

Osjetljivost izoleucil-tRNA-sintetaza iz različitih organizama prema mupirocinu na proteinskoj i staničnoj razini

Pavlak, Lucija

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:217:141563>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Lucija Pavlak

**Osjetljivost izoleucil-tRNA-sintetaza iz različitih
organizama prema mupirocinu na proteinskoj i
staničnoj razini**

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2019. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Morane Dulić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Investigation of substrate and editing specificity in tRNA synthetases and the mechanism of antibiotic action, voditelj projekta: prof. dr. sc. Ita Gruić-Sovulj, Hrvatska zaklada za znanost i Švicarska nacionalna zaklada za znanost.

ZAHVALE

Puno hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Morani Dulić na trudu i vremenu uloženom u mene i moj rad i napredak. Hvala na ugodnom radu i druženju!

Hvala prof. dr. sc. Iti Gruić Sovulj na prilici da radim na njenom projektu te hvala svim zaposlenicima Zavoda za biokemiju na pomoći, podršci i savjetima tijekom eksperimentalnog dijela ovog rada.

Hvala svim učiteljima i profesorima koji su me pratili još od osnovnoškolskih dana pa sve do danas. Ovaj rad je rezultat i vašeg truda i rada.

Hvala prijateljima i kolegama na podršci, savjetima, kavama i druženju. Život i studiranje su bili ljepši i zabavniji uz vas. Posebno hvala Marti na pomoći, kolegijalnosti i posebno na dobrom društvu i kavama.

Posebno hvala mojoj obitelji, mami, tati, baki, seki i Darku, na pomoći i podršci. Vi ste me gurali naprijed i niste mi dali da odustanem ni kad je bilo najteže. Vama pripada najveća zasluga za sva moja postignuća. HVALA VAM!

Hvala Matiji i Lani na velikoj sreći i radosti koju mogu pružiti samo iskrena dječja ljubav i dobrota. Voli vas teta.

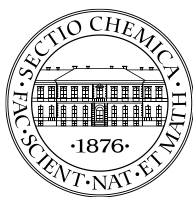
I na kraju, veliko hvala Ivanu, mojoj podršci i osloncu za cijeli život. Hvala ti na slušanju svih problema, tuga i muka koje su me morale i hvala na radosti i dobroti koju mi pružaš!

Sadržaj

ZAHVALE	V
SAŽETAK	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD	1
1.1. Uvod	1
1.1.1. Ciljevi rada	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Biosinteza proteina	4
2.1.1. Ribosom	4
2.1.2. Translacija.....	5
2.1.3. Proteinski faktori	6
2.2. Transfer RNA	8
2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze	10
2.3.1. Vežanje pripadnih aminokiselina i tRNA.....	11
2.3.2. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza	12
2.4. Mehanizmi popravka pogrešaka u aminoacil-tRNA-sintetaza	13
2.4.1. Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline na tRNA.....	14
2.4.2. Popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline na tRNA.....	14
2.5. Isoleucil-tRNA-sintetaza	15
2.5.1. Strukturna svojstva isoleucil-tRNA-sintetaza	16
2.5.2. Mehanizam popravka pogrešaka kod isoleucil-tRNA-sintetaza	18
2.5.3. Tipovi isoleucil-tRNA-sintetaza	19
2.6. Mupirocin	19
2.6.1. Zaštita <i>Pseudomonas fluorescens</i> od vlastitog antibiotika.....	21
2.6.2. Kako djeluje mupirocin?.....	21
2.6.3. Djelovanje mupirocina na razne mikroorganizme	22
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. Materijali	23
3.1.1. Standardne kemikalije.....	23
3.1.2. Enzimi i nukleotidi	23
3.1.3. Početnice.....	24

3.1.4. Markeri veličine i boje.....	24
3.1.5. Komercijalni kompleti.....	24
3.1.6. Ostali materijal.....	24
3.1.7. Instrumenti.....	24
3.1.8. Bakterijski sojevi i plazmidi.....	25
3.1.9. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterija.....	26
3.2. Metode.....	26
3.2.1. Metode rada s nukleinskim kiselinama.....	26
3.2.1.1. Izolacija genomske DNA.....	27
3.2.1.2. Gel-elektroforeza na agaroznom gelu.....	27
3.2.1.3. Lančana reakcija polimerazom.....	28
3.2.1.4. Izolacija PCR produkta iz gela ili otopine.....	30
3.2.1.5. Izolacija plazmida.....	31
3.2.1.6. Restriksijska razgradnja PCR produkata i plazmida.....	33
3.2.1.7. Ligacija.....	34
3.2.1.8. Kemijska transformacija.....	35
3.2.1.9. Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom.....	35
3.2.1.10. PCR na kolonijama.....	36
3.2.1.11. Restriksijska razgradnja rekombinantnog plazmida.....	36
3.2.1.12. Sekvenciranje.....	37
3.2.2. Metode rada s proteinima.....	37
3.2.2.1. Poliakrilamidna gel-elektroforeza u denaturirajućim uvjetima.....	37
3.2.2.2. Prekomjerna ekspresija izoleucil-tRNA-sintetaze 1 iz <i>Bacillus thuringiensis</i>	38
3.2.2.3. Liza bakterijskih stanica.....	39
3.2.2.4. Afinitetna kromatografija.....	40
3.2.3. Metode rada s bakterijama.....	41
3.2.3.1. Mjerenje krivulja rasta bakterija.....	41
3.2.3.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije mupirocina.....	42
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	44
4.1. Kloniranje gena.....	45
4.1.1. Dizajn početnica.....	45
4.1.2. Optimiranje PCR reakcije.....	46
4.1.3. Preparativni PCR.....	48
4.1.4. Restriksijska razgradnja i ligacija.....	50
4.1.5. Identifikacija transformiranih bakterijskih kolonija.....	52
4.1.6. Restriksijska razgradnja rekombinantnih plazmida.....	56
4.1.7. Sekvenciranje gena.....	59
4.2. Afinitetna kromatografija izoleucil-tRNA-sintetaze tipa 1 iz <i>Bacillus thuringiensis</i>.....	63
4.3. Krivulje rasta mikroorganizama.....	65
4.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije mupirocina.....	71

§ 5. ZAKLJUČAK	74
§ 6. POPIS KRATICA.....	75
6.1. Popis kratica korištenih u radu	75
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	76
§ 8. ŽIVOTOPIS	LXXIX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Osjetljivost izoleucil-tRNA-sintetaza iz različitih organizama prema mupirocinu na proteinskoj i staničnoj razini

Lucija Pavlak

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) kovalentno veže izoleucin na pripadnu tRNA^{Ile}, pri čemu ponekad griješi. Radi toga posjeduje mehanizme popravka vlastite pogreške. Uočena su 2 tipa IleRS koji se strukturno razlikuju u C-terminalnoj domeni. IleRS1 se nalazi kod prokariota, dok se IleRS2 pojavljuje kod eukariota, ali i kod nekih prokariota. IleRS1 je, u pravilu, osjetljiviji na mupirocin od IleRS2 i uz popravak pogreške nakon prijenosa koristi i tRNA-ovisni popravak misaktivirane aminokiseline, koji nije detektiran na dosad istraživanim IleRS2. U ovom radu želi se preispitati korelacija između osjetljivosti prema mupirocinu i tipa IleRS-a iz više različitih organizama. Uklonirana su 3 gena za IleRS, te je eksprimiran jedan protein, koji će se u daljnjem radu testirati na inhibiciju mupirocinom. Inhibicija rasta bakterijskih stanica (izražena kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC)) mupirocinom ne pokazuje strogo korelaciju s tipom IleRS-a, što može biti posljedica različitog unosa mupirocina u stanice različitih organizama.

(78 stranica, 43 slika, 9 tablica, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: izoleucil-tRNA-sintetaza, krivulje rasta, minimalna inhibitorna koncentracija, mupirocin

Mentor: doc. dr. sc. Morana Dulić

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić
 2. doc. dr. sc. Jana Pisk
 3. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
- Zamjena: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Datum diplomskog ispita: 20. rujna 2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Mupirocin sensitivity of isoleucyl-tRNA synthetases from various organisms on protein and cellular level

Lucija Pavlak

Isoleucyl-tRNA synthetase (IleRS) covalently binds isoleucine to their cognate tRNA^{Ile}, sometimes making mistakes. Therefore, it acquired editing activity to maintain overall accuracy of translation. Two types of IleRS have been observed that differ structurally in the C-terminal domain. IleRS1 is found in prokaryotes, while IleRS2 occurs in eukaryotes as well as in some prokaryotes. Generally, IleRS1 is more sensitive to mupirocin than IleRS2, and in addition to post-transfer editing, uses a tRNA-dependent pretransfer editing, which was not detected on the IleRS2 studied so far. Here we aim to examine the correlation between mupirocin sensitivity and type IleRS from a number of different organisms. In this work, 3 genes coding for IleRS were cloned and one protein was expressed and purified, which will be assayed *in vitro* for mupirocin inhibition. The inhibition of bacterial cell growth (expressed as minimum inhibitory concentration (MIC)) by mupirocin does not show a strict correlation with the type of IleRS, which may be due to different uptake of mupirocin into cells by different organisms.

(78 pages, 43 figures, 9 tables, 46 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: growth curves, isoleucyl-tRNA-synthetase, minimal inhibitory concentration, mupirocin

Mentor: Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
 2. Dr. Jana Pisk, Assistant Professor
 3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Full Professor
- Substitute: Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor

Date of exam: September 20, 2019.

§ 1. UVOD

1.1. Uvod

Kako su proteini molekule koje obavljaju svestrane funkcije u svim živim organizmima, njihova biosinteza, translacija, mora biti vrlo točna. Biosinteza se odvija na velikom kompleksu proteina i RNA, ribosomu.^{1,2} Zadaća osiguravanja vjernosti biosinteze proteina povjerena je enzimima aminoacil-tRNA-sintetazama. Ovi enzimi moraju točno prepoznati i povezati pripadnu aminokiselinu i tRNA (engl. *transfer RNA*) kako bi aminoacilirana tRNA mogla uključiti odgovarajuću aminokiselinu u rastući polipeptidni lanac. To se pak ostvaruje interakcijom antikodona na tRNA i kodona na mRNA (engl. *messenger RNA*) koji nosi informaciju o aminokiselini koja se treba ugraditi u obliku nukleotidnog tripleta.^{2,3}

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) prepoznaju pripadnu tRNA preko velike dodirne površine budući da su te dvije molekule usporedive veličine. Diskriminacija pripadne aminokiseline puno je zahtjevnija s obzirom na to da su aminokiseline puno manji supstrati u odnosu na veličinu enzima, te da između 20 proteinogenih aminokiselina ima nekih koje jako nalikuju jedna na drugu u obliku, naboju, veličini, hidrofobnosti i kemijskim svojstvima.⁴ Reakcija aminoaciliranja tRNA provodi se u 2 koraka: aktivacija aminokiseline pomoću molekule adenozin-5'-trifosfata (ATP) uz nastanak aminoacil-adenilata, te prijenos aktivirane aminokiseline na 3'-kraj pripadne tRNA. Oba koraka ove reakcije odvijaju se u istom aktivnom mjestu.^{1,3,5}

Aminoacil-tRNA-sintetaze podijeljene su u 2 razreda, razred I i razred II. Pripadnik razreda I je, između ostalih, i izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) koja katalizira povezivanje izoleucina s pripadnom tRNA^{Ile}. Aminokiselina izoleucin vrlo je slična aminokiselini valin od koje se razlikuje u jednoj metilenskoj skupini. Stoga, ne čudi činjenica da IleRS samo 200 puta slabije diskriminira valin od izoleucina. Reakcija aminoaciliranja se u IleRS, i ostalim članovima razreda I aaRS, odvija u sintetskoj domeni u Rossmannovom naboru.⁵⁻⁸

Kako bi biosinteza ostala na potrebnoj razini točnosti, aminoacil-tRNA-sintetaze su razvile mehanizme popravka pogreške. U aaRS razreda I, u Rossmannov nabor umetnuta je domena koja služi za popravak misacilirane tRNA. To je domena CP1 (engl. *connective peptide 1*). Mehanizam popravka nakon prijenosa, kojemu je supstrat misacilirana tRNA,

odvija se u toj zasebnoj hidrolitičkoj domeni. Taj mehanizam je dominantan kod svih aaRS. No, IleRS iz *Escherichia coli* i nekih prokariota u određenoj mjeri se oslanja na drugi tip mehanizma popravka, a to je tRNA-ovisni popravak pogrešno aktivirane aminokiseline koji se odvija u sintetskom mjestu enzima.^{5,7-9}

Mupirocin je antibiotik proizveden od strane *Pseudomonas fluorescens*. Taj antibiotik kao metu koristi izoleucil-tRNA-sintetazu, djelujući kao kompetitivni inhibitor vezanja izoleucina i ATP-a.^{1,10} Dosadašnja istraživanja pokazuju da se dva različita tipa izoleucil-tRNA-sintetaze, IleRS1 koja je nađena u većini prokariota i IleRS2 koja se pojavljuje u eukariota, te nekih prokariota, razlikuju u osjetljivosti na antibiotik mupirocin tako da je tip 1 osjetljiv, dok je tip 2 puno rezistentniji, iako granice nisu sasvim oštre.^{7,8,11}

1.1.1. Ciljevi rada

Kako je predloženo u ovom laboratoriju, tip 2 IleRS-a je vjerojatno, pod evolucijskom prisilom, zamijenio tRNA-ovisni mehanizam popravka pogrešno aktivirane aminokiseline za rezistenciju na antibiotik mupirocin.⁸ Kako mupirocin inhibira IleRS1 kompetitivno se vežući na mjesto vezanja izoleucina i ATP-a, detaljniji uvid u mehanizam djelovanja najbolje se može dobiti iz kristalnih struktura IleRS iz raznih mikroorganizama u kompleksu s mupirocinom. Kao pripremljeni korak, u ovom radu cilj je bio uklonirati gene za izoleucil-tRNA-sintetazu iz odabranih mikroorganizama u plazmidni vektor pET28b. Nadalje, od ukloniranih gena u radu je odabran jedan te je taj enzim prekomjerno eksprimiran i pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni²⁺-NTA koloni.

IleRS iz prokariota koja slični eukariotskom enzimu, IleRS2, slabo je osjetljiv na mupirocin.⁸ Dobra korelacija između minimalne inhibitorne koncentracije mupirocina i tipa IleRS prisutnog u mikroorganizmu bila je opažena kod nekih bakterijskih vrsta. Za bolji uvid u tu korelaciju, te utjecaj mupirocina na rast mikroorganizama, u ovom radu praćen je rast mikroorganizama u prisutnosti i u odsutnosti antibiotika. Nadalje, mjerene su vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije mupirocina za 9 mikroorganizama u bogatom mediju i minimalnom hranjivom mediju kojemu je dodan izoleucin.

Očekuje se da će rezultati ovog rada poslužiti kao temelj za daljnje istraživanje. U dijelu rada koji se bavi kloniranjem gena za IleRS te pročišćavanjem odabrane IleRS, očekuje se da će odabrani geni biti uklonirani u plazmidni vektor pET28b te pročišćeni afinitetnom

kromatografijom. Kako su za rad odabrani mikroorganizmi koji posjeduju jedan ili oba tipa izoleucil-tRNA-sintetaze, iz krivulja rasta želi se dobiti uvid kako koncentracija mupirocina utječe na rast pojedinih vrsta u ovisnosti o tipu IleRS-a koji vrsta posjeduje, te pokušati odrediti koncentraciju mupirocina koja inhibira 50% rasta. Očekuje se da će vrste koje posjeduju tip 1 IleRS biti osjetljivije na mupirocin, odnosno da će mupirocin pri nižim koncentracijama inhibirati vidljivi rast, dok se za vrste s oba tipa IleRS-a ili samo tipom 2 očekuje veća rezistencija prema mupirocinu.

