Obilježavanje kloroplastne senzorske kinaze (CSK) afinitetnim biljezima HA i FLAG

Marinović, Mila

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:509383

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Mila Marinović

Obilježavanje kloroplastne senzorske kinaze (CSK) afinitetnim biljezima HA i FLAG

Diplomski rad

Zagreb, 2011. godina

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za elektronsku mikroskopiju,
Zavoda za molekularnu biologiju Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu,
pod vodstvom Prof. dr. sc. Hrvoja Fulgosija.
Predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja prof. biologije i dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Obilježavanje kloroplastne senzorske kinaze (CSK) afinitetnim biljezima HA i FLAG

Mila Marinović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

U genomu biljke *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh identificiran je gen At1g67840 koji kodira za protein kloroplastnu senzorsku kinazu (CSK), dio „drevnih“ dvokomponentnih signalnih sustava. Analizom aminokiselinskog slijeda utvrđena je visoka sačuvanost i sličnost određenih motiva u svih vaskularnih biljaka i algi te je protein CSK tip bakterijske senzorske histidinske kinaze utvrđene u fotosintetskim plastidima tj. kloroplastima. Cilj ovog rada je obilježavanje CSK proteina afinitetnim biljezima HA i FLAG u svrhu funkcionalne i strukturalne karakterizacije senzorske kinaze i specifičnijeg utvrđivanja njene uloge kod biljke *Arabidopsis thaliana*. Lančanom reakcijom polimerazom fuzionirali smo biljege HA i FLAG na karboksi terminalni kraj CSK proteina. Koristeći „Gateway“ rekombinacijsku tehnologiju konstrukt CSK_HA_FLAG ugrađuje se u ishodišni pENTR (engl. *entry*) vektor te naknadno u binarni pH7WG2,0 vektor. Nadalje, stanice agrobakterija EHA105 transformirane su s konstruktom pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG s ciljem daljnje ugradnje CSK_HA_FLAG komponente prisutne u T-DNA regiji binarnog vektora u genom biljke *Arabidopsis thaliana*. Ovim postupkom u transformiranim biljkama CSK-KO (engl. *knock-out*), inaktiviran je gen At1g67840.

(59 stranica, 23 slike, 3 tablice, 31 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Arabidopsis thaliana* / CSK / dvokomponentni sustavi / senzorske kinaze
fotosinteza / „Gateway“ tehnologija

Voditelj: Dr. sc. Hrvoje Fulgosi, prof.
Ocjenitelji: Dr. sc. Hrvoje Fulgosi, prof.
Dr. sc. Dunja Leljak-Levanić, doc.
Dr. sc. Zdravko Dolenec, prof.
Dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina, prof.

Rad prihvaćen: 6.listopada 2011.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Tagging of the chloroplast sensor kinase (CSK) with affinity epitopes HA and FLAG

Mila Marinović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In plant genome of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh gene At1g67840 that encodes chloroplast sensor kinase (CSK), which is a part of ancestral two-component signal systems has been identified. Sequence analysis showed high similarity of motifs in all major plant and algal lineages which indicates that CSK has evolved from a cyanobacterial sensor histidine kinase. The subject of this work has been tagging of the CSK protein with affinity epitopes HA and FLAG for the functional and structural characterization purpose of the sensor kinase and more specific deciphering of it's role in *Arabidopsis thaliana* plant. For that purpose we fused epitopes HA and FLAG into the carboxy-terminal end of the CSK protein by polymerase chain reaction. Using "Gateway" recombinant technology CSK_HA_FLAG construct has been inserted into the *entry* and subsequently into the binary pH7WG2,0 vector. Futhermore, *Agrobacterium* EHA105 cells were transformed with a final construct pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG with a goal of it further insertion in *Arabidopsis thaliana* plant genome, specifically into the CSK-KO plants.

(59 pages, 23 figures, 3 tables, 31 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: *Arabidopsis thaliana* / CSK / two-component systems / sensor kinases / photosynthesis / "Gateway" technology

Supervisor: Dr. Hrvoje Fulgosi, prof.
Reviewers: Dr. Hrvoje Fulgosi, prof.
Dr. sc. Dunja Leljak-Levanić, doc.
Dr. sc. Zdravko Dolenec, prof.
Dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina, prof.

Thesis accepted: 6th October 2011.

SADRŽAJ

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

POPIS KRATICA

1. UVOD 1

1.1. Građa kloroplasta 2

1.2. Fotosinteza 4

1.2.1. Svjetlosne reakcije fotosinteze 5

1.3. Endosimbioza 8

1.4. Dvokomponentni sustavi 10

1.5. Kloroplastna senzorska kinaza (CSK) 12

1.6. Antigeni biljezi 14

1.7. *Gateway* tehnologija 15

1.7.1. BP reakcija 16

1.7.2. LR reakcija 16

1.8. Cilj istraživanja 17

2. MATERIJALI I METODE 18

2.1 MATERIJALI 19

2.1.1. Kemikalije i enzimi 19

2.1.2. Uređaji 19

2.1.3. Nukleotidni slijed cDNA i nukleotidni sljedovi početnica za lančanu reakciju polimerazom 19

2.1.4. DNA standardi 20

2.1.5. Bakterijski sojevi 21

2.1.6. Plazmidni vektori 21

2.1.7. Biljni materijal 23

2.1.8. Hranjive podloge, antibiotici, otopine i puferi 23

2.2. METODE 26

2.2.1. Lančana reakcija polimerazom 26

2.2.2. Strategija obilježavanja CSK afinitetnim biljezima HA i FLAG 28

2.2.3. Izolacija DNA iz gela agaroze i pročišćavanje DNA iz otopine 28

2.2.4. Elektoforeza u gelu agaroze 29

2.2.5. Transformacija kompetentnih stanica *E. Coli* 29
2.2.6. Priprema i transformacija kemijski kompetentnih stanica bakterije *A. tumefaciens* 30
2.2.7. Mini- i Midipreparacija plazmidne DNA 31
2.2.8. Ugradnja konstrukta CSK_HA_FLAG u *entry* vektor pENTR™/SD/D-TOPO® 32
2.2.9. Digestija restrikcijskim enzimima 33
2.2.10. Gateway® LR reakcija 34
3. REZULTATI 37
3.1. Nukleotidni slijed cDNA gena At1g67840 i biljega HA i FLAG s restrikcijskom mapom 38
3.2. Nukleotidni slijed ishodišnog vektora pENTR™/SD/D-TOPO® s restrikcijskom mapom 40
3.3. Konstrukcija vektora pENTR- CSK_HA_FLAG 42
3.4. Konstrukcija ciljnog binarnog vektora pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG 46
3.5. Transformacija bakterija *A. tumefaciens* EHA 105 binarnim rekombinantnim vektorom pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG 48
4. RASPRAVA 50
5. ZAKLJUČAK 54
6. LITERATURA 56

POPIS KRATICA

A. tumefaciens lat. *Agrobacterium tumefaciens* (agrobakterija)	
ADP	adenozin difosfat
ATP	adenozin trifosfat
^{o}C	Celzijev stupanj
Cam	kloramfenikol
cpDNA	kloroplastna DNA
DNA	engl. *deoxyribonucleic acid* (deoksiribonukleinska kiselina)
cDNA	komplementarna DNA
Col-0	ekotip Colimbia biljne vrste *Arabidopsis thaliana*
CSK	kloroplastna senzorska kinaza
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dCTP	deoskicitidin trifosfat
dGTP	deoksigvanidin trifosfat
dTTP	deoksitimidin trifosfat
E. coli	lat. *Escherichia coli*
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
FAD	flavin adenin dinukleotid
Fd	feredoksin
FLAG	afinitetni, sintetski oktopeptidni biljeg
FNR	feredoksin-oksidoreduktaza
6-His	heksa-histidinski biljeg
HA	hemaglutinin (afinitetni biljeg)
Hyg	higromicin
Kan	kanamicin
KO	engl. *knock-out*
LHCI	engl. *Light harvesting complex* (antenski kompleks fotosistema I)
LHCII	engl. *Light harvesting complex* (antenski kompleks fotosistema II)
$NADP^{+}$	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (oksidirana forma)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (reducirana forma)
OEC	engl. *oxygen evolving complex*
PC	plastocijanin
PCR	engl. *polymerase chain reaction* (lančana reakcija polimerazom)
PQ	plastokinon
PQH_2	plastokinon (reducirani oblik)
PS I	fotosustav I
PS II	fotosustav II
Rif	rifampicin
RNA	engl. *ribonucleic acid* (ribonukleoinska kiselina)

RNAza	enzim ribonukleaza
Spec	spektinomicin
SDS	natrijev dodecil-sulfat
TAE	tris-acetatni-EDTA pufer
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)–1,3-propandiol
T-DNA	regija tumor inducirajućeg plazmida Ti bakterije *A. tumefaciens*, engl. *transfer* DNA
Wt	engl. *wild type*
W/v	engl. *weight per volume*

1. UVOD

1.1. Građa kloroplasta

Kloroplasti su najznačajniji članovi plastidne obitelji u kojima se odvija proces fotosinteze, prisutni su u svim biljnim stanicama kao i u algama. Razvijaju se iz proplastida, malih organela u nezrelim biljnim meristemskim stanicama (Alberts i sur, 2002). Daljni razvoj proplastida ovisi o potrebama svake stanice koja prolazi kroz fazu diferencijacije, a konačan oblik uveliko ovisi o jezgrinom genomu. Tako se iz proplastida mogu razviti etioplasti, kromoplasti, leukoplasti i najvažnija vrsta plastida, kloroplasti.

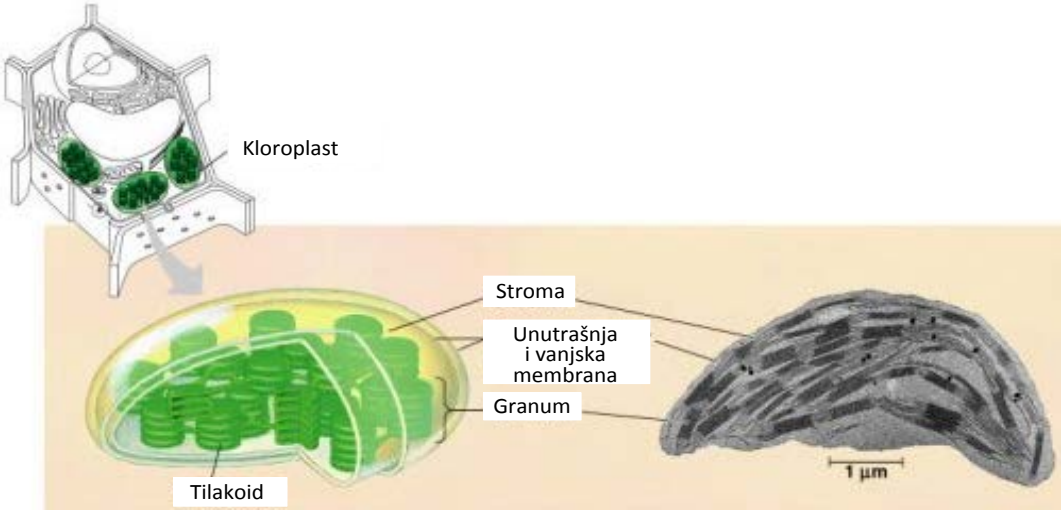
Najaktivnije fotosintetsko tkivo, mezofil lista, u stanicama može sadržavati od 30 do 100 kloroplasta. Mogu varirati oblikom i veličinom, ali u najviše slučajeva su ovalnog oblika i promjera 4-8 μm (Pevalek-Kozlina, 2003). Kloroplaste općenito karakterizira visoko propusna vanjska membrana i manje propusna unutarnja membrana. Između tih dviju membrana nalazi se međumembranski prostor. Obje ove membrane zajedno tvore kloroplastnu ovojnicu. Unutrašnja membrana okružuje veliki prostor, stromu, analog mitohondrijskom matriksu te ona sadrži mnoge topljive metaboličke enzime. Poput mitohondrija i kloroplasti sadrže svoj vlastiti genom i genetski sustav (Pevalek-Kozlina, 2003). Upravo zbog toga u stromi se nalazi i poseban set ribosoma, RNA i nekoliko kružnih molekula DNA koje sadrže gene za sintezu proteina i RNA u kloroplastu.

Posebnost kloroplasta je treća, tilakoidna membrana u kojoj su ugrađeni pigmenti i drugi proteini koji imaju sposobnost apsorpcije svijetlosti kao i transportni lanac elektrona, fotosustavi I i II te ATP sintaza. Upravo tilakoidna membrana tvori specifične membranske strukture, nalik spljoštenim vrećama tj. tilakoide, koji se na određenim mjestima skupljaju u nakupine, grane tilakoida (lat. *granum*), a grane tilakoida međusobno su povezane membranskim strukturama tzv. stroma-tilakoidima, odnosno lumen svakog tilakoida je spojen s lumenom preostalih tilakoida i tako se definira treći unutarnji odjeljak odnosno tilakoidni prostor, a koji je tilakoidnom membranom odvojen od strome kloroplasta (Slika 1).

Tilakoidi tjekom razvitka kloroplasta nastaju iz uleknuća unutrašnje membranske ovojnice pa su analogni mitohondrijskim kristama, stoga su tilakoidne membrane poput unutrašnjih mitohondrijskih membrana, nepropusne za većinu malih molekula i iona. Debljina tih membrana je u prosjeku oko 7 nm, a sastoje se od približno jednakih količina lipida i proteina. Sastojak karakterističan za membrane plastida, galaktolipid, predstavlja oko 40% lipidne frakcije. Ostatak se sastoji od klorofila (20%), fosfolipida (9%), sulfolipida (4%),

karotenoida (3%), kinona (3%) i sterola (2%) (Pevalek-Kozlina, 2003). Molekule klorofila u tilakoidnoj membrani uvijek su povezane s proteinima upravo visokospecifičnim nekovalentnim vezama.

Sadržaj proteina čine uglavnom enzimi ključni za prijenos elektrona, kompleksi antenskih pigmenata i proteina te reakcijska središta fotosistema, a svi oni su integralni membranski proteini uloženi u lipidni dvosloj tilakoidne membrane (Pevalek-Kozlina, 2003).



Slika 1. Prikaz unutrašnje strukture kloroplasta (slika je preuzeta s internet stranice www.daviddarling.info/encyclopedia/C/chloroplasts.html)

Svijetlost u kloroplastu može biti konvertirana samo ako je apsorbirana posredstvom specifičnog zelenog pigmenta, klorofila. Od raznih klorofila, najveće značenje u fotosintezi ima klorofil *a*. U biljkama kao i nekim algama, osim klorofila *a* redovito je prisutan i klorofil *b*. Klorofil *a* je plavozelene boje i maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 430 i 662 nm, dok je klorofil *b* žutozelene boje sa maksimumom apsorpcije valnih duljina 453 i 642 nm. Osnovna struktura klorofila je porfirinski sustav koji čine četiri pirolska prstena međusobno povezana metilnim skupinama u prstenasti sustav. Prstenasta struktura sadrži labavo vezane elektrone i to je dio molekule odgovoran za prijenos elekrona i redoks reakcije. Za boju molekule odgovoran je raspored dvostrukih veza. U središtu porfirinskog sustava nalazi se polivalentni metal magnezij (Mg^{2+}) koji je povezan s atomima dušika u pirolskim prstenovima. Za pirolski prsten broj IV. porfirinskog kostura vezan je esterskom vezom alkohol sa 20 C-atoma, fitol. Fitol je terpenoid koji se sastoji od četiri izoprenske jedinice što

ga čini izrazito hidrofobnim i upravo je on odgovoran za topljivost klorofila u lipidima. Tim dijelom klorofil se pričvršćuje za proteine u membrani. Klorofili se međusobno razlikuju po preostalim supstituentima. Tako klorofil *a* na II. pirolskom prstenu ima metilnu skupinu, a klorofil *b* aldehidnu skupinu (Pevalek-Kozlina, 2003).

Mnogi kloroplastni proteini su produkti transkripcije i translacije koja se događa unutar samog kloroplasta, a sama sinteza se odvija na kloroplastnim ribosomima. Preostali proteini potrebni za normalno funkcioniranje kloroplasta kodirani su jezgrinom DNA. Njihova sinteza se odvija na ribosomima prisutnima u citoplazmi i tek potom se unose u klorolaste. Prijenos kloroplastnih proteina iz citoplazme u kloroplast strogo je reguliran. Proteini kloroplasta čiji geni se nalaze u genomu jezgre su preproteini tj. sintetiziraju se kao preteče s N- terminalnim slijedom aminokiselina (signalni peptid) koji ih usmjerava prema kloroplastu. Taj proces sastoji se od dva ključna koraka. Prvi je vezivanje tranzitnog peptida na površinu kloroplasta, dok je drugi translokacija preko membrana kloroplastne ovojnice. Tranzitni peptid se prilikom transporta ili kratko nakon prijenosa proteolitički cijepa i nastaje zreli protein (Perry i Keegstra, 1994). Većina kloroplastih proteina kodiranih u jezgri unosi se u kloroplast posredstvom dva kompleksa translokacijskih proteina, TOC (engl. *Translocon of the Outer membranes of the Chloroplast*) i TIC (engl. *Translocon on the Inner membranes of the Chloroplast*) (Inoue i sur., 2010).

1.2. Fotosinteza

Fotosinteza je jedini biološki važan proces u kojem se djelovanjem energije Sunčevog zračenja anorganske tvari (voda i ugljik (IV)-oksid) mogu prevesti u složene organske spojeve. Proces fotosinteze provode fotoautotrofne bakterije i oksigene cijanobakterije te biljke, koje posjeduju specifične fotosintetske pigmentno-proteinske komplekse, uklopljene u tilakoidnu membranu biljnih kloroplasta. Osnovno svojstvo tih proteinskih kompleksa je sposobnost apsorpcije svjetlosne energije i njene pretvorbe u kemijsku energiju pohranjenu u kemijskim vezama šećera i ostalih organskih molekula. Takav oblik fotosinteze naziva se oksigenom fotosintezom jer rezultira oslobađanjem molekularnog kisika i uklanjanjem ugljikovog dioksida iz atmosfere. Neke fotosintetske bakterije (proteobakterije, zelene sumporne, zelene filamentozne, grimizne te gram pozitivne bakterije) upotrebljavaju svjetlosnu energiju za dobivanje elektrona iz drugih molekula, a ne samo iz vode i stoga kod tih organizama nema produkcije kisika (Whitmarsh i Govindjee, 1995). Takav oblik

fotosinteze naziva se anoksigena fotosinteza. Fotosinteza nije važna samo kvalitativno već i kvantitativno. Naime, svake godine se procesom fotosinteze transformira oko 200 do 500 miljardi tona ugljika i proizvede više od 100 miljardi metričkih tona ugljikohidrata (Pevalek-Kozlina, 2003).

