

Podjedinica H arhejske RNA-polimeraze: od kloniranja do istraživanja interakcije s atipičnom seril-tRNA-sintetazom

Marasović, Mirela

Master's thesis / Diplomski rad

2011

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:026522>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Mirela Marasović

**Podjedinica H arhejske RNA-polimeraze: od kloniranja
do istraživanja interakcije s atipičnom seril-tRNA-
sintetazom**

Diplomski rad

Zagreb, 2011. godina

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Weygand-Đurašević, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Puno hvala...

Mentorici prof. dr. sc. Ivani Weygand-Đurašević na pruženom povjerenju i što mi je pružila priliku izrade ovog zanimljivog diplomskog rada.

Neposrednoj voditeljici dr. sc. Jeleni Jarić što je sa mnom podijelila svoje bogato znanje i iskustvo, na ukazanom povjerenju, razumijevanju i uloženom trudu pri izradi rada, te na zabavnoj atmosferi.

Svim članovima Zavoda za biokemiju na ugodnoj atmosferi i savjetima, a osobito Neveni na velikoj pomoći i dozama smijeha u kasnim popodnevnim satima. Također hvala Vlatki, Morani i Marku na pomoći u eksperimentalnom dijelu rada.

Naposljetku najveća hvala mojim najbližima koji su uvijek bili uz mene... Mami i tati što su uvijek tu... bratu na vrijednim savjetima i što je uvijek bio spreman pomoći... Filipu na ljubavi i razumijevanju... najdražim prijateljima na zabavnim druženjima i velikoj podršci koja mi puno znači!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

**Podjedinica H arhejske RNA-polimeraze: od kloniranja do istraživanja
interakcije s atipičnom seril-tRNA-sintetazom**

Mirela Marasović

Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu,
Roosveltov trg, 10000 Zagreb

Interakcija podjedinice H arhejske RNA-polimeraze (RpoH) i seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa iz arheje *Methanothermobacter thermautotrophicus* (MtSerRS) detektirana je ranije u laboratoriju sustavom dvaju hibrida. Asocijacija MtSerRS:RpoH vrlo je zanimljiva budući da se radi o proteinima uključenim u proces koji je od vitalne važnosti za život stanice – ekspresiju gena. Funkcija arhejske RNA-polimeraze je transkripcija svih gena, dok MtSerRS aminoacilira tRNA^{Ser} serinom te na taj način opskrbljuje ribosom supstratima za elongacijsku fazu translacije.

U svrhu potvrde stvaranja kompleksa MtSerRS:RpoH tehnikama *in vitro*, bilo je potrebno pročistiti pojedine proteine u dovoljnim količinama. Zato je gen *rpoH* umnožen lančanom reakcijom polimeraze i ugrađen u vektor pod kontrolom jakog T7 promotora. Optimiran je sustav za prekomjernu ekspresiju i pročišćavanje RpoH iz bakterije *E.coli*, a zatim je RpoH pročišćen u preparativnoj količini. Također, prekomjerno je ekspimirana i pročišćena MtSerRS. Interakcija dvaju proteina istražena je gel-retardacijskom elektroforezom i supročišćavanjem kompleksa na koloni. Preliminarni rezultati dali su naznaku stvaranja kompleksa na nativnom gelu, međutim supročišćavanjem kompleksa na koloni asocijacija MtSerRS:RpoH nije detektirana.

Rad sadrži: 77 stranica, 27 slika, 7 tablica, 67 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: arheje, *Methanothermobacter thermautotrophicus*, seril-tRNA-sintetaza metanogenog tipa, podjedinica H arhejske RNA-polimeraze, gel-retardacijska elektroforeza, supročišćavanje kompleksa na koloni

Voditelj: Dr. sc. Ivana Weygand-Đurašević, red. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Ivana Weygand-Đurašević, red. prof.
Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, doc.
Dr. sc. Ivana Ivančić-Baće, doc.

Rad prihvaćen: 15.06.2011.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Archaeal RNA polymerase subunit H: from cloning to investigation of interaction with atypical seryl-tRNA synthetase

Mirela Marasović

Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb,
Roosveltova trg 6, 10000 Zagreb

A yeast two hybrid screen performed earlier in our laboratory revealed interaction of Archaeal RNA polymerase subunit H (RpoH) and methanogenic-type seryl-tRNA synthetase from Archaea *Methanothermobacter thermautotrophicus* (MtSerRS). Association MtSerRS:RpoH is very interesting since both proteins are involved in a process vital for cell's life – expression of genes. Archaeal RNA polymerase transcribes genes while MtSerRS aminoacylates tRNA^{Ser} with serine and supplies ribosome with substrates for elongation phase of translation.

In order to confirm the formation of MtSerRS:RpoH complex by *in vitro* methods, it was necessary to obtain the individual proteins in sufficient amounts. Therefore, *rpoH* gene was amplified using PCR and cloned in a vector under control of T7 strong promoter. The system for overexpression and purification of RpoH in *Escherichia coli* was optimized, and then RpoH was purified for preparative purposes. Also, MtSerRS was overexpressed and purified. The interaction between two proteins was investigated by gel-retardation electrophoresis and pull-down assay. Preliminary results indicate complex formation on native gel, but the association MtSerRS:RpoH was not detected by pull-down assay.

The thesis has: 77 pages, including 27 figures, 7 tables, 67 references, original in: Croatian

Thesis deposited in the Central biological library

Key words: Archaea, *Methanothermobacter thermautotrophicus*, methanogenic-type seryl-tRNA synthetase, RNA polymerase subunit H, gel-retardation electrophoresis, pull-down assay

Supervisor: Dr. sc. Ivana Weygand-Đurašević, Prof.

Reviewers: Dr. sc. Ivana Weygand-Đurašević, Prof.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Asst. Prof.

Dr. sc. Ivana Ivančić-Baće, Asst. Prof.

Thesis accepted: 15.06.2011.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Arheje.....	1
1.2. RNA-polimeraze.....	3
1.2.1. Biološka uloga RNA-polimeraza	3
1.2.2. Arhejska RNA-polimeraza	5
1.1.1. Podjedinica H arhejske RNA-polimeraze (RpoH)	8
1.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze	11
1.3.1. Biološka uloga aminoacil-tRNA-sintetaza	11
1.3.2. Interakcije aminoacil-tRNA-sintetaza s drugim proteinima.....	15
1.3.3. Seril-tRNA-sintetaze	18
1.3.4. Seril-tRNA-sintetaza metanogenog tipa.....	20
1.4. Stanično usmjeravanje supstrata	23
1.5. Cilj istraživanja	25
2. MATERIJALI I METODE	26
2.1. Materijali.....	26
2.1.1. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline	26
2.1.2. Sojevi bakterije <i>E. coli</i>	27
2.1.3. Ekspresijski sustav pPROEX Ht i vektor pPROEX Htb.....	28
2.1.4. Početnice za lančanu reakciju polimeraze.....	30
2.2. Metode	30
2.2.1. Metode rada s DNA	30
2.2.1.1. Kloniranje gena za podjedinicu H RNA-polimeraze (RpoH)	30
2.2.1.2. Elektroforeza molekula DNA u gelu agaroze	32
2.2.1.3. Transformacija stanica <i>E. coli</i> elektroporacijom	33
2.2.1.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR) na bakterijskim kolonijama.....	34
2.2.1.5. Određivanje slijeda nukleotida DNA (sekvenciranje).....	34
2.2.1.6. Određivanje koncentracije DNA	35
2.2.2. Metode rada s proteinima	35
2.2.2.1. Priprema prekonocne kulture transformiranih stanica	35
2.2.2.2. Optimiranje prekomjerne ekspresije gena za protein RpoH.....	35

2.2.2.3.	Priprema proteinskih ekstrakata s nadeksprimiranom RpoH i MtSerRS u preparativne svrhe	38
2.2.2.4.	Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu	39
2.2.2.5.	Poliakrilamidna denaturirajuća elektroforeza na gelu u prisutnosti natrijevog dodecil-sulfata (SDS-PAGE).....	42
2.2.2.6.	Ugušćivanje proteina ultrafiltracijom i izmjena pufera gel-filtracijom ...	43
2.2.2.7.	Bojanje SDS-poliakrilamidnih gelova bojom <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	43
2.2.2.8.	Bojanje nativnih poliakrilamidnih gelova srebrom	44
2.2.2.9.	Određivanje masene koncentracije proteina	45
2.2.2.10.	Retardacijska gel-elektroforeza	46
2.2.2.11.	Supročišćavanje kompleksa na Ni-NTA agarozu (engl. <i>pull-down</i>)	47
3.	REZULTATI	49
3.1.	Konstrukcija rekombinantnog plazmida za prekomjernu ekspresiju gena <i>rpoH49</i>	
3.2.	Optimiranje uvjeta prekomjerne ekspresije gena za protein RpoH.....	51
3.2.1.	Utvrđivanje optimalnog vremena prekomjerne ekspresije gena za protein RpoH	51
3.2.2.	Testiranje ekspresije gena za protein RpoH u ekspresijskim stanicama BL21	52
3.2.3.	Utvrđivanje optimalne koncentracije IPTG-a za indukciju ekspresije gena za protein RpoH	53
3.2.4.	Provjera tendencije RpoH za stvaranjem inkluzijskih tijela	55
3.3.	Prekomjerna ekspresija gena i pročišćavanje RpoH na Ni-NTA agarozu u preparativne svrhe	56
3.4.	Prekomjerna ekspresija gena i pročišćavanje MtSerRS na Ni-NTA agarozu u preparativne svrhe	58
3.5.	Retardacijska gel-elektroforeza u ispitivanju interakcije RpoH i MtSerRS.....	60
3.6.	Supročišćavanje kompleksa RpoH:MtSerRS na Ni-NTA agarozu.....	62
4.	RASPRAVA	65
5.	ZAKLJUČAK	69
6.	LITERATURA	70
7.	ŽIVOTOPIS.....	X

POPIS KRATICA I SIMBOLA***Popis aminokiselina***

simbol	Aminokiselina
<i>Ala (A)</i>	<i>Alanin</i>
<i>Cys (C)</i>	<i>Cistein</i>
<i>Asp (D)</i>	<i>asparaginska kiselina</i>
<i>Glu (E)</i>	<i>glutaminska kiselina</i>
<i>Phe (F)</i>	<i>Fenilalanin</i>
<i>Gly (G)</i>	<i>Glicin</i>
<i>His (H)</i>	<i>Histidin</i>
<i>Ile (I)</i>	<i>Izoleucin</i>
<i>Lys (K)</i>	<i>Lizin</i>
<i>Leu (L)</i>	<i>Leucin</i>
<i>Met (M)</i>	<i>Metionin</i>
<i>Asn (N)</i>	<i>Asparagin</i>
<i>Pro (P)</i>	<i>Prolin</i>
<i>Gln (Q)</i>	<i>Glutamin</i>
<i>Arg (R)</i>	<i>Arginin</i>
<i>Ser (S)</i>	<i>Serin</i>
<i>Thr (T)</i>	<i>treonin</i>
<i>Val (V)</i>	<i>valin</i>
<i>Trp (W)</i>	<i>triptofan</i>
<i>Tyr (Y)</i>	<i>tirozin</i>

Popis kratica

aaRS: aminoacil-tRNA-sintetaza

aa-AMP: aminoacil-adenilat

AMP: adenzin-5'-monofosfat

APS: amonijev persulfat

ATP: adenzin-5'-trifosfat

BSA: albumin goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*)

DTT: ditioneitol

EDTA: etilendiamintetraoctena kiselina

Hepes: N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina

His₆ : privjesak od šest histidina

IPTG: izopropil-β-D-tiogalaktozid (engl. *Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*)

LB: Luria-Bertani medij, kompletni medij za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

MtSerRS: seril-tRNA-sintetaza metanogenog tipa iz arheje *M. thermautotrophicus*

M. thermautotrophicus: *Methanothermobacter thermautotrophicus*

Ni-NTA: nikal-nitrilotrioctena kiselina

PCR: lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

PMSF: fenilmetilsulfonil fluorid

SDS: natrijev dodecilsulfat

SDS-PAGE: SDS-poliakrilamidna gel-elektroforeza

rRNA: ribosomska RNA

RpoH: podjedinica H DNA-ovisne RNA-polimeraze

tRNA: transfer RNA

Tris: Tris(hidroksimetil)-aminometan

1. UVOD

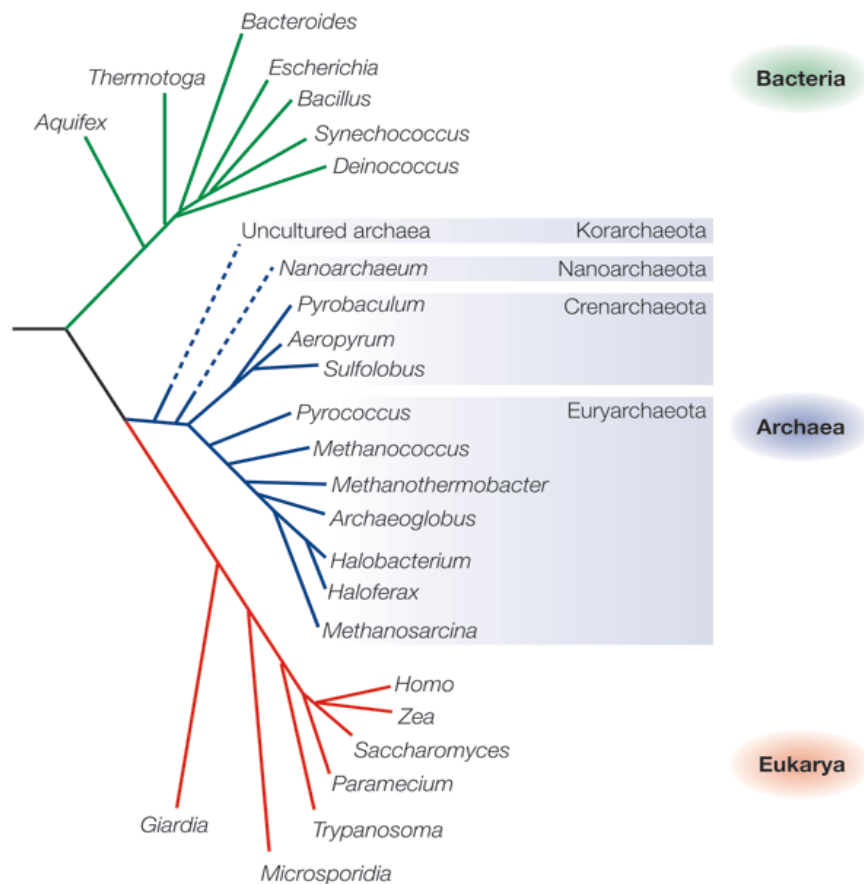
1.1. Arheje

Woese i Fox su davne 1977. karakterizacijom 16S ribosomskih RNA (rRNA) utvrdili da se život na Zemlji može podijeliti u tri domene života: dvije prokariotskog tipa – *Archaea* i *Bacteria* te jednu eukariotskog – *Eukarya* (slika 1.1). *Archaea* su jednostanični prokariotski mikroorganizmi koji pokazuju veliku raznolikost u pogledu morfologije i veličine, fiziologije, adaptacije na ekstremne uvjete okoliša i veličinu genoma (0,49 – 5,75 Mpb). Većina do danas identificiranih ekstremnih termofila pripada arhejskoj domeni, no arheje nalazimo u gotovo svim prirodnim okolišima pa čak i antropogenim biotopima. Također, u domeni nalazimo i neke simbiote (npr. članovi reda *Methanosarcinales* u zajednicama mikroba anaerobno oksidiraju metan, *Methanobrevibacter smithii* u ljudskoj utrobi) te parazite (npr. *Nanoarchaeum equitans*).

Sve kultivirane arheje prvotno su podijeljene u dva koljena: *Crenarchaeota*, koje obuhvaća uglavnom hipertermofilne arheje, te *Euryarchaeota* u kojeg su uvrštene uglavnom halofilne i metanogene arheje (Woese i sur. 1990). Amplifikacijom 16S rRNA iz okolišnih uzoraka identificirano je treće koljeno *Korarchaeota* (Barns i sur. 1996), a četvrto *Nanoarchaeota* uspostavljeno je otkrićem jedinog predstavnika koljena, parazitskog hipertermofila *Nanoarchaeum equitans* (Brochier i sur. 2005) (slika 1.1).

Komparativne i filogenetske analize sekvenciranih arhejskih genoma, koji su postali dostupni kasnih 1990-ih godina, potvrdile su navedeni koncept o tri domene, ali otkrile i prvotno vrlo iznenađujuću činjenicu – arheje sadrže mozaik bakterijskih i eukariotskih karakteristika: metabolički i strukturni proteini arheja nalikuju bakterijskim, no geni uključeni u procesiranje genetičke informacije nalikuju onima u eukariota. Naime, arheje i drugi prokarioti, bakterije, dijele jednostaničnu građu, sličnu veličinu (0,1-15 μm) i oblik. Pripadajući prokariotima, nemaju jezgru i genetička informacija je prisutna u obliku kružnog kromosoma, a ne posjeduju niti druge membranama obavijene organele. Arheje, poput bakterija, sadrže policistranske transkripcijske jedinice te za inicijaciju translacije koriste sekvencu Shine-Dalgarno. Unatoč brojnim sličnostima s bakterijama, arheje posjeduju gene i neke metaboličke puteve koji nalikuju

onima u eukariota, a među njima se osobito ističu enzimi uključeni u proces transkripcije i translacije. Iznenadjuće sličnosti u procesiranju genetičkih informacija između arheja i eukariota su po prvi puta uočili Huet i sur. (1983) imunološkim analizama pročišćene arhejske i eukariotske RNA-polimeraze. Ostali aspekti arhejskih karakteristika su jedinstveni, kao što je npr. specifična građa membranskih lipida (izoprenoidni eteri na okosnici od glicerol-1-fosfata) i stanične stijenke (nema peptidoglikana i u većine arheja izgrađena je od proteina).

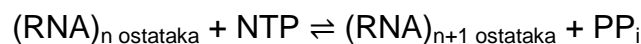


Slika 1.1. Podjela živog svijeta na tri domene. Domena *Archaea* je podijeljena na četiri koljena: *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota*, *Nanoarchaeota*. Preuzeto iz Allers i Mevarech 1995.

1.2. RNA-polimeraze

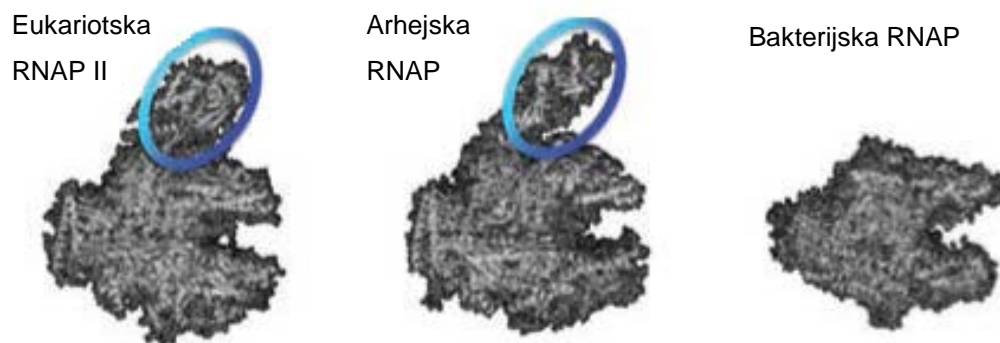
1.2.1. Biološka uloga RNA-polimeraza

U svim organizmima u prvom koraku preuzimanja genetičke informacije iz DNA sudjeluju DNA-ovisne RNA-polimeraze (RNA-polimeraza, RNAP). To su višepodjedinični enzimski kompleksi koji na sofisticiran način transkribiraju gene, tj. odgovorni su za prepisivanje genetičke informacije iz molekula DNA u molekule RNA, koje zatim služe ribosomima kao upute prema kojima se sintetiziraju proteini. RNA-polimeraze kataliziraju nastajanje fosfodieterske veze između nukleozid-trifosfata (NTP): ATP, CTP, GTP i UTP prema kalupu DNA u reakciji koju termodinamski povoljnom čini hidroliza otpuštenog pirofosfata (PP_i). Osnovna reakcija glasi:



U prokariotskim stanicama jedan tip multiproteinske mašinerije transkribira na tisuće različitih gena, dok je kod svih eukariota uloga transkripcije gena podijeljena između tri vrlo srodna enzima, RNA-polimeraze I, II, III (RNAP I, II, III) (Cramer 2002). Svaka od eukariotskih polimeraza specijalizirana je za transkripciju specifičnog seta gena te je podvrgnuta specifičnoj regulaciji. RNAP I transkribira rRNA; stvara jedan prekursor RNA koji se procesira u zrele 28S, 5.8S i 18S rRNA. Transkript RNAP II puno je složeniji jer osim različitih mRNA koje kodiraju proteine uključuje i nekodirajuće RNA poput malih jezgrinih RNA (engl. *small nuclear RNA*, snRNA), malih RNA jezgrice (engl. *small nucleolar RNA*, snoRNA) ili micro (mi) RNA. Produkti RNAP III čine najraznolikiju grupu transkripata koja uključuje tRNA, 5S rRNA i U6 snRNA. Kod biljaka u jezgri nalazimo još dva dodatna enzima, RNA-polimerazu IV i V (Herr i sur. 2005, Kanno i sur. 2005) koje imaju ulogu u stvaranju malih interferirajućih RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) i genskom utišavanju repetitivnih sekvenci DNA RNA-usmjerenom DNA-metilacijom (Till i Ladurner 2007).

Na osnovi usporedbe sekvenci, struktura, funkcija i mehanizama višepodjediničnih RNA-polimeraza iz različitih domena života, vidljivo je da su međusobno vrlo srodne (slika 1.2) te da su vjerojatno nastale od zajedničkog pretka.



Slika 1.2. Prikaz RNA-polimeraza iz tri domene života (*Eukarya*, *Archaea* i *Bacteria*). RNAP su vrlo srodne, a arhejska RNAP pokazuje najveću homologiju s eukariotskom RNA-polimerazom II. Plavim krugovima označene su podjedinice F/E koje čine karakterističnu stabljiku arhejske i eukariotskih RNAP. Preuzeto iz Grohmann i Werner 2010.

Sinteza RNA jedan je od osnovnih i evolucijski konzerviranih enzimskih procesa u živim stanicama. Transkripcijski ciklus općenito se dijeli na tri faze: inicijaciju, elongaciju i terminaciju, tijekom kojih enzim prolazi brojne strukturne rearanžmane i stupa u interakciju s transkripcijskim faktorima. Inicijacija transkripcije odvija se na specifičnim sljedovima DNA, promotorima, koji se sastoje od 40 pb te se nalaze uzvodno, na 5' kraju gena. Nakon vezanja na DNA, RNAP prelazi iz zatvorenog kompleksa u otvoreni kompleks, tijekom čega se razdvajaju lanaci DNA kako bi se formirao razmotani dio DNA od otprilike 13 pb (ovisno o tipu RNAP). Ribonukleotidi se sparuju s kalupom DNA prema Watson-Crickovim pravilima sparivanja baza te RNAP katalizira polimerizaciju komplementarnih lanaca RNA. Za razliku od DNA-polimeraze, RNA-polimeraza inicira polimerizaciju *de novo* i ne zahtijeva početnicu. Zbog čvrste veze s promotorom, RNAP u početnim ciklusima ne može formirati transkripte pune dužine, već nastaju kratki fragmenti (otprilike 9 pb) u procesu koji se naziva abortivna transkripcija. Tek se nakon toga enzim „oslobodi“ promotora i započinje sinteza transkripata pune duljine. RNAP upotrebljavaju osnovni molekularni mehanizam dodatka nukleotida pomoću dva metalna iona, koji je karakterističan za sve polinukleotid-polimeraze (Steitz 1998). Naime, u aktivnom mjestu RNAP nalaze se dva iona magnezija. Jedan od njih je permanentno vezan (metal A) dok je drugi mobilan Mg^{2+} (metal B). Metal A je koordiniran pomoću tri očuvana ostatka aspartata i veže 3'-

OH kraj RNA (Cramer i sur. 2001) čime smanjuje afinitet 3'-OH skupine riboze za vodikom i omogućuje napad 3' O⁻ na α -fosfat nadolazećeg NTP-a. Metal B veže NTP (Westover i sur. 2004) i pomaže pri otpuštanju pirofosfata (PP_i).

1.2.2. Arhejska RNA-polimeraza

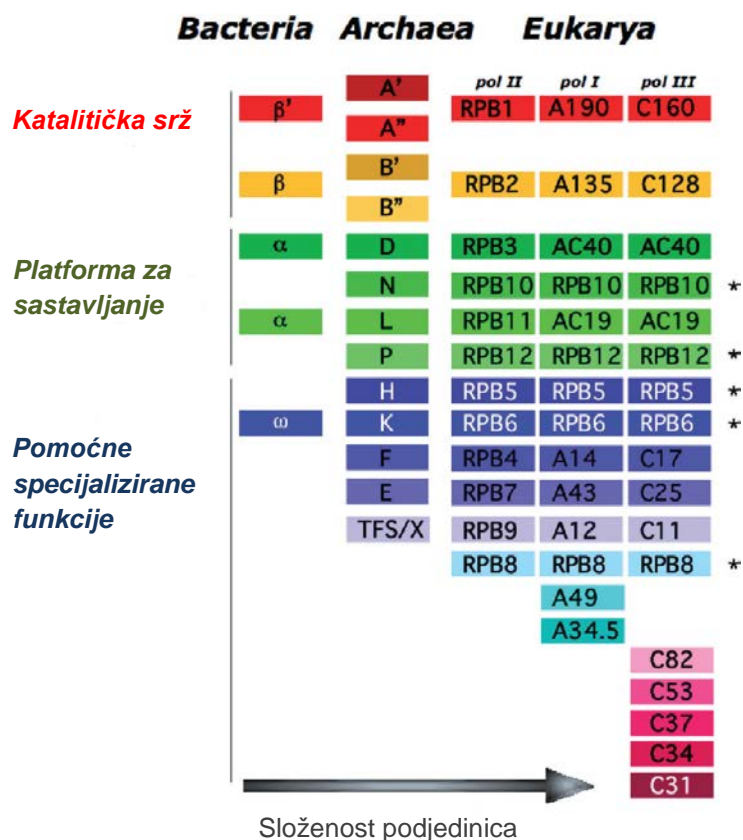
Arhejska DNA-ovisna RNA-polimeraza (RNAP) molekulske je mase oko 370 kDa te je po arhitekturi i sastavu podjedinica, elementima promotora i osnovnim transkripcijskim faktorima potrebnima za inicijacijsku i elongacijsku fazu transkripcije usko srodna eukariotskoj RNAP II (Werner 2007). Sastav podjedinica arhejske RNAP podliježe malim varijacijama između *Euryarchaeota* i *Crenarchaeota*; samo posljednje sadrže podjedinicu G koja je homologna eukariotskoj RPB8 (Grohmann i sur. 2009).

