

Utjecaj transkripcijskih regulatora bakterije *Escherichia coli* na učestalost formiranja čistina nakon infekcije bakteriofagom T4

Srakočić, Sanja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:607257>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-27**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sanja Srakočić

Utjecaj transkripcijskih regulatora bakterije *Escherichia coli*
na učestalost formiranja čistina nakon infekcije bakteriofagom

T4

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Najprije želim zahvaliti mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Ivančić Baće na ukazanom povjerenju, savjetima i podršci prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem mag. biol. mol. Marinu Radovčiću na savjetima, podršci i strpljenju prilikom izvođenja eksperimenata.

Na kraju zahvaljujem roditeljima i svim prijateljima koji su mi bili podrška tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj transkripcijskih regulatora bakterije *Escherichia coli* na učestalost formiranja čistina nakon infekcije bakteriofagom T4

Sanja Srakočić

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Proteini H-NS i StpA su globalni transkripcijski represori iz bakterije *Escherichia coli* koji samostalno i zajedno reguliraju ekspresiju oko 20% gena. Njihova ekspresija je različito regulirana, gdje jedan drugog negativno reguliraju, a ekspresija im ovisi i o temperaturi inkubiranja. Geni čija je ekspresija regulirana samo proteinom H-NS se zovu unilateralni geni, a geni čija je ekspresija regulirana proteinima H-NS i StpA se zovu epistatski geni. Iz dosadašnjih istraživanja uočeno je da bakteriofag T4 iz nepoznatih razloga ne može formirati čistine u inficiranim bakterijskim stanicama Δhns pri temperaturi inkubacije od 30 °C. Cilj ovog rada bio je istražiti ulogu proteina StpA, nekoliko epistatskih gena, te proteaze Lon na uspješnost formiranja čistina bakteriofaga T4 u stanicama Δhns . Dobiveni rezultati ukazuju da nastanak čistina faga T4 u stanicama Δhns ovisi o proteinu StpA. Nedostatak proteaze Lon nije uspostavio nastanak čistina, kao niti jedan od istraživanih epistatskih gena *cbl*, *cspA*, *dnaK*, *groL*, *htpG*, *rnc* i *sodA*. Čistine faga T4 su uočene u soju *E. coli* B Δhns koji je prirodni mutant *lon*, što ukazuje da formiranje čistina faga T4 ovisi o nepoznatom razlikovnom genu između *E. coli* K-12 i *E. coli* B.

(51 stranica, 10 slika, 24 tablice, 63 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: StpA, H-NS, proteaza Lon, T4, *E. coli*

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Ocjenitelji: Dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof.

Dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv. prof.

Dr. sc. Duje Lisičić, doc.

Zamjena: Dr. sc. Nataša Bauer, izv. prof.

Rad prihvaćen: 31. 1. 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation thesis

The effect of *Escherichia coli* transcriptional regulators on efficiency of plaque formation of T4 bacteriophage

Sanja Srakočić

Roosevelt square 6, 10000 Zagreb, Croatia

H-NS and StpA proteins are global transcriptional repressors of *Escherichia coli* that independently and together regulate the expression of about 20% of the genes. Their expression is regulated differently, they negatively regulate one another, and their expression also depends on the temperature of incubation. The genes whose expression is regulated by H-NS alone are called unilateral genes, and the genes whose expression is regulated by H-NS and StpA proteins are called epistatic genes. From recent studies, it has been found that bacteriophage T4 can not form plaques in infected Δhns cells incubated at a 30 °C for an unknown reasons. The aim of this study was to investigate the role of StpA protein, several epistatic genes and Lon protease on the efficiency of T4 bacteriophage plaque formation in Δhns cells. The obtained results indicate that T4 bacteriophage plaque formation depends on the StpA protein. The lack of protease Lon did not revert the plaque formation, as none of the investigated epistatic genes *cbl*, *cspA*, *dnaK*, *groL*, *htpG*, *rnc* and *sodA*. T4 bacteriophage plaques were observed in the *E. coli* B Δhns cells that is a natural *lon* mutant, indicating that plaque formation depends on the unidentified distinct gene between *E. coli* K-12 and *E. coli* B.

(51 pages, 10 figures, 24 tables, 63 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: StpA, H-NS, Lon protease, T4, *E. coli*

Supervisor: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

Dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

Dr. Duje Lisičić, Asst. Prof.

Substitution: Dr. Nataša Bauer, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 31. 1. 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Proteini H-NS i StpA	1
1.2. Epistatski i unilateralni geni	5
1.3. Bakteriofag T4	7
1.4. Ciljevi istraživanja	9
2. MATERIJALI I METODE	10
2.1. Materijali	10
2.1.1. Bakterijski sojevi i plazmidi	10
2.1.2. Pufferi	12
2.1.3. Početnice	13
2.2. Metode	13
2.2.1. Uzgoj bakterijskih sojeva	13
2.2.2. Metode određivanja ekspresije gena	14
2.2.2.1. Izolacija ukupne stanične RNA	14
2.2.2.2. Agarozna gel elektroforeza	15
2.2.2.3. Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu	15
2.2.3. Konstrukcija plazmida	17
2.2.3.1. Kloniranje gena <i>cbl</i> , <i>dnaK</i> i <i>sodA</i> metodom sastavljanja DNA	17
2.2.3.2. Transformacija bakterija plazmidnom DNA	19
2.2.3.3. Izolacija plazmidne DNA	20
2.2.3.4. Kloniranje gena <i>groL</i>	21
2.2.3.5. PCR na pojedinačnim kolonijama	22
2.2.3.6. Sekvenciranje	23
2.2.4. Transformacija bakterijskih stanica plazmidima	24
2.2.5. Konstruiranje bakterijskih sojeva metodom transdukcije fagom P1 $_{vir}$	24
2.2.6. Određivanje uspješnosti formiranja čistina bakteriofaga T4	25

2.2.7.	Određivanje uspješnosti adsorpcije bakteriofaga T4	25
3.	REZULTATI.....	26
3.1.	Utjecaj temperature i proteina H-NS na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4 26	
3.2.	Efikasnost adsorpcije bakteriofaga T4	28
3.3.	Utjecaj proteina StpA na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4.....	29
3.4.	Ekspresija gena <i>stpA</i> u ovisnosti o temperaturi u mutantu Δhns	29
3.5.	Utjecaj epistatskih gena na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4	31
3.6.	Utjecaj proteaze Lon na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4	36
4.	RASPRAVA	40
5.	ZAKLJUČAK	44
6.	LITERATURA	45
7.	ŽIVOTOPIS.....	51

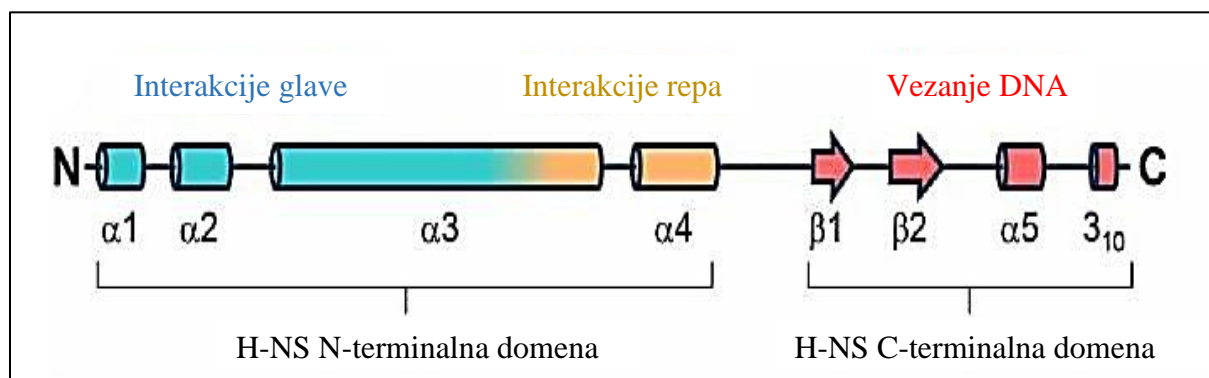
POPIS KRATICA

<i>cat</i>	gen za otpornost na kloramfenikol
Cbl	od engl. <i>cysB-like protein</i>
cDNA	komplementarna DNA
ChIP	kromatinska imunoprecipitacija
CspA	od engl. <i>cold-shock protein A</i>
Ct	od engl. <i>cycle treshold</i>
CTD	C-terminalna domena
Dcm	DNA citozin metiltransferaza
DEPC	dietilpirokarbonat
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
FIS	od engl. <i>factor for inversion stimulation</i>
FRT	od engl. <i>flippase recognition target</i>
H-NS	od engl. <i>histone-like nucleoid structuring protein</i>
Hsp70	od engl. <i>heat shock protein 70 kDa</i>
HtpG	od engl. <i>high temperature protein G</i>
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
<i>kan</i>	gen za otpornost na kanamicin
LB	medij Luria broth
Lrp	od engl. <i>leucine-responsive regulatory protein</i>
NTD	N-terminalna domena
OmpC	od engl. <i>outer membrane protein C</i>
PFU	od engl. <i>plaque-forming unit</i>
qRT-PCR	kvantitativni PCR u stvarnom vremenu
RNaza III	ribonukleaza III
rRNA	ribosomska RNA
SDS	natrijev dodecilsulfat
SodA	superoksid dismutaza
StpA	supresor td ⁻ fenotipa
Tn10	transpozon 10

1. UVOD

1.1. Proteini H-NS i StpA

Protein H-NS (od engl. *histone-like nucleiod structuring*) iz bakterije *Escherichia coli* je sastavni dio bakterijskog nukleoida te sudjeluje u regulaciji ekspresije gena, rekombinaciji i transpoziciji. Nespecifično veže DNA, ali pokazuje preferenciju za zakrivljene strukture i sekvence bogate AT parovima baza (Durrenberger i sur., 1991). Protein H-NS ima 137 aminokiselina te je velik 15,5 kDa. Sastoji se od dvije domene, N-terminalne domene (NTD) i C-terminalne domene (CTD), koje su povezane fleksibilnim linkerom (Slika 1). NTD se sastoji od 4 α -heliksa i sudjeluje u stvaranju dimera i oligomera (Bloch i sur., 2003). CTD se sastoji od dvije β -ploče, α -heliksa i 3_{10} heliksa te veže jednonolančanu i dvolančanu DNA. Za vezanje DNA je najbitnija visoko konzervirana aminokiselinska sekvenca TWTXGRXP koja prepoznaje sekvence bogate AT parovima baza te se veže u mali utor DNA (Gordon i sur., 2011).

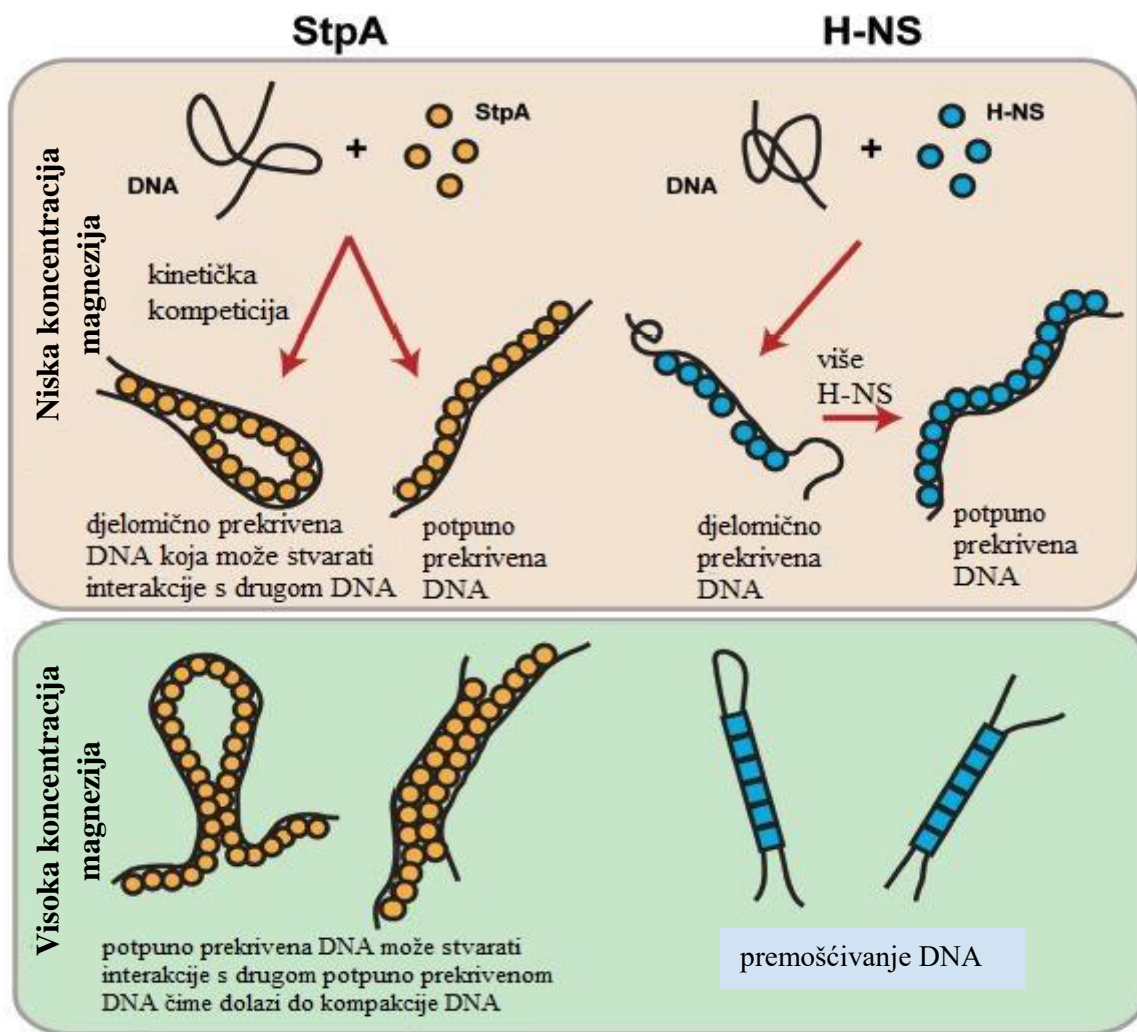


Slika 1. Shematski prikaz strukture proteina H-NS. N-terminalna domena se sastoji od 4 α -heliksa i sudjeluje u stvaranju proteinskih interakcija. C-terminalna domena se sastoji od dvije β -ploče, α -heliksa i 3_{10} heliksa, te sudjeluje u vezanju DNA. Preuzeto i prilagođeno iz Grainger (2016).

Oligomerizacija proteina H-NS s molekulom DNA rezultira formiranjem linearnih nukleoproteinskih filamenata i premošćivanjem DNA (engl. *DNA bridging*) – formiranjem poveznica između različitih segmenata molekule DNA (Dame i sur., 2000). Strukture nastale premošćivanjem DNA su puno rigidnije u odnosu na nukleoproteinske filamente. Formiranje nukleoproteinskih filamenata i premošćivanje DNA ovisi o koncentraciji magnezija u stanici,

gdje se pri koncentraciji magnezija manjoj od 5 mM formira nukleoproteinski filament, dok se pri višim koncentracijama formiraju poveznice između različitih segmenata DNA. Povećanjem ionske jakosti kalija iznad 200 mM i povišenjem temperature na 37 °C protein H-NS disocira s molekule DNA (Liu i sur., 2010). Vežanje proteina H-NS na DNA ima funkciju u uspostavljanju strukture bakterijskog nukleoida i u regulaciji ekspresije gena. Protein H-NS je globalni transkripcijski represor, iako neposredno može biti i aktivator kada inhibira ekspresiju drugih transkripcijskih represora (Ko i Park, 2000). Postoje dva mehanizma kojima protein H-NS inhibira transkripciju gena. Vežanjem na promotor gena se onemogućava vežanje RNA polimeraze i inicijacija transkripcije (Dame i sur., 2002), dok se vežanjem proteina H-NS nizvodno od promotorske regije blokira elongacija transkripcije (Ma i sur., 2013).