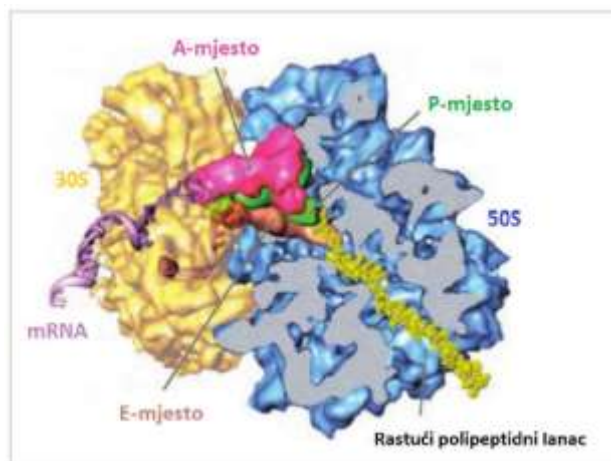
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biosinteza proteina

Proteini su najsvestranije makromolekule u živim sustavima i obavljaju bitne funkcije u svim biološkim procesima. To su linearni polimeri izgrađeni od monomernih jedinica-aminokiselina (engl. *amino acid*, aa), povezanih peptidnom vezom. Sve α -aminokiseline imaju središnji ugljikov atom na koji su vezane amino-skupina, karboksilna skupina, vodikov atom i specifična skupina karakteristična za pojedinu aminokiselinu. Proteine izgrađuje 20 L-aminokiselina. Proces biosinteze proteina naziva se translacija. U tom procesu se informacija zapisana u DNA, koja je prepisana u mRNA (engl. *messenger RNA*), prevodi u slijed aminokiselina. Biosinteza proteina odvija se na ribosomu u četiri koraka; inicijacija, elongacija, terminacija i recikliranje ribosoma.¹²

2.1.1. Ribosom

Ribosom je veliki kompleks koji se sastoji od 3 velike molekule RNA i više od 50 proteina (slika 2.1.). Dvije trećine mase ribosoma otpada na RNA. Prokariotski ribosomi sastoje se od dvije podjedinice, manje koja ima sedimentacijski koeficijent 30S i sastoji se od 16S rRNA i oko 20 proteina, te velike podjedinice, 50S, koja ima 23S rRNA i 5S rRNA, te oko 30-40 proteina. Sedimentacijski koeficijent ukupnog prokariotskog ribosoma iznosi 70S. Eukariotski ribosomi su veći i složeniji, ali nema većih razlika u funkciji u odnosu na prokariotske ribosome.¹



Slika 2.1. Struktura ribosoma iz *Escherichia coli*. Mala podjedinica, 30S prikazana je žutom bojom, a velika, 50S, podjedinica plavom bojom. Rastući polipeptidni lanac prikazan je zelenožutom bojom. Dio netranslatirane mRNA prikazan je ljubičastom bojom, a tRNA koje zauzimaju A, P i E-mjesto prikazane su rozom, zelenom i smeđom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz reference 13.

Velika ribosomska podjedinica katalizira stvaranje peptidne veze i veže elongacijske i terminacijske faktore. Kristalna struktura 50S podjedinice riješena je iz bakterije *Haloarcula marismortui* pri rezoluciji od 2,4 Å. Pokazano je da je površina 50S podjedinice prekrivena proteinima, osim aktivnog mjesta gdje se formira peptidna veza te mjesta gdje se veže mala ribosomska podjedinica.¹⁴ Aktivni centar ribosoma, peptidil-transferazni centar, građen je od RNA, a ne od proteina. Stoga, ribosom je ribozim jer rRNA katalizira sintezu proteina.¹ 30S podjedinica ima ključnu ulogu u dekodiranju mRNA praćenjem sparivanja baza između kodona na mRNA i antikodona na tRNA. Kristalna struktura male podjedinice određena je iz *Thermus thermophilus* pri rezoluciji od 3 Å. Kristalna struktura pomaže u rasvjetljavanju funkcija ribosoma te interakcija između proteina i RNA.¹⁵

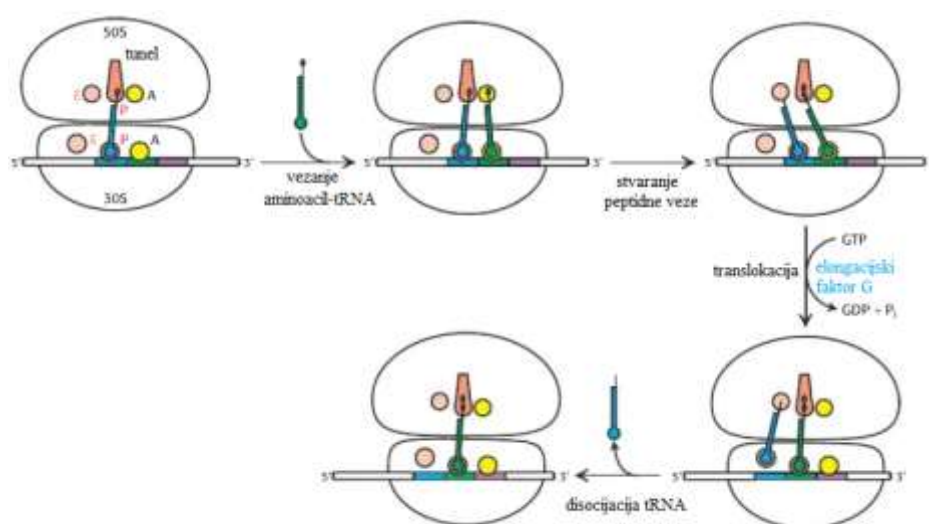
2.1.2. Translacija

Proteini se sintetiziraju dodavanjem aminokiseline na rastući polipeptidni lanac. Nastajanje peptidne veze između slobodnih aminokiselina nije termodinamički povoljno pa je aminokiselinu potrebno prethodno aktivirati. U biosintezi proteina aktivne preteče su aminoacil-tRNA.² Translacija uključuje mnogo koraka i ima 2 bitna zahtjeva: translacija mora biti brza i točna. Kako bi se zadovoljila oba kriterija, brzina i točnost, evolucijski je odabrana brzina translacije koja onda dovodi do frekvencije pogreške koja je zadovoljavajuća za

određeni organizam. U *E. coli* brzina translacije je 20 aminokiselina u sekundi, a frekvencija pogreške 10^{-4} po aminokiselini.²

Biosinteza proteina ne započinje od prvog kodona u mRNA na 5'-kraju, već je pokazano da svaka mRNA ima signale koji određuju početak i kraj svakog kodiranog polipeptidnog lanca. Početak sinteze proteina određuju dvije vrste interakcija, sparivanje purinom bogate regije mRNA, tzv. Shine-Dalgarnovog slijeda, s 3'-krajem 16S rRNA, te sparivanje početnog kodona mRNA molekule, koji je u prokariota većinom AUG, rijede GUG i UUG, s antikodonom inicijacijske molekule tRNA. Sinteza proteina se obustavlja djelovanjem faktora otpuštanja nakon što se dosegnu STOP-kodoni u slijedu molekule mRNA. STOP-kodoni su UAA, UGA i UAG.²

2.1.3. Proteinski faktori



Slika 2.2. Mehanizam biosinteze proteina. Ciklus započinje u P-mjestu s peptidil-tRNA. Novopridošla aminoacil-tRNA veže se u A-mjesto. Nakon popunjavanja oba mjesta dolazi do stvaranja peptidne veze. tRNA i mRNA translociraju pomoću elongacijskog faktora G, koji premješta deaciliranu tRNA u E-mjesto. tRNA iz E-mjesta disocira s ribosoma i ciklus završava. Preuzeto i prilagođeno iz reference 2.

Ključnu ulogu u biosintezi proteina imaju proteinski faktori. Biosinteza proteina ne može započeti prije nego se na ribosom vežu mRNA i formilmetionil-tRNA^f (fMet-tRNA^f), tzv. inicijatorska tRNA. U tome pomažu inicijacijski proteinski faktori IF1, IF2 i IF3 (engl. *initiation factor*, IF). Mala ribosomska podjedinica 30S prvo stvara kompleks s IF3 koji sprječava prerano vezanje s velikom, 50S, podjedinicom, te s IF1 koji usmjerava fMet-tRNA^f da se veže na odgovarajuće mjesto na ribosomu. IF2 pripada porodici G-proteina koji

mijenjaju konformaciju vezanjem gvanozin-trifosfata (GTP) te ima afinitet prema fMet-tRNA^f. Taj kompleks, IF2-GTP-inicijacijska tRNA, veže mRNA i podjedinicu 30S te nastaje inicijacijski kompleks. Strukturne promjene uzrokuju otpuštanje IF1 i IF3, dok IF2 stimulira pridruživanje 50S ribosomske podjedinice nakon čega GTP hidrolizira i IF2 se otpušta sa 70S inicijacijskog kompleksa.²

Druga faza biosinteze proteina je elongacija. Elongacijski faktor Tu (engl. *elongation factor* EF), EF-Tu, donosi aminoaciliranu tRNA na A-mjesto (A-engl. *aminoacyl* ili ono koje veže aminoaciliranu tRNA) na ribosomu. EF-Tu je G-protein i treba GTP da bi vezao aminoacil-tRNA i da bi se vezao na ribosom. EF-Tu štiti osjetljivu estersku vezu u aminoacil-tRNA od hidrolize. Ako nastaje ispravan kompleks EF-Tu:GTP:aminoacil-tRNA:ribosom, GTP hidrolizira i aminoacil-tRNA se prenosi na ribosom. Ako kodon i antikodon nisu pravilno spareni, ne dolazi do hidrolize ni do prijenosa aminoacil-tRNA na ribosom. Elongacijski faktor EF-Ts se nakon prijenosa aminoacil-tRNA na ribosom veže na EF-Tu-GDP te potiče disocijaciju GDP. Kako bi se nova aminoacil-tRNA dopremila u A-mjesto ribosoma, potrebno je da je na EF-Tu veže novi GTP, a time se, istovremeno, otpušta EF-Ts.

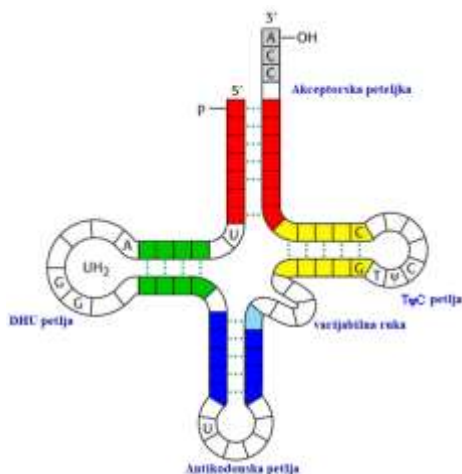
Kad se ispravna aminoacil-tRNA veže u A-mjesto ribosoma, polipeptidni lanac se mora premjestiti iz P-mjesta (P- engl. *peptidyl* ili mjesto nastanka peptidne veze) iz deacilirane tRNA, u A-mjesto na tRNA koja nosi aminokiselinu koja će se sljedeća ugraditi u lanac. To je spontani, termodinamički povoljan proces pri kojem nastaje nova peptidna veza, koja je čvršća od raskinute esterske veze između tRNA i aminokiseline. Za taj proces mRNA se mora pomaknuti za duljinu 3 nukleotida kako bi se novi kodon smjestio u A-mjesto te kako bi se mogla stvoriti interakcija s antikodonom novopridošle aminoacil-tRNA. Istovremeno, deacilirana tRNA se mora premjestiti u E-mjesto (E- engl. *exit*) na 30S podjedinici ribosoma. Tu translokaciju potiče elongacijski faktor G (EF-G) koji se još naziva i translokaza. To je G-protein koji se u kompleksu s GTP-om veže na ribosom u blizini A-mjesta i stvara interakciju s 23S rRNA. Time se potiče hidroliza GTP-a koja dovodi do konformacijske promjene EF-G. Konformacijska promjena uzrokuje translokaciju peptidil-tRNA iz A u P-mjesto, noseći sa sobom mRNA i deaciliranu tRNA. Nakon što EF-G disocira, aminoacil-tRNA se može vezati u A-mjesto.²

Nakon elongacije slijedi terminacija. Aminoacil-tRNA se ne vežu na A-mjesto ribosoma ako se tamo nalaze STOP-kodoni. STOP-kodone prepoznaju faktori otpuštanja, RF (engl. *release factor*, RF). RF pomažu osloboditi dovršeni protein s posljednje molekule tRNA.

U završnoj fazi reciklira se ribosom. U toj fazi uklonjaju se mRNA, tRNA te RF s ribosoma i ribosom disocira na malu i veliku podjedinicu. RF1 ili RF2 se uklanjaju djelovanjem RF3 razmjenom GDP-a s GTP-om na ribosomu. RF3 hidrolizira GTP i odvaja se od ribosoma. Ribosomski faktor recikliranja (engl. *ribosome recycling factor*, RRF) i EF-G-GTP se vežu i razdvajaju ribosom na 30S i 50S podjedinice. Ponovno vezanje podjedinica sprječava IF3 koji se veže na 30S. Reciklirana 30S podjedinica je sada spremna za inicijaciju translacije na novoj mRNA.¹²

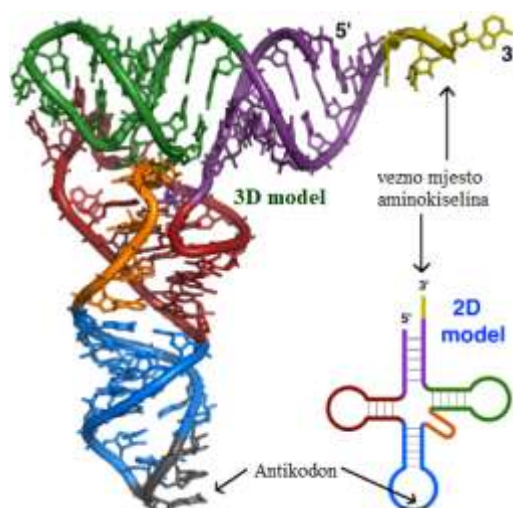
2.2. Transfer RNA

Molekule transfer RNA su adaptor koji se vežu na kodon mRNA i nose aminokiseline koje će se ugraditi u polipeptidni lanac. Rober Holley je 1965. godine odredio slijed baza prve tRNA molekule, kvaščeve alaninske tRNA. Sve molekule tRNA slažu se u sekundarnu strukturu oblika djeteline, pri čemu je oko polovica nukleotida u takvoj strukturi sparena. Sve molekule tRNA imaju neka zajednička svojstva, jednolančane su i imaju između 73-93 nukleotida. Približna molarna masa im je 25 kDa. Dijele se u izoacceptorske skupine u koje su zajedno svrstane tRNA s različitim antikodonima za istu aminokiselinu.⁴ Sve tRNA sadrže neuobičajne baze, između 7 i 15 po molekuli. Te baze su često metilirane ili dimetilirane standardne baze, adenin (A), gvanin (G), citozin (C) i uracil (U). Metiliranja mogu sprječiti stvaranje baznih parova kako bi određene baze bile slobodne za neke druge interakcije. Metiliranja baza također mogu doprinijeti i hidrofobnom karakteru, koji je važan za interakciju tRNA s aminoacil-tRNA-sintetazama i ribosomskim proteinima. Oko polovice nukleotida u tRNA je sparno i tvori dvolančane uzvojnice, dok je u molekuli prisutno pet jednolančanih regija. Na 3'-kraju tRNA nalazi se akceptorska peteljka koja reagira s 50S ribosomskom podjedinicom i završava slijedom CCA. Za hidroksilnu skupinu adenozienskog ostatka na 3'-kraju akceptorske peteljke veže se aktivirana aminokiselina. TΨC petlja nazvana je prema sekvenci ribotimin-pseudouracil-citozin. Varijabilna ruka ima varijabilni broj ostataka, DHU petlja sadrži nekoliko dihidouracilnih ostataka, a antikodonska petlja reagira s 30S ribosomskom podjedinicom. 5'-kraj tRNA je fosforiliran i tamo se najčešće nalazi pG. Antikodon je smješten u središtu antikodonske petlje.^{1,9}



Slika 2.3. Sekundarna struktura molekule transfer RNA. Molekula zauzima djetelinastu formu, dio baza čini dvostruke uzvojnice, dok je dio baza nesparen. Na slici su istaknute jednolančane regije važne u biosintezi proteina. Preuzeto i prilagođeno iz <https://molbioandbiotech.wordpress.com/2007/09/13/trna/>

Rentgenskom strukturnom analizom u laboratoriju A. Richa i A. Khuga, 1974. godine određena je prva trodimenzionalna struktura tRNA. To je bila struktura fenilalaninske tRNA iz kvasca. Kasnije su određene 3D strukture mnogih drugih tRNA te je zaključeno da su najvažnija strukturna svojstva svih tRNA ista. Trodimenzionalna struktura jedne tRNA prikazana je na slici 2.4. To su molekule koje imaju oblik slova L. Struktura ima 2 kraka koja čine 4 segmenta dvostrukih uzvojnica. Dvolančani dijelovi RNA imaju strukturu sličnu A-DNA. Baze koje nisu uključene u tvorbu dvostrukih uzvojnica sudjeluju u vodikovim interakcijama drugačijim od onih u Watson-Crickovim parovima. Akceptorska peteljka, koja služi za vezanje aminokiselina, strši na jednom kraju tRNA kako bi bila lako dostupna. Ta jednolančana regija može mijenjati konformaciju pri aktivaciji aminokiseline i prilikom biosinteze proteina. Na drugom kraju L-strukture tRNA nalazi se antikodonska petlja. Antikodon je lako pristupačan kako bi mogao tvoriti interakcije s kodonom na mRNA, dok je kraj s vezanom aktiviranom aminokiselinom smješten pogodno, u odnosu na rastući polipeptidni lanac, za stvaranje peptidne veze.²



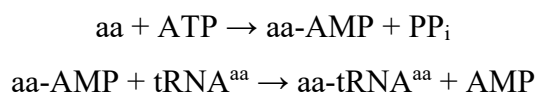
Slika 2.4. Trodimenzionalna struktura tRNA. Akceptorska peteljka, na koju se veže aminokiselina, nalazi se na jednom kraju molekule dok se antikodonska petlja nalazi na drugom kraju. Na slici se također nalazi 2D model tRNA kako bi se lakše predočilo koji dio molekule tRNA se nalazi na kojoj poziciji u trodimenzionalnom modelu. Ista područja u 2D i 3D modelu su označena istom bojom. Preuzeto i prilagođeno s <https://pt.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/translation-polypeptides/a/trna-and-ribosomes>

Molekule tRNA ne sudjeluju samo u dopremanju aminokiselina na ribosom za potrebe biosinteze proteina. tRNA ima ulogu i u biosintezi nekih antibiotika. Za neke funkcije u stanici tRNA mora biti neaminoacilirana. Neaminoacilirane tRNA služe kao senzori koncentracije aminokiselina i kao regulatori globalne ekspresije gena kao odgovor na promjene u koncentraciji aminokiselina.¹⁸

2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Za vjernost biosinteze proteina zaduženi su enzimi aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS). Smatra se da su ti enzimi među najstarijim postojećim proteinima.⁸ AaRS povezuju aminokiselinu s pripadnom tRNA. Jedna aaRS prepoznaje jednu aminokiselinu (aa) i jednu ili više izoakceptorskih tRNA.⁴

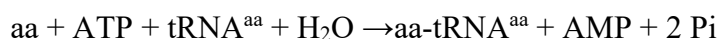
Aktivacija aminokiselina i prijenos na tRNA odvija se u dvostupanjskoj reakciji, oba stupnja kataliziraju aaRS.