RNAP iz *M. thermautothropicus* je izgrađena od 12 podjedinica. Podjedinice se označavaju slovima te imaju homologe u svim podjedinicama RNAP II uz dvije iznimke (RPB8 i RPB9) (Kusser i sur. 2008). Studije *in vitro* rekonstitucija varijanata arhejskih RNAP u odsutnosti određenih podjedinica (Naji i sur. 2007, Werner i Weinzierl 2002) pružaju uvid o funkcijama istih te se na osnovi takvih studija podjedinice mogu podijeliti u tri grupe; podjedinice koje sudjeluju u:

- i. katalizi (A/A', B/B', ili B)
- ii. udruživanju podjedinica (L, N, D, P)
- iii. dodatnim funkcijama (F, E, H i K)

Usporedbom sastava podjedinica RNAP u u tri domene života (slika 1.3) vidljivo je da bakterijska RNAP posjeduje najjednostavniju organizaciju iz koje se može izvesti struktura ostalih RNA-polimeraza. Srž bakterijske RNA-polimeraze izgrađena je od 5 podjedinica: β/β' (katalitičke podjedinice, homologne arhejskim podjedinicama A i B), dvije α podjedinice (za udruživanje podjedinica, homologne arhejskim podjedinicama L i D) i podjedinice ω (pomoćna podjedinica, homologna podjedinici K) (slika 1.3). Dodatna σ podjedinica je esencijalna za specifično vezanje promotora. Složenost građe raste prema arhejskoj RNAP, a najsloženiju strukturu posjeduju eukariotske RNAP.

Eukariotska RNAP II, homologna arhejskoj RNAP, sadrži još dvije dodatne podjedinice, RPB8 i RPB9 (Young 1991).

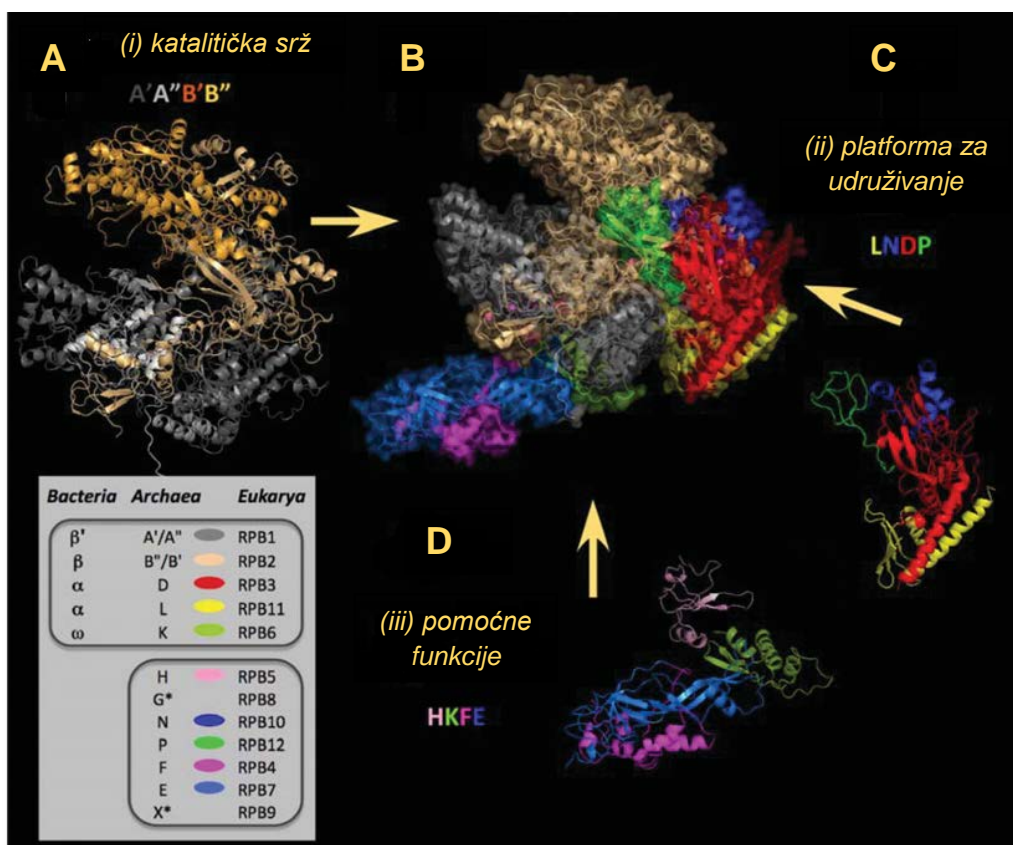


Slika 1.3. Sastav RNAP u tri domene života. Podjedinice su podijeljene prema funkciji i homologne podjedinice su označene istim bojama; podjedinice koje sudjeluju u katalizi, udruživanju podjedinica i dodatnim funkcijama označene su redom crvenom/narančastom, zelenom i plavom bojom. Podjedinice označene zvijezdicom konzervirane su kod sve tri eukariotske RNA-polimeraze. Neke arheje posjeduju fuzioniranu podjedinicu B (B'-B''). Preuzeto iz Werner 2007.

Katalitičke arhejske podjedinice A i B čine približno 2/3 enzima te se često nazivaju velikim podjedinicama. Formiraju strukturu nalik rakovim kliještima (engl. *crab claw*) (slika 1.4. A) čiji uglovi stupaju u interakciju s nizvodnim dupleksom DNA, a na njihovom sučelju se nalazi katalitički centar s tri karakteristična ostatka aspartata i dva iona Mg^{2+} (u centru "klijesta"). Također grade vezna mjesta za NTP-ove i hibrid RNA/DNA. Arhejske velike podjedinice su usko srodne bakterijskim homologima (β/β'), ali je tijekom evolucije došlo do fisije gena za bakterijske β/β' podjedinice pa u arheja

nastaju podijeljene podjedinice. Stoga u arheja velike podjedinice mogu biti sastavljene od tri polipeptida (A'/A"/B, npr. kod *Pyrococcus furiosus*) ili četiri polipeptida (A'/A"/B'/B", npr. kod *Methanocaldococcus jannaschii*) (Werner 2007).

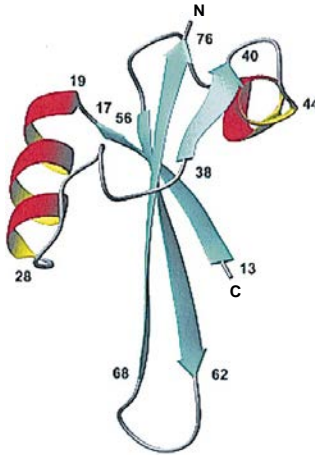
Efikasno udruživanje velikih podjedinica ovisi o malim podjedinicama L, N, D i P. Navedene podjedinice formiraju stabilni kompleks nasuprot mjesta ulaska za DNA i uglova „rakovih kliješta“ (Grohmann i sur. 2009) (slika 1.3. C). Pomoćne podjedinice H, K, F i E (slika 1.4. D) nisu esencijalne za polimerizaciju, ali stupaju u interakciju s osnovnim transkripcijskim faktorima i stabiliziraju interakcije s lancima nukleinskih kiselina u ternarnom elongacijskom kompleksu RNAP-DNA-RNA. Podjedinica H formira „donju čeljust“ i stupa u interakciju s nizvodnom DNA (Bartlet i sur. 2004). Podjedinice F/E se šire iz RNAP poput stabljike i stupaju u interakciju s novosintetiziranim transkriptima RNA (Ujvari i Luise 2006). U arheja su stabilno ugrađene u RNAP (Grohman i sur. 2009B) za razliku od eukariotske RNAP II gdje reverzibilno asociraju s enzimom.



Slika 1.4. Strukturna organizacija arhejske RNAP. Podjedinice su podijeljene u tri grupe prema funkciji **A)** kataliza **C)** udruživanje i **D)** dodatne funkcije. Podjedinice su različito obojane prema indeksu u lijevom kutu, u kojem su homologne podjedinice RNAP bakterija, arheja i eukariotske RNAP II prikazane u istom redu. Preuzeto i prilagođeno iz Grohmann i sur. 2009.

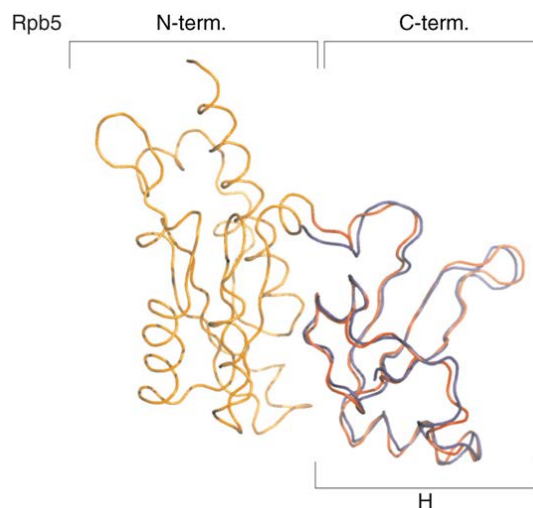
1.1.1. Podjedinica H arhejske RNA-polimeraze (RpoH)

Podjedinica H arhejske DNA-ovisne RNA-polimeraze iz *M. thermautotrophicus* (RpoH) ima molekulsku masu od 9460 Da te je njena struktura u otopini određena metodom nuklearne magnetske rezonancije (NMR; Yee i sur. 2000). Radi se o vrlo bazičnom proteinu (pI 10,1) visoke termalne stabilnosti ($T_m = 85\text{ }^\circ\text{C}$) koji ima oblik spljoštene gljive (slika 1.5). Posjeduje platformu izgrađenu od četiri β -lanca koji se nalaze u sendviču između dva α -lanca.



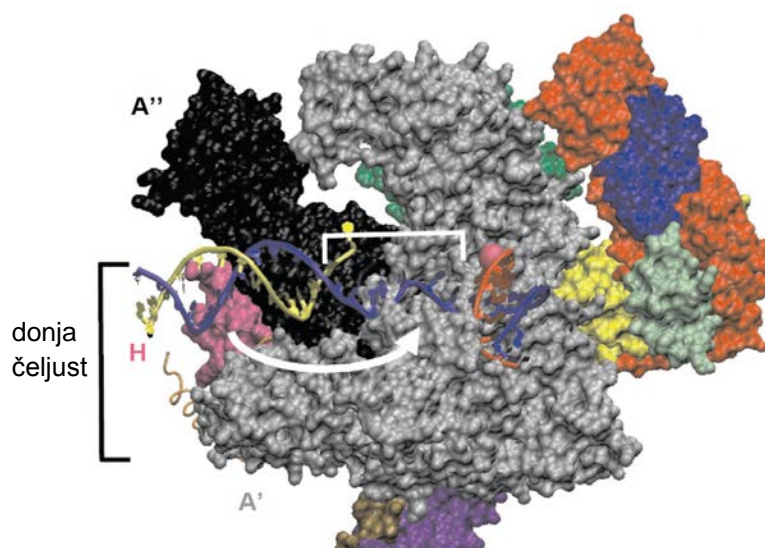
Slika 1.5. Vrpčasti prikaz strukture podjedinice H arhejske RNAP iz *M. thermautotrophicus* određene metodom NMR. Podjedinica je izgrađena od četiri β -lanca (plave boje) i dvije α -uzvojnice (crvene boje). Preuzeto iz Yee i sur. 2000.

Podjedinica H homologna je C-terminalnoj domeni eukariotske podjedinice RPB5 (slika 1.6). N-terminalna domena RPB5, koja u arheja izostaje, važna je za interakciju s transkripcijskim faktorom TFIIF. C-terminalna domena visoko je konzervirana u arheja i eukariota što sugerira na očuvanu funkciju.



Slika 1.6. Superpozicija terciarnih struktura podjedinice RPB5 kvašćeve RNAP II i podjedinice H arhejske RNAP iz *S. solfataricus*. Preuzeto iz Grünberg i sur. 2010.

Studije kovalentnog povezivanja molekula (engl. *crosslinking*) koje su rađene na arhejskim elongacijskim kompleksima pokazuju da je RpoH potrebna za rane korake inicijacije: sudjeluje u procesu razdvajanja lanaca DNA i ranoj transkripciji. Za razliku od podjedinice RPB5 eukariotske RNAP II, prolazi strukturne rearanžmane tijekom transkripcijskog ciklusa (Grünberg i sur. 2010). Naime, kako bi se objasnili rezultati *crosslinking*-a, postavljen je model prema kojem se pozicija donjih čeljusti, koju grade podjedinice A', A'' i H, mijenja tijekom prijelaza iz inicijacijske u elongacijsku fazu (slika 1.7). Pri tome podjedinica H dolazi u blizinu nizvodne DNA (položaj +3) u odnosu na aktivno mjesto (bijela strelica), a podjedinica A'' u blizinu transkribiranog lanca DNA u duplesu RNA/DNA. Pretpostavlja se da neki vanjski modulator uzrokuje fleksibilnost donje čeljusti i na taj način regulira strukturu elongacijskog kompleksa, te da tijekom terminacije dolazi do rearanžmana donjih čeljusti u pre-elongacijsko stanje.



Slika 1.7. Model konformacijske promjene donjih čeljusti arhejske RNAP. Podjedinice H, A'' i A' obojane su redom ružičastom, crnom i sivom bojom. Podjedinica B nije prikazana kako bi se mogla vizualizirati nukleinska kiselina. Lanac koji se prepisuje (kalup) prikazan je plavom bojom, dok je kodirajući lanac žute boje. Aktivno mjesto je označeno rozom kuglicom. Bijela strelica prikazuje konformacijsku promjenu podjedinice H. Preuzeto iz Grünberg i sur. 2010.

1.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze

1.3.1. Biološka uloga aminoacil-tRNA-sintetaza

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji imaju važnu ulogu u procesu translacije - kataliziraju esterifikaciju molekula tRNA pripadnim aminokiselinama (Ibba i Söll 2001). Nastale molekule aminoacil-tRNA zatim selektivno vežu elongacijski faktori (EF-Tu kod bakterija, EF-1A kod arheja i eukariota) koji se nalaze u svojoj „GTP formi“ (imaju vezanu molekulu GTP). Takav novonastali ternarni kompleks (aatRNA:EF:GTP) dostavlja aminoacil-tRNA na ribosom gdje ista služi kao materijal u biosintezi proteina; antikodon u tRNA sparuje se s kodonom u mRNA te se aktivirana aminokiselina prenosi na rastući polipeptidni lanac.

AaRS čine porodicu od 20 enzima, pri čemu je pojedina aaRS specifična za jednu aminokiselinu i jednu ili više pripadnih izoakceptorskih tRNA. U prokariotima postoje odstupanja od tog broja, što je posljedica udvostručenja gena za neke aaRS i postojanja indirektnih puteva za biosintezu određenih aminoacil-tRNA. Naime, bakterijama i arhejama često nedostaju GlnRS, AsnRS ili obje sintetaze, te Gln-tRNA^{Gln} i Asn-tRNA^{Asn} nastaju putem indirektna biosinteze. Pritom nediskriminirajuće GluRS i AspRS misaciliraju tRNA^{Gln} i tRNA^{Asn}, a nastaju Glu-tRNA^{Gln} i Asp-tRNA^{Asn}. Završni korak kataliziraju odgovarajuće amidotransferaze i dobivaju se ispravno aminoacilirane Gln-tRNA^{Gln} i Asn-tRNA^{Asn} (Szymanski i Barciszewski 1999, Woese i sur. 2005). Suprotno tome, svi eukarioti posjeduju potpuni set gena koji kodiraju aaRS.

Iako aaRS kataliziraju istu osnovnu reakciju te imaju zajedničke supstrate (ATP) i kofaktore (magnezij), formiraju divergentnu grupu enzima. Na osnovi usporedbe katalitičkih domena, očuvanih sljedova i interakcija s pripadnim tRNA dijele se u dva konzervirana razreda (razred I i II) s po deset enzima (Eriani i sur. 1990, Ibba i sur. 1997) (tablica 3.1). Iznimka je LysRS koja je kod većine arheja i nekih bakterija enzim razreda I, dok je u svim ostalim organizmima član razreda II (Ibba i sur. 1997).

Aktivno mjesto aaRS razreda I (aaRSI) sastavljeno je od dva uzastopna motiva β - α - β koji čine šesterolančanu paralelnu β strukturu poznatu kao Rossmann-ova

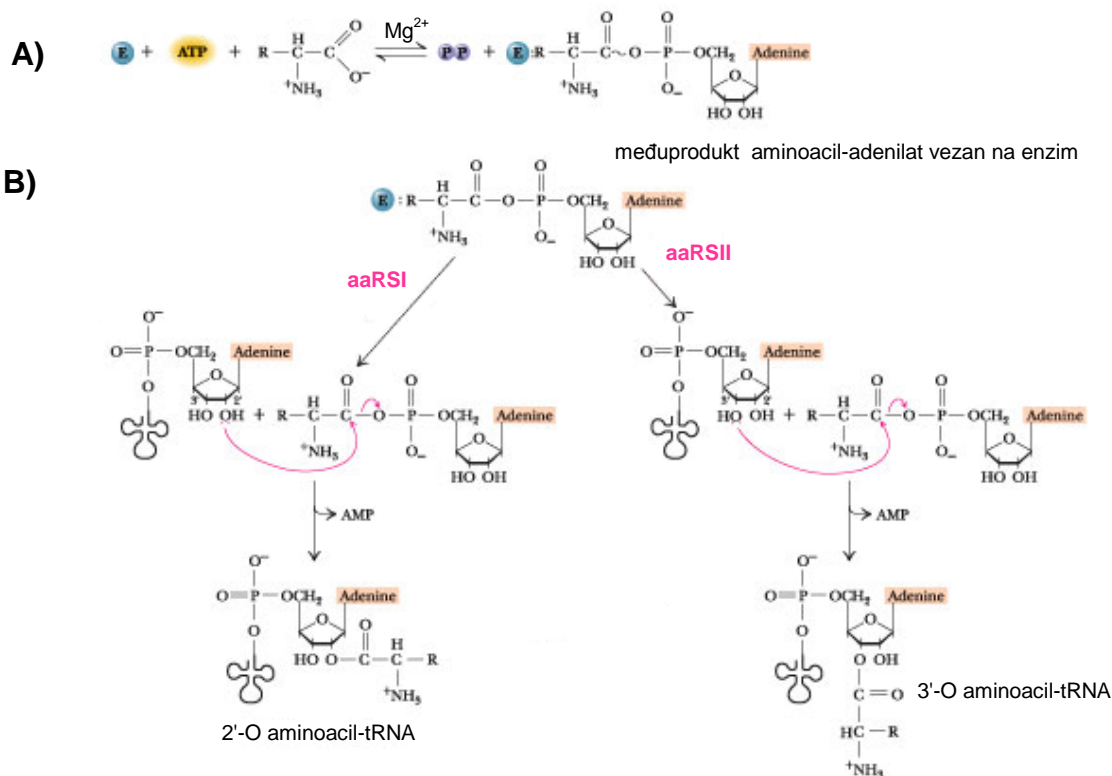
struktura. U njihovom aktivnom mjestu očuvana su dva aminokiselinska slijeda za vezanje ATP-a, motivi KMSKS i HIGH. Katalitička domena aaRS razreda II (aaRSII) nalazi se u antiparalelnoj β -nabranoj ploči okruženoj s α -uzvojnica (Cusak i sur. 1990) te sadrži motive 1, 2 i 3. Motiv 1 dijelom gradi dimerizacijsku površinu enzima, a motivi 2 i 3 čine dio aktivnog mjesta. Sintetaze razreda I su uglavnom monomeri, dok su enzimi razreda II ili dimeri ili tetrameri. Razlike između aaRS razreda I i II očituju se i u strategijama prepoznavanja tRNA. Dok aaRSI prilaze akceptorskoj peteljci tRNA sa strane manjeg utora i vežu aminokiselinu na 2'-OH skupinu 3'-terminalnog adenzina, aaRSII prilaze sa strane velikog utora i aciliraju 3'-OH skupinu (iznimka je PheRS, koja je enzim razreda II, a veže Phe na 2'-OH) (Arnez i Moras 1997, Ibba i sur., 1997). Osim toga postoje i razlike u vezanju molekule ATP: aaRSI vežu ATP u izduženoj konformaciji, dok aaRSII vežu ATP u svijenoj konformaciji.

Tablica 1.1. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza na dva razreda i njihove kvaturne strukture.

Razred I	Kvaterna struktura	Razred II	Kvaterna struktura
GluRS	α	GlyRS	$\alpha_2\beta_2$
GlnRS	α	AlaRS	α_4
ArgRS	α	ProRS	α_2
CysRS	α_2	SerRS	α_2
MetRS	α_2	ThrRS	α_2
ValRS	α	HisRS	α_2
IleRS	α	AspRS	α_2
LeuRS	α	AsnRS	α_2
TyrRS	α_2	LysRS	α_2
TrpRS	α_2	PheRS	$\alpha_2\beta_2$

Svaka aaRS ima tri supstrata: ATP, aminokiselinu i molekulu tRNA, te se osnovni mehanizam aminoaciliranja u većine aaRS odvija u dva stupnja (Ibba i Söll 2000). U prvom koraku odvija se aktivacija aminokiseline ATP-om; ATP i aminokiselina se pozicioniraju u aktivnom mjestu enzima gdje dolazi do nukleofilne supstitucije pri čemu kisik α -karboksilne skupine aminokiseline napada α -fosfat ATP-a (slika 3.1. A). Reakcijom nastaje međuprodukt vezan na enzim, aminoacil-adenilat (aa-AMP), uz oslobađanje anorganskog pirofosfata (PP_i). Reakcija se odvija uz prisutnost kofaktora

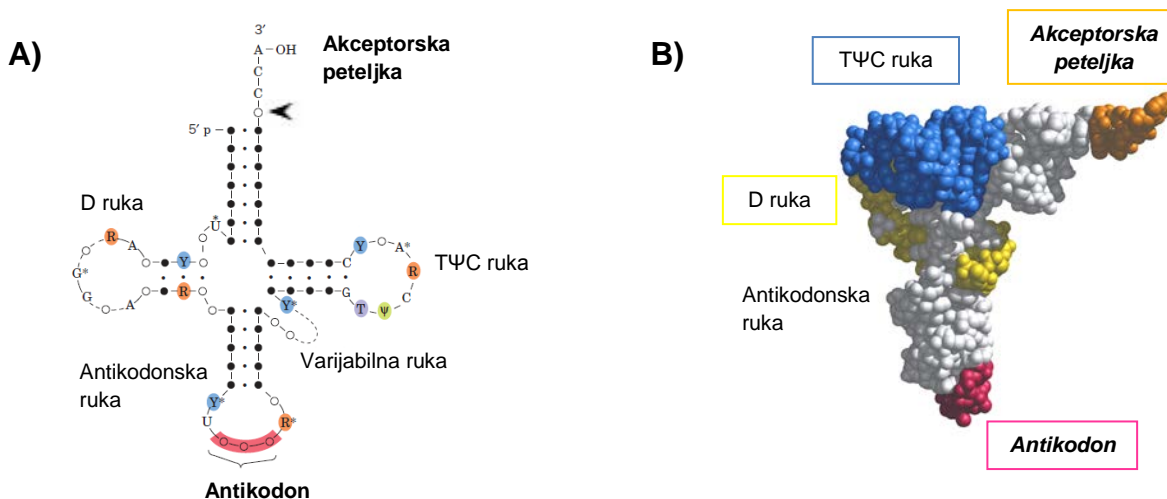
Mg^{2+} koji stabilizira konformaciju ATP-a i sudjeluje u nastanku aminoacil-adenilata. U drugom koraku formira se aminoacil-tRNA; enzim veže tRNA i 2'- ili 3'-terminalna hidroksilna skupina krajnjeg adenzina na 3'-kraju tRNA nukleofilno napada anhidridni ugljikov atom aminoacil-adenilata (slika 3.1. B). Pritom dolazi do prijenosa acilne skupine s aminoacil-adenilata na 3'-terminalnu ribozu pripadne tRNA te nastaje aminoacil-tRNA i AMP kao izlazna skupina. Reakciju termodinamski povoljnom čini hidroliza pirofosfata oslobođenog prilikom aktivacije aminokiseline (koju katalizira anorganska pirofosfataza) čime se njegova koncentracija održava niskom. Arginil-, glutamil-, glutaminil- i lizil-tRNA-sintetaze razreda I imaju malo izmijenjen mehanizam reakcije aminoaciliranja. Naime, kod navedenih sintetaza prvi korak aktivacije aminokiseline nije moguć bez prethodnog vezanja pripadne tRNA na enzim (Cavarelli i Moras 1993).



Slika 1.8. Reakcija aminoaciliranja. A) U prvom stupnju dolazi do aktivacije aminokiseline ATP-om prilikom čega nastaje međuprodukt vezan na enzim, aminoacil-adenilat (aa-AMP) **B)** U drugom stupnju

dolazi do prijenosa acilne skupine s aa-AMP na 2'-OH skupinu riboze (aaRSI) ili 3'-OH skupinu riboze (aaRSII) krajnjeg adenzina tRNA. Preuzeto s <http://web.virginia.edu/Heidi/chapter32/chp32.htm>.