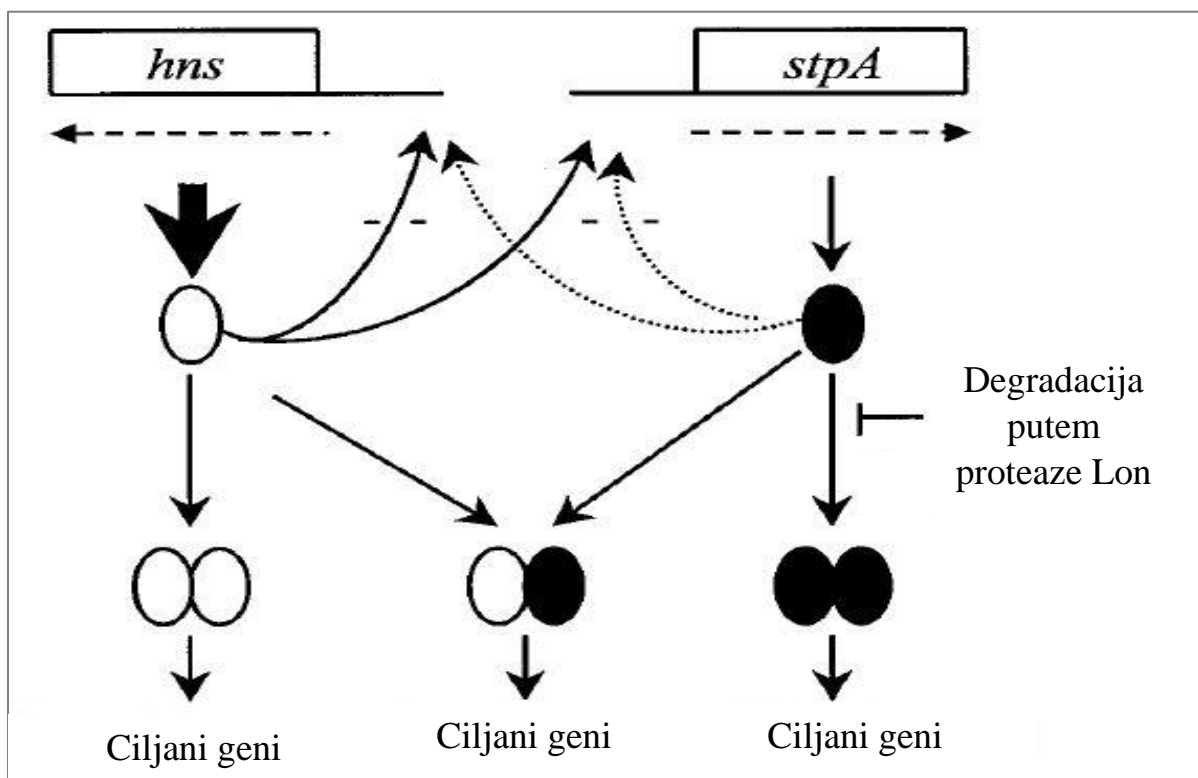
Protein StpA (od engl. *supressor of a td phenotype*) je paralog proteina H-NS s 58% sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci (Zang i Belfort, 1992). Ima 134 amionokiseline i sastoji se od NTD i CTD kao i protein H-NS. NTD sudjeluje u stvaranju dimera i oligomera, a CTD veže DNA (Cusick i Belfort, 1998). Osim sličnosti u strukturi, proteini H-NS i StpA imaju slične funkcije te se smatra da protein StpA služi kao rezerva za protein H-NS. Protein StpA se veže na zakrivljene sekvence DNA te na regije bogate AT parovima baza, može formirati nukleoproteinske filamente čime se inhibira ekspresija gena (Zang i sur., 1996). Za razliku od proteina H-NS, protein StpA veže i RNA preko CTD, djeluje kao šaperon te tako regulira ekspresiju gena na posttranskripcijskoj razini (Mayer i sur., 2007). Pri koncentraciji magnezija nižoj od 5 mM protein StpA formira nukleoproteinske filamente s molekulom DNA, dok su pri višim koncentracijama magnezija prisutne proteinske interakcije između dva nukleoproteinska filamenta što dovodi do kondenzacije bakterijskog nukleoida (Slika 2). Protein StpA ne formira strukture nastale premošćivanjem DNA. Na vežanje proteina StpA na molekulu DNA ne utječe promjena ionske jakosti kalija u rasponu 50-300 mM niti promjena temperature u rasponu 23 °C-37 °C (Lim i sur., 2012). Formiranje nukleoproteinskog filamenta štiti DNA od degradacije nukleazom DNaza I i restrikcijskim enzimom *EcoKI* jer protein StpA onemogućava interakciju molekule DNA s nukleazama i restrikcijskim enzimima (Keatch i sur., 2005).



Slika 2. Sličnosti i razlike u vezanju proteina H-NS i StpA na DNA. Pri niskoj koncentraciji magnezija protein StpA formira nukleoproteinske filamente s DNA. Također, mogu nastati i strukture u kojima protein StpA povezuje različite segmente molekule DNA. Pri višoj koncentraciji magnezija protein StpA može formirati proteinske interakcije između bliskih ili udaljenih segmenata nukleoproteinskog filamenta. Za razliku od njega, protein H-NS pri niskoj koncentraciji magnezija formira samo nukleoproteinske filamente, dok pri visokim koncentracijama magnezija dolazi do premošćivanja između segmenata molekule DNA. Preuzeto i prilagođeno iz Lim i sur., 2012.

Unatoč velikoj sličnosti u strukturi i funkciji, regulacija ekspresije gena *hns* i *stpA* je različita. Ekspresija gena *hns* se aktivira proteinima CspA (od engl. *cold-shock protein A*) (La Teana i sur., 1991) i FIS (od engl. *factor for inversion stimulation*) (Falconi i sur., 1993), dok se ekspresija gena *stpA* aktivira proteinom Lrp (od engl. *leucine-responsive regulatory protein*)

(Sonden i Uhlin, 1996). Proteini H-NS i StpA negativno autoreguliraju ekspresiju svojih gena (Slika 3). Protein H-NS inhibira ekspresiju gena *stpA*, a protein StpA inhibira ekspresiju gena *hns* (Sonden i Uhlin, 1996). Protein H-NS ne može inhibirati ekspresiju gena *stpA* u uvjetima velike ionske jakosti kalija i pri temperaturi većoj od 37 °C jer tada disocira s molekule DNA (Liu i sur., 2010). Ekspresija gena *hns* i *stpA* ovisi i o temperaturi, gdje je ekspresija gena *hns* 3-4 puta veća na 10 °C u odnosu na 37 °C (La Teana i sur., 1991), dok je ekspresija gena *stpA* dva puta veća na 37 °C u odnosu na 26 °C (Sonden i Uhlin, 1996). U laboratorijskim uvjetima gen *hns* ima puno veću ekspresiju u odnosu na gen *stpA* (Zhang i sur., 1996). Osim na razini transkripcije ekspresija proteina StpA je regulirana i na posttranslacijskoj razini (Slika 3) putem proteaze Lon koja u potpunosti degradira protein StpA u bakterijskim sojevima bez gena *hns*. Smatra se da proteini H-NS i StpA formiraju heterodimere gdje protein H-NS štiti protein StpA od degradacije proteazom Lon. Iz tog razloga većina proteina StpA u stanici je u obliku heterodimera s proteinom H-NS (Johansson i Uhlin, 1999).



Slika 3. Shematski prikaz regulacije ekspresije gena *hns* i *stpA*. Proteini H-NS i StpA negativno autoreguliraju ekspresiju vlastitih gena. Protein H-NS inhibira ekspresiju gena *stpA*, a protein StpA inhibira ekspresiju gena *hns*. Proteaza Lon degradira protein StpA koji se nalazi u obliku homodimera. Preuzeto i prilagođeno iz Johansson i Uhlin (1999).

1.2. Epistatski i unilateralni geni

Protein H-NS regulira ekspresiju 20% gena u genomu *E. coli*. Mutacije u genu *hns* imaju pleiotropni učinak na bakteriju. Dolazi do promjena u ekspresiji gena i rekombinaciji, smanjuje se mobilnost bakterije te se povećava učestalost delecija u nukleoidu (Higgins i sur., 1990). U laboratorijskim uvjetima sojevi s mutacijom u genu *hns* sporije rastu u odnosu na divlji tip. Protein StpA može samo djelomično kompenzirati nedostatak proteina H-NS. Kada se u Δhns mutant unese mutacija proteaze Lon dolazi do povećanja količine proteina StpA u stanici, ali bakterije svejedno sporije rastu u odnosu na divlji tip (Johansson i Uhlin, 1999). Bakterijski sojevi s mutacijom u genu *stpA* ne pokazuju promjene u brzini rasta u odnosu na divlji tip, dakle protein H-NS može u potpunosti kompenzirati nedostatak proteina StpA (Zhang i sur., 1996). Bakterijski sojevi u kojima su mutirana oba gena, *hns* i *stpA*, rastu puno sporije u odnosu na jednostruke mutante. Dvostruki mutanti imaju dulju logaritamsku fazu rasta te se prestanu dijeliti pri nižoj optičkoj gustoći u odnosu na jednostruke mutante i divlji tip (Srinivasan i sur., 2013). Ovakvi rezultati ukazuju da proteini H-NS i StpA imaju preklapajuće, ali i različite uloge u stanici, te su oba proteina potrebna za normalan rast bakterije i za regulaciju ekspresije gena (Sonden i Uhlin, 1996).

ChIP (kromatinska imunoprecipitacija) analizom je utvrđeno da se proteini H-NS i StpA vežu na ista mjesta u genomu u divljem tipu, ali u sojevima s mutiranim genom *hns* protein StpA se ne veže na 66% mjesta u genomu u odnosu na divlji tip. U sojevima s mutiranim genom *stpA* ne dolazi do promjena u vezanju proteina H-NS na genom (Uyar i sur., 2009). Temeljem ovih rezultata geni su podijeljeni na unilateralne i epistatske gene, gdje su unilateralni geni oni čija je ekspresija regulirana samo proteinom H-NS, a epistatski geni su oni čija je ekspresija regulirana proteinima H-NS i StpA (Srinivasan i sur., 2013). Unilateralni geni imaju mali udio regija bogatih AT parovima baza, koje prepoznaje protein H-NS, te im je povećana ekspresija u Δhns mutantu. Epistatski geni imaju puno više regija bogatih AT parovima baza u odnosu na unilateralne gene. U Δhns mutantu ne dolazi do promjene u ekspresiji epistatskih gena zato jer tada protein StpA regulira njihovu ekspresiju. Ekspresija epistatskih gena se povećava samo u dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta stpA$. U divljem tipu stanica ekspresija unilateralnih i epistatskih gena je vrlo mala pošto su proteini H-NS i StpA transkripcijski represori. U dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta stpA$ dolazi do povećanja ekspresije unilateralnih i epistatskih gena, s time da je ekspresija epistatskih gena puno veća u odnosu na ekspresiju unilateralnih gena (Srinivasan i sur., 2013). Do sada je otkriveno oko 600 unilateralnih i 350 epistatskih gena. U ovom radu se proučava funkcija epistatskih gena: *cbl*, *cspA*, *dnaK*, *groL*, *htpG*, *rnc* i *sodA*.

Protein Cbl (od engl. *cysB-like*) je transkripcijski faktor koji regulira ekspresiju gena potrebnih za regulaciju razine sulfata u stanici (van der Ploeg i sur., 1997). Uočeno je da se ekspresija gena *cbl* smanjuje tijekom infekcije bakteriofagom PRD1 (Poranen i sur., 2006).

Protein CspA je eksprimiran tijekom rane logaritamske faze rasta na 37 °C te mu se ekspresija povećava snižavanjem temperature s 37 °C na 10 °C (Jones i sur., 1987). On je transkripcijski faktor te aktivira ekspresiju proteina koji su eksprimirani na sniženim temperaturama, uključujući i protein H-NS (La Teana i sur., 1991). Protein CspA djeluje i kao RNA šaperon sprječavajući formiranje sekundarnih struktura u molekuli RNA pri sniženoj temperaturi (Jiang i sur., 1997).

Protein DnaK ili Hsp70 (od engl. *heat shock protein 70 kDa*) je šaperon koji pomaže u pravilnom sastavljanju proteina, popravlja nepravilno sastavljene proteine (Deuerling i sur., 1999) te sudjeluje u usmjeravanju transmembranskih proteina u staničnu membranu (Wild i sur., 1992). Za šaperonsku aktivnost proteina DnaK su potrebni ATP te šaperonini DnaJ i GrpE. Protein DnaK je uključen u kontrolu odgovora bakterije na povišenu temperaturu (Liberek i sur., 1992).

Gen *groL* kodira za protein GroEL, šaperon uključen u kontrolu odgovora bakterije na povišenu temperaturu. Protein GroEL formira kompleks s proteinom GroES, te je za njihovu aktivnost potreban ATP (Yifrach i Horovitz, 1995). Proteinski kompleks GroEL-GroES ima ulogu u pravilnom sastavljanju proteina pri povišenoj temperaturi (Gromiha i Selvaraj, 2004). Tijekom infekcije bakterije *E. coli* bakteriofagom T4 šaperon GroEL formira proteinski kompleks s virusnim šaperoninima, te sudjeluje u sastavljanju proteina glave bakteriofaga T4 (van der Vies i sur., 1994).

Protein HtpG (od engl. *high temperature protein G*) je također uključen u odgovor bakterije na povišenu temperaturu. Njegova ekspresija se inducira i promjenom pH u mediju (Heyde i Portalier, 1990), a nedostatak dušika u stanici inhibira njegovu ekspresiju (Kabir i sur., 2004). Protein HtpG pomaže u sastavljanju novo-sintetiziranih proteina u uvjetima blago povišene temperature te je za njegovu aktivnost potreban ATP (Panaretou i sur., 1998).

Gen *rnc* kodira za protein RNaza III (ribonukleaza III) koji cijepa dvolančanu RNA. Protein RNaza III je neophodan za procesiranje bakterijskih rRNA (Nikolaev i sur., 1974) te nekih mRNA (Gordon i sur., 2017) čime regulira ekspresiju gena na posttranskripcijskoj razini. Dokazano je da protein RNaza III cijepa mRNA bakteriofaga, uključujući i bakteriofag T4, te na taj način regulira ekspresiju gena bakteriofaga (Paddock i sur., 1976).

Protein SodA (superoksid dismutaza) je uključen u odgovor bakterije na stresne uvjete koji rezultiraju stvaranjem superoksidnih radikala u stanici. Nespecifično veže DNA te tako prevenira oštećenja DNA uzrokovana oksidacijskim stresom (Hopkin i sur., 1992). Za njegovu aktivnost je neophodan mangan (Britton i Fridovich, 1977).

1.3. Bakteriofag T4

Bakteriofag T4 je iz porodice *Myoviridae*, inficira bakteriju *E. coli* te ima isključivo litički ciklus (Kutter i sur., 1995). Virion se sastoji od glave u obliku izduženog ikosaedra, kontraktilnog repa koji završava bazalnom pločom te šest fibrila vezanih na bazalnu ploču. Fibrili i bazalna ploča sudjeluju u vezanju bakteriofaga T4 na lipopolisharidni receptor na kapsidi bakterije *E. coli*. Na repu bakteriofaga se nalazi lizozim koji razgrađuje peptidoglikansku staničnu stjenku bakterije. Kontrakcija repa omogućuje ubacivanje genoma bakteriofaga T4 u citoplazmu bakterije. Par minuta nakon infekcije bakteriofag T4 inhibira replikaciju i transkripciju bakterijskog genoma, te translaciju bakterijskih mRNA. Genom bakteriofaga T4 je dvolančana linearna DNA duljine 168 kpb s ukupno 289 otvorenih okvira čitanja. Na krajevima genoma se nalaze direktna ponavljanja. Bakteriofag T4 ima 65% A + T nukleotida u genomu, te njegova DNA ima D-formu što olakšava vezanje proteina na genom (Miller i sur., 2003). Umjesto citozina bakteriofag T4 ugrađuje 5-hidroksi-metil-citozin u DNA kako bi se zaštitio od restriksijskih sustava domaćina te od vlastitih nukleaza. Hidroksi-metilna skupina je glikozilirana što dodatno štiti i stabilizira DNA (Snyder i sur., 1976).

Geni bakteriofaga T4 su podijeljeni na rane, srednje i kasne. Rani geni se eksprimiraju pomoću RNA polimeraze bakterije *E. coli* i za njihovu transkripciju nisu potrebni nikakvi dodatni transkripcijski faktori. Produkti ranih gena se vežu na RNA polimerazu domaćina i modificiraju njezinu funkciju čime se omogućava transkripcija srednjih gena, ali dolazi i do inhibicije transkripcije domaćinovih gena. Transkripcija kasnih gena se odvija zajedno s replikacijom genoma. Produkti kasnih gena su proteini od kojih je sastavljen virion, te neki faktori koji pomažu u sastavljanju viriona (Luke i sur., 2002). Replikacija genoma faga započinje istovremeno s ekspresijom kasnih gena. Genom domaćina se degradira te se nastali produkti koriste za sintezu nukleotida i kasnije tijekom replikacije se ugrade u genom bakteriofaga. U ubacivanju genoma u glavu bakteriofaga sudjeluju proteini za čiju je aktivnost potreban ATP. Glava, rep, bazalna ploča i fibrili se sastavljaju zasebno te se tek na kraju spoje

u virion. Nakon sastavljanja viriona bakterijska stanica se lizira kako bi se oslobodili bakteriofagi.

Dokazano je da se protein H-NS može vezati na genom bakteriofaga T4 što je vjerojatno posljedica velikog udjela A + T parova baza u genomu. Protein MotB iz bakteriofaga T4 onemogućava vezanje proteina H-NS na genom bakteriofaga T4. Delecijom gena *motB* se smanjuje uspješnost infekcije bakteriofaga T4. Ne zna se točno kakav učinak ima vezanje proteina H-NS na genom bakteriofaga T4, ali s obzirom na njegovu ulogu u utišavanju ekspresije gena *E. coli*, pretpostavlja se da protein H-NS može formirati nukleoproteinske filamente na genomu bakteriofaga T4, te tako inhibirati ekspresiju njegovih gena (Patterson-West i sur., 2018). Ovaj model utišavanja ekspresije virusnih gena pomoću proteina H-NS nije specifičan samo za bakteriofag T4, već je dokazan i za bakteriofag T7 (Ali i sur., 2011). Nije istraženo da li se i protein StpA veže na genom bakteriofaga T4, ali je dokazano da protein StpA ima ulogu u izrezivanju introna virusnog gena za timidilat sintazu (Zang i Belfort, 1992).