Reakciju omogućuje hidroliza pirofosfata, koju katalizira pirofosfataza, i čini ju ireverzibilnom.



Ukupna suma reakcije je:



Međuprodukt, aminoacil-adenilat, ne disocira s enzima, već ostaje vezan u aktivnom mjestu. Aktivacija aminokiseline i prijenos na tRNA odvijaju se u istom aktivnom mjestu katalitičke domene, koje se još naziva i sintetskim.⁷

Sparivanjem aa i pripadne tRNA dolazi do esterifikacije 3'-kraja tRNA te nastanka aminoacil-tRNA kako je prikazano u gornjoj reakciji. Prvo dolazi do nukleofilnog napada α -karboksilata aminokiseline na α -fosfat ATP-a. Pretpostavlja se da se reakcija odvija $\text{S}_{\text{N}}2$ mehanizmom pri čemu nastaje pentakoordinirano prijelazno stanje atoma fosfora. Produkti ove reakcije su pirofosfat i aa-AMP kao međuprodukt. U idućem koraku kisik iz 2'- ili 3'-OH skupine adenzina na 3'-kraju tRNA nukleofilno napada α -karbonilni ugljikov atom aminoacil-adenilata. Time dolazi do oslobađanja AMP-a i nastanka aminoacil-tRNA.¹

2.3.1. Vezanje pripadnih aminokiselina i tRNA

Svaka aaRS mora specifično prepoznati svoj aminokiselinski supstrat. Neke sintetaze mogu prepoznati pripadnu aminokiselinu s velikom točnošću samo u sintetskom mjestu. Kako neka aminokiseline jako nalikuju jedna na drugu, neke aaRS ne mogu diskriminirati pripadnu aminokiselinu samo u sintetskom mjestu, te su stoga one razvile i dodatnu, hidrolitičku aktivnost u odvojenoj domeni. Dva aktivna mjesta, sintetsko i hidrolitičko, djeluju kao dvostruko sito koje osigurava vjernu biosintezu proteina.²

Prepoznavanje tRNA od strane svake pripadne aaRS drugačije je i svojstveno samo tom paru makromolekula. Pozitivni i negativni elementi identiteta zaslužni su za prepoznavanje odgovarajuće tRNA. Pozitivni elementi su strukturni elementi koji stabiliziraju kompleks aaRS:tRNA. Negativni elementi identiteta onemogućuju nastajanje stabilnog kompleksa između nepripadnih sintetaza i tRNA. AaRS i tRNA su velike molekule usporedivih veličina pa se interakcija odvija preko velike dodirne površine. Elementi identiteta mogu biti

antikodonska petlja, varijabilna ruka, baza na poziciji 73, tzv. diskriminacijska baza i drugo. U slučajevima kad je aminokiselina kodirana s više kodona, element identiteta često je varijabilna ruka. Molekule tRNA se na temelju varijabilne ruke mogu svrstati u 2 tipa. Podjela se temelji na duljini varijabilne ruke. tRNA tipa I imaju kraću varijabilnu ruku, duljine 4-5 nukleotida, dok one s 13-21 nukleotid spadaju u tip II.⁴

2.3.2. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza

Do sada je poznato 24 različite aaRS. One se dijele u 2 nesrodna, strukturno različita, razreda. Razred I broji 11, dok razred II broji 13 članova.

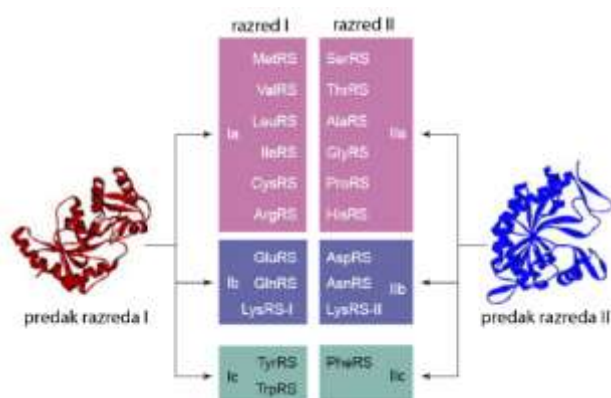
AaRS oba razreda sadrže vezno mjesto za aa, ATP i 3'-kraj tRNA. AaRS razreda I posjeduju sintetsku domenu građenu od Rossmannovog nabora koji je lociran u blizini N-terminalnog kraja. Ta struktura sastoji se od 2 uzastopna β - α - β motiva i odgovorna je za vezanje nukleotida.¹ Uočena su dva očuvana aminokiselinska slijeda, to su motivi **HIGH** (histidil-izoleucil-glicil-histidin) i **KMSKS** (lizil-metionil-seril-lizil-serin) koji čine vezno mjesto za ATP. **HIGH** sekvenca je locirana na N-terminalnom kraju prve α -zavojnice u prvom djelu Rossmannovog nabora, dok se **KMSKS** nalazi u drugoj polovici nabora. Samo je glicinski ostatak u **HIGH** sekvenci strogo konzerviran. Ta pozicija osigurava konformaciju koja dopušta slaganje s adenozijskim prstenom ATP-a. To vezanje bi bilo narušeno da se na toj poziciji nalazi bilo koji drugi β -supstituent pa je na taj način objašnjena stroga konzerviranost. Lizinski ostaci u sekvenci **KMSKS** zaduženi su za interakciju s fosfatom iz ATP-a.³

ATP je u razredu I aaRS-a u sintetskom mjestu vezan u izduženoj konformaciji, dok riboza iz ATP-a zauzima C2' endo konformaciju. Akceptorska peteljka tRNA vezana je sa strane malog utora te je varijabilna ruka okrenuta prema otapalu. U drugom koraku dvostupanjske reakcije 2'- ili 3'-OH skupina adenzina 76 djeluje kao nukleofil. Za enzime razreda I, nukleofil je 2'-OH skupina riboze tRNA, a za enzime razreda II to je 3'-OH skupina. Unutar razreda I napravljena je podjela na podrazrede koji teže prepoznavanju kemijski sličnih aminokiselina, to su podrazredi Ia, Ib i Ic.¹

Većina enzima razreda I su monomeri, dok razred II većinom čine dimeri. AaRS razreda II ne posjeduju Rossmannov nabor.¹⁹ Sedmeročlana antiparalelna β -ploča omeđena s 3 α -zavojnice karakteristika je sintetske domene aaRS razreda II. Unutar razreda II također postoji

podjela na 3 podrazreda, IIa, IIb i IIc. ATP je kod ovih enzima vezan u zavijenoj konformaciji i stabiliziran dodatnim ionom Mg^{2+} . Akceptorskoj peteljci prilazi se sa strane velikog utora pa je varijabilna ruka okrenuta prema proteinu. U katalizi enzimima razreda II 3'-OH skupina riboze tRNA nukleofilno napada α -karbonilni ugljikov atom aminoacil-AMP-a.¹

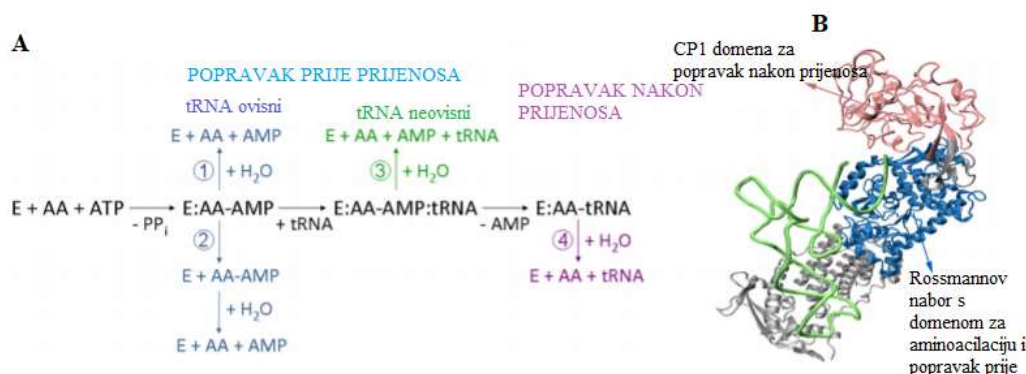
Katalitički gledano, razredi se razlikuju po koraku koji određuje brzinu reakcije. Kod aaRS razreda I korak koji određuje brzinu reakcije je otpuštanje aminoacilirane tRNA, dok kod enzima razreda II nastajanje aminoacil-adenilata predstavlja najsporiji korak u reakciji.⁹



Slika 2.5. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza na razrede i podrazrede. Preuzeto i prilagođeno iz reference 20.

2.4. Mehanizmi popravka pogrešaka u aminoacil-tRNA-sintetaza

Da bi se osigurala velika vjernost biosinteze proteina, aminoacil-tRNA-sintetaze moraju biti izuzetno točni enzimi. Pretpostavlja se da se misacilacija događa samo u 0,03% ukupnih reakcija aminoacilacija.⁹ AaRS imaju 2 supstrata, aminokiseline i tRNA, a diskriminacija pripadne aminokiseline je zahtjevnija i teža. Neke aaRS postižu zadovoljavajući stupanj točnosti u koraku vezanja aa na enzim na temelju kemijskih i steričkih svojstava aminokiselina. Ipak, većina aaRS ne može samo kroz sintetsku reakciju osigurati odgovarajuću točnost te je razvijena kompleksna mreža mehanizama popravka pogrešaka. Pri tome, popravku pogreške mogu biti podvrgnuti i misaktivirana aa i misacilirana tRNA.^{1,4,9,21} Kod 10 obitelji aaRS uočeno je postojanje mehanizama za popravak pogreške. Svih 10 sposobno je hidrolizirati aminoacil-AMP u odsutnosti tRNA.^{3,21}



Slika 2.6. A shematski prikaz kompleksne mreže mehanizama popravka pogrešaka u aaRS. Putevi 1 i 3 predstavljaju tRNA ovisni, odnosno tRNA neovisni, enzimske mehanizme popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline na tRNA. Put označen s 2 odnosi se na neenzimsku hidrolizu misaktivirane aminokiseline. 4. put prikazuje popravak pogreške nakon prijenosa nepravilne aminokiseline na tRNA. B kristalna struktura IleRS iz *Staphylococcus aureus* u kompleksu s tRNA. tRNA je prikazana zelenom bojom, CP1 domena za popravak nakon prijenosa rožom, a Rossmannov nabor s domenom za aminoacilaciju i popravak pogreške prije prijenosa plavom bojom. Ostatak strukture enzima prikazan je sivom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz reference 6.

2.4.1. Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline na tRNA

Generalno, postoje 2 tipa mehanizma popravka pogrešaka. To su mehanizam popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline na tRNA u kojemu se hidrolizira aminoacil-adenilat, te mehanizam popravka nakon prijenosa, odnosno hidroliza misacilirane tRNA. Popravak pogreške prije prijenosa može se odvijati na enzimske i neenzimske način. Neenzimska hidroliza odvija se u citosolu nakon otpuštanja aminoacil-adenilata s enzima. To je selektivni, katalitički model popravka pogreške.

Enzimske popravak pogreške prije prijenosa odvija se u sintetskom aktivnom mjestu. Taj put popravka može biti tRNA-ovisan i tRNA-neovisan. tRNA-ovisan put za sada je poznat samo kod izoleucil-tRNA-sintetaza.

2.4.2. Popravak pogreške nakon prijenosa aminokiseline na tRNA

Većina aaRS oslanja se na hidrolizu misacilirane tRNA kao glavni mehanizam popravka. Takav mehanizam odvija se u zasebnoj, hidrolitičkoj domeni. No, od 10 aaRS kod kojih je opažen popravak pogreške, 3 obitelji aaRS ne posjeduju dodatnu domenu za popravak te se oslanjaju samo na popravak prije prijenosa.^{3,21}

tRNA na koju je vezana nepripadna aminokiselina može se na dva načina dopremiti u hidrolitičko mjesto za popravak. U *in trans* načinu misacilirana tRNA se prvo otpušta s enzima te se ponovo veže u domenu za popravak. Nakon hidrolize slobodna aa i tRNA se otpuštaju u otopinu. U *in cis* putu misacilirana tRNA ostaje cijelo vrijeme vezana na enzimu te se 3'-kraj s nepripadnom aminokiselinom translocira u aktivno mjesto za hidrolizu. Čitavi kompleks aaRS:aa-tRNA prolazi kroz konformacijsku promjenu, a taj proces naziva se translokacija.²¹

Proces diskriminacije aminokiselina od strane aminoacil-tRNA-sintetaza opisan je modelom dvostrukog sita. Aktivno mjesto aaRS djeluje kao prvo sito koje odbacuje aminokiseline veće od pripadne. Manje aa mogu se vezati u sintetsko mjesto te se mogu aktivirati i prenijeti na tRNA. Takva misacilirana tRNA dolazi do hidrolitičkog mjesta za popravak koje djeluje kao drugo sito. To mjesto omogućuje vezanje manjih aa od pripadne, a isključuje pripadnu aminokiselinu.^{1,5,19,22}

2.5. Izoleucil-tRNA-sintetaza

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) je aaRS razreda Ia zadužena za povezivanje izoleucina s pripadnom tRNA^{Ile}. Izoleucin je kodiran s 3 različita kodona, AUU, AUA i AUC. Kod prokariota i eukariota postoje dvije izoakceptorske tRNA^{Ile} s različitim antikodonima.^{1,5,9} Sve IleRS su monomerni proteini veličine oko 104 kDa s približno 1000 aa. Dimenzija enzima iz *E. coli* je 100 Å × 80 Å × 45 Å. Riješeno je nekoliko kristalnih struktura IleRS iz različitih organizama i u kompleksu s različitim ligandima, no mnoge strukture još nedostaju. Daljnji cilj istraživanja je riješiti kristalne strukture IleRS iz različitih organizama s različitim ligandima, osobito mupirocinom, kako bi se dobio bolji uvid u sam mehanizam djelovanja ovog antibiotika. Na slici 2.7. prikazana je struktura IleRS iz *Thermus thermophilus*.



Slika 2.7. Struktura IleRS iz *Thermus thermophilus*. Na slici su kao crvene kuglice prikazani ioni cinka, Rossmannov nabor prikazan je narančastom bojom, CP1 domena svijetlo plavom, a C-terminalni dio je prikazan crvenom bojom. Preuzeto iz reference 23.

2.5.1. Strukturna svojstva izoleucil-tRNA-sintetaza

IleRS je građena od katalitičke domena na N-terminalnom kraju koja je karakteristična za sve aaRS razreda I. U IleRS iz *E. coli* to aktivno mjesto sadrži 939 aa.²⁴ Sintetsko mjesto katalitičke domene građeno je od Rossmannovog nabora koji se sastoji od 2 uzastopna β - α - β motiva. Nastanak tog motiva vjerojatno je rezultat duplikacije gena. Rossmannov nabor razdvojen je umetnutom domenom, CP1 domenom (engl. *connective peptide 1*, CP1). Ta domena posebno je povećana kod IleRS (izoleucil-tRNA-sintetaza, imena ostalih sintetaza izvedena su iz troslovne kratice za aminokiselinu na koju je nadovezan nastavak RS), ValRS i LeuRS jer se u njoj nalazi posebno katalitičko mjesto za hidrolizu misacilirane tRNA. U Rossmannovom naboru katalitičke domene odvija se aktivacija i prijenos aa na tRNA. Organizaciji aktivnog mjesta pomažu dvije očuvane sekvence, **HIGH** te **KMSKS**, opisane ranije u poglavlju 2.3.2.

