

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marija Podolski

Proteinske domene aminoacil-tRNA-
sintetaza i interakcije s drugim
proteinima

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2009.

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

Veliko hvala prof. dr. Ivani Weygand-Đurašević na pruženoj prilici i stručnoj potpori.

Iskreno hvala mojoj neposrednoj voditeljici Vlatki Godinić na pruženom znanju i brojnim savjetima.

Hvala mojim roditeljima, na ljubavi i toplini.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Proteinske domene aminoacil-tRNA-sintetaza i interakcije s drugim proteinima

Marija Podolski

Zavod za biokemiju Kemijskog odsjeka PMF-a, Horvatovac 102a, Zagreb

Prethodno otkrivena kristalna struktura seril-tRNA-sintetaze (SerRS) metanogenog tipa iz arheje *Methanosarcina barkeri* ukazala je na neke atipične karakteristike ovog enzima, jedna od kojih je bila i prisutnost motiva HTH unutar C-terminalne domene proteina. Za njega se pretpostavljalo da je ima važnu ulogu pri dimerizaciji SerRS i interakciji između N- i C-terminalnih domena proteina. Ova pretpostavka je potvrđena našim rezultatima dobivenim metodom dvaju hibrida.

Osim toga, pretraživanje metodom dvaju hibrida iskorišteno je za utvrđivanje proteina s kojima SerRS iz *Methanothermobacter thermautotrophicus* interagira, jedan od kojih je bila i arginil-tRNA-sintetaza (ArgRS). Ovu interakciju smo potvrdili afinitetnom kromatografijom („GST-pulldown assay“).

Prethodno je pronađeno da neke SerRS metanogenog tipa mogu, osim pripadnih tRNA^{Ser} i tRNA^{Sec} prepoznati i eukariotske i prokariotske tRNA^{Ser}. Naši rezultati predlažu da je to slučaj i kod SerRS iz *M. thermautotrophicus*.

(91 stranica/30 slika/1 tablica/80 literaturnih navoda/jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Središnja biološka knjižnica, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Ključne riječi: seril-tRNA-sintetaza/proteinske interakcije/metanogene arheje/sustav dvaju hibrida

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Weygand-Đurašević

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Ivana Weygand-Đurašević
prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić
prof. dr. sc. Dijana Škorić

Rad prihvaćen: 3.6. 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology,
Rooseveltova trg 6, Zagreb

Graduation Thesis

Protein domains of aminoacyl-tRNA synthetases and interactions with other proteins

Marija Podolski

Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb,
Horvatovac 102a, Zagreb

Recently resolved crystal structure of methanogenic type seryl-tRNA synthetase (SerRS) from *Methanosarcina barkeri* revealed some atypical features, one of which was an idiosyncratic helix-turn-helix motif within C-terminal domain of the protein. This motif seems to be important for dimerization of the enzyme and interaction between N- and C-terminal domains. This assumption was supported by our experimental results achieved by yeast two-hybrid assays.

In addition, the yeast two-hybrid approach was used to screen for proteins interacting with SerRS in *Methanothermobacter thermautotrophicus*. One of the proteins which was found to interact with SerRS was arginyl-tRNA synthetase. To support this finding, we proved this interaction by affinity chromatography (GST-pulldown assay).

As it was established for some methanogenic type SerRSs previously, some of these enzymes are capable of recognizing both eukaryotic and prokaryotic tRNA^{Ser} in addition to the homologous tRNA^{Ser} and tRNA^{Sec} substrates. Our results indicate that this feature is also displayed by *M.thermautotrophicus* SerRS.

(91 pages/30 figures/1 table/80 references/original in Croatian)

Thesis deposited in: Faculty of Science, University of Zagreb, Central Biological Library,
Department of Biology, Rooseveltov trg 19, Zagreb

Key words: seryl-tRNA synthetase/protein-protein interactions/methanogenic archaea /
yeast two-hybrid system

Supervisor: prof. dr. sc. Ivana Weygand-Đurašević

Reviewers: prof. dr. sc. Ivana Weygand-Đurašević
prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić
prof. dr. sc. Dijana Škorić

Thesis accepted: June 3rd, 2009

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Arheje.....	2
1.2. Aminoacil-tRNA-sintetaze.....	3
1.2.1. Građa tRNA.....	4
1.2.2. Reakcija aminoacilacije.....	6
1.2.3. Klasifikacija aminoacil-tRNA-sintetaza.....	7
1.2.4. Popravak grešaka pri aminoaciliranju (proofreading).....	9
1.2.5. Sinteza aminoacil-tRNA kod arheja.....	9
1.2.6. Evolucija aminoacil-tRNA-sintetaza.....	10
1.2.7. Seril-tRNA-sintetaze.....	11
1.2.8. Interakcije aminoacil-tRNA-sintetaza s drugim proteinima.....	13
1.3. Sustav dvaju hibrida.....	17
2. MATERIJALI I METODE.....	20
2.1. MATERIJALI.....	21
2.1.1. Standardne kemikalije.....	22
2.1.2. Reagencije.....	22
2.1.3. Pufferi i otopine.....	24
2.1.4. Hranidbene podloge i mediji.....	29
2.1.5. Bakterijski i kvaščevi sojevi.....	30
2.1.6. Plazmidi.....	30
2.1.7. Protutijela.....	34
2.1.8. Početnice za lančanu reakciju polimerazom.....	35
2.1.9. Kompleti.....	35
2.2. METODE.....	37
2.2.1. Ispitivanje interakcija metodom dvaju hibrida.....	38

2.2.1.1. Detekcija transkripcije gena pokazatelja.....	38
2.2.1.2. Transformacija kvasaca metodom litijevog acetata.....	40
2.2.2. Izolacija plazmidne DNA iz <i>E.coli</i>	40
2.2.3. Lančana reakcija polimerazom.....	41
2.2.4. Elektroforetske metode.....	43
2.2.4.1. Agarozna elektroforeza nukleinskih kiselina.....	43
2.2.4.2. Poliakrilamidna elektroforeza.....	44
2.2.4.3. Bojanje poliakrilamidnih gelova srebrom.....	46
2.2.5. Reakcije ligacije.....	47
2.2.6. Priprema elektrokompetentnih stanica <i>E.coli</i>	48
2.2.7. Transformacija <i>E.coli</i> elektroporacijom.....	48
2.2.8. Pročišćavanje proteina His ₆ -SerRS na Ni-NTA koloni.....	49
2.2.9. Pročišćavanje proteina GST-ArgRS na koloni koja sadrži glutation-sefarozu.....	51
2.2.10. Western analiza (detekcija kompleksa His ₆ -SerRS i GST-ArgRS).....	53
3. REZULTATI.....	54
3.1. Interakcije proteinskih domena seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa iz <i>Methanosarcine barkeri</i>	55
3.1.1. Interakcije C-terminalnih domenaseril-tRNA-sintetaze iz <i>M. barkeri</i> u sustavu dvaju hibrida.....	55
3.1.2. Ugradnja sekvence za N-terminalnu domenuseril-tRNA-sintetaze iz <i>M. barkeri</i> u vektor pACT2.....	57
3.1.3. Interakcije N- i C-terminalne domene seril-tRNA-sintetaze iz <i>M. barkeri</i>	59
3.2. Interakcije seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa iz <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> s drugim proteinima.....	61
3.2.1. Izolacija pozitivna.....	61
3.2.2. Analiza sekvenci.....	62
3.2.3. Ugradnja gena za SerRS iz <i>M. thermautotrophicus</i> u vektor pET28b.....	62
3.2.4. Pročišćavanje His ₆ -SerRS.....	66
3.2.5. Ugradnja gena za ArgRS iz <i>M. thermautotrophicus</i> u vektor pGEX-6P-2.....	68

3.2.6. Pročišćavanje GST-ArgRS.....	71
3.2.7. GST-pulldown assay za GST-ArgRS i His ₆ -SerRS.....	73
3.3. Ispitivanje vezanja prokariotske i eukariotske tRNA iz <i>M. thermautotrophicus</i> nenedenaturirajućom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu.....	75
4. RASPRAVA.....	76
4.1. Interakcije proteinskih domena seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa iz <i>Methanosarcine barkeri</i>	77
4.1.1. Struktura SerRS bakterijskog tipa.....	77
4.1.2. Struktura metanogenog tipa SerRS iz <i>M. barkeri</i>	78
4.1.3. Uloga motiva HTH u interakciji C-terminalnih domena.....	78
4.1.4. Uloga motiva HTH u interakciji C- i N-terminalne domene.....	79
4.2. Interakcija seril-tRNA-sintetaze iz <i>M.thermautotrophicus</i> s arginil-tRNA-sintetazom.....	80
4.3. Prepoznavanje tRNA ^{Ser} iz svih domena života od strane SerRS iz <i>M.thermautotrophicus</i>	82
5. ZAKLJUČAK.....	83
6.LITERATURA.....	84

1. UVOD

1.1. Arheje

Carl Woese je podijelio sva živa bića na tri primarne domene: *Bacteria*, *Archaea* i *Eukarya* (1). Ova podjela napravljena je na temelju razlika u slijedu ribosomalne RNA male podjedinice ribosoma (16S rRNA).

Arheje (domena *Archaea*) su metabolički raznosvrtni organizmi s čitavim nizom fenotipa koji zajedno s eukariotima i bakterijama naseljavaju okoliš pri normalnim, ali i vrlo ekstremnim uvjetima u kojima obično prevladavaju. Na prvi pogled ne razlikuju se mnogo od bakterija, osim što neke vrste grade kolonije čija se morfologija razlikuje od tipičnih bakterijskih kolonija. Prvotno su uočene tri skupine fenotipa: metanogeni (striktni anaerobi koji produciraju metan), halofili (striktni aerobi koji žive u okolišu s visokim koncentracijama soli) i termoacidofili (aerobi koji naseljavaju vruća i kisela staništa) (2). Ove skupine je povezivala sličnost u slijedovima rRNA te jedinstvena svojstva membranskih fosfolipida, koji su eteri izoprenola i glicerola (za razliku od bakterijskih i eukaritoskih koji su esteri masnih kiselina i glicerola). Arheje ne sadrže murein, već pseudomurein u staničnoj stijenci, a stanične ovojnice su im vrlo raznolike, iako se najčešće javlja jednostavni S-sloj glikoproteina koji prekriva citoplazmatsku membranu (3).

Domena *Archaea* dijeli se na pet velikih odjeljaka: *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota*, *Nanoarchaeota* i *Thaumarchaeota* (3, 51, 52). Pojam *Euryarchaeota* je širi i podrazumijeva veću fenotipsku raznolikost (ovdje spadaju halofili, metanogeni, neki termoacidofili i neki hipertermofili). Za razliku od toga, fenotipska raznolikost *Crenarchaeota* je puno manja - čine ih samo hipertermofilne vrste (3).

Svi metabolički putevi svojstveni arhejama pronađeni su i u bakterijama, izuzev metanogeneze za koju fosilni podaci govore da je nastala prije 2,8 milijardi godina. Jedinstven nastanak i prisutnost ovog procesa u metanogenim arhejama čine te organizme vrlo drevnim organizmima (4,50). Otkriće podzemnih metanogena koji iz vodika i ugljičnog dioksida produciraju metan, potaklo je posebne spekulacije o tome da su ovi metanogeni direktno povezani s nastankom života na Zemlji (5).

Sam proces metanogeneze je vrlo kompleksan i zahtijeva velik broj specifičnih enzima. Većinu organskih tvari (ugljikohidrati, masne kiseline i alkoholi) metanogene arheje ne mogu koristiti kao supstrate već ih moraju prevesti u jednu od tri jednostavnije molekule: CO₂, spojeve s metilnom skupinom ili acetat.

Metanogene arheje svrstane su u odjeljak *Euryarchaeota* u 5 redova: *Methanobacteriales*, *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* i *Methanosarcinales*. Ove redove čini 10 porodica i 31 rod koji mogu prilično varirati u morfološkim i fiziološkim karakteristikama (razlike u građi stanične ovojnice, sastavu lipida, vrsta supstrata kojeg koriste u metanogenezi), ali svima im je zajednički strogo anaerobni način života i sposobnost proizvodnje metana (6, 50). Organizmi čiji su proteini proučavani u ovom radu, spadaju u redove *Methanobacteriales* (*Methanothermobacter thermoautotrophicus*) i *Methanosarcinales* (*Methanosarcina barkeri*). *M. thermoautotrophicus* je Gram-pozitivni metanogeni mikroorganizam čija stanična stijenka sadrži pseudomurein. Genom je sekvenciran, sastoji se od kružnog kromosoma na kojem se u 1,7 Mpb nalazi 1921 gen (7). Genom *M. barkeri* sastoji se od jednog kružnog kromosoma i jednog plazmida. Kromosom je velik 4.8 Mpb, u kojem protein kodirajuće sekvence čine 69% i daju 3606 proteinskih produkata. Plazmid je velik 36 kB i kodira za 26 uglavnom metaboličkih proteina (8). U *M. barkeri* je pronađena 22. aminokiselina, pirolizin, čija je prisutnost zasad utvrđena samo u metanogenih arheja (9). Oba organizma (*M. thermoautotrophicus* i *M. barkeri*) pronađena su u probavilima preživača gdje pomažu pri probavljanju celuloze.

Što se tiče sličnosti i razlika između bakterija, arheja i eukariota na molekularnoj razini, promatrajući neke osnovne, tzv. *housekeeping* gene, arheje su sa informacijskog stajališta sličnije eukariotima, dok su sa metaboličkog puno srodnije bakterijama (10). Arhealne DNA-polimeraze homolgne su s eukariotskim δ -polimerazama koje repliciraju nuklearni genom i nisu povezane sa funkcionalnim ekvivalentom u bakterijama, DNA-polimerazom III. Sama struktura arhealnih genoma pokazuje operonsku organizaciju, kao i kod bakterija - neki geni za ribosomalne proteine pokazuju operonsku strukturu, iako su proteinski produkti istih tih gena sličniji eukariotskim nego bakterijskim proteinima (10). Komponente transkripcijskog aparata (sve tri velike podjedinice RNA-polimeraze) koje su univerzalno distribuirane kroz sve tri domene, kod arheja također pokazuju veću sličnost s eukariotima (11). Kod arheja nisu prisutne komponente kompleksa za prekranje RNA (engl. *spliceosome*), niti introni grupe I i II, koji se inače javljaju i kod bakterija i kod eukariota, ali su prisutni inteini (samoizrezujuće proteinske sekvence) (10).

1.2. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Biosinteza proteina odvija se u 5 faza:

1. aktivacija aminokiselina
2. inicijacija
3. elongacija
4. terminacija i otpuštanje
5. smatanje i posttranlacijske modifikacije.

U prvoj fazi, aktivaciji aminokiselina, svaka od 20 aminokiselina se kovalentno veže za pripadajuću tRNA u dva koraka uz pomoć aktivirajućih enzima, aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS). Svaka aminoacil-tRNA-sintetaza specifična je za određenu aminokiselinu i jednu ili više odgovarajućih tRNA.

U drugoj fazi, inicijaciji, mRNA se veže za manju ribosomalnu podjedinicu i inicijacijsku aminoacil-tRNA. Nakon toga formira se „inicijacijski kompleks“, vezanjem veće ribosomalne podjedinice. Inicijacijska aminoacil-tRNA sparuje se s AUG kodonom u mRNA koji signalizira početak polipeptida.

Za vrijeme treće faze, elongacije, nascentni polipeptid se produljuje kovalentnim vezanjem sljedećih aminokiselina određenih kodonima u mRNA.

U četvrtoj fazi, terminaciji i otpuštanju, terminacijski kodon u mRNA signalizira otpuštanje polipeptida s ribosoma.

Kako bi postigao biološki aktivnu formu, u finalnoj, petoj fazi, novi polipeptid mora se pravilno smotati u odgovarajuću trodimenzionalnu strukturu. Također, ovaj polipeptid prolazi određene promjene koje uključuju odstranjivanje nekih aminokiselina, proteolitičko cijepanje te dodavanja manjih organskih skupina, oligosaharida ili prostetičkih grupa (12).

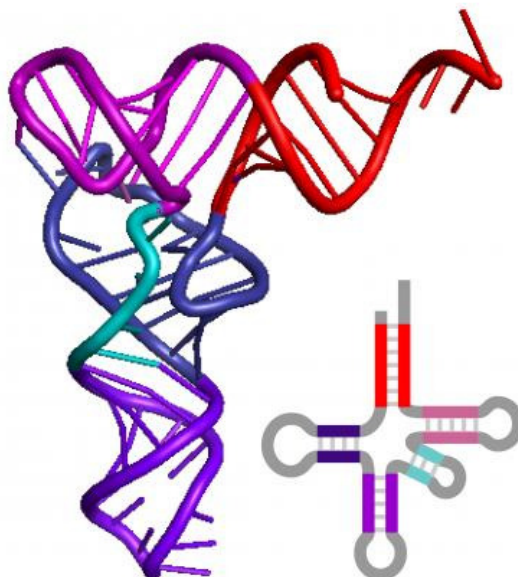
Aktivacija aminokiselina je kritičan korak jer dolazi do vezivanja tRNA s odgovarajućom aminokiselinom što je važno za umetanje točne aminokiseline u polipeptid na mjestu gdje je ta informacija kodirana u mRNA. U aminoacil-tRNA je karboksilna skupina aminokiseline esterskom vezom povezana s 2'- ili 3'-hidroksilnom skupinom riboze na 3' kraju tRNA. Ovako aktivirane karboksilne skupine spremne su za formiranje peptidnih veza (13).

1.2.1. Građa tRNA

Molekule tRNA su prilično male i sastoje se od jednolančane RNA smotane u preciznu trodimenzionalnu strukturu u obliku slova L. Bakterijske i eukariotske citosolne tRNA građene su od 73-93 ribonukleotida, dok su mitohondrijske i kloroplastne tRNA nešto manje. Stanice imaju

najmanje jednu vrstu tRNA za svaku aminokiselinu. Za prepoznavanje svih kodona potrebno je najmanje 32 vrste tRNA jer neke prepoznaju više od jednog kodona. Sve tRNA imaju sekundarnu strukturu u kojoj je polovica nukleotida sparena i tvori dvostruku uzvojniju - tzv. struktura *lista djeteline*. Baze koje nisu sparene formiraju 5 karakterističnih struktura:

- 3' CCA kraj, jednolančana regija koja je dio *akceptorske peteljke*, na koju se veže aminokiselina
- *peteljka T ψ C*, koja sadrži sekvencu ribotimin-pseudouracil-citozin
- *varijabilna omča*, koja sadrži varijabilan broj nukleotida
- *antikodonska petlja*, koja se nalazi u sredini sekvence
- *petlja DHU*, koja sadrži nekoliko dihidrouridinskih ostataka.

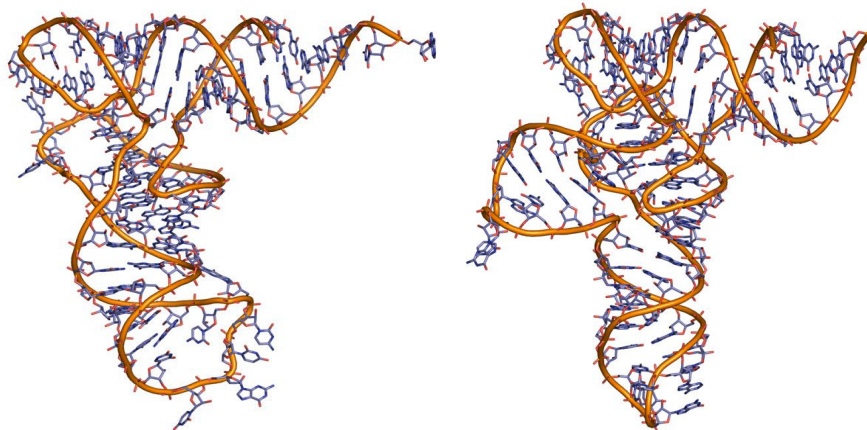


Slika 1.1. Tercijarna i sekundarna struktura tRNA. Crveno-akceptorska peteljka; ružičasto-peteljka T ψ C; svijetlo plavo-varijabilna omča; ljubičasto-antikodonska petlja; tamno plavo-petlja DHU.

Molekule tRNA sadrže mnoge modificirane derivate adenoizina, gvanina, citozina i uracila. 5' kraj tRNA je fosforiliran, obično se radi o pG. Trodimenzionalnu strukturu tRNA oblika obrnutog slova L čine dvije domene postavljene pod kutem od 90°: jednu domenu čine akceptorska peteljka i T ψ C peteljka (interagira s aktivnim mjestom pripadajuće aminoacil-tRNA-sintetaze), a drugu DHU-petlja i antikodonska petlja (sudjeluje u elongaciji polipeptida na ribosomu) (14).

Molekule tRNA dijele se u dva razreda s obzirom na duljinu varijabilne ruke. One sa kratkom varijabilnom rukom duljine 4-5 nukleotida spadaju u 1. razred, dok 2. razred čine ostale čija

varijabilna ruka sadrži 10-24 nukleotida (15). tRNA drugog razreda kod bakterija i organela čine tri izoakceptorske obitelji (tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu} i tRNA^{Tyr}), dok su kod eukariota prisutne samo svije (tRNA^{Ser} i tRNA^{Leu}). aaRS prepoznaju pripadne tRNA preko antikodonskih petlji te drugih identitetnih elemenata strukture tRNA, pri čemu je prepoznavanje kod prokariota više strogo i ovisno o tercijarnoj strukturi, dok je kod eukariota ovisno o nukleotidnom slijedu (16).

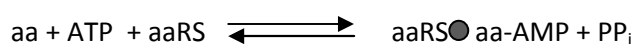


Slika 1.2. Lijevo - tRNA razreda I; desno - tRNA razreda II. Uočljiva je znatno dulja varijabilna ruka kod tRNA tipa II.

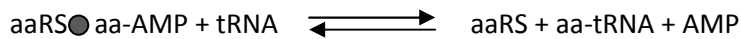
1.2.2. Reakcija aminoacilacije

Reakcija aminoacilacije tRNA koju provode aminoacil-tRNA-sintetaze odvija se u dva koraka:

1. stvaranje aminoacil-adenilata iz aminokiseline i ATP-a (karboksilna grupa aminokiseline se veže na α -fosfat ATP-a):



2. transfer aminoacilne grupe sa aminoacil-AMP-a na odgovarajuću molekulu tRNA:



Nakon prvog koraka ne dolazi do disocijacije aa-AMP sa sintetaze, on je čvrsto vezan u aktivnom mjestu nekovalentnim interakcijama tako da oba koraka provodi ista aminoacil-tRNA-sintetaza. Jednom kad se sintetiziraju, aminoacilirane tRNA molekule veže EF-1A (kod arheja ili eukariota) tj. EF-Tu (kod bakterija) u kompleksu s GTP-om i prenosi ih na ribosom tijekom sinteze proteina (17).

Cilj aminoacilacije tRNA je aktivacija aminokiseline za formiranje peptidne veze i vezanje aminokiseline na odgovarajuću tRNA kako bi se pravilna aminokiselina ugradila u rastući polipeptidni lanac.

Kako se identitet aminokiseline ne provjerava na ribosomu prije ugradnje u polipeptidni lanac, točno vezanje aminokiseline na pripadajuću tRNA je ključno za vjernost sinteze proteina.

Ovisno o mehanizmu kojim izvode drugi korak, te na razlike u primarnoj i tercijarnoj strukturi enzima, aminoacil-tRNA-sintetaze se dijele na dva razreda.

1.2.3. Klasifikacija aminoacil-tRNA-sintetaza

Aminoacil-tRNA sintetaze dijelimo u dva razreda, svaki od kojih čini obitelj homolognih enzima (18). Svaki razred čini 10 aaRS, a razlikuju se po tome što prilaze tRNA s različitih strana akceptorskih peteljki. Pripadnici razreda I prilaze malom utoru dvostruke uzvojnice peteljke, približavaju se samim bazama, dok pripadnici razreda II prilaze velikom utoru peteljke, interagirajući sa izloženim stranama nukleotida. Sukladno tome, pripadnici razreda I aminoaciliraju terminalni adenzin tRNA na 2' poziciji riboze, dok pripadnici razreda II to čine na poziciji 3' riboze (19).

Ispitivanjem sekundarne i tercijarne strukture dvaju razreda otkriveno je da katalitičku domenu aaRS razreda I karakterizira Rossmannov nabor (nukleotid vezujuća regija načinjena od 4 α uzvojnice i lista od 6 paralelnih β lanaca) i prisutnost dva motiva: HIGH (His-Ile-Gly-His) i KMSKS (Lys-Met-Ser-Lys-Ser). Kod aaRS razreda II tu domenu čini niz antiparalelnih β -ploča koje okružuju α -uzvojnice i

predstavljaju 3 specifična konzervirana motiva: motiv I, II i III. Motiv I sudjeluje u dimerizaciji (većina aaRS razreda II čine homodimere), dok motivi II i III čine aktivno mjesto (20).

Osim u strukturnim razlikama i stereokemiji vezanja tRNA, aaRS se razlikuju i u načinu vezanja ATP-a. U aktivnom mjestu sintetaza razreda I molekula ATP-a je rigidna i ravna, dok je u aktivnom mjestu razreda II više zavijena i kompaktna (21).

Osim podjele na razrede, postoji i podjela na podrazrede, s obzirom na homologiju tRNA-veznih domena i tipu aminokiseline koji vežu na pripadajuće tRNA.

razred I		razred II	
Ia	ValRS LeuRS IleRS CysRS MetRS	Ila	GlyRS ThrRS AlaRS ProRS HisRS
Ib	GluRS GlnRS ArgRS LysRS(I)	Ilb	SerRS AspRS AsnRS LysRS(II)
Ic	TyrRS TrpRS	Ilc	PheRS

Tablica 1. Klasifikacija aminoacil-tRNA-sintetaza

Pripadnost aaRS za određenu aminokiselinu jednom od razreda je gotovo potpuno konzervirano u svim vrstama, što ukazuje na drevnost ove dihotomije. Jedine iznimke ovog pravila su LysRS I i II.