Fotosinteza se odvija u području vidljivog dijela svjetlosnog spektra, između 380 i 760 nm. Razlikujemo svjetlosne reakcije ili primarne procese u kojima se odvija prijenos elektrona i protona i reakcije u tami ili sekundarne procese (Calvinov ciklus) ili biosinteza ugljikohidrata iz CO_2.

Svjetlosne reakcije se odvijaju u tilakoidima, specijaliziranim kloroplastnim membranama, a uključuju fotolizu vode, linearni (neciklički) i ciklički prijenos elektrona pri čemu kao konačani produkti nastaju visokoenergetski spojevi ATP-a i NADPH, donori elektrona koji se u reakcijama tame u stromi kloroplasta koriste za sintezu složenih ugljikohidrata putem reakcija fiksacije ugljika.

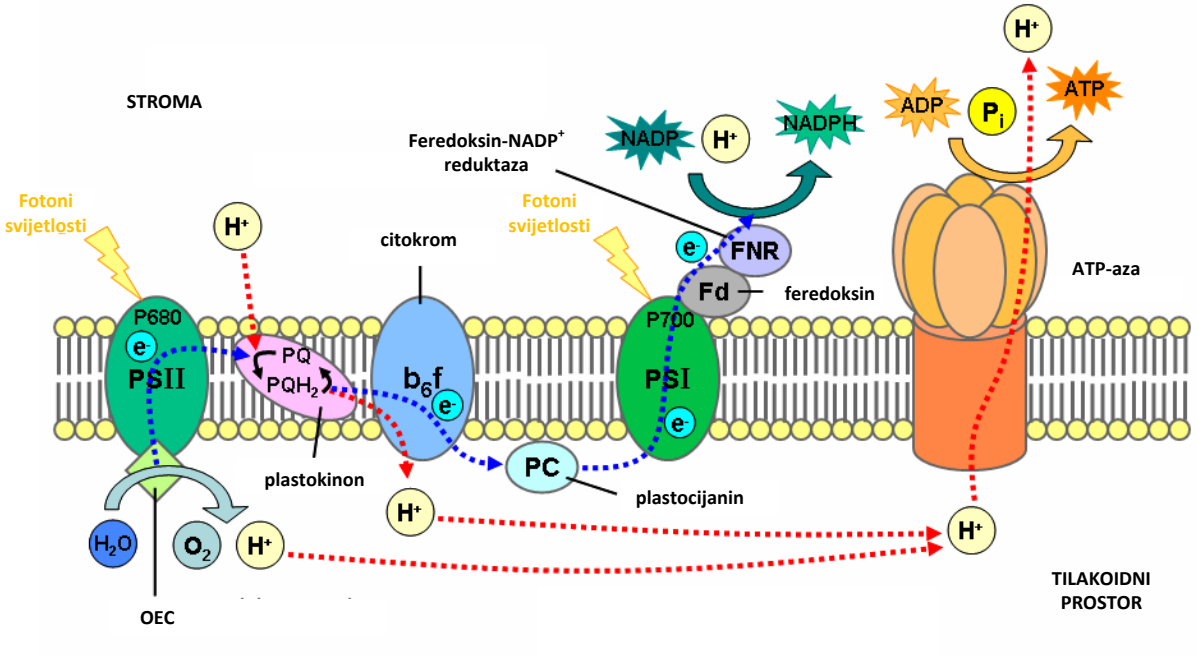
1.2.1. Svjetlosne reakcije fotosinteze

Svjetlosne reakcije fotosinteze karakterizira pretvorba Sunčeve u kemijsku energiju. Pigmenti (klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoidi) koji su zaslužni za apsorpciju Sunčeve svjetlosti nalaze se u tilakoidnim membranama u nakupinama od nekoliko stotina molekula i tvore svjetlosni sustav ili fotosustav. Od mnogo molekula u svakoj takvoj nakupini samo jedna molekula ili jedan par molekula klorofila *a* može pokretati svjetlosne reakcije i to na način da svjetlost koju apsorbira molekula klorofila *a*, a koja se nalazi u reakcijskom središtu fotosistema II (PSII), dovede molekulu klorofila *a* u pobuđeno (ekscitirano) stanje pri čemu ona predaje svoj ekscitirani elektron primarnom akceptoru elektrona. Ostale molekule pigmenata unutar fotosistema služe samo kao antene za hvatanje svjetlosti. Zbog nestabilnog stanja elektrona, stvara se lanac redoks reakcija nazvan transportni lanac elektrona, koji započinje sa PSII, dok je krajnji akceptor elektrona FNR (feredoksin-$NADP^+$ reduktaza). U tom procesu prvi donor elektrona je voda koja se pritom cijepa te kao nusprodukt nastaje kisik. Odnosno, $NADP^+$ (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) se reducira u NADPH, a ATP nastaje dodavanjem fosfatne skupine na ADP procesom fotofosforilacije. Dakle, svjetlosna energija se pretvara u kemijsku energiju u obliku dva spoja, NADPH (izvor visokoenergiziranih elektrona) i ATP-a (izvor energije) koji se poslije u reakcijama tame koriste za redukciju CO_2 i nastanak šećera.

U lipidnom dvosloju tilakoidnih membrana ugrađeni (uklopljeni) su proteinski kompleksi koji sudjeluju u prijenosu elektrona (Slika 2).

Ti integralni membranski proteini su:

- Fotosustav I (PS I) u čijem se reakcijskom središtu nalazi specijalizirana molekula klorofila a (P700) koja maksimalno apsorbira tamnocrvenu svijetlost valne duljine od 700 nm. Tom fotosustavu pridružen je CPI-PSI kompleks koji sadrži P700, antenske molekule klorofila *a*, β-karoten i ksantofil i LHCI (engl. *light harvesting complex* I) koji sadrži antenske molekula klorofila *a* i *b*, lutein i neoksantin
- Fotosustav II (PS II) u svom reakcijskom središtu sadrži molekulu klorofila *a* koja maksimalno apsorbira crvenu svjetlost valne duljine 680 nm (P680). Tom je fotosustavu pridružen LHCII (engl. *light harvesting complex II*) koji prenosi svjetlosnu energiju do P680.
- Citokrom b_6-*f* kompleks, koji povezuje PS I i PS II, izgrađuje ga osam ili devet različitih polipeptidnih podjedinica s nekoliko prostetičkih grupa: citokrom *f*; citokrom b_6, Rieske željezo-sumporni protein, podjedinica IV, četiri mala polipeptida od 3,2 – 4,2 kDa.
- Feredoksin-$NADP^+$ reduktaza (FNR) katalizira redukciju supstrata $NADP^+$ u NADPH, sastoji se od dvije domene, a kao kofaktore koristi FAD (flavin-adenin-dinukleotid) i flavin
- ATPaza katalizira fosforilaciju molekula ADP-a u ATP koristeći energiju pohranjenu u elektrokemijskom potencijalu protona tilakoidne membrane.



Slika 2. Shematski prikaz tilakoidnih proteinskih kompleksa uključenih u svjetlosne reakcije fotosinteze. PSII: fotosustav II, OEC: *oxygen evolving kompleks*, PQ: plastokinon, PQH_2: reducirani plastokinon, b_6f: kompleks citokrom-b_6f, PC: plastocijanin, PSI: fotosustav I, Fd: feredoksin, FNR: feredoksin-$NADP^+$ reduktaza. (Slika je preuzeta i naknadno prerađena sa internet stranice www.ftexploring.com/photosyn/photosyn.html).

Prvi potrebni korak za pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku na tilakoidnim membranama je pretvorba energije fotona svjetlosti u energiju pobuđenog stanja u antenskom kompleksu koja će biti prenesena do reakcijskog središta. Prvi fotokemijski događaj je prijenos elektrona iz pobuđenog reakcijskog središta P680 do akceptora elektrona, feofitina, pri čemu P680 prelazi u snažan oksidans, $P680^+$. $P680^+$ se reducira u stanje prije apsorpcije fotona pomoću proteinskog kompleksa nazvanog OEC (eng. *oxygen evolving complex*), koji sadrži 4 atoma mangana. Ukupni rezultat fotolize vode na OEC je prijenos 4 elektrona do $P680^+$, otpuštanje protona (H^+) u lumen tilakoida i oslobađanje O_2. Elektron kojeg je prihvatila molekula feofitina prenosi se na molekulu plastokinona Q_A trajno vezanu na polipeptid D2 fotosustava II, koja ga potom predaje drugoj molekuli plastokinona, Q_B . Ta molekula ostaje vezana na polipeptidu D1 fotosustava II sve dok se potpuno ne reducira, za što su potrebna dva elektrona i dva protona. Potpuno reducirana molekula plastokinona Q_B, plastokinol, difundira u lipidni matriks tilakoidne membrane i predaje elektrone citokrom b_6-*f* kompleksu. Citokrom b_6-*f* kompleks dalje predaje elektrone molekuli plastocijanina koja ga povezuje s PS I.

Osim što služi kao poveznica između dva fotosustava, taj kompleks ima važnu funkciju stvaranja transmembranske pH razlike prijenosom H^+ iona iz strome u lumen. Tako

se stvara elektrokemijski potencijal potreban ATP-azi za stvaranje molekula ATP-a. Prijenos elektrona s reduciranog plastocijanina na $P700^+$ omogućava reakcijskom središtu PS I da, kada se ponovno osvijetli, posluži kao donor elektrona za redukciju $NADP^+$ u NADPH. Osvjetljavanjem fotosustava I P700 prelazi u pobuđeno stanje iz kojeg se izbacuje elektron bogat energijom. Taj elektron, nakon niza prenositelja, prihvaća molekula feredoksina te ga predaje feredoksin-$NADP^+$ reduktazi (FNR) koja, elektronima primljenim od dvije molekule feredoksina, reducira $NADP^+$ u NADPH.

Ovaj proces naziva se linearni (neciklički) prijenos elektrona jer se elektroni ne vraćaju u reakcijsko središte već se pohranjuju u molekuli NADPH. Ciklički prijenos elektrona je također prisutan u određenim uvjetima. Feredoksin umjesto FNR-u (feredoksin-$NADP^+$ reduktaza) predaje elektrone natrag do citokrom b_6-*f* kompleksa, koji ih prenosi opet plastocijaninu kako bi poslužili za regeneraciju P700. Takav ciklički tok elektrona ima svrhu nastajanja dodatne količine ATP-a djelovanjem ATP-aze jer mu je rezultat povećavanje protonskog elektrokemijskog potencijala.

1.3. Endosimbioza

Nastanak staničnih organela i eukariotske stanice jedan je od najvećih događaja tijekom evolucije živih organizama. Smatra se da je eukariotska stanica nastala nizom neovisnih simbiotskih događaja. Prihvaćena je teorija da su mitohondriji postali od α-proteobakterija, a kloroplasti vuku svoje porijeklo od slobodno-živućih fotosintetskih prokariotskih organizama koji su ušli u endosimbiontski odnos s eukariotskim domaćinom (Allen, 2003).

Mereschkovsky je prvi predstavio hipotezu da su plastidi nastali od endosimbiontskih cijanobakterija tada poznatih kao modrozelene alge. Hipoteza je dobila potvrdu putem biokemijskih dokaza i elektronske mikroskopije koji su pokazali da organeli sadrže DNA, RNA i ribosome (Doolittle i sur, 2003).

Najveći dio molekularno genetičkih dokaza je u skladu s monofiletičkim porijeklom plastida po kojem je početna točka u nastanku svih tipova plastida jedinstveni simbiontski događaj koji uključuje fotosintetizirajućeg prokariota i nefotosintetizirajućeg eukariota koji je već sadržavao mitohondrije (Douglas i Raven, 2003). Po toj hipotezi plastidi algi koje pripadaju odjelima Glaucophyta, Rhodophyta i Chlorophyta (prema tome i svih biljaka) su primarni plastidi izvedeni iz tog jedinstvenog endosimbiontskog događaja. Ostali plastidi su

rezultat sekundarnih ili tercijarnih endosimbioza zelenih ili crvenih jednostaničnih algi i različitih fagotrofnih eukariota.

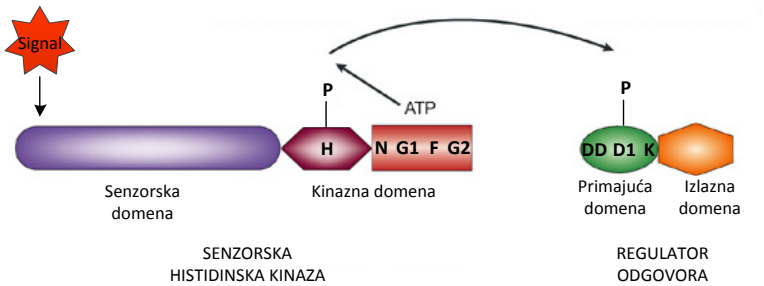
Tijekom evolucije organeli prenose svoje gene u jezgru, ali su u mogućnosti primiti njihove produkte uz pomoć mehanizama prepoznavanja, tranzitnih peptida, i mehanizama unosa koje su postupno razvili (Heins i Soll, 1998). Postoje kompleksi proteina na vanjskoj i unutrašnjoj membrani kloroplasta koji omogućuju organelu da preuzme citoplazmatske prekursore i potom otpusti polipeptide u stromu i matriks. Pretpostavlja se da su kanali koji originalno postoje u cijanobakterijskoj plazmatskoj membrani i vanjskom lipopolisaharidnom omotaču ojačani da bi stvorili sustav koji bi premještao proteine u endosimbiont. Na taj su način organeli opskrbljeni potrebnim genskim produktima iako je većina gena premještena u jezgrin genom (Heins i Soll, 1998). Neki geni koji su pripadali cijanobakterijskom pretku plastida su se potpuno izgubili. Razlog za to leži u činjenici da njihovi produkti nisu potrebni u simbiozi ili da se njihovi duplikati već nalaze u genomu domaćina. Neke analize pokazuju da je oko 4 500 gena unutar genoma biljke arabidopsis, ili 18 % ukupnog genoma, preuzeto od fotosintetskog prokariotskog pretka plastida (Douglas i Raven, 2003).

Čini se da je prijenos gena između organela i jezgre poseban slučaj horizontalnog prijenosa i nikakav mehanizam nije trenutačno poznat koji bi u potpunosti objasnio njegovu selektivnost (Allen, 2003). Allen (2003) postavlja hipotezu da je funkcija genoma unutar organela zadržavanje gena za čiju je ekspresiju bitno da su pod direktnom regulatornom kontrolom redoks stanja njihovih genskih produkata. Zadržana su dva seta gena. Prvi je onaj koji sadrži DNA, RNA i sve komponente potrebne za replikaciju, transkripciju i translaciju proteina kodiranih unutar njega. Drugi set sadrži proteine sa srodnim funkcijama u elektronskom transportu i događajima u fotosintezi. Važno je da je zadržavanje tih gena rezultat selekcijskog pritiska unutar evolucijskog procesa. Navedena povezanost prokariota kao što su cijanobakterije i proklorofiti s kloroplastima algi i biljaka, kao i postojanje homolognih gena u tim organizmima pruža mogućnost njihove primjene u istraživanju procesa koji se odvijaju u plastidima.

1.4. Dvokomponentni sustavi

Dvokomponentni signalni sustavi služe kao osnovna poveznica između vanjskih stimulansa i staničnih odgovora koja omogućuje organizmima da odgovore na promjene različitih ekoloških čimbenika. Ovaj jednostavan, ali efikasan signalni sustav nastao je i razvio se kod prokariota. Evolucijski gledano, takvi signalni sustavi su vjerojatno vrlo stari (Stock i sur, 1989), a nađeni su prvotno kod arheobakterija i eubakterija, uključujući i α-proteobakterije i cijanobakterije te su vjerojatno postali rašireni kod eukariota putem simbiotskog, lateralnog transfera gena od strane kloroplastnih i mitohondrijskih predaka (Koretke i sur, 2000). Donedavno je vladalo mišljenje da dvokomponentni sustavi, nasljeđeni od pradavnih cijanobakterijskih simbionata više ne postoje u kloroplastima, ali nedavna istraživanja pokazala su kako su dvokomponentni sustavi preživjeli u kloroplastima kao produkti i kloroplastnih i jezgrinih gena (Puthiyaveetil i sur, 2008). Sekvenciranjem jezgrinih genoma zelenih algi i biljaka otkriveni su mnogi geni koji kodiraju za dvokomponentne proteine koji nisu nađeni u kloroplastnom genomu. Tako su u biljke *A. thaliana* pronađena 54 gena kodirana u jezgri (Forsberg i sur, 2001). Proučavanjem slijedova i funkcionalnih karakteristika kloroplastnih dvokomponentnih sustava došlo se do zaključka o njihovoj fundamentalnoj ulozi u povezivanju procesa fotosinteze sa ekspresijom gena.

Naziv dvokomponentni sustav odnosi se na broj članova koji sudjeluje u prijenosu signala. Naime, on se sastoji od dviju sačuvanih proteinskih komponenata (Stock i sur, 1985; Nixon i sur, 1986). Te sačuvane proteinske komponente čine: senzorska kinaza i regulator odgovora (Slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz dvokomponentnog sustava. H, N, G1, F, G2: konzervirani motivi kinazne domene, DD, D1 i K: konzervirani motivi primajuće domene regulatora odgovora. (Preuzeto iz Jensen i sur, 2002).