1.4. Ciljevi istraživanja

Uočeno je da bakteriofag T4 ne može formirati čistine u bakterijskim stanicama bez proteina H-NS (mutant Δhns) pri sniženoj temperaturi inkubiranja (30 °C) iz nepoznatog razloga (neobjavljeni rezultati). Protein StpA paralog je proteina H-NS, sličan mu je po ulogama i veže se na ista mjesta u genomu stanica divljeg tipa, ali mu je ekspresija smanjena na 26 °C u Δhns stanicama (Sonden i Uhlin, 1996). Ekspresija proteina StpA također je regulirana i na posttranslacijskoj razini proteazom Lon koja u potpunosti degradira protein StpA u Δhns stanicama. Kako bismo istražili je li razlog nemogućnosti stvaranja čistina faga T4 nedostatak proteina StpA cilj ovog rada je istražiti:

- a) Utjecaj proteina StpA i proteaze Lon na formiranje čistina.
- b) Kako proteini StpA i H-NS zajedno reguliraju ekspresiju takozvanih epistatskih gena, cilj je bio istražiti ovisi li efikasnost stvaranja čistina o ekspresiji pojedinačnih epistatskih gena: *cbl*, *cspA*, *dnaK*, *groL*, *htpG*, *rnc* i *sodA*.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Bakterijski sojevi i plazmidi

U Tablicama 1 i 2 su prikazani bakterijski sojevi korišteni u ovom istraživanju, a u Tablici 3 se nalaze plazmidi.

Tablica 1. Popis bakterijskih sojeva *Escherichia coli* K-12 korištenih u ovom istraživanju.

Bakterijski soj	Opis	Referenca ili izvor	
BW25113 (IIB854)	$\Delta(araD-araB)567$ $\Delta lacZ4787(::rrnB-3) \lambda^- rph-1,$ $\Delta(rhaD-rhaB)568 hsdR514$	Datsenko i Wanner, 2000	
IIB1022	BSN6, $\Delta stpA::kan$	Sonden i Uhlin, 1996	
IIB1023	BSN22, $\Delta hns::cat$	Sonden i Uhlin, 1996	
IIB1269	HT115, $rnc::Tn10$	Takiff i sur., 1989	
Derivati soja BW25113	IIB855	+ $\Delta hns::kan$	Pougach i sur., 2010
	IIB921	+ $\Delta hns::FRT$	Uklanjanje <i>kan</i> iz IIB855 pomoću pCP20
	IIB1025	+ $\Delta stpA::kan$	P1. IIB1022 × IIB854
	IIB1029	+ $\Delta stpA::kan \Delta hns::cat$	P1. IIB1023 × IIB1025
	MR019	+ $\Delta dnaK::kan$	Baba i sur., 2006
	MR020	+ $\Delta sodA::kan$	Baba i sur., 2006
	MR021	+ $\Delta cbl::kan$	Baba i sur., 2006
	MR022	+ $\Delta groL::kan$	Baba i sur., 2006
	MR023	+ $\Delta lon::kan$	Baba i sur., 2006
	MR024	+ $\Delta rnc::Tn10$	P1. IIB1269 × IIB854
	MR025	+ $\Delta hns::FRT \Delta rnc::Tn10$	P1. IIB1269 × IIB921
	MR026	+ $\Delta hns::FRT \Delta dnaK::kan$	P1. MR019 × IIB921
	MR027	+ $\Delta hns::FRT \Delta sodA::kan$	P1. MR020 × IIB921
	MR028	+ $\Delta hns::FRT \Delta cbl::kan$	P1. MR021 × IIB921
	MR031	+ $\Delta hns::cat \Delta lon::kan$	P1. IIB1023 × MR023
MR034	+ $\Delta hns::cat \Delta groL::kan$	P1. IIB1023 × MR022	

Tablica 2. Popis bakterijskih sojeva *Escherichia coli* B korištenih u ovom istraživanju te njihove najbitnije karakteristike.

Bakterijski soj	Opis	Referenca ili izvor
BL21(DE3)	derivat soja <i>E. coli</i> B, <i>lon</i>	Wood, 1966
BL21-AI	<i>F ompT hsdS_B(r_B-m_B-) gal dcm araB::T7RNAP-tetA</i>	Studier i Moffatt, 1986
IIB946	kao BL21-AI, ali $\Delta hns::kan$	P1. IIB855 × BL21-AI
MR033	kao BL21(DE3), ali $\Delta hns::cat$	P1. IIB1023 × BL21(DE3)

Tablica 3. Popis plazmida korištenih u ovom istraživanju te njihove najbitnije karakteristike.

Plazmid	Opis	Referenca
pBad-A	prazan vektor	Tan i sur., 2012
pMR5	<i>stpA</i> u pBad-A	laboratorijska kolekcija
pMR6	<i>dnaK</i> u pBad-A	ovaj rad
pMR7	<i>cbl</i> u pBad-A	ovaj rad
pMR8	<i>sodA</i> u pBad-A	ovaj rad
pMR9	<i>groL</i> u pBad-A	ovaj rad
pBad18-Amp	prazan vektor	Guzman i sur., 1995
pBAD18-HtpG	<i>htpG</i> u pBad18-Amp	Yosef i sur., 2011
pINIII	prazan vektor	Haldimann i sur., 2001
pINcspA	<i>cspA</i> u pINIII	Bae i sur., 2000

2.1.2. Pufferi

U Tablicama 4, 5 i 6 se nalaze sastavi pufera korištenih u ovom radu (TAE, MC i M/15 pufer).

Tablica 4. Sastav pufera TAE koji se koristi za agaroznu gel elektroforezu.

Naziv otopine	Koncentracija (mM)
Tris	40
Octena kiselina	20
EDTA (pH 8,0)	1

Tablica 5. Sastav pufera MC koji se koristi za transdukciju.

Naziv otopine	Koncentracija
MgSO ₄	0,1 M
CaCl ₂	5 mM

Tablica 6. Sastav fosfatnog pufera M/15. Masa soli potrebnih za pripremu 1 L pufera M/15.

Soli se otope u 1L deionizirane vode i pH se podesi na 6,8.

Naziv soli	Masa (g)
Na ₂ HPO ₄	4,7
KH ₂ PO ₄	4,5

2.1.3. Početnice

U Tablici 7 se nalaze sekvence početnica korištenih za kloniranje gena *cbl*, *dnaK*, *groL* i *sodA* u vektor pBad-A.

Tablica 7. Sekvence početnica korištenih za umnažanje gena *cbl*, *dnaK*, *groL* i *sodA*. Kod početnica za kloniranje gena *cbl*, *dnaK* i *sodA* velikim slovima je označen dio početnice koji se veže na sekvencu gena, a malim slovima je označen dio početnice koji se veže na pBad-A pocijepan restrikcijским enzimom *EcoRI*. Kod početnica za kloniranje gena *groL* podebljano su označene sekvence koje prepoznaju restrikcijски enzimi *XhoI* (CTCGAG) i *HindIII* (AAGCTT).

Naziv početnice	Sekvenca početnice
cbl-F	ctgcagctggtaccatattgatGTGAATTTCCAACAATAAAG
cbl-R	cgccaaaacagccaagcttcCTATATCTGATAATCAATTCCTC
dnaK-F	ctgcagctggtaccatattgatATGGGTAAAATAATTGGTATCG
dnaK-R	cgccaaaacagccaagcttcTTATTTTTTGTCTTTGACTTCTTC
sodA-F	ctgcagctggtaccatattgatATGAGCTATAACCCTGCCATC
sodA-R	cgccaaaacagccaagcttcTTATTTTTTTCGCCGCAAAC
groL-F	TAAGCACT CGAG ATGGCAGCTAAAGACGTAAAATTCGG
groL-R	TGCTTAA AGCTT TGTGCAGGGCAATTACATCATGC

2.2. Metode

2.2.1. Uzgoj bakterijskih sojeva

Za uzgoj bakterijskih sojeva korištene su krute podloge LB (Luria broth) (10 g/L baktotripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 10g/L NaCl, 15 g/L agar), meki agar (10 g/L baktotripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl, 7 g/L agar) ili tekući medij LB (10 g/L baktotripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 10g/L NaCl). Po potrebi su dodani antibiotici: ampicilin (100 µg/mL), kanamicin (40 µg/mL), kloramfenikol (15 µg/mL) i tetraciklin (10 µg/mL). Za ekspresiju gena

s plazmida dodani su IPTG (izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid) (1 mM) i arabinoza (0,2%). Optička gustoća stanica mjerena je pri 600 nm (OD_{600}).

2.2.2. Metode određivanja ekspresije gena

2.2.2.1. Izolacija ukupne stanične RNA

Uzgojene su prekonoćne kulture bakterijskih sojeva IIB854, IIB855, IIB1025 i IIB1029 (opis sojeva se nalazi u Tablici 1) u 3 mL tekućeg medija LB. Idući dan se 30 μ L prekonoćnih kultura dodalo u 3 mL svježeg medija LB te su bakterijski sojevi uzgojeni do logaritamske faze rasta ($OD_{600}=0,6$). Ukupna stanična RNA se izolirala kombinacijom izolacije trizolom i kompletom Monarch[®] Total RNA Miniprep Kit (NEB).

Istaložilo se po 1,5 mL svakog bakterijskog soja 5 min na 6000 g, pri temperaturi od 4 °C. Supernatant se odlio, a talog se resuspendirao u 0,5 mL hladne otopine 50 mM natrijeva acetata (pH = 5.3) i 10 mM EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina). Dodalo se 50 μ L 10% SDS-a (natrijev dodecil sulfat) i dobro homogeniziralo na mješalici. Lizatu se zatim dodalo 0,5 mL TRIzola (Sigma) i ponovo dobro homogeniziralo i inkubiralo na sobnoj temperaturi tri minute. Zatim se dodalo 200 μ L hladnog kloroforma i snažno pomiješalo rukom oko 15 sekundi. Inkubiralo se na sobnoj temperaturi dvije do tri minute i zatim centrifugiralo 15 minuta na 12000 g, pri temperaturi od 4 °C. Gornja vodena faza u kojoj se nalazi RNA pažljivo se pipetom odvojila u novu epruvetu i dodan je jednak volumen 96%-tnog etanola te su se uzorci snažno promiješali.

Ostali koraci izolacije RNA su napravljeni pomoću kompleta Monarch[®] Total RNA Miniprep Kit. Uzorci su prebačeni u kolonu za pročišćavanje RNA te su centrifugirani 30 sekundi na 16000 g, pri sobnoj temperaturi. Sva ostala centrifugiranja su bila na 16000 g pri sobnoj temperaturi. Otopina u kolekcijskoj tubici se odlila, a na kolonu se dodalo 0,5 mL pufera za ispiranje i centrifugiralo se 30 sekundi. Zatim se na kolonu dodalo 5 μ L otopine DNaze I i 75 μ L pufera za DNazu I kako bi se uklonila genomska DNA. Inkubiralo se 15 minuta na sobnoj temperaturi i potom se dodalo 0,5 mL RNA Priming pufera te centrifugiralo 30 sekundi. RNA se ispirala dva puta dodavanjem 0,5 mL pufera za ispiranje te centrifugiranjem 30 sekundi. Kolone za pročišćavanje se prebace u nove epruvete, doda se 50 μ L vode i uzorci se centrifugiraju 30 sekundi. Nakon centrifugiranja ukupna stanična RNA je bila u epruveti, otopljena u vodi.

Nakon izolacije ukupne RNA odredila se koncentracija i čistoća spektrofotometrijski pomoću NanoVue Plus™. Čistoća se odredila mjerenjem omjera apsorbanacija A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} (RNA apsorbira svjetlost valne duljine 260 nm, proteini apsorbiraju svjetlost valne duljine 280 nm, a organska otapala apsorbiraju svjetlost valne duljine 230 nm). Uzorci se pohranjuju u ledenicu na -20 °C.

2.2.2.2. Agarozna gel elektroforeza

Kvaliteta izolirane RNA se provjerila elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Za pripremu 1% agaroznog gela odvažuje se 0,3 grama agaroze (Sigma) i dodaje se 30 mL 1X TAE pufera. Zatim se agarozna otopila zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici, ohladila se pod mlazom vode ili na sobnoj temperaturi, te se dodalo 1,4 µl otopine Sybr safe. Gel se izlio u kadu za elektroforezu s dodanim češljicom te se ostavio da odstoji 10 - 15 minuta prije nanošenja uzoraka. U jažice na gelu se stavilo po 1 µg svakog uzorka RNA, što se izračunalo iz koncentracije uzorka, i taj volumen uzorka se pomiješao s 1 µL 6X koncentrirane boje za elektroforezu RNA i vode. U drugu jažicu nanosilo se 2 µl DNA markera Gene Ruler 1 kb, DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Elektroforeza je trajala 20 min pri naponu od 100V u Embi Tec kadici za elektroforezu, koja se napunila 1X TAE puferom.

Gel se fotografirao pod UV svjetlom transiluminatora, na valnoj duljini 312 nm pri kojoj fluorescira Sybr safe, a fotografija se prenese u računalo pomoću programa Kodak. Nakon što se provjerila kvaliteta, izolirana RNA se razrijedila na koncentraciju 1 ng/µL te se dalje koristila za qRT-PCR.

2.2.2.3. Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu

Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (qRT-PCR) je metoda kojom se u svakom ciklusu PCR-a detektira ukupna količina DNA što omogućava kvantifikaciju početne količine DNA kalupa. Detekcija se može vršiti pomoću fluorescentne boje SYBR-Green ili pomoću fluorescentno obilježenih hibridizacijskih proba. U ovom radu se kvantificirala početna količina cDNA (komplementarna DNA) kalupa koja je proporcionalna količini pripadajuće mRNA, tj. ekspresiji gena. Korištena je ukupna stanična RNA izolirana iz bakterijskih sojeva IIB854, IIB855, IIB1025 i IIB1029 koji su uzgojeni do logaritamske faze rasta na 30 °C i 37 °C. Reverzna transkripcija i qRT-PCR su napravljeni u jednom koraku pomoću Luna® Universal

qPCR Master Mixa (NEB). Sastav smjese za jednu reakciju qRT-PCR-a se nalazi u Tablici 8. Napravljena su dva „master mixa“ tako da su dodane sve otopine osim RNA. U prvi „master mix“ su dodane početnice za umnažanje gena *stpA*, a u drugi su dodane početnice za umnažanje gena *groS*, koji služi kao endogena kontrola. Po 18 μL smjese se raspipetiralo u jažice na pločici za q-PCR. Zatim je dodano 2 μL RNA u jažice, za svaku temperaturu i svaki soj su bile po dvije replike. Za qRT-PCR se koristio uređaj Applied Biosystems 7500 Fast, a opis programa se nalazi u Tablici 9. Količina DNA se detektirala pomoću fluorescentne boje SYBR-Green.

Tablica 8. Sastav reakcijske smjese za qRT-PCR.

Naziv otopine i koncentracija	Volumen (μL)
Luna Universal One-step Reaction Mix (2x)	10
Luna Warm Start RT Enzyme Mix (20x)	1,0
F početnica (10 μM)	0,8
R početnica (10 μM)	0,8
RNA (1 ng/ μL)	2,0
DEPC H ₂ O	5,4

Tablica 9. Opis programa korištenog za qRT-PCR. Za svaki korak je napisana temperatura pri kojoj se odvija pojedini korak, vrijeme trajanja i broj ponavljanja pojedinog koraka.

Naziv koraka	Temperatura	Vrijeme	Broj ponavljanja
Reverzna transkripcija	55 °C	10 min	1
Inicijalna denaturacija	95 °C	1 min	
Denaturacija	95 °C	10 sec	40
Ekstenzija	60 °C	60 sec	

Rezultati umnažanja transkripata metodom qRT-PCR-a su kvantificirani metodom $\Delta\Delta Ct$. Metoda se temelji na sposobnosti uređaja da bilježi Ct (od engl. *cycle threshold*) koji govori koliko je ciklusa PCR-a potrebno da reakcija dođe u eksponencijalnu fazu. Vrijednost Ct zatim se koristi kako bi se kvantificirala ekspresija ispitivanih gena. Prvo se normalizirala vrijednost Ct gena *stpA* u odnosu na endogenu kontrolu, gen *groS*, kako bi se dobila ΔCt vrijednost svakog uzorka. Vrijednost ΔCt svakog uzorka zatim se normalizira u odnosu na kontrolu, tj. bakterijski soj IIB854 na 30 °C, te se izračunala vrijednost $\Delta\Delta Ct$. Pomoću dobivenih $\Delta\Delta Ct$ vrijednosti izračunao se faktor promjene ekspresije gena (engl. *fold change*), odnosno koliko je puta različita razina ekspresije gena *stpA* u odnosu na kontrolu.