1.2.4. Popravak grešaka pri aminoaciliranju (engl. *proofreading*)

Kako je točnost aminoacilacije od kritične važnosti za točnost prevođenja genetskog koda, većina aminoacil-tRNA-sintetaza uz acilacijska ima i editirajuća mjesta koja im omogućuju da hidroliziraju krivo aminoacilirane tRNA i tako učestalost pogreške smanje na jednu grešku u 10^4 reakcija (22).

S obzirom da se reakcija aminoacilacije odvija u dva koraka, ispravljanje greške se može postići i na razini aminoacil-adenilata (pri čemu se krivo formirani aminoacil-adenilat hidrolizira u reakciji ovisnoj o ATP-u) kao i na razini aminoacil-tRNA (krivo aminoacilirana tRNA se deacilira u reakciji neovisnoj o ATP-u).

Acilacijska i editirajuća mjesta funkcioniraju po principu „dvostrukog sita“ kako bi osigurala visoku razinu preciznosti. Acilacijsko mjesto predstavlja tzv. „grubo sito“ jer u njega ne mogu dospjeti aminokiseline koje su veće od prave, a hidrolitičko mjesto (tzv. „fino sito“) odstranjuje produkte koji sadrže aminokiselinu koja je manja od one prave (23). Kako je tRNA veći supstrat pa stoga i sadrži više specifičnih elemenata preko kojih je aaRS može prepoznati, za razliku od aminokiselina koje su puno manje, tako pri aminoaciliranju aaRS rade više grešaka pri odabiru odgovarajuće aminokiseline nego pri odabiru tRNA (24). TyrRS (tirozil-tRNA-sintetaza) veže tirozin 10^4 puta snažnije od fenilalanina zbog hidroksilne skupine prisutne u tirozinskom prstenu, pa ona nema editirajuće mjesto. Stoga, editirajuća mjesta su očito bila odabrana evolucijski, onda kada je bilo potrebno povećati vjernost aminoacilacije (25).

1.2.5. Sinteza aminoacil-tRNA kod arheja

Domena *Archaea* dosada je pokazala najviše odstupanja i razlika od kanonskog (*E. coli*) modela sinteze aminoacil-tRNA. Sekvenciranje prvog arehealnog genoma, *Methanococcus janaschii* (26) pokazalo je odsutnost četiri aminoacil-tRNA-sintetaze: AsnRS, GlnRS, LysRS i CysRS.

Kasnije je otkriveno da funkciju AsnRS i GlnRS obavljaju AspRS i GluRS (27), misacilirajući tRNA^{Asn} i tRNA^{Gln} aspartatom i glutamatom, tako da nastaju Asp-tRNA^{Asn} i Glu-tRNA^{Gln}. Nakon ove misacilacije slijedi transamidacijski korak u kojem se Asp-tRNA^{Asn} pretvara u Asn-tRNA^{Asn}, odnosno Glu-tRNA^{Gln} u Gln-tRNA^{Gln} uz pomoć enzima amidotransferaza (asparagil-amidotransferaze, Asp-AdT i glutamil-amidotransferaze, Glu-AdT) (28).

Prisutnost enzima koji aminoacilira Lys-tRNA je utvrđena eksperimentalnim putem, te je nakon analize ovaj protein pokazao sve karakteristike prvog razreda (29). Ovo otkriće bilo je vrlo iznenađujuće jer su sve do tad poznate LysRS pripadale razredu II, te su one dobar primjer funkcionalne konvergencije dvaju divergentnih enzima. Daljnjim istraživanjem, prisutnost LysRS razreda I je utvrđena u većini arheja, nekim bakterijama, ali ne i eukariotima (30).

CysRS prisutna u mnogih arheja slični svojim bakterijskim homolozima. Iznimke su tri metanogene arheje (*Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanothermobacter thermautotrophicus* i *Methanopyrus kandleri*) kod kojih tu funkciju vrši ProRS, kasnije preimenovan u ProCysRS. Točan mehanizam ove reakcije još nije utvrđen, ali je sigurno da ProCysRS misacilira tRNA^{Pro} cisteinom te da nema sposobnost hidrolize takve misacilirane Cys-tRNA^{Pro} (31). Formiranje same Cys-tRNA^{Cys} se događa pod nadzorom O-fosfoseril-tRNA-sintaze koja formira O-fosfoserin-tRNA^{Cys} (Sep-tRNA^{Cys}), nakon čega je enzim Sep-tRNA:Cys-tRNA sintaza pretvara u Cys-tRNA^{Cys} (32).

1.2.6. Evolucija aminoacil-tRNA-sintetaza

S obzirom na istu aminoacilacijsku reakciju koje sve aaRS kataliziraju, u početku je bilo uvriježeno mišljenje da svih 20 enzima čine jednu obitelj koja je divergirala iz zajedničkog ancestralnog tipa enzima. S detaljnijim istraživanjem strukture, postala je očita podjela na dva odvojena razreda, svaki od kojih je imao potpuno drugačiju strukturu katalitičkog mjesta i drugačiji mehanizam vezanja tRNA. Pretpostavlja se da je do ove dihotomije došlo tako što je sinteza proteina počela u sustavu koji je izgrađivala samo RNA u kojem je aminokiseline na tRNA vezala ne-proteinska RNA molekula. Postupno, komponente ovog primitivnog sistema zamijenjene su proteinima za koje su kodirali njihovi proizvođači. Ovakav scenarij podržava razvoj više od jednog sustava aminoaciliranja i evoluciju razreda iz dvije ili više početnih linija (33).

Proučavajući sljedove DNA za aaRS (pa tako i za sve proteine) očekuje se da oni odražavaju očekivanu biološku vezu utemeljenu na sličnosti slijedova ribosomalne RNA - bakterijski proteini jedne vrste trebali bi biti najviše nalik proteinima ostalih bakterijskih vrsta, eukariotski bi trebali najviše sličiti proteinima iz ostalih eukariota, a arhealni proteinima iz drugih arheja. Međutim, u mnogim slučajevima ova očekivanja se nisu pokazala točnima, a nisu ih podržala ni filogenetska stabla. Slijedovi mnogih bakterijskih aaRS izgledaju sličnije eukariotskima što upućuje na horizontalni transfer gena, vrlo čest kod ovih enzima.

Osim horizontalnog transfera gena, drugo objašnjenje za ovakve evolucijske anomalije je moguća duplikacija gena nakon koje je slijedio diferencijalni gubitak jednog od izoenzima u različitim razvojnim linijama organizama. Tome svjedoči činjenica da neki organizmi imaju i više od jednog gena za pojedinu aaRS. Tako *E.coli* ima dvije LysRS čiji su slijedovi 89% slični i najvjerojatnije su nastali duplikacijom gena (34). *Bacillus subtilis* ima dvije ThrRS (35) i dvije TyrRS (36). Slijedovi ThrRS su 54% identični što upućuje na to da se duplikacija ovog gena dogodila davno u prošlosti. Geni za TyrRS su samo 24% identični, a ostale bakterije imaju samo jedan od ova dva tipa enzima.

S obzirom na univerzalnu potrebu organizama za aminoacil-tRNA-sintetazama koje su, očekivano, i visoko konzervirane, njihove studije su iznimno bitne za rasvjetljavanje evolucijske prošlosti i saznanja o porijeklu života.

1.2.7. Seril-tRNA-sintetaze

Seril-tRNA-sintetaze su grupa aminoacil-tRNA-sintetaza koje aminoaciliraju izoakceptorske tRNA^{Ser} serinom. Spadaju u razred II i obično u stanicama dolaze kao homodimeri. S obzirom da postoji 6 kodona za serin, izoakceptorske tRNA^{Ser} postoje u verzijama sa 4 različita antikodona. Ova činjenica onemogućava prepoznavanje tih tRNA od strane SerRS preko antikodonske petlje, jer njena varijabilnost ne dopušta dovoljno precizno prepoznavanje supstrata. Stoga SerRS uspostavljaju kontakt s drugim determinantama, točnije dugim varijabilnim rukama tRNA^{Ser} koje su zajednička karakteristika cijeloj izoakceptorskoj obitelji ovih molekula tRNA (15).

Osim tRNA^{Ser}, SerRS veže i aminoacilira serinom supresorsku selenocisteinsku tRNA^{Sec}. Ove tRNA slične su serinskima, ali sadrže dodatni par baza u akceptorskoj peteljci i nešto dužu varijabilnu ruku. Antikodonska petlja komplementarna je antikodonu UGA. Ovako aminoacilirna Ser-tRNA^{Sec} prevodi se u Sec-tRNA^{Sec} djelovanjem selenocistein-sintaze i selenofosfat-sintaze (37). Na ovaj način, indirektno, SerRS sudjeluje u ugradnji 21. aminokiseline, selenocisteina, u proteine.

Osim toga, pokazano je da atipične SerRS iz *Methanococcus janaschii* i *M. maripaludis*, osim homolognih tRNA^{Ser} i tRNA^{Sec} prepoznaju i bakterijske i eukariotske tRNA^{Ser} (16). Ova fleksibilnost prepoznavanja tRNA ukazuje na određenu razinu očuvanosti identitetnih elemenata tRNA^{Ser} u sve tri domene života.

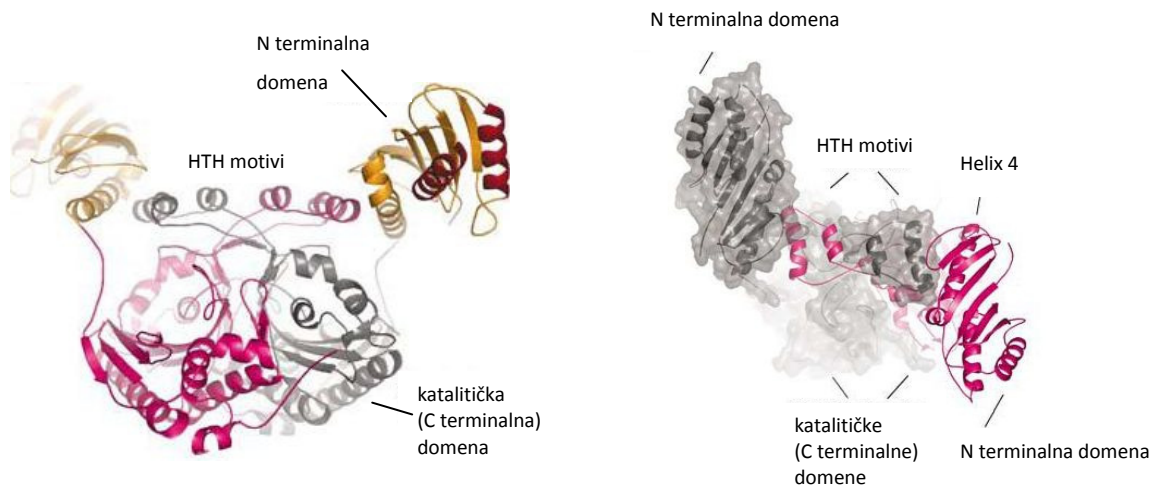
Svaki monomer SerRS iz *E.coli* sastoji se od dvije domene. N-terminalna domena sudjeluje u prepoznavanju i vezanju tRNA, dok ostatak molekule formira aktivno mjesto koje sadrži motiv I, II i III, karakteristične za aaRS razreda II (38).

Nakon sekvenciranja genoma *M. janaschii* uočena je neobična, atipična SerRS prisutna u toj arheji, čime je uspostavljena podjela na SerRS bakterijskog tipa prisutna u eukariotima, bakterijama i arhejama i atipične SerRS metanogenog tipa koje postoje u metanogenim arhejama. U usporedbi sa SerRS iz *E.coli*, metanogeni tip enzima je veći u području N domene koja veže tRNA i imaju kraći motiv II koji služi za prepoznavanje aminokiseline. Ovi podaci daju naslutiti da atipične SerRS imaju drugačije vezno mjesto za tRNA te da prepoznaju serin različitim mehanizmima (39).

To je i dokazano, na SerRS iz *Methanosarcine barkeri* čija je struktura proučavana X-kristalografijom, te je ustanovljeno da posjeduje karakteristično aktivno mjesto s atomom cinka. Ovakav mehanizam prepoznavanja serina do tada nije bio ustanovljen i predstavio je seril-tRNA-sintetaze kao jedinu porodicu enzima sa dva potpuno različita mehanizma prepoznavanja aminokiseline.

Organizacija ukupne strukture SerRS iz *M.barkeri* analogna je onoj u *E.coli*: enzim je homodimer, a svaka monomerna podjedinica posjeduje N-terminalnu i katalitičku, C-terminalnu domenu. Međutim struktura ovih domena je potpuno drugačija. N-terminalna domena je znatno veća i sastavljena je od antiparalelnog šesterolančanog β -lista okruženog s tri uzvojnice (H1, H2 i H4). C-terminalna domena je kao i kod ostalih SerRS načinjena od osmolančanog β -lista okruženog s dva heliksa, međutim samo aktivno mjesto je bitno drugačije od aktivnih mjesta ostalih poznatih SerRS i sadrži atom cinka.

Uz razlike u građi aktivnog mjesta i N-terminalne domene koja veže tRNA, ustanovljene su i razlike u još nekoliko strukturnih elemenata: petlja (eng. *loop*) motiva II je kraća kod metanogenog tipa enzima, a također postoji i insercija od 30-ak aminokiselina (motiv *helix-turn-helix*, HTH) između motiva I i II koji je u kontaktu sa srži i N-terminalnom domenom druge podjedinice homodimera. Ova interakcija ispreplitanjem uzvojnica drži dvije srži enzima zajedno, te prezentira svoju nabijenu površinu H4 uzvojnici N-terminalne domene, zbog čega se između njih formiraju brojni ionski mostovi (engl. *salt bridges*). Usporedba sekvenci s drugim SerRS implicira postojanje ovakvih HTH motiva u svim SerRS metanogenog tipa, pa je moguće da ovaj motiv ima veliku važnost u interakcijama dvaju domena (40), što je istraživano i u ovom radu.



Slika 1.3. Struktura metanogenog tipa SerRS iz *Methanosarcine barkeri* (vrpčani dijagram). Lijevo je prikazana ukupna struktura, a desno pogled uz dvostruku os proteina (jedan monomer je prikazan prozirno). Monomeri su prikazani sivo i ružičasto. Vidi se odnos C terminalnih domena, HTH motiva i N terminalnih domena. Preuzeto iz Bilokapic 2006.

1.2.8. Interakcije aminoacil-tRNA-sintetaza s drugim proteinima

Osim što su esencijalne za vezanje aminokiselina na pripadajuće molekule tRNA, aminoacil-tRNA-sintetaze često se udružuju u komplekse višeg reda sa mnogim proteinima čija funkcija ne mora biti povezana s translacijom. Kompleksi više proteina u kojima se nalaze i aaRS pronađeni su u sve tri domene života gdje imaju važnu ulogu u mnogim procesima.

Eukariotske aaRS se od arhealnih i bakterijskih razlikuju po tome što imaju dodatne domene pridružene C ili N krajevima. Ovi privjesci nemaju katalitičku ulogu i služe im za uspostavljanje protein:protein interakcija ili kao opće RNA-vezne domene.

Usprkos tome što su mnogi ovakvi multiproteinski kompleksi prvo opisani u eukariotskim stanicama, sve ih se više opisuje kako u arhejama tako i u bakterijama (41).

U bakterijama ovi kompleksi su uglavnom binarni i sudjeluju u procesima usko vezanim uz translaciju (obrada aminoaciliranih tRNA):

- prolil-tRNA-sintetaza (ProRS) i protein YbaK
ProRS je poznata po misaciliranju tRNA^{Pro} s alaninom i cisteinom (53). Ustanovljeno je da editirajuća domena ProRS može hidolizirati Ala-tRNA^{Pro} ali ne i Cys-tRNA^{Pro}. Da bi nadoknadila ovaj nedostatak, ProRS interagira s proteinom YbaK koji je samostalni homolog editirajuće domene ProRS. YbaK u kompleksu s ProRS hidrolizira tRNA^{Pro} ali i sprječava nastanak novih misaciliranih tRNA (54).
- aspartil-tRNA-sintetaza (AspRS) i amidotransferaza (transamidom)
Asn-tRNA^{Asn} u bakterijama se sintetizira u dva koraka. Prvo AspRS misacilira tRNA^{Asn} s aspartatom, nakon čega se misaciliranu Asp-tRNA^{Asn} veže GatCAB amidotransferaza (55). Ovaj enzim pretvara aspartat na misaciliranoj tRNA^{Asn} u asparagin, te tako nastaje Asn-tRNA^{Asn}. Moguće je i da je interakcija između sintetaze i amidotransferaze nužna i za olakšani prijenos misaciliranog tRNA intermedijera od sintetaze do amidotranferaze čime se sprečava spontana hidroliza u citoplazmi (41).
- triptofanil-tRNA-sintetaza (TrpRS) i dušikov-oksidsintetaza (NOS)
Deinococcus radiodurans, bakterija vrlo otporna na zračenje, posjeduje dvije TrpRS, I i II. TrpRS II karakterizira N-terminalni produžetak koji služi za uspostavljanje interakcije s NOS (56). U kompleksu sa tRNA^{Trp} i TrpRS, NOS katalizira specifičnu nitraciju triptofana koristeći amino skupinu arginina. Pri tome nastaje 4-nitro-triptofan za kojeg se smatra da kontrolira sintezu drugih metabolita pri radijacijskim oštećenjima (57).

Kod arheja i eukariota kompleksi su višekomponentnim i često posjeduju širi spektar funkcija. Tako su u kvascu pronađeni sljedeći kompleksi:

- glutamil-tRNA-sintetaza (GluRS), protein Arc1p i metionil-tRNA sintetaza (MetRS)
GluRS i MetRS interagiraju preko svojih N terminalnih domena s proteinom Arc1p za koji se smatra da je pomoćni protein koji stabilizira kompleks i djeluje kao protein koji vezuje tRNA. Tako olakšava vezanje pripadnih molekula tRNA (tRNA^{Glu} i tRNA^{Met}) na GluRS i MetRS te povećava njihovu katalitičku efikasnost (58).
- seril-tRNA-sintetaza i Pex21p
SerRS interagira s proteinom Pex21p koji je uključen u biosintezu peroksisoma (organeli u kojima se odvija β-oksidacija masnih kiselina). Smatra se da se ovom interakcijom induciraju

konformacijske promjene u SerRS koje pospešuju vezanje pripadne tRNA (59). Ova interakcija ukazuje na povezanost translacije i biosinteze peroksisoma, pa je moguće i da sudjeluje u regulaciji nekih signala stresa u stanici (59).

- tirozil-tRNA-sintetaza (TyrRS) i protein Knr4

Za protein Knr4 poznato je da je uključen u sintezu stanične stijenke. Prilikom sporulacije kvasca uočena je povezanost ekspresije gena za TyrRS s ekspresijom gena za Knr4. Pretpostavlja se da bi uloga ove interakcije mogla biti poboljšanje formiranja ditirozina, koji je neophodna komponenta vanjskog sloja stijenke spora (60).

U stanicama sisavaca zasad su pronađena 2 multisintetazna kompleksa:

- valil-tRNA-sintetaza (ValRS) i elongacijski faktor EF-1H

Za elongacijski faktor EF-1A poznato je da prenosi aa-tRNA na ribosom na kojem se odvija sinteza polipeptida. EF-1A s EF-1B formira veći elongacijski faktor, EF-1H. ValRS interagira s EF-1H svojom N terminalnom domenom, a pokazalo se da ova interakcija poboljšava katalitičku aktivnost ValRS (10). S obzirom na funkciju EF-1A, smatra se da je uloga ovog kompleksa olakšavanje prijenosa aa-tRNA od aaRS na ribosom (41).

- multisintetazni kompleks u stanicama sisavaca (MARS)

Najveći multisintetazni kompleks (1,4 MDa) nalazimo u stanicama sisavaca, a ima funkciju 9 aminoacil-tRNA sintetaza (LeuRS, LysRS, ProRS, IleRS, MetRS, GluRS, GlnRS, ArgRS i AspRS). Ovaj kompleks stabiliziraju tri proteina (p38, p43 i p18) koji uz to i vežu tRNA (42). Može se uočiti da ovaj kompleks čine aaRS uključene koje vežu nabijene, hidrofobne i nearomatske aminokiseline na pripadne molekule tRNA (61). Postoji mogućnost da su u ovom kompleksu *in vivo* nalaze sve aaRS manje snažno vezane na njega, a da ove interakcije nisu detektirane zbog eksperimentalnih uvjeta koji narušavaju ovakve slabe interakcije (41).

Kod arheja su zasad utvrđena dva kompleksa:

- prolil-tRNA-sintetaza i metabolički protein Mj1338 u *Methanococcus janaschii*

Za Mj1338 se predviđa da je uključen u metabolizam ugljika u arhejama (43) i općenito ima afinitet za tRNA. S njim neovisno interagiraju i LysRS i AspRS, ali kompleks višeg reda

sastavljen od ovih proteina nije utvrđen. Funkcija kompleksa ProRS:Mj1338 još uvijek nije poznata.

- lizil-tRNA-sintetaza : leucil-tRNA-sintetaza : prolil-tRNA-sintetaza

Ovaj multisintetazni kompleks utvrđen je u *Methanothermobacter thermoautotrophicus*-u pretragom biblioteke cDNA ovog organizma metodom dvaju hibrida sa LysRS i ProRS kao proteinima mamcima (44). U prisutnosti LeuRS, katalitička efikasnost LysRS poraste tri, a ProRS pet puta od razine koja je prisutna kada su enzimi „sami“ (45). Stoga se nameće moguća uloga ovog kompleksa: poboljšanje aminoacilacije Lys- i Pro-tRNA. Sintetaze koje čine ovaj kompleks također su dio multisintetaznog kompleksa utvrđenog u sisavcima.

- leucil-tRNA-sintetaza i EF-1A (elongacijski faktor koji specifično veže aa-tRNA i odvodi ih do ribosoma)

U kompleksu s EF-1A aktivnost LeuRS se povećava tri puta, dok se aktivnost EF-1A ne mijenja značajno. Postoji sumnja da EF-1A *in vivo* u *M. thermoautotrophicus*-u asocira sa LysRS, LeuRS i ProRS, vjerojatno upravo preko LeuRS. Stoga se na LysRS:LeuRS:ProRS i LeuRS:Ef-1A gleda kao na jedan makrokompleks (46).

Rezultatima prikazanim u ovom radu utvrđen je i treći, kompleks između seril-tRNA-sintetaze i arginil-tRNA-sintetaze u *M. thermoautotrophicus*.

Funkcije ovakvih kompleksa su vrlo raznolike i variraju od poboljšanja aminoacilacije, ispravka greške kod aminoaciliranja, usmjeravanja supstrata (engl. *substrate channeling*), utišavanja translacije (engl. *translational silencing*), izrezivanja introna, pa čak do sastavljanja virusnih čestica, antiapoptoze i citokina (41).

Poznato je da bifunkcionalna GluProRS sudjeluje u utišavanju translacije ceruloplazmina (proteina povezanog s odgovorom na upalnu reakciju). Kao odgovor na IFN- γ , GluProRS se fosforilira, odvaja od multisintetaznog kompleksa i s još 3 proteina formira tzv. GIAT kompleks (*IFN- γ activated inhibitor of translation*). GIAT se tzv. *linker* regijom koja se nalazi u GluProRS veže za dio 3'-UTR (*3'-untranslated region*) ceruloplazminske mRNA i na taj način inhibira translaciju (62).

Isto tako, LysRS je povezana sa sastavljanjem virusnih čestica HIV-a tipa 1. Ovaj retrovirus ulazi u stanicu domaćina gdje reverznom transkriptazom prepisuje svoj RNA genom u DNA. Inicijacija reverzne transkripcije ovisi o tRNA^{Lys} koja se također pakira u virusne čestice HIV-1. Ova tRNA služi kao početnica reverznoj transkriptazi tako što se veže blizu 5' kraja genomske RNA HIV-a 1 (63). Osim

tRNA^{Lys}, u virusne čestice HIV-1 pakira se i LysRS, tako da uspostavlja kontakt s prekursorskim proteinom Gag koji sudjeluje u slaganju virusnih čestica (64). LysRS potpomaže ugradnju tRNA^{Lys} u virusne čestice (65).

1.3. Sustav dvaju hibrida

Sustav dvaju hibrida jedan je od najbitnijih genetičkih alata za studiranje makromolekularnih interakcija koje su osnovni preduvjet za postojanje živih sustava.

Transkripcijski faktori su regulatorni proteini koji se vežu za specifične sekvence DNA (najčešće u promotorskim regijama gena) i interagiraju s RNA-polimerazom te na taj način kontroliraju ekspresiju određenih gena. Njihov afinitet za ove specifične regije DNA je 10^4 do 10^6 puta veći od afiniteta prema ostalim dijelovima DNA. Većina regulatornih proteina ima diskretne DNA-vezujuće domene (engl. *DNA-binding domain*, BD) koje sadrže karakteristične motive koji interagiraju isključivo s DNA. Ovakvo precizno prepoznavanje omogućuju kemijske grupe koje posjeduju 4 baze, a ponašaju se kao donori i akceptori vodikove veze u velikom utoru DNA. Osim DNA-vezujuće domene, ovi proteini sadrže i aktivacijsku domenu (engl. *activation domain*, AD) koja aktivira transkripciju na način da promovira regrutaciju, vezanje i sastavljanje kompleksa između općih transkripcijskih faktora (npr. TFIID, TFIIB i TFIIE) i RNA polimeraze na promotoru. Aktivacijske domene također imaju specifične regije s obzirom na čiji karakter se dijele na kisele, one bogate glutaminom i one bogate prolinom. Svoju funkciju transkripcijski faktori obavljaju u kompleksu s mnogim drugim proteinima čineći transkripcijski mjehurić, omogućavajući ili onemogućavajući regrutaciju RNA-polimeraze (47).