Od ove dvije komponente, senzorska kinaza je ta koja prva percipira i odgovara na okolišne promjene. Upravo senzorka kinaza, s obzirom na aminokiselinski supstrat, spada u skupinu histidinskih proteinskih kinaza. Sama senzorska histidinska kinaza se sastoji od dviju domena, senzorske domene koja percipira različite specifične signale te je varijabilna i od nevarijabilne kinazne domene. Priroda primljenog signala kao i struktura senzorske domene specifični su za svaku histidinsku senzorsku kinazu. Za razliku od senzorske domene, kinazna domena je visoko konzervirana i strukturalno i funkcionalno. Izgrađena je od dimerizacijske domene i katalitičke jezgre, koja se sastoji od četiri konzervirana aminokiselinska motiva (N, G1, F i G2) koji čine ATP- vezujuće mjesto (Stock i sur, 2000). U dimerizacijsku domenu spada tzv. „H-box“ koji sadrži konzervirani histidinski ostatak, mjesto fosforilacije.

Regulator odgovora predstavlja drugu komponentu koja čini bilo koji dvokomponentni sustav, a koji je također sačinjen od dvije domene. Prvu domenu čini nevarijabilna primajuća domena, a drugu predstavlja varijabilna efektorska domena (izlazna domena), koja provodi specifični izlazni odgovor.

Sistem prijenosa signala dvokomponentnih sustava temelji se na mehanizmu prijenosa fosfatne skupine od nevarijabilne kinazne domene senzora na nevarijabilnu „primajuću“ domenu regulatora odgovora. Kaskada događaja koji vode do „izlaznog“ odgovora počinje ATP-ovisnom autofosforilacijom dimerne histidinske kinaze nakon percepcije signala. Tada jedan monomer histidinske kinaze fosforilira drugi monomer unutar dimera. Pri tome se fosfatna skupina kovalentno veže na konzervirani histidinski ostatak katalitičke jezgre kinazne domene. Potom „primajuća“ domena regulatora odgovora katalizira prijenos fosfatne skupine od histidinskog ostatka kinaze na konzervirani aspartatski ostatak unutar „primajuće“ domene regulatora odgovora (Puthiyaveetil i Allen, 2009). Ovaj proces stvara visokoenergizirani acil-fosfat, međuspoj koji potom aktivira efektorsku domenu regulatora odgovora (Stock i sur, 2000).

Iako mnogi dvokomponentni sustavi imaju prije opisanu shemu modularnog dizajna i mehanizma fosforilacije, varijacije postoje, a one mogu uključivati dodatne konzervirane domene u histidinskim kinazama kao i složenije fosforilirajuće puteve.

1.5. Kloroplastna senzorska kinaza (CSK)

Iako senzorske kinaze koje su kodirane u kloroplastnom genomu nisu poznate kod zelenih algi i kopnenih biljka, sekvencioniranjem jezgrinog genoma otkriveni su mnogi geni koji kodiraju dvokomponentne proteine. Kod modelnog organizma *Arabidopsis thaliana* postoje 54 takva gena od kojih 16 kodira za histidinske kinaze. Donedavno se mislilo da nijedna od ovih histidinskih kinaza ne posjeduje specifični nukleotidni slijed za kloroplaste (Wagner i Pfannschmidt, 2006). Međutim, nedavno je u kloroplastima biljke *Arabidopsis thaliana* otkrivena kloroplastna senzorska kinaza (engl. *Chloroplast Sensor Kinase*, CSK), kodirana u jezgrinom genomu koja služi kao redoks senzor u kloroplastima (Puthiyaveetil i sur, 2008).

Gen za CSK nađen je u cijanobakterijama, prokariotima iz koji su se razvili kloroplasti procesom endosimbioze. Sve kloroplastne senzorske kinaze (CSK) potječu od cijanobakterijske histidinske kinaze, Hik2. Naime, gen *CSK* se premjestio tijekom evolucije iz prvotnih (pradavnih) kloroplasta u jezgrin genom eukariotskih algi i kopnenih biljka. Gen *CSK* ima široku rasprostranjenost sa prepoznatljivim homolozima u svim linijama zelenih algi i biljaka kao i u nekim crvenim algama i dijatomejama (Puthiyaveetil i sur. 2008).

Općenito govoreći, kloroplasti imaju najmanje dvije senzorske kinaze, ycf26 i CSK, od kojih je jedna kodirana u jezginom genomu (CSK) i druga je kodirana u kloroplastnom genomu (ycf26) (Duplessis i sur, 2007). Za razliku od CSK senzorske kinaze, ycf26 senzorska kinaza nalazi se samo u kloroplastima crvenih alga, rafidofita i haptofita koje spadaju u skupinu zlatno-smeđih alga, dok potpuno nedostaje kod kloroplasta zelenih alga i kopnenih biljaka.

Kodirajuća sekvenca gena At1g67840, smještenog na 1. kromosomu biljke *Arabidopsis thaliana* koja kodira CSK kinazu sadrži 612 aminokiselina tj. ima 1836 pb. Pretpostavljena molekularna masa prekursora sintetiziranog u citosolu je 66 kDa. Isto toliko iznosi i molekularna masa zrelog proteina CSK jer se tranzitni slijed ne cijepa (Puthiyaveetil i sur, 2008), kako je ustanovljeno primjenom mehanizma unosa proteina kroz ovojnicu kloroplasta s [^{35}S]metionin označenom pretečom CSK te je potvrđeno kako je obilježeni CSK protein unešen u stromu kloroplasta.

CSK je topljivi stromalni protein tj. nema regiju kojom se veže za kloroplastnu membranu. Senzorska domena kod CSK je GAF domena, koja ima ulogu u percipiranju redoks promjena (Kumar i sur, 2007). Kinazna domena u različitim kloroplastnim senzorskim

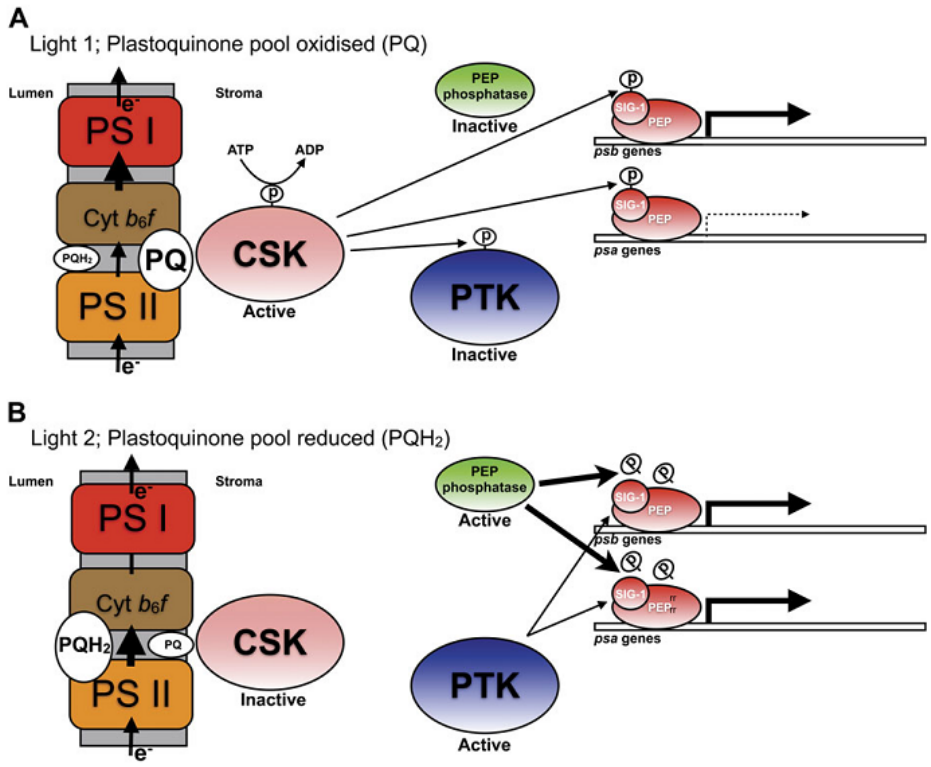
kinazama (CSK) pokazuje varijacije s obzirom na konzervirani histidinski ostatak u „H-box-u“, mjestu autofosforilacije. CSK svih viših biljaka ima glutamatni ostatak (Glu) umjesto konzerviranog autofosforilirajućeg histidinskog ostatka (His).

Mehanizam prijenosa signala kod CSK zbiva se putem prijenosa fosfatnih skupina od ATP-a na specifični glutamatni ostatak u kinaznoj domeni. Spomenuta specifična reakcija je autofosforilacija. Nakon toga, sama senzorska kinaza katalizira prijenos fosfatne grupe od fosforiliranog glutamatskog ostatka na aspartatni ostatak, sastavni dio regulatora odgovora. Fosforilacija regulatora odgovora uzrokuje promjenu njegove konformacije, što dovodi do stimulacije ili represije ekspresije specifičnih gena.

Kloroplastni dvokomponentni sustavi, čiji je CSK sastavni dio, ponašaju se kao senzori redoks procesa i redoks regulatori odgovora unutar kloroplasta (Allen, 1993). CSK se ponaša kao senzor redoks procesa, koji prati protok elektrona u tilakoidnim membranama. Senzorske kinaze zatim predaju ovu informaciju regulatorima odgovora tj. transkripcijskim faktorima poput PTK (engl. *plastid transcription kinase*) i SIG-1 (engl. *RNA polymerase sigma-factor* 1), koji onda u slučaju potrebe selektivno uključuju ili isključuju fotosintetske gene.

Konkretna fiziološka uloga proteina CSK kod biljke *A. thaliana* jest regulacija transkripcije gena *psa*A kao odgovor na dugotrajnu redox neravnotežu PQ stanja (Puthiyaveetil i sur, 2008). Gen *Psa*A kodira za apoprotein A reakcijskog centra fotosustava I (PSI). Kod biljaka sa inaktiviranim genom *CSK*, kloroplasti su izgubili mogućnost regulacije transkripcije gena *psa*A uspoređujući ih sa biljkama divljeg-tipa. Prema tome transkripcijski odgovor u CSK mutanata se razlikuje od onih u biljaka divljeg-tipa (wt). Kada je svjetlo 1 (koje pobuđuje PSI) zamijenjeno sa svjetlom 2 (koje pobuđuje PSII), transkripti *psa*A kloroplastnog gena PSI tj. PSI-A protein se akumulira i do 11 puta više u 26 sati u biljaka divljeg-tipa. No, pod istim uvjetima CSK mutante pokazuju svega 5 puta više transkripata PSI-A. Suprotno, kada je uključeno svjetlo 1 te isključeno svjetlo 2, ekspresija *psa*A gena je smanjena 2,5 puta u wt biljaka, jer je reakcijsko središte PSI reprimirano. No, u CSK-KO mutanata količina psaA transkripata raste slijedećih 8 sati, te potom pada između 26 i 32 sata (Puthiyaveetil i sur, 2008). Prema tome, Arabidopsis knock-out mutante CSK gena nisu u mogućnosti reprimirati PSI gene pod PSI svjetlom i stoga ne mogu regulirati relativne količine PSI I PSII. Predložen je puno kompleksniji model kloroplastnog signalnog puta koji obuhvaća redoks-stanje fotosintetskog nosača elektrona PQ u kloroplastnoj tilakoidnoj

membrani s inicijacijom transkripcije kloroplastne DNA na promotorskoj regiji gena *psa* (kodira proteine PSI) i *psb* (kodira proteine PSII) (Slika 4).



Slika 4. Put prijenosa signala u kloroplastu. PS I: fotosistem I, Cyt b_6f: citokrom b_6f kompleks, PS II: fotosistem II, PQ: plastokinon, PQH_2: plastokinon (reducirani oblik), PEP: RNA polimeraza kodirana u kloroplastima, PEP- fosfataza: enzim koji fosforilira RNA polimerazu kodiranu u kloroplastima, PTK: plastidna transkripcijska kinaza, SIG-1: sigma-faktor 1 RNA polimeraze. (Preuzeto iz Puthiyaveetil i sur, 2010).

1.6. Afinitetni biljezi

Afinitetni biljezi mogu biti dijelovi različitih molekula za koje je karakteristično da ih kao antigene prepoznaju antitjela koja se specifično vežu za njih. U većini slučajeva to su polipeptidi građeni od 10 do 15 aminokiselina iako mogu biti i šećeri ili lipidi. Biljezi se dodaju određenim molekulama od interesa (najčešće proteinima). Karakteristični afinitetni biljezi mogu biti postavljeni bilo gdje unutar željenog gena, ali su obično postavljeni na karboksiterminalnom kraju zbog minimalizacije remećenja tercijarne strukture proteina, a time ujedno i njegove funkcije. Obilježavanje afinitetnim biljezima koristi se u svrhu lokalizacije proteina na staničnom i substaničnom nivou, pročišćavanja proteina, identifikacije interakcija sa drugim proteinima, određivanje strukture proteinskih podjedinica, funkcije proteina i njegove reakcije na promjene u stanicama, kao i sudbine proteina tijekom

starenja stanica te karakterizacije novih proteina koji su rezultat kloniranih gena (Jarvik i Telmer, 1998).

Najčešće korišteni biljezi su HA, peptid koji se sastoji od 9 aminokiselina i potječe od hemaglutininskog proteina gripe, FLAG, sintetski biljeg od 8 aminokiselina, myc, segment protoonkogena myc veličine 10 aminokiselina i 6-His, sintetski peptid koji se sastoji od 6 histidinskih ostataka.

1.7. Tehnologija *Gateway*

Sustav *Gateway* je univerzalna metoda kloniranja koja se temelji na svojstvu mjesno-specifične rekombinacije bakteriofaga λ (Landy, 1989).

Gateway tehnologija omogućava brzo i vrlo efikasno prenošenje sljedova DNA u višestruke vektorske sustave u svrhu proteinske ekspresije i funkcionalne analize, pritom održavajući orijentaciju i okvir čitanja; uporabu i ekspresiju različitih tipova DNA sekvenci (npr. PCR produkt, restrikcijski fragmenti); umetanje većeg broja DNA sekvenci u višestruke destinacijske vektore te jednostavno pretvaranje vektora u *Gateway* destinacijski vektor.

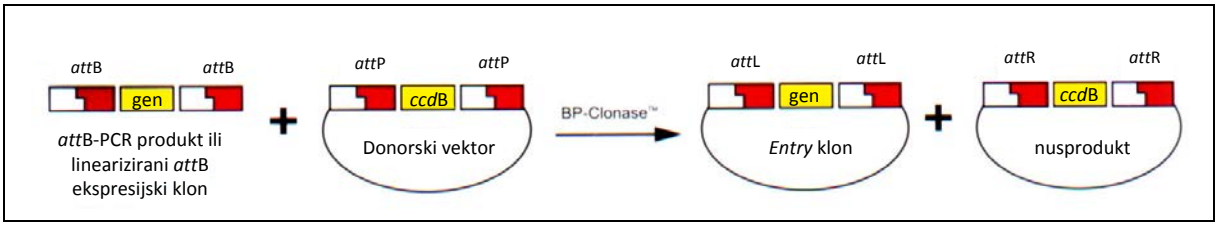
Mjesno - specifični rekombinacijski sustav bakteriofaga λ omogućuje integraciju bakteriofaga λ u kromosom *E. coli* te prijelaz između litičkog i lizogenog puta (Ptashne, 1992). Sastavni dijelovi lambda rekombinacijskog sustava su modificirani kako bi se unaprijedila specifičnost i efikasnost sustava (Bushman i sur, 1985).

Lambda rekombinacija uključuje DNA rekombinacijske sekvence (*att* mjesta) te enzime uključene u rekombinaciju (*Clonase*^{TM} *enzyme mix*, Invitrogen), te se odvija između mjesno- specifičnih mjesta *att*: *att*B mjesta na kromosomu bakterije *E. coli* i *att*P mjesta na lambda kromosomu. Mjesta *Att* služe kao područja vezanja rekombinacijskih enzima. Tjekom lambda integracije proces rekombinacije se odvija između već spomenutih mjesta *att*B i *att*P te kao rezultat nastaju *att*L i *att*R mjesta. „*Crossover*“ se događa između 15 pb dugih homolognih područja na *att*B i *att*P mjestima, ali su sekvence uz ta područja potrebne kao mjesta vezivanja rekombinacijskih enzima (Landy, 1989).

Dvije rekombinacijske reakcije koje čine osnovu *Gateway* sustava su: reakcija BP i reakcija LR.

1.7.1. BP reakcija

Reakcija BP omogućuje rekombinaciju *att*B supstrata (*att*B-PCR produkt ili linearizirani *att*B ekspresijski klon) sa *att*P supstratom (donorski vektor). Nastaje *entry* klon koji sadrži *att*L mjesta (Slika 5). Kada je gen omeđen s *att*L mjestima kao *entry* klon, može se prenijeti u novi ekspresijski vektor rekombinacijom s destinacijskim vektorom u LR reakciji. BP reakcija je najviše korištena za kloniranje PCR produkata kao *entry* klonova.

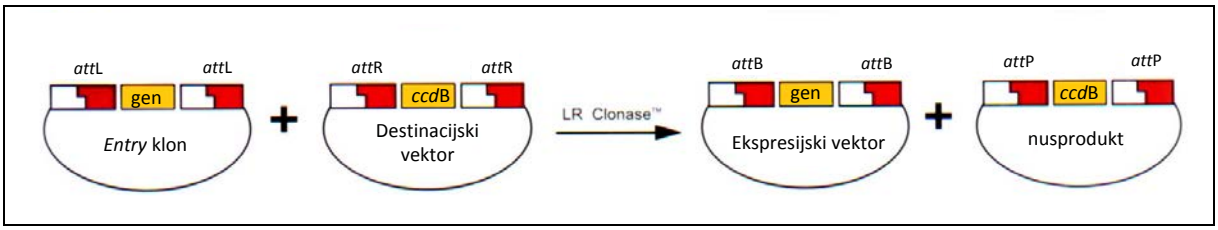


Slika 5. BP reakcija: rekombinacija *att*B supstrata s *att*P supstratom (donorski vektor) uz nastajanje *att*L *entry* klona i nusprodukta pod enzimskim dijelovanjem *BP- Clonase* ^{TM} (preuzeto iz Brasch i sur, 2004).