2.2.3. Konstrukcija plazmida

2.2.3.1. Kloniranje gena *cbl*, *dnaK* i *sodA* metodom sastavljanja DNA

Kloniranje gena metodom sastavljanja fragmenata DNA (engl. *DNA assembly*) sastoji se od samo dva koraka, umnažanja željenog gena metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) kojom se posebnim početnicama na krajeve umnoženog gena dodaje sekvenca komplementarna plazmidu, te od spajanja produkta PCR s plazmidom pocijepanim restrikcijskim enzimom. Kalup DNA za umnažanje gena *cbl*, *dnaK* i *sodA* metodom PCR priređen je lizom 10 μL prekonoćne kulture stanica divljeg tipa u mikroepreveti s 50 μL vode na 98 °C kroz 3 minute. Koristila se DNA polimeraza koja ima lektorirajuću aktivnost, Q5[®] Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (NEB). Reakcijske smjese za PCR su napravljene prema uputama proizvođača tako da je ukupni volumen bio 12,5 μL (Tablica 10). U smjesi se dodao 1,0 μL pripremljenog kalupa DNA. Početnice su dizajnirane prema uputama NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB) te se njihove sekvence nalaze u Tablici 7. Za reakcije PCR se koristio uređaj Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), a program umnažanja PCR-a se nalazi u Tablici 11. Uspješnost umnažanja DNA metodom PCR provjerila se elektroforezom na 1% agaroznom gelu na sličan način kao što je napravljeno za RNA (2.2.2.2.).

Tablica 10. Sastav smjese za umnažanje gena *cbl*, *dnaK* i *sodA* metodom PCR pomoću Q5[®] Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix.

Naziv otopine i koncentracija	Volumen (μL)
Q5 Master mix (2X)	6,25
F-početnica (10μM)	0,625
R-početnica (10μM)	0,625
Kalup DNA	1
H ₂ O	4

Tablica 11. Opis programa korištenog za PCR kojim su umnoženi geni *cbl*, *dnaK* i *sodA*. Za svaki korak je napisana temperatura, vrijeme trajanja i broj ponavljanja.

Naziv koraka	Temperatura	Vrijeme	Broj ponavljanja
Inicijalna denaturacija	98 °C	30 sec	1
Denaturacija	98 °C	10 sec	30
Vežanje početnica	53 °C	30 sec	
Elongacija	72 °C	2 min	
Završna elongacija	72 °C	2 min	1

Dobiveni produkti DNA umnoženi metodom PCR su spojeni u vektor pBad-A koristeći NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix 2X. Plazmid pBad-A se prethodno pocijepao restriktivnim enzimom *EcoRI* (Thermo Scientific). Sastav reakcijske smjese za restrikciju se nalazi u Tablici 12. Restrikcija je trajala 60 min na 37 °C nakon čega se enzim inaktivirao inkubacijom na 65 °C 10 minuta. Za svaki gen se napravila reakcijska smjesa za kloniranje - vežanje plazmida i inserta koja se temelji na enzimu „klonaza“ koja je aktivni dio smjese

Assembly Master Mix (Tablica 13). Uzorci su inkubirani u termobloku *Thermomixer comfort* (Eppendorf) 15 min na 50 °C.

Tablica 12. Sastav smjese za restrikciju vektora pBad-A restrikcijskim enzimom *EcoRI*.

Naziv otopine i koncentracija	Volumen (μL)
Plazmidna DNA, pBad-A (300 ng/μL)	10
Pufer za <i>EcoRI</i> (10X)	3
Enzim <i>EcoRI</i> 10 U/μL	1
H ₂ O	16

Tablica 13. Sastav smjese za kloniranje gena *cbl*, *dnaK* i *sodA* u pBad-A pomoću kompleta NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit.

Naziv otopine i koncentracija	Volumen (μL)
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (2x)	2
PCR produkt	2
pBad-A pocijepan s <i>EcoRI</i> (38 ng/μL)	5
H ₂ O	1

2.2.3.2. Transformacija bakterija plazmidnom DNA

Za transformaciju pripremljene smjese za kloniranje u bakterije korištene se već priređene kemijski kompetentne stanice *E. coli* NEB 5α. Stanicama u alikvotima od 50 μL dodano je po 2 μL smjese za kloniranje i uzorci su inkubirani na ledu 30 min, a zatim je napravljen toplinski šok stavljanjem tubica u termoblok na 42 °C 30 sekundi, a zatim 2 minute na led. Transformiranim bakterijama je dodano 650 μL medija SOC, te su se stanice oporavljale

1 sat na 37 °C i zatim je 350 µL nasadeno na čvrste podloge LB s antibiotikom ampicilinom, po dvije podloge za svaki plazmid. Podloge s bakterijama transformiranim plazmidima pMR7 i pMR8 su inkubirane na 37 °C, a podloge s bakterijama transformiranim plazmidom pMR6 su inkubirane na 30 °C preko noći.

2.2.3.3. Izolacija plazmidne DNA

Plazmidna DNA je izolirana pomoću kompleta *AccuPrep*[®] Plasmid Mini Extraction Kit (BIONEER) prema uputama proizvođača. 1,5 mL prekonoćnih kultura se taložio 2,5 minute na 6500 g. Supernatanti su se odlili, a talog se resuspendirao u 250 µL pufera za resuspendiranje. Dodano je 250 µL pufera za lizu te su uzorci dobro promiješani. Zatim se dodalo 350 µL pufera za neutralizaciju te su uzorci centrifugirani 10 minuta na 13000 g pri 4 °C. Bistri lizati su prebačeni na kolone za pročišćavanje te su centrifugirani 1 minutu na 13000 g. Dodano je 700 µL pufera za ispiranje te se dva puta ponovilo centrifugiranje. Kolone za pročišćavanje su prebačene u nove epruvete. Dodano je 50 µL pufera za eluiranje i uzorci su centrifugirani. Nakon zadnjeg koraka izolirani plazmidi su bili u epruvetama, otopljeni u puferu za eluiranje. Koncentracija i čistoća izoliranih plazmida se odredila spektrofotometrijski, kao za RNA.

Uspješnost ugradnje gena u vektor se provjerila restrikcijom izoliranih plazmida pomoću restrikcijskog enzima *KpnI* (Thermo Scientific). Za restrikciju se koristio FastDigest protokol. Restrikcijske smjese su napravljene prema uputama proizvođača (Tablica 14), te su inkubirane 10 min na 37 °C. Uspješnost restrikcije se provjerila elektroforezom na isti način kao i za RNA (2.2.2.2.).

Tablica 14. Sastav smjese za restrikciju plazmida pMR6, pMR7 i pMR8 restrikcijskim enzimom *KpnI*.

Naziv otopine	Volumen (µL)
Plazmidna DNA	3,5
Pufer <i>Green</i> (10X)	1
Enzim <i>KpnI</i>	0,5
H ₂ O	5

2.2.3.4. Kloniranje gena *groL*

Kloniranje gena pomoću ligiranja pocijepanih dijelova DNA istim restrikciskim enzimima se sastoji od nekoliko koraka. Najprije se metodom PCR umnoži ciljani gen. Zatim se umnoženi produkt i plazmid pocijepaju istim restrikciskim enzimima, a insert i vektor se spoje pomoću enzima DNA ligaza. Gen *groL* se umnožio metodom PCR na isti način kao i kod kloniranja gena metodom sastavljanja DNA. Početnice za umnažanje gena *groL* su dizajniranje prema uputama na web stranici "addgene" (<https://www.addgene.org/protocols/pcr-cloning/>) i njihove sekvence se nalaze u Tablici 7.

PCR produkt i vektor pBad-A su pocijepani restrikciskim enzimima *XhoI* i *HindIII* (Thermo Scientific). Restrikcijske smjese su napravljene prema uputama proizvođača prema protokolu za dvostruku digestiju (Tablica 15). U jednu restrikcijsku smjesu je dodan PCR produkt, a u drugu vektor pBad-A. Restrikcijske smjese su inkubirane 2h i 30 min na 37 °C. Uspješnost restrikcije se provjerila agaroznom gel elektroforezom (2.2.2.2.).

Tablica 15. Sastav smjese za dvostruku restrikciju restrikciskim enzimima *XhoI* i *HindIII*.

Naziv otopine	Volumen (µL)
Kalup DNA	10
Pufer <i>Red</i> (10X)	3
Enzim <i>XhoI</i>	1,5
Enzim <i>HindIII</i>	1,5
H ₂ O	14

Nakon restrikcije pBad-A i gen *groL* su pročišćeni pomoću kompleta GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific). Uzorcima je dodan pufer za vezanje u omjeru 1:1. Otopine su stavljene na kolonu za pročišćavanje te su centrifugirane 30 sekundi na 12000 g. Dodano je 700 µL pufera za ispiranje te se centrifugiranje ponovilo dva puta. Kolone za pročišćavanje su prebačene u epruvete te se dodalo 30 µL pufera za eluiranje. Uzorci su centrifugirani 1 minutu na 12000 g i nakon centrifugiranja uzorci DNA su bili u epruvetama, otopljeni u puferu. Koncentracija i čistoća DNA se provjerila spektrofotometrijski.

Nakon pročišćavanja insert za gen *groL* je ligiran u vektor pBad-A pomoću T4 DNA ligaze (Thermo Scientific). Ligacijska smjesa se napravila prema uputama proizvođača (Tablica 16). Ligacija je trajala 20 min na sobnoj temperaturi nakon čega se enzim ligaza inaktivirao inkubiranjem na 65 °C 10 min. Dobivena ligacijska smjesa se koristila za transformaciju *E. coli* NEB 5α stanica, na isti način kao u poglavlju 2.2.3.2.

Tablica 16. Sastav smjese za ligaciju gena *groL* u vektor pBad.

Naziv otopine i koncentracija	Volumen (μL)
PCR produkt za <i>groL</i> (20 ng/μL)	2,4
Vektor pBad-A (4 ng/μL)	6
Pufer za DNA ligazu (10X)	2
Enzim T4 DNA ligaza (1 U/μL)	0,35
H ₂ O	9,25

2.2.3.5. PCR na pojedinačnim kolonijama

Uspješnost kloniranja gena *groL* u vektor pBad-A provjerila se metodom PCR na pojedinačnim kolonijama. Kalup za PCR se pripremio tako da su se bakterijske kolonije čačkalicom prebacile u epicu s 30 μL vode i smjesa se inkubirala 3 min na 98 °C. Za PCR se koristio EmeraldAmp® PCR Master Mix (Takara). Korištene su univerzalne početnice koje se vežu na *forward* i *reverse* priming mjesto na plazmidu pBad-A. Reakcijska smjesa se pripremila prema uputama proizvođača (Tablica 17). Koristio se isti PCR program kao i za umnažanje gena *cbl*, *dnaK* i *sodA* (Tablica 11). Rezultati su provjereni agaroznom gel elektroforezom.

Iz bakterijske kolonije s kloniranim *groL*, plazmid pMR9 se izolirao na isti način kao i plazmidi pMR6, pMR7 i pMR8. Uspješnost ugradnje gena *groL* u pBad-A se dodatno provjerila cijepanjem izoliranog plazmida restrikcijskim enzimom *PvuII* (Thermo Scientific). Restrikcijska smjesa je pripremljena prema uputama proizvođača (Tablica 18) te se inkubirala 1h na 37 °C. Rezultati su provjereni agaroznom gel elektroforezom (2.2.2.2.).

Tablica 17. Sastav smjese za umnažanje gena *groL* metodom PCR na pojedinačnim kolonijama pomoću EmeraldAmp® PCR Master Mixa.

Naziv otopine i koncentracija	Volumen (µL)
EmeraldAmp PCR Master Mix (2X)	5
F-početnica (10µM)	0,2
R-početnica (10µM)	0,2
Kalup DNA	1
H ₂ O	3,6

Tablica 18. Sastav smjese za restrikciju plazmida pMR9 restrikcijskim enzimom *PvuII*.

Naziv otopine	Volumen (µL)
Plazmidna DNA, pMR9	5
Pufer <i>Green</i> (10X)	1
Enzim <i>PvuII</i>	1
H ₂ O	3

2.2.3.6. Sekvenciranje

Konstruirani plazmidi pMR6, pMR7, pMR8 i pMR9 su poslani na sekvenciranje u servis Macrogen kako bi se utvrdila ispravnost kloniranja. Uzorci za sekvenciranje su pripremljeni prema uputama na web stranici servisa Macrogen. Plazmidi su otopljeni u deioniziranoj vodi tako da je koncentracija bila veća od 100 ng/µL, a na sekvenciranje se poslalo 2 µg svakog plazmida. Korištene su univerzalne početnice koje se vežu na *forward* i *reverse* priming mjesto na plazmidu pBad-A. Plazmidi su sekvencirani Sangerovom metodom u Applied Biosystems 3730XL sekvenceru. Rezultati sekvenciranja se dobiju preko interneta u formatu prikladnom za analizu sekvence i kvalitete same reakcije sekvenciranja.

2.2.4. Transformacija bakterijskih stanica plazmidima

Bakterije narasle do logaritamske faze ($OD_{600} = 0,55$) su razdijeljene u epruvete od 1,5 mL i istaložene na 6500 g, 2 minute i 30 sekundi. Nakon centrifugiranja odlio se supernatant te se talog resuspendirao sa 200 μ L hladnog 50 mM $CaCl_2$. Centrifugiranje se ponovilo te se talog resuspendirao u 50 μ L 50 mM $CaCl_2$. Kalcijev klorid se veže na bakterijsku ovojnicu te destabilizira negativno nabijenu membranu koja postaje polupropusna za plazmidnu DNA. Bakterije su inkubirane na ledu oko 15 minuta, potom se dodao 1 μ L plazmida te su bakterije ponovo vraćene na led 30 minuta. Zatim se napravio toplinski šok, uzorci su stavljeni u termoblok zagrijan na 42 °C na 60 sekundi, a zatim na led 60 sekundi. Dodalo se 200 μ L tekućeg LB medija te su se bakterije oporavile u tresilici na 37 °C kroz 1h. Nakon toga su bakterije nasadene na čvrste podloge s ampicilinom i inkubirane na 37 °C preko noći.

2.2.5. Konstruiranje bakterijskih sojeva metodom transdukcije fagom

P1vir

Prvo su pripremljeni lizati faga *P1vir* na odgovarajućim donorskim bakterijskim sojevima (IIB1269, MR019, MR020, MR021 i MR023). Donorski sojevi su uzgojeni u 10 mL tekućeg medija LB do rane logaritamske faze na 37 °C, $OD_{600} = 0,3$. Kulturama se dodalo 60 μ L 1M $CaCl_2$ i 50 μ L lizata bakteriofaga *P1vir* te su inficirane bakterije inkubirane u tresilici oko 4 sata na 37 °C sve dok nije nastupila liza. Liziranim bakterijama se dodalo 500 μ L kloroforma kroz 5 minuta uz povremeno miješanje kako bi se bakterije dodatno lizirale. Lizat se centrifugirao 12 minuta na 13000 g pri temperaturi od 4 °C da se uklone bakterijski ostaci, a supernatanti su prebačeni u sterilne staklene epruvete. Ovako su pripremljeni lizati bakteriofaga *P1vir* čuvaju se u frižideru na +4 °C i koriste se za transdukciju.

Prekonoćne kulture bakterijskih sojeva se razdijele u epruvete od 1,5 mL i istalože na 6500 g, 2 i pol minute te se talog resuspendira u 200 μ L pufera MC (Tablica 5) koji pomaže adsorpciji bakteriofaga. Bakterijama se dodalo 200 μ L bakteriofaga *P1vir* uzgojenih na donorskom soju i smjesa bakterija i virusa se inkubirala 30 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, dodano je 200 μ L 1M natrijevog citrata da veže Ca^{2+} ione, čime se zaustavlja infekcija bakteriofagom *P1vir*. Na selektivne podloge LB s antibioticima se izlilo 3 mL mekog agra, u koji je prethodno dodana smjesa za transdukciju. Podloge su inkubirane na 37 °C preko noći.

2.2.6. Određivanje uspješnosti formiranja čistina bakteriofaga T4

U 3 mL mekog agara dodalo se 200 μ l prekonoćnih bakterijskih kultura i prelilo se na čvrste LB podloge. Napravljena su decimalna razrjeđenja bakteriofaga T4 (od 10^{-2} do 10^{-7}) u puferu M/15 (Tablica 6) te su alikvoti faga (10 μ L) nanešeni na dobivene „bakterijske livade“. Kada su se fagi upili u agar, podloge su inkubirane na 30 °C i 37 °C preko noći. Drugi dan su prebrojane čistine bakteriofaga T4 te se izračunao PFU/mL (od engl. *plaque-forming unit*) za svaki soj i svaku temperaturu. PFU/mL se računa tako da se broj nastalih čistina pomnoži s faktorom decimalnog razrjeđenja i sa 100, jer se na ploče stavio alikvot od 10 μ L, a PFU se izražava u mL.

2.2.7. Određivanje uspješnosti adsorpcije bakteriofaga T4

U epruветama od 1,5 mL se napravila predadsorpcija dodavanjem 880 μ L pufera M/15, 20 μ L 10^{-4} razrjeđenja bakteriofaga T4 i 100 μ L svježe uzgojenih prekonoćnih bakterijskih kultura na 30 °C i 37 °C. Smjesa se inkubirala 15 minuta na onoj temperaturi na kojoj su uzgojene bakterije i zatim se centrifugirala 1 minutu na 10000 g. Bakterijske stanice zajedno s adsorbiranim fagima su nakon centrifugiranja bile u talogu, dok su u supernatantu zaostali fagi koji se nisu adsorbirali. U meki agar je dodano 100 μ L supernatanta i 200 μ L prekonoćne kulture divljeg tipa bakterija. Meki agar se zatim prelio na čvrste LB podloge koje su inkubirane preko noći na 37 °C. Drugi dan su prebrojane nastale čistine te je izračunat PFU/mL i udio adsorbiranih bakteriofaga.