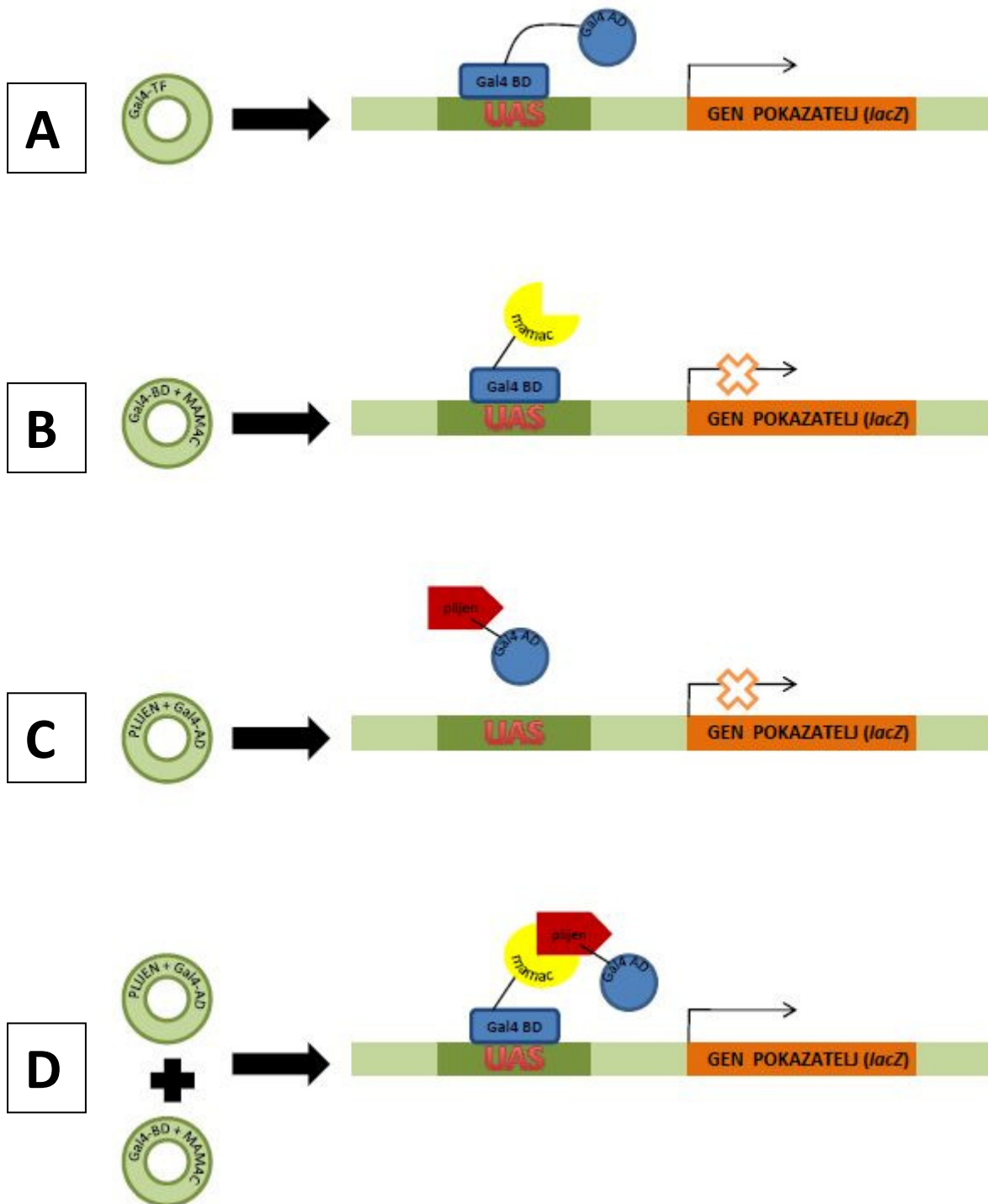
Temeljni sastavni dijelovi promotora kvasaca su UAS (uzvodne aktivirajuće sekvence, engl. *upstream activating sequences*) i TATA regije. Ispred strukturnih gena u kvascu nalazi se visoko konzervirana sekvenca TATA koja određuje mjesto početka transkripcije (nalazi se 25pb uzvodno od njega) i također je primarni faktor koji određuje bazalnu razinu transkripcije. Mnogi geni su povezani i sa *cis*-djelujućim elementima (sekvence DNA na koje se vežu transkripcijski faktori i ostali regulatorni proteini i utječu na nivo transkripcije). Za razliku od regulacije gena kod višestaničnih eukariota, gdje se *cis* regulatorni elementi nalaze daleko uzvodno ili nizvodno od promotora koje reguliraju, kod regulacije gena u kvasaca, *cis* regulatorni elementi se nalaze vrlo blizu slijeda TATA. Jedan tip *cis*-djelujućeg transkripcijskog elementa je u kvascu je UAS koje prepoznaju određeni transkripcijski faktori i pojačavaju transkripciju sa susjednih nizvodnih regija TATA. Kod kvasaca postoje različite

TATA kutije, a promotori se razlikuju i po njihovom broju. Također, one se mogu pomicati u blizinu drugih *cis* regulatornih elemenata i još uvijek zadržati svoju transkripcijsku funkciju. UAS sekvence su neovisne o orijentaciji ali su osjetljive na udaljenost od regije TATA. Također ih može biti više uzvodno od kodirajuće regije. Upravo ova svojstva kvaščevih TATA kutija i UAS sekvenci iskorištena su pri kreiranju novih promotora za gene pokazatelje. Najčešće se koriste *lacZ*, *HIS3*, *ADE2* i *LEU2* kao geni pokazatelji pod kontrolom umjetnih promotorskih konstrukata koje čine TATA i UAS sekvence iz drugih gena, dok je LexA operator *cis* regulatorni element izoliran iz *E. coli* (48).

Sustav dvaju hibrida je *in vivo* sustav u kvascu kojim možemo proučavati interakcije između dva proteina. Glavna pretpostavka ovog sustava je aktivacija nizvodnog reporter gena vezanjem transkripcijskog faktora na UAS, za što je odgovorna BD, a za aktivaciju transkripcije AD transkripcijskog faktora. Ove domene su modularne i mogu funkcionirati kada se nalaze u međusobnoj blizini bez da su direktno vezane. Dakle, kada se transkripcijski faktor razdijeli na dva fragmenta, BD i AD, on će i dalje moći aktivirati transkripciju ako su ove domene indirektno povezane. Upravo ovo svojstvo transkripcijskih faktora je iskorišteno kod sustava dvaju hibrida. Proteini čije interakcije želimo proučavati mogu se fuzionirati na BD i AD, te ako interakcija postoji, funkcionalni transkripcijski faktor će uzrokovati transkripciju gena pokazatelja.

Prvi korak u ovoj metodi je konstruiranje hibridnog proteina „mamca“ (engl. „*bait*“) koji sadrži jedan od proteina od interesa (X) i BD nekog transkripcijskog faktora, te drugog hibridnog proteina „plijena“ (engl. „*prey*“) koji uz drugi protein od interesa (Y) sadrži AD transkripcijskog faktora (49). Zbog njihove modularnosti i međusobne neovisnosti moguće je napraviti kimerne transkripcijske faktore koji normalno funkcioniraju *in trans*, tj. kombinirati DB jednog TF-a s AD drugog i dobiti očekivanu aktivnost.

Lažni pozitivivi su definirani kao klonovi koji sadrže DB-X i AD-Y koji induciraju transkripciju gena pokazatelja, ali pri čemu X i Y međusobno ne interagiraju, ili njihova intrakcija nije biološki značajna. Lažni pozitivivi u kojima DB-X ili AD-Y samoaktiviraju gene pokazatelje (npr. mutacije u X koje rezultiraju samoaktivacijom ili AD-Y klonovi koji aktiviraju transkripciju vežući se na promotore ili proteine već vezane na promotore) mogu se eliminirati ponovnim testiranjem AD-Y sa DB ili DB-X. Snažan dokaz za potvrdu interakcije X i Y je zamjena fuzija: konstruiranje DB-Y i AD-X. Određeni proteini, kao što su proteini sa slabim afinitetom za mnoge druge proteine (npr. proteini sa velikim hidrofobnim domenama) ili proteini koji prepoznaju određene regije drugih proteina (npr. šaperoni) mogu se također identificirati kao lažni pozitivivi. I neke kompleksnije strukture, kao one u kojima su X i Y premošteni trećim proteinom ili RNA, također mogu rezultirati nastankom lažnih pozitiviva.



Slika 1.4. Pregled metode dvaju hibrida u proučavanju interakcije između dva proteina, "mamca" i „plijena“. **A.** Transkripcijski faktor Gal4 sastoji se od dvije domene (BD i AD) ključne za transkripciju gena reportera (*lacZ*). **B,C.** Načinjena su 2 fuzijska proteina: Gal4BD+mamac i Gal4AD+plijen. Nijedan od njih sam nije dovoljan da potakne transkripciju reportera gena. **D.** Kada fuzijski proteini interagiraju, „mamca“ i „plijen“ također interagiraju, te dolazi do transkripcije gena reportera.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJALI

2.1.1. Standardne kemikalije

agar (*Difco*), agarozna (*Sigma*), akrilamid (*Sigma*), 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) (*Sigma*), ampicilin (*Boehringer Mannheim*), amonijev acetat (NH₄Ac) (*Kemika*), amonijev persulfat (APS) (*Serva*), 5-brom-4-klor-3-hidroksiindolil-β-galaktopiranozid (X-gal) (*Sigma*), N,N-dimetilformamid (DMF) (*Sigma*), ditioneitol (DTT) (*Sigma*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Sigma*), etanol (*Kemika*), fenol (*Kemika*), glicerol 100%-tni (*Merck*), D-glukoza (*Sigma*), imidazol (*Boehringer Mannheim*), kalcijev klorid (CaCl₂) (*Kemika*), kalijev acetat (KAc) (*Kemika*), kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄) (*Kemika*), kalijev klorid (KCl) (*Kemika*), kloroform (*Kemika*), 4-klor-1-naftol (*Kemika*), kloridna kiselina (HCl) (*Alkaloid*), litijev acetat (LiAc) (*Boehringer Mannheim*), litijev klorid (LiCl) (*Kemika*), magnezijev klorid (MgCl₂) (*Fluka*), magnezijev sulfat (MgSO₄) (*Sigma*), β-merkaptetoetanol (*Serva*), metanol (*Kemika*), N,N'-metilenbisakrilamid (*Merck*), natrijev acetat (NaAc) (*Kemika*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Merck*), natrijev hidrogenfosfat (Na₂HPO₄) (*Kemika*), natrijev hidroksid (NaOH) (*Kemika*), natrijev klorid (NaCl) (*Kemika*), Np40 (*US Biochemical*), octena kiselina (*Kemika*), polietilenglikol 4000 (PEG 4000) (*Sigma*), 1,4-bis[2-(4-metil-5-fenil)oksazolil]benzen, POPOP (*Kemika*), 2,5-difeniloksazol, srebrov nitrat (*Kemika*), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) (*Serva*), tiamin-hidroklorid (*Sigma*), Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (*Kemika*), triton-X (*Sigma*)

2.1.2. Reagencije

Aminokiseline, baze i nukleotidi

adenil-sulfat (*Sigma*), arginil-hidrogenklorid (*Sigma*), asparagin (*Sigma*), dATP, dCTP, dGTP, dTTP (*Boehringer Mannheim*), fenilalanin (*Sigma*), glicin (*Merck*), glutaminska kiselina (*Sigma*), histidil-klorid (*Sigma*), izoleucin (*Sigma*), leucin (*Sigma*), lizil-klorid (*Sigma*), metionin (*Sigma*), prolin (*Sigma*), serin (*Sigma*), D,L-serin-hidroksamat (*Sigma*), tirozin (*Sigma*), treonin (*Sigma*), triptofan (*Sigma*), uracil (*Sigma*), ukupna tRNA iz *S. cerevisiae* (*Boehringer Mannheim*), ukupna tRNA iz *E.coli*, valin (*Sigma*)

Boje

Bromfenol plava (Bromophenol Blue) (*Serva*)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Sigma*)
Etidijev bromid (*Boehringer Mannheim*)
Ponceau S (*Sigma*)
Ksilencijanil-fluorofosfat (Xylene Cyanol FF) (*Serva*)

Proteinski standardi

Low Range standards (*Merck*)
Broad range SDS-standards (*Bio-Rad*)
Prestained SDS-PAGE standards (*Bio-Rad*)

Enzimi s odgovarajućim puferima

*Nco*I (*NEB2*), *Xho*I (*NEB2*), *Nde*I (*NEB2*), *Hind*III (*NEB2*), *Eco*RI (*NEB3*), *Sma*I (*NEB3*), *Not*I (*NEB3*), *Pst*I (*NEB3*), *Bam*HI (*NEB4*), *Cla*I (*NEB4*)
DNA-polimeraza faga T4 s puferom
DNA-ligaza faga T4 s puferom
Taq DNA-polimeraza
Pfu-polimeraza s puferom (*Stratagene*)
RNaza
DNaza
lizozim

Proteini i nukleinske kiseline

albumin goveđeg seruma (*bovine serum albumine*, BSA) (*Sigma*)
DNA faga λ
DNA iz sperme lososa, SS-DNA (*Boehringer Mannheim*)

2.1.3. Pufferi i otopine

10X TBE puffer (Tris boratni puffer)

za 1000 ml:

Tris	108 g
borna kiselina	55 g
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	40 ml

1X TBS/Np40 puffer

za 1000 ml:

NaCl	8.766 g
TrisHCl 1M	10 ml
Np40	1 ml

10X PBS

za 1000 ml:

NaCl	80g
KCl	2g
Na ₂ HPO ₄	14.4g
KH ₂ PO ₄	2.4g

1X Z-puffer

za 1000 ml:

Na ₂ HPO ₄ bezvodni	4.25 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	3.1 g
KCl	0.375 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.123 g
β-merkaptotanol	2.7 ml/l

Puffer gela za sabijanje proteina u SDS-PAGE elektroforezi

TrisHCl	0.5 M (pH 6.8)
Glicin	0.192 M
SDS	0.1%

Puffer gela za razdvajanje proteina u SDS-PAGE elektroforezi

TrisHCl	1.5 M (pH 8.8)
SDS	0.4%

Pufer za SDS elektroforezu

TrisHCl	25 mM (pH 8.3)
Glicin	192 mM
SDS	0.1%

Otopina I. za izolaciju plazmidne DNA

Glukoza	50 mM
Tris HCl pH=8.0	25 mM
EDTA pH=8.0	10 mM

Otopina II. za izolaciju plazmidne DNA

NaOH	0,2M
SDS	1%

Otopina III. za izolaciju plazmidne DNA

5M NaAc	60 ml
Ledena octena kiselina	11,5 ml
Re voda	28,5 ml
Σ	100 ml

Otopina za bojanje SDS gela

<i>Coomassie brilliant blue</i>	10%
Metanol:octena kiselina:voda	3:1:6

Otopina za odbojavanje SDS gela

Octena kiselina	8%
Etanol	25%

Pufer za prijenos (pH 9.2) za Western (za 1L):

Tris	3.03 g
Glicin	14.4g
SDS	1g
Etanol	20%

Otopina za blokiranje proteina na nitroceluloznoj membrani:

Nemasno mlijeko u prahu 5% (5g u 100mL TBS, 0.1% Tween20)

Ponceau otopina

Ponceau boja	0.1%
Octena kiselina	5%

“Breaking buffer” za kvasce

1M TrisHCl pH 7,5	10 ml
NaCl 5 M	4 ml
Glicerol 87 %	23 ml
EDTA 0.5 M	100 µl
β-merkaptotanol 14 M	100 µl
PMSF 100 mM/200x	500 µl
Σ	100 ml

Puferi za pročišćavanje His₆-SerRS na Ni-NTA koloni:

Osnovni stockovi:

2M KCl	75 g KCl	do 500 mL ReH ₂ O
1M MgCl ₂	20,3 g MgCl ₂ X 6H ₂ O	do 100 mL ReH ₂ O
2M imidazol	13,6 g imidazol	do 100 mL ReH ₂ O
1M K ₂ HPO ₄	17,4 g	do 100 mL ReH ₂ O
1M KH ₂ PO ₄	13,6 g	do 100 mL ReH ₂ O
1M HEPES pH 7,0	23,83 g	do 100 mL ReH ₂ O

Pufer za nabijanje („Charge buffer“) NiSO₄ 4X (Novagen): 200 mM NiSO₄**PUFER za lizu A („Lysis buffer“)**

1M K ₂ HPO ₄	624 µL
1M KH ₂ PO ₄	630 µL
2M KCl	12,5 mL

1M MgCl ₂	250 µL
glicerol 10%	5 mL
2M imidazol	250 µL
PMSF	500 µL
β-merkaptoetanol	36 µL
ReH ₂ O	30,21 mL
Σ	50 mL

PUFER za ispiranje B („Wash buffer“)

1M K ₂ HPO ₄	125 µL
1M KH ₂ PO ₄	126 µL
2M KCl	2,5 mL
1M MgCl ₂	50 µL
glicerol 10%	1 mL
2M imidazol	250 µL
ReH ₂ O	5,949 mL
Σ	10 mL

PUFER C za 1. eluciju (Elution 1 buffer)

1M K ₂ HPO ₄	125 µL
1M KH ₂ PO ₄	126 µL
2M KCl	2,5 mL
1M MgCl ₂	50 µL
glicerol 10%	1 mL
2M imidazol	500 µL
ReH ₂ O	5,699 mL
Σ	10 mL

PUFER D za 2. eluciju (Elution 2 buffer)

1M K ₂ HPO ₄	125 µL
1M KH ₂ PO ₄	126 µL
2M KCl	2,5 mL
1M MgCl ₂	50 µL
glicerol 10%	1 mL
2M imidazol	2 mL
ReH ₂ O	4,199 mL
Σ	10 mL

Puferi za pročišćavanje GST-ArgRS:**pufer za lizu GST („binding buffer“) pH****6.8**

1M K ₂ HPO ₄	624 µL
1M KH ₂ PO ₄	630 µL
2M KCl	12,5 mL
1M MgCl ₂	250 µL
glicerol	5 mL
β-merkaptotetanol	36µL
PMSF	500 µL
ReH ₂ O	31 mL
Σ	50 mL

pufer za eluciju GST („elution buffer“) pH**6.8**

1M K ₂ HPO ₄	125 µL
1M KH ₂ PO ₄	126 µL
2M KCl	2,5mL
1M MgCl ₂	50 µL
glicerol	1 mL
0,163 M glutation	615 µL
ReH ₂ O	5,584 mL
Σ	10 mL

Puferi za GST-pulldown assay:**Pufer za vezanje („binding buffer“)**

1M HEPES	2,5 mL
2M KCl	3,75 mL
MgCl ₂	0,5 mL
ReH ₂ O	43,25 mL
Σ	50 mL

2.1.4. Hranidbene podloge i mediji

LB (Luria/Bretani) tekući medij:

glukoza	10 g/l
triptozni pepton	5g/l
NaCl	10g/l

Dodaci LB-mediju (konačne koncentracije): ampicilin (amp) 200mg/l

Hranjive podloge za uzgoj kvasaca

Kompletni medij za kvasce (YPAD):

ekstrakt kvasca	10 g/l
pepton	20 g/l
D-glukoza	20 g/l

Minimalni medij za kvasce s glukozom (SD-medij, engl. *“synthetic dropout”*):

D-glukoza	20 g/l
YNB (yeast nitrogen base)	6.7 g/l

Dodaci minimalnom mediju (*“dropout”* otopina):

adenil-sulfat	40 mg/l
arginil-klorid	20 mg/l
asparagin	100 mg/l
fenilalanin	50 mg/l
glutaminska kiselina	100 mg/l
histidil-klorid	20 mg/l
izoleucin	30 mg/l
leucin	100 mg/l
lizil-klorid	30 mg/l
metionin	200 mg/l

serin	3750 mg/l
tirozin	30 mg/l
treonin	200 mg/l
triptofan	40 mg/l
valin	150 mg/l
uracil	20 mg/l
3-AT	30 mM

Iz "dropout" otopine izostavlja se jedan ili više sastojaka, ovisno o selekciji koja se želi postići. Za krute podloge je dodano 20 g/l agara.

2.1.5. Bakterijski i kvašćevi sojevi

Soj *E.coli* BL21 (*hdsS gal (Δclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gen1)*) - ekspresijski soj stanica za inducibilnu ekspresiju gena sa sutavima koji sadrže T7 promotore.

Soj *E.coli* DH5α (*supE44 ΔlacU169(Φ80 lacZΔM15)hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) - elektroporacijske, kompetentne stanice korištene pri transformaciji molekulama DNA.

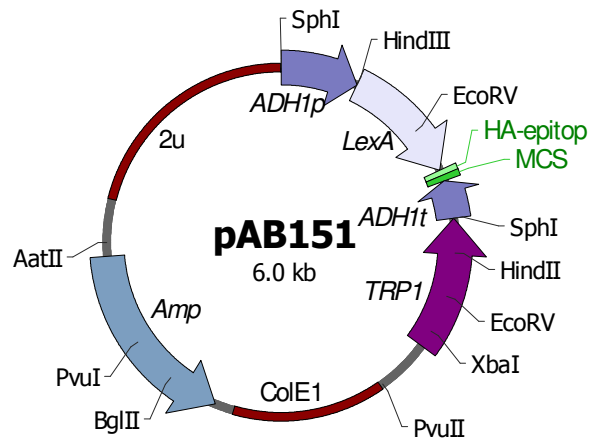
Soj *Saccharomyces cerevisiae* korišten u sustavu dvaju hibrida je L40 (*MATa trp1 leu2 his3 LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-lacZ*). Geni koji sudjeluju u sintezi triptofana, leucina i histidina mutirani su, pa se mogu koristiti u selekciji transformiranih stanica. Inaktivirani su i geni *LYS2* i *URA3*, a kao geni repoteri koriste se *HIS3* i *lacZ*.

2.1.6. Plazmidi

Shuttle vektori za test dvaju hibrida:

- pAB151 - konstitutivni promotor *ADH1*
 - LexA-BD (DNA vezujuća domena LexA transkripcijskog faktora)
 - HA epitop (moguća detekcija hibridnog proteina anti-HA protutijelima)
 - terminator transkripcije *ADH1*
 - ishodišta replikacije: pBR322 ori (*E.coli*), 2μ (*S.cerevisiae*)

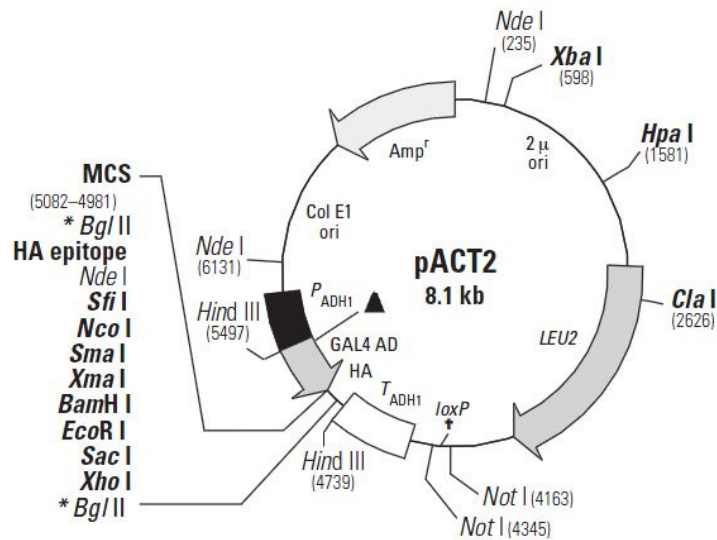
- selektivni markeri: Amp, Trp



Slika 2.1. pAB151 vektor

Ovaj vektor korišten je za ekspresiju C terminalne domene i C terminalne domene bez motiva HTH kao fuzijskih proteina s LexA-veznom domenom na njihovom N kraju. Ovako eksprimirani proteini poslužili su kao mamci u testu dvaju hibrida.

- pACT2 - konstitutivni promotor *ADH1*
 - GAL4-AD (aktivacijska domena transkripcijskog faktora GAL4)
 - epitop HA (za detekciju anti-HA protutijelima)
 - *ADH1* terminator transkripcije
 - ishodišta replikacije: ColE1 ori (*E.coli*), 2μ (*S.cerevisiae*)
 - selektivni markeri: Amp, Leu

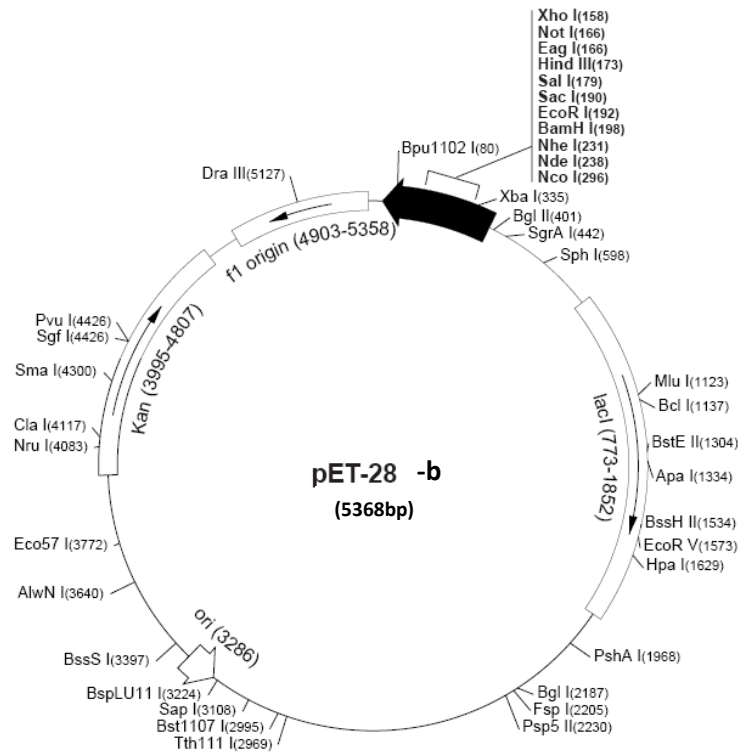


Slika 2.2. Vektor pACT2.