Vjernost reakcije aminoaciliranja postiže se vrlo preciznim odabirom supstrata (aminokiseline i tRNA) od strane aaRS. Strukturni elementi molekule tRNA koji omogućuju prepoznavanje i vezanje pripadnih parova aaRS:tRNA, kao i diskriminaciju nepripadnih, nazivaju se pozitivnim, odnosno negativnim identitetnim elementima (Cavarelli i Moras 1993, Pallanck i Schulman 1992). Na slici 1.2 prikazana je sekundarna (oblik lista djeteline), odnosno tercijarna struktura molekule tRNA (oblik obrnutog slova „L“), te su prikazani osnovni elementi strukture. Identitetni elementi se kod većine tRNA nalaze u antikodonu, akceptorskoj peteljci i na položaju 73 (tzv. diskriminacijski nukleotid). Također, i posttranskripcijske modifikacije tRNA mogu predstavljati identitetne elemente (Muramatsu i sur. 1988). U slučaju kada aaRS katalizira prijenos aminokiseline koja sterički i kemijski nalikuje nekoj drugoj, postoji mogućnost aminoaciliranja tRNA nepripadnom aminokiselinom; takve aaRS posjeduju mehanizme popravka pogreške (engl. *proofreading*).



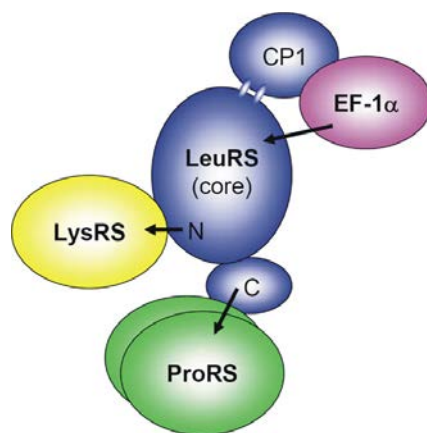
Slika 1.9. Sekundarna (A) i tercijarna (B) struktura tRNA. Najčešći identitetni elementi označeni su podebljano. Diskriminacijski nukleotid 73 označen je strelicom. **A)** Sekundarna struktura ima oblik lista djeteline. Preuzeto iz: Voet i Voet (2004). **B)** Tercijarna struktura tRNA^{Phe}. Preuzeto iz: Nelson i Cox (2005).

1.3.2. Interakcije aminoacil-tRNA-sintetaza s drugim proteinima

Aminoacil-tRNA-sintetaze imaju važnu ulogu u procesu translacije, gdje ribosomima osiguravaju aminokiselinske supstrate za rastući polipeptidni lanac u obliku molekula aminoacil-tRNA. U stanicama se, osim u slobodnoj formi, aminoacil-tRNA-sintetaze nalaze i u binarnim te kompleksima višeg reda, u kojima asociraju s drugim sintetazama, ali i s proteinima koji imaju uloge izvan procesa translacije (Hausmann i Ibba 2008a). Takvi multisintetazni kompleksi (engl. *multisynthetase complex*, MSC) su pronađeni u sve tri domene života, a neki od njih su navedeni u tablici 1.2. Aminoacil-tRNA-sintetaze stoga, pored kanonske uloge u procesu translacije proteina, sudjeluju u različitim staničnim procesima kao što je izrezivanje introna, apoptoza, sastavljanje virusnih čestica, regulacija transkripcije i translacije.

Dok su u bakterijama pronađeni uglavnom binarni kompleksi koji sadrže aminoacil-tRNA-sintetaze u asocijaciji s drugim sintetazama ili staničnim faktorima, u arhejama i eukariotima su prisutni brojni binarni, ali i kompleksi višeg reda. Multisintetazni kompleksi u arheja predmet su intenzivnog istraživanja te ih je do sada pronađeno nekoliko. U arheje *Methanocaldococcus jannaschii* pronađena je stabilna asocijacija ProRS i proteina Mj1338 (Lipman i sur. 2003). Iako funkcija Mj1338 nije potpuno razjašnjena, pokazano je da posjeduje generalni afinitet za tRNA. No, funkcija formiranja kompleksa nije poznata, ali je ustanovljeno da se aminoacilacijska aktivnost ProRS u kompleksu ne razlikuje u odnosu na slobodan enzim. Također je pronađeno da i LysRS i AspRS neovisno stupaju u interakciju s Mj1338 (Lipman i sur. 2003), što sugerira potencijalnu povezanost s arhejskim kompleksom ProRS:Mj1338. Iako postojanje ovakvog složenijeg kompleksa nije potvrđeno, svakako je zanimljivo da su spomenute sintetaze (ProRS, LysRS i AspRS) u eukariotima dio multisintetaznog kompleksa koji se sastoji od devet aaRS (ArgRS, AspRS, GluProRS, GlnRS, IleRS, LeuRS, LysRS, MetRS) i tri dodatna proteina (p43, p38 i p18) (Kerjan i sur. 1994, Robinson i sur. 2000). U arheji *Methanothermobacter thermoautotrophicus* pronađen je MSC sastavljen od leucil-, lizil- i prolil-tRNA-sintetaze koji uspostavlja interakcije s EF-1A (Praetorius-Ibba i sur. 2005) (slika 1.10). Pokazano je da u kompleksu LeuRS stimulira reakcije aminoacilacije LysRS i ProRS 3-5 puta, dok obrnuto ne vrijedi

(Praetorius-Ibba i sur. 2005). Moguća uloga arhejskog MSC je stoga poboljšanje katalitičke efikasnosti LysRS i ProRS. Također je zanimljivo da su te tri aaRS pronađene u MSC sisavaca, što sugerira da je potencijalna biološka uloga kompleksa aaRS u translaciji poboljšanje aminoaciliranja asociranih aaRS. Uz to, u *M. thermoautotrophicus* je pronađen i kompleks EF-1A:LeuRS. U kompleksu EF-1A stimulira reakciju aminoacilacije LeuRS 3 puta, dok je aktivnost EF-1A nepromijenjena (Hausmann i sur. 2007). Nadalje, u našem laboratoriju je nedavno pronađeno da SerRS iz *M. thermoautotrophicus* (MtSerRS) stabilno asocira s arginil-tRNA-sintetazom (MtArgRS) (Godinic-Mikulcic i sur. 2011). Pokazano je da MtArgRS stimulira reakciju aminoacilacije MtSerRS 4 puta, dok suprotno ne vrijedi. Predloženo je da formiranje kompleksa ima ulogu u optimiranju reakcije aminoaciliranja u različitim okolišnim uvjetima, budući da je najizraženiji porast serilacijske aktivnosti uočen u uvjetima povišene temperature i osmolarnosti.



Slika 1.10. Shematski prikaz multisintetaznog kompleksa iz arheje *M. thermoautotrophicus*. LeuRS (označena plavom bojom) predstavlja srž multienzimskog kompleksa te s drugim komponentama MSC uspostavlja interakcije putem različitih domena: s LysRS (žuto) ostvaruje interakciju putem N-terminalne domene, s ProRS (zeleno) putem C-terminalne domene, a s elongacijskim faktorom EF-1A putem domene za popravak pogreške (CP1). Preuzeto iz Hausmann i Ibba 2008b.

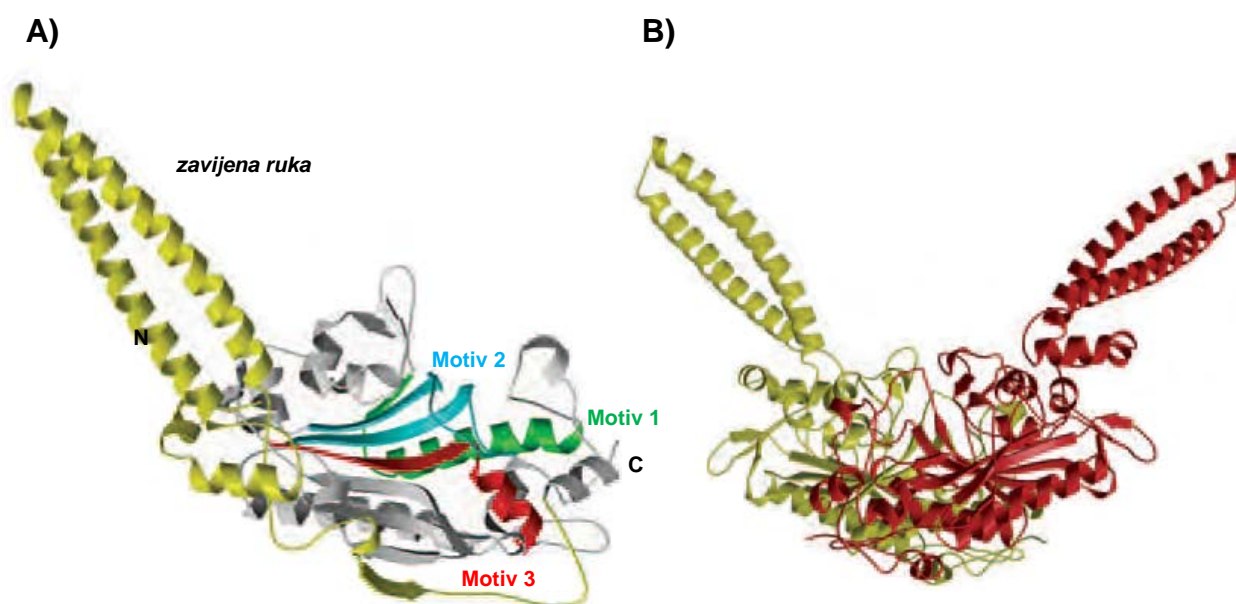
Tablica 1.2. Pregled proteina koji stupaju u interakciju s aminoacil-tRNA-sintetazama. Preuzeto i prilagođeno iz Hausmann i Ibba 2008a.

	AMINOACIL-tRNA-SINTETAZA (razred)	PROTEIN	ORGANIZAM	FUNKCIJA
Bacteria	ProRS (II)	YbaK	<i>H. influenzae</i> ; <i>E. coli</i>	Hidroliza Cys-tRNA(Pro)
	AspRS (II)	GatCAB amidotransferaza	<i>T. thermophilus</i>	Pretvorba Asp-tRNA(Asn) u Asn-tRNA(Asn)
	TrpRS (II)	Sintaza dušičnog oksida	<i>D. radiodurans</i>	Nitracija triptofana, nastaje 4-nitro-Trp
	PheRS (II), TyrRS (I), MetRS (I) GluRS (I), TrpRS (II)		<i>M. pneumoniae</i>	Nepoznata
Archaea	ProRS (II), (LysRS (I), AspRS (II))	Mj1338	<i>M. janaschii</i>	Nepoznata (stabilizira protein)
	LysRS (I), LeuRS (I), ProRS (III)	EF-1A	<i>M. thermautotrophicus</i>	Stimulira aminoacilaciju
	SerRS (II), ArgRS (I)		<i>M. thermautotrophicus</i>	Stimulira aminoacilaciju
Eukarya	MetRS (I), GluRS (I)	Arc1p	<i>S. cerevisiae</i>	Povećan afinitet vezanja tRNA(Met) i tRNA(Glu)
	SerRS (II)	Pex21p	<i>S. cerevisiae</i>	Stimulira vezanje tRNA(Ser)
	ValRS (I)	EF-1A	<i>H. sapiens</i>	Stimulira aminoacilaciju
	AspRS (II)	EF-1A	<i>H. sapiens</i>	Olakšano otpuštanje produkta Asp- tRNA(Asp)
	LysRS (II) I AspRS (II)	EF-1A i p38	<i>H. sapiens</i>	Stimulira aminoacilaciju
	GluProRS (I, II)	L13a, GAPDH, NSAP1	<i>H. sapiens</i>	Translacijsko utišavanje
	LysRS (II)	HIV-1 Gag	<i>H. sapiens</i>	Sklapanje virusnih čestica; pakiranje tRNA(Lys)
	LysRS(II),AspRS(II) LeuRS (I),IleRS (I), GluProRS (I,II), MetRS (I),GlnRS (I), ArgRS (I)	p18, p38, p43	<i>Chordata</i>	Nepoznata (citoplazmatska lokalizacija aaRS, stabilizacija proteina, kontrola dodatnih funkcija aaRS)

1.3.3. Seril-tRNA-sintetaze

Seril-tRNA-sintetaze (SerRS) su enzimi koji u svim organizmima imaju esencijalnu ulogu aminoaciliranja nekoliko izoakceptora tRNA^{Ser} serinom (Ibba i Söll 2001). Enzimi također seriliraju selenocisteinske tRNA (tRNA^{Sec}) na kojima se zatim serin konvertira u selenocistein, te stoga sudjeluju i u kotranslacijskoj ugradnji 21. aminokiseline u proteine (Leinfelder i sur. 1988).

SerRS su homodimerni proteini relativne molekulske mase 100 000 – 120 000 te pripadaju IIa razredu aaRS (Weygand-Đurašević i Cusack 2005) (slika 1.11. B). Riješene su brojne kristalne strukture SerRS sa i bez supstrata i njihovih analoga (npr. iz bakterija *E. coli* (Cusack i sur. 1990) i *T. thermophilus* (Cusack i sur. 1996), metanogene arheje *Methanosarcina barkeri* (Bilokapić i sur. 2006), mitohondrija goveda *Bos taurus* (Shimada i sur. 2001), te pokazuju da se monomer svih SerRS sastoji od dvije domene: globularne katalitičke domene, koja sadrži motive 1, 2 i 3 karakteristične za razred II aaRS, i N-terminalne domene, koja strši iz globularne domene i čini vezno mjesto za pripadnu tRNA (slika 1.11. A).



Slika 1.11. Vrpčasti prikaz seril-tRNA-sintetaze iz *Thermus thermophilus*. A) Monomer. Katalitička domena (sivo) posjeduje motive 1, 2 i 3 (označeni zelenom, plavom i crvenom bojom) koji su karakteristični za aaRSII. Jedinствену N-terminalnu domenu (označena žutom bojom) grade dvije dugačke antiparalelne α-zavojnice (tzv. zavojite uzvojnice, engl. *coiled coil*) koje formiraju „zavijenu ruku“ (eng. *helical arm*). B) Dimer je funkcionalna forma enzima. Monomeri su označeni žutom i crvenom bojom. Preuzeto iz Weygand-Đurašević i Cusack 2005.

Međutim, na temelju riješenih kristalnih struktura i usporedbom sekvenci seril-tRNA-sintetaza iz različitih organizama, utvrđeno je i da se one mogu podijeliti na dva evolucijski različita tipa enzima. Zastupljeniji tip je tzv. standardni ili bakterijski tip SerRS (bSerRS), koji je prisutan kod bakterija, eukariota i većine arheja, te metanogeni tip SerRS uočen kod svih metanogenih arheja osim *Methanosarcina mazei* i *Methanosarcina acetivorans* (Kim i sur. 1998). Potonje se još nazivaju i atipične seril-tRNA-sintetaze.

Za sve seril-tRNA-sintetaze je karakteristično da prepoznaju pripadnu tRNA na jedinstven način. Za razliku od ostalih aaRS (osim AlaRS) kod kojih antikodonska petlja predstavlja identitetni element, kod SerRS identitetni elementi su nukleotid na položaju 73, duga varijabilna ruka i dodatni elementi koji su specifični za određeni organizam (slika 1.9. A).

Seril-tRNA-sintetaze, poput ostalih aaRS, u nekim organizmima stupaju u interakciju s drugim proteinima. U *Saccharomyces cerevisiae* je pronađen kompleks kvaščeve seril-tRNA-sintetaze i proteina Pex21 koji je uključen u biogenezu peroksisoma (Ročak i sur. 2002). Ključnu ulogu u interakciji s Pex21p ima C-terminalna domena kvaščeve SerRS (Godinić i sur. 2007, Močibob i Weygand-Đurašević 2008). Iako točna uloga kompleksa nije poznata, pronalazak pruža potencijalnu povezanost procesa translacije i biogeneze peroksisoma. Dalje, Kuhner i sur. (2009) su uočili da bakterijska SerRS interagira s proteinima koji sudjeluju u replikaciji molekula DNA, dok je u arheje *M. thermautotrophicus*, kao što je već spomenuto, pronađen kompleks između SerRS metanogenog tipa (MtSerRS) i arginil-tRNA-sintetaze (MtArgRS) (Godinić-Mikulčić i sur. 2011).

1.3.4. Seril-tRNA-sintetaza metanogenog tipa

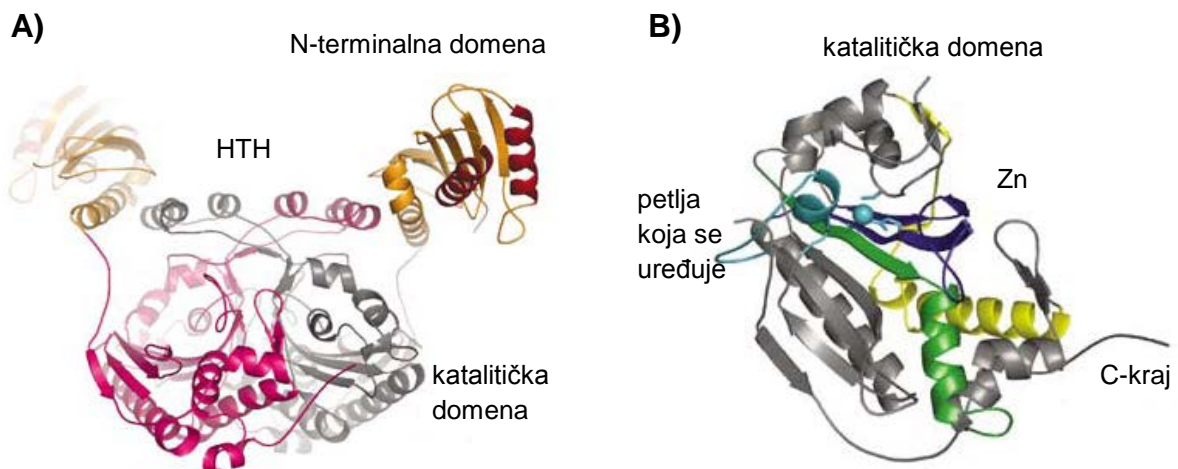
Kao što je već spomenuto, u metanogenim arhejama nalazimo jedinstveni tip enzima za serilaciju koji je nazvan SerRS metanogenog tipa (mSerRS). Nedavno je riješena kristalna struktura takve atipične seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa iz arheje *Methanosarcina barkeri* (mMbSerRS) (Bilokapić i sur. 2006), koja otkriva neka jedinstvena svojstva metanogenog tipa enzima u odnosu na bakterijski tip: znatno veću N-terminalnu domenu za prepoznavanje pripadne tRNA, prisutnost metalnog iona u katalitičkoj domeni zbog čega se mehanizam prepoznavanja supstrata razlikuje, te nekoliko karakterističnih insercija. Dok *M. barkeri* posjeduje i bakterijski i metanogeni tip SerRS, *M. thermautotrophicus* posjeduje samo metanogeni tip enzima, koji je homologan istovjetnom tipu iz *M. barkeri* (Kim i sur. 1998). Stoga riješena kristalna struktura SerRS metanogenog tipa iz *M. barkeri* služi kao model enzima iz *M. thermautotrophicus*.

N-terminalna domena i u bakterijskom i metanogenom tipu SerRS sudjeluje u vezanju pripadne tRNA (Jarić i sur. 2009). Međutim, u mSerRS ta domena se sastoji od šesterolančane antiparalelne β -ploče ($\alpha 1$ - $\alpha 6$) obavijene s četiri α -uzvojnice (H1, H2, H3, H4) (slika 1.12. A) te je stoga puno veća od iste domene u bakterijskom tipu enzima (slika 1.11. A), gdje samo dvije dugačke antiparalelne α -zavojnice (tzv. zavojite

uzvojnice, engl. *coiled coil*) formiraju "zavijenu ruku" (eng. *helical arm*) (Bilokapić i sur. 2006).

Katalitička domena mSerRS sastoji se, kao i kod bakterijskog tipa enzima, od osmerolančane β -ploče okružene α -uzvojnica, no u aktivnom mjestu mSerRS nalazi se i ion cinka važan za enzimsku aktivnost (slika 1.12 B). Stoga se mehanizam prepoznavanja serina razlikuje od onog kojeg upotrebljavaju SerRS bakterijskog tipa, što čini seril-tRNA-sintetazu jedinstvenom jer je jedina aaRS koja je razvila različite mehanizme prepoznavanja supstrata. Pokazano je da je ion cinka tetraedarski koordiniran bočnim ograncima cisteina 306, glutamata 355, cisteina 461 i molekulom vode, koja se prethodno serilaciji zamjenjuje supstratom (Bilokapić i sur. 2006).

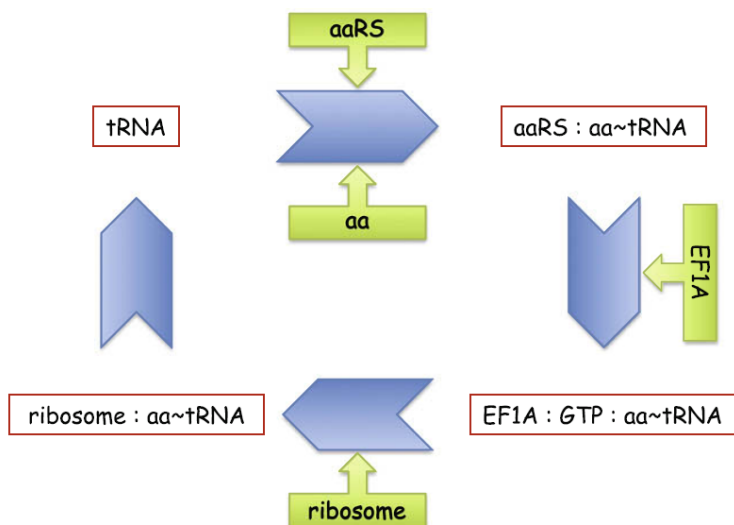
Daljnje razlike između standardne i atipične SerRS očituju se u različitim elementima strukture. U mSerRS omča motiva 2 je nešto kraća te enzim posjeduje dvije karakteristične insercije. Prva insercija od otprilike 30 aminokiselina nalazi se između motiva 2 i 3, te poprima strukturu zavojnica-okret-zavojnica (engl. *helix-turn-helix*, HTH) koja je bitna za ostvarivanje interakcija između dva homodimera, pridonosi cjelokupnoj stabilnosti enzima te je kritična za pravilno pozicioniranje N-terminalne domene druge podjedinice homodimera u odnosu na katalitičku domenu (Bilokapić i sur. 2009). Druga karakteristična insercija nalazi se između motiva 1 i 3 te čini petlju koja se uređuje prilikom vezanja serina (engl. *serine ordering loop*).



Slika 1.12. Struktura SerRS metanogenog tipa iz *M. barkeri*. **A)** Vrpčasti prikaz kristalne strukture. Katalitičke domene dviju podjedinica prikazane su ružičastom i sivom bojom. N-terminalna domena obojana je narančasto, a uzvojnice koje stupaju u interakciju s tRNA označene su crveno. **B)** Katalitička domena s motivima 1, 2 i 3 (označeni žutom, plavom i zelenom bojom) koji su karakteristični za aaRSII. Ion cinka (kuglica), njegovi ligandi (aminokiseline 394-410) i petlja koja se uređuje vezanjem serina (engl. *serine ordering loop*, SOL) označeni su svjetlo plavom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz Bilokapić i sur. 2006.

1.4. Stanično usmjeravanje supstrata

Stanično usmjeravanje supstrata (engl. *channeling*) je proces u kojem se intermedijeri nekog puta prenose s jednog enzima na drugi bez otpuštanja u okolni medij (Srere 1987). Smatra se da ono smanjuje vrijeme prijenosa intermedijera, sprječava njihov gubitak difuzijom, štiti nestabilne intermedijere od otapala, te sprječava ulazak istih u kompetirajuće metaboličke puteve (Ovádi 1991). Danas se za većinu metaboličkih puteva smatra da posjeduju ciljani prijenos supstrata (Sumegi i sur. 1990, Miziorko i sur. 1990, Clegg i Jackson 1990). Osobito je zanimljivo usmjeravanje molekule tRNA na komponente translacijskog aparata bez otpuštanja u citoplazmu (engl. *tRNA channeling*) koje su predložili Smith i sur. davne 1975. god. U tom procesu se molekule tRNA prenose od jezgre, gdje ih RNA-polimeraze sintetiziraju, do aminoacil-tRNA-sintetaza koje ih aminoaciliraju, pa do ribosoma gdje služe u biosintezi proteina. Hipotezu podupiru brojni radovi (Stapulionis i Deutscher 1995, Negrutskii i Deutscher 1991, Sivaram i Deutscher 1990, Negrutskii i Deutscher 1992), no točan put molekula tRNA u cjelosti još nije poznat. Novija istraživanja (Mirande 2010) podupiru tvrdnju kako je ribosomska sinteza proteina vrlo organizirani proces i kako tijekom koraka elongacije translacije, tRNA u citoplazmi stanica prolazi zatvoreni krug reakcija koje su nazvane ciklusom molekula tRNA (slika 1.13). U tom procesu se molekule aminoacil-tRNA selektivno vežu na elongacijski faktor (EF-1A kod eukariota i arheja, EF-Tu kod bakterija), koji na sebi ima vezanu molekulu GTP, te takav novonastali ternarni kompleks (EF-1A:GTP:aa-tRNA) odlazi na ribosom gdje se aa-tRNA koriste u biosintezi proteina.



Slika 1.13. Shematski prikaz ciklusa tRNA. Molekule tRNA se aminoaciliraju s pripadnom aminokiselinom uz pomoć aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS) i nastaje aminoacil-tRNA (aa-tRNA) koja se prenosi na ribosom u ternarnom kompleksu s elongacijskim faktorom EF1A (EF1A:GTP:aa - tRNA). Na ribosomu dolazi do prijenosa aminokiseline na rastući polipeptidni lanac, a molekula tRNA se otpušta i ulazi u novi translacijski ciklus. Preuzeto iz Mirande 2010.