1.7.2. LR reakcija

Reakcija LR omogućuje rekombinaciju *att*L supstrata (*entry* klon) sa *att*R supstratom (destinacijski vektor). Tom reakcijom nastaje ekspresijski klon koji sadrži *att*B mjesta.

Nakon postupka konstrukcije ekspresijskog klona putem LR reakcije događa se transformacija kompetentnih stanica bakterije *E. coli* i selekcija ekspresijskih klonova. Kako bi se omogućila rekombinacija i efikasna selekcija *entry* ili ekspresijskih klonova, *att* mjesta većine *Gateway* vektora omeđuju područje gena *ccd*B i gena otpornosti na kloramfenikol. Nakon BP ili LR reakcije ovo područje zamjenjuje sekvenca željenog gena. Prisutnost *ccd*B gena omogućuje negativnu selekciju donorskih i destinacijskih vektora u *E. coli* nakon rekombinacije i transformacije. Gen *ccd*B interferira sa DNA girazom *E. coli* (Bernard i Couturier, 1992) što za posljedicu ima onemogućen rast stanica *E. coli* koje ga sadrže. S obzirom da nakon rekombinacije istraživani gen zamjenjuje *ccd*B gen, ovim načinom omogućena je visoka učinkovitost selekcije željenih ekspresijskih klonova.



Slika 6. LR reakcija: mjesno-specifična rekombinacija *att*L supstrata (*entry* klon) sa *att*R supstratom (destinacijski vektor) uz nastajanje ekspresijskog vektora. Reakciju katalizira LR- *Clonase* ™ enzimski mix (preuzeto iz Brasch i sur, 2004).

1.8. Cilj istraživanja

Dvokomponentni sustavi odigrali su odlučujuću ulogu u povezivanju procesa fotosinteze sa genskom ekspresijom te tako odredili način na koji se biljke prilagođavaju promjenama u okolišu. Od prije je već poznato da su glavni signalni mehanizmi kod prokariota upravo dvokomponentni signalni sustavi. No, otkriće ovih sustava kod eukariota, posebno kod viših biljaka, sugerira novi model genske regulacije.

U sklopu istraživanja regulacije procesa fotosinteze u genomu biljke *Arabidopsis thaliana* identificiran je gen At1g67840 koji kodira protein kloroplastnu senzorsku kinazu (CSK), sastavni dio dvokomponentnih sustava.

Cilj ovog rada je obilježavanje cDNA gena At1g67840 afinitetnim biljezima HA i FLAG. U tu svrhu konstrukt CSK_HA_FLAG treba ugraditi u pENTR, te potom u pH7WG2,0 vektor.

Transformacija agrobakterija EHA105 konstruktom pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG omogućiti će transformaciju *in planta* biljaka u kojima je prethodno inaktiviran gen At1g67840 za kinazu CSK („CSK *knock-out*“). Konačan cilj je konstrukcija „CSK-SENSE“ biljaka u kojima se protein CSK nakuplja, kako bi se nadalje mogao istraživati utjecaj gena *CSK* na transkripciju gena kloroplasta.

2. MATERIJALI I METODE

2.1 MATERIJALI

2.1.1. Kemikalije i enzimi

Kemikalije koje sam koristila pri izvođenju pokusa proizvodi su sljedećih tvrtki: Difco Laboratories (Detroit, SAD), Roth GmbH & Co. KG (München, Njemačka), Sigma Chemicals (München, Njemačka), Kemika i Pliva (Hrvatska).

Restrikcijske endonukleaze *Eco*RV i *Sal*I proizvodi su tvrtke Invitrogen (USA), a *Hind*III proizvod tvrtke Fermentas (St. Leon-Rot, Njemačka). U lančanoj reakciji polimerazom koristila sam Phusion Hot Start polimeraza, proizvođača NEB (New England BioLabs, Massachusetts, USA).

Za pročišćavanje PCR-produkata koristila sam komplet GFX^{TM} PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, UK).

Komplet za izolaciju plazmidne DNA (HISpeed Plasmid Midi kit) proizvod je tvrtke Qiagen (Hilden, Njemačka).

2.1.2. Uređaji

U pokusima su korištene centrifuge: Sigma 202 MK, Njemačka (rotor 12045), Multifuge 3 S-R, proizvođača Heraeus Njemačka (rotor 3057 i 6445).

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom (engl. *PCR polymerase chain reaction*) koristila sam uređaj za umnažanje DNA (Termocycler Uno II, Biometra, Njemačka).

U svrhu transformacije kemijski kompetentnih stanica bakterija *E. coli* te transformacije bakterija *A. tumefaciens* upotrijebila sam uređaj Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka. Transformacija elektrokompetentnih stanica *E. coli* DH5α provedena je na uređaju Gene Pulser Xcell, proizvođača Bio Rad (SAD).

2.1.3. Nukleotidni slijed cDNA i nukleotidni sljedovi početnica za lančanu reakciju polimerazom

U pokusima kloniranja koristila sam cDNA sekvencu gena At1g67840 koji kodira senzorsku kloroplastnu kinazu (CSK) iz biljne vrste *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ekotip Columbia,

te nukleotidni slijed biljega HA i FLAG (Tablica 1.) koje sam koristila za C- terminalno obilježavanje cDNA gena At1g67840 lančanom reakcijom polimerazom. cDNA gena At1g67840 pohranjena je u TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) biblioteci.
Prema tim sljedovima određene su početnice za umnažanje i obilježavanje DNA:

P1 CSK_For **5' – CACC ATG CTT CTT TCT GCA ATC GCT TC – 3'**

P2 CSK_HA_Rev **5' – CTA AGC AGC AGC GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA TGC TTC ATT GGC TTC AGA TAC TG – 3'**

P3 CSK_FLAG_ Rev **5' – CTA TTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC TAA CTT GAC AGC AGC AGC GTA ATC TGG AAC – 3'**

Sve navedene specifične početnice (engl. *primer*) nabavljene su od tvrtke Invitrogen (USA).

Tablica 1: Nukleotidna i peptidna sekvenca afinitetnih biljega HA i FLAG korištenih za C- terminalno obilježavanje CSK

BILJEZI	NUKLEOTIDNA SEKVENCA
HA	**Y P Y D V P D Y A** **5'–** TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT **– 3'**
FLAG	**D Y K D D D D K** **5'–** GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAA **– 3'**

2.1.4. DNA standardi

Kao DNA standard koristila sam 1 kb DNA marker (Gene Ruler, #SMO331) proizvođača MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Njemačka).

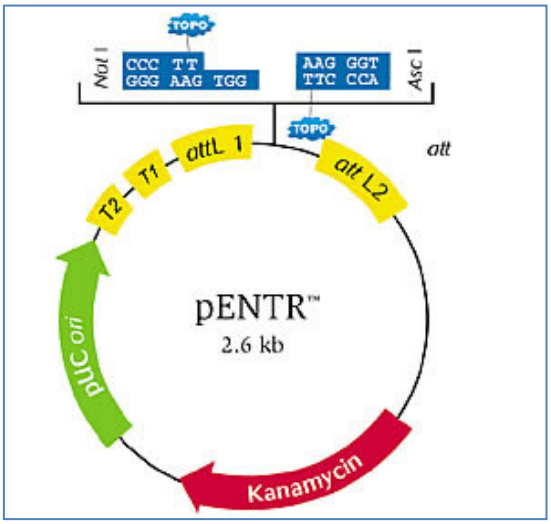
2.1.5. Bakterijski sojevi

U pokusima kloniranja koristila sam sojeve elektrokompetentnih stanica bakterije *E.coli*, DH5α (Hanahan, 1985.) i kemijski kompetentne stanice *E. coli* TOP10 (Invitrogen, USA) te soj EHA 105 bakterija *Agrobacterium tumefaciens*.

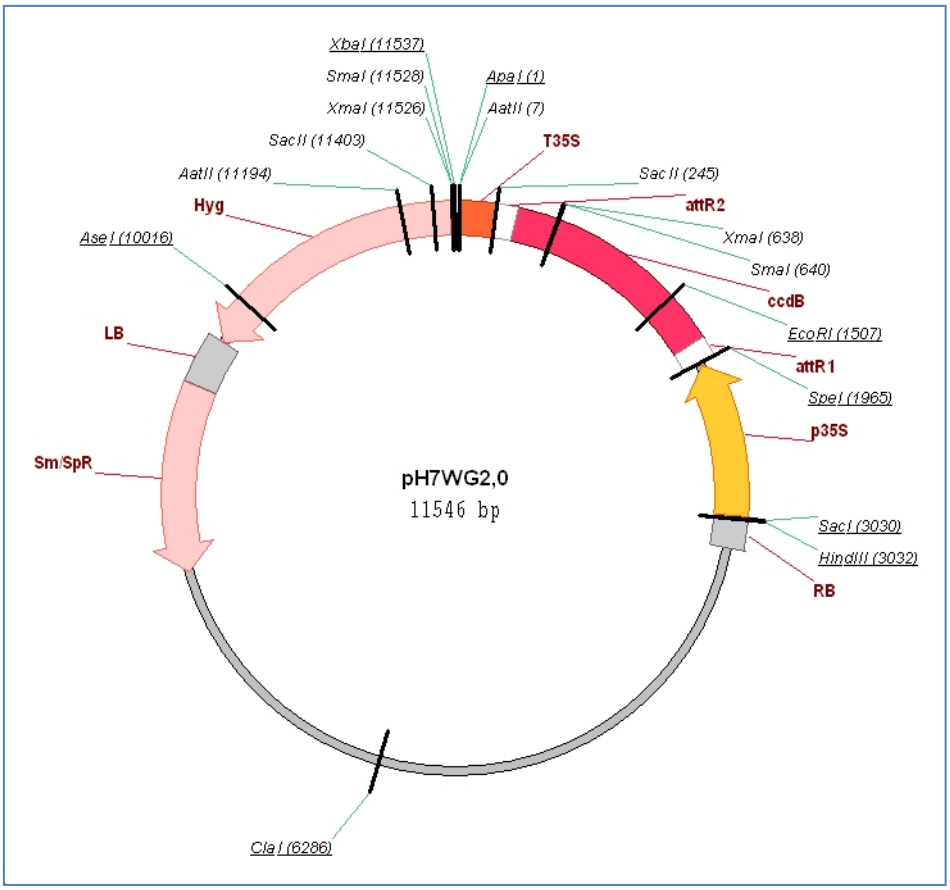
2.1.6. Plazmidni vektori

U pokusima kloniranja kao ishodišni (*entry*) vektor koristila sam vektor pENTR™/SD/D-TOPO® (Invitrogen, SAD) koji sadrži specifična *att*L1 i *att*L2 mjesta za mjesno-specifičnu rekombinaciju s *att*R1 i *att*R2 mjestima destinacijskog vektora. Osim navedenih sekvenci, pENTR™/SD/D-TOPO® vektor sadrži i gen za otpornost na kanamicin, T7 gen 10 za pojačavanje translacije, mjesto za vezanje ribosoma (RBS, *Ribosome Binding Site*), *rrn*B terminacijske sekvence translacije koje sprečavaju bazalnu ekspresiju PCR produkta u *E. coli*, pUC ishodište replikacije (*origin*) za *high-copy* replikaciju i stabilnost plazmida u *E. coli* te TOPO® mjesto kloniranja za brzo i efikasno usmjereno kloniranje PCR produkta tupih krajeva (Slika 7).

Kao destinacijski vektor koristila sam binarni vektor pH7WG2,0 (Invitrogen, SAD), koji sadrži navedene *att*R1 i *att*R2 regije za mjesno specifičnu rekombinaciju s *entry* vektorom, gen *ccd*B, gene za rezistenciju na spektinomicin i higromicin te granične dijelove T-DNA regije: LB (*left border*) i RB (*right border)* (Slika 8).



Slika 7. Shematski prikaz *entry* vektora pENTR™/SD/D-TOPO® (2601 bp). Terminacijske sekvence: *rrn*B T2 i *rrn*B T1; *att*L1 i *att*L2 mjesta za mjesno-specifičnu rekombinaciju s destinacijskim vektorom; T7 gen 10 za pojačavanje translacije (*enhancer*); RBS mjesto za vezanje ribosoma; TOPO® mjesto kloniranja; gen rezistencije na kanamicin, pUC ishodište replikacije. (Preuzeto iz *Gateway® technology* priručnika).



Slika 8.Shematski prikaz destinacijskog vektora pH7WG2,0 (11 546 pb). Vektor sadrži konstitutivni promotor P35S, terminatorsku regiju T35S, regije *att*R2 i *att*R1 za mjesno specifičnu rekombinaciju s ishodišnim vektorom, gen *ccd*B, gene za rezistenciju na spektinomicin (bakterijski selektivni biljeg) i higromicin (biljni selektivni biljeg) te granične linije T-DNA regije LB (*left border*) i RB (*right border*). (Preuzeto iz *Gateway® technology* priručnika).

2.1.7. Biljni materijal

U pokusima sam koristila biljku *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (hrv. talijin uročnjak), ekotip Columbia (Col-0), jednogodišnja dvosupnica iz porodice *Brassicaceae*.

2.1.8. Hranjive podloge, antibiotici, otopine i puferi

Tekuća podloga LB: (za rast bakterije *E. Coli*)
1,0% baktotripton
0,5% ekstrakt kvasca
1,0% NaCl
namjestiti pH na 7,0 s 1 M NaOH
sterilizirati u autoklavu 20 min na temperaturi od 121 °C
ohladiti na temperaturu od 55 °C do 60 °C
prema potrebi dodati kanamicin otopljen u redestiliranoj vodi i filter-steriliziran (30 μg/ml) ili spektinomicin otopljen u redestiliranoj vodi i filter-steriliziran (50 μg/ml).

Tekuća podloga SOC:
2,0% baktotripton
0,5% ekstrakt kvasca
10,0 mM NaCl
2,5 mM KCl
namjestiti pH na 7,0 s 1M NaOH
sterilizirati u autoklavu 20 min na temperaturi od 121 °C
ohladiti na temperaturu od 55 °C do 60 °C i dodati 10,0 mM filter sterilizirane otopine glukoze i 10,0 mM $MgCl_2$

Tekuća podloga YEB: (za rast bakterije *A. tumefaciens*)
0,5% goveđi ekstrakt
0,1% baktopepton
0,1% ekstrakt kvasca
0,5% saharoza

namjestiti pH na 7,4 s 1 M KOH
sterilizirati u autoklavu 20 min na temperaturi od 121 °C
ohladiti na temperaturu od 55 °C do 60 °C
dodati filter steriliziranu 2 mM otopinu $MgSO_4$
po potrebi dodati rifampicin otopljen u dimetilsulfoksidu (100 μg/ml) i spectinomicin otopljen u redestiliranoj vodi i filter-steriliziran (50 μg/ml).

kan^R ploče:

1,0% baktotripton
0,5% ekstrakt kvasca
1,0% NaCl
namjestiti pH na 7,0 s 1 M NaOH
1,5% agar
sterilizirati u autoklavu 20 min na temperaturi od 121 °C
ohladiti na temperaturu od 55 °C do 60 °C
prema pokusu dodati kanamicin otopljen u redestiliranoj vodi i filter-steriliziran (30 μg/ml).

spec^R ploče:

1,0% baktotripton
0,5% ekstrakt kvasca
1,0% NaCl
namjestiti pH na 7,0 s 1 M NaOH
1,5% agar
sterilizirati u autoklavu 20 min na temperaturi od 121 °C
ohladiti na temperaturu od 55 °C do 60 °C
prema pokusu dodati spektinomicin otopljen u redestiliranoj vodi i filter- steriliziran (50 μg/ml).

cam^R ploče:

1,0% baktotripton

0,5% ekstrakt kvasca
1,0% NaCl
namjestiti pH na 7,0 s 1 M NaOH
1,5% agar
sterilizirati u autoklavu 20 min na temperaturi od 121 °C
ohladiti na temperaturu od 55 °C do 60 °C
prema pokusu dodati kloramfenikol otopljen u redestiliranoj vodi i filter- steriliziran (34 μg/ml).

spec^R rif^R ploče: 0,5% goveđi ekstrakt
0,1% baktopepton
0,1% ekstrakt kvasca
0,5% saharoza
namjestiti pH na 7,4 s 1 M KOH
1,5% agar
sterilizirati u autoklavu 20 min na temperaturi od 121 °C
ohladiti na temperaturu od 55 °C do 60 °C
dodati filter steriliziran 2 mM $MgSO_4$
dodati rifampicin otopljen u dimetilsulfoksidu (100 μg/ml) i spectinomicin otopljen u redestiliranoj vodi i filter- steriliziran (50 μg/ml)

Otopine za izolaciju plazmidne DNA:

Otopina I: 50 mM glukoza
10 mM EDTA
25 mM Tris-HCl
Namjestiti ph na 8,0 s 1M NaOH

Otopina II: 0,2 M NaOH
1% SDS (w/v)

Otopina III: 3,0 M kalijev - acetat
1,8 M mravlja kiselina

Pufer TAE: 10 mM Tris-HCl (pH 7,2-8,0)
1 mM EDTA (pH 8,0)

2.2. METODE

2.2.1. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*) je metoda umnožavanja specifičnog nukleotidnog slijeda molekule DNA u *in vitro* uvjetima. Ova tehnika se temelji na poznavanju malog dijela nukleotidnog slijeda kojeg je potrebno umnožiti, a prema kojemu se sintetiziraju dva jednolančana oligonukleotida sa slobodnim 3' OH krajem (početnice). Da bi umnožavanje bilo moguće u reakcijsku smjesu je uz kalup, odnosno željenu DNA i početnice, potrebno dodati i sva četiri deoksinukleotidtrifosfata (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), enzim DNA polimerazu koja umnožava specifični nukleotidni slijed počevši od početnica te odgovarajući pufer s Mg^{2+} ionima koji su neophodni za aktivnost polimeraze.
Lančana reakcija polimerazom uobičajeno se odvija u 30-tak ciklusa, a svaki od njih se sastoji od 3 koraka:

1. Faza razdvajanja – denaturacija DNA kalupa na dva lanca pri temperaturi od 98 ^{o}C (Hot Start polimeraza, NEB)
2. Faza sparivanja – hibridizacija početnica s lancima kalupa DNA koja se obično odvija na temperaturi od 60 ^{o}C (ovisno o temperaturi taljenja početnica (Tm))
3. Faza produljivanja – sinteza novih lanaca, odnosno produljivanje početnica, pomoću *Taq* DNA polimeraze, odvija se pri temperaturi od 72 ^{o}C (Tablica 2)

Novosintetizirani lanci DNA služe kao kalupi u slijedećim ciklusima tako da se početna količina DNA molekule kalupa eksponencijalno povećava.