Vektor pACT2 korišten je za ekspresiju fuzijskih proteina plijena pri proćavanju interakcija dvaju C terminalnih domena. U tom slućaju eksprimirani su fuzijski proteini C terminalnih domena (kao i C terminalne domene bez motiva HTH) na ćijem je N kraju bila GAL4 aktivacijska domena. Osim toga, korišten je i pri proućavanju interakcija C- i N terminalne domene gdje je N terminalna domena poslućila kao protein mamac.

Vektori korišteni za proizvodnju proteina s His₆ i GST privjescima:

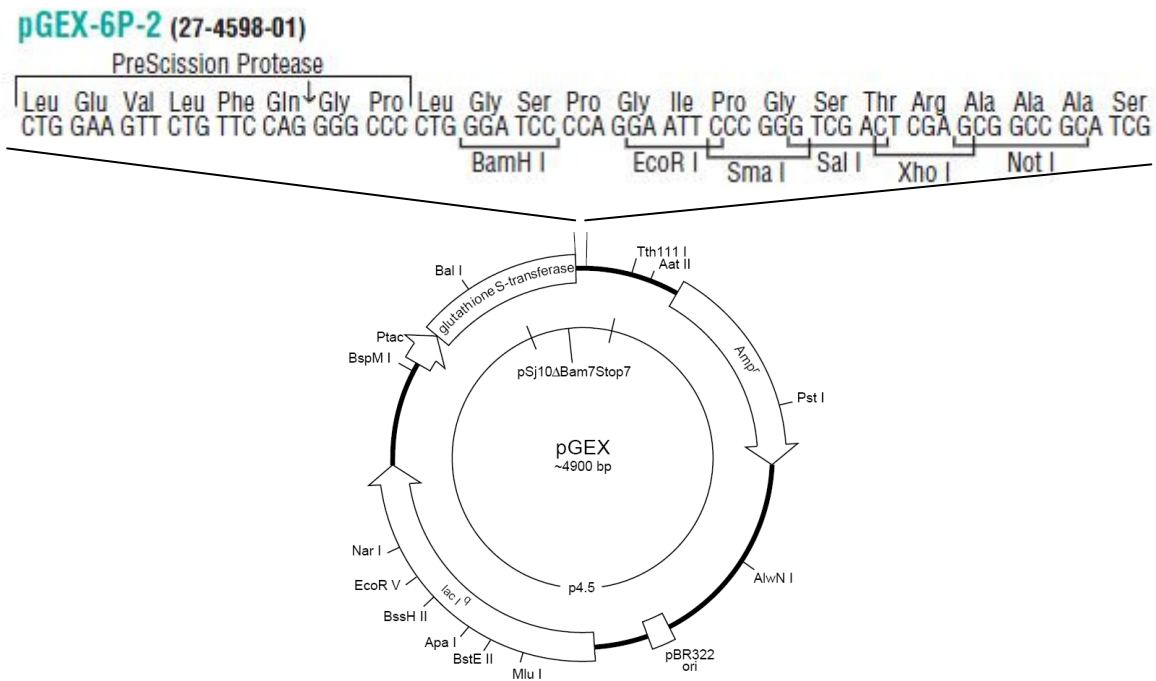
- pET28b - promotor T7
 - kodirajuća sekvenca za His₆ privjesak (sadrži 6 histidina)
 - terminator transkripcije T7
 - kodirajuća sekvenca za *lacI*
 - ishodište replikacije: pBR322 ori
 - selektivni marker: Kan



Slika 2.3. Vektor pET28b.

Ovaj vektor korišten je za produkciju i prekomjernu ekspresiju seril-tRNA sintetaze iz *M.barkeri* s His₆ privjeskom na N kraju.

- pGEX-6P-2 - promotor transkripcije *tac* (ekspresija se inducira s IPTG-om)
 - kodirajuća sekvenca za glutation-S-transferazu (26 kDa)
 - kodirajuća sekvenca za *lacI*
 - ishodište replikacije: pBR322 ori
 - selekcijski marker: Amp



Slika 2.4. Vektor pGEX-6P-2.

Ovaj vektor korišten je za prekomjernu ekspresiju arginil-tRNA-sintetaze kao fuzijskog proteina s GST privjeskom na N kraju (veličina fuzijskog proteina je 90 kDa).

2.1.7. Protutijela

Anti GST primarna zečja anti-GST protutijela, sekundarna anti-zečja protutijela konjugirana s peroksidazom iz hrena

Anti His - primarna mišja anti-His protutijela, sekundarna anti-mišja protutijela konjugirana s peroksidazom iz hrena

2.1.8. Početnice za lančanu reakciju polimerazom

Uzvodna početnica za SerRS *M. thermautotrophicus*:

5-MT-Nde: 5'-gagatc~~catatg~~aaattcaaactcaaggg-3'

Nizvodna početnica za SerRS *M. thermautotrophicus*:

3-MT-Hind: 5'-gagac~~aagcttt~~tatcagtcctggcgc-3'

Uzvodna početnica za ArgRS *M. thermautotrophicus*:

5-RRS-Bam: 5'-cgg~~gatcc~~atgttcaggtacattg-3'

Nizvodna početnica za ArgRS *M. thermautotrophicus*:

3-RRS-Xho: 5'-ccg~~ctcgag~~tactacatggtctc-3'

2.1.9. KOMPLETI

QIAquick Gel Extraction Kit

Komplet QIAQuick Gel Extraction Kit korišten je za izolaciju fragmenata DNA (uglavnom produkata PCR reakcija) iz agaroznog gela nakon elektroforeze. Pogodan je za izolaciju fragmenata DNA 70 bp - 10kb) iz agaroznih gelova s TAE ili TBE puferima, te pročišćavanje DNA iz enzimatskih reakcija. Komadići agaroznih gelova koji sadrže željene fragmente DNA se otapaju u puferu s visokom koncentracijom soli i nanose u kolonu u kojoj se DNA veže za silikonsku membranu dok nečistoće prolaze kroz kolonu. DNA se zatim eluira sa puferom Tris ili vodom.

QIAprep Spin Miniprep Kit

Ovaj komplet korišten je za izolaciju plazmidne DNA iz *E.coli*, a modificirani protokol korišten je i za izolaciju plazmida iz kvasaca. U prvoj fazi uz korištenje nekoliko pufera stanice su razbijene (pri oštećivanju stanica kvasaca korištene su staklene kuglice zbog debele stanične stijenke), odstranjeni su proteini i membranski lipidi centrifugiranjem i izolirane nukleinske kiseline. Ovakav ekstrakt nanesen je na kolonu *QIAprep spin column* te je kolona isprana nekoliko puta, pri čemu su se na nju vezali plazmidi, a ostale molekule i nečistoće prošle su kroz kolonu. Nakon toga plazmidna DNA je eluirana s kolone s ReH_2O .

2.2. METODE

2.2.1. Ispitivanje interakcija metodom dvaju hibrida

Kao što je već prethodno opisano, metoda dvaju hibrida koristi modularnu prirodu transkripcijskih faktora kako bi mogle biti proučavane interakcije između proteina. Ukoliko dva proteina interagiraju, dolazi do rekonstitucije funkcionalnog transkripcijskog faktora koji uzrokuje transkripciju gena pokazatelja ugrađenih u genom kvasca. Genima pokazateljima pridruženi su određeni promotori na koje se specifično veže funkcionalni transkripcijski faktor, što omogućuje promatranje i detekciju transkripcije ovisne o sustavu dvaju hibrida.

2.2.1.1. Detekcija transkripcije gena pokazatelja

U sustavu dvaju hibrida koji smo mi koristili postoje 2 gena pokazatelja (*HIS3* i *lacZ*) pod različitim promotorima, tako da se moraju dogoditi dva neovisna transkripcijska događaja na različitim lokusima u kromosomu. Na ovaj se način maksimalno smanjuje mogućnost pojave lažnih pozitivna.

Indukcija gena *HIS3* omogućava promatranje aktivacije transkripcije ovog gena preko rasta stanica na podlogama bez prisutnosti histidina. Indukcija gena *lacZ* rezultira plavim obojenjem pri dodatku X-Gal.

Dakle, ovaj sustav smanjuje pojavu lažnih pozitivna dajući 2 fenotipa koja signaliziraju interakciju proteina (His^+ , β -gal).

Prije izvođenja samog testa dvaju hibrida, potrebno je ispitati razinu samoaktivacije proteina mamca (DB-X) i odrediti bazalnu razinu transkripcije *HIS3* gena pokazatelja. Neki transkripcijski faktori, a i mnogi proteini koji inače nemaju ulogu u aktivaciji transkripcije mogu sadržavati domene koje mogu uzrokovati aktivaciju transkripcije kad se fuzioniraju na DNA vezujuću domenu transkripcijskog faktora.

TITRACIJA S 3AT

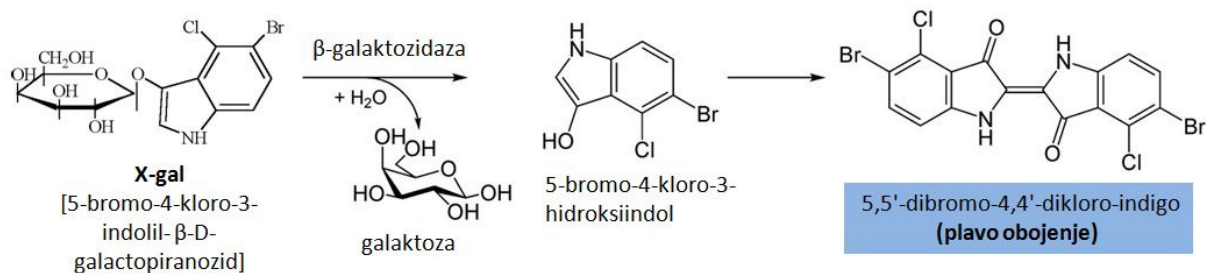
Aktivnost *HIS3* se titrira na podlogama bez histidina koje sadrže 3AT. *HIS3* gen kodira za imidazol-glicerol-fosfat-dehidratazu, enzim uključen u biosintezu histidina, dok je 3AT njegov specifični inhibitor. Kako bi se maksimalizirala osjetljivost *HIS3* gena pokazatelja, određuje se prag osjetljivosti na 3AT i ta koncentracija se uključuje u sve podloge s histidinom. Na ovaj način eliminira se bazalna

ekspresija *HIS3* i svaki rast na ovakvoj ploči nastaje kao posljedica interakcije dvaju proučavanih proteina. Sposobnost rasta stanica kvasca pri većim koncentracijama 3-AT od bazalne pokazatelj je relativne jakosti interakcije proteina.

X-gal „COLONY LIFT FILTER ASSAY“

X-gal je supstrat za β -galaktozidazu čijim cijepanjem nastaje produkt koji daje plavo obojenje (5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigo). Intenzitet i brzina nastanka obojenja su proporcionalni aktivnosti β -galaktozidaze.

Filter papir se uroni u Petrijeve zdjelice s otopinom koja sadrži X-gal, Z-pufer i β -merkaptioetanol. Svježe kolonije kvasaca narasle na podlogama „preslikaju“ se metodom *replica plate* na nitroceluloznu membranu koja se potom na 20-30s uroni u tekući dušik (liza stanica). Smrznuta membrana se prenese na filter papire natopljene otopinom X-gal i nastanak plavog obojenja se promatra tijekom 24h.



Slika 2.5. Prikaz X-gal reakcije s β -galaktozidazom koja daje plavo obojenje.

ONPG-test

ONPG test je kvantitativni kolorimetrijski test za direktno mjerenje aktivnosti β -galaktozidaze u tekućem mediju u kojem se koristi o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (ONPG). ONPG je umjetni bezbojni kromogeni supstrat β -galaktozidaze, dok je produkt reakcije, ortonitrofenol (ONP) žute boje ($\lambda_{max}=420nm$). Brzina pojave žutog obojenja proporcionalna je aktivnosti β -galaktozidaze.

Proteinski ekstrakt se izolira iz stanica i u 10-20 μL proteinskog ekstrakta dodaje se ONPG. Nakon toga mjeri se vrijeme i smjesa se inkubira na 30 °C. Kada se pojavi žuto obojenje, reakcija se

zaustavlja s 500 μL NaCO_3 , zapisuje se vrijeme i mjeri se apsorbancija uzorka pri valnoj duljini 420 nm (A_{420}).

Nakon toga se jedinice β -galaktozidaze izračunavaju prema formuli:

$$\text{broj jedinica } \beta\text{-galaktozidaze} = 1000 \times A_{420} \times \frac{1.7}{t \times m (\mu\text{g proteina})} \times 0.0045$$

2.2.1.2. Transformacija kvasaca metodom litijevog acetata (LiAc)

Pojedinačna kolonija s krute podloge prebaci se u 50 mL tekućeg medija (YPAD) i inkubira se preko noći na 30 °C uz trešnju. Kada OD_{600} dosegne vrijednost 1, suspenzija stanica se centrifugira 3 min na 2000xg nakon čega se ispere najprije s 40 mL ReH_2O , a zatim nakon još jednog centrifugiranja resuspendira u 8 mL ReH_2O . Ova suspenzija stanica se podijeli na alikvote od 100 μL koji se stave na led. U njih se dodaje 240 μL PEG 4000 50%, 36 μL LiAc 1M, 5 μL SS-DNA 10 mg/mL, te 1-10 μg plazmida kojim transformiramo. Ovakva transformacijska smjesa se nakon dobrog miješanja inkubira 30 min na 30 °C uz lagano miješanje, nakon čega se izloži temperaturi 42 °C na 15 min. Smjesa se centrifugira, supernatant se odstrani i talozi se resuspendiraju u 50-100 μL ReH_2O i nasade na odgovarajuću selektivnu podlogu.

2.2.2. Izolacija plazmidne DNA iz *E. coli*

Osim kompletom *QIAprep Miniprep Kit* plazmidna DNA iz *E. coli* izolirana je i metodom alkalne lize, da bi se utvrdilo koje transformante nose rekombinantni plazmid.

Odabrane kolonije prenesene su sa krutih podloga u 2 mL tekućeg medija LB i inkubirane preko noći na 37 °C na tresilici. Stanice se potom centrifugiraju 1 min na 4 °C i supernatant se odstrani. Talog stanica se resuspendira u 100 μL hladne otopine 1 na 5 min. Ova otopina sadrži glukozu, zbog čega stanice pucaju pod osmotskim tlakom. Zatim se dodaje 200 μL sveže pripremljene hladne otopine 2

te se sadržaj brzo promiješa i ostavi 5 min na ledu. Doda se 150 µL hladne otopine 3 i nježno protrese 10 sekundi te opet ostavi na ledu 5 min. Lizat stanica se centrifugira 10 min na 10000xg na 4 °C. Supernatantu se doda jednaki volumen fenol-kloroforma i dobro se promiješa, te centrifugira 2 min na 10000xg i 4 °C. Opet se izolira supernatant te mu se dodaju dva volumena 96%-tnog etanola. Ova otopina se promiješa i centrifugira 15 min na 10000xg. Sada se supernatant odlije i talogu se doda 500 µL 70%-tnog etanola. Centrifugira se 15 min, supernatant se odlije a talog se osuši i zatim otopi u 50 µL ReH₂O, od čega se 5µL koristi za analizu agaroznom elektroforezom.

2.2.3. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je tehnika kojom se broj molekula DNA umnaža za nekoliko redova veličina, producirajući tako milijune kopija određenog slijeda DNA. Glavne komponente PCR reakcije su:

- termostabilna DNA-polimeraza koja katalizira sintezu DNA ovisnu o kalupu (do danas je poznat velik broj enzima koji variraju u efikasnosti, točnosti i sposobnosti da sintetiziraju dugačke fragmente DNA)
- par sintetičkih oligonuklotida, počenica, koje su nužne za početak reakcije
- deoksinukleozid-trifosfati (dNTP): dATP, dTTP, dCTP, dGTP
- dvovalentni kationi, najčešće Mg²⁺
- pufer koji održava pH vrijednost, najčešće 10mM Tris-Cl pH 8,3-8,8 (kada se inkubira pri 72 °C vrijednost mu pada na 7,2)
- jednovalentni kationi, obično se dodaje 50 mM KCl
- molekula DNA koja služi kao kalup - sadrži sekvencu koju želimo amplificirati

Lančana reakcija polimerazom je ponavljajući proces, u koji se sastoji od tri elementa: denturacije kalupa povišenjem temperature, sljublivanja početnica na jednolančanu sekvencu željenog slijeda DNA i produljivanja sljubljenih početnica djelovanjem termostabilne DNA-polimeraze.

- DENATURACIJA

Dvolančani DNA kalupi se denaturiraju pri temperaturi koju djelomično određuje i udio G+C parova baza. Što je veći ovaj udio, veća je i početna temperatura potrebna za razdvajanje lanaca kalupa DNA. O duljini DNA kalupa ovisi vrijeme potrebno za odvajanje lanaca pri ovoj temperaturi. Ako je temperatura preniska ili vrijeme izlaganja toj temperaturi prekratko, odvojiti će se samo regije kalupa bogate AT parovima baza. Ako se upotrebljava Taq polimeraza, denaturacija se odvija pri 94-95 °C, što je naviša temperatura koju enzim može podnijeti kroz 30-ak ciklusa reakcije.

- VEZANJE POČETNICA

Obično je temperatura pri kojoj se događa vezanje početnica kritična za uspješnost reakcije. Pri previsokoj temperaturi, početnice se slabije vežu pa je količina konačnog produkta reakcije vrlo mala. Preniska temperatura može uzrokovati nespecifično vezanje početnica što rezultira umnažanjem neželjene sekvence DNA.

- PRODULJIVANJE

Produljivanje početnica odvija se pri optimalnoj temperaturi pri kojoj funkcionira termostabilna polimeraza (za Taq polimeraze je to 72-78 °C). U prva dva ciklusa, produljivanje od jedne početnice se nastavlja dalje od sekvence komplementarne veznom mjestu druge početnice. U sljedećem ciklusu, nastaju prve molekule čija je duljina jednaka duljini DNA segmenta kojeg omeđuju vezna mjesta početnica. Od trećeg ciklusa nadalje, ovaj segment DNA se umnaža geometrično dok se duži segment nastao u prvom ciklusu umnaža asimetrično. Brzina polimerizacije za Taq-polimerazu je oko 2000 nukleotida po minuti pri optimalnoj temperaturi.

Kao zadnji ciklus PCR reakcije, mnogi znanstvenici koriste završno produljivanje, koje je oko tri puta dulje od prijašnjih ciklusa, kako bi se dopustilo da se svi umnoženi produkti kompletno i točno produlje.

- BROJ CIKLUSA

Broj ciklusa potrebnih za umnažanje željenog segmenta DNA ovisi o početnom broju molekula kalupa koje ulaze u reakciju, te o efikasnosti vezanja početnica i njihovog produljivanja. Kada se uspostavi geometrijska faza, reakcija se ponavlja sve dok jedna od komponenti ne postane ograničavajuća. Tada količina specifičnih produkata postaje

maksimalna, a nespecifične produkte rijteko da se može detektirati. Ovo se obično događa nakon 30 ciklusa i dobiva se 10^5 kopija željenog segmenta DNA.

2.2.4. Elektroforetske metode

Elektroforetske metode koje koriste agarozne i poliakrilamidne gelove su jednostavne i lako izvodive tehnike pomoću kojih je moguće odvojiti nukleinske kiseline ili proteine s obzirom na njihovu veličinu. Moć razlučivanja koja se njima može postići je daleko veća od moći razlučivanja drugih metoda, npr. centrifugiranjem u gradijentu gustoće. Položaj molekule u gelu može se utvrditi direktno, dodatkom odgovarajućih boja, a pruge koje sadrže molekule od interesa mogu se izrezati iz gela u svrhu daljnjeg postupanja s molekulom.

2.2.4.1. Agarozna elektroforeza nukleinskih kiselina

Agarozni gelovi imaju manju moć razlučivanja od poliakrilamidnih ali mogu razlučiti molekule većeg spektra veličina (DNA od 50pb do nekoliko megabaza može se razdvojiti na agaroznim gelovima različitih konfiguracija i koncentracija). Brzina kretanja DNA u ovakvom gelu se smanjuje sa povećanjem njezine duljine i proporcionalna je snazi električnog polja. Granica razlučivosti doseže se kada radijus giracije linerane DNA premaši veličinu pora gela, kada se DNA ne razdvaja na osnovu veličine već se „provlači“ kroz pore gela kao kroz zakrivljenu cijev. Što su pore gela veće, to se mogu razvojiti veći fragmenti DNA. Tako se 0,1 - 0,2% agarozni gelovi se koriste za razdvajanje izuzetno velikih molekula DNA.

Agaroz je linearni polimer koji se sastoji od alternirajućih ostataka D- i L- galaktoze spojenih α -(1→3) i β -(1→4) glikozidnim vezama. Lanci agaroze tvore helikalna vlakna koja agregiraju u superzavijenu strukturu s radijusom 20-30 nm. Polimerizacija ovakvih struktura stvara trodimenzionalnu mrežu kanala čiji promjeri variraju od 50-200 nm.

Komercijalno pripremljena agarozna sadrži oko 800 galaktoznih ostataka po lancu, međutim ona nije homogena, pa prosječna duljina polisaharidnih lanaca varira od proizvođača do proizvođača.

Čimbenici koji utječu na brzinu migracije molekula DNA kroz ovakve gelove su:

- veličina DNA molekule
- koncentracija agaroze
- konformacija DNA molekule
- prisutnost etidijevog bromida u gelu i puferu za elektroforezu
- primjenjena voltaža
- vrsta agaroze
- vrsta pufera za elektroforezu: TAE - sadrži Tris-acetat i EDTA; TBE - sadrži Tris-borat i EDTA; TPE - sadrži Tris-fosfat i EDTA.

Mi smo koristili 1%-tne agarozne gelove napravljene otapanjem agaroze na temperaturi vrenja u puferu TAE u kojeg je prethodno dodan etidijev bromid (EtBr) do koncentracije 50 µg/L. Elektroforezu smo provodili u istom puferu električnom polju jakosti 8-10 V/cm. EtBr omogućuje vizualizaciju molekula DNA ako se osvijetli ultraljubičastim svjetlom jer se interkalira između baza prilikom čega fluorescira te daje žuto-narančasto svjetlo $\lambda=590\text{nm}$.

Uzorci se prije nanošenja u jažice miješaju s puferom za nanošenje uzoraka koji sadrži boje bromfenol plavo i ksilencijanol (omogućuju praćenje brzine kretanja uzorka), te saharozu i glicerol za povećanje gustoće uzorka kako bi uzorak što bolje ušao u jažicu. Bromfenol plavo migrira 2,2 puta brže od ksilencijanola neovisno o koncentraciji agaroze.

2.2.4.2. Poliakrilamidna elektroforeza

Elektroforeza proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Gotovo sve elektroforetske metode kojima se analiziraju proteini provode se u poliakrilamidnom gelu pri uvjetima koji osiguravaju disocijaciju proteina na njihove podjedinice i minimaliziraju agregaciju. Pri tome se najčešće koristi anionski deterdžent SDS koji se koristi u kombinaciji s reducirajućim agensom i povišenjem temperature kako bi proteini disocirali prije nanošenja na gel. Denaturirani polipeptidi vežu SDS i postanu negativno nabijeni, pri čemu je količina vezanog SDS-a proporcionalna molekularnoj težini polipeptida (1,4 g SDS po 1g polipeptida) i ne ovisi o samom slijedu aminokiselina. Zbog toga brzina migracije ovih kompleksa ovisi o veličini polipeptida, pa koristeći markere poznatih težina možemo odrediti molekularnu težinu nepoznatog proteina.

Poliakrilamidne gelove čine lanci polimeriziranog akrilamida koji su međusobno povezani bifunkcionalnim agensom kao što je N,N'-metilen-bis-akrilamid.

Moć razlučivanja SDS-poliakrilamidnih gelova ovisi o koncentraciji poliakrilamida i količini međusobne povezanosti njegovih lanaca za koju je odgovoran bis-akrilamid. On gel čini krutim i daje mu napetost te formira pore kroz koje prolaze kompleksi SDS-a i polipeptida. Veličina pora smanjuje se s povećanjem omjera bisakrilamid:akrilamid i doseže minimum kada je ovaj omjer 1:20. Većina gelova se radi u omjeru 1:29 i njima se može postići razdvajanje proteina koji se razlikuju po veličini do 3%.

SDS PAGE se provodi u okomito postavljenoj aparaturi, pri čemu je gel podijeljen na gornji sabijajući (engl. „*stacking*“) i donji razdvajajući (engl. „*separating*“). Gornji gel ima veće pore i pH 6,8, dok donji ima manje pore i pH 8,8. Prije nanošenja na gel, uzorci se denaturiraju 5 min u kipućoj vodi. Elektroforeza se prekida kada bromfenol plavo dosegne kraj gela za razdvajanje, a zatim se gel inkubira 30 min u otopini koja sadrži *Coomassie Brilliant Blue*, octenu kiselinu i metanol. Nakon bojanja gel se odbojava kuhanjem u destiliranoj vodi, nakon čega na njemu možemo vizualizirati proteine.

Nedenaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Nukleinske kiseline i proteine moguće je analizirati i elektroforezom u poliakrilamidnom gelu pri nedenaturirajućim (nativnim) uvjetima, bez agresivnih deterdženata kao što je SDS. Dok u SDS-PAGE elektroforetska mobilnost proteina ovisi primarno o njihovoj molekularnoj masi, pri nedenaturirajućoj elektroforezi mobilnost molekula ovisi o njihovom naboju i hidrodinamskoj veličini. Električni naboj određuje intrinzički naboj proteina pri pH vrijednosti pufera koji se koristi pri elektroforezi. Ovaj naboj ovisi o aminokiselinskom sastavu proteina. Kako protein ostaje pri nativnoj konformaciji, hidrodinamska veličina i pokretljivost na gelu također ovise o prirodnoj konformaciji (kompaktniji proteini su pokretljiviji od većih, oligomernih proteina). Ukoliko se nativna elektroforeza odvija pri neutralnom pH, moguće je proučavati konformaciju, asocijaciju i agregaciju proteina, ali i vezanje drugih proteina/molekula. Stoga je ova metoda korištena za detekciju vezanja tRNA od strane SerRS.

SerRS je inkubiran s ukupnom tRNA iz *E. coli* i *S. cerevisiae* 10 min na 37 °C u puferu koji je sadržavao 25mM HEPES pH 7,0 i 5mM MgCl₂. Kompleksi su nanoseni na 9%-tni bisakrilamid:akrilamid (1:19) gel 2h na 100V pri 4 °C.

2.2.4.3. Bojanje poliakrilamidnih gelova srebrom

Bojanje srebrom je vrlo osjetljiva tehnika vizualizacije molekula odvojenih elektroforezom koja omogućuje vizualizacij vrlo malih količina proteina, čak do 0.3 - 10 ng. Ioni srebra vežu se na aminokiselinske ostatke proteina, osobito na sulfhidrilne i karboksilne grupe, nakon čega slijedi redukcija slobodnim ionima srebra. Dvije su osnovne vrste protokola za bojanja srebrom: srebrov-amin ili alkalna metoda i srebrov-nitrat ili kisela metoda.

Kompleksi SerRS i tRNA detektirani su bojanjem poliakrilamidnih gelova srebrom kiselim metodom po sljedećem protokolu:

1. FIKSIRANJE 20 min:

etanol	25 mL
octena kiselina	6 mL
ReH ₂ O	19 mL
Σ	50 mL

2. FIKSIRANJE 20 min u:

etanol	5,6 mL
octena kiselina	2,8 mL
ReH ₂ O	41,6 mL
Σ	50 mL

3. INKUBACIJA 5 min u:

K ₂ Cr ₂ O ₇	0,05g
HNO ₃ , 65%-tna	13,5 μL
ReH ₂ O	50 mL
Σ	50 mL

4. ISPIRANJE u ReH₂O 3X po 10 min

5. BOJANJE 20 min u:

AgNO ₃	0,1 g
ReH ₂ O	50 mL

6. RAZVIJANJE:

otopina za razvijanje:

Na ₂ CO ₃	8,91 g
ReH ₂ O	300 mL

kratko mućkanje u:

otopina za razvijanje	200 mL
formaldehid	20 µL

finalno razvijanje u:

otopina za razvijanje	100 mL
formaldehid	50 µL

7. ZAUSTAVLJANJE reakcije:

octena kiselina	0,5 mL
ReH ₂ O	49,5 mL

2.2.5. Reakcije ligacije

Prije pristupanja samoj ligaciji vektora i inserta, plazmidnu DNA koja je predstavljala vektor nakon digestije smo obično pročistili od retrikcijskih enzima tako da smo je ekstrahirali fenol-kloroformom i istaložili u etanolu. Postupak je izgledao ovako: nakon digestije uzorak je nadopunjen s ReH₂O do 100 µL i dodan je jednak volumen fenol-kloroforma. Nakon što je uzorak protrešen, centrifugiran je na 3-5 min na 10000xg. Gornja (vodena faza) prebačena je u drugu *Eppendorf* epruvetu. Njoj je dodano 2,5 volumena hladnog 96%-tnog etanola i 10 µL 3M natrijevog-acetata. Otopina je taložena 20min na -80 °C i zatim centrifugirana 15 min na 10000xg i 4 °C. Supernatant je odstranjen, a istaložena DNA je

isprana u 200 μL hladnog 70%-tnog etanola i ostavljena da se istaloži 15 min na $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Nakon toga je otopina još jednom centrifugirana 15 min na $10000\times g$ i $4\text{ }^\circ\text{C}$, supernatant je ponovno odstranjen, a talog koji sadržava plazmidnu DNA je osušen i otopljen u ReH_2O .

Nakon ovakve pripreme, vektor i insert smo inkubirali uz ligacijske enzime u različitim omjerima koje smo izračunali prema formuli:

$$ng(\text{insert}) = \frac{ng(\text{vektor}) \times bp(\text{insert})}{bp(\text{vektor})} \times \frac{\text{vektor}}{\text{insert}}$$

2.2.6. Priprema elektrokompetentnih stanica *E.coli*

S obzirom da su stanice *E.coli* sojeva DH5 α i BL21 transformirane prigodnim vektorima metodom elektroporacije, bilo ih je potrebno pripremiti za ovaj proces. Bakterijske stanice nasade se u tekući LB medij i inkubiraju na $37\text{ }^\circ\text{C}$ preko noći uz trešnju. Nakon toga se svježa noćna kultura nasadi u tekući LB medij u omjeru 1:100 i uzgaja do $\text{OD}_{600}=0,6$. Kultra se ohladi na ledu 30min i zatim centrifugira 15 min na $4000\times g$ 15 minuta. Stanični talog se u dva navrata ispere hladnom ReH_2O nakon čega se otopi u hladnom 10%-tnom glicerolu i ponovno centrifugira 20 min na $4000\times g$. Supernatant se odbaci i talog stanica se ponovno resuspendira u 2-5 mL hladnog 10%-tnog glicerola. Izmjeri se OD_{600} i odredi gustoća stanica prisutna u suspenziji nakon čega se stanice raspodjele u alikvote od $50\text{ }\mu\text{L}$ i pohrane na $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.7. Transformacija *E.coli* elektroporacijom

Elektroporacija je metoda unošenja plazmidne DNA u stanice *E.coli* na način da ih se nakratko izloži visoko-naponskom električnom izboju koji uzrokuje nestabilnost stanične membrane i formiranje

većih hidrofobnih pora promjera nekoliko nanometara. Neke veće hidrofobne pore prelaze u hidrofilne jer se energija potrebna za njihovo stvaranje smanjuje kako voltaža raste. Zatvaranje ovih pora je stohastički proces i može se odgoditi držanjem stanica na niskoj temperaturi. Dok su pore otvorene, molekule DNA lako prolaze iz medija u citoplazmu stanice. Voltaža potrebna za formiranje velikih hidrofobnih pora je proporcionalna promjeru stanice, pa je tako potrebno primijeniti veću voltažu za transfekciju eukariotskih stanica.

Mi smo radili tako da smo u 50 μ L kompetentnih *E.coli* dodali 20ng DNA i izložili ih pulsu od 2,5 kV/cm u trajanju 4 ms. Nakon toga se u elektroporirane stanice dodaje hranjivi medij i inkubiraju 1h na 37 °C radi oporavka. Nakon toga stanice se nasađuju na LB podloge s dodatkom određenog antibiotika koji služi kao selektivni marker - izrastaju samo stanice koje nose plazmid s rezistencijom na prisutni antibiotik.

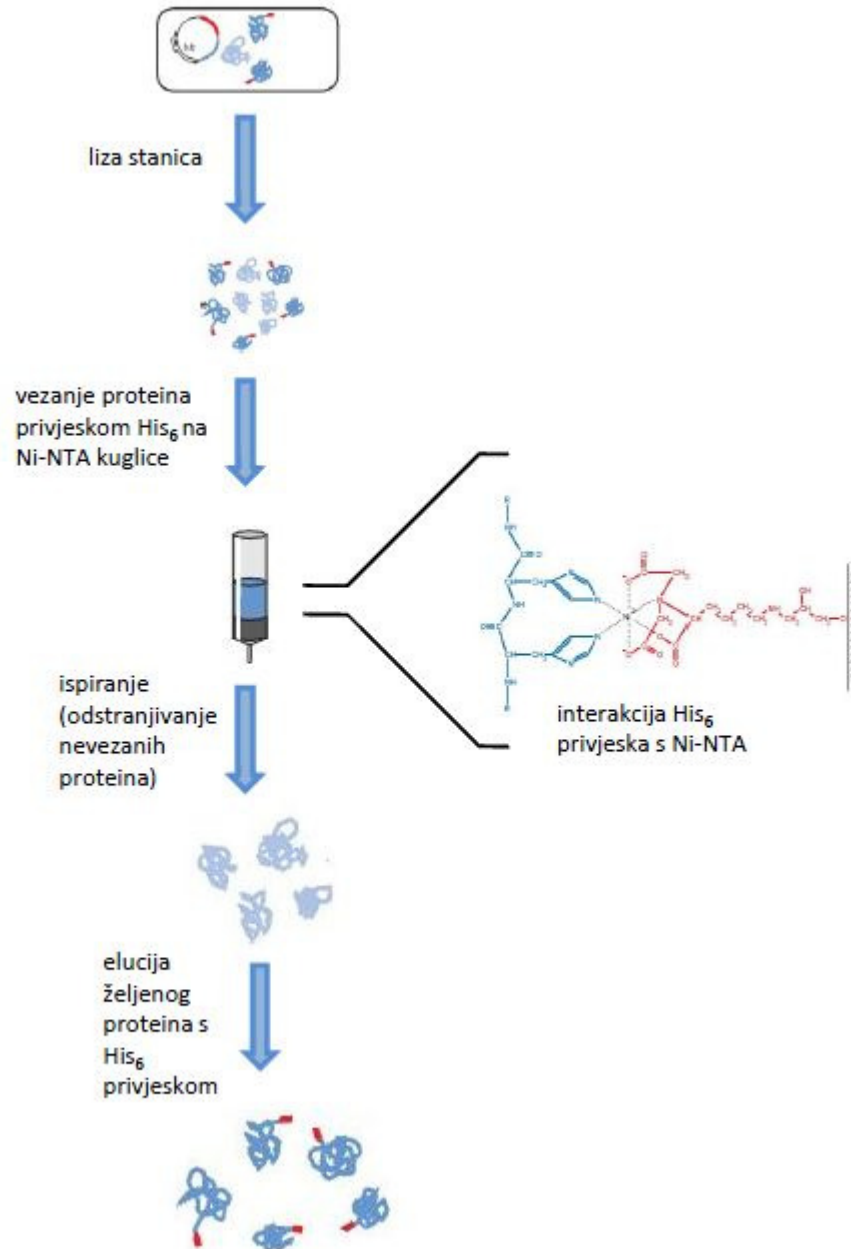
Najveća efikasnost transformacije (broj kolonija/ μ g plazmidne DNA) postiže se kada je koncentracija plazmidne DNA visoka i kada je duljina izlaganja električnom pulsu takva da samo 30-50 % stanica preživi. Tada je moguće da i do 80 % preživjelih stanica nosi željeni plazmid.

2.2.8. Pročišćavanje proteina His₆-SerRS na koloni Ni-NTA

Pročišćavanje His₆-SerRS provedeno je afintetnom kromatografijom uz koja se bazira na interakciji privjeska His₆ na željenom proteinu i kolone Ni-NTA.

Nitrilotriacetatna kiselina (NTA) je tetradentatni helirajući adsorbens koji okupira 4 od 6 veznih mjesta u koordinacijskoj sferi iona nikla, ostavljajući 2 vezna mjesta slobodna za interakciju s privjeskom His₆. NTA snažno veže ione metala i drži ih pri posebno agresivnim uvjetima ispiranja.

Privjesak His₆ je mnogo manji od ostalih privjesaka koji su komercijalno dostupni, pa stoga ne uzrokuje smetnje pri pravilnom smatanju proteina.

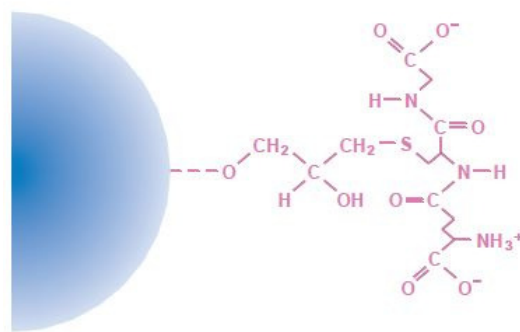


Slika 2.6. Shema pročišćavanja proteina s His₆ privjeskom preko kolone Ni-NTA.

2.2.9. Pročišćavanje proteina GST-ArgRS na koloni koja sadrži glutation-sefarozu

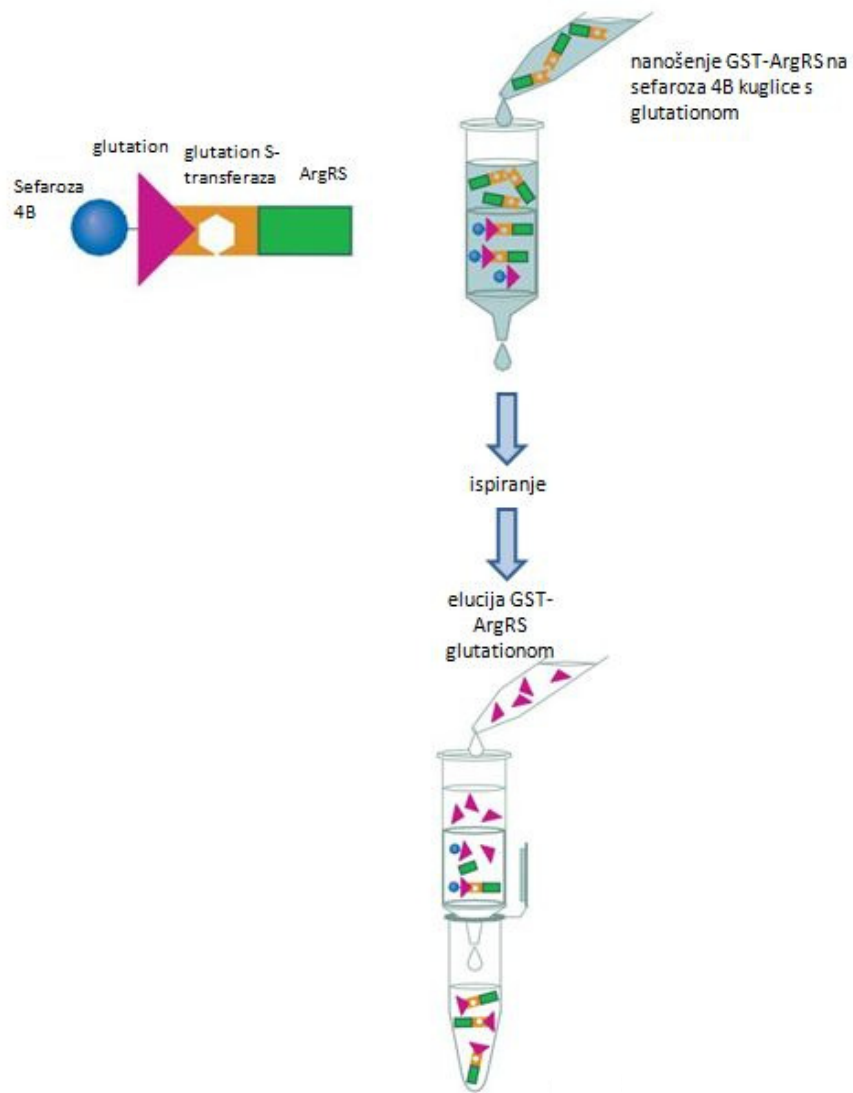
Glutation S-transferaza (GST) je protein velik 26 kDa spada u obitelj istoimenih enzima. Oni kataliziraju konjugaciju reduciranog glutationa na elektrofilne centre širokog spektra supstrata. Ovom aktivnošću detoksificiraju endogene tvari kao što su peroksidirani lipidi i sudjeluju u razgradnji ksenobiotika. Također, mogu vezati toksine i funkcionirati kao transportni proteini.

GST protein ima iznimno visok afinitet za glutation, te je upravo ovo njegovo svojstvo iskorišteno u konstrukciji GST sustava za pročišćavanje proteina. U ovom sustavu, kuglice sefaroze prekrivene su glutationom (Slika 2.7.).



Slika 2.7. Glutation pričvršćen na kuglicu sefaroze 4B (plavo).

Kada se na kolonu sa ovim kuglicama nanese protein sa GST privjeskom, uspostavlja se interakcija između GST privjeska i glutationa i željeni protein zaostaje na koloni, za razliku od ostalih proteina koji se ispiru. Nakon toga željeni protein se eluira s kolone puferom u kojem se nalazi slobodni glutation koji kompetira s glutationom na kuglicama za vezna mjesta na GST privjesku (Slika 2.8.).



Slika 2.8. Shema pročišćavanja proteina s GST privjeskom preko kolone koja sadrži kuglice sefaroze s glutationom.

2.2.10. Western analiza (detekcija kompleksa His₆-SerRS i GST-ArgRS)

Western analiza je metoda detekcije proteina osjetljivija od bojanja srebrom (može otkriti čak 0,1 ng proteina). Kao probe se koriste antitijela koja reagiraju specifično s određenim epitopom na proteinu imobiliziranom na membrani. Dodatkom sekundarnih antitijela koja na sebi nose enzim čijim djelovanjem na neki od supstrata nastaje fluorescirajući produkt detektiramo protein od interesa.

Nakon što su proteini razdvojeni elektroforezom na SDS poliakrilamidnom gelu, na njega se stavlja nitrocelulozna membrana s aparaturom za prijenos. Primjenjuje se struja od 0,8 mA/cm² u trajanju 1h. Nakon toga membrana se blokira u 5%-tnom nemasnom mlijeku.

Učinkovitost prijenosa i položaj markera može se utvrditi privremenim bojanjem u *Ponceau S* boji.

Nakon toga membrana se ispiru puferom TBS 5 min i inkubira s primarnim protutijelima 1h. Slijedi ispiranje s puferom TBS u 3 navrata po 5 min, i 1h inkubacije sa sekundarnim protutijelima. Membrana se završno ispiru u puferu TBS dva puta po 10 min.

Kako je na sekundarnim protutijelima preoksidaza hrena, naš protein detektiramo kemiluminiscencijom. Otopine za detekciju A i B pomješaju se u jednakim volumenima i membrana se oplahuje 5 min. Nakon toga se ocijedi na filter papiru, zamota u protirnu foliju i prenese u tamnu komoru. Tamo se prisloni na film koji se zatim razvija najprije uranjajući se u razvijač, zatim se ispiru u vodi i fiksira.

3. REZULTATI

3.1. Interakcije proteinskih domena seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa iz *Methanosarcine barkeri*

3.1.1. Interakcije C-terminalnih domena seril-tRNA-sintetaze iz *M. barkeri* u sustavu dvaju hibrida

Gen za C-terminalnu domenu SerRS je od prije bio ugrađen u plazmid pAB151 (mamac) koji omogućava ekspresiju fuzijskog proteina s LexA-vezujućom domenom (*LexA-binding domain*, **LexA-BD**). Korišteni su konstrukti:

- pAB151-CTD, C-terminalna domena eksprimira se u okviru čitanja s LexA-BD na N-kraju, **LexA-BD-CTD**, i
- pAB151-CTD Δ HTH, C-terminalna domena bez motiva HTH eksprimira se u okviru čitanja s LexA-BD na N-kraju, **LexA-BD-CTD Δ HTH**.

Osim toga, C-terminalna domena SerRS je prethodno ugrađena i u plazmid pACT2 (plijen) koji omogućava njenu ekspresiju kao fuzijskog proteina s Gal4-aktivacijskom domenom (*Gal4-activation domain*, **Gal4-AD**). Korišteni su konstrukti:

- pACT2-CTD, C-terminalna domena eksprimira se u okviru čitanja s Gal4-AD na N-kraju, **Gal4-AD-CTD**, i
- pACT2-CTD Δ HTH, C-terminalna domena bez motiva HTH eksprimira se u okviru čitanja s Gal4-AD na N-kraju, **Gal4-AD-CTD Δ HTH**.

Ovim konstruktima transformirane su stanice kvasca soja L40 u sljedećim kombinacijama:

mamac (fuzijski protein)	+	plijen (fuzijski protein)
pAB151-CTD Δ HTH (LexA-BD-CTDΔHTH)	+	pACT2 (Gal4-AD)
pAB151-CTD (LexA-BD-CTD)	+	pACT2 (Gal4-AD)
pAB151-CTD Δ HTH (LexA-BD-CTDΔHTH)	+	pACT2-CTD Δ HTH (Gal4-AD-CTDΔHTH)
pAB151-CTD (LexA-BD-CTD)	+	pACT2-CTD (Gal4-AD-CTD)

Dvostruki transformanti su uzgajani u selektivnom mediju bez triptofana i leucina (SD-Trp-Leu) do kasne log faze ($A_{600}=0,7-1,0$).

Serijska razrjeđenja tekućih kultura nasađena su u alikvotima od 5 μ L na selektivne podloge SD-Trp-Leu i SD-Trp-Leu-His s 30, 50, 75 i 100 mM 3-AT.

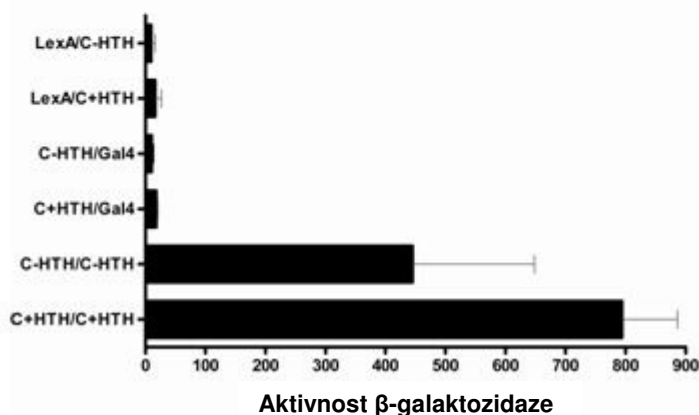
Tekuće kulture dvostrukih transformanata nasađene su i na podloge SD-Trp-Leu koje su iskorištene za testiranje aktivnosti β -galaktozidaze *X-gal colony lift filter assay*-om.

Aktivnost β -galaktozidaze testirana je i u izoliranim proteinskim ekstraktima uz ONPG kao supstrat (ONPG-test).

A

<i>mamac</i>	<i>plijen</i>	-Trp-Leu	-Trp-Leu-His + 50 mM 3AT	<i>X-Gal</i>
<i>CTDΔHTH</i>	<i>Gal4AD</i>			-
<i>CTD</i>	<i>Gal4AD</i>			-
<i>CTDΔHTH</i>	<i>CTDΔHTH</i>			++
<i>CTD</i>	<i>CTD</i>			+++

B



Slika 3.1. Interakcije C-terminalnih domena seril-tRNA-sintetaze iz *M.barkeri* u sustavu dvaju hibrida. **A.** Navedene kombinacije plazmida i/ili konstrukata transformirane su u stanice kvasca soja L40. Serijska razrjeđenja su nasađena na podloge SD-Trp-Leu i SD-Trp-Leu-His s 50mM 3-amino-1,2,4-triazolom. *X-gal colony lift filter assay* je korišten za testiranje β -galaktozidazne aktivnosti. Razvitak obojenja praćen je i indiciran kako slijedi: +++ = 15min-1h; ++ = 1-4h; + = 4-8h; - = 8-16h. **B.** Aktivnost β -galaktozidaze je analizirana i u izoliranim proteinskim ekstraktima uz ONPG kao supstrat. Jedinice β -galaktozidaze izražene su u Millerovim jedinicama i predstavljaju prosječne vrijednosti rezultata iz 3 ponovljena ONPG-testa.

Kako se može zaključiti iz podataka prikazanih na Slici **3.1.**, svi primjenjeni testovi za proučavanje interakcija u sustavu dvaju hibrida (rast na SD-Trp-Leu-His podlogama s 3AT, *X-gal colony lift filter assay* i ONPG-test) pokazuju da C-terminalne domene interagiraju puno jače nego krnje C-terminalne domene bez motiva HTH.

3.1.2. Ugradnja sekvence za N-terminalnu domenu seril-tRNA-sintetaze iz *M. barkeri* u vektor pACT2

Sekvenca koja kodira za N-terminalnu domenu SerRS iz *M. barkeri* izolirana je iz vektora pET15b-NTD. Plazmid pET15b-NTD izložen je restriksijskim enzimima *NcoI* i *XhoI* kako bi iz njega izolirali nukleotidni slijed za N-terminalnu domenu (insert).

pET15b-NTD (0.33ng/μL)	30 μL
<i>NcoI</i>	4 μL
<i>XhoI</i>	4 μL
pufer NEB2	5 μL
BSA	0.5 μL
Re H ₂ O	6.5 μL
Σ	50 μL

Enzimi su inaktivirani u vremenu od 20 min na 65 °C i produkti reakcije analizirani agaroznom elektroforezom u trajanju od 30 min na 140V. Nukleotidni slijed za N-terminalnu domenu je skalpelom izrezan iz gela i pročišćen kompletom *QIAQuick Gel Extraction Kit*.