Preduvjet za proces staničnog usmjeravanja supstrata uključuje postojanje nekog oblika strukturne organizacije komponenata koje sudjeluju u određenom metaboličkom putu (npr. multienzimske komplekse, multifunkcionalne enzime, smještaj enzima na membranama i sl.), a koja dopušta mogućnost katalize naredne reakcije u putu bez disocijacije intermedijera (Srere 1987). U tom smislu su zanimljivi kompleksi u kojima se aminoacil-tRNA-sintetaze udružuju međusobno (multisintetazni kompleksi) te kompleksi koje formiraju s drugim proteinima (opisano u poglavlju 1.3.2).

1.5. Cilj istraživanja

Prethodno je u našem laboratoriju sustavom dvaju hibrida detektirana interakcija između dva proteina ključna u procesu ekspresije gena: podjedinice H arhejske RNA-polimeraze (RpoH) i seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa iz *M. thermautothropicus* (MtSerRS). Budući da se navedena interakcija u literaturi ne spominje, izuzetno je zanimljivo proučiti postojanje ove interakcije dodatnim biokemijskim metodama *in vitro*.

Najprije je potrebno dobiti proteine u dovoljnim količinama za eksperimente. U tu svrhu će se gen *rpoH* ugraditi u vektor pPROEX Htb. Rekombinantni protein RpoH prekomjerno će se eksprimirati u stanicama *E. coli* i pročistiti afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu pomoću His-privjeska na N-kraju proteina. Budući da u našem laboratoriju RpoH prethodno nije pročišćavan, cilj je, između ostalog, i odrediti optimalne uvjete za prekomjernu ekspresiju i pročišćavanje proteina. Prekomjerno će se eksprimirati i pročistiti i MtSerRS prema protokolu ranije utvrđenom u laboratoriju.

Nakon dobivanja proteina u dovoljnim količinama za biokemijske eksperimente, interakcija proteina proučavati će se metodom gel-retardacijske elektroforeze i supročišćavanjem kompleksa na koloni (engl. *pull-down*), u kojem je jedan protein imobiliziran na Ni-NTA kolonu i služi kao „mamac“ za potencijalnog interakcijskog partnera („plijen“).

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

agar (*Sigma*), agarozna (*Sigma*), akrilamid (*Sigma*), amonijev acetat (*Kemika*), amonijev klorid (*Kemika*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Serva*), amonijev sulfat (*Kemika*), ampicilin (*Sigma*), bromfenol plavo (*Serva*), *Coomassie brilliant blue R 250* (*Merck*), dimetilsulfoksid (DMSO) (*Sigma*), ditiotreitrol, DTT (*Sigma*), dušična kiselina (*Kemika*), etanol, (*Kemika*), etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (*Sigma*), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma*), formaldehid (*Kemika*), glicerol (*Kemika*), glicin (*USB Corporation*), N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*USB Corporation*), imidazol (*Sigma*), izopropil- β -tiogalaktozid (IPTG) (*Sigma*), izopropanol (*Kemika*), kalijev bikromat (*Kemika*), kanamicin (*Sigma*), kloridna kiselina (*Kemika*), kloroform (*Kemika*), ksilencijanil-fluorofosfat (XCFF) (*Serva*), kvaščev ekstrakt (*Difco*), magnezijev acetat (*Sigma*), magnezijev klorid (*Kemika*), magnezijev sulfat (*Kemika*), β -merkaptetoetanol (*Serva*), 2-N-(morfolino)etansulfonska kiselina (Mes) (*Sigma*), N,N'-metilenbisakrilamid (*Merck*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Merck*), natrijev karbonat (*Kemika*), octena kiselina (*Kemika*), polietilenglikol 8000 (PEG 8000) (*Sigma*), srebrov nitrat (*Sigma*), N,N,N,N-tetrametiletildiamin (TEMED) (*Serva*), 99,5 % octena kiselina (*Kemika*), tripton (*Sigma*), tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Sigma*), urea (*Kemika*).

2.1.1. Enzimi, proteini i nukleinske kiseline

Albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*; BSA) (*NEB*), DNaza I (*NEB*), *Pfu* DNA-polimeraza i pripadni pufer (*Fermentas*), restrikcijske endonukleaze s pripadnim puferima (*NEB*), *Taq* DNA-polimeraza i pripadni pufer (*Fermentas*), T4 DNA-ligaza s puferom (*Fermentas*).

Genomsku DNA arheje *Methanothermobacter thermautotrophicus*, koja je korištena kao kalup u PCR reakciji za umnažanje gena *rpoH*, izolirala je prethodno dipl. ing. Ana Crnković iz arheje *M. thermautotrophicus* u laboratoriju prof. Mike Ibbe (Ohio State University, Department of Microbiology, SAD).

Bakterijski soj *E. coli* BL21 transformiran rekombinantnim vektorom pET28b, koji sadrži gen za MtSerRS ugrađen kao *NdeI* i *HindIII* kazeta (pET28b-MtSerRS) prethodno je napravila dr. sc. Vlatka Godinić-Mikulčić. Navedeni soj korišten je za prekomjernu ekspresiju proteina MtSerRS s histidinskim privjeskom pod kontrolom inducibilnog promotora *T7lac*. Plazmid nosi rezistenciju na kanamicin, a navedeni histidinski privjesak omogućuje pročišćavanje afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozima.

Izoakceptorsku tRNA^{Ser} iz *Methanosarcina barkeri* s antikodonom GGA (MbtRNA^{Ser}_{GGA}), koja je korištena u eksperimentu gel-retardacijske elektroforeze, pripremila je dr. sc. Jelena Jarić transkripcijom *in vivo* u stanicama *E. coli* soja BL21 (DE3) s vektora pETΔ3MbtRNASerGGA.

Tekuća hranidbena podloga Luria-Bertani (LB): 5 g dm⁻³ ekstrakt kvasca, 10 g dm⁻³ tripton, 10 g dm⁻³ NaCl.

Kruta hranidbena podloga: 5 g dm⁻³ ekstrakt kvasca, 10 g dm⁻³ tripton, 10 g dm⁻³ NaCl, 15 g dm⁻³ agar.

Antibiotici ampicilin ili kanamicin u podloge se dodaju do konačne koncentracije 100 mg dm⁻³, odnosno 30 mg dm⁻³.

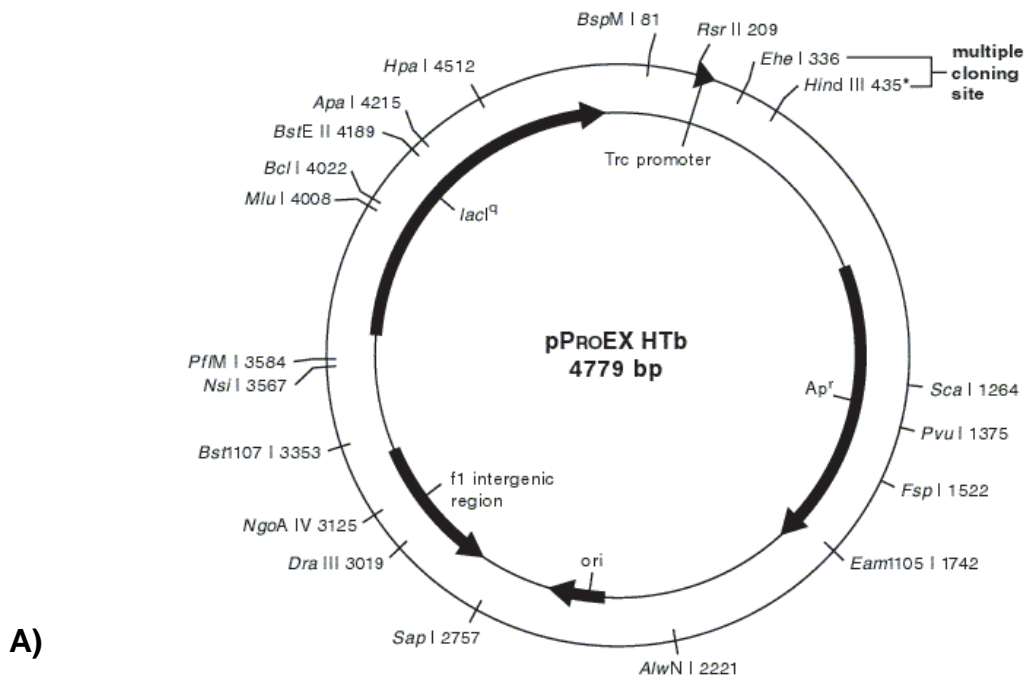
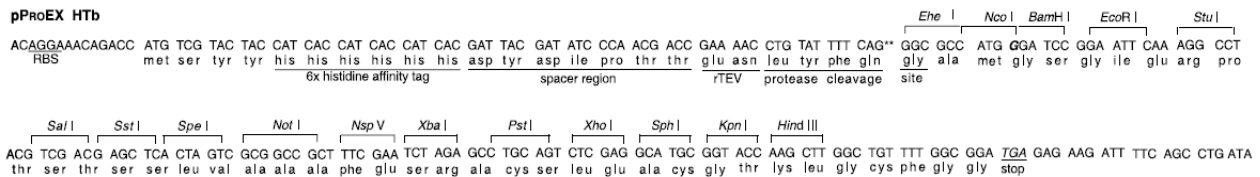
2.1.2. Sojevi bakterije *E. coli*

BL21 (DE3) (F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) ga dcm* (DE3); Novagen): soj korišten za prekomjernu ekspresiju ispitivane podjedinice H. Soj sadrži kromosomsku kopiju gena za T7 RNA-polimerazu. To je λ (DE3) lizogen soja BL21 koji nema citoplazmatsku proteazu Lon i proteazu OmpT, vezanu s vanjske strane membrane. Bakteriofag DE3 je derivat bakteriofaga λ koji sadrži gen *lacI*, promotor *lacUV5* i gen za T7 RNA-polimerazu pod kontrolom tog promotora, tako da se sinteza ove RNA-polimeraze, a time i sinteza proteina kloniranog u odgovarajući vektor pod kontrolom T7 promotora, inducira dodatkom IPTG.

DH5 α ((*supE44* Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ*) Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1*): soj rutinski korišten za umnožavanje plazmidne DNA te za kloniranje. Pogodan je zbog delecije gena *endA1* (kodira endonukleazu I) čime se izbjegava nespecifična razgradnja DNA.

2.1.3. Ekspresijski sustav pPROEX Ht i vektor pPROEX Htb

Ekspresijski vektor pPROEX Htb dizajniran je za efikasnu ekspresiju rekombinantnih proteina u stanicama *E. coli*. Visoka razina ekspresije omogućena je promotorom *trc* (*trp-lac*) koji sadrži -35 regiju promotora *trp* zajedno s -10 regijom promotora *lac*. Za regulaciju ekspresije, gen koji kodira *lac*-represor (*lacIq*) nalazi se na vektoru i time omogućuje regulaciju *trc* promotora neovisno o tome da li soj stanice domaćina sadrži gen za *lac*-represor. IPTG se koristi za indukciju ekspresije gena - dodatkom IPTG-a inducira se ekspresija T7 RNA-polimeraze s kromosoma bakterije domaćina te ona transkribira željeni gen na plazmidu. Nakon ekspresije protein je u fuziji sa sekvencom od 6 histidina (His₆) na N-kraju, što omogućava pročišćavanje afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu. Plazmid također sadrži: mjesto cijepanja proteazom Tev (engl. *Tobacco Etch Virus*) koja se koristi za uklanjanje histidina s fuzijskog proteina, pBR322 ishodište replikacije (engl. *origin of replication*, OR), gen za otpornost na ampicilin (engl. *ampicillin resistance*, Apr) koji omogućuje selektivni rast transformanata, ishodište replikacije bakteriofaga f1 za dobivanje jednolančane DNA (*f1 origin*) u sprezi s odgovarajućim fagom pomagačem (slika 2.1. A i B).

**pProEX HTb****B)**

Slika 2.1. Plazmidni vektor pPROEX Htb. A) Shema B) Višestruko mjesto za kloniranje (engl. *multiple cloning site*, MCS). Podvučene su sekvence za polihistidinski privjesak, regija od sedam aminokiselina koja služi kao razmaknica (engl. *spacer*) i mjesto cijepanja proteazom Tev koje se nalazi između glutamina i glicina te je dodatno obilježeno (). Stop kodon je podvučen u kurzivu. Za sekvenciranje može se koristiti početnica M13/pUC Reverse 23-Base Sequencing Primer.**

2.1.4. Početnice za lančanu reakciju polimeraze

Sekvence sintetičkih oligonukleotida (*Sigma*) korištene za kloniranje gena za podjedinicu H RNA-polimeraze (RpoH) iz genomske *Methanothermobacter thermautotrophicus* DNA (tablica 2.1) dizajnirane su na način da sadrže sljedove koje specifično cijepaju restriksijske endonukleaze *Bam*HI odnosno *Xho*I, te se stoga isti nukleotidni sljedovi nalaze na 5' odnosno 3' kraju umnoženog PCR produkta.

Tablica 2.1. Početnice korištene za umnažanje gena za RpoH (RpoH_F: uzvodna početnica (engl. *forward*); RpoH_R: nizvodna početnica (engl. *reverse*)). Sljedovi koji nisu komplementarni kalupu, dodani radi lakšeg cijepanja krajeva DNA restriksijskim endonukleazama, označeni su sivom bojom. Restriksijska mjesta označena su u kurzivu i podebljano, start i stop kodoni zeleno, a dio početnica koji odgovara genu crveno.

Naziv početnice	Sekvenca (5'-3')
subH_F	GAGACT GGATCC ATGAAGAGGGAGATCTTGA AAC
subH_R	GAGACT CTCGAG CTAGTCTGAACAAGCCTGTAG

*Bam*HI - **G**^v **GATCC**, *Xho*I - **CT**^v **CGAG**

2.2. Metode

2.2.1. Metode rada s DNA

2.2.1.1. Kloniranje gena za podjedinicu H RNA-polimeraze (RpoH)

Lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) korištena je za umnožavanje gena za protein podjedinica H RNA-polimeraze (*rpoH*, lokus **MTH1048**), pri čemu je kao kalup korištena genomska DNA arheje *Methanothermobacter thermautotrophicus*. Preparativna reakcija ukupnog volumena 100 µl sadržavala je 250 ng genomske DNA (kalup), 5 µl 10 µmol dm⁻³ početnice RpoH_F i 5 µl 10 µmol dm⁻³ početnice RpoH_R, 10 µl 10 x pufer za DNA-polimerazu *Pfu* (20 mmol dm⁻³ Tris-HCl (pH = 8,8), 10 mmol dm⁻³ (NH₄)₂SO₄, 10 mmol dm⁻³ KCl, 0,1 mg ml⁻¹ BSA, Triton X-100 (φ = 0,001), 2 mmol dm⁻³ MgSO₄), 4 µl 25 mmol dm⁻³ MgCl₂,

2 μl 10 mmol dm^{-3} dNTP-a (svakog) te 2 μl *Pfu* polimeraze (2,5 U μl^{-1}). Nukleotidni slijed korištenih početnica prikazan je u tablici 2.1, a uvjeti PCR-a prikazani su u tablici 2.2.

Tablica 2.2. Uvjeti reakcije PCR.

	temperatura / °C	trajanje ciklusa / min	broj ciklusa
Početna denaturacija	95	5	1
Denaturacija	95	0.45	30
Sljepljivanje početnica na kalup	52	0.3	30
Produljenje lanaca	72	2	30
Završno produljenje lanaca	72	5	1

Ukupna smjesa PCR reakcije stavljena je na agarozni gel i sprovedena je agarozna gel-elektroforeza kako bi se PCR produkt odvojio od ostalih neželjenih fragmenata DNA različite veličine koji su nastali u PCR reakciji. Željeni PCR produkt je zatim izrezan iz gela i pročišćen upotrebom komercijalnog kompleta *QIAquick Gel Extraction Kit* (*Qiagen*) prema uputama proizvođača.

Prije ligacije dobivenog PCR produkta i odabranog vektora, potrebno je na istima imati komplementarne stršeće krajeve. U tu svrhu izvršena je razgradnja PCR produkta i vektora pPROEX Htb istim restrikcijским enzimima: *Bam*HI i *Xho*I prema uputama proizvođača, nakon čega su pročišćeni pomoću kompleta *QIAquick Gel Extraction Kit* (*Qiagen*). Reakcijska smjesa za ligaciju sadržavala je sastojke u količinama navedenim u tablici 2.1 te se odvijala u PCR uređaju 1 sat na 22 °C, nakon čega je T4 DNA-ligaza inaktivirana 10 min na 65 °C.

Tablica 2.3. Ligacijska smjesa za ugradnju PCR produkta u vektor pPROEX Htb.

Sastojak	Količina
Vektor pPROEX Htb (<i>Bam</i> HI / <i>Xho</i> I)	100 ng
PCR produkt (<i>Bam</i> HI / <i>Xho</i> I)	240 ng
T4 DNA-ligaza (400 U μl^{-1})	0,4 μl
10 x pufer za ligazu	1 μl
ReH ₂ O	5 μl
Ukupni volumen	10 μl

2.2.1.2. Elektroforeza molekula DNA u gelu agaroze

Agarozna gel-elektroforeza koristila se za razdvajanje i pročišćavanje PCR produkata, provjeru uspješnosti ligacije, procjenu mase i izolaciju plazmidne DNA. Agaroz je linearni polimer D-galaktoze i 3,6-L-galaktoze. Gelovi su pripremljeni otapanjem 1 g agaroze u 100 ml pufera 1 x TAE (40 mmol dm⁻³ Tris, 1 mmol dm⁻³ EDTA, titrirano konc. octenom kiselinom do pH 8,0) u kojeg je prethodno dodan etidijev bromid do koncentracije 0,5 mg dm⁻³, te zagrijavanjem na temperaturu vrenja. Otopina hlađenjem prelazi u gel zbog nastajanja vodikovih veza između polimernih molekula. Prije nanošenja na gel, uzorku je dodano 1/10 volumena pufera za nanošenje uzorka koji sadrži plavu boju (25 mg ksilencijanolfosfata i 25 mg bromfenol plavo otopljeni u 7 ml 0,1 mol dm⁻³ EDTA (pH = 8,0) i 3 ml glicerola) koja omogućuje praćenje elektroforetske pokretljivosti uzoraka u gelu. Elektroforeza je provedena na sobnoj temperaturi pri 120 V u aparaturi za horizontalnu elektroforezu. Tijekom elektroforeze dolazi do interkalacije etidijevog bromida među parove baza DNA i time povećanja njegove fluorescencije za 9-40 puta, što omogućuje vizualizaciju vrpca DNA promatranjem gela pod UV svjetlom na transiluminatoru ($\lambda = 312 \text{ nm}$).

Prilikom rada s etidijevim bromidom treba biti vrlo oprezan jer je mutagen, kancerogen i teratogen već i u vrlo malim količinama. Stoga je potrebno nositi zaštitnu kutu i rukavice te voditi računa o posuđu i otopinama koje se koriste.

2.2.1.3. Transformacija stanica *E. coli* elektroporacijom

Elektroporacija je česta metoda uvođenja strane DNA u animalne stanice, stanice kvasaca, biljaka i bakterija. Stanice se podvrgnu kratkom električnom šoku od nekoliko tisuća volti što uzrokuje kratkotrajno povećanje permeabilnosti stanične membrane za DNA. Smatra se da primijenjeno pulsno električno polje narušava naponski gradijent uzduž membrane i reverzibilno stvara pore kroz koje DNA, koja zbog hidrofilnog karaktera teško prolazi fosfolipidni dvosloj, može ući u stanicu.

Metoda je korištena za uvođenje rekombinantnog plazmida pPROEX Htb koji sadrži insert *rpoH* između restrikcijskih mjesta *Bam*HI i *Xho*I (pPROEXHtb-RpoH) u elektrokompetentne stanice *E. coli* sojeva DH5 α i BL21 u svrhu umnožavanja rekombinantnog vektora i prekomjerne ekspresije proteina. Upotrijebljen je uređaj Gene Pulser[®] (*Bio-Rad*) čiji su parametri ugođeni na 2,5 kV, 25 μ F i 200 Ω . Kiveta za elektroporaciju i nosač za kivetu prethodno su ohlađeni na -20 °C zbog veće efikasnosti elektroporacije pri nižim temperaturama. Prije postupka je 40 μ l elektrokompetentnih stanica *E. coli* otopljeno na ledu, nakon čega im je dodano nekoliko mikrolitara ligacijske smjese (oko 20 ng DNA; 1-4 μ l smjese/40 μ l stanica). Sadržaj je promiješan i ostavljen 1 min na ledu, nakon čega je prebačen u ohlađenu kivetu i pomoću hladnog nosača umetnut u uređaj za elektroporaciju. Primjenjen je puls od 2,5 kV cm⁻¹ u trajanju od 4,5 ms. Elektroporirane stanice brzo su resuspendirane u 1 ml tekućeg LB medija jer je vremenski period između primjene pulsa i dodatka medija presudan za oporavak transformiranih stanica. Stanice su zatim premještene u eppendorf epruvetu i inkubirane oko 1 sat na 37 °C. Nakon inkubacije, odgovarajući se alikvoti stanične suspenzije (20-50 μ l u slučaju transformacije čistim plazmidom, te 100-200 μ l u slučaju transformacije ligacijskom smjesom) razmažu na selektivnu hranjivu podlogu LB koja sadrži 100 μ g ml⁻¹ ampicilina te se zatim inkubiraju preko noći na 37 °C.

2.2.1.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR) na bakterijskim kolonijama

PCR na bakterijskim kolonijama (engl. *colony* PCR) je metoda koja se zasniva na umnažanju produkata reakcijom PCR direktno iz bakterijske kolonije, čime je omogućeno brzo pretraživanje bakterijskih kolonija na krutoj podlozi s ciljem pronalaženja onih koje posjeduju plazmide s ugrađenim željenim insertom DNA (tzv. pozitivne kolonije). Pomoću ove metode pronađene su bakterijske kolonije koje sadrže vektor pPROEX Htb s ugrađenim genom za RpoH.

Sterilnim nastavkom je dio bakterijske kolonije s krute selektivne podloge prenesen na zasebnu ploču LB/Amp, nakon čega su bakterije resuspendirane u 10 μl redestilirane vode u epruveti za PCR maksimalnog volumena 250 μl . Stanice su zatim lizirane zagrijavanjem 10 minuta na 95 $^{\circ}\text{C}$ u uređaju za PCR, nakon čega su stavljene na led. Stanicama se zatim dodala smjesa za PCR, koja odgovara prethodno korištenoj smjesi za PCR osim što je izostavljen kalup. Ukupni volumen reakcije bio je 25 μl i smjesa je sadržavala 2,5 μl 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ početnice RpoH_F i 2,5 μl 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ početnice RpoH_R, 2,5 μl 10 x pufer za DNA-polimerazu *Taq* (20 mmol dm^{-3} Tris-HCl (pH = 8,8), 10 mmol dm^{-3} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mmol dm^{-3} KCl, 0,1 mg ml^{-1} BSA, Triton X-100 ($\varphi = 0,001$), 2 mmol dm^{-3} MgSO_4), 2,5 μl 25 mmol dm^{-3} MgCl_2 , 0,5 μl 10 mmol dm^{-3} dNTP-a (svakog), 10 μl suspenzije liziranih stanica te 0,4 μl *Taq* polimeraze (2,5 $\text{U } \mu\text{l}^{-1}$). Nukleotidni slijed korištenih početnica prikazan je u tablici 2.1, a uvjeti PCR reakcije prikazani su u tablici 2.2.

2.2.1.5. Određivanje slijeda nukleotida DNA (sekvenciranje)

Izabrana je kolonija za koju se metodom PCR na bakterijskim kolonijama i analizom u gelu agaroze uspostavilo da sadrži rekombinantni plazmid, tj. pPROEX Htb s insertom *rpoH* (posjeduje 234 nukleotida). Plazmidna DNA je izolirana pomoću komercijalnog kompleta *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen). U svrhu potvrde uspješnosti kloniranja, rekombinantni plazmid je sekvenciran u DNA-servisu Instituta Ruđer Bošković (Zagreb, www.irb.hr), na četverokapilarnom sekvenatoru ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*). Pripremljene su dvije reakcijske smjese za sekvenciranje te je u svakoj plazmidni vektor zamješšan u ukupnom volumenu

od 13 μl u koncentraciji od 30 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$. Za sekvenciranje su korištene genomske početnice za *rpoH* (tablica 2.1); u jednu smjesu je dodano 1 μl početnice subH_F, a u drugu ista količina subH_R, konačne koncentracije 3,2 $\mu\text{mol dm}^{-3}$.

2.2.1.6. Određivanje koncentracije DNA

Masene koncentracije DNA određene su spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije na uređaju NanoDrop 1000 pri valnoj duljini od 260 nm (područje maksimalne apsorpcije nukleinskih kiselina). Jedna jedinica apsorbancije pri valnoj duljini 260 nm (A_{260}) odgovara 50 μg čiste DNA koja je otopljena u 1 ml. Iz te relacije uređaj mjerenjem apsorbancije određuje koncentraciju uzorka DNA. Omjer apsorbancija pri valnim duljinama od 260 i 280 nm se koristi kao pokazatelj čistoće DNA u suspenziji; ukoliko je izmjeren omjer A_{260}/A_{280} oko 2,1, smatra se da je uzorak zadovoljavajuće čistoće. Mjerno područje instrumenta za mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina je 2 – 3700 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$.

2.2.2. Metode rada s proteinima

2.2.2.1. Priprema prekonoćne kulture transformiranih stanica

Cilj uzgoja prekonoćne kulture je dobivanje bakterija u stacionarnoj fazi rasta u kojoj je rast drastično usporen i broj stanica relativno konstantan, što je posljedica smanjenja količine hranjivih tvari i akumulacije toksičnih tvari u mediju. Presađivanjem u svježju tekuću hranidbenu podlogu bakterije ponovno započinju rast i diobu. Prekonoćna kultura služi kao pretkultura s kojom se inokulira selektivni medij za uzgoj i rast bakterija (LB medij). Za dobivanje zasićenih prekonoćnih kultura, transformirane bakterijske stanice su inokulirane u odgovarajućoj količini tekućeg selektivnog LB medija koji je sadržavao ampicilin (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) odnosno kanamicin (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Stanice su inkubirane preko noći (15-18 sati) na 37 °C uz trešnju.