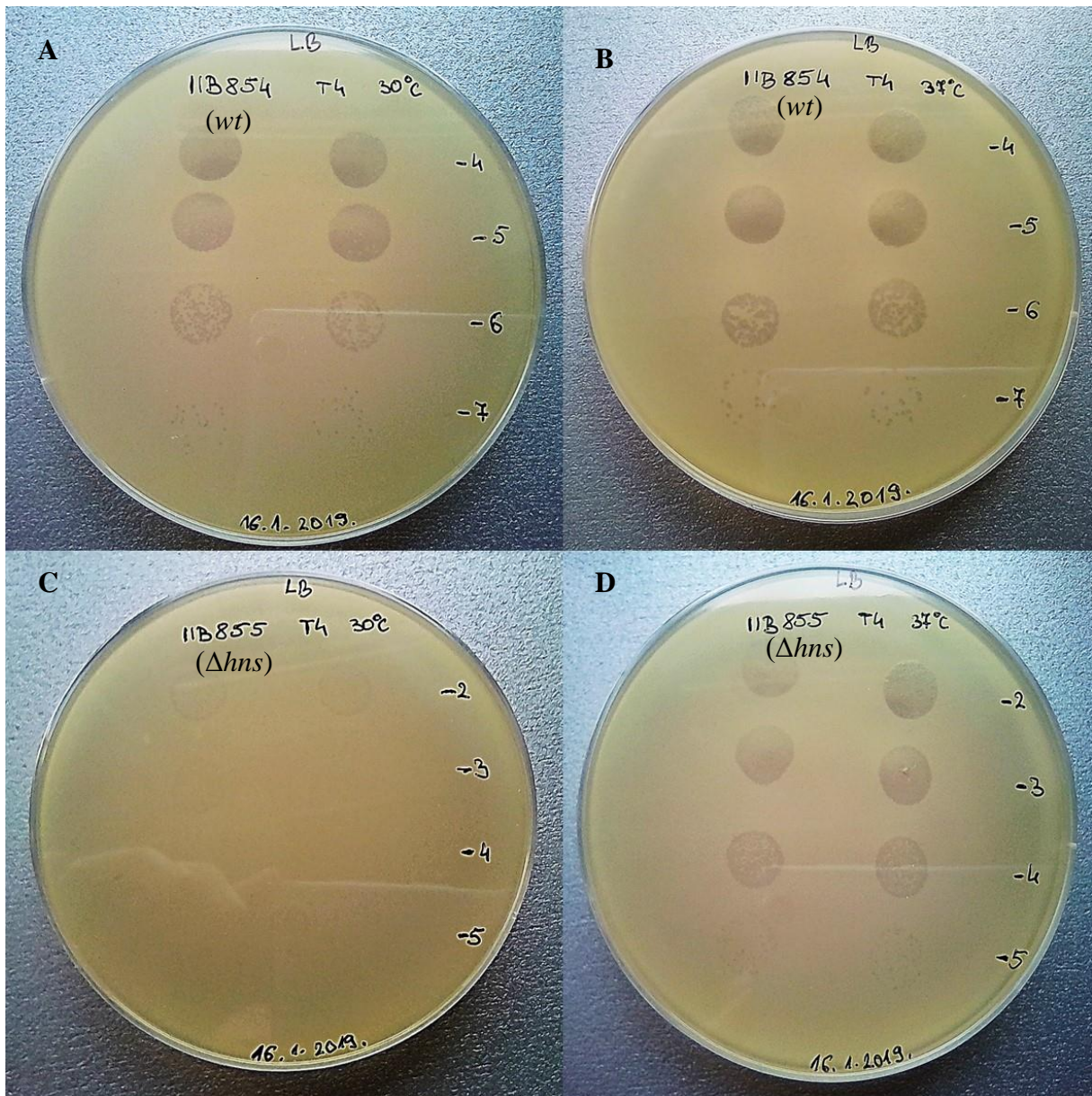
3. REZULTATI

3.1. Utjecaj temperature i proteina H-NS na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4

Uspješnost formiranja čistina bakteriofaga na stanicama bakterija domaćina može ovisiti o mnogim čimbenicima poput temperature, sastava medija - iona, soli i kiselosti, jer može utjecati na preživljenje faga, odnosno dovesti do oštećenja faga (Mullan, 2002). Prvo smo istražili ovisi li uspješnost formiranja broja plakova/čistina (PFU) faga T4 o temperaturi inkubiranja u stanicama divljeg tipa (IIB854). Inficirane bakterijske stanice divljeg tipa inkubirali smo preko noći na 30 °C i 37 °C. Na obje temperature bakteriofag T4 je formirao vidljive, podjednako velike čistine sa sličnom efikasnošću (Tablica 19). Utjecaj temperature je također istraživao na bakterijskim stanicama bez gena *hns* (IIB855). Bakteriofag T4 na njima nije formirao čistine nakon inkubacije na 30 °C, dok su na 37 °C formirane čistine, ali su bile sitnije u odnosu na čistine nakon infekcije divljeg tipa (Slika 4). Također, efikasnost formiranja čistina bila je za oko 100 puta manja u odnosu na stanice divljeg tipa (Tablica 19).

Tablica 19. Efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4. Bakterijski sojevi inficirani bakteriofagom T4 su se inkubirali na 30 °C i 37 °C. PFU/mL se izračunao iz broja nastalih čistina bakteriofaga T4.

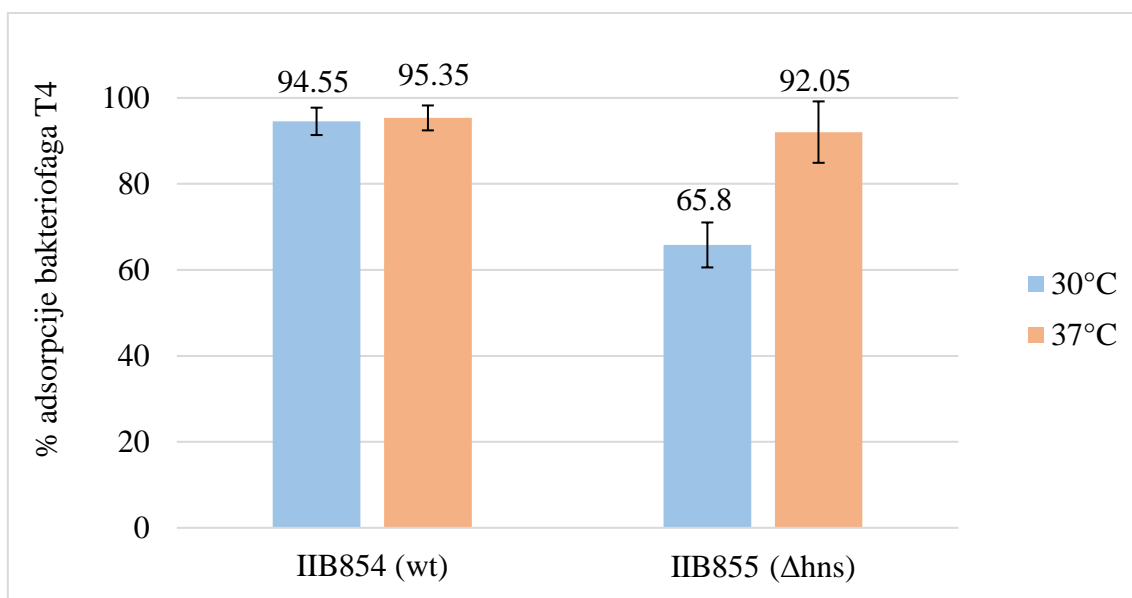
Bakterijski soj	PFU/mL	Standardna devijacija	PFU/mL	Standardna devijacija
IIB854 (<i>wt</i>)	3,31*10 ⁹	9,72*10 ⁸	4,38*10 ⁹	1,84*10 ⁹
IIB855 (Δhns)	0	0	2,91*10 ⁷	2,65*10 ⁶
IIB1025 ($\Delta stpA$)	3,83*10 ⁹	4,60*10 ⁸	3,74*10 ⁹	1,25*10 ⁹
IIB1029 ($\Delta hns \Delta stpA$)	0	0	0	0
IIB855 + pBad-A	0	0	1,37*10 ⁸	7,50*10 ⁷
IIB855 + pMR5	3,30*10 ⁹	9,90*10 ⁸	3,45*10 ⁹	1,41*10 ⁸
IIB1029 + pBad-A	0	0	0	0
IIB1029 + pMR5	2,14*10 ⁹	3,69*10 ⁸	2,70*10 ⁹	5,00*10 ⁷
	30 °C		37 °C	



Slika 4. Čistine bakteriofaga T4 formirane nakon infekcije bakterijskih sojeva divljeg tipa (IIB854) i Δhns (IIB855). A) *wt* inkubiran na 30 °C; B) *wt* inkubiran na 37 °C; C) Δhns inkubiran na 30 °C; D) Δhns inkubiran na 37 °C.

3.2. Efikasnost adsorpcije bakteriofaga T4

Temperatura ima ključnu ulogu u adsorpciji, ulasku i umnažanju faga. Na nižoj temperaturi manje će faga ući u stanicu i započeti umnažanje (Jończyk i sur., 2011) pa smo željeli istražiti je li razlog neformiranja čistina u Δhns stanicama na nižoj temperaturi posljedica smanjene adsorpcije bakteriofaga T4 ili je došlo do promjene u ekspresiji određenih gena koji mogu utjecati na umnažanje faga T4. Efikasnost adsorpcije bakteriofaga T4 je određena na stanicama divljeg tipa i Δhns mutantu uzgojenih na obje temperature i inkubiranih s fagima na obje temperature. U divljem tipu stanica efikasnost adsorpcije je visoka na obje temperature, i udio adsorbiranih bakteriofaga je iznosio preko 90% (Slika 5). U mutantu Δhns na 37 °C nije došlo do smanjenja efikasnosti adsorpcije u odnosu na divlji tip. Adsorbiralo se 92,05% bakteriofaga, dok se na 30 °C u Δhns mutantu adsorbiralo samo 65,8% bakteriofaga (Slika 5). Iz navedenih rezultata može se zaključiti da se manje bakteriofaga adsorbira u stanicama Δhns na 30 °C, ali da to ipak ne može objasniti potpuni izostanak čistina bakteriofaga T4 u ovom soju.



Slika 5. Efikasnost adsorpcije bakteriofaga T4 (%) na bakterijske sojeve IIB854 (*wt*) i IIB855 (Δhns) pri različitim temperaturama inkubiranja (30 °C i 37 °C). Raspon pogreške (engl. *error bar*) prikazuje standardnu devijaciju.

3.3. Utjecaj proteina StpA na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4

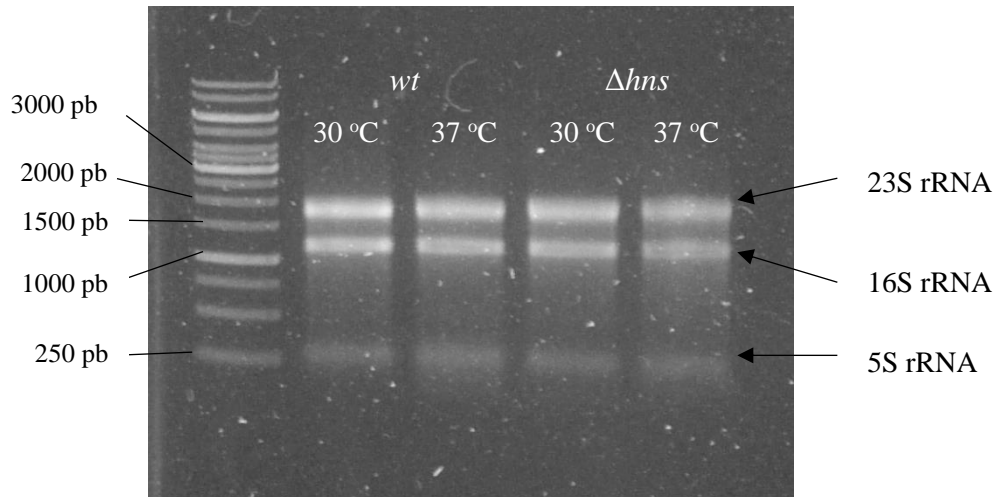
Budući da proteini H-NS i StpA imaju slične uloge u stanici (Zang i sur., 1996) i gen *stpA* je manje eksprimiran na 26 °C u odnosu na 37 °C u mutantu Δhns (Sonden i Uhlin, 1996), zanimalo nas je utječe li protein StpA na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4. Efikasnost formiranja čistina faga T4 određena je u mutantu $\Delta stpA$ (IIB1025) na 30 °C i 37 °C. Temperatura inkubacije i nedostatak gena *stpA* nisu imali učinak na formiranje čistina. Bakteriofag T4 je na obje temperature formirao podjednako velike čistine sa sličnom efikasnošću (Tablica 19), kao i nakon infekcije stanica divljeg tipa. Međutim, u dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta stpA$ (soj IIB1029) bakteriofag T4 nije formirao čistine na 30 °C niti na 37 °C (Tablica 19). Dakle, došlo je do sinergističkog, pojačavajućeg negativnog učinka na formiranje čistina faga T4 u dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta stpA$ na 37 °C.

S obzirom da protein StpA može djelomično kompenzirati nedostatak proteina H-NS jer inhibira ekspresiju epistatskih gena u mutantu Δhns (Srinivasan i sur., 2013), te se nedostatkom gena *stpA* u mutantu Δhns efekt pojačao, željeli smo istražiti hoće li prekomjerna ekspresija proteina StpA s plazmida revertirati - ponovno uspostaviti efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4. Mutanti Δhns i $\Delta hns \Delta stpA$ transformirani su s vektorom u koji je ukloniran gen *stpA* (pMR5), te je određena efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4 na obje temperature. Bakteriofag T4 je pokazao podjednaku efikasnost formiranja čistina na obje temperature (Tablica 19), s time da su čistine sitnije na 30 °C nego na 37 °C. PFU/mL bakteriofaga T4 se dodatno povećao 10 puta u odnosu na iste sojeve transformirane praznim vektorom. Iz svega navedenog možemo zaključiti da se prekomjernom ekspresijom proteina StpA uspostavilo formiranje čistina u mutantu Δhns na 30 °C što ukazuje da protein StpA ima važnu ulogu u formiranju čistina faga T4.

3.4. Ekspresija gena *stpA* u ovisnosti o temperaturi u mutantu Δhns

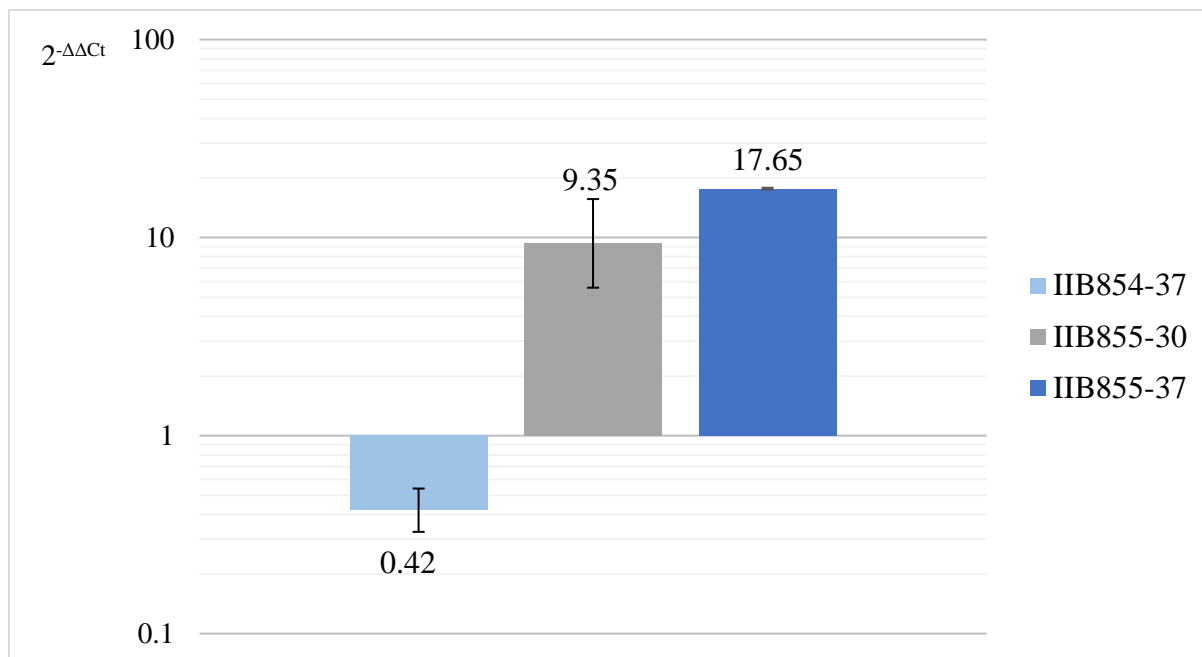
Prethodni rezultati ukazuju da je razlog neformiranja čistina faga T4 u mutantu Δhns nedostatak proteina StpA na 30 °C što je opisano u literaturi (Sonden i Uhlin, 1996). Kako bismo to potvrdili, odredili smo količine transkripata gena *stpA* u stanicama divljeg tipa i u mutantu Δhns uzgojenih do logaritamske faze rasta ($OD_{600}=0,6$) na 30 °C i 37 °C. Iz izolirane RNA se metodom qRT-PCR odredila ekspresija gena *stpA* za svaki soj i temperaturu. Rezultati su se kvantificirali metodom $\Delta\Delta Ct$ te se odredila relativna ekspresija gena *stpA* u odnosu na ekspresiju u divljem tipu na 30 °C.