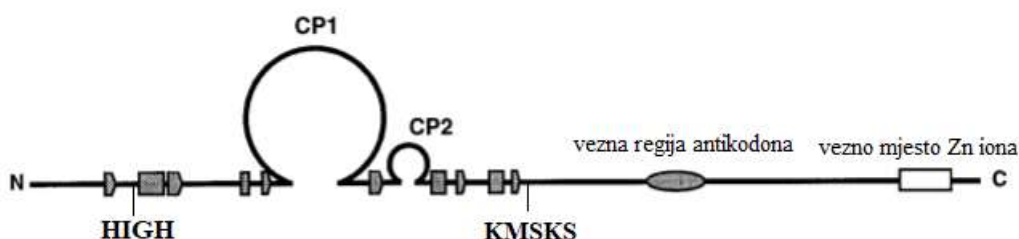
Riboza ATP-a prepoznata je od strane *T. thermophilus* IleRS-a pomoću vodikovih veza. 2'-OH skupina riboze tvori interakcije s amidnom skupinom glicina na poziciji 551, a ta skupina stvara vodikovu vezu i s bočnim ogranakom aspartata na poziciji 553. Taj bočni ogranak je kod većine IleRS konzerviran. U IleRS je strogo konzerviran bočni ogranak na poziciji 550, to je bočni ogranak glutaminske kiseline koji stvara vodikovu vezu s 3'-OH skupinom riboze. Kako bi se ATP pravilno pozicionirao u aktivnom mjestu potrebna je još

jedna interakcija, a to je vodikova veza između N3 atoma adenina i bočnog ogranka histidina na položaju 581.

Pripadni aminokiselinski supstrat, izoleucin, se u aktivno mjesto pozicionira van der Waalsovima interakcijama. Ile se veže u hidrofobni džep IleRS-a koji je građen od Gly, Pro i Trp. U IleRS su potpuno konzervirani ostaci na poziciji 85-asparaginska kiselina, te glutaminska kiselina na položaju 554. Ti bočni ogranci stvaraju vodikove veze s α -amino, odnosno α -karboksilnom skupinom izoleucina.^{1,5}

Približno 30 Å udaljena od katalitičke domene nalazi se umetnuta domena CP1. Osim CP1, postoji i dodatna umetnuta domena, CP2. CP1 domena sadrži dodatno aktivno mjesto koje je odgovorno za hidrolizu misacilirane tRNA^{Ile}. Katalitička domena povezana je s CP1 domenom s dva β -lanca. Ta dva aktivna mjesta, sintetsko i hidrolitičko, služe kao dvostruko sito koje osigurava vjernost biosinteze proteina.^{1,5}

Na karboksilnom kraju proteina nalazi se domena zadužena za vezanje tRNA^{Ile}. Ta domena nije očuvana kod svih IleRS te se razlikuje između bakterija i eukariota.^{1,5}



Slika 2.8. Organizacija domena u IleRS iz *E. coli*. Prikazane su očvane sekvence **HIGH** te **KMSKS** koje pomažu organizaciji aktivnog mjesta, umetnute domene CP1 i CP2 te regija za vezanje antikodona tRNA i vezno mjesto za Zn²⁺ ion na C-terminalnom djelu proteina. CP1 domena odgovorna je za dio popravka pogreške u IleRS, dok CP2 domena u nekim organizmima veže Zn²⁺ ion koji je u *E. coli* vezan na C-terminalnom kraju. Preuzeto i prilagođeno iz reference 24.

IleRS su metaloproteini koji sadrže 2 cinkova iona. Cinkovi ioni su esencijalni za aktivnost IleRS. U *E. coli*, ispravno vezanje tRNA^{Ile} zahtjeva C-terminalni peptid koji veže Zn²⁺ ion. Taj ion koordiniran je s 4 cisteinska bočna ogranka. Za razliku od *E. coli*, C-terminalni kraj IleRS iz *T. thermophilus*, prikazane na slici 2.7., ne veže cinkov ion, ali je cinkov ion vezan u CP2 domeni te je također koordiniran s 4 cisteinska bočna ogranka.

Drugi cinkov ion nalazi se na amino-kraju proteina. Koordiniran je s 2 Cys bočna ogranka iz katalitičke domene, te s 2 Cys ogranka iz CP1 domene. Ioni Zn²⁺ u IleRS imaju strukturnu ulogu budući da su im sva koordinacijska mjesta zauzeta Cys bočnim ograncima. Također,

IleRS izoliran iz medija bez cinkovih iona nije bio katalitički aktivan što je dokaz esencijalne uloge Zn^{2+} iona.^{1,5}

2.5.2. Mehanizam popravka pogreška kod izoleucil-tRNA-sintetaza

Čak i prije nego je mehanizam biosinteze proteina bio u potpunosti razjašnjen, Pauling je predvidio poteškoće u selekciji Ile prema Val tijekom translacije.⁵ Zbog malih razlika u strukturi valina i izoleucina, IleRS katalizira stvaranje i Ile-AMP i Val-AMP.^{5,9} IleRS samo 200 puta slabije diskriminira nepripadni Val od pripadnog Ile. Razlika u veznoj energiji između Ile i Val ne može osigurati postizanje zadovoljavajuće vjernosti biosinteze proteina.^{1,6-9} Da bi se spriječila pogreška, IleRS se oslanja na 3 mehanizma popravka pogreške, tRNA-ovisni i tRNA-neovisni popravak misaktivirane aa te popravak misacilirane tRNA.

Kako je ranije opisano u poglavlju 2.4.1., 2 su osnovna mehanizma popravka pogreška, popravak misaktivirane aminokiseline i misacilirane tRNA. Popravak pogreške prije prijenosa prvo je uočen kod IleRS.³ U slučaju IleRS-a, neenzimska hidroliza misacilirane aminokiseline je vrlo malo vjerojatna i odvija se u slučaju misaktiviranog cisteina⁹, ali ne i u slučaju misaktivacije valina koji se na IleRS-u aktivira gotovo jednako učestalo kao i pripadni izoleucin. Ovi podaci ne iznenađuju budući da se valin i izoleucin razlikuju samo u jednoj metilenskoj skupini.^{1,9}

tRNA-ovisni popravak prije prijenosa značajan je kod IleRS iz *E. coli*, na taj mehanizam otpada 30 % ukupnog popravka pogreške. Taj popravak odvija se u sintetskom aktivnom mjestu u Rossmannovom naboru i to je drevno svojstvo IleRS.⁶ Za sada nije poznato da je to svojstvo izraženo kod bilo koje druge aminoacil-tRNA-sintetaze.

U IleRS zamijećen je očuvani tirozinski ostatak unutar sintetskog mjesta. Smatra se da je on bitan i kod aminoacilacije i hidrolize misaktivirane aa. Tirozinski ostatak nalazi se na poziciji 59 u *E. coli* i može poprimiti različite konformacije.⁶

Istraživanja su pokazala da se IleRS iz nekih organizama ne oslanjaju na ovakav mehanizam popravka pogreške već, kao i većina aaRS, kao glavni mehanizam koriste mehanizam popravka pogreške nakon prijenosa kojemu je supstrat misacilirana tRNA. Postoje dvije vrste izoleucil-tRNA-sintetaza kodirane s dva tipa gena. IleRS2, kodirane s *ileS2*, izgubile su tRNA-ovisni mehanizam popravka pogreške prije prijenosa. Time je pokazano da mehanizam popravka prije prijenosa nije esencijalan za IleRS.⁸

Kod IleRS se popravak pogreške nakon prijenosa, hidroliza misacilirane tRNA, odvija u domeni koja se nalazi umetnuta u Rossmannov nabor, to je ranije opisana CP1 domena.^{3,21} Popravak Val-tRNA^{Ile} prvi puta je izmjeren još 1972. Pokazano je da se Val-tRNA^{Ile} veže i u sintetsko i u hidrolitičko mjesto unutar CP1 domene dok se Ile-tRNA^{Ile} veže samo u sintetsko mjesto.²⁵ Misacilirana tRNA^{Ile} se iz sintetske domene mora smjestiti u hidrolitičko mjesto da bi došlo do hidrolize i oslobađanja aa i tRNA, taj prijenos odvija se na *in cis* način.³ Zanimljiva činjenica kod IleRS je da se valin deacilira samo s 3'-OH skupine adenzina na 3'-kraju tRNA, dok je poznato da IleRS kod predstavnika razreda I aaRS-a aminoacilira 2'-OH skupinu tRNA. Popravak nakon prijenosa, stoga, zahtijeva korak koji uključuje translokaciju valina s 2'- na 3'-OH skupinu adenzina 76 na 3'-kraju tRNA.

2.5.3. Tipovi izoleucil-tRNA-sintetaza

Postoje 2 tipa izoleucil-tRNA-sintetaza koje kodiraju 2 različita gena, *ileS1* i *ileS2*. One se strukturno razlikuju u mjestu na kojem je vezan esencijalan cinkov ion. U IleRS1 taj je Zn²⁺ ion vezan na C-terminalnom peptidu, dok je kod IleRS2 vezan u umetnutoj CP2 domeni.²⁴ IleRS1 kao značajni mehanizam popravka pogrešaka koristi tRNA-ovisni popravak prije prijenosa, dok se u IleRS2 popravak vrši, kao i kod većine aaRS koje popravljaju pogreške, gotovo isključivo na misaciliranoj tRNA.

Tip 1 IleRS pronađen je kod većine prokariota te u mitohondrijima eukariota. IleRS2 javlja se u eukariota ali je pronađen i u nekih prokariota. Horizontalni prijenos gena mogao bi objasniti pronalazak tipa 2 IleRS-a u bakterijama.⁸ Također, pronađeni su prokarioti koji sadrže oba tipa izoleucil-tRNA-sintetaza, tip 1 i tip 2.

Razlika između 2 tipa IleRS može se iskoristiti i u komercijalne svrhe jer je IleRS tipa 1 osjetljiviji na djelovanje mupirocina od IleRS tipa 2.^{5,8}

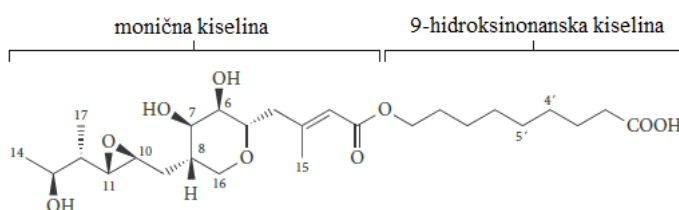
2.6. Mupirocin

Mupirocin je antibiotik koji proizvodi *Pseudomonas fluorescens* (NCIMB 10586).^{10,27-29} *P. fluorescens* je uobičajena bakterija koja živi u tlu te proizvodi pseudomoničnu kiselinu A, B, C i D kao smjesu. Na pseudomoničnu kiselinu A otpada 90 % te smjese i ona je glavna antimikrobna komponenta antibiotika, te se naziv mupirocin odnosi na nju.²⁸ Molekulska

formula pseudomonične kiseline A je $C_{26}H_{44}O_9$, a građena je od 9-hidroksinonanske kiseline koja je preko svoje OH-skupine vezana α,β -nezasićenom esterskom vezom na ostatak molekule, moničnu kiselinu. Antibiotik izoliran iz *P. fluorescens* pokazuje stabilnost u rasponu pH vrijednosti od 4-9 na temperaturi od 37 °C kroz 24 h. Izvan tih granica opažen je znatan gubitak aktivnosti.¹⁰

Mupirocin se u obliku aerosola i masti koristi za liječenje raznih kožnih infekcija. Djeluje na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije, a također djeluje i na *Staphylococcus aureus*. U ljudskom organizmu mupirocin se brzo hidrolizira na 9-hidroksinonansku i moničnu kiselinu, inaktivne metabolite koji se brzo izlučuju iz organizma. Također, mupirocin se veže na proteine humanog seruma pa je manje biodostupan.^{27,28}

Meta ovog antibiotika je izoleucil-tRNA-sintetaza tipa 1. Humana IleRS je puno manje osjetljiva na mupirocin u odnosu na bakterijsku. Ova specifičnost je bitna za primjenu, a i uz jedinstvenu strukturu antibiotika, mupirocin se smješta u klasu neobičnih antimikrobnih agenasa. On djeluje kao kompetitivni inhibitor vezanja izoleucina i ATP-a u sintetskom mjestu.^{1,5} Kako se enzimaska aktivnost može inhibirati vezanjem molekula koje nisu supstrati, opisano je više mogućih scenarija inhibicije. U reverzibilnoj inhibiciji kompleks enzim-inhibitor brzo disocira. U ovaj tip inhibicije spada i kompetitivna inhibicija kakva se javlja u slučaju mupirocina i IleRS-a. Inhibitor, mupirocin, se natječe sa supstratom za isto vezno mjesto. Na to mjesto može se vezati ili inhibitor ili supstrat te se na taj način ostvaruje inhibicija.²



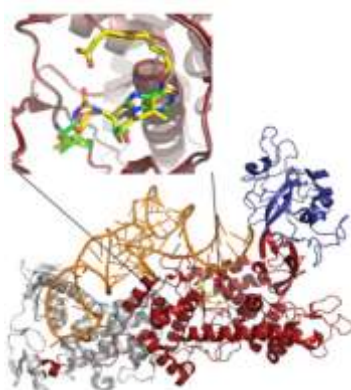
Slika 2.9. Struktura pseudomonične kiseline A. Prikazana su dva dijela koji čine pseudomoničnu kiselinu A, monična kiselina te 9-hidroksinonanska kiselina. Preuzeto iz reference 28.

2.6.1. Zaštita *Pseudomonas fluorescens* od vlastitog antibiotika

Budući da mupirocin djeluje na IleRS, enzim koji je neophodan za život u sve tri domene života, jasno se nametalo pitanje kako se *P. fluorescens*, koji proizvodi ovaj antibiotik, štiti od istog. Yanagisawa i suradnici su u svom radu iz 2003. dali odgovor na ovo pitanje. U toj bakteriji identificirana su 2 različita gena, *ileS1* te *ileS2*, koji kodiraju 2 tipa IleRS. Najveća razlika između pronađenih tipova IleRS-a je u njihovoj osjetljivosti prema pseudomoničnoj kiselini, odnosno mupirocinu. Određeno je da pročišćena izoleucil-tRNA-sintetaza, koja je kodirana genom *ileS2*, ne pokazuje osjetljivost prema mupirocinu, dok IleRS1 pokazuje. Nadalje, aminokiselinska sekvenca IleRS2 pokazuje značajke koje su pronađene u eukariotskim enzimima, te je evolucijski udaljena od IleRS1 s kojom dijeli samo 29,6% identičnih aminokiselinskih ostataka. Kako je eksperimentalno potvrđeno da je tip 2 IleRS-a otporniji na mupirocin, zaključeno je da je glavni mehanizam obrane *P. fluorescens* od mupirocina postojanje dodatne izoleucil-tRNA-sintetaze. IleRS1 je puno termički stabilniji od IleRS2, koji je pak zaslužan za otpornost na antibiotik, te bi to mogao biti glavni razlog postojanja oba tipa IleRS-a u *P. fluorescens*.¹¹

2.6.2. Kako djeluje mupirocin?

Da bi se odredilo kako djeluje mupirocin, Yanagisawa je još 1994. godine izdao rad kojim je pokušao rasvijetliti mehanizam djelovanja pseudomonične kiseline A. Usporedbom aminokiselinskih sekvenci izoleucil-tRNA-sintetaza iz *E. coli*, mutanta *E. coli* koji je rezistentan na mupirocin, te IleRS iz *P. fluorescens*, zaključeno je da su oba dijela pseudomonične kiseline A potrebna za inhibiciju. Iz mutacije koja dovodi do rezistencije, u blizini očuvane sekvence **KMSKS**, predloženo je da se dio pseudomonične kiseline veže u vezno mjesto ATP-a. Pronađena je sekvenca koja bi mogla biti odgovorna za vezanje Ile, te se to mjesto preklapalo s veznim mjestom djela pseudomonične kiseline koji je analog izoleucinu. Yanagisawa je tada donio zaključak da je mupirocin bifunkcionalni antibiotik koji kompetira vezanju izoleucina i ATP-a.³⁰



Slika 2.10. Struktura izoleucil-tRNA-sintetaze iz *S. aureus* u kompleksu s mupirocinom i tRNA^{Ile}. Mupirocin je prikazan žutom bojom, tRNA^{Ile} narančastom, sintetska domena je prikazana crvenom bojom, hidrolitička domena plavom, a ostatak enzima sivom bojom. Preuzeto iz reference 8.