2.2.2.2. Optimiranje prekomjerne ekspresije gena za protein RpoH

Geni za proteine MtSerRS i RpoH ugrađeni su u vektore koji omogućuju da se transliraju kao proteini koji posjeduju privjesak od 6 histidinskih ostataka na N-kraju,

stoga oznake MtSerRS i RpoH označavaju proteine s N-terminalnim His-privjeskom. Za prekomjernu ekspresiju gena za MtSerRS korišten je transformant (sadrži vektor (pET28b-MtSerRS) koji je prethodno napravljen u laboratoriju i uvjeti prekomjerne ekspresije gena za MtSerRS koji su također prethodno određeni, stoga ih nije bilo potrebno optimirati. Međutim, u ovom radu je u našem laboratoriju po prvi puta provedena heterologna prekomjerna ekspresija gena za RpoH. Zato su prethodno induciranoj ekspresiji RpoH, s ciljem što većeg prinosa proteina, ispitani optimalni uvjeti ekspresije RpoH na malom uzorku. U tom postupku se ustvrdila bakterijska kolonija koja pokazuje najbolju ekspresiju, optimalno vrijeme trajanja prekomjerne ekspresije te minimalna, ali dovoljna količina IPTG-a kojom se inducira ekspresija. Također je provjereno da li prekomjerno eksprimiran protein RpoH u bakterijskom domaćinu stvara inkluzijska tijela.

A) Utvrđivanje optimalnog vremena prekomjerne ekspresije gena za protein RpoH

10 ml LB/Amp medija inokulirano je s 100 μ l prekončne pretkulture i inkubirano na 37 °C uz trešnju na 200 rpm, sve dok bakterijska suspenzija nije dosegla vrijednost OD₆₀₀ od 0,5 – 0,8. Tada su uzeti alikvoti stanica od 50 μ l (neinducirane stance), a u ostatak bakterijske suspenzije dodan je IPTG konačne koncentracije 1 mmol dm⁻³ za indukciju prekomjerne ekspresija gena za RpoH. Bakterijska suspenzija inkubirana je na 37 °C, a alikvoti (50 μ l) induciranih stanica uzeti su 1,5 h i 3 h od trenutka indukcije, tj. dodatka IPTG-a.

B) Testiranje ekspresije gena za protein RpoH u ekspresijskim stanicama BL21

S ciljem selekcije kolonije koja pokazuje najbolju ekspresiju gena za RpoH, izvršena je indukcija ekspresije stanica BL21 transformiranih s rekombinantnim vektorom pPROEXHtb-RpoH. Također, bilo je zanimljivo usporediti efikasnost ekspresije gena za RpoH između transformiranih stanica DH5 α i BL21, te je u tu svrhu istodobno izvršena i indukcija ekspresije stanica DH5 α transformiranih s istim plazmidom.

10 ml LB/Amp medija inokulirano je s 200 μl prekonoćne pretkulture i inkubirano na 37 °C uz trešnju na 200 rpm, sve dok bakterijska suspenzija nije dosegla vrijednost OD_{600} od 0,5 do 0,8. Tada je uzet alikvot stanica od 50 μl (neinducirane stanice). Prekomjerna ekspresija gena za protein RpoH inducirana je dodatkom IPTG-a konačne koncentracije 1 mmol dm^{-3} . Bakterijska suspenzija inkubirana je na 37 °C tijekom 3 h, nakon čega su uzeti alikvoti od 50 μl u kojima su stanice oborene centrifugiranjem 2 min na 10 000 x g i sobnoj temperaturi. Supernatant je uklonjen aspiracijom vakuum sisaljkom, a talog otopljen u 9 μl redestilirane vode, nakon čega su uzorci pripremljeni za SDS-PAGE.

C) Utvrđivanje optimalne koncentracije IPTG-a za indukciju ekspresije gena za protein RpoH

U daljnjim eksperimentima je korištena isključivo ona kolonija za koju se prethodnim testom utvrdilo da pokazuje najbolju ekspresiju. U svrhu štednje IPTG-a, prije indukcije ekspresije gena za RpoH u preparativne svrhe, testirana je i količina IPTG-a optimalna za ekspresiju slijedećim koncentracijama: 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 i 1 mmol dm^{-3} .

200 μl prekonoćne pretkulture inokulirano je u 10 ml LB/Amp medija. Stanice su inkubirane na 37 °C uz trešnju na 200 rpm do $\text{OD}_{600} = 0,5 - 0,8$, kada je uzet alikvot neinduciranih stanica od 50 μl , te je dodana različita koncentracija IPTG-a. Bakterijske suspenzije inkubirane su na 37 °C tijekom 3 h nakon čega su uzeti alikvoti od 50 μl u kojima su stanice oborene centrifugiranjem 2 min na 10 000 x g i sobnoj temperaturi. Supernatant je uklonjen, a talog stanica resuspendiran u 15 μl redestilirane vode. Analiza je izvršena SDS-PAGE elektroforezom.

D) Provjera sklonosti RpoH za stvaranjem inkluzijskih tijela

Također je testirano da li heterologno eksprimiran protein RpoH u bakterijskom domaćinu agregira u inkluzijska tijela. Naime, zbog visoke razine ekspresije proteina u bakterijskom domaćinu, postoji mogućnost da se protein taloži u inkluzijskim tijelima. U tom slučaju je potrebno optimirati uvjete ekspresije (osobito temperaturu) i pročišćavanja proteina.

800 μl prekonoćne pretkulture inokulirano je u 40 ml LB/Amp medija. Stanice su inkubirane na 37 °C uz trešnju na 200 rpm do $\text{OD}_{600} = 0,5 - 0,8$, kada je uzet alikvot neinduciranih stanica od 50 μl . Prekomjerna ekspresija proteina RpoH inducirana je dodatkom IPTG-a konačne koncentracije 0,3 mmol dm^{-3} . Bakterijska suspenzija inkubirana je na 37 °C tijekom 3 h, nakon čega su stanice oborene centrifugiranjem 10 min na 5 000 x g i 4 °C. Supernatant je odliven, a talog resuspendiran u 1 ml pufera A za lizu stanica sastava: 25 mmol dm^{-3} Tris, 500 mmol dm^{-3} NaCl, 20 mmol dm^{-3} imidazol, glicerol ($\varphi = 0,10$), 7,3 mmol dm^{-3} β -merkaptotanol, 0,5 mmol dm^{-3} PMSF. Stanice su sonicirane ultrazvukom na ledu u 2 ciklusa u trajanju 1 minute između kojih je bila pauza u trajanju od 1 min. Nakon lize, uzet je alikvot stanica od 20 μl (aliquot nakon soniciranja). Lizat je centrifugiran 10 min na 12 000 x g (4 °C). Supernatant je odliven u novu eppendorf epruvetu, a talog resuspendiran u 1 ml redestilirane vode. Zatim su pripremljeni uzorci za elektroforezu (aliquot neinduciranih stanica, aliquot nakon soniciranja, talog, supernatant).

2.2.2.3. Priprema proteinskih ekstrakata s nadeksprimiranom RpoH i MtSerRS u preparativne svrhe

Za preparativno pročišćavanje proteina RpoH i MtSerRS, 500 ml odnosno 750 ml sterilnog LB medija koji sadrži ampicilin tj. kanamicin, inokulirano je s noćnom kulturom transformiranih stanica (5 ml za RpoH; 7 ml za MtSerRS). Kultura je uzgajana na 37 °C uz trešnju. Prilikom uzgoja MtSerRS, pri OD_{600} 0,3 dodan je ZnCl_2 do konačne koncentracije 0,5 mmol dm^{-3} . Kada je bakterijska suspenzija dosegla vrijednost OD_{600} 0,5 – 0,8, ekspresija gena je inducirana dodatkom IPTG-a (0,3 mmol dm^{-3} za RpoH; 0,7 mmol dm^{-3} za MtSerRS). Bakterije su inducirane 3 sata na 37 °C u tresilici, a zatim su oborene centrifugiranjem 15 min na 5000 x g i 4 °C. Supernatant je uklonjen, a talog ispran hladnom vodom i ponovo centrifugiran.

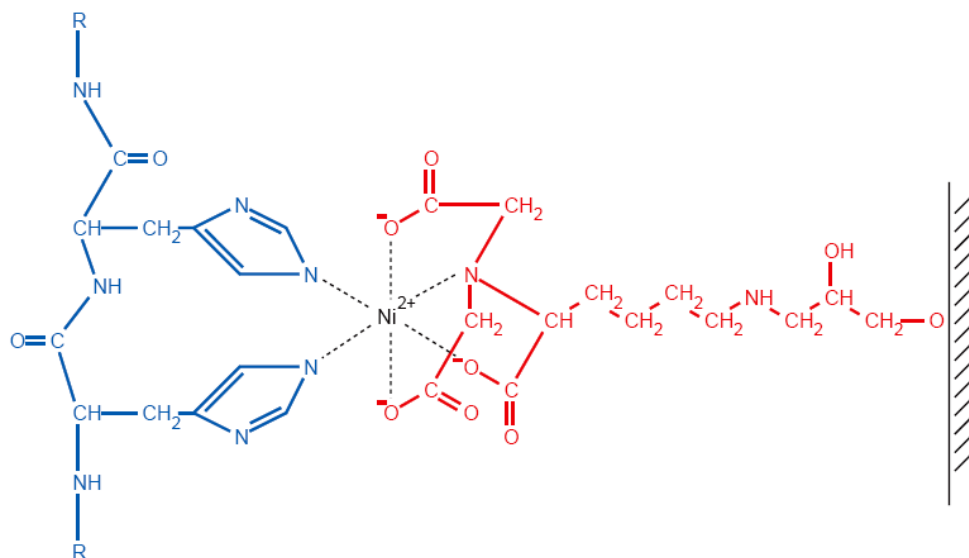
Talog je zatim resuspendiran u 6 ml pufera za lizu stanica (pufer A, sastav opisan u tablici 2.4 za RpoH, i tablici 2.5 za MtSerRS), te su dodani 25 μg DNaze i 250 μg lizozima. U svrhu lize bakterijskih stanica i oslobađanja proteina u otopinu, stanice su sonicirane ultrazvukom na ledu u 4 ciklusa u trajanju od 1 minute između kojih je bila

pauza u trajanju od 1 min. Lizat je centrifugiran 20 min na 5000 x g (4 °C), dobiveni supernatant je potom odmah odvojen i dodatno centrifugiran 1 h na 12 000 x g (4 °C) nakon čega je profiltriran protiskivanjem kroz sterilni filter *Milipore* (0,2 µm).

2.2.2.4. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozima

U ovom radu, proteini su eksprimirani u fuziji s oligopeptidom od 6 histidina (His-privjesak) na N-kraju, što omogućuje njihovo jednostavno odvajanje iz proteinskog ekstrakta afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozima. Postupak se temelji na specifičnim reverzibilnim interakcijama između His-privjeska, koji je pri pH 7,5 – 8 nenabijen i uglavnom ne utječe na strukturu i funkciju proteina, i metal-kelatne površine kao što je Ni-NTA (Qiagen 2003).

Nitrilotriocetna kiselina (NTA) je tetradentatni kelatirajući adsorbent koji zauzima četiri od šest veznih mjesta u koordinacijskoj sferi iona Ni^{2+} , ostavljajući dva mjesta slobodna za interakciju s imidazolnim prstenovima dvaju susjednih histidina His-privjeska (slika 2.2) (Qiagen 2003).



Slika 2.2. Interakcije između susjednih ostataka u His₆-privjesku (plave boje) i Ni-NTA (crvene boje). Preuzeto iz Qiagen 2003.

Kromatografija je izvođena u ledenici na 4 °C propuštanjem uzorka kroz kolonu punjenu Ni-NTA agarozom, koja se sastoji od sefaroze *CL-6B* (matrica) na koju je vezana Ni-NTA. Punilo Ni-NTA izuzetno je pogodno zbog lakoće rukovanja, stabilnosti, relativno velikog kapaciteta vezanja (5-10 mg proteina po mililitru smole), te minimalnog nespecifičnog vezanja (Qiagen 2003).

Sastav korištenih pufera je u osnovici jednak, a razlikuje se po konačnoj koncentraciji imidazola. Puferi korištenih pri pročišćavanju RpoH i MtSerRS opisani su u tablicama 2.4 i 2.5. Korištenim puferima dodaje se niska koncentracija β -merkaptoetanol (5 do 7,3 mmol dm⁻³), reducirajućeg agensa, kako bi se spriječile eventualne ko-purifikacije proteina koji su stvorili disulfidne mostove s proteinom od interesa, te PMSF (0,5 do 1 mmol dm⁻³) koji je inhibitor serinskih proteaza. Kromatografska kolona najprije se napuni s etanolskom suspenzijom Ni-NTA (1 ml za RpoH; 1,5 ml za MtSerRS), ispire redestiliranom vodom (15 ml) i uravnoteži u puferu A (15 ml) koji sadrži nisku koncentraciju imidazola. Imidazol se veže na niklove ione i stoga onemogućuje vezanje histidinskih ostataka (imidazolnih prstenova) koji nisu dio His-privjeska. Time se sprječava nespecifično vezanje ostalih proteina na kolonu. Nakon pripreme kolone, proteinski ekstrakt (supernatant nakon soniciranja i centrifugiranja) propušten je dva puta u svrhu učinkovitijeg vezanja proteina s His-privjeskom na kolonu. Slijedilo je uklanjanje nevezanih proteina ispiranjem kolone puferom A (30 ml za RpoH; 38 ml za MtSerRS) i zatim puferom B (10 ml za RpoH; 18 ml za MtSerRS), koji sadrži veću koncentraciju imidazola od pufera A i stoga ispire nespecifično vezane proteine s kolone. Protein je naposljetku eluiran puferom C (u obrocima od 2 ml skupljeno je oko 10 frakcija). Uspješnost pročišćavanja provjerena je elektroforezom na denaturirajućem gelu uz prisutnost SDS-a.

Tablica 2.4. Sastav pufera za kromatografiju RpoH na Ni-NTA agarozima.

Sastojak	Pufer A	Pufer B	Pufer C
Tris	25 mmol dm ⁻³	25 mmol dm ⁻³	25 mmol dm ⁻³
Imidazol	20 mmol dm ⁻³	40 mmol dm ⁻³	200 mmol dm ⁻³
NaCl	500 mmol dm ⁻³	500 mmol dm ⁻³	500 mmol dm ⁻³
Glicerol	$\varphi = 0,10$	$\varphi = 0,10$	$\varphi = 0,10$
β -merkaptotanol*	7,3 mmol dm ⁻³	7,3 mmol dm ⁻³	7,3 mmol dm ⁻³
PMSF*	0,5 mmol dm ⁻³	0,5 mmol dm ⁻³	0,5 mmol dm ⁻³

* Dodano neposredno prije korištenja pufera

Tablica 2.5. Sastav pufera za kromatografiju MtSerRS na Ni-NTA agarozima.

Sastojak	Pufer A	Pufer B	Pufer C
K₂HPO₄	12,5 mmol dm ⁻³	12,5 mmol dm ⁻³	12,5 mmol dm ⁻³
KH₂PO₄	12,6 mmol dm ⁻³	12,6 mmol dm ⁻³	12,6 mmol dm ⁻³
NaCl	500 mmol dm ⁻³	500 mmol dm ⁻³	500 mmol dm ⁻³
MgCl₂	5 mmol dm ⁻³	5 mmol dm ⁻³	5 mmol dm ⁻³
Glicerol	$\varphi = 0,10$	$\varphi = 0,10$	$\varphi = 0,10$
Imidazol	10 mmol dm ⁻³	30 mmol dm ⁻³	400 mmol dm ⁻³
β -merkaptotanol*	5 mmol dm ⁻³	5 mmol dm ⁻³	5 mmol dm ⁻³
PMSF*	1 mmol dm ⁻³	1 mmol dm ⁻³	1 mmol dm ⁻³

* Dodano neposredno prije korištenja pufera

2.2.2.5. Poliakrilamidna denaturirajuća elektroforeza na gelu u prisutnosti natrijevog dodecil-sulfata (SDS-PAGE)

Poseban oblik poliakrilamidne gel-elektroforeze je denaturirajuća elektroforeza u prisutnosti natrijevog dodecil-sulfata (SDS-PAGE) kod koje se elektroforetsko razdvajanje proteina vrši isključivo na temelju molekularne mase. Korištena je za provjeru uspješnosti pročišćavanja proteina nakon afinitetne kromatografije, za provjeru i optimiranje indukcije ekspresije gena za proteine, te u postupku istraživanja interakcija protein-protein.

Tehnika se bazira na denaturaciji proteina dodavanjem anionskog detergenta natrijevog dodecil-sulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS). Detergent se svojim hidrofobnim dijelovima veže na hidrofobne grupe proteina pa ih na taj način denaturira i razmotava u štapičasti oblik. Razmotana proteinska molekula nosi veliki negativan naboj koji potječe od vezanog SDS-a te je u odnosu na njega naboj samog proteina zanemariv. Na taj način svi proteini u gelu imaju jednak oblik te omjer naboja i mase, pa se razdvajaju isključivo na temelju molekularnih masa.

Postupak je proveden u aparaturi *Mini PROTEAN® II Electrophoresis Cell, BioRad*. Između dviju vertikalno postavljenih staklenih ploča do 2/3 volumena izliven je gel za razdvajanje sastava: maseni udio akrilamid:bisakrilamid (u masenom omjeru 29:1) 9 % ili 15 %, $0,375 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl (pH 8,8), SDS (4 mg ml^{-1}). Neposredno prije izlivanja, gelu je dodan inicijator polimerizacije amonijev persulfat (APS) konačne koncentracije $0,7 \text{ g dm}^{-3}$, te katalizator polimerizacije *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin (TEMED) do konačnog volumnog udjela 0,05 %. Gel je nadsvođen destiliranom vodom kako bi se spriječio pristup atmosferskom kisiku koji inhibira polimerizaciju. Po završetku polimerizacije (20–30 min) odlivena je voda i izliven gel za sabijanje sastava: maseni udio akrilamid:bisakrilamid (u masenom omjeru 29:1) 4 %, $0,125 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl (pH = 6,8), SDS (4 mg ml^{-1}) kojemu su APS do konačne koncentracije $0,7 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ i TEMED do konačnog volumnog udjela 0,05 % također dodani neposredno prije izlivanja. U gel za sabijanje postavljen je češalj s jažicama.

Prije nanošenja na gel, uzorcima je dodan pufer za nanošenje uzorka sastava: $62,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris-HCl (pH 6,8), $12,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ β -merkaptoetanol, glicerol ($\varphi = 0,06$), $12,5 \text{ mg ml}^{-1}$ SDS, 1 mg ml^{-1} bromfenol plavo. Uzorci su denaturirani u kipućoj vodi (5 min) i zatim nanieseni u jažice gela. Elektroforeza je provođena na sobnoj temperaturi u puferu za elektroforezu sastava: 1 mg ml^{-1} SDS, 192 mmol dm^{-3} glicin, 25 mmol dm^{-3} Tris (pH = 8,3). Elektroforeza je provođena 15 min pri naponu od 120 V i zatim oko 45 min pri 180 V. Nakon elektroforeze, proteini su detektirani bojanjem s otopinom *Coomassie Brilliant Blue* R250 ili redukcijom elementarnog srebra.

2.2.2.6. Ugušćivanje proteina ultrafiltracijom i izmjena pufera gel-filtracijom

Nakon provjere uspješnosti pročišćavanja proteina na Ni-NTA agarozu pomoću SDS-PAGE, frakcije koje su sadržavale značajnu količinu proteina ugušćene su metodom ultrafiltracije. Za ugušćivanje pročišćenog MtSerRS korišten je *Centricon®-centrifugal filter device (Milipore)* s porama koje propuštaju čestice manje od 30 kDa, a za ugušćivanje RpoH korišten je *Vivaspin 0.5 concentrator (Vivascience)* s porama koje propuštaju čestice do 5 kDa.

Ugušćenim proteinima je na gel-filtracijskoj koloni (5 ml, PD-10) izmjenjen pufer u 25 mmol dm^{-3} Tris (pH = 8), 200 mmol dm^{-3} NaCl, 5 mmol dm^{-3} MgCl_2 i 5 mmol dm^{-3} DTT, nakon čega im je dodan glicerol do konačnog volumnog udjela 0,10. Koncentracija proteina određena je spektrofotometrijski ili metodom po Bradfordu, te su proteini pohranjeni na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.2.7. Bojanje SDS-poliakrilamidnih gelova bojom *Coomassie Brilliant Blue*

Za vizualizaciju proteina nakon elektroforeze, gelovi su inkubirani u otopini sastava: etanol ($\varphi = 0,45$), octena kiselina ($\varphi = 0,10$), i $2,5 \text{ g dm}^{-3}$ boje *Coomassie Brilliant Blue* R-250. Naime, navedena boja se u kiseloj sredini elektrostatskim silama veže za amino skupine proteina, čime je omogućena njihova vizualizacija. Gelovi su inkubirani u otopini tijekom 20 min uz protresanje, a odbojavanje je izvođeno kuhanjem gela 13 min u destiliranoj kipućoj vodi.

2.2.2.8. Bojanje nativnih poliakrilamidnih gelova srebrom

Tehnike zasnovane na bojanju srebrom znatno su osjetljivije od bojanja pomoću *Coomassie Brilliant Blue* i mogu detektirati 0.1 ng proteina po vrpici, što ih čini izuzetno važnima pri analizi uzoraka raspoloživih u ograničenim količinama. Također, detektiraju i nukleinske kiseline. No, ove metode mogu imati nekoliko bitnih nedostataka kao što je izrazito pozadinsko bojenje (čistoća reagensa i vode od iznimne je važnosti), loša reproducibilnost, visoka cijena, slabo bojanje nekih proteina. Metode se baziraju na redukciji srebra koje se veže na amino skupine proteina. Korištena je inačica bojanja srebrom u kojoj se za impregnaciju gela upotrebljava srebrov nitrat, a redukcija se postiže djelovanjem formaldehida u alkalnoj otopini natrij-karbonata. Prije bojanja, gelove je potrebno dobro isprati u otopini etanola kako bi se uklonili ostaci Tris-a, SDS-a i glicina iz gela, koji mogu vezati srebro i time pojačati pozadinsko bojanje.

Gelovi su prvo fiksirani u otopini etanola ($\varphi = 0,50$) i octene kiseline ($\varphi = 0,12$) tijekom 30 minuta. Potom su inkubirani 30 minuta u otopini etanola ($\varphi = 0,10$) i octene kiseline ($\varphi = 0,05$). Kratko su isprani redestiliranom vodom, a zatim namakani 10 min u otopini sastava $3,4 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ i $3,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ dušična kiselina. Gelovi su isprani redestiliranom vodom tri puta po 5 minuta do potpunog obezbojenja te inkubirani 30 min u otopini 12 mmol dm^{-3} srebrova nitrata. Gelovi su zatim kratko isprani otopinom koja je sadržavala: $0,28 \text{ mmol dm}^{-3}$ natrij-karbonat i formaldehid ($\varphi = 0,0001$), nakon čega se provodilo razvijanje inkubacijom gela u otopini sastava: $0,28 \text{ mmol dm}^{-3}$ natrij-karbonat i formaldehid ($\varphi = 0,0005$), dok se nisu razvile pruge odgovarajućeg intenziteta. Tada se razvijanje zaustavilo uranjanjem u otopinu octene kiseline ($\varphi = 0,01$). Svaki korak inkubacije izvođen je uz protresanje na rotacijskoj platformi.

2.2.2.9. Određivanje masene koncentracije proteina

Metoda po Bradfordu

Metoda po Bradfordu je kolorimetrijska metoda za određivanje koncentracije proteina koja se temelji na promjeni maksimuma apsorbanije anionske boje *Coomassie Brilliant Blue* s 465 nm (crveno) na 595 nm (plavo) uslijed vezanja na proteine u kiseljoj otopini. (Bradford 1976).

Kako bi se odredila koncentracija proteina potrebno je načiniti baždarnu krivulju koristeći nekoliko koncentracija proteinskog standarda. Kao proteinski standard korišten je goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) koji je razrijeđen u rasponu od 1,2 do 20 μg u konačnom volumenu od 100 μl . Razrijeđeni su i uzorci proteina nepoznate koncentracije na koncentraciju koja se približno nalazi u rasponu koncentracije BSA, također u ukupnom volumenu od 100 μl . Tako pripremljenim uzorcima i slijepoj probi (uzorak bez proteina) dodalo se po 1 ml Bradfordovog reagensa sastava: 0,1 g dm^{-3} *Coomassie Brilliant Blue* R250 boja, etanol ($\varphi = 0,05$) i fosfatna kiselina ($\varphi = 0,085$). Uzorci su snažno promiješani te je nakon 20 min mjerena apsorbanija pri valnoj duljini od 595 nm. Koristeći izmjerene apsorbanije otopina BSA poznatih koncentracije konstruirao se baždarni pravac te se iz jednadžbe pravca odredila nepoznata koncentracija proteina.

Mjerenje koncentracije proteina na spektrofotometru NanoDrop 1000

Određivanje koncentracije proteina mjerenjem apsorbanije otopine proteina pri 280 nm (UV područje) temelji se na sposobnosti bočnih ogranaka aromatskih aminokiselina fenilalanin, triptofan i tirozin u proteinu da maksimalno apsorbiraju UV zračenje pri valnim duljinama oko 280 nm. Prema Beer-Lambertovom zakonu ($A = \epsilon \times l \times c$, pri čemu je ϵ molarni ekstinkcijski koeficijent, l duljina puta zrake svjetlosti kroz uzorak, a c koncentracija tvari koja apsorbira), vidljivo je da se poznavanjem molarnog ekstinkcijskog koeficijenta proteina i mjerenjem apsorbanije može odrediti koncentracija proteina.

Na postolje spektrofotometra NanoDrop 1000 nanijelo se 2 μl uzorka ispitivanog proteina te se u program unijela vrijednost ekstincijskog koeficijenta i molekulske mase. Mjerenjem apsorbancije pri 280 nm dobiveni su apsorpcijski spektri i koncentracije proteina izražene u mg ml^{-1} .