Nakon elektroforeze ukupne stanične RNA na gelu su se vidjele vrpce rRNA (ribosomske RNA): 23S rRNA, 16S rRNA i 5S rRNA (Slika 6). Na gelu se nije vidjela genomaska DNA što znači da je tretman DNazom bio uspješan.



Slika 6. Rezultati elektroforeze nakon izolacije ukupne stanična RNA izolirane iz divljeg tipa stanica i Δhns mutanta na 30 °C i 37 °C. Za elektroforezu je korišten marker Gene Ruler 1kb, DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

U divljem tipu (IIB854) ekspresija gena *stpA* je 2,4 puta manja na 37 °C nego na 30 °C (Slika 7). U Δhns mutantu dolazi do povećanja ekspresije gena *stpA* u odnosu na divlji tip. Na 30 °C Δhns mutant ima 9,35 puta veću ekspresiju gena *stpA* nego divlji tip na 30 °C (Slika 7). Na 37 °C ekspresija gena *stpA* u Δhns mutantu je 17,65 puta veća nego ekspresija u divljem tipu na 30 °C, te 42 puta veća u odnosu na ekspresiju u divljem tipu na 37 °C (Slika 7). Drugim riječima, Δhns mutant ima 1,8 puta veću ekspresiju gena *stpA* na 37 °C nego na 30 °C. Metodom qRT-PCR se umnožio gen *stpA* u $\Delta stpA$ mutantu (IIB1025) i u dvostrukom $\Delta hns \Delta stpA$ mutantu (IIB1029). S obzirom da je u tim sojevima u potpunosti deletiran gen *stpA*, njegova ekspresija je bila zanemariva i dobiveni rezultati se nisu analizirali.



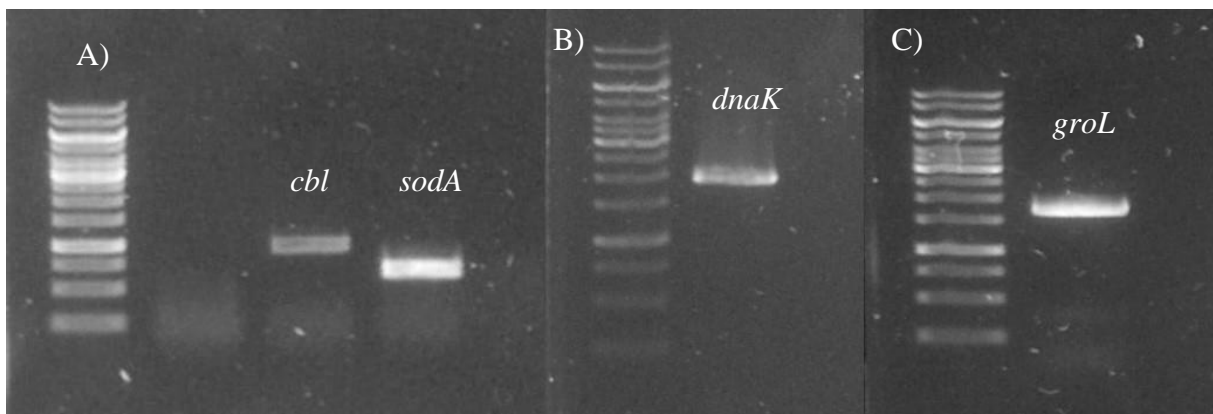
Slika 7. Relativna ekspresija gena *stpA* u bakterijskim sojevima divljeg tipa (IIB854) i u mutantu Δhns (IIB855). Rezultati qRT-PCR-a su se kvantificirali metodom $\Delta\Delta C_t$ te se odredila relativna ekspresija gena *stpA* u odnosu na ekspresiju u bakterijskom soju divljeg tipa koji je do logaritamske faze rasta uzgojen na 30 °C. Bakterijski soj IIB855 ima veću ekspresiju gena *stpA* na 30 °C i 37 °C u odnosu na bakterijski soj IIB854. Y-os je prikazana na logaritamskoj skali. Raspon pogreške (engl. *error bar*) prikazuje standardnu pogrešku.

3.5. Utjecaj epistatskih gena na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4

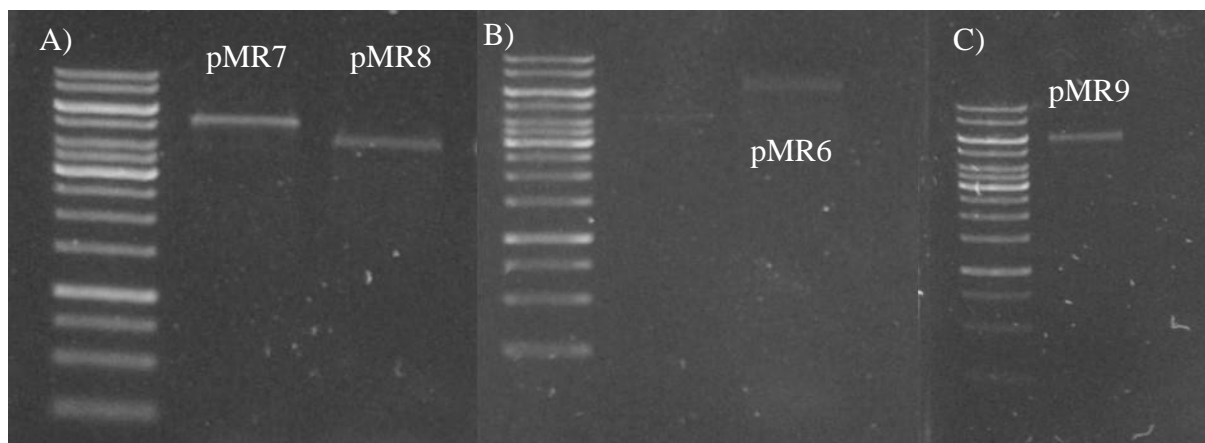
Epistatski geni su oni čija je ekspresija regulirana s oba proteina H-NS i StpA. U divljem tipu stanica njihova ekspresija je vrlo mala, ali se povećava kada nema proteina H-NS i StpA (Srinivasan i sur., 2013). Kako su prethodni rezultati pokazali da je u Δhns mutantu manja ekspresija gena *stpA* na 30 °C u odnosu na 37 °C, pretpostavili smo da je moguće da je neki epistatski gen pojačano eksprimiran na 30 °C te da inhibira nastanak čistina bakteriofaga T4, ali se njegov učinak ne vidi u divljem tipu stanica pošto mu je ekspresija inhibirana proteinima H-NS i StpA. Da bi provjerili našu pretpostavku odabrali smo nekoliko epistatskih gena čija se ekspresija mijenja nakon infekcije bakteriofagima (Poranen i sur., 2006), te smo istražili kako odabrani geni utječu na formiranje čistina bakteriofaga T4.

Kako bi se istražio utjecaj epistatskih gena na uspješnost formiranja čistina bakteriofaga T4, najprije su se klonirali geni *cbl*, *dnaK*, *sodA* i *groL* dok smo za gene *htpG* i *cspA* imali odgovarajuće plazmidne konstrukte (Tablica 3).

Najprije su se PCR-om pomoću Q5[®] DNA polimeraze umnožili geni *cbl*, *dnaK*, *groL* i *sodA*. Nakon elektroforeze PCR produkta dobili smo vrpce veličine koje su odgovarale veličini umnoženih gena *cbl* (1000 pb), *dnaK* (2000 pb), *groL* (1600 pb) i *sodA* (700 pb) (Slika 8). Uspješnost kloniranja gena u vektor pBad-A je provjerena cijepanjem restriksijskim enzimima. Plazmidi pMR6, pMR7 i pMR8 su se cijepali restriksijskim enzimom *KpnI*, a plazmid pMR9 se cijepao restriksijskim enzimom *PvuII*. Rezultati restrikcije su se provjerili agaroznom elektroforezom. Na Slici 9 se vidi da su se svi geni uspješno klonirali u vektor. Nakon elektroforeze dobivene su vrpce veličine 5000 pb (pMR7, pCbl), 4500 pb (pMR8, pSodA), 6500 pb (pMR6, pDnaK) i 6000 pb (pMR9, pGroL), a pBad-A je velik oko 4100 pb. Uspješnost ugradnje gena u vektor se još dodatno potvrdila sekvenciranjem (rezultati nisu prikazani). Svi geni su uspješno klonirani u plazmid te imaju ispravnu sekvencu.



Slika 8. Rezultati elektroforeze nakon umnažanja gena *cbl*, *sodA* (A), *dnaK* (B) i *groL* (C) Q5[®] DNA polimerazom. Za elektroforezu je korišten marker Gene Ruler 1kb, DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).



Slika 9. Rezultati elektroforeze nakon cijepanja plazmida pMR6 (B), pMR7 i pMR8 (A) restrikcijom enzimom *KpnI* i plazmida pMR9 (C) restrikcijom enzimom *PvuII*. Za elektroforezu je korišten marker Gene Ruler 1kb, DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Zatim se Δhns mutant transformirao plazmidnim konstruktima s epistatskim genima *cbl*, *cspA*, *dnaK*, *groL*, *htpG* i *sodA*. Odredilo se kako prekomjerna ekspresija pojedinih epistatskih gena u Δhns mutantu utječe na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4 na 30 °C i 37 °C. Očekivali smo da će prekomjernom ekspresijom epistatskog gena biti onemogućeno formiranje čistina bakteriofaga T4 na 37 °C, ili da se čistine uopće ne bi formirale, slično kao u dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta stpA$.

Nakon prekomjerne ekspresije epistatskih gena *cbl*, *cspA*, *dnaK*, *groL*, *htpG* i *sodA* bakteriofag T4 nije formirao čistine na 30 °C (Tablica 20), isto kao i u Δhns mutantu bez plazmida. Nakon prekomjerne ekspresije gena *htpG*, *dnaK* i *sodA* u Δhns mutantu bakteriofag T4 je imao 10 puta veću efikasnost infekcije na 37 °C u odnosu na Δhns mutant transformiran praznim vektorom (Tablica 20). Geni *cbl*, *cspA* i *groL* nisu utjecali na efikasnost infekcije bakteriofaga T4 na 37 °C u odnosu na prazne vektore (Tablica 20). Bakteriofag T4 je formirao veće čistine nakon infekcije Δhns mutanta u kojima su prekomjerno ekspimirani geni *cbl* i *dnaK* u odnosu na ostale sojeve. Prekomjerna ekspresija epistatskih gena *cbl*, *cspA*, *dnaK*, *groL*, *htpG* i *sodA* nije imala značajan učinak na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4, tj. niti jedan gen nije smanjio efikasnost infekcije bakteriofaga T4 na 37 °C. Uočeno je da se prekomjernom ekspresijom gena *groL* u Δhns mutantu smanjila vijabilnost bakterija. Prekonoćna kultura je narasla do $OD_{600}=1,4$, dok su sve ostale prekonoćne kulture narasle do $OD_{600}=2,0$.

Tablica 20. Efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4 nakon infekcije bakterijskog soja *Δhns* (IIB855) s eksprimiranim epistatskim genima s plazmida. Nakon infekcije bakteriofagom T4 bakterijski sojevi su se inkubirali na 30 °C i 37 °C. PFU/mL bakteriofaga T4 za svaki bakterijski soj i svaku temperaturu se izračunao iz broja nastalih čistina.

Bakterijski soj	PFU/mL	Standardna devijacija	PFU/mL	Standardna devijacija
IIB855 + pBad18-Amp	0	0	1,74*10 ⁸	1,14*10 ⁸
IIB855 + pBAD18-HtpG	0	0	1,52*10 ⁹	1,98*10 ⁸
IIB855 + pINIII	0	0	6,95*10 ⁸	3,04*10 ⁸
IIB855 + pINcspA	0	0	3,63*10 ⁸	3,01*10 ⁸
IIB855 + pMR6	0	0	1,02*10 ⁹	6,12*10 ⁸
IIB855 + pMR7	0	0	3,90*10 ⁸	1,41*10 ⁸
IIB855 + pMR8	0	0	2,04*10 ⁹	2,83*10 ⁷
IIB855 + pMR9	0	0	5,93*10 ⁸	1,80*10 ⁸
	30 °C		37 °C	

Nakon što se odredilo kako povećanje ekspresije epistatskih gena u *Δhns* mutantu utječe na uspješnost infekcije bakteriofaga T4, istražilo se kakav učinak ima delecija istih pojedinih epistatskih gena (*dnaK*, *sodA*, *cbl*, *groL*, *rnc*) u stanicama divljeg tipa. Nakon infekcije mutanata *ΔdnaK*, *ΔsodA*, *Δcbl*, *ΔgroL* i *Δrnc* efikasnost infekcije bakteriofaga T4 je slična na 30 °C i 37 °C te iznosi iznosi oko 2*10¹⁰ PFU/mL (Tablica 21). Bakteriofag T4 formira jasno vidljive, podjednako velike čistine na obje temperature. Delecija epistatskih gena *dnaK*, *sodA*, *cbl*, *groL* i *rnc* u divljem tipu stanica nije imala nikakav učinak na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4. Ovakav rezultat je u skladu s očekivanjima pošto epistatski geni ionako imaju zanemarivo malu razinu ekspresije u divljem tipu stanica (Srinivasan i sur., 2013).

Tablica 21. Efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4 nakon infekcije bakterijskih sojeva u kojima su deletirani epistatski geni. Nakon infekcije bakteriofagom T4 bakterijski sojevi su se inkubirali na 30 °C i 37 °C. PFU/mL bakteriofaga T4 za svaki bakterijski soj i svaku temperaturu se izračunao iz broja nastalih čistina.

Bakterijski soj	PFU/mL	Standardna devijacija	PFU/mL	Standardna devijacija
MR019 ($\Delta dnaK$)	$2,80 \cdot 10^{10}$	$1,41 \cdot 10^9$	$2,33 \cdot 10^{10}$	$3,18 \cdot 10^9$
MR020 ($\Delta sodA$)	$2,08 \cdot 10^{10}$	$2,47 \cdot 10^9$	$2,48 \cdot 10^{10}$	$4,60 \cdot 10^9$
MR021 (Δcbl)	$2,38 \cdot 10^{10}$	$1,77 \cdot 10^9$	$2,50 \cdot 10^{10}$	$5,66 \cdot 10^9$
MR022 ($\Delta groL$)	$2,28 \cdot 10^{10}$	$6,72 \cdot 10^9$	$2,23 \cdot 10^{10}$	$6,72 \cdot 10^9$
MR024 (Δrnc)	$2,75 \cdot 10^{10}$	$3,54 \cdot 10^9$	$2,40 \cdot 10^{10}$	$7,07 \cdot 10^8$
	30 °C		37 °C	

Na kraju su se konstruirali dvostruki mutanti u kojima su deletirani pojedini epistatski geni (*dnaK*, *sodA*, *cbl*, *groL*, *rnc*) zajedno s genom *hns*. Istražilo se kako dobivene mutacije utječu na efikasnost infekcije bakteriofaga T4 na 30 °C i 37 °C. Delecijom gena *hns* i epistatskog gena koji inhibira nastanak čistina bi se povećala efikasnost infekcije bakteriofaga T4, te bi bakteriofag formirao čistine na 30 °C, slično kao u divljem tipu stanica.

Kao i nakon infekcije Δhns mutanta, bakteriofag T4 nije formirao čistine na 30 °C nakon infekcije dvostrukih mutanta u kojima su deletirani pojedini epistatski geni (*dnaK*, *sodA*, *cbl*, *groL* i *rnc*) i gen *hns* (Tablica 22). Nakon inkubacije na 37 °C bakteriofag T4 ima 10 puta veću efikasnost infekcije u dvostrukim mutantima $\Delta dnaK \Delta hns$ (MR026), $\Delta cbl \Delta hns$ (MR028) i $\Delta groL \Delta hns$ (MR034) i 100 puta veću efikasnost infekcije u dvostrukim mutantima $\Delta rnc \Delta hns$ (MR025) i $\Delta sodA \Delta hns$ (MR027) u odnosu na Δhns mutant (Tablica 22), ali je bakteriofag T4 na 37 °C formirao sitne plakove kao i nakon infekcije Δhns mutanta. Iako se na 37 °C povećala efikasnost infekcije u odnosu na Δhns mutant, delecija epistatskih gena *dnaK*, *sodA*, *cbl*, *groL* i *rnc* nije pokazala značajan učinak na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4 pošto nisu formirane čistine na 30 °C. Uspoređivanjem ovih rezultata s rezultatima dobivenih nakon prekomjerne ekspresije epistatskih gena može se zaključiti da niti jedan od istraživanih

epistatskih gena (*cbl*, *cspA*, *dnaK*, *groL*, *htpG*, *rnc*, *sodA*) ne utječe na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4.

Tablica 22. Efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4 nakon infekcije bakterijskih sojeva u kojima je deletiran gen *hns* te pojedini epistatski geni. Nakon infekcije bakteriofagom T4 bakterijski sojevi su se inkubirali na 30 °C i 37 °C. PFU/mL bakteriofaga T4 za svaki bakterijski soj i svaku temperaturu se izračunao iz broja nastalih čistina.