2.6.3. Djelovanje mupirocina na razne mikroorganizme

Kako je već ranije spomenuto u poglavlju 2.4.2., u nekim bakterijama pronađen je IleRS sličan eukariotskom, IleRS2, a to sugerira da je došlo do horizontalnog prijenosa gena. Istraživanja provedena na raznim mikroorganizmima dovela su do zaključka da su organizmi s tipom gena *ileS2* koji slični eukariotskom, otporniji na mupirocin, što može objasniti širenje tog gena među prokariotima.⁷

Kritični tirozinski ostatak, koji se u *E. coli* nalazi na poziciji 59, u bakterijskoj IleRS zamijenjen je u IleRS2 s fenilalaninom ili treoninom. Kako je ranije spomenuto, organizmi s tipom 2 IleRS-a kao glavni mehanizam uklanjanja pogreške koriste mehanizam nakon prijenosa za razliku od prokariota koji se uvelike oslanjaju na tRNA-ovisni popravak prije prijenosa. Moguće je da je, uslijed evolucijskih pritisaka, sintetsko mjesto IleRS2 imalo slobodu odreći se tRNA-ovisnog mehanizma uređivanja u zamjenu za rezistenciju na mupirocin.⁸ Točan mehanizam djelovanja mupirocina te korelacija između tipa IleRS-a i osjetljivosti na mupirocin tek trebaju biti detaljno istraženi.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Agar (*Liofilchem*), agaroz (Sigma), akrilamid/bisakrilamid 29:1 (Sigma), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Serva*), amonijev klorid (NH₄Cl) (*Kemika*), ampicilin (Sigma), ekstrakt kvasca (*Liofilchem*), ekstrakt mesa (*Biolife*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Sigma), etanol (*Kemika*), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (Sigma), fenol (*Kemika*), glicerol (*Kemika*), glukoza (*Kemika*), N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*AppliChem PanReac*), imidazol (Sigma), izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) (Sigma), izoleucin (Sigma), izopropanol (*Kemika*), kalcijev klorid (CaCl₂) (*Kemika*), kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄) (*Kemika*), kalijev hidrogenfosfat (K₂HPO₄) (*Kemika*), kanamicin (Sigma), kloridna kiselina (HCl) (*Kemika*), kloroform (*Kemika*) magnezijev klorid (MgCl₂) (*Kemika*), magnezijev sulfat heptahidrat (MgSO₄ × 7 H₂O) (*Kemika*), β-merkaptotanol (*Serva*), mupirocin (*PanReac Applichem*), natrijev acetat (NaCH₃COO) (*Kemika*), natrijev hidrogenfosfat (Na₂HPO₄) (*Kemika*), natrijev klorid (NaCl) (*Kemika*), octena kiselina (CH₃COOH) (*Kemika*), polietilen glikol (PEG 8000) (Sigma), pepton (Sigma), staklene kuglice (Sigma), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Serva*) tiamin (Sigma), tripton (*Liofilchem*), Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (Sigma).

3.1.2. Enzimi i nukleotidi

Alkalna fosfataza (Calf Intestinal Phosphatase, CIP) (*New England BioLabs, NEB*), BamHI (*NEB*), BglII (*NEB*), Dnaza I (*Fluka*), dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Thermo Scientific*), KpnI (*NEB*), NcoI (*NEB*), NdeI (*NEB*), NheI (*NEB*), lizozim (*USB*), *Phusion* DNA-polimeraza s odgovarajućim 5 × high fidelity (HF) puferom (*Thermo Scientific*), puferi CutSmart, 1.1. i 3.1. (*NEB*), Rnaza A (Sigma), T4 DNA-ligaza s odgovarajućim 10 × puferom (*Thermo Scientific*), Taq DNA-polimeraza s odgovarajućim 10 × puferom i magnezijevim sulfatom (MgSO₄) (*Thermo Scientific*), ukupna kvašćeva tRNA (*Roche Diagnostics*), XhoI (*NEB*).

3.1.3. Početnice

Početnice korištene u lančanoj reakciji polimeraze dizajnirane su u laboratoriju i naručene od komercijalnog proizvođača (*Macrogen*). Njihovi sljedovi prikazani su u tablici 3.2.

3.1.4. Markeri veličine i boje

Agarozna boja s Gel Red-om (*Biotium*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Merck*), Gene ruler 1 kb gen ladder (*Thermo Scientific*).

3.1.5. Komercijalni kompleti

QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) za izolaciju plazmidne DNA iz bakterijskih stanica, QIAquick GelExtraction Kit (*Qiagen*) za pročišćavanje PCR produkata.

3.1.6. Ostali materijal

Centrikon *Amicon*® *Ultra centrifugal filters* (*Milipore*), filteri s promjerom pora 0,2 µm (*Whatman*), Ni²⁺-NTA agarozna (*Qiagen*)

3.1.7. Instrumenti

Autoklav (EPSA 2000, *Bari*), centrifuga Sigma 1-14 (*Sigma*), centrifuga Sigma 6K15 (*Sigma*), centrifuga Mini centrifuge M-6, (*Boeco Germany*), centrifuga (ThermoScientific SL16R Centrifuge, *Thermo Fischer Scientific*), elektroporator (MicroPulser, *Bio-Rad*), inkubator (DigitHeat, J.P. *Selecta*, S.A.), izvor napona za agaroznu elektroforezu (Electrophoresis power supply-EPS600, *Pharmacia Biotech*), izvor napona za SDS-PAGE elektroforezu (Mini PROTEAN TetraSystem, *Bio-Rad*), komplet za SDS-PAGE elektroforezu (Mini PROTEAN TetraSystem, *Bio-Rad*), PCR-uređaj (T100 Thermal Cycler, *Bio-Rad*), rotacijska platforma (OS-20 Orbital Shaker, *Biosan*), DNA120 SpeedVac (*Thermo Savant*), spektrofotometar (Evolution 60S UV-Vis Spectrophotometer, *Thermo Scientific*), spektrofotometar kratkog puta (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, *Thermo Fisher*), sonikator (VibraCell 50 Watt Model, *Bioblock Scientific*), termoblok (Thermo Mixer C, *Eppendorf*), termostatirana tresilica (MaxQ 420 HP, *Thermo Scientific*), Orbital shaker 420, (*Thermo Scientific*), transiluminator (*Bio imaging systems Ltd., Bis Pro*), vaga (Electronic Balance FA-200, *AND Company*).

3.1.8. Bakterijski sojevi i plazmidi

BL21 ($F^- ompT hsdS_B$ ($r_B^- m_B^-$) *gal dcm* (DE3); *Novagen*): laboratorijski soj koji je pogodan za prekomjernu ekspresiju gena. Transkripcija se inducira dodatkom IPTG-a. Soj je pogodan zato što ima mutacije u genima *lon* i *ompT* čime je spriječeno djelovanje proteaza i razgradnja proteina prilikom pročišćavanja.

X10 GOLD ($Tet^r \Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte$ [F' *proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r*): laboratorijski soj kompetentnih stanica stvoren za transformaciju velikih molekula DNA s velikom učinkovitošću. Fenotip *Hte* povećava učinkovitost transformacije ligiranih i velikih molekula DNA. Stanice su deficijentne u svim poznatim restriksijskim sustavima [$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$]. Soj je deficijentan u endonukleazi (*endA*) i restriksijski deficijentan (*recA*) čime se osigurava stabilnost umetnute DNA. Gen *lacIqZDM15* osigurava plavo-bijelu selekciju transformiranih stanica.

Tablica 3.1. Sojevi mikroorganizama korišteni u radu i medij pogodan za njihov uzgoj

mikroorganizam	Soj	medij za uzgoj
<i>Agrobacterium fabrum</i>	ATCC 33970 / C58	LB
<i>Bacillus thuringiensis</i>	BGSC 4cc1	LB
<i>Deinococcus radiodurans</i>	ATCC 13939 / DSM 20539 / JCM 16871 / NCIMB 9279	LB
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 47076 / MG 1655 / K12	LB
<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC 367 / JCM 1170	MRS
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 15307 / IFO 3333 / NCIB 9278 / NCTC 2665	LB
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 19420 / DSM 43756 / JCM 5866 / NCTC 8159	LB
<i>Paenibacillus curdlanolyticus</i>	DSM 10247 / IFO 15724 / NBRC 15724	LB
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525 / DSM 50090 / NCIB 9046 / NCTC 10038	MP
<i>Streptomyces griseus</i>	JCM 4626 / NBRC 13350	LB

3.1.9. Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterija

Tekući Luria-Bertani (LB) hranjivi medij: 10 g dm⁻³ tripton, 5 g dm⁻³ ekstrakt kvasca, 10 g dm⁻³ natrijev klorid (NaCl).

LB kruta hranjiva podloga (ploče): 10 g dm⁻³ tripton, 5 g dm⁻³ ekstrakt kvasca, 10 g dm⁻³ natrijev klorid (NaCl), 15 g dm⁻³ agar.

Minimalni hranjivi medij M9: 5 g dm⁻³ natrijev hidrogenfosfat (Na₂HPO₄), 3 g dm⁻³ kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄), 1 g dm⁻³ amonijev klorid (NH₄Cl), 0,5 g dm⁻³ natrijev klorid (NaCl), 0,001 % tiamin, 1 mmol dm⁻³ magnezijev sulfat (MgSO₄), 0,1 mmol dm⁻³ kalcijev klorid (CaCl₂), 0,5 % glukoza.

U ovom radu u minimalni medij je za potrebe istraživanja dodan i 0,1 mmol dm⁻³ izoleucin.

Hranjivi MP (Meat-Pepton) medij: 5 g dm⁻³ pepton, 3 g dm⁻³ ekstrakt mesa (engl. *meat extract*).

MRS hranjivi medij: 10 g dm⁻³ tripton, 10 g dm⁻³ ekstrakt mesa, 5 g dm⁻³ ekstrakt kvasca, 20 g dm⁻³ glukoza, 2 g dm⁻³ kalijev hidrogenfosfat (K₂HPO₄), 5 g dm⁻³ natrijev acetat (NaCH₃COO), 0,2 g dm⁻³ magnezijev sulfat heptahidrat (MgSO₄ × 7 H₂O).

Mediji su prije upotrebe sterilizirani autoklaviranjem na temperaturi od 120 °C i tlaku od 2,6 bar u trajanju od 20 minuta. U kruti hranjivi LB medij je nakon hlađenja dodan kanamicin do koncentracije 0,05 mg mL⁻¹ te je medij preliven u Petrijeve zdjelice i ostavljen radi skrućivanja u gel. Kruti medij pohranjuje se na +4 °C do upotrebe.

3.2. Metode

3.2.1. Metode rada s nukleinskim kiselinama

Metode rada s nukleinskim kiselinama kao što su izolacija genomske i plazmidne DNA, lančana reakcija polimerazom, agarozna gel-elektroforeza, transformacija bakterija i slično izvedene su prema opisu postupka u laboratorijskom priručniku J. Sambrook i D. Russell-a: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. izdanje, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) ili prema uputama proizvođača korištenih kompleta ili enzima.

3.2.1.1. Izolacija genomske DNA

5 mL bakterijske prekonoćne kulture uzgojene u odgovarajućem hranjivom mediju centrifugirano je 10 minuta na 5000 g te je supernatant odliven, a talog stanica je resuspendiran u 200 μL 10 \times TE pufera (100 mmol dm^{-3} Tris-HCl, 10 mmol dm^{-3} EDTA, pH=8,5). Na resuspendirani talog dodaju se staklene kuglice i 500 μL fenol-kloroforma te se smjesa vorteksira 4 minute. Smjesa se potom centrifugira 10 minuta na 5000 g i uzima se gornja, vodena faza u kojoj se nalaze nukleinske kiseline za daljnji rad. U fenolnoj fazi zaostaju hidrofobne molekule, proteini i lipidi. Na vodenu fazu dodaje se fenol-kloroform u volumenu koji odgovara volumenu dobivene vodene faze. Smjesa se ponovo vorteksira 4 minute i centrifugira 10 minuta na 5000 g. Na izdvojenu vodenu fazu dodaje se jednaki volumen izopropanola da bi se istaložile nukleinske kiseline i centrifugira se 20 minuta na 17 000 g. Dobiveni supernatant se odlije, a talog se posuši na SpeedVac-u. Posušeni talog se otopi u 100 μL 1 \times TE pufera te se oprezno dodaje RNaza A (50 $\mu\text{g/mL}$) i ostavi na sobnoj temperaturi 20 minuta. RNaza A se dodaje da bi se razgradile molekule RNA. Nakon toga ponovo se dodaje 100 μL fenol-kloroforma i centrifugira se 10 minuta na 5000 g kako bi se uklonila dodana RNaza. Na gornju, vodenu fazu se dodaje NaCl do koncentracije 0,3 mol dm^{-3} i MgCl_2 do koncentracije 0,01 mol dm^{-3} te 50 μL PEG 8000 do 10 % (w/v) te se ostavi na sobnoj temperaturi 10 minuta. PEG 8000 taloži nukleinske kiseline. Korišten je 10%-tni jer će se pri toj koncentraciji taložiti velike nukleinske kiseline dok male, pocijepane RNazom A ne bi trebale taložiti. Potom se uzorak centrifugira 10 minuta na max. g, supernatant se odlije, a talog se ispere s 50 μL hladnog 96 % etanola da bi se bolje osušio te se centrifugira 10 minuta na 13 000 g. Uzorak se potom posuši na SpeedVac-u i otopi u 100 μL 1 \times TE pufera. Izoliranoj genomskoj DNA provjeri se čistoća elektroforezom na agaroznom gelu i izmjeri se koncentracija na spektrofotometru kratkog puta koji mjeri koncentraciju nukleinskih kiselina mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 260 nm. Uzorci izoliranih genomskih DNA čuvaju se na -20°C .

3.2.1.2. Gel-elektroforeza na agaroznom gelu

Fenomen elektroforeze, kretanja nabijenih molekula u električnom polju, koristi se za odjeljivanje makromolekula. DNA je pri neutralnom pH negativno nabijena zbog postojanja fosfatnih skupina. Kretanjem u električnom polju kroz gel, molekule DNA se odvajaju na

temelju veličine. Male molekule DNA lako se kreću kroz pore gela pa putuju brže, dok velike molekule teže prolaze kroz pore i zaostaju na vrhu gela. Na brzinu kretanja DNA utječe i oblik molekule pa će se među molekulama DNA iste veličine najbrže kretati superzavijena molekula DNA, potom linearna, a najsporije se kreće relaksirana cirkularna molekula.

Za odvajanje DNA u ovom radu korišteni su 1 %-tni agarozni gelovi pripremljeni otapanjem 3 g agaroze do temperature vrenja u 300 mL TAE pufera (40 mmol dm⁻³ Tris, 20 mmol dm⁻³ octena kiselina, 1 mmol dm⁻³ EDTA, pH=8). Elektroforeza se provodi u TAE puferu u aparaturi za elektroforezu (Electrophoresis power supply-EPS600, *Pharmacia Biotech*). Uzorci koji se nanose na gel se prethodno pripreme tako da im se doda agarozna boja s Gel Red-om (2,5 % (w/v) bromfenolno plavilo, 0,01 mol dm⁻³ EDTA (pH=8,0), 3 % (v/v) glicerol, 2,5 % (w/v) ksilencijanól-fluorofosfat, Gel Red 100 × razrijeđen). Gel Red je boja koja se veže na nukleinske kiseline. Sastoji se od dvije molekule etidij-bromida premoštena preko kisika. Vezanjem na DNA, pod UV svjetlom fluorescirat će narančastom bojom i vizualizirati uzorak. Glicerol služi za lakše nanošenje uzorka na gel. Elektroforeza se provodi na sobnoj temperaturi pri 120 V kroz 30-40 minuta. Nakon završetka elektroforeze, gelovi se analiziraju snimanjem pod UV svjetlom ($\lambda=302$ nm) na transiluminatoru (*Bio imaging systems Ltd., Bis Pro*). Za procjenu veličine fragmenata koristi se marker molekulske mase Gene ruler 1 kb gen ladder (*Thermo Scientific*).



Slika 3.1. Marker veličine GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*). Marker veličine korišten je za procjenu veličine produkta dobivenih nakon PCR reakcije. Koristi se na 1 %-tnom agaroznom gelu. Preuzeto iz reference 32.

3.2.1.3. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je reakcija umnažanja specifičnog odsječka DNA *in vitro*, uz pomoć DNA-polimeraze i para početnica.

Za reakciju su također potrebni dNTP-ovi, DNA koja služi kao kalup, pufer za odgovarajuću DNA-polimerazu i Mg^{2+} . Uređaj u kojem se reakcija odvija omogućuje brze izmjene temperature koje su potrebne za uspješno provođenje reakcije. Reakcija se odvija u ciklusima od 3 koraka koji se ponavljaju: toplinska denaturacija lanaca DNA, prijanjanje početnica na komplementarne lance DNA kalupa te sinteza komplementarnih lanaca pomoću DNA-polimeraze.