2.2.2.10. Retardacijska gel-elektroforeza

Retardacijska gel-elektroforeza uobičajena je metoda koja se koristi za proučavanje interakcija između proteina i nukleinskih kiselina (RNA ili DNA). Metoda se bazira na činjenici da kompleksi proteina i RNA/DNA sporije putuju kroz nedenaturirajući gel agaroze ili poliakrilamida u odnosu na slobodne fragmente nukleinskih kiselina. Budući da je stopa migracije DNA/RNA usporena (retardirana) vezanjem proteina, metoda je nazvana retardacijskom gel-elektroforezom (engl. *gel retardation* ili *gel shift assay*). Općenito se metodom može odrediti veže li protein (ili mješavina proteina) određen slijed RNA/DNA. Također, metodom se može pokazati da li u vezanju nukleinske kiseline sudjeluje više proteina. U tom slučaju, postojala bi razlika u elektroforetskoj pokretljivosti između kompleksa izgrađenog od jednog proteina i nukleinske kiseline u odnosu na pokretljivost kompleksa koji se sastoji od više proteina i iste nukleinske kiseline. Metoda nije ograničena samo na istraživanje interakcija proteina i nukleinskih kiselina, već se mogu proučavati i protein-protein interakcije prema analognom principu: kompleks proteina će kroz nedenaturirajući gel imati smanjenu elektroforetsku pokretljivost u odnosu na čiste proteine.

U ovom radu metoda je korištena za proučavanje interakcija između RpoH i MtSerRS; ukoliko dolazi do formiranja kompleksa, njegova će pokretljivost biti smanjena u odnosu na čiste proteine. Također je iskorištena i činjenica da SerRS veže pripadne tRNA – pokretljivost tog kompleksa je manja od pokretljivosti čiste tRNA. Ako i RpoH sudjeluje u vezanju, nastali ternarni kompleks rezultirat će još izraženijom gel-retardacijom.

Najprije je bilo potrebno renaturirati uzorak pripadne tRNA. U eksperimentu je korišten izoakceptor tRNA^{Ser} iz *Methanosarcina barkeri* s antikodonom GGA ($\text{MbtRNA}^{\text{Ser}}_{\text{GGA}}$) koja je pripremljena ranije u laboratoriju. Renaturacija je izvedena

inkubacijom uzorka 5 min na 70 °C u otopini 10 mmol dm⁻³ Tris-HCl (pH = 7,5), nakon čega je dodan MgCl₂ do konačne koncentracije 5 mmol dm⁻³. Uzorak je tada ostavljen 15-20 min na sobnoj temperaturi, te je pohranjen na ledu do upotrebe.

Istraživani proteini RpoH (8,3 pmol) i MtSerRS (8,3 pmol) inkubirani su s renaturiranom MbtRNA^{Ser_{GGA}} (14,8 pmol) u otopini sastava: 30 mmol dm⁻³ Hepes-KOH (titriran s NaOH do pH = 7,0) i 6 mmol dm⁻³ MgCl₂. Inkubacija proteina i renaturirane tRNA trajala je 15 min na 37 °C u ukupnom volumenu 13,5 µl. Prije nanošenja uzoraka na gel, dodan im je glicerol do volumnog udjela 4 % i bromfenol plavo do konačne koncentracije 0,3 mg ml⁻¹ radi praćenja tijekom elektroforeze. Elektroforeza je sprovedena u gelu sastava: maseni udio akrilamid:bisakrilamid (u masenom omjeru 19:1) 9 %, glicerol ($\varphi = 0,05$), 25 mmol dm⁻³ Mes-KOH (pH = 6,5), 10 mmol dm⁻³ magnezijev acetat, te u elektroforetskom puferu sastava: 25 mmol dm⁻³ Mes-KOH, 10 mmol dm⁻³ magnezijev acetat (pH = 6,5). Elektroforeza se odvijala u ledenici na 4 °C pri 120 V tijekom 2,5 h. Proteini i tRNA detektirani su bojanjem srebrom.

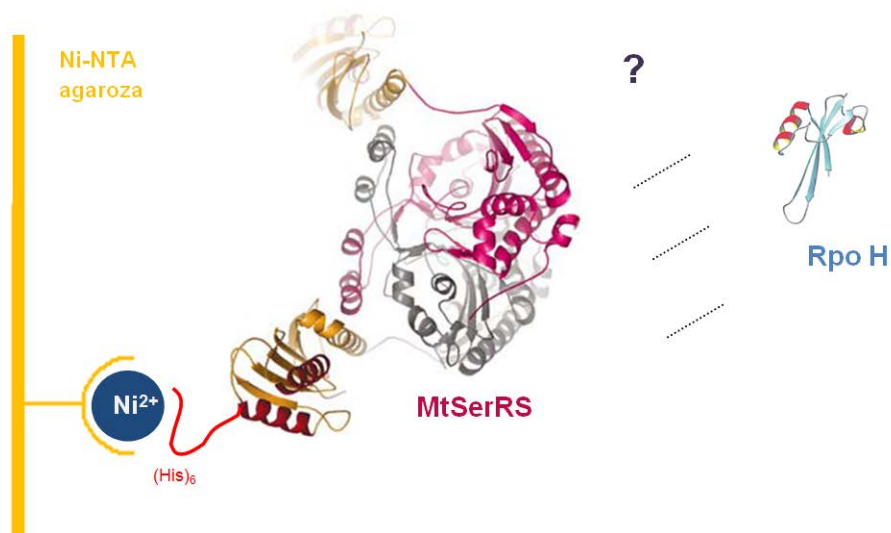
2.2.2.11. Supročišćavanje kompleksa na Ni-NTA agarozu (engl. *pull-down*)

Interakcija između RpoH i MtSerRS ispitivana je sustavom za detekciju *in vitro* tzv. supročišćavanjem kompleksa na koloni (engl. *pull-down*). Metoda se bazira na imobilizaciji jednog od proučavanih proteina na Ni-NTA agarozu pomoću His-privjeska („mamac“) u prisutnosti potencijalnog interakcijskog partnera („plijen“). Ukoliko postoji interakcija između dva proteina, prilikom elucije proteina s His-privjeskom dolazi i do koelucije interakcijskog partnera.

Oba proučavana proteina su bila eksprimirana u fuziji s His-privjeskom na N-kraju, stoga je najprije bilo potrebno pocijepati privjesak s jednog od njih. His-privjesak uklonjen je s proteina RpoH upotrebom proteaze Tev (engl. *AcTEV Protease (Invitrogen)*). Reakcija razgradnje inkubirana je na 30 °C u trajanju od 6 h prema uputama proizvođača. RpoH, kojem je uklonjen His-privjesak ukoncentriran je upotrebom *Vivaspin 0.5 concentrator (Vivascience)* i pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu. Nakon što mu je pocijepan His-privjesak, RpoH je

mogao poslužiti kao protein „plijen“, dok je MtSerRS, koja je posjedovala His-privjesak, mogla biti protein „mamac“ (slika 2.2).

Prvo je u kolonu stavljeno 100 μl suspenzije Ni-NTA agaroze, nakon čega je dva puta isprana s 150 μl redestilirane vode i uravnotežena s 300 μl pufera za ispiranje (20 mmol dm^{-3} imidazol, 5 mmol dm^{-3} MgCl_2). U eppendorf epruветama pomiješano je 25 μg MtSerRS i 25 μg RpoH (bez His-privjeska) u puferu za vezanje (5 mmol dm^{-3} Tris-HCl (pH 8), 5 mmol dm^{-3} MgCl_2 , 5 mmol dm^{-3} β -merkaptoletanol) u ukupnom volumenu od 25 μl . Uzorci su inkubirani na 30 $^{\circ}\text{C}$ tijekom 20 minuta (stvaranje kompleksa), nakon čega je 22 μl suspenzije nanijeto na kolonu. Kolona je ispirana tri puta s 150 μl pufera za ispiranje (20 mmol dm^{-3} imidazol, 5 mmol dm^{-3} MgCl_2), a zatim su vezani proteini eluirani s 50 μl imidazola (500 mmol dm^{-3} , pH 7,5). Kao kontrole, čisti uzorci proteina (MtSerRS i RpoH) zamiješani su također u puferu za vezanje te pojedinačno nanijeti na kolone. Skupljene frakcije analizirane su SDS-PAGE-om na 15 % poliakrilamidnom gelu.



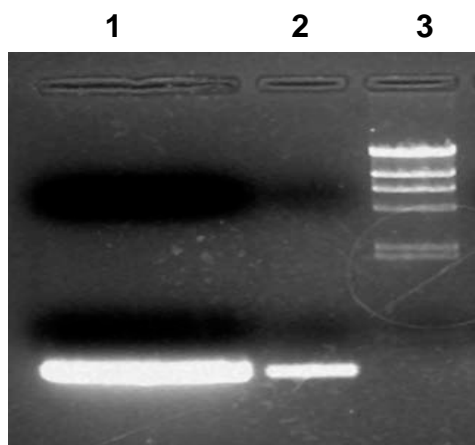
Slika 2.3. Shema detekcije interakcije između MtSerRS i RpoH (bez His-privjeska) na Ni-NTA agarozu. MtSerRS djeluje kao „mamac“, a RpoH je protein „plijen“.

3. REZULTATI

3.1. Konstrukcija rekombinantnog plazmida za prekomjernu ekspresiju gena *rpoH*

Gen *rpoH* koji kodira podjedinicu H RNA-polimeraze (RpoH) umnožen je metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) na kalupu genomske DNA iz *M. thermautotrophicus*. Korištene početnice (tablica 2.1) dizajnirane su na način da sadrže nukleotidne sljedove koje specifično cijepaju restrikcijske endonukleaze *BamHI* odnosno *XhoI*, stoga se ti sljedovi nalaze na 5' odnosno 3' kraju umnoženog PCR produkta.

Veličina PCR produkta provjerena je elektroforezom na 1 % gelu agaroze usporedbom s markerom - DNA faga λ pocijepana restrikcijskim enzimom *HindIII* (λ DNA-*HindIII*) (slika 3.1), nakon čega je umnoženi PCR produkt izrezan iz gela i pročišćen pomoću kompleta za pročišćavanje DNA *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).



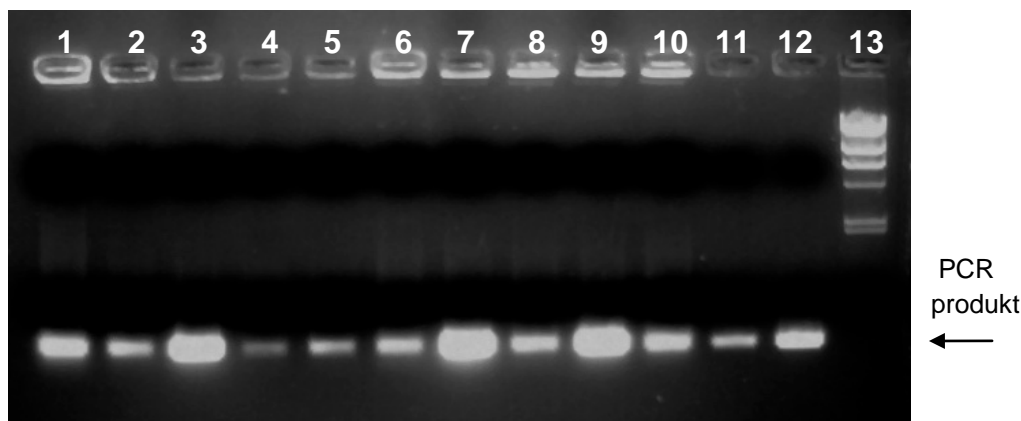
Slika 3.1. Elektroforeza PCR produkta na 1 % agaroznom gelu. 1 – PCR produkt tj. gen *rpoH* umnožen početnicama RpoH_F i RpoH_R (preparativna količina) (tablica 2.2), 2 – PCR produkt prethodnog napravljenog PCR-a (probni uzorak), 3 – marker za duljinu fragmenata DNA (λ DNA-*HindIII*).

PCR produkt je zatim podvrgnut cijepanju restriksijskim enzimima *Bam*HI i *Xho*I kako bi se dobili stršeci krajevi komplementarni vektoru pPROEX Htb, koji je prethodno u laboratoriju pocijepan istim enzimima. Nakon inkubacije sa spomenutim enzimima, pocijepani PCR produkt razdvojen je u gelu agaroze iz kojeg je izrezan i pročišćen pomoću kompleta *QIAquick Gel Extraction Kit* (*Qiagen*).

Zatim je postavljena reakcija ligacije (opisano u poglavlju 2.2.1.1, sastav ligacijske smjese prikazan u tablici 2.3) pocijepanog PCR produkta u restriksijsko mjesto *Bam*HI/*Xho*I plazmida pPROEX Htb (pocijepan prethodno u laboratoriju), čime je dobiven rekombinantni plazmid pPROEXHtb-RpoH. Prekomjernom ekspresijom ovako ugrađenog gena *rpoH* dobiva se protein RpoH s privjeskom od šest histidina na N-kraju. His-privjesak moguće je i odstraniti jer protein u svojoj sekvenci sadrži i mjesto za cijepanje proteazom Tev.

Transformacija stanica *E. coli* soja DH5 α ligacijskom smjesom izvršena je metodom elektroporacije (opisano u poglavlju 2.2.1.3). Budući da vektor pPROEX Htb posjeduje gen za rezistenciju na ampicilin, rast samo transformiranih stanica osigurava se dodatkom ampicilina u hranjive podloge.

Nasumično je odabrano 10 transformanata s LB/Amp krute podloge te metodom PCR na bakterijskim kolonijama (engl. colony PCR) (opisano u poglavlju 2.2.1.4) provjereno da li je gen *rpoH* uspješno ukloniran u vektor. Produkti reakcije razdvojeni su elektroforezom u gelu agaroze (slika 3.2) te je pokazano da sve odabrane kolonije posjeduju insert RpoH.



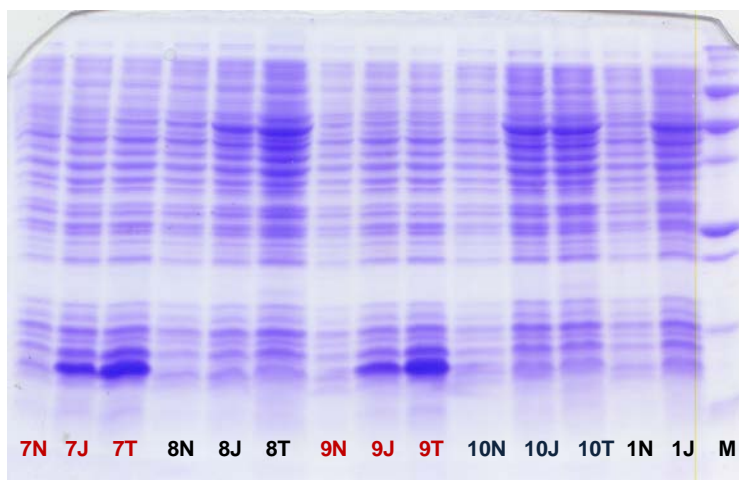
Slika 3.2. Elektroforeza PCR produkata dobivenih metodom PCR na bakterijskim kolonijama. 1 - 10 produkti PCR-a na nasumično odabranim bakterijskim kolonijama, **11** – *Bam*HI/*Xho*I pocijepani PCR produkt tj. gen za RpoH; **12** – PCR produkt; **13** – marker za duljinu odsječaka DNA (λ DNA-*Hind*III).

3.2. Optimiranje uvjeta prekomjerne ekspresije gena za protein RpoH

Budući da je u ovom radu u našem laboratoriju po prvi puta provedena heterologna prekomjerna ekspresija RpoH, s ciljem što većeg prinosa proteina, ispitani su optimalni uvjeti ekspresije. U tom postupku se ustvrdila bakterijska kolonija koja pokazuje najbolju ekspresiju, optimalno vrijeme trajanja prekomjerne ekspresije te minimalna, ali dovoljna količina IPTG-a kojom se inducira ekspresija. Također je provjereno stvara li prekomjerno ekspimirani protein RpoH u bakterijskom domaćinu inkluzijska tijela.

3.2.1. Utvrđivanje optimalnog vremena prekomjerne ekspresije gena za protein RpoH

S obzirom da je metodom *colony* PCR utvrđeno da sve stanice DH5 α transformirane ligacijskom smjesom posjeduju rekombinantni plazmid s insertom *rpoH*, testirana je indukcija ekspresije navedenog gena. U tu svrhu su, kako bi se ustanovilo optimalno vrijeme indukcije, alikvoti (50 μ l) induciranih stanica uzeti 1,5 h i 3 h od trenutka indukcije, tj. dodatka IPTG-a. Zbog usporedbe, uzeti su i alikvoti neinduciranih stanica. Analizom na SDS-gelu je pokazano da stanice inducirane 3 h posjeduju znatno veću količinu proteina RpoH u odnosu na stanice inducirane 1,5 h (slika 3.3).

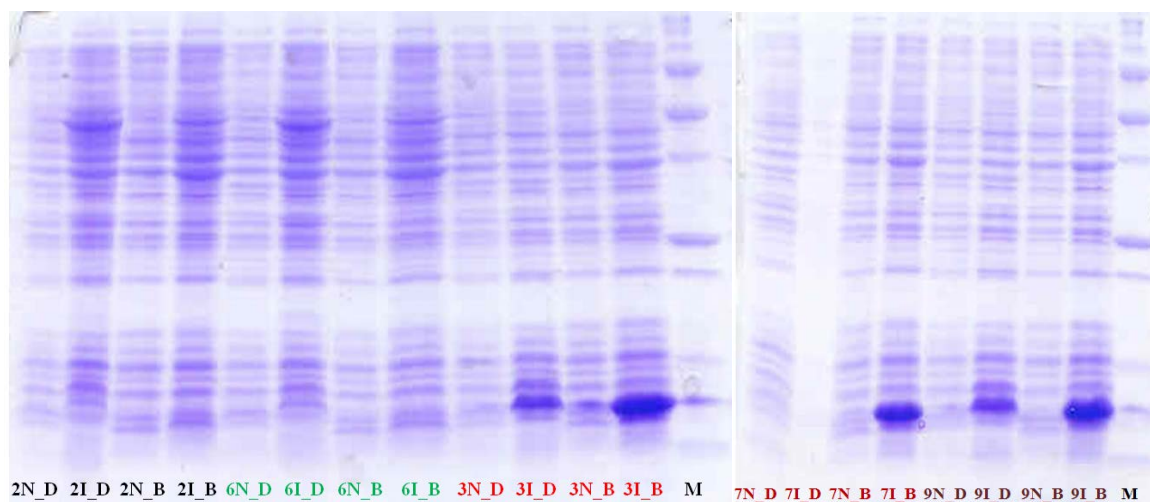


Slika 3.3. Određivanje optimalnog vremena prekomjerne ekspresije RpoH. Bakterijski lizati su označeni brojevima (7, 8, 9, 10, 1) te različitim bojama. Slova uz broj označavaju N: neinducirane stanice; J: stanice inducirane 1,5 h; T: stanice inducirane 3 h. M: marker molekulske masa (kDa).

3.2.2. Testiranje ekspresije gena za protein RpoH u ekspresijskim stanicama BL21

Budući da je u svim transformiranim stanicama DH5 α uspješno inducirana ekspresija gena za protein RpoH, a metodom PCR na bakterijskim kolonijama utvrđeno da sve izabrane kolonije posjeduju rekombinantni vektor pPROEXHtb-RpoH, proizvoljno su izabrane kolonije 2, 3, 6, 7 i 9 (slika 3.2) iz kojih su komercijalnim kompletom za pročišćavanje izolirani rekombinantni plazmidi. Izoliranim rekombinantnim plazmidima izvršena je transformacija stanica BL21 koje su pogodne za prekomjernu ekspresiju proteina. Transformacija stanica napravljena je metodom elektroporacije (opisano u poglavlju 2.2.1.3).

Slijedila je pretraga kolonija s ciljem odabira one koja će pokazivati najbolju ekspresiju gena za protein RpoH. Pritom je bilo zanimljivo usporediti efikasnost indukcije ekspresije gena u stanicama DH5 α i BL21. U tu svrhu izvršena je indukcija ekspresije proteina transformiranih stanica DH5 α i BL21 1 mmol dm⁻³ IPTG-om te su stanice inkubirane na 37 °C tijekom 3 h. Postupak eksperimenta i priprema uzoraka za analizu SDS-poliakrilamidnom elektroforezom opisani su u poglavlju 2.2.2.2, a rezultati su prikazani na slici 3.4.



Slika 3.4. SDS-poliakrilamidna gel-elektroforeza proteinskih ekstrakta transformiranih stanica *E. coli* DH5 α i BL21 koje su prekomjerno ekspimirale protein RpoH. Na gel su nanešeni proteinski ekstrakti (označeni različitim bojama i brojkama) dobiveni centrifugiranjem 50 μ l stanične kulture. Slova uz broj označavaju N: neinducirane stanice; I: stanice inducirane 3 h; D: DH5 α ; B: BL21. M – markeri molekulaskih masa (veliĉine: 260, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 kDa).

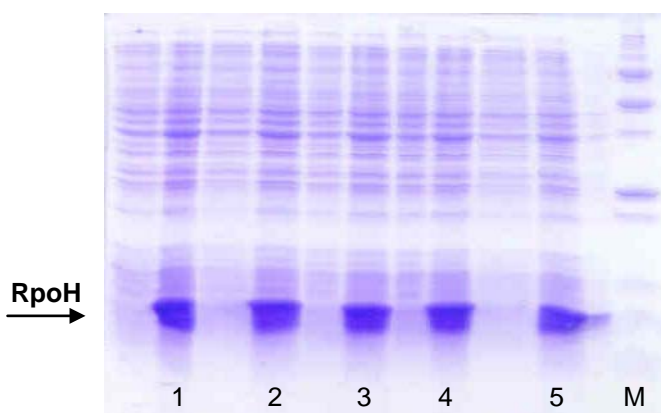
Iz slike 3.4 je vidljivo da su transformirane kolonije 3, 7 i 9 oba soja (DH5 α i BL21) imale dobru ekspresiju gena za protein RpoH, dok u ostalim kolonijama nije došlo do ekspresije. Također, kao što je i bilo očekivano, ekspresija je ipak bila nešto bolja u stanicama BL21. Prilikom pripreme uzoraka za elektroforezu došlo je do gubitka uzorka 7I_D i stoga nije nanijet na gel. Za konaĉnu potvrdu da stanice posjeduju plazmid koji je zaista rekombinantni vektor pPROEX Htb s ugrađenim genom za RpoH, plazmid je izoliran iz kolonije 9 (jedna od kolonija koja pokazuje dobru ekspresiju) upotrebom komercijalnog kompleta te sekvenciran u servisu za sekvenciranje na Institutu Ruđer Bošković.

3.2.3. Utvrđivanje optimalne koncentracije IPTG-a za indukciju ekspresije gena za protein RpoH

S obzirom da se sekvenciranjem potvrdilo da kolonija 9 sadrži vektor pPROEX Htb s pravilno ugrađenim genom za RpoH te da stanice BL21 pokazuju bolju ekspresiju proteina od DH5 α , u daljnim eksperimentima je korištena isključivo kolonija 9 BL21. U

svrhu štednje IPTG-a, prije indukcije ekspresije gena za RpoH u preparativne svrhe, testirana je količina IPTG-a optimalna za ekspresiju sljedećim koncentracijama: 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 i 1 mmol dm⁻³.

Bakterijske suspenzije inkubirane su na 37 °C tijekom 3 h nakon čega su uzeti alikvoti od 50 µl u kojima su stanice oborene centrifugiranjem. Supernatant je uklonjen, a talog stanica resuspendiran u 15 µl redestilirane vode. Analiza je izvršena SDS-PAGE elektroforezom (slika 3.6).

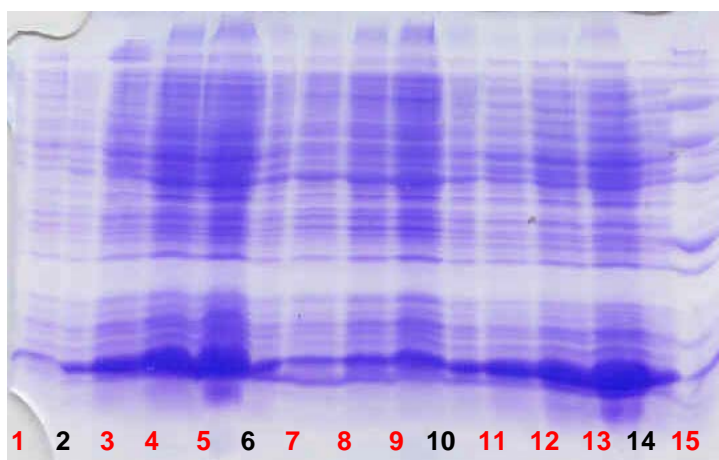


Slika 3.5. Denaturirajuća elektroforeza proteinskih ekstrakata stanica BL21 induciranih različitim koncentracijama IPTG-a na 15% poliakrilamidnom (19:1) gelu. U jažice 1 – 5 su nanijeti resuspendirani stanični talozi dobiveni iz 50 µl suspenzije stanica induciranih sljedećim koncentracijama IPTG-a: 0,1, 0,3, 0,5 0,7 i 1 mmol dm⁻³. M – marker molekulskih masa (kDa).

Budući da se razina proteina RpoH nije znatno razlikovala s obzirom na količinu IPTG-a (slika 3.5), koncentracija od 0,3 mmol dm⁻³ je izabrana kao dovoljna za indukciju te je korištena prilikom prekomjerne ekspresije gena za protein RpoH u preparativne svrhe. Također, iz slike gela je vidljivo da je došlo do djelomičnog prelijevanja sadržaja u okolne jažice.

3.2.4. Provjera tendencije RpoH za stvaranjem inkluzijskih tijela

Također je testirano agregira li heterologno eksprimirani protein RpoH u bakterijskom domaćinu u inkluzijska tijela. Naime, zbog visoke razine ekspresije proteina, postoji mogućnost da protein taloži u inkluzijskim tijelima. U tom slučaju je potrebno optimirati uvjete ekspresije (osobito temperaturu) i pročišćavanja proteina. Postupak eksperimenta opisan je u poglavlju 2.2.2.2., a analiza je izvršena na 15 % SDS gelu (slika 3.6).