Vektor (pACT2) je također izložen djelovanju restriksijskih enzima *NcoI* i *XhoI*:

vektor (pACT2) (0.33ng/μL)	20 μL
<i>NcoI</i>	3 μL
<i>XhoI</i>	3 μL
pufer NEB2	3 μL
BSA	0,3 μL
Re H ₂ O	0,7 μL
Σ	30 μL

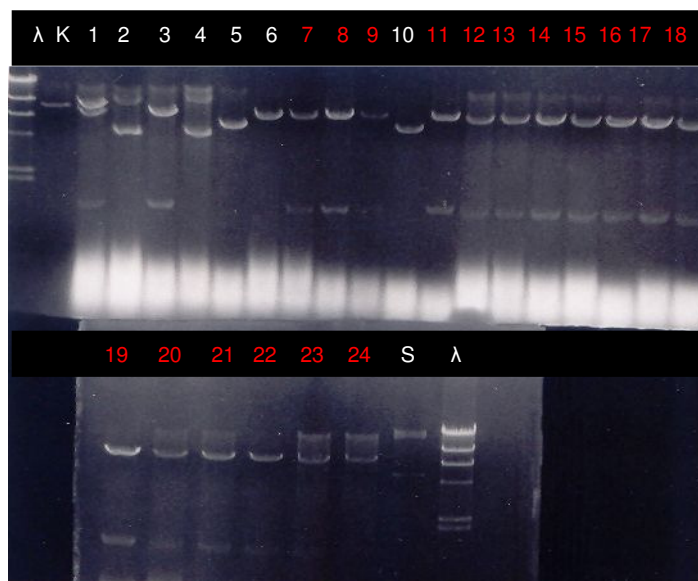
Enzimi su inaktivirani 20min na 65°C i reakcija je pročišćena ekstrakcijom fenol-kloroformom i vektor je istaložen etanolom.

Vektor i insert su pomiješani u različitim omjerima i spojeni DNA-ligazom iz faga T4 (reakcija ligacije). Najproduktivnije reakcije ligacije bile su one u kojima je omjer insert:vektor bio 3:1 i 1:3. Reakcije ligacije su inkubirane preko noći na 14°C:

3:1		1:3	
vektor (pACT2)	5 μ L	vektor (pACT2)	5 μ L
insert (N-domena)	3 μ L	insert (N-domena)	0,5 μ L
pufer za ligazu	4 μ L	pufer za ligazu	4 μ L
rapid DNA ligaza (5U/ μ L)	0,6 μ L	rapid DNA ligaza (5U/ μ L)	0,6 μ L
Re H ₂ O	7,4 μ L	Re H ₂ O	10 μ L
Σ	20 μ L	Σ	20 μ L

Elektroporirano je po 3-5 μ L DNA u kompetentne stanice *E.coli* soja DH5 α , dodan je medij LB^{Amp} i nakon oporavka sat vremena na 37 °C stanice su nasađene na podloge LB^{Amp}.

Nasumično su odabrane 24 kolonije koje su narasle na podlogama i nasađene u tekuće kulture za izolaciju DNA. Plazmidna DNA je izolirana i izložena djelovanju restrikcijskih enzima *Nco*I i *Xho*I te su produkti reakcije analizirani agaroznom elektroforezom (Slika 3.2.). Dobiveno je 17 konstrukata, od kojih su pojedini korišteni za transformaciju kvasaca. pACT2-NTD eksprimira N-terminalnu domenu SerRS kao fuzijski protein na čijem se N-kraju nalazi aktivacijska domena (*Gal4-activation domain*, Gal4-AD) transkripcijskog faktora Gal4.



Slika 3.2. Restriksijska analiza potencijalnih konstrukata pACT2-NTD. λ -standard molekularnih masa (fragменти DNA λ -faga razgrađena s *Hind*III: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 bp. **K**-kontrola, prazan plazmid pACT2 (8,1kb). **1-24**-uzorci 24 izolata plazmidne DNA, potencijalni konstrukti. Uzorci koji posjeduju željeni konstrukt su označeni crveno (plazmid 7,5 kb + insert 1,6kb). **S**-superzavijeni plazmid pACT2.

3.1.3. Interakcije N- i C- terminalne domene seril-tRNA-sintetaze iz *M. barkeri*

Kako bi proučili interakciju N-terminalne i C-terminalne domene SerRS, konstrukti pAB151-CTD ili pAB151-CTD Δ HTH (mamci) te pACT2-NTD (plijen) kontransformirani su u stanice kvasca soja L40.

Dakle, kombinacije plazmida koje su sadržavali dvostruki transformanti bile su sljedeće:

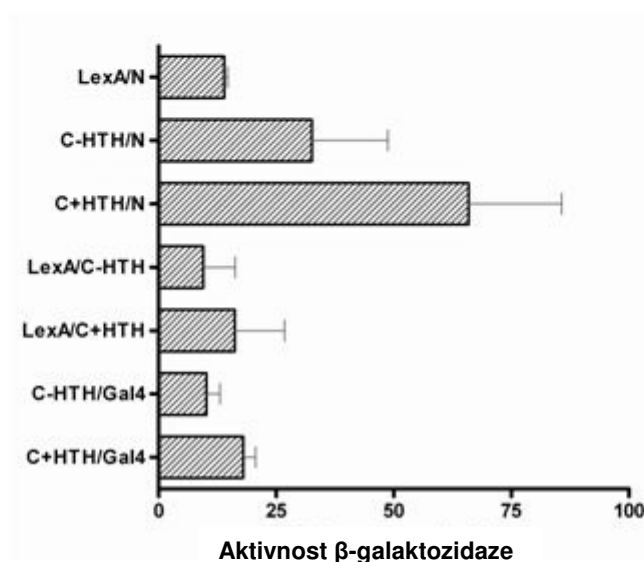
mamac (fuzijski protein)	+	plijen (fuzijski protein)
pAB151-CTD Δ HTH (LexA-BD-CTD Δ HTH)	+	pACT2 (Gal4-AD)
pAB151-CTD (LexA-BD-CTD)	+	pACT2 (Gal4-AD)
pAB151-CTD Δ HTH (LexA-BD-CTD Δ HTH)	+	pACT2-CTD Δ HTH (Gal4-AD-CTD Δ HTH)
pAB151-CTD (LexA-BD-CTD)	+	pACT2-CTD (Gal4-AD-CTD)

Testirani su kao i pri istraživanju interakcija C-terminalnih domena. Serijska razrjeđenja ovih kultura su nasadena u alikvotima od 5 μ L na SD-Trp-Leu i SD-Trp-Leu-His ploče s 3-AT. Kulture dvostrukih transformanata nasadene su i za testiranje aktivnosti β -galaktozidaze *X-gal colony lift filter assay*-om, koja je osim toga provjerena i ONPG testom.

A

<i>mamac</i>	<i>plijen</i>	-Trp-Leu	-Trp-Leu-His + 5 mM 3AT	<i>X-Gal</i>
<i>CTDΔHTH</i>	<i>Gal4-AD</i>			-
<i>CTD</i>	<i>Gal4-AD</i>			-
<i>LexA-BD</i>	<i>NTD</i>			-
<i>CTDΔHTH</i>	<i>NTD</i>			+/-
<i>CTD</i>	<i>NTD</i>			+

B



Slika 3.3. Interakcije C- i N-terminalne domene seril-tRNA-sintetaze iz *M.barkeri*. **A.** Navedene kombinacije plazmida i/ili konstrukata transformirane su u stanice kvasca soja L40. Serijska razrjeđenja su nasadena na podloge SD-Trp-Leu i SD-Trp-Leu-His s 5mM 3-amino-1,2,4-triazolom. *X-gal colony lift filter assay* je korišten za testiranje β -galaktozidazne aktivnosti. Razvitak obojenja praćen je i indiciran kako slijedi: +++ = 15min-1h; ++ = 1-4h; + = 4-8h; - = 8-16h. **B.** Aktivnost β -galaktozidaze je analizirana i ONPG testom. Jedinice β -galaktozidaze izražene su u Millerovim jedinicama i predstavljaju prosječne vrijednosti rezultata iz 3 ponovljena ONPG testa.

S obzirom na rezultate prikazane na Slici 3.3. očito je da je interakcija između C- i N-terminalne domene slabija ukoliko C-terminalna domena ne posjeduje motiv HTH.

3.2. Interakcije seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa iz *Methanothermobacter thermautotrophicus* s drugim proteinima

3.2.1. Izolacija pozitiva

Prethodno je napravljena analiza proteinskih interakcija sustavom dvaju hibrida u kvascu gdje je kao mamac poslužila seril-tRNA-sintetaza iz *Methanothermobacter thermautotrophicus*-a kao plijen biblioteka cDNA u plazmidima pDEST22 [Trp^R, Amp^R] iz istog organizma. Bilo je potrebno izolirati plazmide iz stanica kvasaca koji su se pokazali kao pozitivni u pretrazi biblioteke cDNA *M. thermautotrophicus*. Plazmidi su izolirani iz kvasca kompletom *QIAprep Spin Miniprep Kit*.

Plazmidi su dalje transformirani u stanice *E. coli* soja DH5 α : elektroporirano je 3 μ L DNA u 50 μ L kompetentnih stanica *E. coli* i odmah nakon toga u smjesu je dodano 800 μ L medija LB te su stanice ostavljene 1h na 37 °C da se oporave. Nakon toga, stanice su nasađene na podloge LB s ampicilinom, kako bi narasle samo kolonije koje sadržavaju plazmide.

Kolonije su izolirane s podloga i prebačene u 4,5 mL tekućeg medija LB s ampicilinom. Prekonoćna kultura korištena je za izolaciju plazmidne DNA s kompletom *QIAprep Spin Miniprep Kit*.

Prisutnost plazmidne DNA potvrđena je elektroforezom izolata na 1%-tnom agaroznom gelu (30min/100V). Mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm procijenjena je koncentracija DNA u izolatima i iznosila je \approx 500 - 1000 ng/ μ L. Kako bi detektirali proteine koji su interagirali sa SerRS, plazmidi (c= 200-500 ng/ μ L) su sa odgovarajućim početnicama (c= 3,2 μ M) poslani na sekvenciranje.

3.2.2. Analiza sekvenci

Dobivene sekvence smo preveli u tekstualni format uz pomoć programa *BioEdit*, te nakon toga napravili BLAST nukleotid-nukleotid sravnjivanje. Pretraga je ograničena na organizam *M. thermoautotrophicus* i optimizirana za visoko slične sekvence. BLAST-om je identificirano 25 proteinskih pozitiva, od kojih 5 sudjeluje u biosintezi proteina. To su:

- ribosomalni protein L3
- 4. regulatorna podjedinica ATP-ovisne 26S proteaze
- H podjedinica DNA-ovisne RNA polimeraze
- B podjedinica DNA-ovisne RNA polimeraze
- arginil-tRNA sintetaza (ArgRS)

Posebno zanimljivim učinila nam se interakcija između ArgRS i SerRS i odlučili smo se dalje u našem istraživanju usredotočiti na potvrdu ove interakcije.

Strategija je uključivala pročišćavanje ova dva proteina sa privjescima His₆ i GST i potvrda interakcije *GST-pulldown assay*-em.

3.2.3. Ugradnja gena za SerRS iz *M.thermautotrophicus* u vektor pET28b

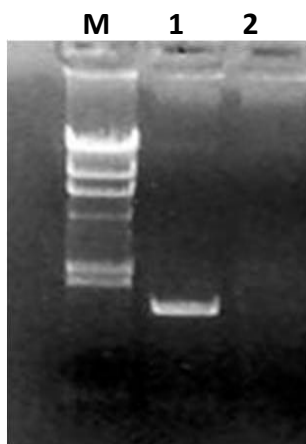
Gen za SerRS (*serS*) umnožen je PCR metodom iz genomske DNA *M. thermoautotrophicus*, pri čemu je reakcijska smjesa sadržavala:

uzvodna početnica (10 μM)	2 μL
nizvodna početnica (10 μM)	2 μL
10X Pfu-pufer	10 μL
gDNA (250ng/μL)	1 μL
dNTP (10mM)	2 μL
Pfu-polimeraza (2.5 U/μL)	2 μL
Re H ₂ O	81 μL
Σ	100 μL

Reakcija je izvedena 4 puta u odvojenim *Eppendorff* epruветama (*large scale* PCR) po sljedećem programu:

	Vrući start	95°C	5 min
30 X	Denaturacija kalupa	95°C	45 s
		55°C	45 s
	Produljivanje	72°C	2 min
	Završno produljivanje	72°C	10 min

Reakcijska smjesa analizirana je na agaroznom gelu i provedena je elektroforeza (30min/100V) (Slika 3.4.). Željeni produkt (*serS*, 1542 bp) je izrezan iz gela i izoliran pomoću kompleta *QIAQuick Gel Extraction Kit*.



Slika 3.4. Agarozna elektroforeza produkta PCR reakcije. M-marker, DNA λ -faga razgrađena s *HindIII*: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 bp. 1-uzorak PCR reakcije, vidljiv je produkt *serS* veličine 1542 bp. 2-negativna kontrola PCR reakcije bez genomske DNA (kalupa).

Vektor (pET28b) i insert (*serS*) smo razgradili restriktivnim enzimima *NdeI* i *HindIII* preko noći na 37°C:

vektor (pET28b)	50 μL	insert (<i>serS</i>)	40 μL
<i>NdeI</i>	2.5 μL	<i>NdeI</i>	1 μL
<i>HindIII</i>	2.5 μL	<i>HindIII</i>	1 μL
pufer NEB2	10 μL	NEB3 pufer	10 μL
Re H ₂ O	35 μL	BSA	1 μL
<hr/>		Re H ₂ O	47 μL
Σ	100 μL	Σ	100 μL

Enzimi su inaktivirani izlaganjem temperaturi od 60 °C u trajanju od 20 minuta. Prije same reakcije ligacije, insert i vektor smo ekstrahirali fenol-kloroformom i istaložili etanolom kako bi pročistili i ukoncentrirali DNA. Koncentraciju vektora (100 ng/ μL) i inserta (50 ng/ μL) smo odredili uspoređujući intenzitet pruga sa intenzitetom markera poznatih koncentracija na agaroznom gelu.

Reakcije ligacije koje su dale najveći broj kolonija bile su one u kojima je omjer vektor:insert bio 1:3 i 1:1:

omjer1:3

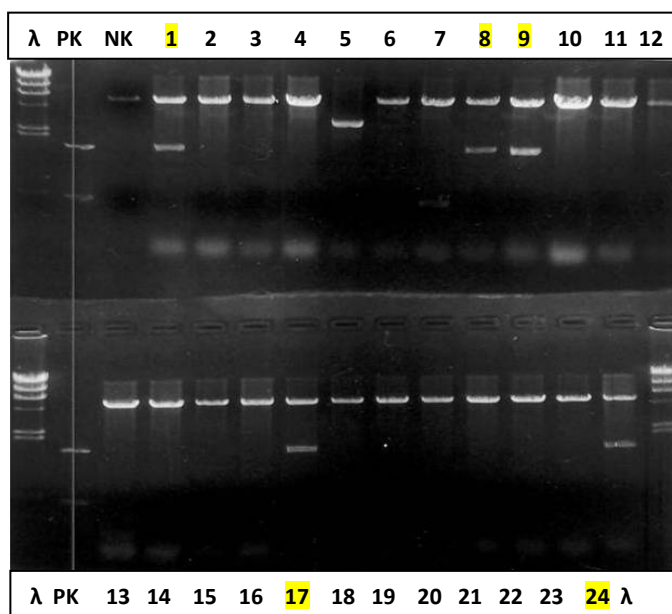
vektor (pET28b)	2 μL
insert (<i>serS</i>)	4 μL
pufer za ligazu 10X	1 μL
T4 DNA-ligaza (5U/ μL)	0.3 μL
Re H ₂ O	2.7 μL
<hr/>	
Σ	10 μL

omjer1:

vektor (pET28b)	2 μL
insert (<i>serS</i>)	2.5 μL
pufer za ligazu 10X	1 μL
T4 DNA-ligaza (5U/ μL)	0.3 μL
Re H ₂ O	5.2 μL
<hr/>	
Σ	10 μL

Reakcije su ostavljene preko noći na 19°C. Nakon toga ligaza je inaktivirana 20min/65°C.

4 μL DNA elektroporirano je u 50 μL kompetentnih stanica *E. coli* soja BL21 nakon čega im je dodano 1 mL medija LB, te su ostavljene da se oporave 1h/37°C i potom su nasađene na podloge LB^{Kan}. Kolonije koje su narasle uzgojene su u tekućem mediju LB^{Kan} i iz njih je izolirana plazmidna DNA koja je analizirana s restrikcijskim enzimima *NdeI* i *HindIII* (Slika 3.5.).



Slika 3.5. Potencijalni konstrukti su analizirani restrikcijskim enzimima s *NdeI/HindIII* – plazmidi koji sadrže insert *serS* (**1,8,9,17 i 24**) daju dodatnu prugu na gelu na položaju pozitivne kontrole (**PK**-samo insert). Ostali izolati koji ne sadrže insert imaju prazne vektore i daju signal gdje i negativna kontrola (**NK**-samo vektor). λ - marker: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 bp.

Dobivenih 5 konstrukata je dodatno provjereno s još 3 restrikcijske analize (Slika 3.6.):

SmaI/EcoRI:

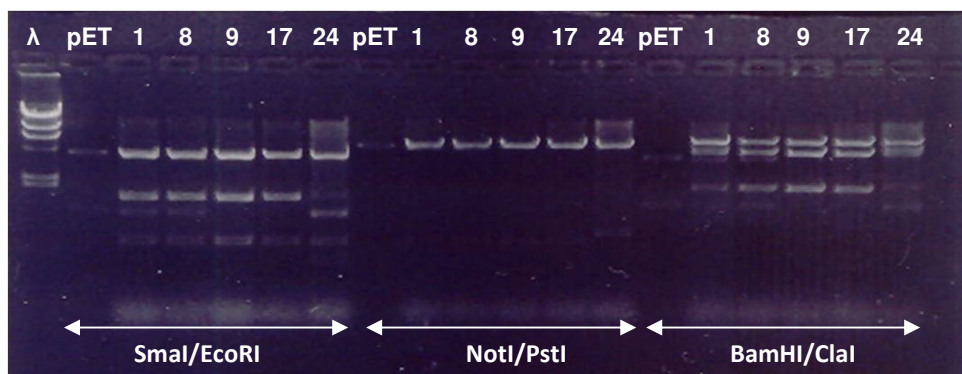
NEB4 pufer	1 μ L
<i>SmaI</i>	0.5 μ L
<i>EcoRI</i>	0.5 μ L
BSA	0.1 μ L
DNA	4 μ L
RNaza	0.5 μ L
Re H ₂ O	3.5 μ L
Σ	10 μ L

NotI/PstI:

NEB3 pufer	1 μ L
<i>NotI</i>	0.5 μ L
<i>PstI</i>	0.5 μ L
BSA	0.1 μ L
DNA	4 μ L
RNaza	0.5 μ L
Re H ₂ O	3.5 μ L
Σ	10 μ L

BamHI/ClaI:

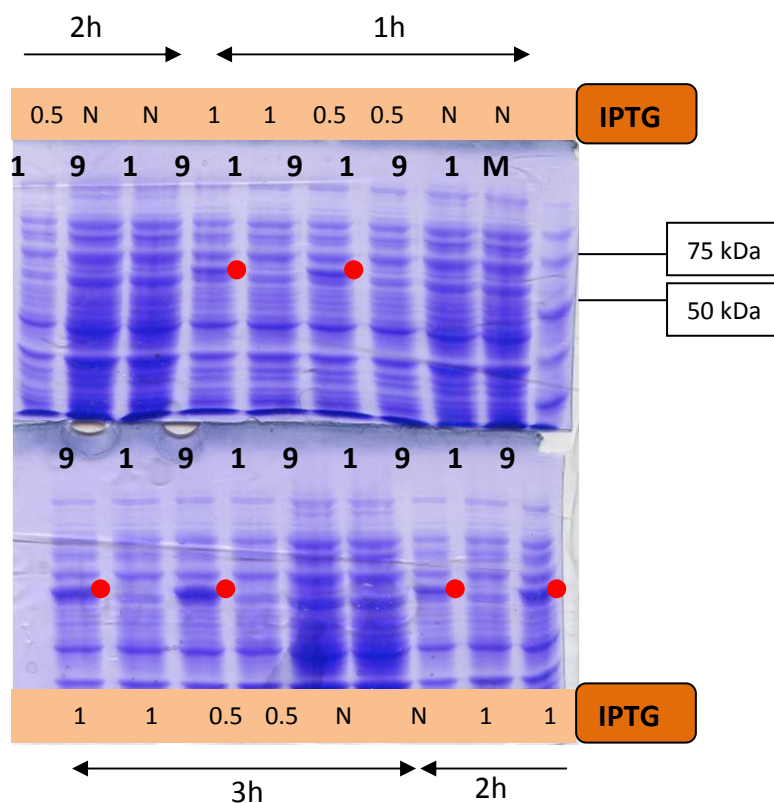
NEB4 pufer	1 μ L
<i>BamHI</i>	0.1 μ L
<i>ClaI</i>	0.5 μ L
BSA	0.1 μ L
DNA	4 μ L
RNaza	0.5 μ L
Re H ₂ O	3.5 μ L
Σ	10 μ L



Slika 3.6. Dodatne restrikcije potencijalnih konstrukata **1,8,9,17 i 24** sa: **SmaI/EcoRI** (treba dati fragmente od 0.7, 1.4 i 4.3kB); **NotI/PstI** (treba dati fragmente od 0.8 i 6.2kB) i **BamHI/ClaI** (treba dati fragmente od 1.9 i 5.0kB). Konstrukti 1 i 9 vrlo čisto daju očekivane fragmente u svim reakcijama. **λ**- DNA λ -faga razgrađena s HindIII: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 bp. **pET**- kontrola, prazan pET28b vektor.

3.2.4. Pročišćavanje His₆-SerRS

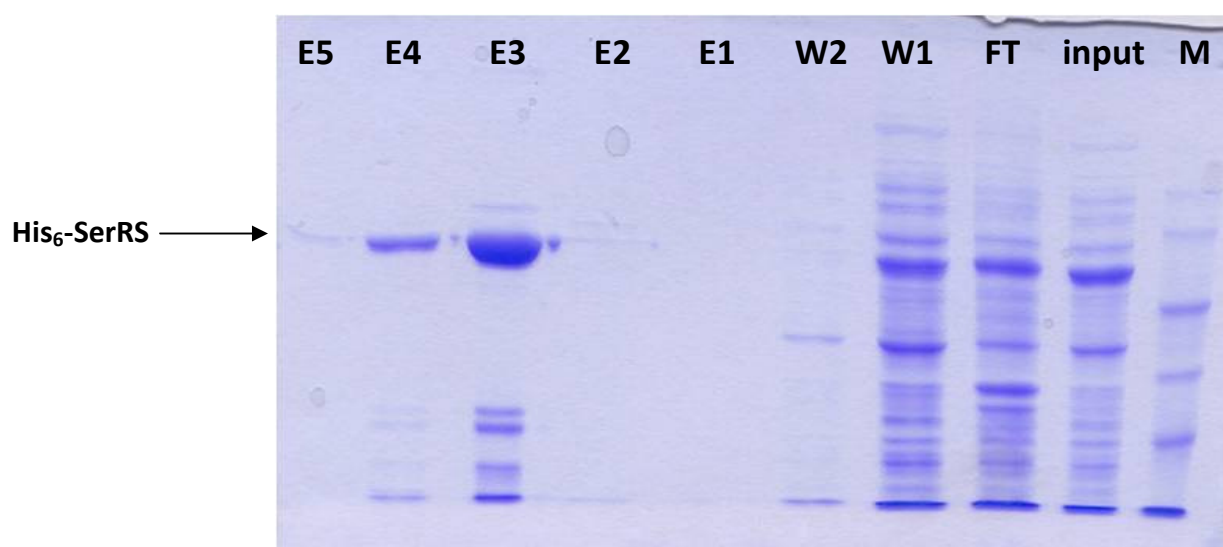
Za probnu indukciju s IPTG-om izabrani su konstrukti 1 i 9. Njihove prekončne kulture su razrijeđene 1:20, te su uzgajani do $OD_{600}=0.6$. Ekspresija proteina je inducirana s 0.5mM i 1mM IPTG, i periodički su odstranjeni uzorci kultura u vremenima 1, 2 i 3 sata nakon indukcije. Uzorci su centrifugirani 1min/10000xg, talozi resuspendirani u H₂O i pomiješani sa 4X puferom za nanošenje uzoraka. Stavljani su u kipuću vodu 5min te nanoseni na SDS gel za elektroforezu, nakon koje su gelovi tretirani *Coomassie* bojom (Slika 3.7.).



Slika 3.7. Probna indukcija klonova 1 i 9 s **0.5** μ L i **1** μ L 1mM **IPTG**-om, uzorci uzimani **1.**, **2.** i **3.** sata rasta kulture nakon indukcije. Na gelu se vidi da konstrukt 9 pojačano izražava protein veličine između 75 i 50kDa (crvena točka), što odgovara His₆-SerRS (59.7kDa). **M**-marker.

Konstrukt 9 je dao puno bolju ekspresiju proteina, te je on korišten za nadekspresiju His₆-SerRS. Noćna kultura je razrijeđena 1:100 u mediju LB^{Kan} i uzgojena do OD₆₀₀=0.6. Indukcija je napravljena s 0.5mM IPTG-om 2.5h na 37°C. Suspenzija je centrifugirana na 5000xg 10min i LB je odstranjen. Talog koji je sadržavao stanice je resuspendiran u puferu A za lizu, te su dodani lizozim i DNaza. Stanice su sonicirane u ciklusima 4x1min između kojih je bila pauza od 1min. Lizat stanica je centrifugiran 20min na 5000xg, a supernatant (proteinski ekstrakt) prebačen u *Eppendorff* epruvete od 2mL i centrifugiran 1h na 12000xg. Supernatanti su spojeni i profiltrirani kroz *Milipore* filter (0.2 μ m).

Suspenzija NTA kuglica (*Novagen*) nanosena je u kolonu. Privjesak His₆ ima veliki afinitet za Ni-NTA kuglice i one su tretirane sa puferom koji sadrži nikal („*charging buffer*“), isprane su puferom A te je na njih nanosen proteinski ekstrakt koji je propušten kroz kolonu. Proteini koji se nisu vezali („*flow through*“) skupljeni su u jednu frakciju. Nakon toga slijedi ispiranje s 25mL pufera A („*wash 1*“) i 12mL pufera B („*wash 2*“). Na ispranoj koloni sada se nalazi vezan uglavnom His₆-SerRS kojeg eluiramo s puferom C u 2 koraka („*elution 1*“ i „*elution 2*“). Sve ove frakcije su skupljene i analizirane elektroforezom na SDS gelu.