PCR je korišten za umnažanje gena *ileS1* iz genomske DNA ciljnih mikroorganizama, te za provjeru ugradnje željenih gena u plazmide transformirane u X10 GOLD soj *E. coli* (PCR na kolonijama). Za umnažanje ciljnih gena prvo je izolirana genomska DNA (3.2.1.1.). Za reakciju je korištena *Phusion* DNA-polimeraza visoke vjernosti. Ova polimeraza sastoji se od domene za vezanje DNA spojene s polimerazom visoke vjernosti iz *Pyrococcus furiosus*. Korištena je zbog svoje visoke vjernosti i male pojavnosti grešaka. Kao početnice korištene su komercijalne početnice specifične za ciljni gen naručene od specijaliziranog proizvođača (*Macrogen*) dizajnirane na temelju poznatog nukleotidnog slijeda gena. Početnice su bile duge 27-33 nukleotida. Nakon otapanja u redestiliranoj vodi do koncentracije 100 mol dm^{-3} , čuvaju se na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Popis korištenih početnica s glavnim informacijama o njima dan je u tablici 3.2.

Tablica 3.2. Početnice korištene u lančanoj reakcije polimeraze

Naziv početnice	T_m /($^\circ\text{C}$)	GC%	Nukleotidni slijed (5'-3')
BtIleRS1_F	68,0	40,0	GAG AGAGCTAGCATGGAGTACAAAAATACA
BtIleRS1_R	65,3	27,27	GAGAGACTCGAGTATTTTACATAATTTTCTTT
LbIleRS_F	72,1	50,0	GAGAGAGCTAGCATGCGAGTAAAAGACACG
LbIleRS_R	69,4	43,33	GAGAGACTCGAGTTAGTTTTTCGTCAAATCC
PcIleRS_F	68,3	48,15	GAGAGACATATGCAACGCGTAGTAGTC
PcIleRS_R	67,6	41,38	GAGAGAGGATCCTTAATCGCGAATTTGAA
EcIleRS_F	68,3	38,7	GAGAGAGCATATGAGTGACTATAAATCAACC
EcIleRS_R	71,7	41,2	GAGAGAGAAGCTTTCAGGCAAACCTACGTTTTTC
T7P_F	54,3	40,0	TAATACGACTCACTATAGGG
T7T_R	57,3	52,6	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Reakcijska smjesa za PCR reakciju sadržavala je 200 ng genomske DNA, $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ svake od početnica, $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ svakog dNTP-a, $1 \times Phusion$ HF pufera (koji sadržava $1,5 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ MgCl}_2$) i *Phusion* DNA-polimerazu $0,02 \text{ U}/\mu\text{L}$. Reakcija se provodi u PCR uređaju (T100 Thermal Cycler, *Bio-Rad*) kroz 30 ciklusa denaturacije, sparivanja početnica i produljivanja lanaca. Temperature sparivanja početnica dane su u tablici 3.4. Nakon

provedene PCR reakcije, uspješnost reakcije provjerava se agaroznom gel-elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu na 120 V pri sobnoj temperaturi kroz približno 30 minuta.

Tablica 3.3. Uvjeti lančane reakcije polimerazom provedeni s *Phusion* DNA-polimerazom

	temperatura / °C	trajanje ciklusa / s	broj ciklusa
početna denaturacija	98	30	1
denaturacija	98	10	30
sparivanje početnica	T _a	30	30
produljenje	72	90	30
završno produljenje	72	600	1

Tablica 3.4. Temperature sparivanja početnica za gene iz različitih mikroorganizama

Mikroorganizam iz kojeg poječe gen	T _a / °C
<i>Bacillus thuringiensis</i> (gen <i>ileS1</i>)	56
<i>Lactobacillus brevis</i>	64
<i>Paenibacillus curdlanolyticus</i>	72
<i>Escherichia coli</i>	65

3.2.1.4. Izolacija PCR produkta iz gela ili otopine

Željeni PCR produkti mogu se pročistiti iz 1 %-tnog agaroznog gela ili iz otopine. Mala količina uzorka nakon PCR reakcije se nanosi na 1 %-tni agarozni gel kako bi se provjerila čistoća produkta. Ako se u PCR reakciji dobije samo specifični produkt, produkt se pročisti direktno iz otopine, a ako se u reakciji dobije, uz specifični produkt, i puno nespecifičnih produkata, sav produkt se nanosi na gel, te se izolira izrezivanjem i pročišćavanjem iz gela nakon elektroforeze. Gel se mora izrezati tako da se zahvati što manje nepotrebnog gela, tj. što manje praznog gela. Oba načina pročišćavanja provode se pomoću komercijalno dostupnog kompleta QIAquick GelExtraction Kit (*Qiagen*) za pročišćavanje PCR produkata prema zadanim protokolima.

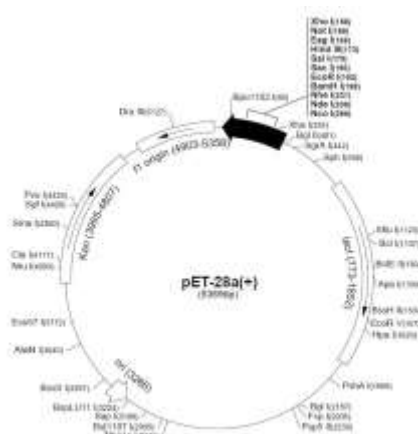
Izrezani gel se izvaže. Gelu se zatim dodaje 3 × veći volumen od mase (1 mg~1 μL) pufera QG (5,5 mol dm⁻³ gvanidinijev tiocijanat, 20 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH=6,6) koji služi za otapanje gela i koji u sebi sadrži pH indikator. Otopina mora biti žute boje. Smjesa se inkubira 10 minuta na 50°C uz protresanje od 300 rpm (engl. *revolutions per minute*). Nakon inkubacije na smjesu se doda jedan volumen izopropanola i promiješa se te se uzorak prebaci na kolonicu za ekstrakciju iz gela i centrifugira se 1 minutu na 13 000 rpm. Tekući dio koji je

prošao kroz kolonicu se baca, a na kolonicu se dodaje 500 μL QG pufera i opet se centrifugira 1 minutu na 13 000 rpm. Tekući dio se baca, a na kolonicu se dodaje 750 μL PE pufera (10 mmol dm^{-3} Tris-HCl, 80% EtOH, pH=7,5) za ispiranje. Centrifugira se 1 minutu na 13 000 rpm, baca se tekući dio, a kolonica se još jednom centrifugira 1 minutu na 13 000 rpm. Nakon toga kolonica se postavi u mikroeprevetu, doda se 30 μL EB (engl. *Elution Buffer*) pufera (10 mmol dm^{-3} Tris-HCl, pH=8,5) za eluciju, pričekava se minutu te se uzorak centrifugira 1 minutu na 13 000 rpm. Pročišćenom PCR produktu koji je prošao kroz kolonicu izmjeri se koncentracija na spektrofotometru kratkog puta.

Ako se PCR produkt izolira iz otopine, otopini koja sadrži željeni PCR produkt dodaje se $5 \times$ veći volumen PB pufera (5 mol dm^{-3} gvanidinijev HCl, 30 % izopropanol) koji omogućuje vezanje DNA, tj. PCR produkta na membranu kolone. Uzorak se prebaci u kolonicu i centrifugira se 1 minutu na 13 000 rpm. Tekući dio se baci, a na kolonicu se dodaje 750 μL PE pufera (10 mmol dm^{-3} Tris-HCl, 80% EtOH, pH=7,5) za ispiranje. Uzorak se centrifugira 1 minutu na 13 000 rpm. Tekući dio koji je prošao kroz kolonicu se baca, a kolonica se još jednom podvrgne centrifugiranju. Kolonica se prebaci u mikroeprevetu, dodaje se 30 μL EB pufera (10 mmol dm^{-3} Tris-HCl, pH=8,5) za eluciju, pričekava se minutu te se uzorak centrifugira 1 minutu na 13 000 rpm. Tekući dio sadrži željeni PCR produkt kojemu se izmjeri koncentracija.

3.2.1.5. Izolacija plazmida

Plazmidi su ekstrakromosomske molekule DNA koje se ponašaju kao dodatne genetičke jedinice koje se repliciraju i nasljeđuju neovisno o bakterijskom kromosomu. Plazmidni vektori imaju malu molekulsku masu, probirni biljeg i jedinstvena restrikcijska mjesta za velik broj restrikcijskih endonukleaza. Probirni biljeg omogućuje selekciju stanica domaćina koje su transformirane plazmidom. Pri radu je korišten sustav pET28b veličine 5368 parova baza (pb) (slika 3.2.). Sustav sadrži jedinstvena restrikcijska mjesta za velik broj restrikcijskih endonukleaza kako bi se omogućilo lakše povezivanje s raznolikim genima. U ovom radu kao probirni biljeg se koristi rezistencija na antibiotik kanamicin. Kanamicin je aminoglikozidni antibiotik koji inhibira biosintezu proteina tako da se veže na 30S podjedinicu ribosoma. Mehanizam otpornosti je takav da aminofosfotransferaza inaktivira kanamicin prebacujući γ -fosfat ATP-a na 3'-OH skupinu antibiotika. Time se sprječava vezanje kanamicina na ribosom.

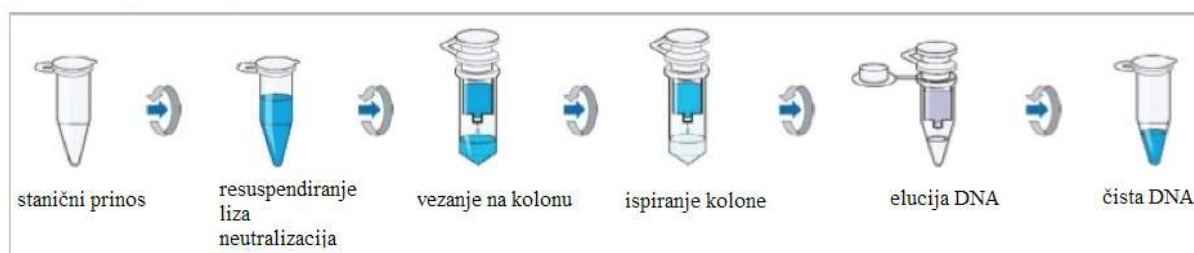


Slika 3.2. Plazmidni vektor pET28b.

Preuzeto iz <https://www.researchgate.net>

Za izolaciju plazmida potrebno je napraviti prekonocnu kulturu u LB mediju koja sadrži kanamicin (30 ng/mL). Prekonocna kultura se centrifugira 10 minuta na 5000 g. Supernatant se odlije, a plazmid se izolira iz taloga pomoću komercijalnog kompleta QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*). QIAprep miniprep koristi modificiranu verziju alkalne lize u kojoj se bakterije liziraju u alkalnim uvjetima, a lizat se naknadno neutralizira. Kod ove metode plazmidna DNA ostaje neoštećena, dok se genomska DNA razara, a proteini se denaturiraju. Uzorak se pročisti na silikatnoj membrani. Izolacija plazmida se provodi tako da se talog bakterijskih stanica resuspendira u 500 μ L pufera za resuspendiranje, P1 (50 mmol dm⁻³ Tris-Cl, pH=8,0, 10 mmol dm⁻³ EDTA, 100 μ g/mL RNaza A, pufer se čuva na 4 °C). Resuspendirani talog se prebaci u mikroeprevetu za centrifugiranje i doda se 500 μ L pufera P2 (200 mmol dm⁻³ NaOH, 1 % SDS (w/v)) koji se koristi za razaranje stanične membrane. Sadržaj se dobro promiješa 4-6 puta, te se smjesa ostavi na sobnoj temperaturi 5 minuta. Na to se još dodaje 700 μ L pufera N3 (4,2 mol dm⁻³ gvanidinij-HCl, 0,9 mol dm⁻³ natrijev-acetat, pH=4,8) koji služi za neutralizaciju, pri čemu se male nukleinske kiseline renaturiraju te se uzorak centrifugira 10 minuta na 13 000 rpm. Talog nakon centrifugiranja sadrži genomsku DNA koja se zbog svoje veličine nije mogla renaturirati prilikom neutralizacije otopine, proteine i lipide i nije potreban za daljnji rad. Supernatant, koji sadrži plazmidnu DNA i nečistoće, se prebaci u QIAprep spin kolonicu i centrifugira se 1 minutu na 13 000 rpm. Tekući dio koji prođe kroz kolonicu se baca, a na kolonicu se dodaje 500 μ L PB pufera (5 mol dm⁻³ gvanidinij-HCl, 30 % izopropanola) koji pospješuje učinkovito vezanje DNA na membranu spin kolone. Uzorak se centrifugira 1 minutu na 13 000 rpm, tekući dio se opet

baca, a na kolonicu se dodaje 750 μL pufera PE (10 mmol dm^{-3} Tris-HCl, 80 % etanola) koji služi za ispiranje, centrifugira se 1 minutu na 13 000 rpm, baca se tekući dio, ponovo se centrifugira 1 minutu na 13 000 rpm. Kolonica se potom prebaci u mikroepruvetu, na kolonicu se dodaje 30 μL EB elucijskog pufera (10 mmol dm^{-3} Tris-HCl, pH=8,5), pričekava se 1 minutu i nakon toga se uzorak centrifugira 1 minutu na 13 000 rpm. Tekući dio sadrži željeni plazmid, koncentracija plazmida izmjeri se na spektrofotometru kratkog puta.



Slika 3.3. Prikaz tijeka izolacije i pročišćavanja plazmidne DNA pomoću QIAprep Spin Miniprep Kit-a (Qiagen). Preuzeto i prilagođeno iz <https://Qiagen MiniPrep/svpticket2ana.wordpress.com>

3.2.1.6. Restriksijska razgradnja PCR produkata i plazmida

Kako bi se dobiveni PCR produkti mogli uspješno uklonirati, odnosno povezati s plazmidom, potrebno ih je pocijepati restriksijskim enzimima. Restriksijski enzimi su enzimi koji omogućuju razgradnju strane DNA u bakterijama. Oni prepoznaju specifični slijed DNA i na tom mjestu režu DNA stvarajući stršeće (2-4 nesparena nukleotida) ili tupe krajeve (nema nesparenih nukleotida). Ti enzimi iskorišteni su u genetičkom inženjerstvu kao molekulske „škare“. Restriksijska razgradnja provodi se s odgovarajućim restriksijskim enzimima i u odgovarajućem puferu. Plazmid i PCR-om umnoženi gen se pocijepaju istom kombinacijom restriksijskih enzima kako bi imali iste ljepljive krajeve koji će se povezati u reakciji ligacije. Restriksijskoj razgradnji podvrgnuta je ukupna količina PCR produkt pročišćenog iz gela ili otopine. Odgovarajući pufer dodan je do finalne koncentracije 1 \times , a restriksijski enzimi do koncentracije 20 U/ μL . Razgradnja se provodi inkubacijom na 37 $^{\circ}\text{C}$ kroz 4 sata. Nakon razgradnje, enzime je potrebno inaktivirati temperaturom. Vrijeme i temperatura inaktivacije razlikuju se u ovisnosti o korištenom enzimu te je inaktivacija provedena prema uputama proizvođača. Plazmid je potrebno nakon razgradnje defosforilirati kako bi se spriječilo zatvaranje samog plazmida bez ugrađenog inserta. Defosforilacija se provodi dodatkom CIP-a (engl. *calf intestine phosphatase*) u otopinu pocijepanog plazmida do finalne koncentracije 0,2

U/ μ L. Reakcija se provodi inkubacijom na 37 °C kroz sat vremena. Nakon razgradnje i defosforilacije plazmida, uzorci se prije ligacije pročiste kompletom QIAquick GelExtraction Kit (*Qiagen*) (3.2.1.4.). Podaci o korištenim enzimima i puferima za pojedine gene navedeni su u tablici 3.5.

Tablica 3.5. Restriksijski enzimi i odgovarajući puferi korišteni u razgradnji pojedinih gena

Gen	restriksijski enzimi / pufer	restriksijski enzim koji cijepa samo na jednom mjestu u genu / pufer
<i>B. thuringiensis ileSI</i>	NheI/XhoI / CutSmart	NcoI / CutSmart
<i>L. brevis ileSI</i>	NheI/XhoI / CutSmart	BglII / 3.1
<i>P. curdlanolyticus ileSI</i>	NdeI/BamHI / 2.1	KpnI / 1.1

3.2.1.7. Ligacija

Nakon izolacije i restriksijske razgradnje, željeni gen i plazmid, koji služi kao vektor, tj. prenositelj, se povezuju pomoću DNA-ligaze. Ligaza katalizira formiranje fosfodiesterске veze između terminalnih 5'-fosfatnih i 3'-hidroksilnih skupina u DNA.