Slika 3.6. Provjera sklonosti RpoH za stvaranjem inkluzijskih tijela na 15 % SDS gelu. U jažicu 1 nanijet je resuspendirani stanični talog dobiven iz 50 μ l suspenzije neinduciranih stanica. U jažice 3, 4 i 5 nanijeto je redom po 2,2, 4,4 i 8,8 μ l alikvota stanica nakon soniciranja. U jažice 7, 8 i 9 nanijeto je po 2,2, 4,4 i 8,8 μ l resuspendiranog taloga (u 1 ml redestilirane vode) dobivenog nakon centrifugiranja soniciranih stanica. U jažice 11, 12 i 13 nanijeto je po 2,2, 4,4 i 8,8 μ l supernatanta dobivenog nakon centrifugiranja soniciranih stanica. U jažicu 15 nanijet je marker molekulskih masa (kDa). U jažice označene crnom bojom je došlo do prelijevanja sadržaja iz okolnih jažica.

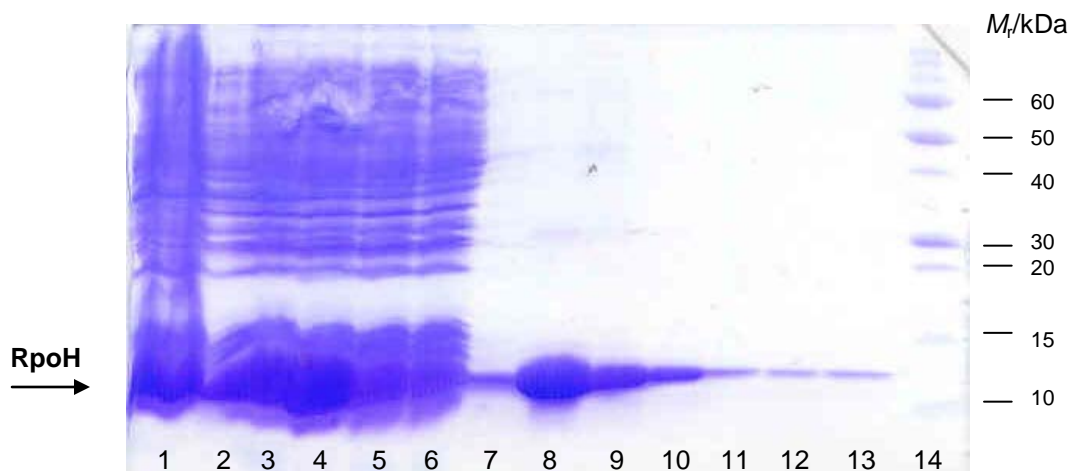
Iz slike 3.6 je vidljivo da je indukcija stanica bila uspješna budući da u liniji 1, u kojoj se nalazi alikvot neinduciranih stanica, nema vrpce koja pripada proteinu RpoH. U linijama 3, 4 i 5 nalaze se alikvoti stanica nakon soniciranja. Jasno se vidi da je sonikacija induciranih stanica bila efikasna. U svrhu provjere da li protein RpoH u bakterijskom domaćinu agregira u inkluzijska tijela, na gel su nanijeti resuspendirani talozi dobiveni nakon centrifugiranja soniciranih stanica (linije 7, 8 i 9) te alikvoti

supernatanta dobivenog istim centrifugiranjem (linije 11, 12 i 13). Naime, centrifugiranjem u staničnom talogu zaostaju krupniji dijelovi stanice, dok u supernatantu zaostaje topiva citosolna frakcija. Ukoliko protein taloži u inkluzijskim tijelima, nalazit će se u frakciji „taloga“. Usporedbom vrpce na gelu, vidljivo je da se veći udio proteina nalazi u topivoj citosolnoj frakciji (linije 11, 12 i 13), dok manji dio proteina agregira u inkluzijska tijela, tj nalazi se u frakciji „talog“ (linije 7, 8 i 9). No, s obzirom da se radi o manjoj količini proteina koja se nalazi u inkluzijskim tijelima, zaključeno je da su primijenjeni uvjeti indukcije ekspresije gena zadovoljavajući. Prilikom pripreme gela upotrijebljenog u ovom eksperimentu, korišten je češalj s manjim jažicama, zbog čega je količina nanašanih uzoraka bila prevelika te je došlo do prelijevanja sadržaja iz okolnih jažica u jažice 2, 6, 10 i 14.

3.3. Prekomjerna ekspresija gena i pročišćavanje RpoH na Ni-NTA agarozu u preparativne svrhe

Kao što je opisano u prethodnom poglavlju, prije prekomjerne ekspresije RpoH u preparativne svrhe, izvršeno je testiranje inducirajućih uvjeta kojim su se slijedeći parametri pokazali optimalnim: indukcija 0,3 mmol dm⁻³ IPTG-om tijekom 3 h na 37 °C, te su isti korišteni za prekomjernu ekspresiju proteina u preparativne svrhe (opisano u poglavlju 2.2.2.3).

Nakon indukcije ekspresije RpoH, proteinski ekstrakt je pripremljen kao što je opisano u poglavlju 2.2.2.3 i podvrgnut pročišćavanju afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu (opisano u poglavlju 2.2.2.4). Frakcije prikupljene u pojedinim koracima pročišćavanja analizirane su SDS-poliakrilamidnom elektroforezom (slika 3.7).



Slika 3.7. Provjera uspješnosti pročišćavanja proteina RpoH na 15% SDS gelu. 1 - 9 μL staničnog lizata, 2 – 1,2 μL staničnog lizata, 3 – 9 μL proteinskog ekstrakta nakon sonikacije i centrifugiranja, 4 – 9 μL proteinskog ekstrakta nakon sonikacije i drugog centrifugiranja, 5 – alikvot proteina koji se nisu afinitetno vezali na kolonu (proteinski ekstrakt nakon propuštanja kroz Ni-NTA kolonu) 6 – ispiranje puferom A, 7 – ispiranje puferom B, 8 - 13: frakcije skupljene prilikom eluiranja RpoH puferom C (imidazol koncentracije 200 mmol dm^{-3}), 14 – marker molekulskih masa.

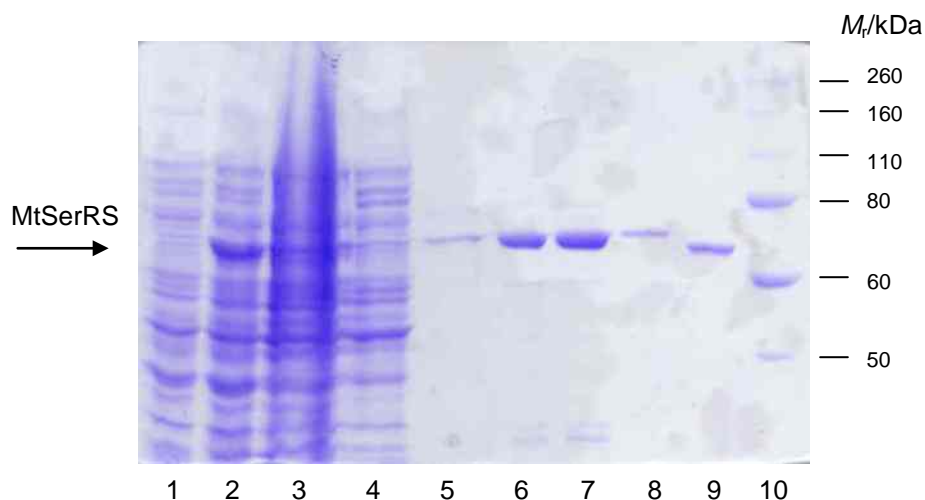
Iz SDS-gela (slika 3.7) vidljivo je da je pročišćavanje RpoH na Ni-NTA koloni bilo uspješno. Budući da je RpoH prisutan u citosolnoj frakciji, liza stanica bila je također efikasna (linija 1 i 2). Specifične interakcije His-privjeska s Ni-NTA agarozom, omogućile su vezanje RpoH na kolonu i time uklanjanje ostalih proteina ispiranjem puferima A i B (linije 6 i 7) s različitim koncentracijama imidazola (20 i 40 mmol dm^{-3}).

RpoH je eluiran s Ni-NTA agaroze (linije 8-13) ispiranjem s puferom C koji sadrži visoku koncentraciju imidazola (200 mmol dm^{-3}). Frakcije najbogatije proteinom (linije 8-10) ukoncentrirane su te im je izmijenjen pufer na koloni PD-10 u pufer D (poglavlje 2.2.2.6). Čistom proteinu određena je koncentracija metodom po Bradfordu i spektrofotometrijski (vidi poglavlje 2.2.2.9).

3.4. Prekomjerna ekspresija gena i pročišćavanje MtSerRS na Ni-NTA agarozu u preparativne svrhe

Kao što je već prije spomenuto, kloniranje gena za SerRS iz *M. thermoautotrophicus* (MtSerRS) u vektor pET28b između restrikcijskih mjesta *NdeI* i *HindIII*, kao i transformacija stanica *E.coli* soja BL21 navedenim rekombinantnim plazmidom napravljena je ranije u laboratoriju. Također, prethodno su utvrđeni i optimalni parametri za prekomjernu ekspresiju gena za MtSerRS: 0,7 mmol dm⁻³ IPTG i indukcija u trajanju od 3 h na temperaturi od 37 °C. Stoga su navedeni uvjeti korišteni prilikom indukcije ekspresije gena i pročišćavanje proteina MtSerRS u preparativne svrhe, koja je opisana u 2.2.2.3 poglavlju.

Rast bakterijske kulture praćen je spektrofotometrijski; pri vrijednosti OD₆₀₀ od 0,3 dodan je ZnCl₂ do konačne koncentracije 0,5 mmol dm⁻³, a pri vrijednosti OD₆₀₀ od 0,8 (tzv. log-faza rasta) inducirana je ekspresija proteina IPTG-om (konačne koncentracije 0,7 mmol dm⁻³). Cinkov klorid se induciranim stanicama dodaje zato što se cink nalazi u aktivnom mjestu MtSerRS, koja se u inducirajućim uvjetima proizvodi u količini koja je znatno veća od one pri konstitutivnoj ekspresiji. Nakon uzgoja je slijedilo pročišćavanje proteina na Ni-NTA agarozu (opisano u poglavlju 2.2.2.4), te je uspješnost pročišćavanja provjerena na SDS-gelu (slika 3.8).

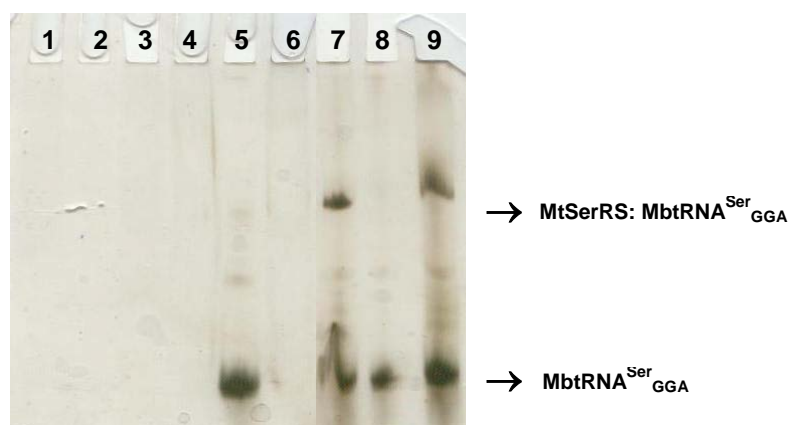


Slika 3.8. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje MtSerRS. **1** – alikvot neinduciranih bakterijskih stanica, **2** – alikvot induciranih bakterijskih stanica, **3** – alikvot proteina koji se nisu afinitetno vezali na Ni-NTA agarozu (ekstrakt nakon propuštanja kroz Ni-NTA kolonu), **4** – ispiranje puferom A (sadrži imidazol koncentracije 10 mmol dm^{-3}), **5** – ispiranje puferom B (sadrži imidazol koncentracije 30 mmol dm^{-3}), **6** – **8**: frakcije skupljene prilikom eluiranja puferom C (sadrži imidazol koncentracije 400 mmol dm^{-3}), **9** – prethodno pročišćena seril-tRNA-sintetaza metanogenog tipa iz *M. barkeri*, **10** – Marker.

Slika 3.8 pokazuje da je pročišćavanje MtSerRS na Ni-NTA agarozu bilo uspješno. Budući da je MtSerRS prisutan u liniji 2 (aliquot induciranih stanica), dok nije prisutan u liniji 1 (aliquot neinduciranih stanica), indukcija stanica je bila efikasna. MtSerRS se ekspimirao u fuziji s N-terminalnim His-privjeskom te su specifične reverzibilne interakcije između His-privjeska i Ni-NTA agaroze omogućile vezanje MtSerRS na kolonu i uklanjanje ostalih proteina ispiranjem puferima A i B (linije 4 i 5) s različitim koncentracijama imidazola (10 i 30 mmol dm^{-3}). Protein se eluira po dodatku pufera C, koji sadrži visoku koncentraciju imidazola (400 mmol dm^{-3}) (linije 6 - 8). Imidazol se natječe s bočnim ogrankom histidina za vezanje na Ni^{2+} zbog čega se rekombinantni protein (s histidinskim privjeskom) ispiru s kolone. Vidljivo je da su prve dvije frakcije elucije najbogatije proteinom, stoga su ukoncentrirane te im je izmijenjen pufer na koloni PD-10 u pufer D (poglavlje 2.2.2.6). Čistom proteinu određena je koncentracija metodom po Bradfordu i spektrofotometrijski (vidi poglavlje 2.2.2.9).

3.5. Retardacijska gel-elektroforeza u ispitivanju interakcije RpoH i MtSerRS

Kako bi se ispitalo stvaranje kompleksa između MtSerRS i RpoH korištena je retardacijska gel-elektroforeza. Metoda se bazira na činjenici da kompleksi proteina s nukleinskim kiselinama ili drugim proteinima putuju sporije kroz nenedenaturirajući gel agaroze ili poliakrilamida u odnosu na slobodne komponente. Stoga bi smanjena elektroforetska pokretljivost smjese proteina MtSerRS i RpoH u odnosu na čiste proteine ukazivala na postojanje kompleksa MtSerRS:RpoH. Također je uzeta u obzir i činjenica da SerRS veže pripadne tRNA – pokretljivost tog kompleksa je manja od pokretljivosti čiste tRNA. Ako se u smjesu doda i RpoH i dođe do dodatne retardacije, značilo bi da i RpoH sudjeluje u vezanju i da nastaje ternarni kompleks. Postupak i uvjeti retardacijske gel-elektroforeze opisani su u poglavlju 2.2.2.10, a rezultati su prikazani na slici 3.9.



Slika 3.9. Retardacijska gel-elektroforeza kompleksa MtSerRS:RpoH i MtSerRS:RpoH:tRNA. Naneseni uzorci **1)** MtSerRS (1 μ g), **2)** RpoH (1 μ g), **3)** MtSerRS (1 μ g) i RpoH (1 μ g), **4)** MtSerRS (1 μ g) i RpoH (2 μ g), **5)** MbtRNA^{Ser}_{GGA} (0,5 μ g), **6)** mMbSerRS (1 μ g), **7)** MtSerRS (1 μ g) i MbtRNA^{Ser}_{GGA} (0,5 μ g), **8)** mMbSerRS (1 μ g) i MbtRNA^{Ser}_{GGA} (0,5 μ g), **9)** MtSerRS (1 μ g), RpoH (2 μ g) i MbtRNA^{Ser}_{GGA} (0,5 μ g) .

Gel je nakon elektroforeze bojan srebrom budući da je na taj način moguće detektirati proteine, nukleinske kiseline i njihove komplekse. U jažice 1 i 2 nanijeti su čisti proteini RpoH i MtSerRS, a u jažice 3 i 4 njihova smjesa. U uvjetima u kojima je izvođena elektroforeza su navedeni proteini imali premalu elektroforetsku pokretljivost i nisu ušli u gel. Na gel je nanijeta i MbtRNA^{Ser}_{GGA} (jažica 5) koja zbog negativnog naboja ima relativno veliku elektroforetsku pokretljivost te je njena vrpca lijepo vidljiva.

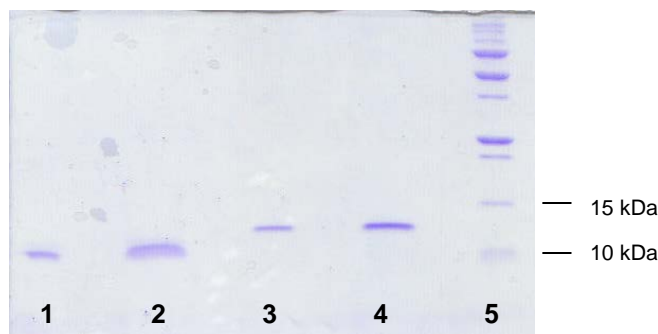
Kao pozitivna kontrola stvaranju kompleksa između MtSerRS i MbtRNA^{Ser}_{GGA} (jažica 7), na gel je nanijeta i smjesa mMbSerRS i MbtRNA^{Ser}_{GGA} (jažica 8). No, u liniji 8 nalazi se samo vrpca koja pripada molekuli tRNA što znači da kompleks nije nastao. Vjerojatno je upotrebljeni enzim mMbSerRS zbog duže pohrane izgubio aktivnost. Stvaranje kompleksa između MtSerRS i MbtRNA^{Ser}_{GGA} (linija 7) bilo je uspješno; u liniji 7 vidljiva je donja vrpca koja pripada tRNA i gornja vrpca koja pripada kompleksu MtSerRS:tRNA. Također, da vrpca na gelu zaista potječe od nekovalentnog kompleksa MtSerRS:tRNA potvrđuje se usporedbom s linijama 1 i 5 gdje su nanijeti uzorci čistog proteina MtSerRS (nije ušao u gel), odnosno čiste MbtRNA^{Ser}_{GGA}.

U jažicu 9 nanijeta je smjesa RpoH, MtSerRS i MbtRNA^{Ser}_{GGA}. Ukoliko dolazi do formiranja trojnog kompleksa između navedenih molekula, njegova elektroforetska pokretljivost bi se razlikovala u odnosu na pokretljivost binarnog kompleksa MtSerRS:MbtRNA^{Ser}_{GGA} (linija 7). Iz slike gela je vidljivo da se položaj gornje vrpce linije 7 (koja dakle pripada MtSerRS:MbtRNA^{Ser}_{GGA}) i gornje vrpce linije 9 (pripada potencijalnom trojnom kompleksu RpoH:MtSerRS:MbtRNA^{Ser}_{GGA}) malo razlikuju. Protein RpoH je relativno malen protein (molekularne mase oko 10 kDa) pa očekivana razlika u pokretljivosti potencijalnog trojnog kompleksa i jest mala, no ne možemo sa sigurnošću tvrditi da je ova razlika u pokretljivosti značajna.

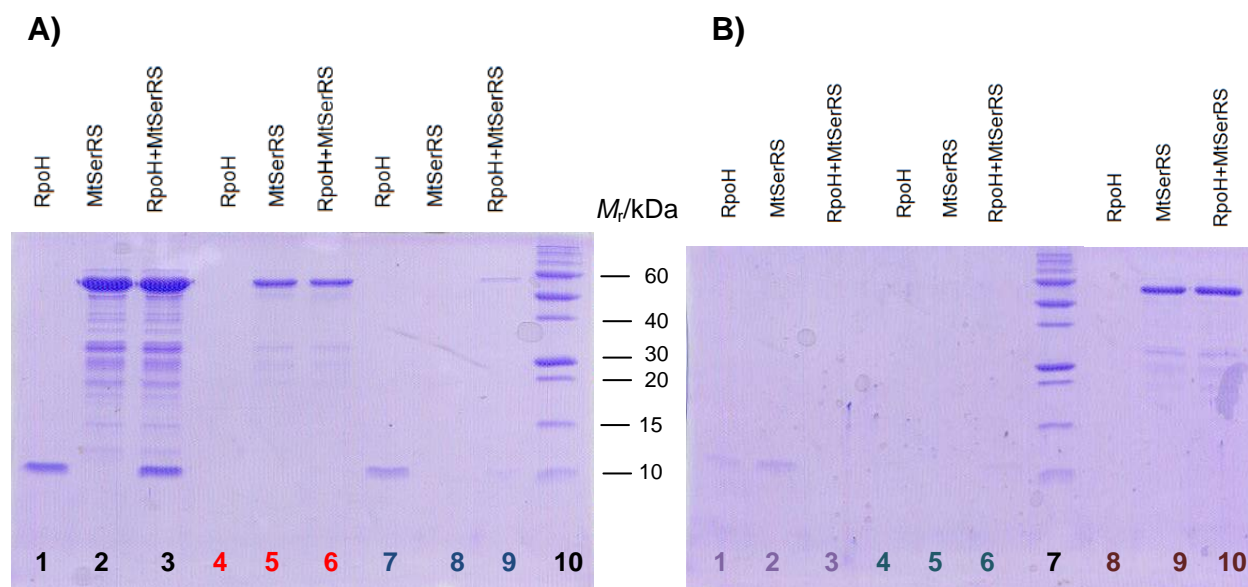
3.6. Supročišćavanje kompleksa RpoH:MtSerRS na Ni-NTA agarozu

Interakcija između RpoH i MtSerRS ispitivana je supročišćavanjem kompleksa na koloni (engl. *pull-down*). Metoda se bazira na imobilizaciji jednog od proučavanih proteina na Ni-NTA agarozu pomoću His-privjeska („mamac“) u prisutnosti potencijalnog interakcijskog partnera („plijen“). Ukoliko postoji interakcija između dva proteina, prilikom elucije proteina s His-privjeskom dolazi i do koelucije interakcijskog partnera. Protein RpoH izabran je kao protein „plijen“, stoga mu je najprije uklonjen N-terminalni histidinski privjesak. To je učinjeno upotrebom proteaze Tev (engl. *AcTEV Protease (Invitrogen)*) budući da rekombinantni vektor pPROEXHtb-RpoH, kojim je transformiran bakterijski soj korišten za indukciju prekomjerne ekspresije RpoH, posjeduje mjesto cijepanja koje prepoznaje proteaza Tev (nalazi se nizvodno od regije koja kodira His-privjesak i uzvodno od inserta *rpoH*; slika 2.1). Uvjeti reakcije su prvotno provjereni u probnim količinama, nakon čega je izvršena razgradnja u preparativnim količinama. Reakcija je inkubirana na 30 °C u trajanju od 6 h prema uputama proizvođača. Uspješnost reakcije provjerena je na SDS-gelu (slika 3.10), iz kojeg je jasno vidljiva razlika veličine između proteina RpoH kojem je pocijepan His-privjesak, i proteina RpoH koji posjeduje His-privjesak. Pocijepani RpoH ukoncentriran je upotrebom *Vivaspin 0.5 concentrator (Vivascience)* i pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu od nepocijepanog RpoH.

Pull-down je izveden inkubiranjem smjese proteina MtSerRS i RpoH (bez His-privjeska) u puferu za vezanje na 30 °C tijekom 20 minuta, nakon čega je smjesa nanijeta na Ni-NTA agarozu (opisano u poglavlju 2.2.2.11). Kao kontrole, korišteni su i čisti uzorci proteina, MtSerRS i RpoH (bez His-privjeska), također inkubirani u puferu za vezanje te pojedinačno nanijeti na kolone. Prethodno eluciji 500 mmol dm⁻³ imidazolom, kolone su isprane tri puta (20 mmol dm⁻³ imidazol) radi uklanjanja proteina koji su se nespecifično vezali za kolonu. Sve frakcije su skupljene i analizirane SDS-PAGE-om na 15% poliakrilamidnom gelu (slika 3.11).



Slika 3.10. Provjera uklanjanja His-privjeska na proteinu RpoH. U jažice 1 i 2 je nanijeto po 1 µg i 2 µg RpoH razgrađenog proteazom Tev (aliquoti od 5,6 µl i 11,2 µl smjese razgradnje). U jažice 3 i 4 nanijeta je ista količina nerazgrađenog RpoH (1 µg i 2 µg). U jažicu 5 je nanijet marker molekulskih masa.



Slika 3.11. Supročišćavanje kompleksa RpoH:MtSerRS na Ni-NTA agarozu (engl. *pull-down assay*).

A) u jažice 1, 2 i 3 nanijeto je redom: 1 µg RpoH (bez His-privjeska), 1 µg MtSerRS, i smjesa 1 µg RpoH (bez His-privjeska) i 1 µg MtSerRS prije nanošenja na kolonu. U jažice 4, 5 i 6 (obilježene crvenom bojom) nanijeti su aliquoti nakon prve elucije 500 mmol dm⁻³ imidazolom. U jažice 7, 8 i 9 nanijeti su aliquoti nakon prvog ispiranja 20 mmol dm⁻³ imidazolom. U jažicu 10 nanijet je marker molekulskih masa (kDa). **B)** U jažice 1, 2 i 3 nanijeti su aliquoti nakon drugog ispiranja 20 mmol dm⁻³ imidazolom, a u jažice 4, 5 i 6 aliquoti nakon trećeg ispiranja. U jažicu 7 nanijet je marker molekulskih masa (kDa). U jažice 8, 9 i 10 (obilježene tamno crvenom bojom) nanijeti su aliquoti nakon druge elucije 500 mmol dm⁻³ imidazolom.