Lančana reakcija polimerazom korištena je za umnožavanje cDNA gena At1g67840, uz obilježavanje istog afinitetnim biljezima HA i FLAG, pri čemu su korištene početnice **P1**, **P2** i **P3**.

Lančana reakcija polimerazom odvijala se u 30 ciklusa (Tablica 2.), a sastav reakcijske smjese prikazan je u tablici 3.

Tablica 2. Temperaturni uvjeti za provođenje lančane reakcije polimerazom

REAKCIJA	TEMPERATURA	VRIJEME
Denaturacija kalupa (At1g67840)	98 °C	30 sek
30X denaturacija	98 °C	10 sek
hibridizacija početnica	62 °C	30 sek
elongacija lanaca	72 °C	30 sek
završna elongacija lanaca	72 °C	10 min
kraj	4°C	∞

Tablica 3. Sastav reakcijske otopine za lančanu reakciju polimerazom

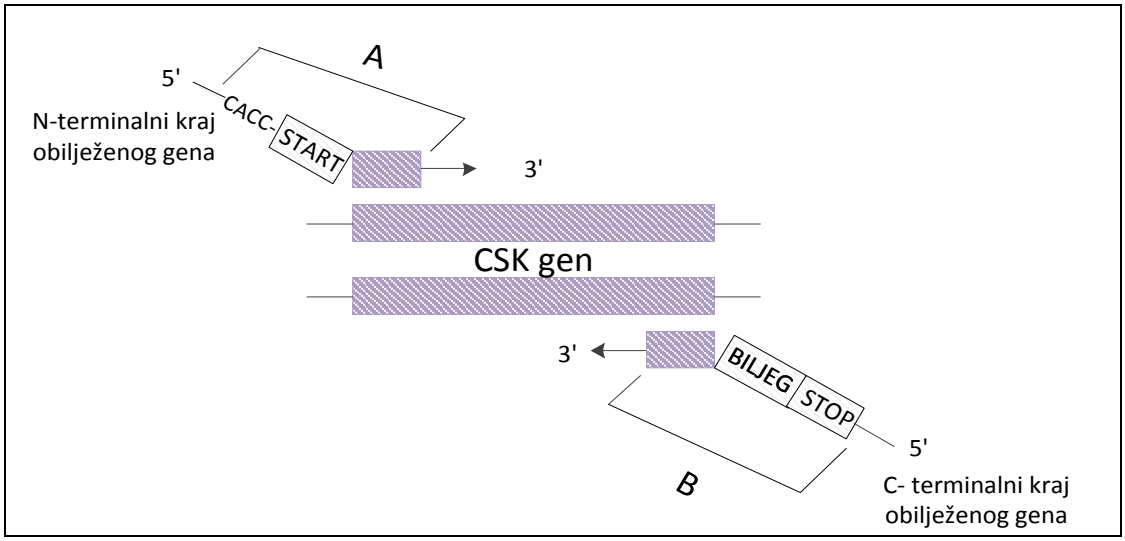
KOMPONENTE	VOL. / 25 µl po reakciji	KONAČNA KONCENTRACIJA
MB * H_2O	16,25	
5X Phusion HF pufer	5,0	1 X
dNTP	0,5	100 µM
početnica P1	1,25	0,5 µM
početnica P2,P3	1,25	0,5 µM
DNA	0,5	
PFU polimeraza*	0,25	0,02 U/µl

MB* *Molecular Biology Grade Water*
Phusion Hot Start DNA polimeraza* (Finnzymes, High Fidelity DNA Polymerase, F-540S

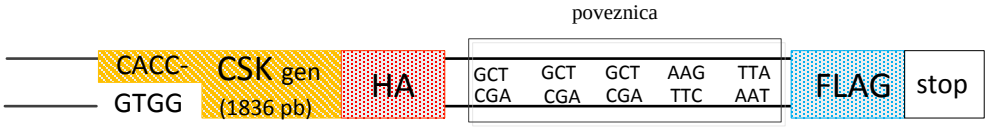
2.2.2. Strategija obilježavanja CSK afinitetnim biljezima HA i FLAG

Strategija obilježavanja gena od interesa temelji se na lančanoj reakciji polimerazom (2.2.1.). Početnice su konstruirane prema cDNA slijedu gena At1g67840 kao i nukleotidne sekvence afinitetnih biljega HA i FLAG (Tablica 1.), smještene na karboksiterminalnom kraju (C-kraju) CSK gena.

Princip C – terminalnog obilježavanja prikazuje slika 9, dok je shematski prikaz konstrukta CSK_HA_FLAG prikazan na slici 10.



Slika 9. Hibridizacija željenog CSK gena PCR početnicama koje sadržavaju afinitetne biljege. A: CSK_For početnica sa karakterističnim CACC- slijedom za maksimizaciju translacije, B: CSK_Rev početnica sa afinitetnim biljezima



Slika 10. Shematski prikaz CSK_HA_FLAG konstrukta (1902 pb) dobivenog PCR metodom; HA (hemaglutinin) afinitetni biljeg, FLAG™ afinitetni biljeg.

2.2.3. Izolacija DNA iz gela agaroze i pročišćavanje DNA iz otopine

DNA umnoženu lančanom reakcijom polimerazom izolirala sam iz 1,2% gela agaroze prema uputama proizvođača GFX^{TM} PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, UK).
Pročišćavanje DNA iz otopine (dobivene PCR metodom, mini- ili midi-preparacijom) sam također provela navedenim kitom.
Navedena metoda se temelji na svojstvu DNA da se u prisustvu kaotropnih soli („Binding buffer“) veže na matriks silike, s kojeg se nakon ispiranja („Washing buffer“) eluira redestiliranom vodom. Ukoliko se uzorak pohranjuje na dulje vrijeme eluira se u otopini Tris/EDTA (pH=8) ukoliko se DNA pročišćava s namjenom korištenja u LR reakciji.

2.2.4. Elektoforeza u gelu agaroze

Za analizu i razlučivanje fragmenata molekula DNA koristila sam metodu elektroforeze u gelu agaroze. Agaroza je polimerna molekula koja ima svojstvo stvaranja umreženih struktura. Pod utjecajem električnog polja u gelu agaroze negativno nabijena molekula DNA putuje od negativne elektrode (katode) prema pozitivnoj elektrodi (anodi). Gel se priprema otapanjem određene mase agaroze (0,7g, 1g, 1,2g) u 100 ml 1x TAE pufera (0,7%, 1%, 1,2%). U gel sam dodala interkalirajuću boju etidijev bromid (1μg/ml). Tako obojene molekule DNA vizualizirala sam na UV transiluminatoru pri valnoj duljini od 256 nm te fotografirala digitalnim uređajem (Gene Snap).

2.2.5. Transformacija kompetentnih stanica *E. coli*

a) Transformacija kemijski kompetentnih stanica

Kemijski kompetentne stanice *E. coli* TOP10 (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E.coli*) transformirala sam sa pENTR-CSK_HA_FLAG vektorskim konstruktom (Slika 11) prema protokolu proizvođača kemijski kompetentnih stanica (Invitrogen, SAD). U 50 μl kemijski kompetentnih stanica dodala sam 2 μl TOPO® smjese. Uzorak sam inkubirala na

ledu 10 minuta. Bakterijske stanice sam zatim podvrgnula toplinskom šoku na temperaturi od 42 °C u trajanju od 30 sekundi te ih inkubirala na ledu. U uzorak sam dodala 250 µl tekuće podloge SOC zagrijane na sobnu temperaturu. Transformirane bakterijske stanice sam horizontalno inkubirala na tresilici (250 okr/min) na temperaturi od 37 °C u trajanju od 60 minuta. Nasadila sam po 100 i 150 µl bakterijske suspenzije na LB kan^R ploče i inkubirala ih preko noći na temperaturi od 37 °C.

b) Transformacija elektrokompetentnih stanica

U 20 µl elektrokompetentnih stanica *E.coli*, DH5α dodala sam 2 µl reakcijske smjese LR reakcije (pENTR-CSK_HA_FLAG i pH7WG2,0 vektora), promiješala i inkubirala na ledu 1 minutu. Smjesu stanica sam prebacila u kivetu debljine 0,2 cm te kivetu postavila na za nju određeno mjesto u elektroporatoru (Bio-rad elektroporator). Stanice sam podvrgnula električnom pulsu napona 2,5 kV. Nakon električnog pulsa, u kivetu sam brzo dodala 0,8 ml zagrijane tekuće podloge 2YT. Brzo i nježno sam resuspendirala stanice u mediju i prebacila ih u Eppendorf tubu. Transformirane stanice sam horizontalno inkubirala na tresilici (250 okr/min) na temperaturi 37 °C u trajanju od 60 minuta. Nakon inkubacije sam nasadila 50 µl i 100 µl bakterijske suspenzije na ploče sa spektinomicinom i inkubirala ih u termostatu preko noći na temperaturi od 37 °C.

2.2.6. Priprema i transformacija kemijski kompetentnih stanica bakterije *A. tumefaciens*

Bakterijske stanice *A. tumefaciens* EHA105 uzgajaju se dva dana na tresilici (250 okr/min) pri temperaturi od 28 ºC u 5 ml tekuće podloge YEB s rifampicinom. Bakterijsku suspenziju prenesemo u 50 ml tekuće podloge YEB s rifampicinom i inkubiramo na tresilici pri temperaturi od 28 ºC sve dok optička gustoća pri valnoj duljini 600 nm ne iznosi 1,0. Suspenziju se potom centrifugira 15 min na 3 500 x g. Dobiveni talog se resuspendira u 1ml ledeno hladnog 10 mM kalcijevog klorida. Kemijski kompetentne stanice alikvotiramo po 100 µl u Eppendorf tube, zamrznemo u tekućem dušiku i pohranimo u hladnjak na temp. od -80 ºC. Na 100 µl smrznutih kemijski kompetentnih stanica *A. tumefaciens* EHA105 doda se 2 µl bakterijske kulture midi-prepa binarnog vektora pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG (Slika 12).

Uzorak se inkubira 5 minuta na temperaturi od 37 ºC uz dodatak 1 ml tekuće podloge YEB s rifampicinom. Dobivena smjesa se inkubira na tresilici (700 okr/min) 3-4 sata pri temp. od 28 ºC. Nakon inkubacije smjesa se centrifugira 2 minute na 12 000 x g. Dobiveni talog se resuspendira u 100 µl podloge YEB s rifampicinom te se 50 µl bakterijske suspenzije nanese na YEB ili LB ploče s rifampicinom i spektinomicinom. Ploče se potom inkubiraju u termostatu tri dana pri temperaturi od 28 ºC.

2.2.7. Mini- i Midipreparacija plazmidne DNA

Bakterijsku koloniju s ploče nacijepila sam u 3 ml LB tekuće podloge s odgovarajućim antibiotikom i inkubirala preko noći na tresilici (250 okr/min) pri 37 ºC. Oko 1,5 ml bakterijske suspenzije prenijela se u Eppendorf tubicu i centrifugirala 5 min na 3 500 x g. Dobiveni talog sam resuspendirala u 150 µl Otopine I, kojoj sam neposredno prije izvođenja pokusa dodala lizozim (4 mg/ml). Uzorak sam inkubirala 15 minuta na sobnoj temperaturi, potom dodala 150 µl svježe priređene Otopine II. Nakon inkubacije otopine 5 minuta na ledu dodala sam 150 µl Otopine III, te ponovno inkubirala uzorak 15 minuta na ledu. Slijedi centrifugiranje na 13 000 x g u trajanju od 15 minuta. Nadtalog sam prenijela u novu Eppendorf tubu uz dodatak 2 µl RNaze A (DNase free, 10mg/ml, Invitrogen) i inkubirala u termostatu pri 37 ºC 45-60 minuta. Plazmidnu DNA istaložila sam dodatkom 360 µl izopropanola te sam smjesa inkubirala 60 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorak sam tada centrifugirala 10 min na 8 000 x g, te dobiveni talog isprala s 500 µl 70% etanola i ponovo centrifugirala (10 min, 8 000 x g). Nadtalog sam izlila iz tube, a talog osušila na sobnoj temperaturi i otopila u 20 µl sterilne redestilirane vode.

Midipreparacija plazmidne DNA se od minipreparacije razlikuje samo po volumenu korištenih tekućih podloga i otopina. Transformirane bakterijske stanice uzgajala sam u 30 ml LB medija s pripadnim antibiotikom uz dodatak po 6 ml Otopine I, II i III, 10 µl RNaze A (10mg/ml) te 10,8 ml izopropanola. Talog sam otopila u 200 µl sterilne redestilirane vode. Otopina sam ostavila 20-30 min na sobnoj temperaturi.

2.2.8. Ugradnja konstrukta CSK_HA_FLAG u *entry* vektor pENTR™/SD/D-TOPO®

Konstrukt CSK_HA_FLAG konstruiran je prema opisanom protokolu za lančanu reakciju polimerazom (2.2.1.).

Reakcijska TOPO® smjesa za ugradnju konstrukta CSK_HA_FLAG u vektor pENTR™/SD/D-TOPO® pripremljena je prema dolje navedenoj proceduri:

10 ng svježeg PCR produkta

0,5 μl otopine soli (1.2 M NaCl, 0.06 M $MgCl_2$)

4 μl sterilne vode

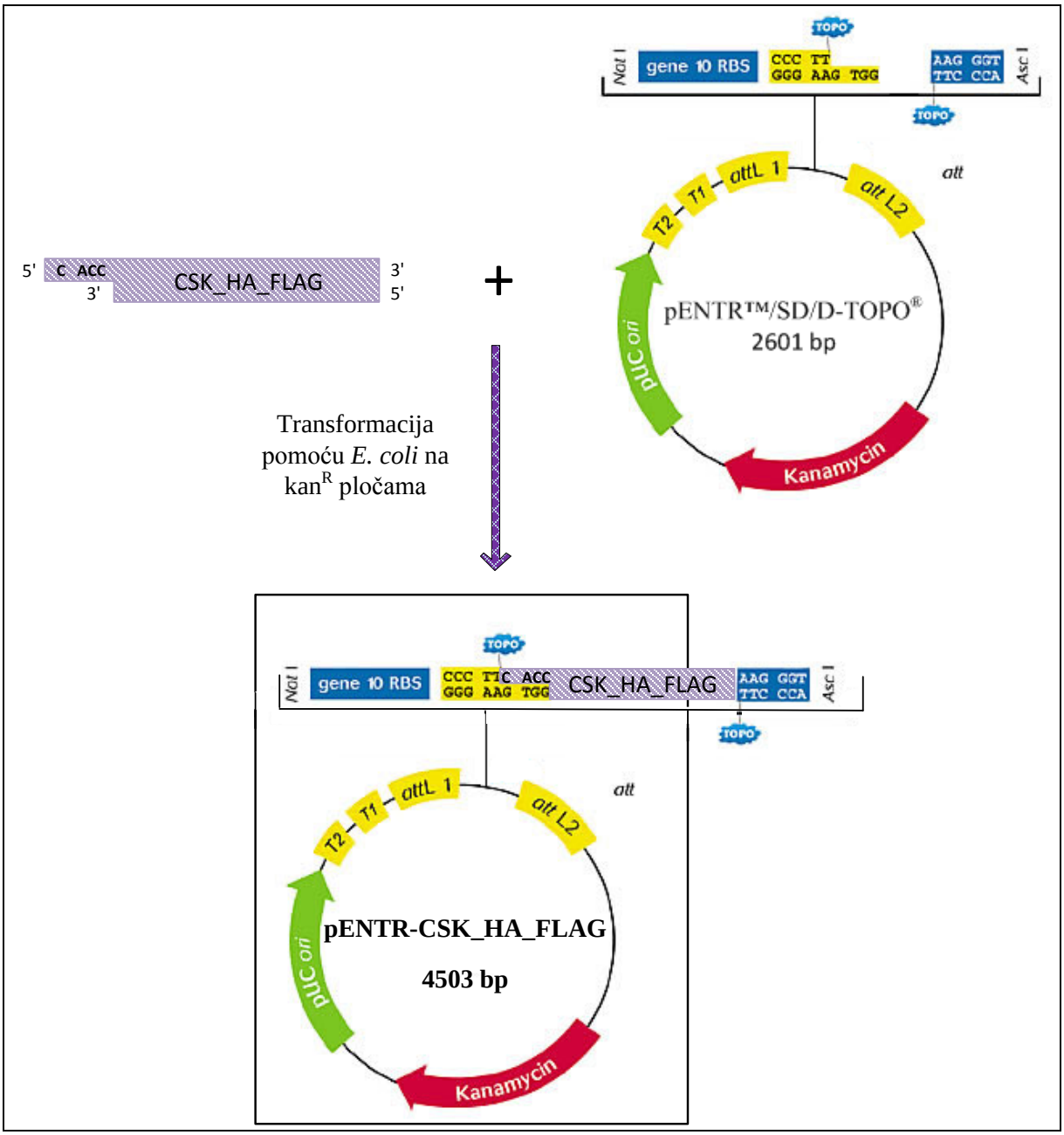
10 ng TOPO® vektora

_____

Konačni volumen 6 μl

Transformirala sam kemijski kompetentne stanice *E.coli* TOP10 smjesom za kloniranje prema već opisanom protokolu (2.2.5.a). Za selekciju transformanata nasadila sam bakterijske stanice na LB kan^R ploče.