Slika 3.8. Frakcije pojedinih faza u pročišćavanju His₆-SerRS. S desna na lijevo: **M**-marker; **input**-proteinski ekstrakt nakon lize stanica; **FT**-aliquot ekstrakta nakon propuštanja kroz kolonu, sadrži većinu proteina osim His₆-SerRS; **W1**-aliquot ekstrakta nakon prvog ispiranja, sadrži mnoge proteine, kao i FT; **W2**-aliquot ekstrakta nakon drugog ispiranja; **E1**, **E2**, **E3**, **E4** i **E5**-eluati nakon ispiranja kolone sa puferom koji sadrži imidazol koji uzrokuje otpuštanje His₆-SerRS sa kolone. Najviše His₆-SerRS ima u E3 i E4.

3.2.5. Ugradnja gena za ArgRS iz *M.thermautotrophicus* u vektor pGEX-6P-2

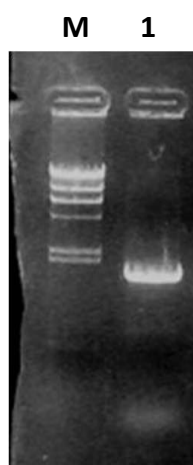
Gen za ArgRS (*argS*) kao i *serS* umnožen je iz genomske DNA *M. thermautotrophicus* uz prikladne početnice:

uzvodna početnica (10 μ M)	2 μ L
nizvodna početnica (10 μ M)	2 μ L
Pfu pufer 10X	10 μ L
gDNA (250ng/ μ L)	0.7 μ L
dNTP (10mM)	2 μ L
Pfu polimeraza (2.5U/ μ L)	2 μ L
Re H ₂ O	81.3 μ L
Σ	100 μ L

Reakcija je također izvedena 4 puta u odvojenim *Eppendorff* epruветama (*large scale* PCR) po programu:

	Vrući start	95°C	5 min
30 X	{	Denaturacija kalupa	95°C 45 s
		Vežanje početnica	52°C 45 s
		Produljivanje	72°C 2 min
	Završno produljivanje	72°C	10 min

Nakon završetka lančane reakcije polimerazom, reakcijska smjesa je analizirana elektroforezom (Slika 3.9.)



Slika 3.9. Analiza PCR produkta agaroznom elektroforezom. M-marker, DNA λ -faga razgrađena s *Hind*III: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 bp. 1-uzorak PCR reakcije, vidljiv je produkt, *argS* veličine 1683 bp.

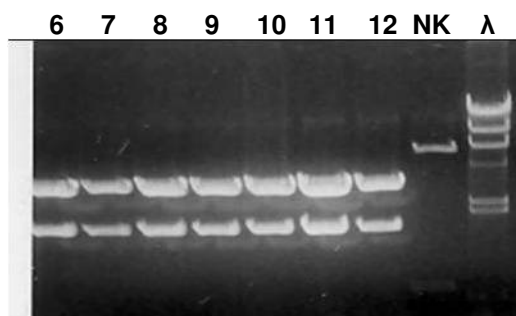
Željeni produkt je izrezan iz gela i DNA je izolirana kompletom *QIAquick Gel Extraction Kit* te je on, kao i vektor razgrađen restriktivnim enzimima *Bam*HI i *Xho*I kako bi ih mogli spojiti u reakciji ligacije:

vektor (pGEX-6P-2)	50 μ L	insert (<i>argS</i>)	50 μ L
NEB2 pufer	7 μ L	NEB2 pufer	7 μ L
<i>Bam</i> HI	2 μ L	<i>Bam</i> HI	0.5 μ L
<i>Xho</i> I	2 μ L	<i>Xho</i> I	0.5 μ L
BSA	1 μ L	BSA	1 μ L
Re H ₂ O	8 μ L	Re H ₂ O	11 μ L
Σ	70 μ L	Σ	70 μ L

Reakcija ligacije sadržavala je:

vektor (pGEX-6P-2)	1 μ L
insert (<i>argS</i>)	8 μ L
pufer za ligazu 10X	2 μ L
T4 DNA ligaza (5U/ μ L)	0.3 μ L
Re H ₂ O	8.7 μ L
Σ	10 μ L

Ova reakcija ostavljena je preko noći, ligaza je inaktivirana 20min na 65°C. Po 3-4 μ L DNA iz ove reakcije elektroporirano je u kompetentne *E. coli*, nakon čega su one nasadene na LB^{Amp} podloge. Kolonije koje su izrasle, prenešene su ezom u tekući medij LB^{Amp}. Iz takvih prekonocnih kultura izolirana je plazmidna DNA koja je razgrađena sa *Bam*HI i *Xho*I (Slika 3.10.).

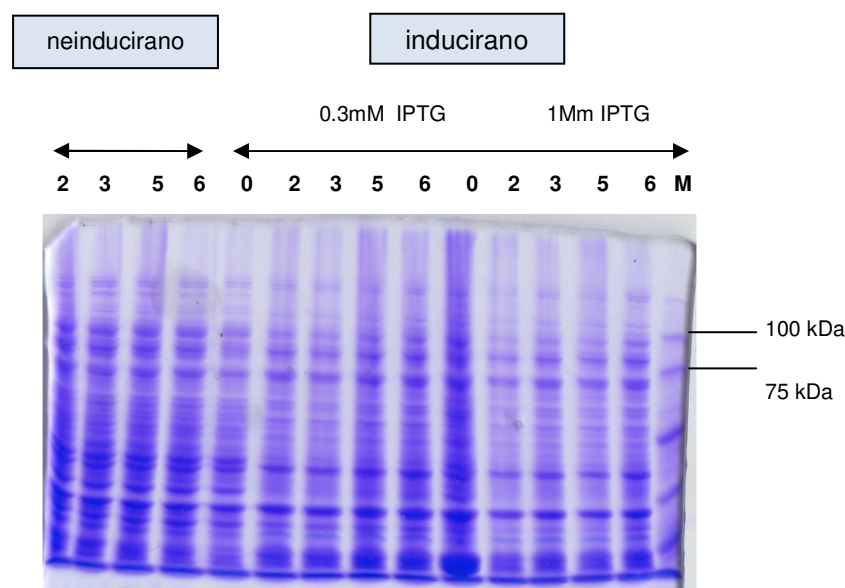


Slika 3.10. Konstrukti, pGEX-6P-2 s insertom *argS* (6,7,8,9,10,11,12) razgrađeni s *Bam*HI/*Xho*I, daju fragmente od 3.5 i 1.5kb (vektor i insert). **K**-kontrola, pET28b vektor razgrađen s *Bam*HI/*Xho*I, daje fragmente od 0.6 i 6.3kb. **λ**-marker, DNA faga λ razgrađena s *Hind*III: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 bp.

Restriksijska analiza izolata plazmidne DNA s *Bam*HI i *Xho*I pokazala da 21/24 analizirane kolonije posjeduju vektor s insertom (efikasnost ligacijske reakcije je čak 88%).

3.2.6. Pročišćavanje GST-ArgRS

Za testiranje ekspresije fuzijskog proteina GST-ArgRS u soju BL21 postavljene su noćne kulture odabranih konstrukata 1, 2, 3, 5 i 6. Kulture su razrijeđene u omjeru 1:50 i uzgojene do $OD_{600}=0.6-0.7$, te inducirane s 0.3mM i 1mM IPTG-om. Nakon indukcije u vremenu od 2h na 37°C kulture su centrifugirane 1min na 10000xg, talog resuspendiran u H₂O, te uzorci pomiješani sa 4X puferom za nanošenje uzoraka i analizirani SDS elektroforezom (Slika 3.11.).

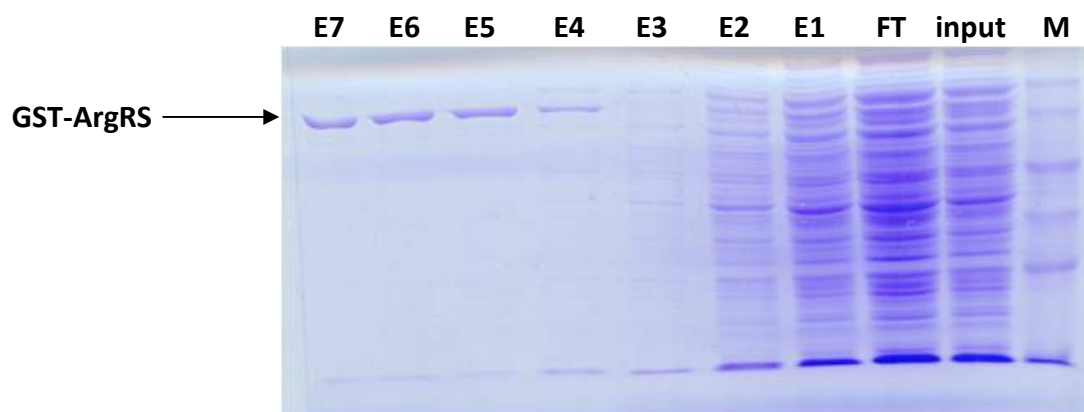


Slika 3.11. Probna indukcija GST-ArgRS u klonovima 2, 3, 5 i 6. GST-ArgRS (90kDa) je između 2. i 3. pruge markera (između 100kDa i 75kDa), potvrđeno Westernom. 0- prazan vektor, pGEX-6P-2.

U daljnjem pročišćavanju GST-ArgRS je korišten konstrukt 2. Prekonoćna kultura je razrijeđena 1:50 u LB^{Amp}. Stanice su uzgajane bez dodatka IPTG-a 4h na 37°C. Kulture su centrifugirane 10min/5000xg, supernatant je odstranjen i talog resuspendiran u ReH₂O nakon čega je opet suspenzija stanica centrifugirana 10min na 5000xg. Supernatant je

odstranjen i talog resuspendiran u puferu A, dodani su lizozim i DNaza te je suspenzija inkubirana 10min na 4°C. Stanice su sonicirane 4x1min s pauzom od 1min između perioda sonikacije. Suspenzija je centrifugirana 20min na 5000xg. Supernatant (proteinski ekstrakt) je prebačen u *Eppendorff* epruvete i centrifugiran 1h na 10000xg pri 4°C, nakon čega su supernatanti spojeni.

Suspenzija glutation sefaroze 4B je prebačena u kolonu i isprana 3X sa 5mL ReH₂O (4°C). Nakon toga je isprana u puferu za vezanje („*binding buffer*“) i nanesen je proteinski ekstrakt („*flow through*“). Kolona je zatim 2 puta isprana sa puferom za vezanje („*wash1*“ i „*wash2*“). GST-ArgRS eluiran je 10X s po 1mL pufera za eluciju („*elution buffer*“) koji je inkubiran na koloni nekoliko minuta. Sve frakcije koje su prošle kroz kolonu su skupljene i analizirane SDS elektroforezom (Slika 3.12.).



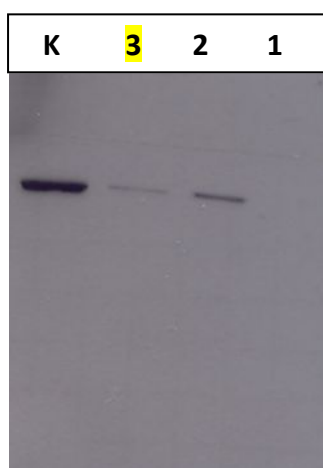
Slika 3.12. Analiza frakcija u pročišćavanju GST-ArgRS. **M**-markeri; **input**-proteinski ekstrakt koji je nanešen na kolonu; **FT**-„*flow through*“, sadrži sve proteine osim GST-ArgRS koji se veže na kolonu; **E1, E2, E3, E4, E5, E6 i E7**-frakcije eluata koje sadrže GST-ArgRS). U GST-*pull-down assay*-u korištena je frakcija E5.

3.2.7. GST-pulldown assay sa GST-ArgRS i His₆-SerRS

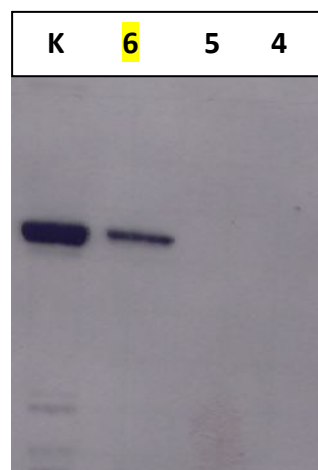
Suspenzija kuglica *Glutahtion Sepharose 4B* (*Pharmacia Biotech*) je isprana s ReH₂O i inkubirana s puferom za vezanje. Kompleksi GST-ArgRS i His₆-SerRS su načinjeni tako da su proteini inkubirani u puferu za vezanje i ostavljeni 10min na sobnoj temperaturi. Po 50μL kuglica je razdjeljeno u 3 *Eppendorff* epruvete u koje su naneseni redom:

- A. 5 μg His₆-SerRS
- B. 5 μg GST-ArgRS
- C. 30 μg kompleksa (GST-ArgRS + His₆-SerRS)

Proteini su ostavljeni na kuglicama preko noći na 4°C. Suspenzija proteina i kuglica prenesena je na kolone i 4 puta isprana s puferom za vezanje. Kuglice su prenesene u *Eppendorff* epruvete, pomiješane s vodom i puferom za nanošenje uzoraka, 5 minuta skuhane u kipućoj vodi i nanese na SDS gel radi elektroforeze. Proteini su nakon SDS elektroforeze preneseni na nitroceluloznu membranu na kojoj su inkubirani sa anti-GST- i anti-His protutijelima. Detektirani su kemiluminescencijom.



Slika 3.13. Western analiza s anti-GST protutijelima. **K**-kontrola, GST-ArgRS; **3**-uzorak C, kompleks GST-ArgRS i His₆-SerRS je zadržan na kuglicama jer se GST-ArgRS vezao na njih, signal daje GST-ArgRS; **2**-uzorak B, GST-ArgRS koji se vezao na kuglice; **1**-uzorak A, His₆-SerRS se nije vezao na kuglice jer nema GST tag te nema signala.

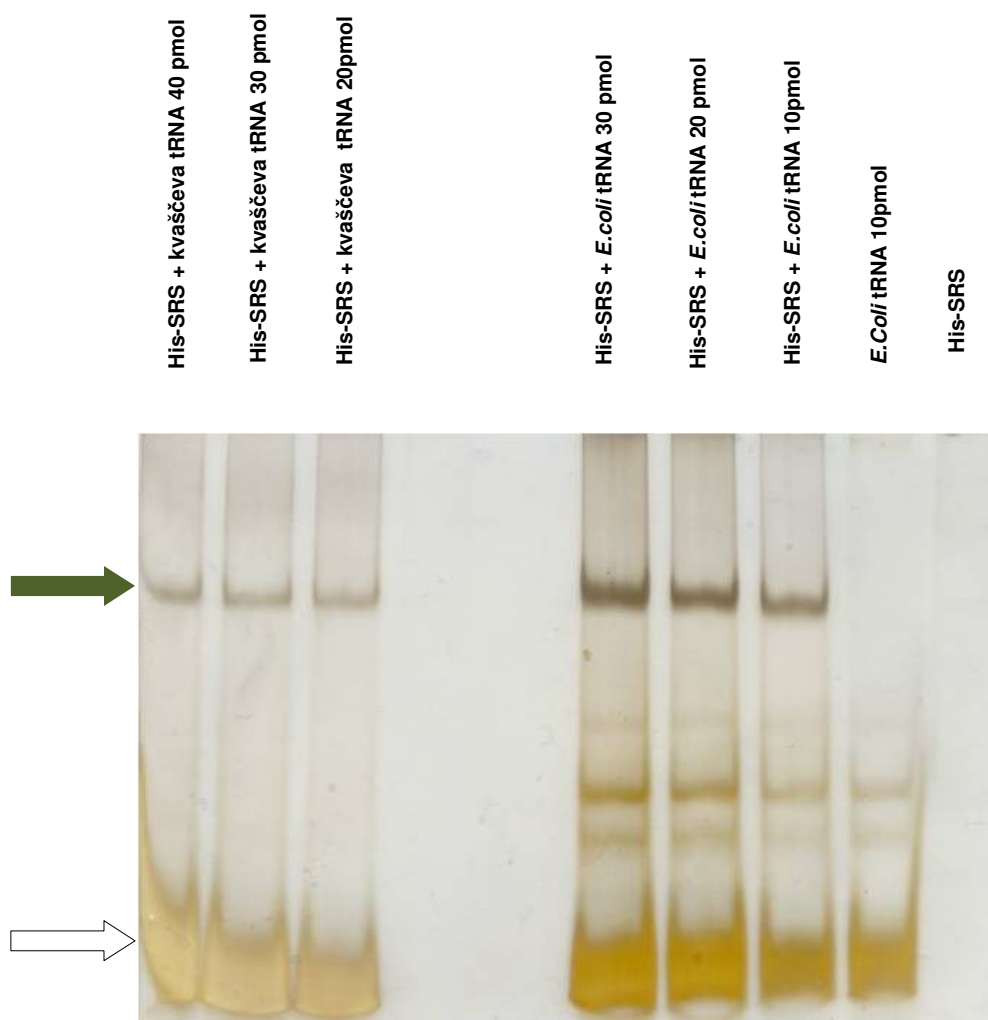


Slika 3.14. Western analiza s anti-His protutijelima. **K**-kontrola, His₆-SerRS; **6**-uzorak C, kompleks GST-ArgRS i His₆-SerRS koji je zadržan na kuglicama jer se GST-ArgRS vezao na njih, signal daje His₆-SerRS; **5**-uzorak B, GST-ArgRS koji se vezao na kuglice, ne daje signal; **4**-uzorak A, His₆-SerRS se nije vezao na kuglice jer nema GST tag i ne daje signal.

Rezultati Western analize potvrdili su interakciju GST-ArgRS i His₆-SerRS. Ovaj kompleks ostaje vezan na *Glutathion Sepharose 4B* kuglicama jer se GST-ArgRS veže na njih svojim GST privjeskom. Prisutnost oba proteina vidljiva je u stupcima 3 i 6 na Slikama **3.13.** i **3.14.** u kojima su na SDS gelu analizirani uzorci sa kompleksom GST-ArgRS i His₆-SerRS. U stupcu 3 na Slici **3.13.** GST-ArgRS detektiran je anti-GST protutijelima, a u stupcu 6 na Slici **3.14.** His₆-SerRS detektiran je anti-His protutijelima.

3.3. Ispitivanje vezanja prokariotske i eukariotske tRNA od strane SerRS metnogenog tipa iz *M.thermautotrophicus* nenedaturirajućom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu

His₆-SerRS inkubiran je sa ukupnom tRNA iz *S. cerevisiae* te *E. coli* rastućih koncentracija 10min na 37°C u puferu (25mM HEPES pH=7.0, 5mM MgCl₂). Ovi kompleksi podvrgnuti su elektroforezi na 9%-tnom akrilamid/bisakrilamidnom gelu (19:1) 2h na 100V i 4°C. Gel je obojen srebrom.



Slika 3.15. Detekcija nekovalentnih kompleksa SerRS i tRNA. SerRS iz *M. thermautotrophicus* stvara komplekse i s eukariotskom (*S.cerevisiae*) i s prokariotskom (*E.coli*) tRNA (strelica). Na dnu je vidljiva nevezana tRNA (bijela strelica).

4. RASPRAVA

4.1. Interakcije proteinskih domena seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa iz *Methanosarcine barkeri*

Prethodno određena kristalna struktura SerRS metanogenog tipa iz *M. barkeri* pokazala je dimernu prirodu enzima, u kojoj se svaki monomer sastojao od katalitičke domene i N-terminalnog nastavka (67), koji postoji i kod *E.coli* SerRS (68). Dok katalitička domena sadrži samo aktivno mjesto enzima, N-terminalna domena služi za prepoznavanje pripadne tRNA (70). Smatra se da su u početku aaRS imale samo katalitičke domene, a N-terminalne domene koje su nastale mnogostrukim spajanjem gena su im pridodane kasnije. Ovim putem nastale su moderne aaRS koje su mogle specifično prepoznati pripadne molekule tRNA, pa se tako poboljšao način njihovog odabiranja u odnosu na nepripadne tRNA u stanici, a samim time i točnost i brzina djelovanja samih enzima (71).

4.1.1. Struktura SerRS bakterijskog tipa

Kod SerRS bakterijskog tipa, C-terminalna domena sadrži aktivno mjesto koje se sastoji od tri evolucijski očuvana motiva (motiv I, II i III) karakteristična za aaRS razreda II. N-terminalna domena, koju čini 100 aminokiselina formira karakterističnu antiparalelnu zavojitu uzvojniju (engl. *coiled coil*) dugačku 60 Å, tzv. *helikalnu ruku* (68). Ona je izložena otapalu i ima ključnu ulogu u specifičnom prepoznavanju tRNA^{Ser}. Pri vezanju tRNA helikalna ruka je stabilizirana i veže se između T Ψ C petlje i varijabilne ruke tRNA. Uspostavljeni kontakt sa glavnom okosnicom varijabilne ruke seže do 6. baznog para. SerRS prepoznaje uglavnom trodimenzionalnu strukturu tRNA^{Ser} (68), pri čemu nema interakcije sa specifičnim bazama pripadne tRNA^{Ser} (73) već se smatra da N-domene prepoznaju uglavnom generalnu strukturu tRNA (fosfatno-šećernu okosnicu), a prisutnost C-terminalne domene je ključna za specifičnost prepoznavanja.

Samo vezanje tRNA^{Ser} događa se u dva koraka: početno prepoznavanje i „usidranje“ koje uvelike ovisi o kontaktu helikalne ruke s varijabilnom rukom tRNA, te pravilno pozicioniranje 3' kraja tRNA u aktivnom mjestu (68). Delecija ove helikalne ruke u N-terminalnoj domeni drastično smanjuje aminoacilacijsku aktivnost i sposobnost prepoznavanja pripadne tRNA, iako katalitička aktivnost svojstvena C-terminalnoj domeni nije narušena - krnji enzim još uvijek može katalizirati nastanak seril-adenilata (72). Bitna karakteristika bakterijskih SerRS je da vežu molekule tRNA preko dimera, *in trans*. Naime, N-terminalna domena jednog monomera uspostavlja kontakt sa varijabilnom rukom

tRNA^{Ser} dok se akceptorska peteljka te iste tRNA^{Ser} „usidruje“ u katalitičko mjesto u C-terminalnoj domeni druge monomerne podjedinice (69).

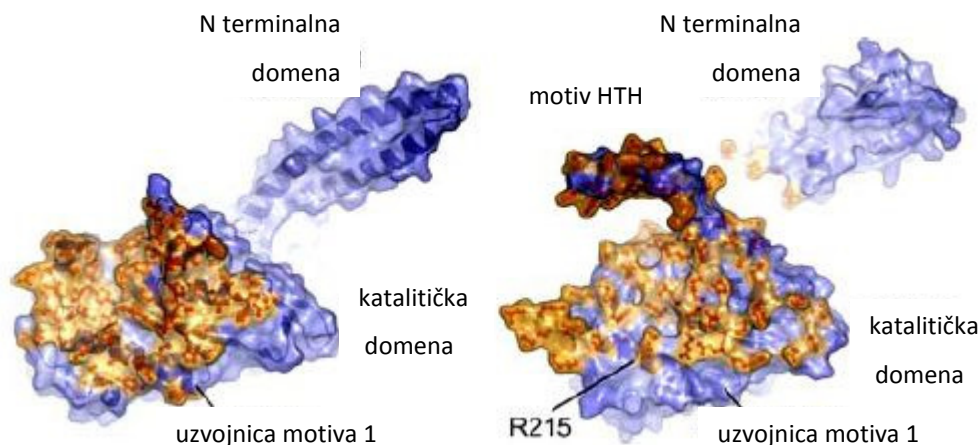
4.1.2. Sturktura metanogenog tipa SerRS iz *M. barkeri*

Kristalna struktura SerRS metanogenog tipa iz *M. barkeri* (67) otkrila je da je ona građena od N- i C-terminalnih domena povezanih kratkim tzv. *linker* peptidom. Katalitičko mjesto, koje se nalazi u C-terminalnoj domeni čine antiparalelni β lanci okruženi α uzvojnicaama kao i kod SerRS bakterijskog tipa. Usprkos tome, sami načini vezanja suptrata bitno se razlikuju kod SerRS bakterijskog i metanogenog tipa, s obzirom da je u katalitičkom mjestu metanogenog tipa prisutan i ion cinka, umetnut u duboki procjep aktivnog mjesta (67). Iako vjerojatno slične uloge i jednakog položaja s obzirom na katalitičku domenu, struktura N-terminalne domene metanogenog tipa SerRS je bitno drugačija od one bakterijskog tipa. Kod metanogenog tipa enzima ova domena je znatno veća, a načinjena je od šestrolančanog antiparalelnog β lista prekrivenog α uzvojnicaama s jedne strane (H1, H2, H4) (67). Njezina uloga još nije sa sigurnošću utvrđena, ali se pretpostavlja da jednako kao i N-terminalna domena bakterijskog tipa enzima služi vezanju tRNA.

4.1.3. Uloga motiva HTH u interakciji C-terminalnih domena

Metanogeni tip SerRS iz *M. barkeri* sadrži specifičan motiv HTH umetnut između motiva I i II C-terminalne domene. Struktura otkriva da HTH motiv jedne podjedinice monomera prelazi dvostruku os dimera i pozicionira se iznad C-terminalne domene drugog monomera. HTH motivi dviju podjedinica su međusobno paralelni i formiraju strukturu od 4 uzvojnice koja prekriva katalitičke srži C-terminalnih domena (67).