U linijama 1, 2 i 3 slike 3.11. A nalaze se vrpce koje pripadaju redom proteinu RpoH (bez His-privjeska), MtSerRS i njihovoj smjesi prije nanošenja na kolonu i služe kao pozitivna kontrola. U linijama 4, 5 i 6 nanijete su frakcije elucije 500 mmol dm⁻³ imidazolom. Budući da MtSerRS posjeduje His-privjesak, dolazi do interakcije s Ni-NTA agarozom te se veže na kolonu. Prilikom elucije imidazolom, silazi s kolone (linije 5 i 6), za razliku od RpoH koji ne posjeduje His privjesak i ne zadržava se na koloni, stoga se ne nalazi u frakciji elucije (linija 4). U liniji 6 nalazi se frakcija elucije smjese MtSerRS i RpoH (bez His-privjeska); ukoliko dolazi do protein-protein interakcije između MtSerRS i RpoH, prilikom elucije MtSerRS dolazi i do koelucije RpoH. U tom slučaju u liniji 6 bile bi vidljive dvije vrpce: jedna koja pripada MtSerRS i druga koja pripada RpoH. No, kao što je vidljivo iz slike gela, vrpca RpoH izostaje. Stoga ovim eksperimentom interakcija MtSerRS:RpoH nije potvrđena. U linijama 7, 8 i 9 nanijete su frakcije nakon prvog ispiranja kolone imidazolom (20 mmol dm⁻³) iz kojih je vidljivo da dolazi do ispiranja male količine proteina RpoH (bez His-privjeska).

Slika 3.11. B prikazuje analizu ostalih frakcija eksperimenta *pull-down*. U linijama 1, 2 i 3 nalaze se frakcije drugog ispiranja (20 mmol dm⁻³ imidazolom). U liniji 2 je vidljiva vrpca koja pripada proteinu RpoH; zbog nepažljivijeg nanošenja uzoraka je došlo do prelijevanja sadržaja jažice 1 u jažicu 2. Budući da se protein RpoH (bez His-privjeska) nalazi u frakcijama prvog i drugog ispiranja 20 mmol dm⁻³ imidazolom, očito se djelomično nespecifično veže na kolonu. U linijama 8, 9 i 10 nanijeti su alikvoti druge elucije 500 mmol dm⁻³ imidazolom iz kojih je vidljivo da se određena količina MtSerRS i dalje zadržava na koloni, stoga je za potpunu eluciju proteina potrebna veća koncentracija imidazola ili veći volumen 500 mmol dm⁻³ imidazola.

4. RASPRAVA

Ciljevi ovog rada bili su prekomjerno eksprimirati i pročistiti sljedeće proteine: podjedinicu H arhejske RNA-polimeraze (RpoH) i seril-tRNA-sintetazu metanogenog tipa iz *M. thermautothropicus* (MtSerRS), nakon čega se interakcija između istih proteina pokušala i potvrditi biokemijskim metodama *in vitro*: gel-retardacijskom elektroforezom i supročišćavanjem kompleksa na koloni (engl. *pull-down*). Naime, iako se prvotno smatralo da aminoacil-tRNA-sintetaze funkcioniraju kao samostalni proteini koji imaju fundamentalni zadatak aminoaciliranja tRNA, otkrićem brojnih kompleksa koji sadrže aaRS postalo je jasno da pored kanonske uloge u translaciji ovi enzimi sudjeluju i u drugim staničnim procesima koji nisu direktno povezani s translacijom proteina. Seril-tRNA-sintetaze, poput ostalih aaRS, u nekim organizmima stupaju u interakciju s drugim proteinima. U kvascu *Saccharomyces cerevisiae* je pronađen kompleks kvaščeve seril-tRNA-sintetaze i proteina Pex21p koji je uključen u biogenezu peroksisoma (Ročak i sur. 2002). Iako točna uloga kompleksa nije poznata, pronalazak pruža potencijalnu povezanost između procesa translacije i biogeneze peroksisoma. Također, Kuhner i sur. (2009) su uočili da bakterijska SerRS interagira s proteinima koji sudjeluju u replikaciji molekula DNA. Stoga, kako bi se istražile moguće interakcije između arhejske seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa i drugih staničnih komponenata, prethodno je u našem laboratoriju sprovedena pretraga sustavom dvaju hibrida, u kojem je MtSerRS korištena kao protein „mamac“ u potrazi za interakcijskim partnerima iz konstruirane cDNA biblioteke arheje *M. thermautothropicus*. Pretragom je pronađeno i potvrđeno da MtSerRS stabilno interagira s arginil-tRNA-sintetazom (MtArgRS) (Godinić-Mikulčić i sur. 2010). Pokazano je da MtArgRS u kompleksu stimulira reakciju aminoacilacije MtSerRS 4 puta, a budući da je najizraženiji porast serilacijske aktivnosti uočen u uvjetima povišene temperature i osmolarnosti, predloženo je da formiranje kompleksa ima ulogu u optimiranju reakcije aminoaciliranja u različitim okolišnim uvjetima. Također, sustavom dvaju hibrida, kao potencijalni interakcijski partner detektirana je i podjedinica H RNA-polimeraze.

Iako je sustav dvaju hibrida rutinski postupak za identifikaciju velikog broja potencijalnih interakcijskih partnera, sama tehnika daje mnogi mnogo lažnih pozitiva (i negativna), s grubom procjenom oko 70 % (Deane i sur. 2002). Razlozi visoke stope grešaka leže u samom principu tehnike, kojom se uvijek proučavaju (i) prekomjerno eksprimirani (ii) fuzijski proteini u (iii) jezgri (iv) kvasaca. Svaka od navedenih stavki može biti odgovorna za lažne rezultate. No, podaci dobiveni sustavom dvaju hibrida slične su kvalitete kao i oni dobiveni alternativnim postupcima, kao što je koafinitetna purifikacija nakon koje slijedi masena spektrometrija. Zbog vjerojatnosti generiranja lažnih pozitiva, interakcije je potrebno potvrditi visoko pouzdanim testovima.

Budući da u literaturi nema podataka o interakciji SerRS s RNA-polimerazom u niti jednoj domeni života, bilo je izuzetno zanimljivo testirati postojanje ove interakcije. Do sada, interakcije aaRS s komponentama RNAP zabilježene su, no ne i potvrđene, samo u bakterije *E. coli*. Naime, metodama velikog opsega (engl. *highthroughput*) za proučavanje protein-protein interakcija zabilježeni su kompleksi između dvije aminoacil-tRNA-sintetaze iz *E. coli* i podjedinica RNA-polimeraze. Butland i sur. (2005) su detektirali interakciju između AspRS s α podjedinicom RNA-polimeraze, a Arifuzzaman i sur. (2006) su detektirali interakciju AspRS s β podjedinicom RNAP te interakciju stres-inducibilne LysRS s β i β' podjedinicama. Budući da su bakterije i arheje prokariotski organizmi u kojima procesi transkripcije i translacije nisu odijeljeni te se, štoviše, odvijaju simultano, moguće je pretpostaviti da aaRS zaista stupaju u interakciju s podjedinicama transkripcijske mašinerije. Nadalje, koncept o staničnom usmjeravanju molekule tRNA u sisavaca ide u prilog pretpostavci. Naime, u tom konceptu molekula tRNA je usmjerena od jezgre, gdje se sintetizira, do aaRS koje vrše aminoacilaciju, pa do ribosoma gdje služe kao materijal u biosintezi proteina. Navedeni koncept ima brojne potvrde. Pronađeno je da mnoge aminoacil-tRNA-sintetaze stupaju u interakciju s elongacijskim faktorima i smatra se da takve interakcije služe kao vektor direktnog prijenosa aa-tRNA od aminoacil-tRNA-sintetaza do ribosoma (Mirande, 2010). Ukoliko bi interakcija između aaRS i RNAP postojala, navedeni koncept vrijedio bi i za arheje.

Kako bi se istražile navedene interakcije, bilo je potrebno pročistiti proteine u količinama dovoljnim za biokemijske eksperimente. U tu svrhu je gen za podjedinicu H

umnožen PCR-om na genomskoj DNA *M. thermautothropicus* koristeći specifično dizajnirane početnice i ugrađen u vektor pPROEX Htb između restrikcijskih mjesta *BamHI* odnosno *XhoI*. Nakon toga, uspješno je izvršena transformacija stanica *E. coli* BL21, koje su pogodne za prekomjernu ekspresiju proteina. Budući da je u ovom radu po prvi puta provedena heterologna prekomjerna ekspresija RpoH u našem laboratoriju, prethodno induciranoj ekspresiji proteina u preparativne svrhe izvršeno je testiranje inducirajućih uvjeta kojim su se sljedeći parametri pokazali optimalnim: indukcija 0,3 mmol dm⁻³ IPTG-om tijekom 3 h na 37 °C. Čest problem kod heterologno eksprimiranih proteina je moguća agregacija proteina u inkluzijska tijela. Pokazano je da pri optimiranim uvjetima RpoH dijelom agregira, no veći udio proteina se nalazio u topivoj frakciji stoga ga je bilo moguće dobiti u dovoljnim količinama. Protein se dobro ekspimirao u fuziji s N-terminalnim histidinskim privjeskom, koji je omogućio efikasno pročišćavanje na Ni-NTA agarozu. Iz taloga bakterijskih stanica dobivenog uzgojem u 0,5 l LB medija, pročišćeno je oko 11,75 mg RpoH proteina zadovoljavajuće čistoće (veće od 90 % prema SDS-PAGE) i u količini dovoljnoj za planirane pokuse. MtSerRS je također ekspimirana s N-terminalnim His-privjeskom i pročišćena afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni prema postupku ranije uhodanom u laboratoriju. Uzgojem iz 0,75 l noćne kulture dobilo se 15,84 mg proteina.

Nakon dobivanja proteina u dovoljnim količinama, izvršeno je testiranje protein-protein interakcija gel-retardacijskom elektroforezom i supročišćavanjem kompleksa na koloni. Dok rezultati gel-retardacijske elektroforeze daju naznaku da bi moglo doći do formiranja ternarnog kompleksa između RpoH: MtSerRS: tRNA^{Ser}, supročišćavanjem kompleksa na koloni utvrđeno je da interakcije nema. No, kako bi se sa sigurnošću utvrdilo postoji li interakcija između dva proteina, potrebni su dodatni eksperimenti poput kovalentnog povezivanja molekula (engl. *crosslinking*), aminoaciliranja, gel-filtracije, izotermalne kalorimetrije (engl. *Isothermal Titration Calorimetry*, ITC), površinske rezonancije plazmona (engl. *Surface Plasmon Resonance*, SPR). Također, osim spomenute mogućnosti da kompleks sudjeluje u usmjeravanju molekule tRNA u stanici, moguće je da ima drugačiju ulogu. Kao što je već spomenuto, pored kanonskih uloga u translaciji proteina, aminoacil-tRNA-sintetaze sudjeluju u različitim staničnim procesima (tablica 2.1), a među njima su i kontrola transkripcije. Putney i Schimmel su još 1981.

uočili da alanil-tRNA-sintetaza inhibira transkripciju vlastitog gena tako što se veže na palindromske sljedove koji obavijaju mjesto početka transkripcije. Inhibicija transkripcije je najizraženija kada je prisutna povišena koncentracija pripadne aminokiseline. Efekt aminokiseline uzrokovan je direktnom asocijacijom liganda (alanina) i sintetaze, koja posreduje snažnije vezanje na DNA. Također, pronađeno je da humana metionil-tRNA-sintetaza ima ulogu u sintezi rRNA (Ko i sur. 2000); u proliferativnim stanicama humana MetRS translocirana je u jezgricu gdje pozitivno utječe na sintezu rRNA kataliziranu RNA-polimerazom I.

Ako bi se daljnjim eksperimentima pokazalo da interakcija između MtSerRS i podjedinice H RNA-polimeraze postoji, ona bi mogla imati analognu ulogu u regulaciji transkripcije, gdje bi pod utjecajem nekog staničnog faktora, možda dostupnog serina, stimulirala ili inhibirala transkripciju vlastitog gena. Budući da je predloženo da podjedinica H u elongacijskoj fazi stupa u interakciju s nizvodnom DNA (+3 nukleotid od početka transkripcije) (Grohmann i sur. 2010), možda je za interakciju MtSerRS:RpoH potrebna i nukleinska kiselina. Svakako, glavni nedostatak izvršenih testova je što proučavaju interakcije *in vitro*, jer možda upravo za uspostavu interakcije nedostaje neka stanična komponenta, poput nukleinske kiseline, aminokiseline ili transkripcijskog faktora. Također, bitno je naglasiti da se u eksperimentima koristila samo podjedinica H RNA-polimeraze, koja je izvan svog prirodnog okoliša, dakle bez ostalih komponenata RNAP, te se njena struktura u otopini vjerojatno razlikuje od one u sklopu cijelog kompleksa RNAP. Iako istraživanja opisana u ovom radu nisu potvrdila interakciju MtSerRS:RpoH, dala su smjernice za buduće pokuse.

5. ZAKLJUČAK

- ◆ Gen *rpoH* umnožen je lančanom reakcijom polimeraze pomoću specifično dizajniranih početnica, te ugrađen u vektor pPROEX Htb pod kontrolom jakog T7 promotora kao kazeta *BamHI/XhoI*
- ◆ Optimiran je sustav za prekomjernu ekspresiju i pročišćavanje RpoH iz *E. coli* i inducirana ekspresija u preparativnoj količini
- ◆ Iz taloga bakterijskih stanica dobivenog uzgojem u 0,5 l LB medija, pročišćeno je oko 11,7 mg proteina RpoH zadovoljavajuće čistoće (veće od 90 % prema SDS-PAGE) i u količini dovoljnoj za planirane eksperimente
- ◆ Prekomjerno je eksprimirana i pročišćena MtSerRS prema protokolu ranije uhodanom u laboratoriju; uzgojem iz 0,75 l prekonodne kulture dobiveno je 15,8 mg proteina
- ◆ Interakcija MtSerRS:RpoH istražena je gel-retardacijskom elektroforezom i supročišćavanjem kompleksa na koloni
- ◆ Preliminarni rezultati gel-retardacijske elektroforeze dali su naznaku stvaranja kompleksa MtSerRS:RpoH
- ◆ Supročišćavanjem kompleksa na koloni asocijacija MtSerRS:RpoH nije detektirana

6. LITERATURA

Allers T., Mevarech M. (2005): Archaeal genetics — the third way. *Nat Rev Genet* **6**: 58-73.

Arifuzzaman M., Maeda M., Itoh A., Nishikata K., Takita C., Saito R., Ara T., Nakahigashi K., Huang H. C., Hirai A., Tsuzuki K., Nakamura S., Altaf-Ul-Amin M., Oshima T., Baba T., Yamamoto N., Kawamura T., Ioka-Nakamichi T., Kitagawa M., Tomita M., Kanaya S., Wada C., Mori H. (2006): Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Res* **16**: 686-691.

Arnez J.G., Moras D. (1997): Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem Sci* **22**: 211-216.

Barns S. M., Delwiche C. F., Jeffrey J. D., Pace N. R. (1996): Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9188–93.

Bartlett M. S., Thomm M., Geiduschek E. P. (2004): Topography of the euryarchaeal transcription initiation complex. *J Biol Chem* **279**: 5894-5903.

Bilokapić S., Ivić N., Godinić-Mikulčić V., Piantanida I., Ban N., Weygand-Đurašević I. (2009): Idiosyncratic helix-turn-helix motif in *Methanosarcina barkeri* seryl-tRNA synthetase has a critical architectural role. *J Biol Chem* **284**: 10706-10713.

Bilokapić S., Maier T., Ahel D., Gruić-Sovulj I., Söll D., Weygand-Đurašević I., Ban N. (2006): Structure of the unusual seryl-tRNA synthetase reveals a distinct zinc-dependent mode of substrate recognition. *EMBO J* **25**: 2498-2509.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive assay for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Brochier C., Gribaldo S., Zivanovic Y., Confaloniere F. & Forterre P. (2005): Nanoarchaea: representatives of a novel archaeal phylum or a fast-evolving euryarchaeal lineage related to Thermococcales? *Genome Biol* **6**: 1–10.

Butland G., Peregrín-Alvarez J. M., Li J., Yang W., Yang X., Canadien V., Starostine A., Richards D., Beattie B., Krogan N., Davey M., Parkinson J., Greenblatt J., Emili A. (2005): Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* **433**: 531-537.

Cavarelli J. i Moras D. (1993): Recognition of tRNAs by aminoacyl-tRNA synthetases. *The FASEB Journal* **7**: 79-86.

Chimnaronk S., Gravers Jeppesen M., Suzuki T., Nyborg J., Watanabe K. (2005): Dual-mode recognition of noncanonical tRNAs(Ser) by seryl-tRNA synthetase in mammalian mitochondria. *EMBO J* **24**: 3369-3379.

Clegg J. S., Jackson S. A. (1990): Glucose metabolism and the channeling of glycolytic intermediates in permeabilized L-929 cells. *Arch Biochem Biophys* **278**: 452-460.

Cramer P., Bushnell D. A., Kornberg R. D. (2001): Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* **292**: 1863-1876.

Cusack S., Berthet-Colominas C., Härtlein M., Nassar N., Leberman R. (1990): A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature* **347**: 249-255.

Cusack S., Yaremchuk A., Tukalo M. (1996): The crystal structure of the ternary complex of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase with tRNA(Ser) and a seryl-adenylate analogue reveals a conformational switch in the active site. *EMBO J* **15**: 2834-2842.

Deane C. M., Salwiński Ł., Xenarios I., Eisenberg D. (2002): Protein interactions: two methods for assessment of the reliability of high throughput observations. *Mol Cell Proteomics* **1**: 349-356.

Eriani G., Delarue M., Poch O., Gangloff J., Moras D. (1990): Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **347**: 203-206.

Godinić-Mikulčić V., Jarić J., Hausmann C. D., Ibba M., Weygand-Đurašević I. (2011): An archaeal tRNA-synthetase complex that enhances aminoacylation under extreme conditions. *J Biol Chem* **286**: 3396-3404.

Grohmann D., Hirtreiter A., Werner F. (2009): Molecular mechanisms of archaeal RNA polymerase. *Biochem Soc Trans* **37**:12-17.

Grohmann D., Hirtreiter A., Werner F. (2009): RNAP subunits F/E (RPB4/7) are stably associated with archaeal RNA polymerase: using fluorescence anisotropy to monitor RNAP assembly in vitro. *Biochem J* **421**: 339-343.

Grohmann D., Werner F. (2010): Hold on!: RNA polymerase interactions with the nascent RNA modulate transcription elongation and termination. *RNA Biol* **7**:310-315.

Grünberg S., Reich C., Zeller M. E., Bartlett M. S., Thomm M. (2010): Rearrangement of the RNA polymerase subunit H and the lower jaw in archaeal elongation complexes. *Nucleic Acids Res* **38**: 1950-1963.

Hausmann C. D., Ibba M. (2008a): Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 705-721.

Hausmann C. D., Ibba M. (2008b): Structural and functional mapping of the archaeal multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex. *FEBS Letters* **582**: 2178–2182.

Hausmann C. D., Praetorius-Ibba M., Ibba M. (2007): An aminoacyl-tRNA synthetase:elongation factor complex for substrate channeling in archaeal translation. *Nucleic Acids Res* **35**: 6094-6102.

Huet J., Schnabel R., Sentenac A. & Zillig W. (1983): Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *EMBO J* **2**: 1291–1294.

Ibba M., Morgan S., Curnow A.W., Pridmore D.R., Vothknecht U.C., Gardner W., Lin W., Woese C.R., Söll D. (1997): A euryarcheal lysyl-tRNA synthetase: resemblance to class I synthetases. *Science* **278**: 1119-1122.

Ibba M., Söll D. (2000): Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem* **69**: 617-650.

Ibba M., Söll D. (2001): The renaissance of aminoacyl-tRNA synthesis. *EMBO reports* **2**: 382-387.

Jarić J., Bilokapić S., Lesjak S., Crnković A., Ban N., Weygand-Đurašević I. (2009): Identification of amino acids in the N-terminal domain of atypical methanogenic-type Seryl-tRNA synthetase critical for tRNA recognition. *J Biol Chem* **284**: 30643-30651.

Kerjan P., Cerini C., Semeriva M., Mirande M. (1994): The multienzyme complex containing nine aminoacyl-tRNA synthetases is ubiquitous from *Drosophila* to mammals. *Biochim Biophys Acta* **1199**: 293–297.

Kim H. S., Vothknecht U. C., Hedderich R., Celic I., Söll D. (1998): Sequence divergence of seryl-tRNA synthetases in archaea. *J Bacteriol* **180**: 6446-6449.

Ko Y. G., Kang Y. S., Kim E. K., Park S. G., Kim S. (2000): Nucleolar localization of human methionyl-tRNA synthetase and its role in ribosomal RNA synthesis. *J Cell Biol* **149**: 567–574.

Kusser A. G., Bertero M. G., Naji S., Becker T., Thomm M., Beckmann R., Cramer P. (2008): Structure of an archaeal RNA polymerase. *J Mol Biol* **376**: 303-307.

Leinfelder W., Forchhammer K., Zinoni F., Sawers G., Mandrand-Berthelot M. A., Böck A. (1988): Escherichia coli genes whose products are involved in selenium metabolism. *J Bacteriol* **170**: 540-546.

Lipman R. S., Chen J., Evilia C., Vitseva O., Hou Y. M. (2003): Association of an aminoacyl tRNA synthetase with a putative metabolic protein in archaea. *Biochemistry* **42**: 7487–7496.

Mirande M. (2010): Processivity of translation in the eukaryote cell: role of aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett* **584**: 443-447.

Miziorko H. M., Laib F. E., Behnke C. E. (1990): Evidence for substrate channeling in the early steps of cholesterologenesis. *J Biol Chem* **265**: 9606-9609.

Muramatsu T., Nishikawa K., Nemoto F., Kuchino Y., Nishimura S., Miyazawa T., Yokoyama S. (1988): Codon and amino-acid specificities of a transfer RNA are both converted by a single post-transcriptional modification. *Nature* **336**: 179-181.

Naji S., Grünberg S., Thomm M. (2007): The RPB7 orthologue E' is required for transcriptional activity of a reconstituted archaeal core enzyme at low temperatures and stimulates open complex formation. *J Biol Chem* **282**: 11047-11057.

Negrutskii B. S., Deutscher M. P. (1992): A sequestered pool of aminoacyl-tRNA in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 3601-3604.

Negrutskii B. S., Deutscher M. P. (1991): Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4991-4995.

Nelson D. L., Cox M. M. (2005): Protein metabolism. U: Nelson D. L., Cox M. M. (ur.) Lehninger Principles of Biochemistry. New York, Freeman and Company, str. 1034-1075.

O'Donoghue P., Sethi A., Woese C. R., Luthey-Schulten Z. A. (2005): The evolutionary history of Cys-tRNA^{Cys} formation. Proc Natl Acad Sci USA **102**: 19003–19008.

Ovádi J. (1991): Physiological significance of metabolic channelling. J Theor Biol **152**: 1-22.

Pallanck L., Schulman L. H. (1992): tRNA discrimination in aminoacylation. U: Hatfield D. L., Lee B. J., Pirtle R. (ur.) Transfer RNA in protein synthesis. Boca Raton, CRC Press, str. 279-318.111

Praetorius-Ibba M., Rogers T. E., Samson R., Kelman Z., Ibba M. (2005): Association between archaeal prolyl- and leucyl-tRNA synthetases enhances tRNA(Pro) aminoacylation. J Biol Chem **280**: 26099–26104.

Putney S. D., Schimmel P. (1981): An aminoacyl tRNA synthetase binds to a specific DNA sequence and regulates its gene transcription. Nature **291**: 632-635.

Robinson J. C., Kerjan P., Mirande M. (2000): Macromolecular assemblage of aminoacyl tRNA synthetases: quantitative analysis of protein-protein interactions and mechanism of complex assembly. J Mol Biol **304**: 983-994.

Sivaram P., Deutscher M. P. (1990): Existence of two forms of rat liver arginyl-tRNA synthetase suggests channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis. Proc Natl Acad Sci USA **87**: 3665-3669.

Smith D. W. (1975): Reticulocyte transfer RNA and hemoglobin synthesis. *Science* **190**: 529–535.

Srere P. A. (1987): Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu Rev Biochem* **56**: 89-124.

Stapulionis R., Deutscher M. P. (1995): A channeled tRNA cycle during mammalian protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7158-7161.

Steitz T. A. (1998): A mechanism for all polymerases. *Nature* **391**:231-232.

Sumegi B., Sherry A. D., Malloy C. R. (1990): Channeling of TCA cycle intermediates in cultured *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **29**: 9106-9110.

Szymanski M., Barciszewski J. (1999): The aminoacyl-tRNA Synthetase Data Bank (AARSDB). *Nucleic Acids Res* **27**:332-335.

Ujvári A., Luse D. S. (2006): RNA emerging from the active site of RNA polymerase II interacts with the Rpb7 subunit. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 49-54

Voet D., Voet J. G. (2004): Translation. U: Voet D., Voet J.G. (ur.) *Biochemistry*. New York , John Wiley & Sons, str. 1285-1371.

Weygand-Đurašević I., Cusack S. (2005): Structure, function and evolution of seryl-tRNA synthetases. U: Ibba M., Francklyn C., Cusack S. (ur.) *The Aminoacylc-tRNA Synthetases*, Georgetown, Landes Bioscience, str. 177–192.

Werner F. (2007): Structure and function of archaeal RNA polymerase. *Molecular Microbiology* **65**: 1395-1404.

Werner F., Weinzierl R. O. (2002): A recombinant RNA polymerase II-like enzyme capable of promoter-specific transcription. *Mol Cell* **10**: 635-646.

Westover K. D., Bushnell D. A., Kornberg R. D. (2004): Structural basis of transcription: nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center. *Cell* **119**:481-489.

Woese C. R., Fox G. E. (1977): Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5088-5090.

Woese C. R., Kandler O., Wheelis M. L. (1990): Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4576–4579.

Yee A., Booth V., Dharamsi A., Engel A., Edwards A. M., Arrowsmith C. H. (2000): Solution structure of the RNA polymerase subunit RPB5 from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6311-6315.

Young R. A. (1991): RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* **60**: 689-715.

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 11. lipnja 1985. godine u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu "Dr. Ante Starčevića" i XV. gimnaziju. 2004. godine sam upisala studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom fakultetskog obrazovanja sam primala stipendiju A kategorije Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH. U periodu od veljače do svibnja 2009. godine boravila sam na Virginia Polytechnic Institute and State University, SAD, kao IAESTE praktikantica. Diplomski rad izradila sam na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod neposrednim vodstvom dr. sc. Jelene Jarić i mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Weygand-Đurašević.