Analiza rekombinantne plazmidne DNA radi se izolacijom prekonoćne kulture transformiranih bakterijskih stanica metodom minipreparacije (2.2.7.), a ugradnju konstrukta CSK_HA_FLAG u *entry* vektor provjerila sam restrikcijskom digestijom pomoću endonukleaza *Eco*RV i *Sal*I, kao i metodom sekvencioniranja s M13 5' i 3' početnicama.



Slika 11. Shematski prikaz ugradnje konstrukta CSK_HA_FLAG u pENTR™/SD/D-TOPO® vektor

2.2.9. Digestija restrikcijskim enzimima

Reakciju digestije provela sam prilikom provjere ugradnje konstrukta CSK_HA_FLAG u *entry* vektor pENTR™/SD/D-TOPO® kao i naknadne ugradnje u destinacijski vektor pH7WG2,0.

Reakcija se radi jednim ili određenom kombinacijom restrikcijskih enzima, u predviđenom puferu pri temperaturi od 37 ^{o}C u trajanju od 60 minuta. Količina enzima koja se koristi ovisi o količini DNA, stoga se za digestiju 1 ng DNA koristi 1 jedinica enzima.

Za provjeru ugradnje konstrukta CSK_HA_FLAG u pENTR™/SD/D-TOPO® vektor postavila sam restrikcijsku smjesu prema protokolu:

2,0 µl pENTR-CSK_HA_FLAG
6 jedinica *Eco*RV
3 jedinice *Sal*I
1 µl Pufer 10
6,1 µl MB H_2O
Konačni volumen 10 µl

2,0 µl pENTR-CSK_HA_FLAG
3 jedinice *Sal*I
1 µl Pufer 10
6,7 µl MB H_2O
Konačni volumen 10 µl

2.2.10. Gateway® LR reakcija

LR reakcija ugradnje konstrukta CSK_HA_FLAG iz *entry* klona pENTR-CSK_HA_FLAG u binarni vektor pH7WG2,0 provela sam prema protokolu seta pENTR™/SD/D-TOPO® *Cloning Kit* proizvođača Invitogen.

Gateway® LR reakcijska smjesa (bez enzima):
150 ng *entry* klon pENTR-CSK_HA_FLAG
150 ng binarni vektor pH7WG2,0
5,4 µl TE pufer (pH=8,0)
Konačni volumen 8 µl

U otopinu sam zatim dodala 2 µl *LR Clonase* ^{TM} *enzyme mix* i promiješala na mješalici te inkubirala 60 minuta pri 25 ^{o}C. Nakon inkubacije dodala sam 1µl otopine *Proteinaze K* koja zaustavlja reakciju te se ponovo inkubirala 10 minuta pri 37 ^{o}C. Rekombinacijom *entry* vektora pENTR-CSK_HA_FLAG koji sadrži cDNA gena At1g67840 te biljege HA i FLAG i destinacijskog vektora pH7WG2,0, LR reakcijom nastaje ekspresijski vektor pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG kojim transformiramo DH5α elektrokompetentne stanice *E. coli* prema već opisanom protokolu (2.2.5. b). Za selekciju transformanata nasadila sam bakterijske stanice na LB spec^{R} ploče.



Slika 12. Pojednostavljeni shematski prikaz ugradnje CSK_HA_FLAG konstrukta iz pENTR-CSK_HA_FLAG klona u binarni pH7WG2,0 vektor.

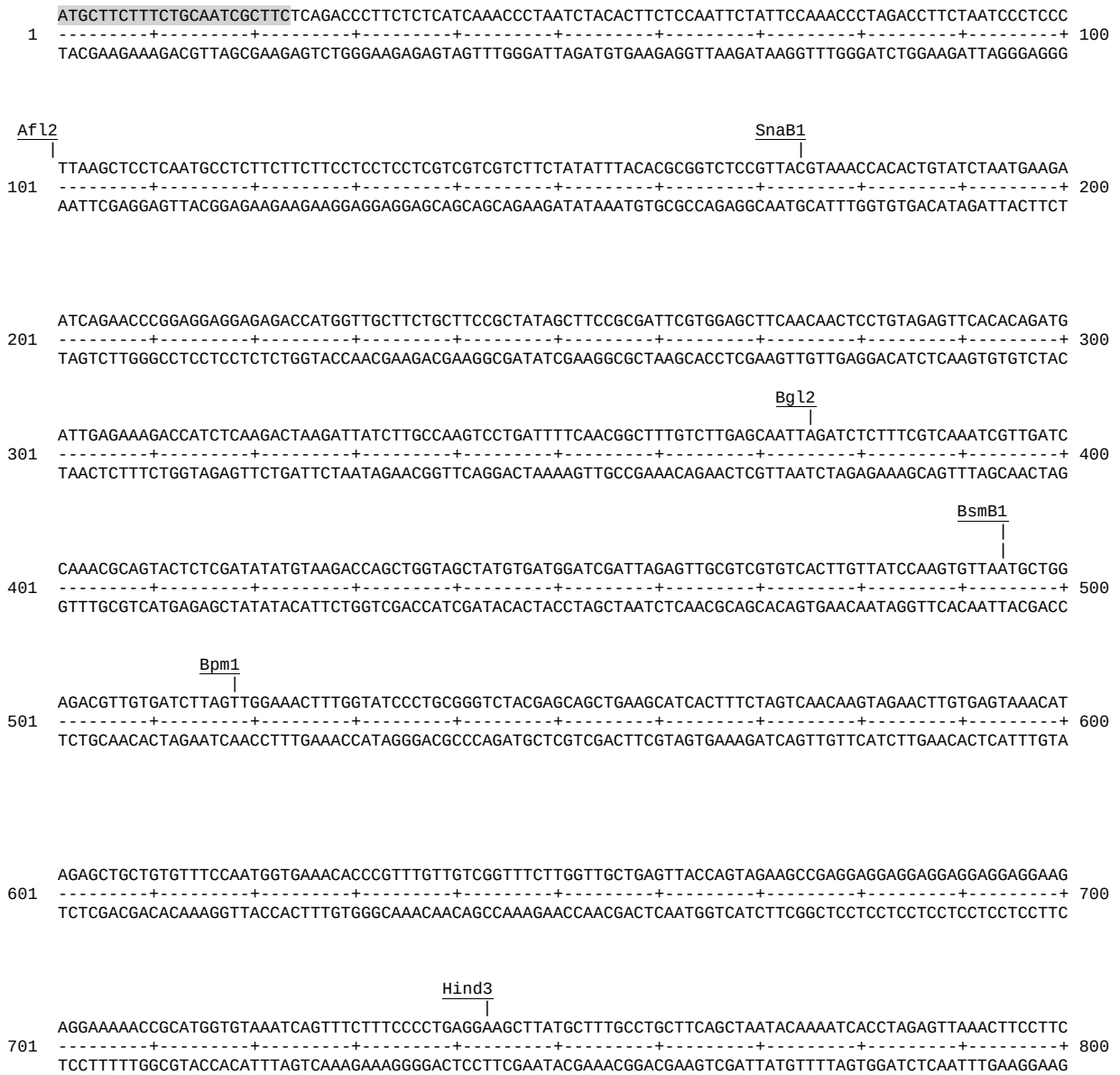
Rekombinantnu plazmidnu DNA sam zatim izolirala metodom mini-preparacije (2.2.7.) iz prekonoćne kulture transformiranih bakterijskih stanica koje su bile uzgajane u 3 ml LB tekuće podloge sa dodatkom antibiotika spektinomicina.

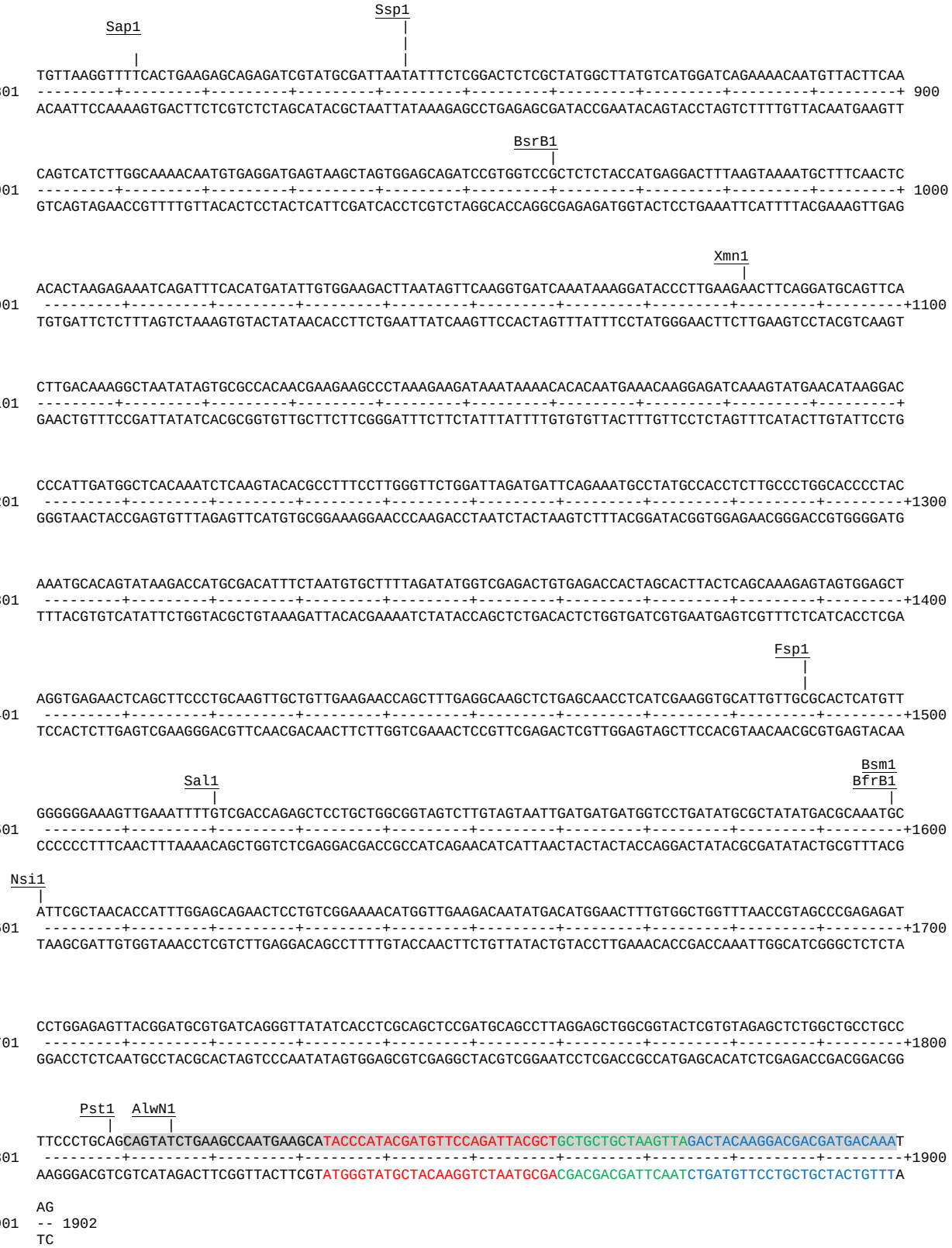
Provjeru ugradnje konstrukta CSK_HA_FLAG u ciljni vektor pH7WG2,0 izvršila sam metodom lančane reakcije polimerazom (2.2.1.) kao i restrikcijskom digestijom restrikcijskom endonukleazom *Hind*III (2.2.9.).

3. REZULTATI

3.1. Nukleotidni slijed cDNA gena At1g67840 i biljega HA i FLAG s restrikcijskom mapom

Za izradu početnica upotrebljenih u lančanoj reakciji polimerazom korišten je nukleotidni slijed cDNA gena At1g67840 zajedno sa nukleotidnim slijedom biljega HA i FLAG. Restrikcijska mapa nukleotidnog slijeda koristi se za provjeru ugradnje konstrukta u pENTR™/SD/D-TOPO® *entry* vektor kao i za potvrdu pravilne orijentacije CSK_HA_FLAG u ishodišnom vektoru (Slika 13).

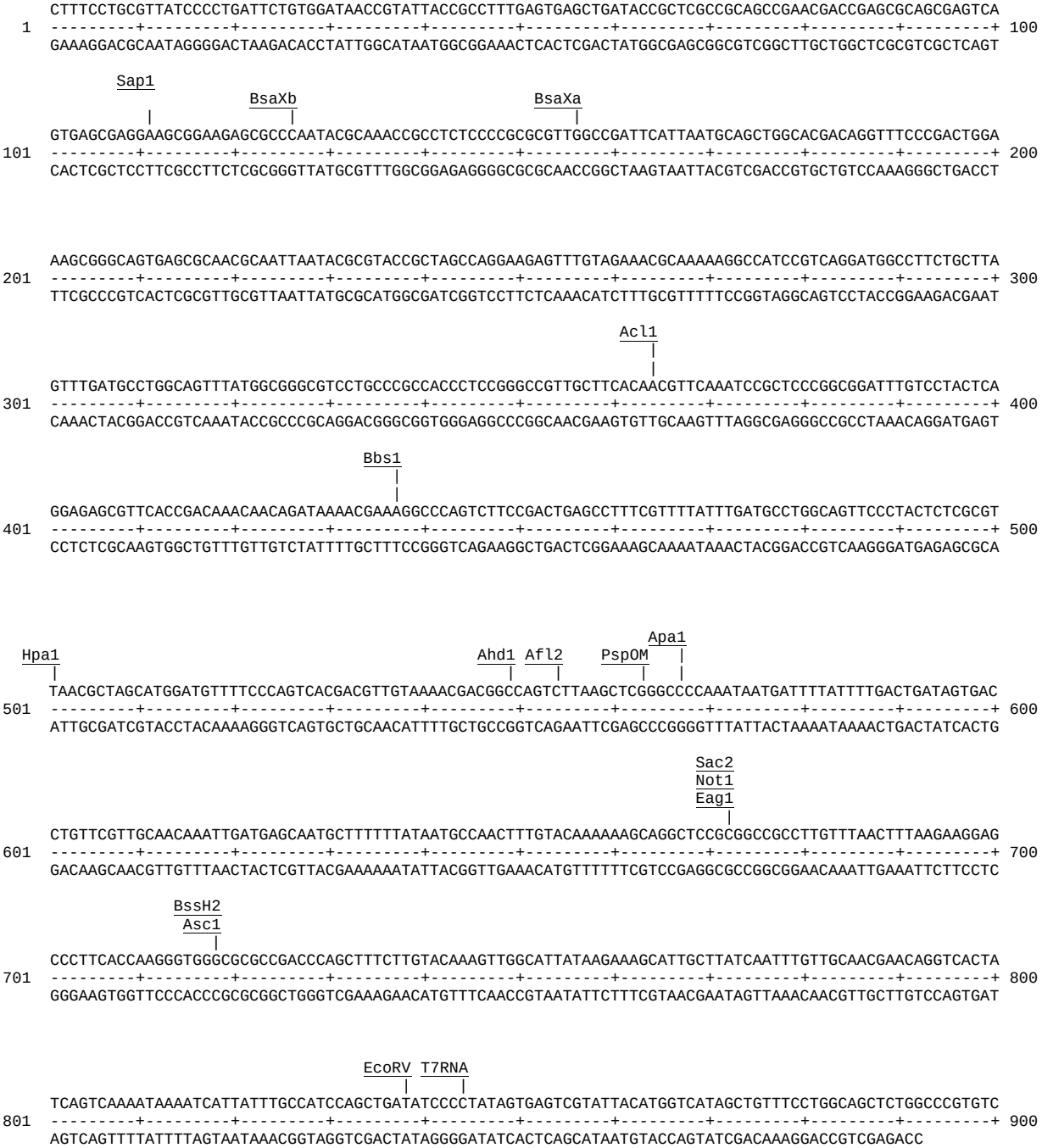


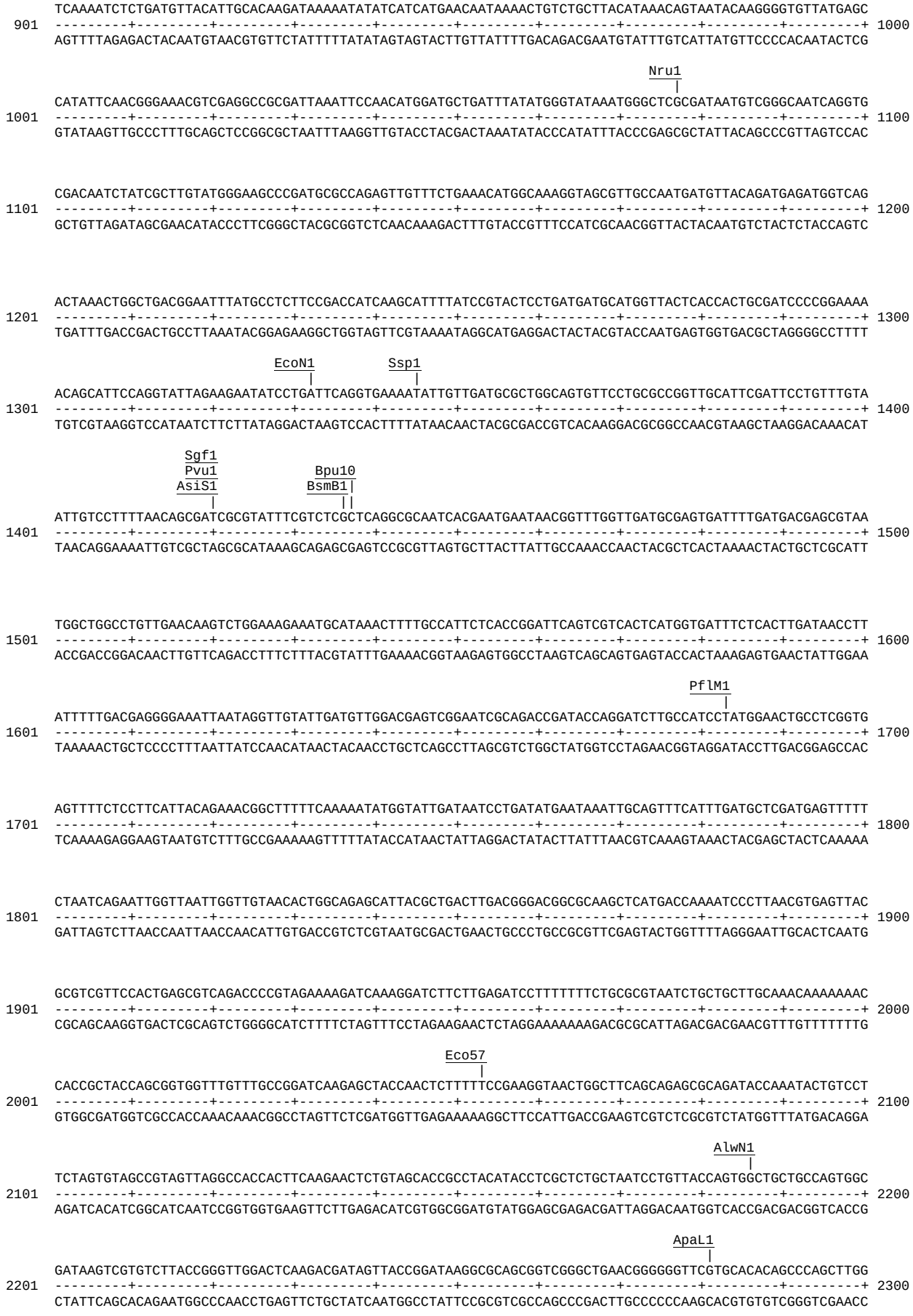


Slika 13: Nukleotidni slijed cDNA gena At1g67840 iz biljke *Arabidopsis thaliana* i afinitetnih biljega HA i FLAG s jedinstvenim restrikcijskim mjestima; Crvenom bojom označena je nukleotidna sekvenca HA biljega, a plavom FLAG biljega, zelena sekvenca označava nukleotidni slijed poveznice. Prema sivim nukleotidnim slijedovima određene su početnice za lančanu reakciju polimerazom.