Bakterijski soj	PFU/mL	Standardna devijacija	PFU/mL	Standardna devijacija
MR025 ($\Delta rnc \Delta hns$)	0	0	$2,44 \cdot 10^9$	$3,01 \cdot 10^8$
MR026 ($\Delta dnaK \Delta hns$)	0	0	$7,42 \cdot 10^8$	$6,25 \cdot 10^8$
MR027 ($\Delta sodA \Delta hns$)	0	0	$1,54 \cdot 10^9$	$7,60 \cdot 10^8$
MR028 ($\Delta cbl \Delta hns$)	0	0	$3,51 \cdot 10^8$	$8,31 \cdot 10^7$
MR034 ($\Delta groL \Delta hns$)	0	0	$4,55 \cdot 10^8$	$2,83 \cdot 10^8$
	30 °C		37 °C	

3.6. Utjecaj proteaze Lon na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4

Prethodni rezultati su pokazali da bakteriofag T4 ne može formirati čistine na 30 °C u Δhns mutantu jer nema dovoljno proteina StpA u stanici. Ekspresija proteina StpA je, osim na transkripcijskoj razini, regulirana i na posttranslacijskoj razini, degradacijom putem proteaze Lon. Protein H-NS štiti protein StpA od degradacije proteazom Lon, pa u Δhns mutantu proteaza Lon može u potpunosti degradirati protein StpA (Johansson i Uhlin, 1999). Stoga smo očekivali da će delecijom proteaze Lon u Δhns mutantu doći do povećanja količine proteina StpA u stanici, čime se inhibira ekspresija epistatskih gena, te posljedično dolazi do formiranja čistina bakteriofaga T4 na 30 °C. Za istraživanje utjecaja proteaze Lon na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4 su korišteni bakterijski sojevi derivati *E. coli* B i *E. coli* K-12. Gen *lon* je prirodno mutiran u svim sojevima derivatima *E. coli* B, dok se Δlon mutant, derivat soja *E.*

coli K-12 konstruirao pomoću transdukcije i prijenosom mutacije u Δhns stanice (Baba i sur., 2006).

U bakterijskom soju derivatu *E. coli* K-12 delecija gena *lon* u divljem tipu stanica (soj MR023) nije imala nikakav utjecaj na efikasnost infekcije bakteriofaga. Bakteriofag T4 je na obje temperature formirao podjednako velike, jasno vidljive čistine s podjednakom efikasnošću (Tablica 23). Nakon infekcije dvostrukog mutanta $\Delta lon \Delta hns$ (soj MR031), koji je derivat *E. coli* K-12, bakteriofag T4 nije formirao čistine na 30 °C (Tablica 23). Bakteriofag T4 je na 37 °C formirao čistine, ali su one bile mutne i općenito slabo vidljive, iako su bile velike kao i nakon infekcije mutanta Δlon . Efikasnost infekcije bakteriofaga T4 na 37 °C je bila oko 10 puta manja u dvostrukom mutantu $\Delta lon \Delta hns$ nego u mutantu Δlon (Tablica 23). Iz dobivenih rezultata se može zaključiti da delecija proteaze ne Lon utječe na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4. Kako bi se u mutantu $\Delta lon \Delta hns$ bolje vidjele čistine smanjili smo volumen mekog agra (na 2,5 mL) prilikom određivanja efikasnosti infekcije bakteriofaga T4, te smo koristili meki agar bez ekstrakta kvasca, ali ništa od navedenog nije omogućilo formiranje jasno vidljivih čistina. Dvostruki mutant $\Delta lon \Delta hns$ (MR031) je također imao specifičan fenotip. Nastale kolonije su puno veće u odnosu na divlji tip stanica, te imaju nepravilan/sluzast oblik. Kako bi provjerili da li je nastali fenotip rezultat pogreške prilikom konstruiranja soja MR031, konstruirali smo mutante $\Delta lon \Delta hns$ koristeći druge sojeve, isto derivate *E. coli* K-12. Ispostavilo se da dobiveni fenotip nije karakteristika samo MR031 soja već i svih dvostukih mutanata $\Delta lon \Delta hns$ derivata *E. coli* K-12.

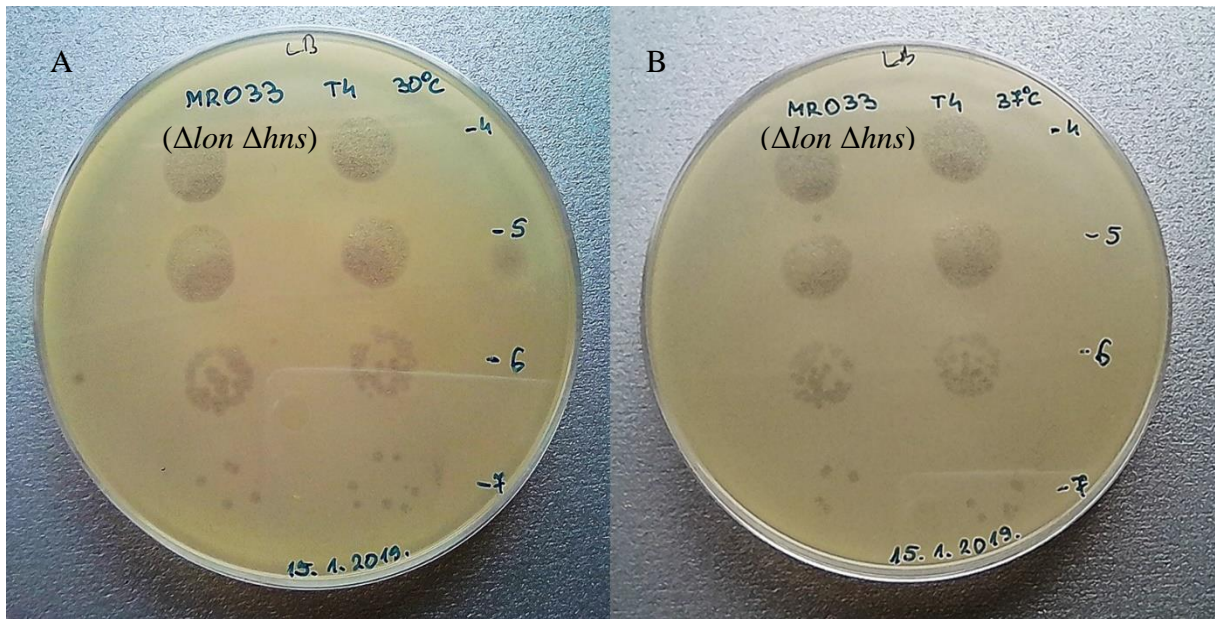
Tablica 23. Efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4 nakon infekcije bakterijskih sojeva koji su derivati *E. coli* K-12 soja. Nakon infekcije bakteriofagom T4 bakterijski sojevi su se inkubirali na 30 °C i 37 °C. PFU/mL bakteriofaga T4 za svaki bakterijski soj i svaku temperaturu se izračunao iz broja nastalih čistina.

Bakterijski soj	PFU/mL	Standardna devijacija	PFU/mL	Standardna devijacija
MR023 (Δlon)	$3,32 \cdot 10^{10}$	$1,16 \cdot 10^{10}$	$2,85 \cdot 10^{10}$	$1,44 \cdot 10^{10}$
MR031 ($\Delta lon \Delta hns$)	0	0	$2,51 \cdot 10^9$	$2,70 \cdot 10^9$
	30 °C		37 °C	

Nakon infekcije sojeva *E. coli* B, koji imaju prirodno deletiran gen *lon*, bakteriofagom T4 dobiveni su potpuno drugačiji rezultati nego za sojeve *E. coli* K-12. U divljem tipu stanica (soj BL21-AI) bakteriofag T4 formira velike, jasno vidljive čistine s podjednakom efikasnošću na obje temperature (Tablica 24). Nakon infekcije dvostukih mutanata $\Delta lon \Delta hns$ (IIB946 i MR033), derivata *E. coli* B, bakteriofag T4 je formirao jasno vidljive čistine na obje temperature (Slika 10) s podjednakom efikasnošću (Tablica 24). Dvostruki mutanti $\Delta lon \Delta hns$ derivati *E. coli* B ne pokazuju nikakve promjene u fenotipu, i bakterijske kolonije su okrugle i iste veličine kao i kolonije divljeg tipa stanica. Na temelju svega navedenog, možemo zaključiti da razlog boljeg formiranja čistina faga T4 u sojevima *E. coli* B nije zbog mutacije u genu *lon*.

Tablica 24. Efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4 nakon infekcije bakterijskih sojeva koji su derivati *E. coli* B soja. Nakon infekcije bakteriofagom T4 bakterijski sojevi su se inkubirali na 30 °C i 37 °C. PFU/mL bakteriofaga T4 za svaki bakterijski soj i svaku temperaturu se izračunao iz broja nastalih čistina.

Bakterijski soj	PFU/mL	Standardna devijacija	PFU/mL	Standardna devijacija
BL21-AI ($\Delta lon \Delta dcm$)	$1,78 \cdot 10^{10}$	$1,72 \cdot 10^{10}$	$2,21 \cdot 10^{10}$	$2,40 \cdot 10^{10}$
IIB946 ($\Delta lon \Delta dcm \Delta hns$)	$2,11 \cdot 10^{10}$	$1,75 \cdot 10^{10}$	$1,71 \cdot 10^{10}$	$1,48 \cdot 10^{10}$
MR033 ($\Delta lon \Delta hns$)	$5,88 \cdot 10^9$	$1,56 \cdot 10^9$	$6,05 \cdot 10^9$	$1,40 \cdot 10^9$
	30 °C		37 °C	



Slika 10. Čistine bakteriofaga T4 formirane nakon infekcije bakterijskog soja MR033 (derivat *E. coli* B, $\Delta lon \Delta hns$) na 30 °C (A) i na 37 °C (B). Na obje temperature su nastale podjednako velike čistine.

4. RASPRAVA

Da bi bakteriofag uspješno inficirao bakteriju najprije se mora vezati na receptore na površini stanice. Bakteriofag T4 na površini stanice *E. coli* prepoznaje lipopolisaharide i protein OmpC (od engl. *outer membrane protein C*) na koje se veže pomoću fibrila i bazalne ploče (Yu i Mizushima, 1982). Za ulazak virusnog genoma u stanicu, stanična stijenka se mora degradirati enzimom lizozim, te mora doći do kontrakcije repa bakteriofaga T4. Nakon ubacivanja genoma u stanicu domaćina, bakteriofag T4 se mora zaštititi od bakterijskog restrikcijско-modifikacijskog sustava i mora vezati bakterijsku RNA polimerazu čime dolazi do ekspresije virusnih gena. Produkti tkz. ranih gena blokiraju transkripciju i translaciju bakterijskog genoma. Nakon replikacije virusnog genoma dolazi do sastavljanja viriona i do lize bakterijske stanice, čime se oslobađaju novonastali virioni (Miller i sur., 2003). Infekcijom "bakterijske livade" širenje bakteriofaga po livadi je ograničeno, vjerojatno zbog smrti stanice prije infekcije, što dovodi do formiranja plakova/čistina. Čistina je teoretski mjesto na bakterijskoj livadi gdje jedan virion bakteriofaga zarazi jednu bakterijsku stanicu. Prethodnim istraživanjima uočeno je da bakteriofag T4 ne može formirati čistine nakon infekcije bakterijskih sojeva bez proteina H-NS pri temperaturi inkubacije 30 °C. U ovom radu se istražilo utječe li na ovaj efekt protein StpA, proteaza Lon, te ovisi li o ekspresiji epistatskih gena. Istražen je utjecaj na efikasnosti adsorpcije bakteriofaga i na formiranje čistina, tj. na efikasnost infekcije.

U divljem tipu stanica temperatura inkubacije nije imala učinak na efikasnost adsorpcije bakteriofaga T4, dok je u mutantu Δhns došlo do značajnog smanjenja adsorpcije na 30 °C. Temeljem ovih rezultata sam očekivala da će bakteriofag T4 imati smanjenu efikasnost formiranja čistina nakon infekcije Δhns mutantu na 30 °C, ali smanjenje adsorpcije ipak ne može objasniti potpuni izostanak čistina. Pokazano je da snižavanjem temperature manje bakteriofaga ulazi u stanicu (Jończyk i sur., 2011), ali u ovom radu nije istraženo da li će se smanjiti efikasnost ulaska bakteriofaga T4 u stanicu što bi bilo zanimljivo napraviti u budućim istraživanjima.

Kao što je prethodno navedeno, bakteriofag T4 nije formirao čistine u Δhns mutantu prilikom inkubacije na 30 °C, dok su na 37 °C nastale čistine. Protein H-NS se veže na bakterijski genom, ima ulogu u očuvanju strukture nukleoida i regulira ekspresiju gena (Durrenberger i sur., 1991). Prethodna istraživanja su pokazala da se protein H-NS može vezati na genom bakteriofaga T4 čime se smanjuje efikasnost infekcije bakteriofaga (Patterson-West i sur., 2018). U skladu s tim rezultatima očekivali bi da će u Δhns mutantu doći do povećanja

efikasnosti infekcije bakteriofaga T4 neovisno o temperaturi inkubacije, ali ovo istraživanje je pokazalo suprotno. Za uočeni efekt je vjerojatno odgovoran jedan od gena čija je ekspresija regulirana proteinom H-NS.

StpA je jedan takav gen i protein *StpA* je paralog proteina H-NS te ima slične funkcije u stanici. Budući da se veže na bakterijski nukleoid i zajedno s proteinom H-NS regulira ekspresiju epistatskih gena (Srinivasan i sur., 2013) zanimalo me je utječe li na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4. Nedostatak proteina *StpA* nije pokazao učinak na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4. Ovakvi rezultati su u skladu s očekivanjima pošto je dokazano da protein H-NS može u potpunosti nadomjestiti nedostatak proteina *StpA* (Zhang i sur., 1996). U dvostukom mutantu $\Delta hns \Delta stpA$ bakteriofag T4 nije formirao čistine na 30 °C niti na 37 °C. Ovakvi rezultati ukazuju da protein *StpA* ipak ima važan utjecaj na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4. Ekspresija gena *stpA* je veća na 37 °C nego na 26 °C, pa je moguće da na 30 °C ekspresija proteina *StpA* u Δhns mutantu vjerojatno nije dovoljno velika da nadomjesti nedostatak proteina H-NS. Prekomjernom ekspresijom s plazmida, protein *StpA* je uspio kompenzirati nedostatak proteina H-NS te je došlo do formiranja čistina bakteriofaga T4 u mutantu Δhns na 30 °C. Time je dodatno potvrđena važnost proteina *StpA* na formiranje čistina na nepoznat način.

Metodom qRT-PCR sam pokazala da je ekspresija gena *stpA* veća u Δhns mutantu nego u divljem tipu stanica. Budući da protein H-NS inhibira ekspresiju gena *stpA* njegova ekspresija je povećana u Δhns mutantu (Sonden i Uhlin, 1996). U Δhns mutantu ekspresija gena *stpA* je bila 1,8 puta veća na 37 °C nego na 30 °C. Slične rezultate su dobili Sonden i Uhlin (1996), gdje je ekspresija gena *stpA* u Δhns mutantu bila 2 puta veća na 37 °C u odnosu na 26 °C. Treba napomenuti da su Sonden i Uhlin (1996) za određivanje ekspresije gena koristili metodu *Northern blot*, dok je u ovom radu korištena metoda qRT-PCR. U divljem tipu stanica ekspresija gena *stpA* je bila oko 2,4 puta manja na 37 °C u odnosu na 30 °C. Dobiveni rezultat se ne slaže s podacima u literaturi, gdje je otkriveno da je ekspresija gena *stpA* u divljem tipu stanica 2 puta veća na 37 °C nego na 26 °C (Sonden i Uhlin, 1996). U oba eksperimenta su bakterije uzgajane do logaritamske faze rasta tako da uvjeti uzgoja nisu mogli utjecati na rezultate. Različiti rezultati su vjerojatno posljedica korištenja različitih metoda za određivanje ekspresije gena. S obzirom da je ekspresija proteina *StpA* regulirana i na posttranslacijskoj razini, degradacijom putem proteaze Lon (Johansson i Uhlin, 1999), na temelju ekspresije gena se ne može predvidjeti količina proteina *StpA* u stanici. U budućim istraživanjima bi se mogla odrediti količinu proteina *StpA* metodom *Western blot* u stanicama divljeg tipa i u Δhns

mutantu na 30 °C i 37 °C, te dobivene rezultate povezati s efikasnošću formiranja čistina bakteriofaga T4.

S obzirom da je protein StpA uspio nadomjestiti nedostatak proteina H-NS jedna mogućnost posljedice mutacije *hns* je da neki od epistatskih gena inhibiraju nastanak čistina bakteriofaga T4. Epistatski geni su oni čija je ekspresija regulirana proteinima H-NS i StpA, a nedostatkom proteina H-NS protein StpA svejedno inhibira njihovu ekspresiju. Ekspresija epistatskih gena je zanemariva u divljem tipu stanica, a povećava se samo kada nema proteina H-NS i StpA (Srinivasan i sur., 2013). Dakle, moguće je da su epistatski geni eksprimirani u mutantu Δhns na 30 °C utjecali na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4 što je testirano. Od ukupno 350 gena odabrano je njih 7: *cbl*, *cspA*, *dnaK*, *groL*, *htpG*, *rnc* i *sodA*, zato jer je pokazano da se njihova ekspresija mijenja prilikom infekcije bakteriofagima (Poranen i sur., 2006). U ovom istraživanju smo se fokusirali na šaperone, koji pomažu u pravilnom sastavljanju drugih proteina (proteini CspA, DnaK, GroEL i HtpG), na transkripcijske faktore (proteini Cbl i SodA), te na protein RNaza III. Niti jedan od istraživanih gena nije imao utjecaj na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4. Pošto smo uočili da se smanjuje adsorpcija bakteriofaga T4 u mutantu Δhns bilo bi zanimljivo istražiti epistatske gene koji mogu utjecati na adsorpciju ili na njihove transkripcijske faktore.