Ligacijske smjese su pripravljene u masenom omjeru 5:1 u korist ciljanog gena. Smjesa sadrži 50 ng plazmida te 250 ng gena. Kao DNA-ligaza korištena je T4-DNA-ligaza izolirana iz stanica *E. coli* s ukloniranim genom 30 iz bakteriofaga T4. T4 DNA-ligaza zahtjeva ATP kao kofaktor. Koncentracija ligaze je 0,05 U/ μ L. Smjesa sadrži još i 1 \times T4 ligazni pufer (40 mmol dm⁻³ Tris-HCl, 10 mmol dm⁻³ MgCl₂, 10 mmol dm⁻³ DTT, 0,5 mmol dm⁻³ ATP, pH=7,8) te destiliranu vodu do ukupnog volumena 20 μ L. Ligacijska smjesa se inkubira preko noći na 16 °C, te se nakon toga ligaza toplinski inaktivira na 65 °C 10 minuta. Da bi transformacija bila što uspješnja, ligacijska smjesa se podvrgne sljedećem protokolu: na 5 μ L ligacijske smjese dodaje se 14 μ L ReH₂O, 1 μ L ukupne kvašćeve tRNA koncentracije 1 μ g/ μ L i 50 μ L hladnog 96 %-tnog etanola. Smjesa se ostavi 20 minuta na -20 °C te se potom nukleinske kiseline istalože centrifugiranjem na 14 000 g 10 minuta na 4 °C. Supernatant se odlije, a talog se ispere sa 70 μ L hladnog 96 %-tnog EtOH te se posuši na DNA120 SpeedVac-u. Talog se resuspendira u 1 μ L ReH₂O i podvrgne transformaciji elektroporacijom.³⁰

3.2.1.8. Kemijska transformacija

Transformacija je način unošenja DNA u bakterijsku stanicu. To je proces tijekom kojeg bakterijska stanica prima „čistu“ molekulu DNA. Može se provoditi kemijskim ili fizikalnim metodama. Za najučinkovitiju transformaciju koriste se bakterijske stanice u srednjem dijelu logaritamske faze raste, tj. $OD_{600} \sim 0,6$, koje su ranije pripremljene u laboratoriju.

Učinkovitost kemijske transformacije je 10^6 - 10^9 transformanata / μg DNA. Veličina unešene DNA može biti do 50 kb. Ne zna se točan mehanizam ulaska strane DNA u kompetentne stanice. Unos strane DNA potiče se kratkim toplinskim šokom koji najvjerojatnije destabilizira staničnu membranu.

Gen *ileS* iz *L. brevis* ukloniran je kemijskom metodom transformacije u kemijski kompetentne stanice *E. coli* soja X10 GOLD. Kemijska transformacija je provedena tako da je alikvot kompetentnih stanica, koji se čuva na $-80\text{ }^\circ\text{C}$, inkubiran na ledu 20 minuta. Nakon inkubacije, u alikvot se dodaje 1-5 μL ligacijske smjese, ovisno o koncentraciji, tako da sadrži 50 ng rekombinantne DNA, te se inkubira na ledu 30 minuta. U termobloku se potom napravi toplinski šok na $42\text{ }^\circ\text{C}$ kroz 45 sekundi. Bakterije su odmah potom stavljene na led na 2 minute nakon čega im se dodaje 450 μL toplog LB medija te ih se ostavi 1,5 h na $37\text{ }^\circ\text{C}$ da se oporave. Alikvot transformacijske smjese se razmaže na LB ploču koja sadrži antibiotik kanamicin i ostavi preko noći da se inkubira na $30\text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.1.9. Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom

Elektroporacija je fizikalna metoda transformacije bakterijskih stanica. Stanice se podvrgnu kratkom električnom šoku pomoću jakog električnog polja kroz nekoliko milisekundi. Na taj način se otvaraju privremene pore na membrani kroz koje onda ulaze molekule strane DNA. Ova metoda je brza i vrlo učinkovita, a za njezino provođenje potreban je uređaj elektroporator.

Elektroporacija se provodi tako da se na unaprijed pripremljene stanice *E. coli* soja X10 GOLD dodaje 1-3 μL ligacijske smjese. Stanice s ligacijskom smjesom se prebace u elektrokivetu, koja mora biti hladna jer uspješnost transformacije ovisi o temperaturi, te se smjesa podvrgne kratkom električnom šoku na elektroporatoru (MicroPulser, *Bio-Rad*). Postavke elektroporatora su: napon od 2500 V, kapacitet od 25 μF i otpor od 200 Ω . Odmah potom na stanice se dodaje 1 mL LB medija. Stanice se stave sat vremena na $37\text{ }^\circ\text{C}$ na

oporavljanje. Nakon toga se stanice razmažu na LB ploču koja sadrži antibiotik kanamicin i ostave se preko noći na 30 °C. Na ploči će narasti samo one bakterije koje su primile gen koji nosi otpornost na antibiotik dodan u ploču s hranjivim medijem koji služi kao probirni biljeg.

3.2.1.10. PCR na kolonijama

PCR na kolonijama (engl. *colony* PCR) omogućuje identifikaciju kolonija koje sadrže željeni plazmid. Nakon uspješne transformacije, na LB ploči koja sadrži antibiotik kanamicin, narastu bakterijske stanice koje su transformirane praznim plazmidom ili rekombinantnim plazmidom. Kako bi se detektirali rekombinanti plazmidi, provodi se probir naraslih kolonija PCR-om na kolonijama.

PCR na kolonijama razlikuje se od prije opisanog PCR-a u tome što se u ovoj reakciji kao kalup za PCR reakciju ne koristi genomska DNA, već se kao kalup uzima mala količina bakterijskih kolonija. PCR je proveden s T7 početnicama ili početnicama specifičnim za gen za koji se provjerava uspješnost kloniranja, čiji sljedovi su prikazani u tablici 3.2., a temperatura prijanjanja početnica bila je 48 °C. Smjesa za reakciju sadrži po 1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ svake od početnica, 0,2 mmol dm^{-3} dNTP-a, 2,5 mmol dm^{-3} MgCl_2 , *Taq* pufer do koncentracije $1 \times$ i 0,03 U/ μL *Taq* DNA-polimeraze. Rezultati PCR reakcije provjere se elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu. Od onih kolonija za koje je utvrđeno da sadrže rekombinantne plazmide, naprave se bakterijske prekonoćne kulture u LB mediju s kanamicinom i plazmid se izolira na opisani način (3.2.1.5.).

3.2.1.11. Restriksijska razgradnja rekombinantnog plazmida

Kao dodatna provjera uspješnosti kloniranja, rekombinantni plazmid izoliran iz prekonoćne kulture se podvrgne restriksijskoj razgradnji. Razgradnja se provodi s restriksijskim enzimima kojima je gen bio pocijepan prije ligacije (tablica 3.5) kako bi gen izrezali iz plazmida, te se razgradnja provodi s dodatnim enzimom koji cijepa gen samo jednom. Razgradnja se provodi na prethodno opisani način (3.2.1.6.). U tablici 3.5. navedeni su enzimi korišteni za cijepanje gena.

3.2.1.12. Sekvenciranje

Nakon provjere uspješnosti kloniranja putem PCR-a na kolonijama i restrikcijske razgradnje, uzorci su poslani na sekvenciranje kako bi se dobila najpouzdanija potvrda da je kloniranje uspješno provedeno. Uzorci su poslani na sekvenciranje u *Macrogen Europe Laboratory* u Nizozemskoj.

3.2.2. Metode rada s proteinima

Nakon kloniranja gena u plazmidni vektor pET28b, odabran je gen iz jednog organizma i prebačen je u pogodan bakterijski soj, te je eksprimirani protein pročišćen afinitetnom kromatografijom. Za ekspresiju *ileS* gena odabran je gen *ileS1* iz *B. thuringiensis*.

3.2.2.1. Poliakrilamidna gel-elektroforeza u denaturirajućim uvjetima

Poliakrilamidnom elektroforezom u prisutnosti SDS-a (natrijev dodecil-sulfat) proteini se razdvajaju na temelju mase. SDS je anionski detergent koji razara nekovalentne interakcije u nativnom proteinu, veže se stehiometrijski na protein te svi proteini imaju jednak omjer naboja i mase. Za redukciju disulfidnih veza dodaje se β -merkaptetanol. Kako se puno negativno nabijenog SDS-a veže na protein, prirodni naboj proteina postaje beznačajan te se proteini razdvajaju samo na temelju mase. Manji proteini brže se kreću kroz gel, dok veliki proteini zaostaju pri vrhu gela. Proteini se nakon elektroforeze vizualiziraju bojenjem bojom Coomassie Brilliant Blue R-250.

Poliakrilamidni gelovi se sastoje od povezanih akrilamidnih monomera. Akrilamidni lanci se međusobno povezuju dodatkom bisakrilamida tijekom polimerizacijske reakcije. Reakcija se odvija uz APS kao inicijator te TEMED kao katalizator. Polimerizacijom nastaje mrežasta struktura gela kroz koju se proteini različite veličine i strukture kreću različitom brzinom. Veličina pora koje nastaju u mrežastoj strukturi ovisi o koncentraciji akrilamida.

Postupak elektroforeze provodi se u uređaju PROTEAN TETRA (*Bio-Rad*). Gelovi su diskontinuirani, tj. sastoje se od 2 gela; donji gel za razdvajanje (9 % akrilamid-bisakrilamid (29:1), 0,375 mol dm⁻³ Tris-HCl pH=8,8, 0,1 % (v/w) SDS, 0,7 μ g mL⁻¹ APS, 0,05 % TEMED) te gornji gel za sabijanje (4 % akrilamid-bisakrilamid (29:1), 0,125 mol dm⁻³ Tris-HCl pH=6,8, 0,1 % (v/w) SDS, 0,7 μ g mL⁻¹ APS, 0,05 % TEMED). Prvo se izlije gel za

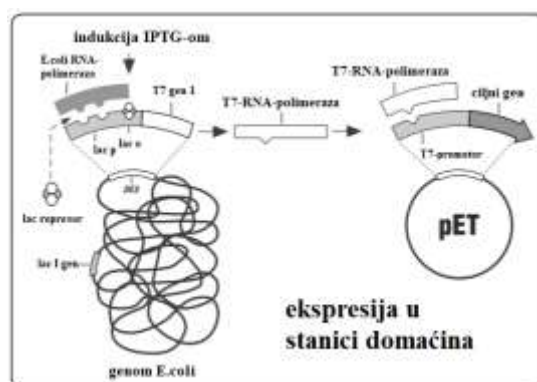
razdvajanje (~3/4 visine gela) te se nalije sloj vode kako bi se gel poravnao i spriječio doticaj atmosferskog kisika, koji inhibira polimerizaciju, s gelom. Nakon pola sata ukloni se sloj vode te se izlije gel za sabijanje i stavi se češljic za formiranje jažica.

Način vizualizacije razdvojenih proteina je čvrsto vezanje boje Coomassie Blue za proteine. Prije nego se proteini mogu bojati, moraju se fiksirati za matricu gela i mora se ukloniti sloj SDS-a. To se postiže namakanjem gela u octenoj kiselini za fiksiranje proteina te u izopropanolu da bi se uklonio SDS. U ovom radu, fiksacija, uklanjanje SDS-a i bojanje provedeni su u jednom koraku. Nakon bojanja, sljedeći korak je odbojavanje kako bi proteinske vrpce bile vidljive u odnosu na čistu pozadinu gela. Odbojavanje je provedeno u vrućoj vodi.

Uzorci prije nanošenja moraju se pripremiti tako da im se dodaje pufer za nanošenje (62,5 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH=6,8, 12,5 mmol dm⁻³ β-merkaptEtOH, 6,25 (v/v) glicerol, 1,25 % (w/v) SDS, 0,002 % bromfenolno plavilo) te se zagriju u vrućoj vodi 5 minuta radi denaturacije. Elektroforeza se provodi u puferu pH=8,3 (14,4 g dm⁻³ glicin, 3,03 g dm⁻³ Tris, 0,1 % (w/v) SDS) na sobnoj temperaturi. Prvih 15 minuta elektroforeza se provodi pri 120 V kako bi se uzorci sabili, a potom se idućih 45 minuta elektroforeza provodi pri 180V. Kako bi se uzorci na gelu vizualizirali, gel se inkubira 20 minuta u otopini boje Coomassie Brilliant Blue R-250 (2,5 g dm⁻³ boja, 10 % octena kiselina, 45 % EtOH). Višak vezane boje uklanja se u vrućoj vodi kroz ~5 minuta.

3.2.2.2. Prekomjerna ekspresija izoleucil-tRNA-sintetaze I iz *Bacillus thuringiensis*

Za prekomjernu ekspresiju proteina koristi se sustav pET koji je utemeljen na T7 sustavu. U genomu soja BL21 nalazi se gen za T7-RNA-polimerazu koji je pod kontrolom *lac*-promotora i *lac*-operatora. *Lac*-promotor prepoznaje bakterijska RNA-polimeraza. Prije nego se potakne ekspresija, na *lac*-operatoru je vezan represor koji spriječava ekspresiju T7-RNA-polimeraze. Dodatak IPTG-a dovodi do uklanjanja represora i transkribira se T7-RNA-polimeraza. U vektoru pET je insert za ciljni gen ugrađen između T7-promotora i T7-terminatora transkripcije. Nakon što se dodatkom IPTG-a transkribira velika količina T7-RNA-polimeraze, ona prepoznaje specifično T7-promotor i prekomjerno se eksprimira ciljni protein.



Slika 3.4. Shematski prikaz sustava T7. Dodatak IPTG-a inducira ekspresiju T7-RNA-polimeraze, a time i transkripciju sljedova pod kontrolom T7 promotora. Preuzeto i prilagođeno iz reference 36.

Prekonoćna bakterijska kultura u LB mediju s kanamicinom napravi se iz rekombinantnih kolonija *E. coli* soja BL21. Pretkultura raste preko noći u tresilici na 37 °C. Rekombinantne bakterije sadrže pET28b BtlleRS1. Prekonoćnom kulturom (5 mL) inokulira se 0,5 L LB medija koji sadrži 500 µL kanamicina. Prati se rast pomoću spektrofotometra pri 600 nm (OD_{600}). Kad se dosegne OD_{600} 0,5-0,8 ekspresija se inducira dodatkom 0,25 mmol dm⁻³ IPTG-a (125 µL 1 mol dm⁻³ IPTG). Prije indukcije uzima se alikvot stanica od 50 µL i od 100 µL te se centrifugiraju 2 minute na 10 000 g, odsisa se supernatant, a talog se sprema na -20 °C. Nakon indukcije nastavlja se rast još 2 sata na 37 °C. Nakon 2 h, stanice se istalože centrifugiranjem 15 minuta na 5 000 g. Prije taloženja uzimaju se 2 alikvota od 50 i 100 µL, centrifugiraju se 2 minute na 5 000 g, odsisa se supernatant, a talog se sprema na -20°C. Stanični talog iz 0,5 L se ispere puferom A (20 mmol dm⁻³ HEPES pH= 7,0, 500 mmol dm⁻³ NaCl, 5 mmol dm⁻³ MgCl₂, 10 mmol dm⁻³ imidazol, 0,1 mmol dm⁻³ PMSF, 5 mmol dm⁻³ β-merkaptotanol), odsiše se supernatant, te se talog spremi na -20 °C.

3.2.2.3. Liza bakterijskih stanica

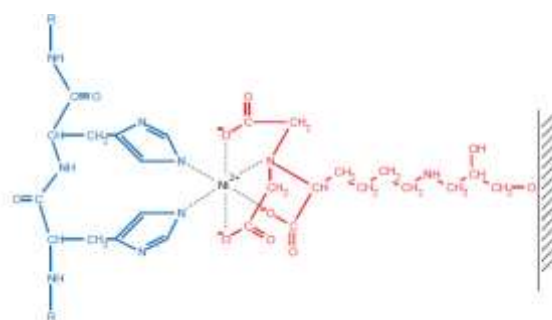
Kako bi se pripremio uzorak za afinitetnu kromatografiju, talog stanica dobiven centrifugiranjem nakon uzgoja resuspendira se u 5 mL pufera A za pročišćavanje afinitetnom kromatografijom (20 mmol dm⁻³ HEPES pH= 7,0, 500 mmol dm⁻³ NaCl, 5 mmol dm⁻³ MgCl₂, 10 mmol dm⁻³ imidazol, 0,1 mmol dm⁻³ PMSF, 5 mmol dm⁻³ β-merkaptotanol). U uzorak se dodaje 4 µL lizozima i 13 µL DNaze I. Lizozim se dodaje jer on hidrolizira peptidoglikan koji

gradi bakterijsku staničnu stjenku, a DNaza I razgrađuje dvolančanu DNA. Liza stanica provodi se sonikacijom u 6 ciklusa po 1 minutu s 1 minutom pauze između svake sonikacije. Sonikacija se provodi na ledu zbog jakog zagrijavanja uzorka kao posljedica soniciranja. Veći dijelovi stanica talože se centrifugiranjem 1 h na 10 000 g. Citosolni proteini nalaze se u bistrim supernatantu, koji se profiltrira pomoću Whatman sterilnog filtera s veličinom pora 0,22 μm .