3.2. Nukleotidni slijed ishodišnog vektora pENTR™/SD/D-TOPO® s restrikcijskom mapom

Za restrikcijsku provjeru pravilne ugradnje konstrukta CSK_HA_FLAG u ishodišni vektor pENTR™/SD/D-TOPO®, napravljena je restrikcijska mapa vektora i pronađena su jedinstvena restrikcijska mjesta uz pomoć kojih se može provjeriti uspješnost ugradnje konstrukta.




Nru1
EcoN1
Ssp1
Sgf1
Pvu1
AsiS1
Bpu10
BsmB1
PflM1
Eco57
AlwN1
ApaL1



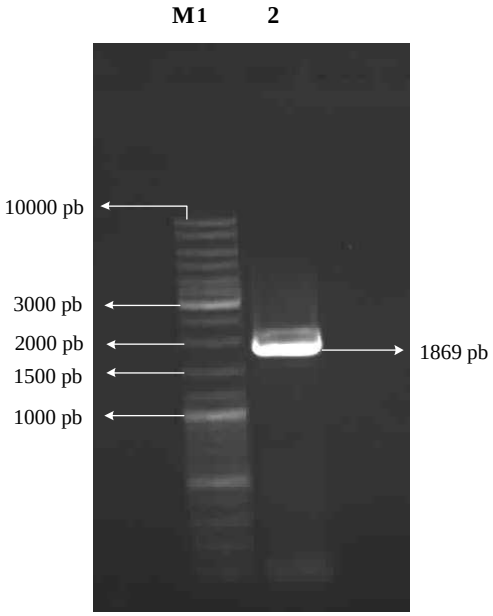
Slika 14. Nukleotidni slijed vektora pENTR™/SD/D-TOPO® s naznačenim jedinstvenim restrikcijskim mjestima

3.3. Konstrukcija vektora pENTR- CSK_HA_FLAG

Kako bi ugradnja konstrukta CSK_HA_FLAG veličine 1902 pb u ishodišni vektor pENTR™/SD/D-TOPO® bila uspješna, konstrukt CSK_HA_FLAG dobiven lančanom reakcijom polimerazom mora na svom 5' kraju sadržavati sekvencu CACC-.

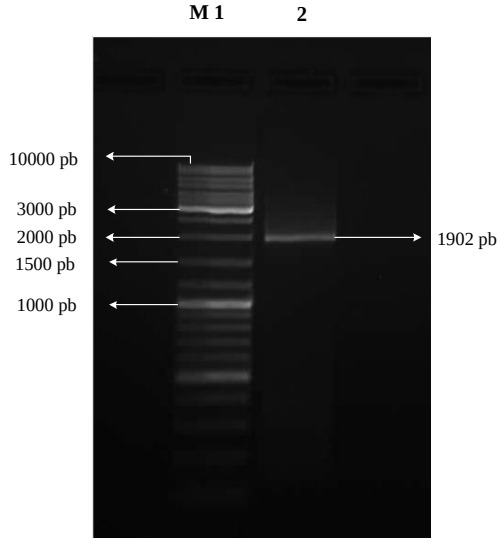
Sama konsktrukcija rekombinantnog vektora pENTR-CSK_HA_FLAG odvija se u 3 koraka:

1. Izrada konstrukta CSK_HA veličine 1869 pb lančanom reakcijom polimerazom (2.2.1.). Dobiveni produkt je zatim pročišćen iz PCR otopine i provjeren elektroforezom DNA u gelu agaroze (Slika 15).



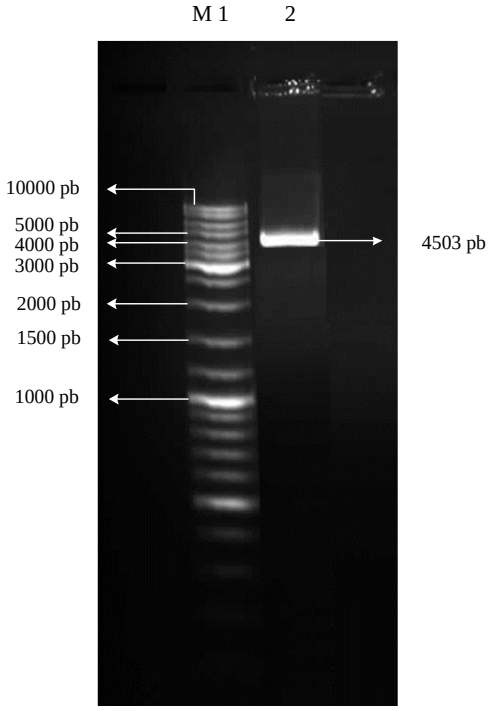
Slika 15. Elektroforeza DNA u 1% agaroznom gelu. Jažica 1(M1): DNA molekularni biljeg, jažica 2: vrpca od 1869 pb koja odgovara konstruktu CSK_HA dobivenom lančanom reakcijom polimerazom

2. Produkt lančane reakcije polimerazom CSK_HA služio je kao kalup za umnažanje konstrukta CSK_HA_FLAG (1902) pb. PCR produkt je bio pročišćen iz otopine i provjeren elektroforezom na gelu agaroze (Slika 16)



Slika 16. Elektroforeza DNA u 1% gelu agaroze. Jažica 1 (M1): DNA molekularni biljeg, jažica 2: vrpca od 1902 pb koja odgovara konstruktu CSK_HA_FLAG dobivenom lančanom reakcijom polimerazom

3. Ugradnja konstrukta CSK_HA_FLAG u ishodišni vektor pENTR™/SD/D-TOPO® odvijala se prema opisanom protokolu u poglavlju 2.2.8. (Slika 17).



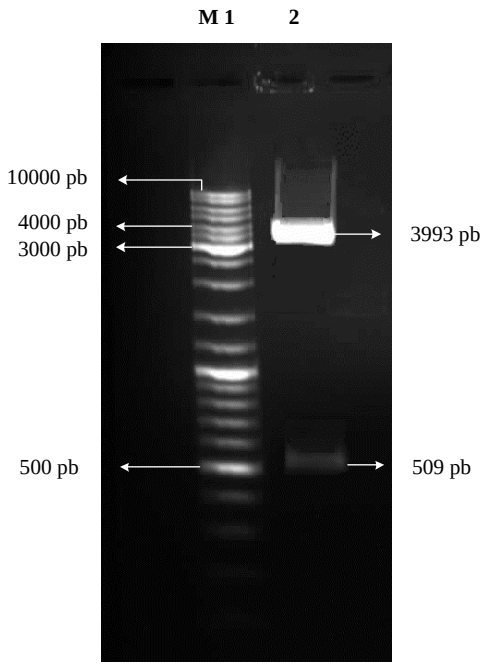
Slika 17. Elektroforeza DNA u 1% gelu agaroze. Jažica 1 (M1): DNA molekularni biljeg, jažica 2: vrpca od 4503 pb koja odgovara lineariziranom rekombinantnom vektoru pENTR-CSK_HA_FLAG nakon restrikcijske digestije sa *Sal*I.

Nakon transformacije određenog soja bakterije *E. coli* s rekombinantim plazmidnim vektorom pENTR-CSK_HA_FLAG, provjerava se ugradnja, kao i pravilna orijentacija ugrađenog konstrukta pomoću restrikcijskih enzima *Eco*RV i *Sal*I.

Analiza restrikcijske mape cDNA gena At1g67840 sa biljezima HA i FLAG i restrikcijske mape vektora pENTR™/SD/D-TOPO® pokazala je da restrikcijski enzim *SalI* cijepa sekvencu CSK_HA_FLAG na samo jednom mjestu, dok vektor pENTR™/SD/D-TOPO® ne cijepa. *Sal*I cijepa gen At1g67840 sa biljezima HA i FLAG na 1522. bazi.

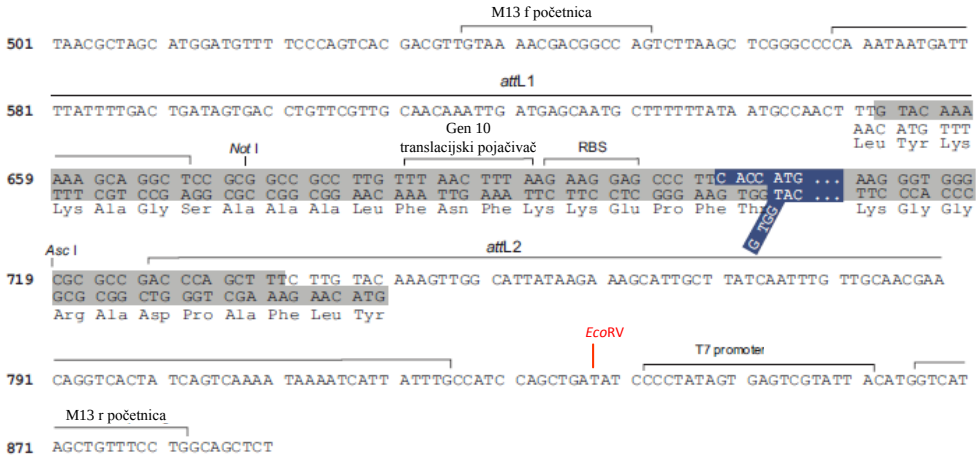
Restrikcijski enzim *Eco*RV cijepa vektor pENTR™/SD/D-TOPO® samo na jednom mjestu, na 839. bazi, dok sekvencu CSK_HA_FLAG ne cijepa. Ukoliko je ugradnja izvršena u pravilnoj orijentaciji, restrikcijskom analizom pomoću *Eco*RV i *Sal*I restrikcijskih enzima metodom elektroforeze u agaroznom gelu moguće je dokazati dvije vrpce, veličine 3993 pb i

509 pb što odgovara ukupnom broju pb konstrukta CSK_HA_FLAG ugrađenog u vektor pENTR™/SD/D-TOPO® (Slika 18).



Slika 18. Elektroforeza DNA na 1% agaroznom gelu. Jažica 1 (M1): DNA molekularni biljeg, jažica 2: vektor pENTR-CSK_HA_FLAG nakon restrikcije s *Eco*RV i *Sal*I, veličine pruga potvrđuju ugradnju i pravilnu orijentaciju konstrukta CSK_HA_FLAG u pENTR™/SD/D-TOPO® vektor.

Nakon potvrde pravilne orijentacije prilikom ugradnje konstrukta CSK_HA_FLAG u vektor pENTR™/SD/D-TOPO® i pročišćavanja rekombinantnog plazmida, uslijedilo je sekvenciranje s M13 početnicama (M13 f: GTAAAACGACGGCCAG i M13 r: CAGGAAACAGCTATGAC). Početnica se veže na komplementaran slijed vektora pENTR (Slika 19).

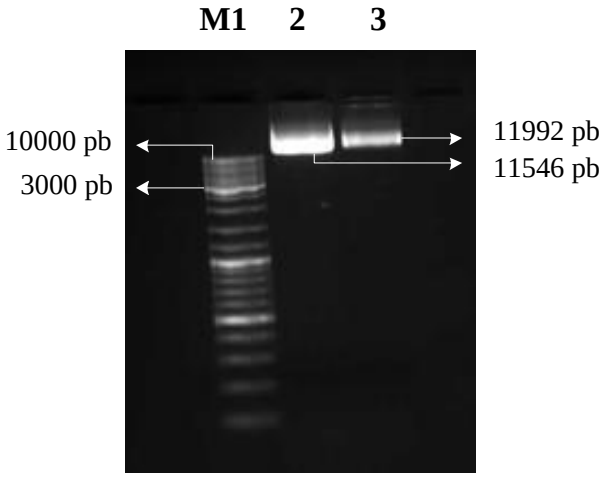


Slika 19. Shematski prikaz mjesta vezivanja M13 početnica na vektoru pENTR™/SD/D-TOPO® i mjesto cijepanja restrikcijskim enzimom *Eco*RV iza rekombinacijskog mijesta *att*L2. Slika preuzeta iz pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits.

3.4. Konstrukcija ciljnog binarnog vektora pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG

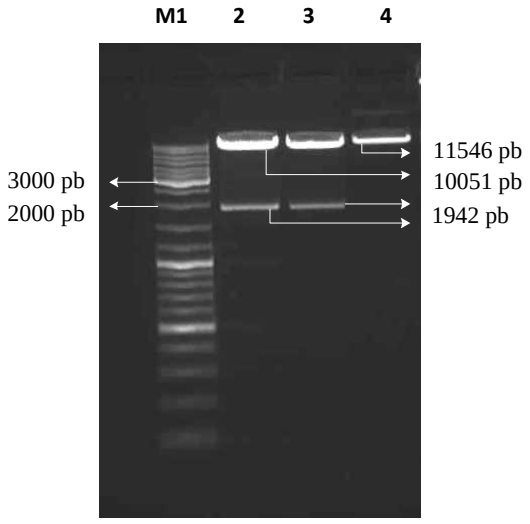
Konstrukcija binarnog vektora pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG također se odvijala kroz nekoliko koraka:

1. Ugradnja konstrukta CSK_HA_FLAG iz rekombinantnog vektora pENTR-CSK_HA_FLAG u binarni pH7WG2,0 vektor. Postupak LR reakcije rekombinacije prethodno je opisan (2.2.10.)
2. Transformacija određenog soja bakterija *E. coli* s rekombinantnim binarnim vektorom (pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG). Nakon minipreparacije ispitana je prisutnost ugrađenog konstrukta CSK_HA_FLAG u binarnom vektoru pH7WG2,0 lančanom reakcijom polimerazom te provjerena elektroforezom u gelu agaroze (Slika 20).
3. Provjera ugradnje CSK_HA_FLAG slijeda u binarni pH7WG2,0 vektor osim RE digestijom utvrđen je i sekcencioniranjem sa P35s_f početnicom (CCGACAGTGGTCCCAAAGATGGAC)



Slika 20. Elektroforeza DNA u 1% gelu agaroze. Jažica 1 (M1): DNA molekularni biljeg, jažica 2: pročišćeni binarni vektor pH7WG2,0 (11546 pb), jažica 3: vrpca odgovara veličini rekombinantnog vektora pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG (11992 pb), prethodno pročišćenog.

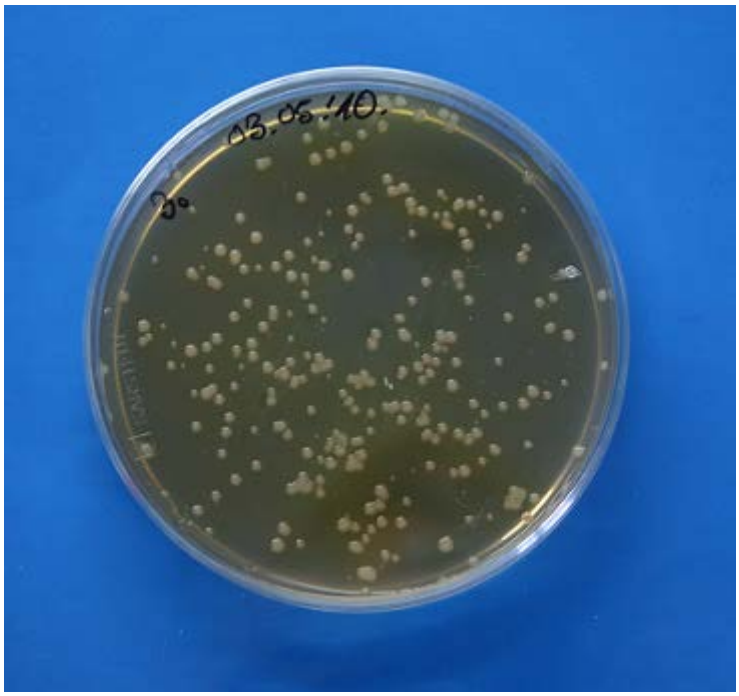
Ugradnja konstrukta CSK_HA_FLAG u binarni vektor pH7WG2,0 provjerena je također restrikcijskom digestijom enzimom *Hind*III. Analizom restrikcijske mape konstrukta CSK_HA_FLAG i vektora pH7WG2,0 CLUSTAL W programom, utvrđeno je da *Hind*III reže konstrukt CSK_HA_FLAG na 744. nukelotidu,a vektor pH7WG2,0 na 3032. nukleotidu. Nakon restrikcijske digestije rekombinantnog plazmida pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG i elektroforeze na agaroznom gelu dobivene su dvije vrpce koje odgovaraju veličinama 1942 pb i 10051 pb (Slika 21).