Na kraju sam odredila kako nedostatak proteaze Lon utječe na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4. Proteaza Lon degradira protein StpA (Johansson i Uhlin, 1999), pa bi se njenom delecijom trebala povećati količina proteina StpA u stanici, i samim time bi se povećala efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4. U pokusima su korišteni derivati sojeva *E. coli* K-12 i *E. coli* B. U sojevima *E. coli* B gen *lon* je prirodno deletiran, dok se u sojevima *E. coli* K-12 gen *lon* morao deletirati uvođenjem delecijske mutacije transdukcijom. Nakon infekcije dvostrukog mutanta $\Delta lon \Delta hns$ bakteriofag T4 je formirao čistine u soju *E. coli* B na 30 °C, dok u soju *E. coli* K-12 nije došlo do formiranja čistina. S obzirom da se isti efekt nije ponovio u soju *E. coli* K-12, za uočeni efekt nije odgovorna proteaza Lon već je vjerojatno posljedica razlika u genotipu između sojeva *E. coli* B i *E. coli* K-12. Pretpostavljam da soj *E. coli* B ima deletiran epistatski gen koji onemogućava formiranje čistina bakteriofaga T4 na 30 °C u mutantu Δhns , dok je isti gen je prisutan u sojevima *E. coli* K-12 te inhibira formiranje čistina. Ekspresijom nepoznatog ciljanog gena s plazmida u sojevima *E. coli* B očekujem da bi nestale čistine na 30 °C u mutantu Δhns , dok bi njegovom delecijom u sojevima *E. coli* K-12 došlo do formiranja čistina bakteriofaga T4 na 30 °C. Gen *dcm* (DNA citozin metiltransferaza) je jedan od mogućih gena kandidata koji je deletiran u sojevima *E. coli* B, ali je prisutan u sojevima *E.*

coli K-12 (Jeong i sur., 2009). Gen *dcm* nije deletiran u soju MR033 (derivat *E. coli* B), no u njemu je došlo do formiranja čistina na 30 °C što znači da pak ne utječe na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4.

Tijekom adsorpcije na sojeve *E. coli* B bakteriofag T4 se veže samo na lipopolisaharide na bakterijskoj stanici, jer *E. coli* B ima deletiran gen *ompC* (Wilson i sur., 1970) koji kodira receptor za vezanje bakteriofaga T4 na površinu stanice. Moguće je da postoji razlika u efikasnost adsorpcije i ulaska bakteriofaga T4 u sojeve *E. coli* B i *E. coli* K-12 što bi moglo objasniti dobivene različite rezultate.

U ovom istraživanju je otkriveno da protein StpA utječe na na efikasnost formiranja čistina bakteriofaga T4, ali na nepoznat način. Vezanjem na genom bakteriofaga T4 StpA može direktno štititi DNA faga od nukleaza što nije istraženo (Keatch i sur. 2005) ili regulacijom ekspresije epistatskih gena zaštitu rade neki drugi geni. Potrebna su dodatna istraživanja da se razjasni uloga proteina StpA na efikasnost formiranja čistina faga T4.

5. ZAKLJUČAK

Iz rezultata dobivenih u ovom radu može se zaključiti:

- Bakteriofag T4 se slabije adsorbira na stanice Δhns pri 30 °C, međutim to ne može objasniti potpuni izostanak čistina bakteriofaga T4 u ovom soju na 30 °C.
- Protein StpA utječe na formiranje čistina faga T4 samo u stanicama Δhns . Uvođenjem mutacije $\Delta stpA$ u stanice Δhns nastaje sinergistički učinak i fag T4 ne može formirati čistine niti na 37 °C. Povećanjem ekspresije gena *stpA* s plazmida uspostavilo se formiranje čistina faga T4 na 30 °C.
- U stanicama Δhns uzgajanim na 30 °C smanjena je količina transkripata gena *stpA* za 1.8 puta u odnosu na 37 °C.
- Uspješno su klonirani epistatski geni *groL*, *cbl*, *dnaK* i *sodA* što je potvrđeno restrikcijском analizom i sekvenciranjem.
- Epistatski geni nisu značajno utjecali na formiranje čistina faga T4 niti prekomjernom ekspresijom s plazmida u stanicama Δhns niti u dvostrukim mutantima.
- Proteaza Lon nije utjecala na formiranje čistina faga T4 što je pokazano u dvostrukom mutantu. Nije istražen utjecaj prokomjerne ekspresije s plazmida.
- Fagi T4 su formirali čistine sa podjednakom efikasnošću na 30 °C i 37 °C u stanicama *E. coli* B koje imaju mutaciju *lon*, što ukazuje na mogućnost da formiranje čistina faga T4 ovisi o nepoznatom razlikovnom genu između tipova *E. coli* K-12 i *E. coli* B.

6. LITERATURA

- Ali S., Beckett E., Bae S., Navarre, W. (2011): The 5.5 protein of phage T7 inhibits H-NS through interactions with the central oligomerization domain. *Journal of Bacteriology* **193**(18): 4881–4892
- Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K., Tomita M., Wanner B., Mori H. (2006): Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology* **2**: 1-11
- Bae W., Xia B., Inouye M., Severinov K. (2000): *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(14): 7784-7789
- Bloch V., Yang Y., Margeat E., Chavanieu A., Augé M., Robert B., Arold S., Rimsky S., Kochoyan M. (2003): The H-NS dimerization domain defines a new fold contributing to DNA recognition. *Nature Structural Biology* **10**(3): 212–218
- Britton L. i Fridovich I. (1977): Intracellular localization of the superoxide dismutases of *Escherichia coli*: a reevaluation. *Journal of Bacteriology* **131**(3): 815-820
- Cusick M. i Belfort M. (1998): Domain structure and RNA annealing activity of the *Escherichia coli* regulatory protein StpA. *Molecular Microbiology* **28**(4): 847–857
- Dame R., Wyman C., Goosen N. (2002): Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *The Journal of Biological Chemistry* **277**(3): 2146–2150
- Dame R., Wyman, C., Goosen N. (2000): H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Research*. **28**(18): 3504–3510
- Datsenko K. i Wanner B. (2000): One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**(12): 6640-6645
- Deuerling E., Schulze-Specking A., Tomoyasu T., Mogk A., Bukau B. (1999): Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* **400**(6745): 693-696

- Durrenberger M., La Teana A., Citro G., Venanzi F., Gualerzi C., Pon C. (1991): *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS is localized in the nucleoid. *Research in Microbiology* **142**(4): 373–380
- Falconi M., Higgins N., Spurio R., Pon C., Gualerzi C. (1993): Expression of the gene encoding the major bacterial nucleoid protein H-NS is subject to transcriptional auto-repression. *Molecular Microbiology* **10**(2): 273-282
- Gordon B., Li Y., Cote A., Weirauch M., Ding P., Hughes, T. et al. (2011): Structural basis for recognition of AT-rich DNA by unrelated xenogeneic silencing proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **108**(26): 10690–10695
- Gordon G., Cameron J., Pflieger B. (2017): RNA Sequencing identifies new RNase III cleavage sites in *Escherichia coli* and reveals increased regulation of mRNA. *mBio* **8**(2): e00128-17
- Grainger D. (2016): Structure and function of bacterial H-NS protein. *Biochemical Society Transactions* **44**(6): 1561–1569
- Gromiha M. i Selvaraj S. (2004): Inter-residue interactions in protein folding and stability. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **86**(2): 235–277
- Guzman L., Belin D., Carson M., Beckwith J. (1995): Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology* **177**(14): 4121-4130
- Haldimann A i Wanner B. (2001): Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *Journal of Bacteriology* **183**(21): 6384-6393
- Heyde M. i Portalier R. (1990): Acid shock proteins of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **57**(1-2): 19-26
- Higgins C., Hinton J., Hulton C., Owen-Hughes T., Pavitt G., Seirafi A. (1990): Protein HI: a role for chromatin structure in the regulation of bacterial gene expression and virulence. *Molecular Microbiology* **4**(12): 2007-2012
- Hopkin K., Papazian M., Steinman H. (1992): Functional differences between manganese and iron superoxide dismutases in *Escherichia coli* K-12. *Journal of biological chemistry* **267**(34): 24253-24258

- Jeong H., Barbe V., Lee C., Vallenet D., Yu D., Choi S., Couloux A., Lee S., Yoon S., Cattolico L., Hur C., Park H., Ségurens B., Kim S., Oh T., Lenski R., Studier F., Daegelen P., Kim J. (2009): Genome Sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of molecular biology* **394**(4): 644-652
- Jiang W., Hou Y., Inouye M. (1997): CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *The Journal of biological chemistry* **272**(1): 196-202
- Johansson J. i Uhlin B. (1999): Differential protease-mediated turnover of H-NS and StpA revealed by a mutation altering protein stability and stationary-phase survival of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(19): 10776-10781
- Jończyk E., Kłak M., Międzybrodzki R., Górski A. (2011): The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiologica* **56**(3): 191-200
- Jones P., VanBogelen R., Neidhardt F. (1987): Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **169**(5): 2092-2095
- Kabir M., Sagara T., Oshima T., Kawagoe Y., Mori H., Tsunedomi R., Yamada M. (2004): Effects of mutations in the *rpoS* gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *Microbiology* **150**(8): 2543-2553
- Keatch S., Leonard P., Ladbury J., Dryden D. (2005): StpA protein from *Escherichia coli* condenses supercoiled DNA in preference to linear DNA and protects it from digestion by DNase I and EcoKI. *Nucleic Acids Research* **33**(20): 6540-6546
- Ko M. i Park C. (2000): H-NS-Dependent regulation of flagellar synthesis is mediated by a LysR family protein. *Journal of Bacteriology* **182**(16): 4670–4672
- Kutter E., Gachechiladze K., Poglazov A., Marusich E., Shneider M., Aronsson P., Napuli A., Porter D., Mesyanzhinov V. (1995): Evolution of T4-related phages. *Virus Genes* **11**(2-3): 285–297
- La Teana A., Brandi A., Falcon M., Spurio R., Pon C., Gualerzi C. (1991): Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **88**(23): 10907-10911
- Liberek K., Galitski T., Zylicz M., Georgopoulos C. (1992): The DnaK chaperone modulates the heat shock response of *Escherichia coli* by binding to the σ^{32} transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**(8): 3516–3520

- Lim C., Whang Y., Kenney L., Yan J. (2012): Gene silencing H-NS paralogue StpA forms a rigid protein filament along DNA that blocks DNA accessibility. *Nucleic Acids Research* **40**(8): 3316-3328
- Liu Y., Chen H., Kenney L., Yan J. (2010): A divalent switch drives H-NS/DNA-binding conformations between stiffening and bridging modes. *Genes & Development* **24**(4): 339-344
- Luke K., Radek A., Liu X., Campbell J., Uzan M., Haselkorn R., Kogan Y. (2002): Microarray analysis of gene expression during bacteriophage T4 infection. *Virology* **299**(2): 182–191
- Ma J., Bai L., Wang M. (2013): Transcription under torsion. *Science* **340**(6140): 1580–1583
- Mayer O., Rajkowitsch L., Lorenz C., Konrat R., Schroeder R. (2007): RNA chaperone activity and RNA-binding properties of the *E. coli* protein StpA. *Nucleic Acids Research* **35**(4): 1257-1269
- Miller E., Kutter E., Mosig G., Arisaka F., Kunisawa T., Ru W. (2003): Bacteriophage T4 genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**(1): 86-156
- Mullan A., Quinn J., McGrath J. (2002): Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low pH conditions. *Microbial Ecology* **44**(1): 69-77
- Nikolaev N., Schlessinger D., Wellauer P. (1974): 30 S pre-ribosomal RNA of *Escherichia coli* and products of cleavage by ribonuclease III: length and molecular weight. *Journal of Molecular Biology* **86**(4): 741-747
- Paddock G., Fukada K., Abelson J., Robertson H. (1976): Cleavage of T4 species I ribonucleic acid by *Escherichia coli* ribonuclease III. *Nucleic Acids Research* **3**(5): 1351-1371
- Panaretou B., Prodromou C., Roe S., O'Brien R., Ladbury J., Piper P., Pearl L. (1998): ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone *in vivo*. *EMBO Journal* **17**(16): 4829-4836
- Patterson-West J., Arroyo-Mendoza M., Hsieh M., Harrison D., Walker M., Knipling L., Hinton D. (2018): The bacteriophage T4 MotB protein, a DNA-binding protein, improves phage fitness. *Viruses* **10**(7): 343

- Poranen M., Ravantti J., Grahn A., Gupta R., Auvinen P., Bamford D. (2006): Global changes in cellular gene expression during bacteriophage PRD1 infection. *Journal of Virology* **80**(16): 8080-8088
- Pougach K., Semenova E., Bogdanova E., Datsenko K., Djordjevic M. i sur. (2010): Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **77**(6): 259–72
- Snyder L., Gold L., Kutter E. (1976): A gene of bacteriophage T4 whose product prevents true late transcription on cytosine-containing T4 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **73**(9): 3098–3102
- Sonden B. i Uhlin B. (1996): Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. *The EMBO Journal* **15**(18): 4970-4980
- Srinivasan R., Chandraprakash D., Krishnamurthi R., Singh P., Scolari V., Krishna S., Seshasayee A. (2013): Genomic analysis reveals epistatic silencing of “expensive” genes in *Escherichia coli* K-12. *Molecular BioSystems* **9**: 2021-2033
- Studier F. i Moffatt B. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**(1): 113-130
- Takiff H., Chen S, Court D. (1989): Genetic analysis of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **171**(5): 2581-2590
- Tan B., Bogdanov M., Zhao J., Dowhan W., Raetz C., Guan Z. (2012) Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **109**(41): 16504-16509
- Uyar E., Kurokawa K., Yoshimura M., Ishikawa S., Ogasawara N., Oshima T. (2009): Differential binding profiles of StpA in wild-type and *hns* mutant cells: a comparative analysis of cooperative partners by chromatin immunoprecipitation-microarray analysis. *Journal of Bacteriology* **191**(7): 2388-2391
- van der Ploeg J., Iwanicka-Nowicka R., Kertesz M., Leisinger T., Hryniewicz M. (1997): Involvement of CysB and Cbl regulatory proteins in expression of the tauABCD operon and

other sulfate starvation-inducible genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **179**(24): 7671-7678

van der Vies S., Gatenby A., Georgopoulos C. (1994): Bacteriophage T4 encodes a co-chaperonin that can substitute for *Escherichia coli* GroES in protein folding. *Nature* **368**(6472): 654–656

Wild J., Altman E., Yura T., Gross C. (1992): DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli*. *Genes & development* **6**(7): 1165-1172

Wilson J, Luftig R., Wood W. (1970): Interaction of bacteriophage T4 tail fiber components with a lipopolysaccharide fraction from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **51**(2): 423–434

Winardhi R., Yan J., Kenney L. (2015): H-NS regulates gene expression and compacts the nucleoid: insights from single-molecule experiments. *Biophysical Journal* **109**(7): 1321–1329

Wood W. (1966): Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *Journal of Molecular Biology* **16**(1): 118-133

Yifrach O. i Horovitz A. (1995): Nested co-operativity in the ATPase activity of the oligomeric chaperonin GroEL. *Biochemistry* **34**(16): 5303–5308

Yosef I., Goren M., Kiro R., Edgar R., Qimron U. (2011): High-temperature protein G is essential for activity of the *Escherichia coli* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **108**(50): 20136-20141

Yu F. i Mizushima S. (1982): Roles of lipopolysaccharide and outer membrane protein OmpC of *Escherichia coli* K-12 in the receptor function for bacteriophage T4. *Journal of Bacteriology* **151**(2): 718–722

Zang A. i Belfort M. (1992): Nucleotide sequence of a newly-identified *Escherichia coli* gene, *stpA*, encoding an H-NS-like protein. *Nucleic Acids Research* **20**(24): 6735

Zhang A., Rimsky S., Reaban M., Buc H., Belfort M. (1996): *Escherichia coli* protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics. *The EMBO Journal* **15**(6): 1340-1349

7. ŽIVOTOPIS

OSOBNNE INFORMACIJE

Ime i prezime: Sanja Srakočić
e-mail: ssrakocic@stud.biol.pmf.hr

OBRAZOVANJE

Rujan 2016. - sada Diplomski studij molekularne biologije
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički
fakultet, Biološki odsjek

Rujan 2013. - srpanj 2016. Preddiplomski studij molekularne biologije
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički
fakultet, Biološki odsjek

Rujan 2009. - lipanj 2013. Gimnazija Karlovac, opći smjer

PROJEKTI

Srpanj 2018. - siječanj 2019. Diplomski rad na Zavodu za molekularnu biologiju,
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički
fakultet
(Utjecaj transkripcijskih regulatora bakterije *Escherichia coli* na učestalost formiranja čistina nakon infekcije bakteriofagom T4)