Iz kristalne strukture je vidljivo da uz visoko očuvani motiv I svojstven svim sintetazama razreda II, motiv HTH značajno povećava dimerizacijsko sučelje SerRS metanogenog tipa. Heliks 9 (H9) jednog monomera je u interakciji sa istim H9 drugog monomera. Ovom interakcijom površina dimerizacijskog sučelja povećana je s 2010 Å² (koliko pridonosi motiv I) na 3760 Å² po monomeru (67). Ovakvo povećanje površine pridonosi stabilizaciji dimera i može biti od velike biološke važnosti za metanogene arheje s obzirom da mnoge od njih žive u ekstremnim uvjetima okoliša (67).

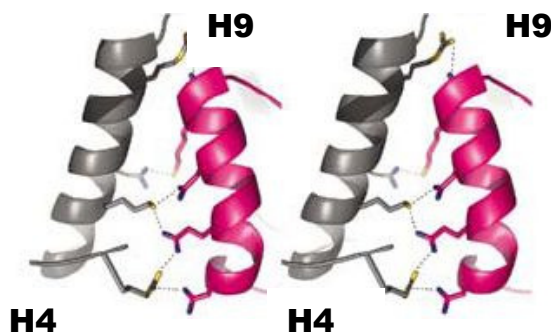


Slika 4.1. Usporedba dimerizacijskih površina SerRS bakterijskog (lijevo) i metanogenog tipa (desno). Površine koje čine dimerizacijsko sučelje prikazane su narančasto (slika preuzeta iz Bilokapic 2009).

Našim rezultatima eksperimentalno su potvrđena su predviđanja utemeljena na tumačenju kristalne strukture - interakcija potpunih C-terminalnih domena pokazala se znatno jačom u odnosu na interakcije C-terminalnih domena koje nisu posjedovale motiv HTH. Time smo potvrdili da je jedna od funkcija motiva HTH stabilizacija dimera povećavanjem dimerizacijske površine.

4.1.4. Uloga motiva HTH u interakciji C- i N-terminalne domene

Osim stabiliziranja dimera, proučavanjem kristalne strukture uočena je još jedna moguća uloga motiva HTH. Naime, dvije vanjske uzvojnice motiva HTH (H9) formiraju ionske mostove i vodikove veze sa zadnjom uzvojnicom N-terminalne domene (H4). Ovakav položaj i interakcija s H4 uzvojnicom sugeriraju da je funkcija ovog motiva pravilno pozicioniranje N-terminalne domene u odnosu na katalitičku domenu (67).



Slika 4.2. Prikaz heliksa 9 (H9) N-terminalne domene i heliksa 4 (H4) motiva HTH u interakciji preko ionskih mostova i vodikovih veza. Dijelovi različitih monomernih podjedinica su prikazani sivo i ružičasto (preuzeto iz Bilokapić 2006).

Naši eksperimentalni rezultati pokazuju da iako slaba, interakcija između N- i C-terminalne domene postoji, za razliku od slučaja kada C-terminalnoj domeni uklonimo motiv HTH. Tada interakcija dvaju domena ne samo da slabi, već je upitno njezino postojanje, s obzirom je razina transkripcije reporterskih gena detektirana u metodi dvaju hibrida vrlo blizu bazalnim (kontrolnim) vrijednostima.

Iz naših rezultata proizlazi da ne postoji interakcija N- i C-terminalne domene *in trans* ukoliko nema motiva HTH u katalitičkoj domeni. Dakle, možemo zaključiti da je uloga HTH motiva izuzetno važna u pozicioniranju N-terminalne domene iznad katalitičke domene jer je iz kristalne strukture je vidljivo da te dvije domene povezuje samo kratki peptid linker. Eksperimentima sustava dvaju hibrida s delecijским mutantima potvrdili smo da motiv HTH očigledno potpomaže orijentaciju N-terminalne domene za koju se pretpostavlja da je zbog prisutnosti linkera inače vrlo fleksibilna i zaključujemo da je uloga motiva HTH stabilizacija interakcije i dodatno uspostavljena komunikacija između dvije domene *in cis*.

4.2. Interakcija seril-tRNA-sintetaze iz *M. thermautotrophicus* s arginil-tRNA-sintetazom

Interakcija između SerRS i ArgRS u *M. thermautotrophicus* utvrđena metodom dvaju hibrida potvrđena je kombinacijom metoda „GST-pulldown assay“ i Western analize.

Ovo nije jedina interakcija između aminoacil-tRNA-sintetaza u ovoj metanogenoj arheji. Prethodno je ustanovljeno da se tri aminoacil-tRNA-sintetaze iz ovog organizma udružuju u kompleks: lizil-, prolil- i leucil-tRNA sintetaza (LysRS, ProRS i LeuRS). Praćenjem aktivnosti pojedinih sintetaza kada se nalaze u kompleksu i uspoređujući je sa aktivnošću samostalnih (slobodnih) enzima, uočeno je da se katalitička efikasnost aminoacilacije tRNA^{Lys} i tRNA^{Pro} od strane pripadnih aaRS povećava kada se LysRS i ProRS nalaze u kompleksu sa LeuRS (74). S obzirom na ovakvu ulogu multisintetaznog kompleksa LysRS-ProRS-LeuRS moguće je da i kompleks pronađen našim istraživanjem ima sličnu ulogu - povećanje učinkovitosti aminoacilacijske reakcije jednog ili obaju enzima.

Za razliku od LysRS, ProRS, LeuRS te ArgRS koje su osim u arhealnom pronađene i u multisintetaznom kompleksu kod sisavaca, tzv. MARS-u, SerRS ne sudjeluje u njegovoj izgradnji (75). Ovo je prvi organizam u kojem je pronađena interakcija SerRS i ArgRS. Moguće je da je za nju odgovorna sama priroda SerRS iz *M. thermotrophicus* koja kod metanogenih arheja pokazuje bitno drugačiju strukturu od SerRS bakterijskog tipa koji je prisutan u ostalim organizmima. Stoga je moguće da ove razlike u strukturi enzima metanogenog tipa omogućavaju i drugačija vezna mjesta i površine prikladne za interakcije s drugim proteinima, pa tako i ustanovljenu interakciju s arginil-tRNA-sintetazom.

Za MARS iz sisavaca dokazano je da je vrlo blisko povezan sa sintezom proteina, supstratima koje sintetizira direktno opskrbljujući ribosom na kojem se odvija sinteza polipeptida (77). Radioaktivno obilježena tRNA koja je elektroporacijom unesena u CHO stanice nije mogla biti iskorištena za sintezu proteina, za razliku od radioaktivno obilježenih aminokiselina (76). Ovime je dokazano da se samo endogene tRNA, aminoacilirane unutar multisintetaznog kompleksa mogu koristiti u biosintezi proteina, te da se ove dvije „populacije“ tRNA nisu pomiješale unutar stanice. Svi ovi podaci sugeriraju da je funkcija ovog multisintetaznih kompleksa usmjeravanje supstrata, engl. „*substrate channeling*“, proces u kojem se aminoacilirana tRNA (supstrat) direktno prenosi na ribosom, što bitno ubrzava sam proces sinteze polipeptidnog lanca. Ovu teoriju podupiru i istraživanja koja pokazuju da postoji i veza između transkripcijskog faktora EF-1 α (njegova funkcija je da prenosi aminoaciliranu tRNA sa sintetaze na ribosom) i multisintetaznih kompleksa (77). Kod arheja postoji analogna veza, a to je interakcija LeuRS i EF-1A, koja znatno povećava stopu aminoacilacije tRNA^{Leu} i smatra se da također služi da bi se novosintetizirana tRNA^{Leu} s aaRS direktno prenijela na ribosom.

Točan mehanizam funkcioniranja multisintetaznih kompleksa u arheja treba još detaljno proučiti, međutim osim povećanja stope aminoacilacije tRNA, ovi kompleksi (kao i eukariotski) direktno „predaju“ aminoacilirane tRNA od sintetaza ribosomu prilikom sinteze proteina, te povezuju proces translacije s drugim procesima u stanici.

4.3. Prepoznavanje tRNA iz svih domena života od strane SerRS iz *M. thermautotrophicus*

Za izoakceptorsku obitelj tRNA^{Ser} molekula karakterističan je visoko konzervirani nukleotid G73 i varijabilna ruka sastavljena od 16-17 nukleotida (16). Varijabilna ruka je po duljini sličnija bakterijskom tipu tRNA^{Ser}, dok je po broju nesparenih nukleotida pri bazi varijabilne ruke sličnija kvaščevom tipu tRNA. Osim toga, kod metanogenih tRNA^{Ser} varira veličina petlje DHU čija je funkcija kod *E. coli* orijetiranje varijabilne ruke u kompleksu sa SerRS (78). Mnoge metanogene tRNA^{Ser} imaju nukleotide na položajima 17 i 17A u području petlje DHU, a nedostaje im nukleotid na poziciji 20A koji je prisutan kod tRNA^{Ser} bakterijskih i eukariotskih izoakceptora, kao i nukleotid 20B inače prisutan kod svih bakterijskih i organelnih tRNA^{Ser} (16). Dakle, možemo zaključiti da izoakceptorske tRNA^{Ser} iz metanogenih areheja posjeduju karakteristike eukariotskih i bakterijskih tRNA.

Osim duljine varijabilne ruke, za pravilno prepoznavanje tRNA^{Ser} od strane SerRS bitna je i njezina orijentacija (79). Kod *E. coli* nju orijentira petlja DHU (80), a s obzirom da se struktura ove regije dosta razlikuje kod arheja, one vjerojatno imaju neki drugi mehanizam kojim to čine.

Proučavanjem strukture metanogenih tRNA^{Ser} zbog njihovih „mješovitih“ svojstava koja su kombinacija karakteristika bakterijskih i eukariotskih tRNA^{Ser} nameće se pitanje na koji način ih SerRS prepoznaje. Zbog činjenice da ovaj enzim mora vezati ovakvu „mješovitu“ tRNA^{Ser} lako je moguće da prepoznaje i eukariotske i prokariotske tRNA^{Ser}, što je i potvrđeno. Eksperimentalno je dokazano da metanogeni tip SerRS iz *Methanococcus janaschii* i *M. maripaludis* tvori komplekse, tj. prepoznaje tRNA^{Ser} iz sve tri domene života (16).

U našem istraživanju to je dokazano i za SerRS iz *M. thermautotrophicus*, a ovakvi rezultati upućuju na očitu konzerviranost određenih serinskih determinanti kroz sve tri domene.

5. ZAKLJUČAK

- motiv HTH stabilizira dimerizacijsko sučelje dvaju C-terminalnih domena metanogenog tipa SerRS iz *Methanosarcine barkeri*
- ukoliko nema motiva HTH u C-terminalnoj domeni, ne postoji interakcija između C- i N-terminalne domene metanogenog tipa SerRS iz *M. barkeri*
- u *Methanothermobacter thermautotrophicus* seril-tRNA-sintetaza i arginil-tRNA-sintetaza tvore kompleks
- SerRS iz *M.thermautotrophicus* prepoznaje tRNA iz svih domena života

6. LITERATURA

1. Woese CR, Kandler O i Wheelis M L: Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 87:4576–4579.
2. Woese CR i Fox GE: Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977, 74: 5088–5090.
3. Forterre P: Evolution of the Archaea. *Theoretical Population Biology* 2002, 61:409-422.
4. Bapteste E, Brochier C i Boucher Y: Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 2005, 1:353-363.
5. Chapelle FH, O'Neill K, Bradley PM, Methe BA, Ciufo SA, Knobel LL i Lovley DR: A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens. *Nature* 2002, 415:312–315.
6. Garrity G: Bergey's manual of systematic bacteriology, str. 721. Springer-Verlag 2001, New York.
7. Smith DR, Doucette-Stamm LA, Deloughery C, Lee H, Dubois J, Aldredge T, Bashirzadeh R, Blakely D, Cook R, Gilbert K, Harrison D, Hoang L, Keagle P, Lumm W, Pothier B, Qiu D, Spadafora R, Vicaire R, Wang Y, Wierzbowski J, Gibson R, Jiwani N, Caruso A, Bush A, Reeve JN: Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum deltaH*: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol.* 1997, November; 179(22): 7135–7155.
8. Maeder DL, Anderson I, Brettin TS, Bruce DS, Gilna P, Han CS, Lapidus A, Metcalf WW, Saunders E, Tapia R i Sowers KR: The *Methanosarcina barkeri* genome: comparative analysis with *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei* reveals extensive rearrangement within methanosarcinal genomes. *J Bacteriol.* 2006 November; 188(22): 7922–7931.
9. Ibba M i Soll D: Genetic Code: Introducing Pyrrolysine. *Current Biology* 2002, 12(13):464-466.
10. Olsen GJ i Woese CR: Archaeal genomics: An Overview. *Cell* 1997, 89: 991-994.
11. Langer D, Hain J, Thuriax P i Zillig W: Transcription in Archaea: similarity to that in eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92 (13): 5768-5772.
12. Nelson DL i Cox MM (2004): Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Edition. Protein metabolism, str. 1044-1045. WH Freeman.
13. Berg JM, Tymoczko JL i Stryer L (2003): Biochemistry, 5th ed. Protein synthesis, str. 817-818. WH Freeman and Company, New York.

14. Moras D, Comarmond MB, Fischer J, Weiss R, Thierry JC, Ebel JP i Giegé R: Crystal structure of yeast tRNA^{Asp}. *Nature* 1980, 286:669-674.
15. Asahara H, Himeno H, Tamura K, Nameki N, Hasegawa T i Shimizu M: Discrimination among *E. coli* tRNAs with a long variable arm. *Nucleic. Acids. Symp. Ser.* 1993, 29:207-208.
16. Bilokapic S, Korencic D, Soll D i Weygand-Durasevic I: The unusual seryl-tRNA synthetase recognizes tRNA^{Ser} species from all three kingdoms of life. *Eur. J Biochem.* 2004, 271:694-702.
17. Voet D i Voet JG (2004): *Biochemistry, 3rd Edition. Translation*, str. 1326-1335. Wiley.
18. Eriani G, Delarue M, Poch O, Gangloff J i Moras D: Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequences motif. *Nature* 1990, 347:203-206.
19. Farias ST i Guimaraes RC: Aminoacyl-tRNA synthetase classes and groups in prokaryotes. *J. Theor. Biol.* 2008, 250:221-229.
20. Cusack S, Härtle M i Leberman R: Sequence, structural and evolutionary relationships between class 2 aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res.* 1991, 13:3489-3498.
21. Torres-Larios A, Sankaranarayanan R, Rees B, Dock-Bregeon AC i Moras D: Conformational movements and cooperativity upon amino acid, ATP and tRNA binding in threonyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol.* 2003, 331:201-211.
22. Berg JM, Tymoczko JL i Stryer L (2003): *Biochemistry, 5th ed. Protein synthesis*, str. 819. WH Freeman and Company, New York.
23. Fersht AR i Dingwall C: Evidence for the double-sieve editing mechanism in protein synthesis. Steric exclusion of isoleucine by valyl-tRNA synthetases. *Biochemistry* 1979, 18:2627-31.
24. Lin J, Hale SP i Schimmel P: Aminoacylation error correction. *Nature* 1996, 384:33-34.
25. Berg JM, Tymoczko JL i Stryer L (2003): *Biochemistry, 5th ed. Protein synthesis*, str. 820. WH Freeman and Company, New York.
26. Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, Fitzgerald LM, Clayton GA, Gocayne JD et al: Complete genome sequence of the Methanogenic archaeon, *Methanococcus janaschii*. *Science* 1996, 273:1058-1073.
27. Ibba M, Curnow A, i Soll D: Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal. *Trends Biochem Sci* 1997, 22:39-42.

28. Praetorius-Ibba M i Ibba M: Aminoacyl t-RNA synthesis in archaea: different but not unique. *Mol. Microbiol.* 2003, 48:631-637.
29. Ibba M, Morgan S, Curnow AW, Pridmore DR, Vothknecht UC, Gardner W, Lin W, Woese CR i Soll D: A euryarchaeal lysil-tRNA synthetase: resemblance to class I synthetases. *Science* 1997, 278:1119-1122.
30. Ibba M, Losey HC, Kawarabayasi Y, Kikuchi H, Bunjun S i Soll D: Substrate recognition by class I lysil-tRNA synthetases: a molecular basis for gene displacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96:418-423.
31. Ambrogelly A, Kamtekar S, Sauerwald A, Ruan B, Tumbula-Hansen D, Kennedy D, Ahel I i Soll D: Cys-tRNA^{Cys} formation and cysteine biosynthesis in methanogenic archaea: two faces of the same problem? *Cell. Mo.l Life Sci.* 2004, 61:2437-2445.
32. Sauerwald A, Zhu W, Major TA, Roy H, Palioura S, Jahn D, Whitman WB, Yates, JR, Ibba M i Soll D: RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea. *Science* 2005, 307:1969-72.
33. Doolittle RF i Handy J: Evolutionary anomalies among the aminoacyl-tRNA synthetases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998, 8:630-636.
34. Leveque F, Plateau P, Dessen P i Blanquet S: Homology of LysS and LysU, teh two *Escherichia coli* genes encoding distinct lysil-tRNA synthetase species. *Nucleic acids Res.* 1990, 18:3305-3312.
35. Putzer H, Brakhage AA i Grunberg-Monago M: Independent genes for two threonyl tRNA synthetase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 1990, 172:4593-4602.
36. Henkin TM, Glass BL i Grundy FJ: Analysis of the *Bacillus subtilis* tyrS gene: conservation of a regulatory sequence in multiple tRNA synthetase genes. *J. Bacteriol.* 1992, 174:1299-1306.
37. Stadtman TC: Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochemistry* 1996, 65: 83-100.
38. Cusack S, Berthet-Colominas C, Härtle M, Nassar N i Leberman R: A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase. *Nature* 1990, 347:249-255.
39. Bilokapic S (2006): Uloga cinkovog iona u aktivnom mjestu atipične arhealne seril-tRNA-sintetaze: strukturna i biokemijska analiza. Doktorska disertacija.
40. Bilokapic S, Maier T, Ahel D, Gruic-Sovulj I, Soll D, Weygand-Durasevic I i Ban N: Structure of the unusual seryl-tRNA synthetase reveals a distinct zinc-dependent mode of substrate recognition. *EMBO Journal* 2006, 25:2498-2509.

41. Hausmann CD i Ibba M: Aminoacyl-tRNA complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol Rev* 2008, 32:705-721.
42. Kerjan P, Cerini C, Semeriva M i Mirande M: The multienzyme complex containing nine aminoacyl-tRNA synthetases is ubiquitous from *Drosophila* to mammals. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1199:293-297.
43. Lipman RS, Chen J, Evilia C, Vitseva O i Hou YM: Association of an aminoacyl-tRNA synthetase with a putative metabolic protein in archaea. *Biochemistry* 2003, 42:7487-7496.
44. Praetorius-Ibba M, Rogers TE, Samson R, Kelman Z i Ibba M: Association between archaeal prolyl- and leucyl-tRNA synthetases enhances tRNA^{Pro} aminoacylation. *J Biol Chem* 2005, 280:26099-26104.
45. Praetorius-Ibba M, Hausmann CD, Paras M, Rogers TE i Ibba M: Functional association between three archaeal aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* 2007, 282: 3680-3687.
46. Hausmann CD, Praetorius Ibba M i Ibba M: An aminoacyl-tRNA synthetase: elongation factor complex for substrate channeling an archaeal translation. *Nucleic Acid Res* 2007, 35: 6094-6102.
47. Nelson DL i Cox MM: Lehninger Principles of Biochemistry, 4th edition. Principles of Gene Regulation, str. 1083. WH Freeman.
48. Clontech Yeast Protocols Handbook manual, CLONTECH Laboratories, Inc.
49. Brachmann RK i Boeke JD: Tag games in yeast: the two hybrid system and beyond. *Curr Opin Biotech* 1997, 8: 561-568.
50. Liu Y i Whitman WB: Metabolic, phylogenetic and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008, 1125: 171-189.
51. Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S i Forterre P: Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* 2008, 3:245-252.
52. Huber H, Hohn MJ, Rachel R, Fuchs T, Wimmer VC i Setter KO: A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 2002, 417:63-67.
53. Abrogelly A, Ahel I, Polycarpo C *et al*: *Methanococcus janaschii* prolyl-tRNA synthetase charges tRNA^{Pro} with cysteine. *J Biol Chem* 2002, 277: 34749-34754.
54. An S i Musier-Forsyth K: Cys-tRNA^{Pro} editing by *Haemophilus influenzae* YbaK via a novel synthetase.YbaK.tRNA ternary complex. *J Biol Chem* 280: 344465-344472.

55. Racznik G, Becker HD, Min B i Soll D: A single amidotransferase forms asparaginyI-tRNA and glutaminyI-tRNA in *Chlamidia trachomatis*. *J Biol Chem* 276: 45862-45867.
56. Buddha MR, Keery KM i Crane BR: An unusual tryptophanyl-tRNA synthetase interacts with nitric oxide synthase in *Deinococcus radiodurans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:15881-15886.
57. Buddha MR, Tao T, Parry RJ i Crane BR: Regioselective nitration of tryptophan by a complex between bacterial nitric oxide synthase and tryptophanyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* 2004, 279: 49567-49570.
58. Simos G, Sauer A , Fasiolo F i Hurt EC: A conserved domain within Arc1p delivers tRNA to aminoacyl-tRNA synthetases. *Moll Cell* 1998, 1: 235-242.
59. Rocak S, Landeka I i Weygand-Durasevic I: Identifying Pex21p as a protein that specifically interacts with yeast seryl-tRNA synthetase. *FEMS Microbiol Lett.* 2002, 214: 101-106.
60. Dagkessamanskaia A, Martin-Yken H, Basmaji F, Briza P i Francois J: Interaction of Knr4 protein, a protein involved in cell wall synthesis, with tyrosine tRNA synthetase encoded by TYS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 2001, 200: 53-58.
61. Wolfson A i Knight R: Occurrence of the aminoacyl-tRNA synthetases in high-molecular weight complexes correlates with the size of substrate amino acids. *FEBS Lett.* 2005, 579:3467-3472.
62. Sampath P, Mazumder B, Seshadri V *et al.*: Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene specific silencing of translation. *Cell* 2004, 119:195-208.
63. Kleiman L i Cen S: The tRNA^{Lys} packaging complex in HIV-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, 36: 1776-1786.
64. Javanbakht H, Hawlani R, Cen S, Saadatmand J, Musier-Forsyth K, Gottlinger H i Kleiman L: The interaction between HIV-1 Gag and human lysyl-tRNA synthetase during viral assembly. *J Biol Chem* 2003, 278: 27644-27651.
65. Guo F, Cen S, Niu M, Javanbakht H i Kleiman L: Specific inhibition of the synthesis of human lysyl-tRNA synthetase results in decreases of tRNA^{Lys} incorporation, tRNA^{Lys}₃ annealing to viral RNA, and viral infectivity in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2003, 77: 9817-9822.
66. ProQuest Two-Hybrid System with Gateway Technology, Instruction Manual, Version C (2002). Invitrogen life technologies.

67. Bilokapic S, Ivic N, Godinic-Mikulcic V, Piantanida I, Ban N i Weygand-Đurašević I: Idiosyncratic helix-turn-helix motif in *Methanosarcina barkeri* seryl-tRNA synthetase has a critical architectural role. *J Biol Chem* 2009, 284:10706-10713.
68. Cusack S, Berthet-Colominas C, Hartlein M, Nassar N i Leberman E: A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *E. coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å resolution. *Nature* 1990, 347:249-255.
69. Vincent C, Borel F, Willison JC, Leberman R i Hartlein M: Seryl-tRNA synthetase from *E. coli*: functional evidence for crossdirner tRNA binding during aminoacylation. *Nucleic Acids Res* 1995, 23:1113-1118.
70. Francklyn C, Perona JJ, Puetz J, i Hou YM: Aminoacyl-tRNA synthetases: versatile players in the changing theater of translation. *RNA* 2002, 8:1363-1372
71. Sherman JM i Soll D: Aminoacyl-tRNA synthetases optimize both cognate tRNA recognition and discrimination against noncognate tRNAs. *Biochemistry* 1996, 35:601-607
72. Borel F, Vincent C, Leberman R i Hartlein M: Seryl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*: implication of its N-terminal domain in aminoacylation activity and specificity. *Nucleic Acids Res.* 22, 2963-2969
73. Cusack S, Yaremchuk A i Tukalo M: The crystal structures of *T. thermophilus* lysyl-tRNA synthetase complexed with *E. coli* tRNA(Lys) and a *T. thermophilus* tRNA(Lys) transcript: anticodon recognition and conformational changes upon binding of a lysyl-adenylate analogue. *EMBO J.* 15, 2834-2842
74. Preatorius-Ibba M, Hausmann C, Paras M, Rogers T i Ibba M: Functional association between three archaeal aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem*, 2006.
75. Kerjan P, Cerini C, Semeriva M i Mirande M: The multienzyme complex containing nine aminoacyl-tRNA synthetases is ubiquitous from *Drosophila* to mammals. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1199: 293-297.
76. Negrutskii BS i Deutscher MP: Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88:4991-4995.
77. Negrutskii BS, Shalak VF, Kerjan P, El'skaya AV i Mirande M (1999) Functional interaction of mammalian valyl-tRNA synthetase with elongation factor EF-1alpha in the complex with EF-1H. *J Biol Chem* 274: 4545-4550
78. Biou V, Yaremchuk A, Tukalo M i Cusack S: The 2.9 Å crystal structure of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Ser}. *Science* 1994, 263: 1404-1410.

79. Achsel T i Gross TJ: Identity determinants of human tRNA^{Ser}: sequence elements necessary for serylation and maturation of tRNA with a long extra arm. *EMBO Journal* 1993, 12: 3333-3338.
80. Asahara H, Himeno H, Tamura K, Nameki N, Hasegawa T i Shimizu M: *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase recognizes tRNA^{Ser} by its characteristic tertiary structure. *J Mol Biol* 1994, 236: 738-748.