Slika 21. Elektroforeza DNA u 1.2% gelu agaroze. Jažica 1 (M1): DNA molekularni biljeg, jažice 2-3: odgovaraju veličini rekombinantnog vektora pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG (11992 pb) nakon restrikcije s *Hind* III, jažica 4: vektor pH7WG2,0

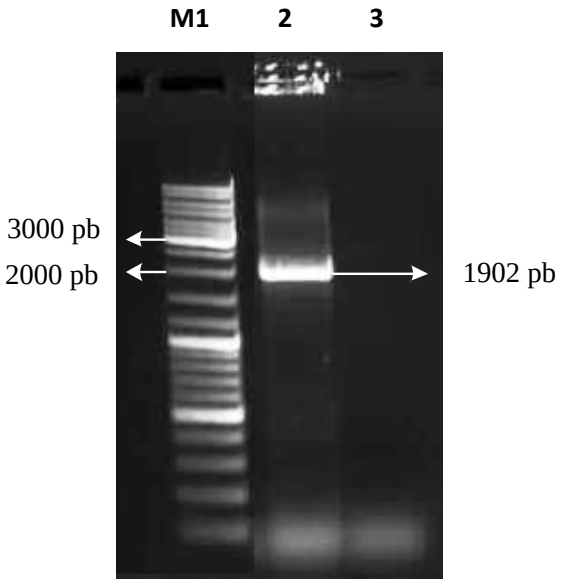
3.5. Transformacija bakterija *A. tumefaciens* EHA 105 binarnim rekombinantnim vektorom pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG

Kemijski kompetentne stanice *A. tumefaciens* EHA 105 transformirane su rekombinantnim vektorom pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG prema opisanom protokolu u poglavlju 2.2.6.
Nakon toga slijedi selekcija transformanata na krutoj YEB podlozi uz dodatak antibiotika rifampicina (rif^R) i spektinomicina ($spec^R$). Nakon 3 dana inkubacije na 28^oC, na selekcijskim pločama uspješno su narasle transformirane kolonije bakterija *A. tumefaciens*.



Slika 22. Kolonije transformiranih bakterija *A. tumefaciens* na YEB $spec^R$ i rif^R pločama

Transformacija bakterija *A. tumefaciens* konstruktom pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG, provjerena je lančanom reakcijom polimerazom uz uporabu gen-specifičnih početnica (2.1.3.). Pri tome je umnožen insert veličine 1902 pb, što odgovara veličini samog konstrukta CSK_HA_FLAG (Slika 23).



Slika 23. Elektroforeza DNA u 1% gelu agaroze. Jažica 1(M1): DNA molekularni biljeg, jažica 2: vrpca odgovara konstruktu CSK_HA_FLAG (1902 pb) umnoženom pomoću gen- specifičnih početnica na kalupu pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG izoliranom iz bakterijskih stanica *A. tumefaciens*, jažica 3: negativna kontrola provjere čistoće početnica.

4. RASPRAVA

Veliki napredak u istraživanju biljaka postignut je tijekom posljednjeg desetljeća. Istraživanja su dala uvid u prirodne procese uključene u otpornost biljaka prema bolestima, odgovorima na okolišni stres i biljni metabolizam. Također, počela su razjašnjavanja razvojnih, biokemijskih i fizioloških procesa mnogih vrsta biljaka. Međutim, kako su sve osobine živih organizama određene njihovim genetskim ustrojem i interakcijom sa okolišem, polazna točka je otkrivanje strukture i funkcije svakog gena i određivanje njegove uloge u kontroli metaboličkih i razvojnih procesa biljaka.

Genom biljke *Arabidopsis thaliana* poslužio je kao referenca za sekvencioniranje ostalih biljnih vrsta, a pokazalo se da sadrži oko 27 000 gena koji kodiraju za 35 000 proteina potrebnih za funkcioniranje biljke (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Daljna pitanja koja su se postavljala u pogledu ove problematike bila su način funkcioniranja tih gena na staničnoj razini kao i na razini organizma te sam način regulacije mehanizama prilagodbe koji biljkama omogućavaju život u različitim uvjetima, a u skladu s tim i različitim staništima.

U pogledu shvaćanja karakterističnih funkcija novootktivenih gena tj. njihovih proteinskih produkata, značajna je metoda obilježavanja proteina od interesa oligopeptidnim biljezima tj. epitopima koji omogućuju razne aplikacije, a između ostalog i praćenje ekspresije proteina, lokaliziranje proteina na staničnoj i substaničnoj razini, purifikaciju proteina, kao i analizu proteinske topologije, dinamike i interakcija. U novije vrijeme metoda je također našla primjenu u transgeničnoj i genskoj terapiji kao i u funkcionalnoj genomici i proteomici (Jarvik i Telmer, 1998). Metoda obilježavanja biljezima (epitopima) pristupom je slična kao i konstrukcija rekombinanata sa fluorescentnim proteinima. Fuzijom otvorenog okvira čitanja (ORF, engl. *Open Reading Frame*) na fluorescentne proteine poput zelenog (GFP), žutog (YFP), crvenog (RFP) ili cijan (CFP) fluorescentnog proteina može omogućiti određivanje unutarstanične lokalizacije proteina ili provjeru interakcija sa drugim fluorescentno označenim proteinima u živim stanicama (Earley i sur, 2006). Kod korištenja fluorescentno obilježenih proteina ciljani protein se može lako promatrati jer sam biljeg fluorescira dok se kod obilježavanja biljezima protein od interesa može detektirati samo imunološkim metodama. Međutim ova tehnika ima i mnoge prednosti. Relativno mala veličina biljega omogućuje njihovo fuzioniranje na amino- ili karboksi-terminus željenog proteina, a da pri tom struktura, a time i funkcija, tog proteina ostanu očuvane, korištenjem jednog specifičnog biljega može se detektirati veći broj proteina upotrebom istog antitjela specifičnog za taj biljeg. Sama detekcija je jako osjetljiva i omogućava razlikovanje dva ili

više proteina sa međusobno sličnom antigenskom reakcijom. Tehnika se pokazala korisnom pri detekciji proteina koji se teško izoliraju i pročišćavaju (Brizzard B, 2008).

Dvokomponentni prijenos signala, koji se sastoji od senzorske kinaze i regulatora odgovora je dominantni signalni mehanizam prokariota. Ovakav signalni sustav potječe od bakterija te se kroz eukariotsku domenu proširio simbiozom tj. lateralnim prijenosom gena iz kloroplasta i mitohondrija. Tjekom evolucije, kloroplasti su (osim nekoliko iznimaka kod ne-zelenih alga) prenijeli sve gene koji kodiraju za dvokomponentne sustave u jezgru eukariotskog domaćina. Dugo vremena kod zelenih alga i biljaka nisu bili poznati ni kloroplastni geni za dvokomponentne sustave niti kloroplastni dvokomponentni proteini kao produkti jezgrinih gena. Međutim, to se promijenilo otkrićem proteina kloroplastne senzorske kinaze (CSK) koja je kodirana u jezgri.

Prethodna istraživanja proteina kloroplastne senzorske kinaze (CSK) kojeg kodira gen At1g67840 kod biljke *Arabidopsis thaliana*, pokazala su da CSK kao sastavni dio dvokomponentnog sustava vrši regulaciju procesa fotosinteze tj. povezuje fotosintezu sa genskom ekspresijom (Puthiyaveetil i sur, 2008). CSK je sintetizirana u citosolu te se unosi u kloroplast u obliku proteinskog prekursora.

Iako je poznata substanična lokalizacija proteina CSK, pretpostavljena stromalna sublokalizacija treba biti potvrđena dodatnim metodama. U svrhu subkloroplastne lokalizacije mogu se koristiti osjetljiva antitijela na biljege kojima je obilježena CSK. Također, obilježavanje afinitetnim biljezima može olakšati izolaciju CSK kao i koizolaciju prilikom njene interakcije sa drugim proteinskim komponentama stanice.

U ovom je radu, u cilju istraživanja regulacije procesa fotosinteze, obilježena cDNA gena At1g67840 afinitetnim biljezima HA i FLAG. Zatim je izvršena ugradnja CSK_HA_FLAG konstrukta u pENTR, te potom u pH7WG2,0 vektor. Naknadno je napravljena transformacija agrobakterija EHA105 sa pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG konstruktom sa svrhom konačne transformacije vrste *A. thaliana* CSK *knock-out* biljaka, u kojima je prethodno inaktiviran gen At1g67840, koji sintetizira protein CSK. Konačna svrha ovih kloniranja je konstrukcija CSK-SENSE biljaka u kojima se nakuplja protein CSK, kako bi se nadalje mogao istraživati utjecaj CSK gena na transkripciju gena kloroplasta.

Kloniranje pomoću ligaza je mukotrpno i zahtjeva mnogo vremena te stvara tehničku prepreku za visoku učinkovitost u istraživanjima funkcionalne genomike ili proteomike. Uz to, unatoč napredovanju postupka transformacije biljaka pomoću *Agrobacterium tumefaciens*

binarni vektori korišteni u ovoj metodi su veliki (u prosjeku 10-14 kb) i često sadrže samo nekoliko jedinstvenih restrikcijskih mjesta (Dubin, 2008).

Takve prepreke su značajno umanjene pojavom Gateway® tehnologije kloniranja. Sustav Gateway® je relativno brza metoda kloniranja jer nisu potrebne prekonoćne inkubacije te se rekombinacijskim sustavom *lambda* bakteriofaga zaobilazi potreba za klasičnim kloniranjem pomoću ligaza.

Kad je željena sekvenca ugrađena u *entry* plazmidni vektor tako da je bočno okružena rekombinacijskim mjestima, dalje se može rekombinirati u raznovrsne destinacijske vektore koji sadrže kompatibilna rekombinacijska mjesta. Biljni destinacijski vektori oblikovani su za različite specifične namjene uključujući lokalizaciju proteina, funkcionalnu analizu promotora, overekspresiju gena, utišavanje gena pomoću RNA, stvaranje proteina označenih epitopom u svrhu pročišćavanja kromatografijom ili analizu protein-protein interakcija (Earley i sur, 2006). Destinacijski vektori za ekpresiju proteina u različitim organizmima komercijalno su dostupni i mogu se nabaviti putem tvrtke Invitrogen (SAD). Metoda je iznimno učinkovita, u većini slučajeva uspješnost je veća od 90%. Prisutnost dvije vrste antibiotika kao i *ccdB* proteina koji interferirajući sa *E. Coli* DNA girazom inhibira rast većine sojeva *E. Coli* (DH5α, TOP10), razlog je njene velike uspješnosti (Bernard i Cuoturier, 1992). U konačnici, sustav kloniranja *Gateway* je univerzalna metoda s obzirom da dopušta upotrebu i ekspresiju različitih tipova DNA fragmenata (produkata lančane reakcije polimerazom, cDNA klonova ili restrikcijskih fragmenata).

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada je primjena metode obilježavanja kloroplastne senzorske kinaze (CSK) afinitetnim biljezima HA i FLAG u svrhu karakterizacije proteina CSK biljne vrste *Arabidopsis thaliana*.

Upotrebom specifičnih antitijela moguće je lokalizirati protein od interesa u pojedinim staničnim odjeljcima, pratiti njegovu dinamiku i interakcije s ostalim proteinskim komponentama stanice, što doprinosi otkrivanju i razumijevanju njegove uloge.

S obzirom na rezultate dobivene u ovom radu, došlo se do sljedećih zaključaka:

- Nukleotidni konstrukt cDNA gena At1g67840, koji kodira za protein kloroplastnu senzorsku kinazu (CSK) sa fuzioniranim afinitetnim biljezima HA i FLAG, veličine 1902 pb dobro se umnožava lančanom reakcijom polimerazom.
- Konstrukt CSK_HA_FLAG ugrađen je na odgovarajuće mjesto u Gateway® pENTR™/SD/D-TOPO® vektor. Ugradnja i pravilna orijentacija provjerena je i potvrđena restrikcijskom digestijom i sekvencioniranjem sa M13 početnicama.
- Konstrukt CSK_HA_FLAG uspješno je prenesen u binarni pH7WG2,0 ciljni vektor. Prisutnost konstrukta dokazana je lančanom reakcijom polimerazom kao i restrikcijskom digestijom te sekvencioniranjem sa P35s_f početnicom.
- Bakterije *A. tumefaciens* transformirane su s binarnim vektorom pH7WG2,0-CSK_HA_FLAG. Uspješna transformacija dokazana je naraslim kolonijama na pločama sa odgovarajućim antibiotikom i lančanom reakcijom polimerazom.

6. LITERATURA

Kaul S, Koo H.L, Jenkins J, Rizzo M, Rooney T. i sur. (2000): The Arabidopsis Genome Initiative Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002): Molecular biology of the cell (4th edition), Chloroplast and photosynthesis, Garland Science, 793-808.

Allen J.F. (1993*a*): Control of gene-expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *Theor. Biol.* **165:** 609-631.

Allen J.R. (1993*b*): Redox control of transcription-sensors, response regulators, activators and repressors. *FEBS Lett.* **332:** 203-207.

Allen J.F. (2003): The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B* **358:** 19-38.

Bernard P, Couturier M. (1992): Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA topoisomerase II complexes. *J. Mol. Biol.* **226:** 735-745.

Brasch M.A, Hartley J.L, Vidal M. (2004): ORFeome cloning and system biology: standardized mass production of the parts from the parts-list. *Genome Res.***14:** 2001-2009.

Brizzard B. (2008): Epitope tagging. *BioTechniques* **44:** 693-695.

Bushman W, Thompson J.F, Vargas L, Landy A. (1985): Control of directionality in Lambda site-specific recombination. *Science* **230**: 906-911.

De Las Rivas J, Losano J.J, Ortiz A.R. (2002): Comparative analysis of chloroplast genomes: Functional annotation, genome-based phylogeny, and deduced evolutionary patterns. *Genome Res.* **12:** 567-583.

Doolittle W.F, Boucher Y, Nesbo C.L, Douady C.J, Andersson J.O, Roger A.J. (2003): How big is the iceberg of which organellar genes in nuclear genomes are but the tip? *Philos. Trans. R. Soc. Land. B. Biol. Sci.* **358:** 39-57.

Douglas A.E, Raven J.A. (2003): Genomes at the interface between bacteria and organelles. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.B* **358:** 5-18.

Dubin M.J, Bowler C, Benvenuto G. (2008): A modified *Gateway* cloning strategy for overexpressing tagged protein in plants. *Plant Methods* **4:** 3.

Duplessis M.R, Karol K.G, Adman E. T, Choi L.Y, Jacobs M.A, Cattolico R.A. (2007): Chloroplast His-to-Asp signal transduction: a potential mechanism for plastid gene regulation in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *BMC Evol. Biol.* **7:** 70.

Earley K.W, Haag J.R, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard C.S. (2006): Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J.* **45** (4): 616-629.

Inoue H, Rounds C, Schnell D.J. (2010): The molecular basis for distinct pathways for protein import into *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell.* **22:** 1947-1960.

Jarvik J.W, Telmer C.A. (1998): Epitope tagging. *Annu. Rev. Genet.* **32:** 601-618.

Jensen R.B, Wang S.C, Shapiro L. (2002): Dynamic localisation of proteins and dna during a bacterial cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**: 167.

Koretke K.K, Lupas A.N, Warren P.V, Rosenberg M, Brown J.R. (2000): Evolution of two-component signal transduction. *Mol. Biol. Evol.* **17:** 1956-1970.

Kumar A, Toledo J.C, Patel R.P, Lancaster J.R, Steyn A.J. (2007): Mycobacterium tuberculosis DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104:** 11 568-11 573.

Landy A. (1989): Dynamic, structural and regulatory aspects of Lambda site-specific recombination. *Ann. Rev. Biochem.* **58**: 913-949.

Nixon B.T, Ronson C.W, Ausubel F.M. (1986): Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC. *Proc. Natl. ACAD. Sci. USA* **83:** 7850-7854.

Perry S.E, Keegstra K. (1994): Envelope membrane proteins that interact with chloroplast precursor proteins. *Plant Cell.* **6:** 93-105.

Pevalek-Kozlina B. (2003): Fiziologija bilja, Klanac Z. (ur.): Biljna stanica, Fotosinteza. Profil, Zagreb, 24-25, 156-219.

Ptashne M. (1992): A genetic switch: Phage (Lambda) and higher organisms (2nd edition), The master elements of control, Cambridge, MA: Cell Press, 13-20.

Puthiyaveetil S, Ibrahim I.M, Jeličić B, Tomašić A, Fulgosi H, Allen J.F. (2010): Transcriptional control of photosynthesis genes: the evolutionary conserved regulatory mechanism in plastid genome function. *Genome Biol. Evol.* **2:** 893.

Puthiyaveetil S, Kavanagh T.A, Chain P, Sullivan J.A, Nevell C.A, Gray J.C, Robinson C, van der Giezen M, Rogers M.B, Allen J.F. (2008): The ancestral symbiont sensor kinase CSK links photosynthesis with gene expression in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105:** 10 061-10 066.

Stock J.B, Ninfa A.J, Stock, A.M. (1989): Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53:** 450-490.

Stock A.M, Robinson V.L, Goudreau P.N. (2000): Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69:** 183-215.

Wagner R, Pfannschmidt T. (2006): Eucaryotic transcription factors in plastids: bioinformatic assessment and implications for the evolution of gene expression machineries in plants. *Gene* **381:** 62-70.

Whitmarsh J. and Govindjee (1995): Concepts in photobiology: Photosynthesis and photomorphogenesis, Singhal G.S, Renger G, Sopory S.K, Irrgang K.D, Govindjee (ur.): The photosynthetic process. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 11-51.