3.2.2.4. Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija je način pročišćavanja proteina. Koristi se za pročišćavanje proteina koji se specifično vežu na određene kemijske spojeve koji su kovalentno vezani na kromatografsku kolonu. Nakon što se smjesa proteina propusti kroz kolonu, nevezani proteini se ispiru odgovarajućim puferima. Vezani, ciljni, protein se eluira velikom koncentracijom topljivog oblika kemijskog spoja vezanog na kolonu ili promjenom uvjeta koji smanjuju afinitet vezanja na kolonu.

Ni^{2+} -NTA afinitetnom kromatografijom mogu se pročistiti fuzijski proteini koji imaju histidinski privjesak. To su proteini koji se sastoje od ciljanog proteina i afinitetnog privjeska koji je egzogeni slijed aminokiselina, 6 histidina, koji se vežu na Ni^{2+} ione imobilizirane na kolonu pomoću nitrilotrioctene kiseline (NTA). NTA okupira 4 od 6 koordinacijskih mjesta Ni^{2+} iona, a preostala 2 mjesta su slobodna i dostupna za vezanje s proteinom. Fuzijski protein eluira se s imidazolom.



Slika 3.5. Interakcija Ni^{2+} -NTA s 2 imidazolna prstena na kromatografskoj koloni

Preuzeto iz www.researchgate.net

Za pročišćavanje BtlleRS1 potrebni su puferi koji imaju osnovni sastav 20 mmol dm^{-3} HEPES pH=7,0, 500 mmol dm^{-3} NaCl, 5 mmol dm^{-3} MgCl_2 i 5 mmol dm^{-3} β -merkaptioetanol, a razlikuju se samo po koncentraciji imidazola. Niskim koncentracijama imidazola prvo se

isperu nevezani proteini i oni koji se na kolonu vežu manjim afinitetom, a na kraju se ciljani protein eluira visokom koncentracijom imidazola. S proteinima je potrebno rukovati na 4 °C pa se postupak pročišćavanja provodi u ledenici. Prvo je potrebno pripremiti kolonu za afinitetnu kromatografiju. Kolona se prvo ispire s 10 mL sterilne ReH₂O, potom se uravnoteži s 10 mL pufera A (osnovni sastav + 10 mmol dm⁻³ imidazol + 0,1 mmol dm⁻³ PMSF,). PMSF je ireverzibilni inhibitor serinskih proteaza te je bitan jer sprječava potencijalnu razgradnju ciljnog proteina. Nakon uravnoteživanja kolone puferom A nanosi se uzorak koji sadrži smjesu proteina propuštanjem cijelog volumena 3 puta kroz kolonu kako bi se što više ciljnog proteina vezalo. Kolona se zatim ispire s 30 mL pufera A, te s 10 mL pufera B (osnovni sastav + 20 mmol dm⁻³ imidazol). Kolona se nakon toga ispire s 10 mL pufera C (osnovni sastav + 30 mmol dm⁻³ imidazol), te se na kraju željeni protein eluira puferom D (osnovni sastav + 200 mmol dm⁻³ imidazol) u ukupnom volumenu 6 mL. Kolona se potom ispire s 2 mol dm⁻³ imidazolom kako bi se uklonili eventualno zaostali proteini na koloni te kako bi se kolona mogla opet koristiti. Nakon toga kolona se ispire još i s 30 mL ReH₂O te s 10 mL 20 % EtOH te se ostavi u 20 % EtOH u ledenici na 4 °C. Sakupljene frakcije provjeravaju se SDS poliakrilamidnom gel-elektroforezom (3.2.2.2.)

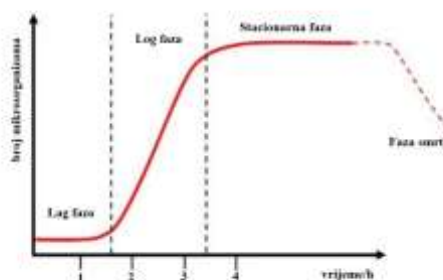
3.2.3. Metode rada s bakterijama

Prilikom rada s bakterijama mjerene su krivulje rasta bakterija te je određivana minimalna inhibitorna koncentracija mupirocina za bakterijske vrste u bogatom hranjivom mediju te u minimalnom mediju M9 kojemu je dodan izoleucin u koncentraciji 0,1 mmol dm⁻³.

3.2.3.1. Mjerenje krivulja rasta bakterija

Krivulja rasta bakterija je grafički prikaz rasta bakterijske populacije tijekom vremena. Broj stanica, koji se izražava na y osi, se izražava parametrom OD₆₀₀ (engl. *optical density*). Optička gustoća stanica pri 600 nm je proporcionalna broju bakterijskih stanica. Krivulja je podijeljena na nekoliko faza, a to su lag faza, log faza, stacionarna faza i faza smrti. U lag fazi stanice se još nisu počele intenzivno dijeliti, bakterije se adaptiraju na medij i uvjete inkubacije. Prilikom log faze, tj. eksponencijalne faze rasta, broj stanica povećava se eksponencijalno. U stacionarnoj fazi stanice se prestaju intenzivno dijeliti zbog smanjene količine nutrijenata i akumulacije toksičnih produkata. U ovoj fazi brzina rasta jednaka je

brzini odumiranja stanica. Nakon toga nastupa faza smrti. Zbog istrošenosti svih nutrijenata i nakupljanja velikih količina toksičnih metaboličkih nusprodukata stanice odumiru. Primjer krivulje rasta bakterija prikazan je na slici 3.6.



Slika 3.6. Prikaz krivulje rasta bakterija. Na slici su vidljive faze bakterijskog rasta, lag, log faza, stacionarna faza i faza smrti. Preuzeto i prilagođeno iz reference 37.

U radu je praćen utjecaj antibiotika mupirocina na krivulju rasta bakterija. Za mjerenje krivulja rasta priređene su bakterijske prekonoćne kulture u odgovarajućem hranjivom mediju. Kulture su rasle na 30 °C uz 250 rpm. Kulture su razrijeđene 100 ×, te su im dodane različite koncentracije antibiotika mupirocina. Kulture su rasle na 30 °C i 250 rpm te im je svakih sat vremena praćen rast. Rast se prati mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm na spektrofotometru (Evolution 60S UV-Vis Spectrophotometer, *Thermo Scientific*), u kivetama debljine 1 cm. Rad s bakterijama izvodi se u sterilnoj okolini u laminaru. Mjerenja su prvo provedena na manjoj skali i na manje pouzdanom uređaju, a tek onda na većoj skali. Prilikom mjerenja na većoj skali, u sterilnoj okolini svakih sat vremena uzeo se alikvot bakterijske kulture kojemu je mjerena optička gustoća, a ostatak kulture je ostavljen da raste. Sva mjerenja ponovljena su više puta.

3.2.3.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije mupirocina

Minimalna inhibitorna koncentracija (engl. *minimal inhibitory concentration*, MIC) je minimalna koncentracija inhibitora koja inhibira vizualni rast bakterijskih stanica. Vrijednost MIC-a se koristi za određivanje osjetljivosti bakterija na lijekove i za procjenu aktivnosti novih, antimikrobnih sredstava.³⁸

U radu je određivana MIC za antibiotik mupirocin. MIC je određen za 9 mikroorganizama.

Za određivanje MIC-a nasadi se bakterijska prekonoćna kultura (na 30 °C uz 250 rpm) mikroorganizma za koji se želi odrediti MIC u odgovarajućem hranjivom mediju (tablica 3.1.) i u minimalnom hranjivom mediju M9 s dodatkom izoleucina. Prethodno je mupirocin pripremljen otapanjem u Tris-HCl (1 mol dm⁻³, pH=8,0) te steriliziran filtriranjem. U novi tekući medij doda se željena koncentracija pripremljenog antibiotika. Napravi se 5 serijskih razrijeđenja u omjeru 1:1. U pripremljene razrijeđene medije s antibiotikom dodaje se prekonoćna kultura razrijeđena 100 ×. Pripremljene kulture se ostave preko noći (ili duže u slučaju određivanja MIC-a u minimalnom hranjivom mediju kojemu je dodan izoleucin) na 30 °C i 250 rpm te se odredi MIC tako da se vizualno procijeni koje kulture su narasle (zamućeni medij), a koje su ostale bistre, tj. bakterije nisu narasle. Najmanja koncentracija na kojoj nema vidljivog rasta bakterija je MIC. Sva mjerenja ponovljena su 3 puta.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je uklonirati gene za izoleucil-tRNA-sintetazu iz odabranih mikroorganizama u plazmidni vektor pET28b te transformirati pogodan soj *E. coli* rekombinantnim plazmidom kako bi se ti geni mogli eksprimirati i koristiti u daljnjem tijeku istraživanja. Također, za odabane mikroorganizme mjerene su krivulje rasta u bogatom hranjivom mediju te je određena vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije mupirocina u bogatom i u minimalnom hranjivom mediju.

Za istraživanje je odabrano 10 različitih mikroorganizama koji posjeduju IleRS1, IleRS2 ili oba tipa IleRS-a. U tablici 4.1. nabrojani su mikroorganizmi koji su korišteni u istraživanju te su navedeni tipovi IleRS-a koji posjeduju.

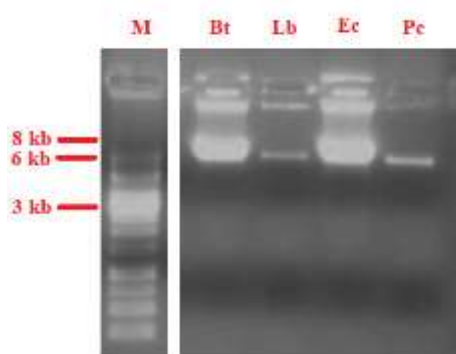
Tablica 4.1. Mikroorganizmi korišteni u istraživanju i tip IleRS-a koji posjeduje pojedini mikroorganizam

mikroorganizam	IleRS1	IleRS2
<i>Agrobacterium fabrum</i>	+	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+
<i>Deinococcus radiodurans</i>		+
<i>Escherichia coli</i>	+	
<i>Lactobacillus brevis</i>	+	
<i>Micrococcus luteus</i>		+
<i>Mycobacterium smegmatis</i>		+
<i>Paenibacillus curdlanolyticus</i>	+	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	
<i>Streptomyces griseus</i>		+

U tablici su navedeni svi mikroorganizmi s kojima se radilo u ovom istraživanju, bilo u radu s nukleinskim kiselinama, proteinima ili bakterijama. Plus označava onaj tip IleRS koji mikroorganizam posjeduje, a crveno su označeni plusevi IleRS-a čiji geni su odabrani za kloniranje u plazmidni vektor pET28b.

4.1. Kloniranje gena

Najčešća upotreba PCR reakcije je selektivna amplifikacija specifične regije iz složene molekule kalupa, najčešće genomske DNA. U ovom radu PCR je bio upotrijebljen za tu istu svrhu, regija koja predstavlja gen *ileS* iz genomske DNA se amplificirala kako bi se taj gen mogao uklonirati u plazmidni vektor pET28b. Genomske DNA su izolirane na opisani način (3.2.1.1.), a na slici 4.1. prikazane su genomske DNA iz 4 različita mikroorganizma nakon što su podvrgnute agaroznoj elektroforezi.



Slika 4.1. Na slici su prikazane genomske DNA izolirane iz *B. thuringiensis* (Bt), *L. brevis* (Lb), *E. coli* (Ec) i *P. curdlanolyticus* (Pc). Genomske DNA su čiste te njihova veličina odgovara očekivanoj. Genomske DNA dobivene su u različitim prinosima.

4.1.1. Dizajn početnica

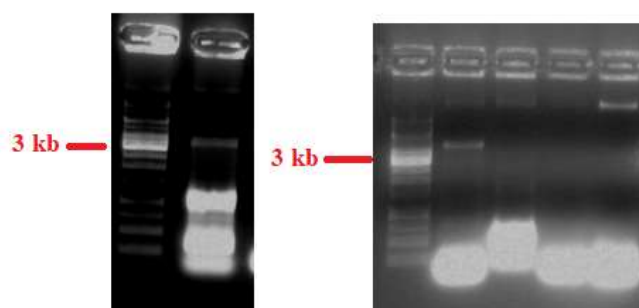
Specifičnost amplifikacije u PCR reakciji ovisi o dizajnu početnica, te o samoj regiji s kojima se početnice sparuju. Najčešće se dizajniraju početnice koje sadrže 20-24 nukleotida jer je ta duljina obično dovoljno selektivna da prepozna specifični, ciljani, segment u genomskoj DNA. Ipak, dulje početnice i viša temperatura sljepljivanja (T_a) mogu učiniti PCR amplifikaciju još selektivnijom.³⁹ Početnice su dizajnirane na temelju nukleotidnog slijeda gena *ileS* koji se želi amplificirati. Nukleotidne sekvence gena izvučene su iz baze podataka National Center for Biotechnology Information, NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Početnice su također dizajnirane tako da sadrže mjesta koja prepoznaju željene restriksijske endonukleaze kako bi se PCR produkt mogao restriksijski razgraditi i povezati u reakciji ligacije s plazmidnim vektorom pET28b koji je prethodno pocijepan istom kombinacijom restriksijskih enzima. U tablici 4.2. prikazani su NCBI identifikatorski brojevi genoma i položaji na kojima se nalaze geni prema kojima su dizajnirane početnice.

Tablica 4.2. Mikroorganizmi te NCBI brojevi njihovih genoma u bazi NCBI te područje na kojem se nalaze geni u genomu

mikroorganizam	gen	NCBI broj	pozicija gena
<i>Agrobacterium fabrum</i>	<i>ileS1</i>	NC_003062.2	680863-683766
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>ileS1</i>	NC_005957.1	3738244-3735479
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>ileS2</i>	NC_005957.1	2076881-2079982
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>ileS2</i>	NC_001263.1	1342495-1339259
<i>Escherichia coli</i>	<i>ileS1</i>	NC_000913.3	22391-25207
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>ileS1</i>	NC_008497.1	1415201-1412388
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>ileS2</i>	NC_012803.1	1080493-1083909
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>ileS2</i>	NC_008596.1	3243269-3246391
<i>Paenibacillus curdlanolyticus</i>	<i>ileS1</i>	NZ_AEDD01000001.1	375603-378698
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>ileS1</i>	NC_016830.1	5843604-5840773
<i>Streptomyces griseus</i>	<i>ileS2</i>	NC_010572.1	6385980-6382837

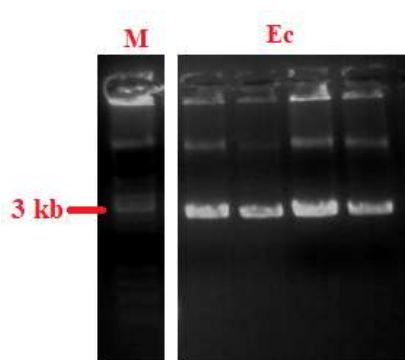
4.1.2. Optimiranje PCR reakcije

Za uspješno kloniranje gena, prvi korak je umnažanje ciljnog gena pomoću PCR reakcije. Nakon uspješne izolacije genomske DNA (3.2.1.1.) i dizajniranja početnica (4.1.1.), daljnji korak bio je optimiranje PCR reakcije kako bi se dobio što čišći produkt i u što većem prinosu. PCR reakcija je prvotno provedena pomoću *Taq* DNA-polimeraze koja je najpoznatija termostabilna DNA-polimeraza. Osim reakcijskog pufera, za ispravan rad polimeraze bilo je potrebno dodati i Mg^{2+} ion koji služi kao kofaktor DNA-polimerazi i koji stvara kompleks s dNTP-ovima. Da bi se reakcija optimirala, koristile su se različite koncentracije genomske DNA, te različite temperature sljepljivanja. Kao temperatura sljepljivanja prvo se uzimalo $T_m - 5$ °C za svaki par početnica, a PCR je proveden i s temperaturama višim od $T_m - 5$ °C. Viša temperatura sljepljivanja smanjuje mogućnost pogrešnog sljepljivanja početnica na kalup, a to u prvih nekoliko ciklusa pomaže povećanju specifičnosti. Ostali parametri poput količine dNTP-ova i koncentracije magnezijevih iona korišteni su prema uputama proizvođača *Taq* DNA-polimeraze.



Slika 4.2. Primjer rezultata PCR reakcije provedene s *Taq* DNA-polimerazom. Na markeru je označena pruga koja predstavlja veličinu od 3 kb što je očekivana veličina produkta. Vidljivo je da produkt nije dobiven ili da je dobiven u jako malom prinosu i s puno nespecifičnih produkata te je daljnji korak prelazak na high fidelity polimerazu.

Na slici 4.2. su rezultati PCR reakcije provedene s uzorcima raznih genomskih DNA s *Taq* DNA-polimerazom u različitim koncentracijama genomske DNA. Rezultati s *Taq* DNA-polimerazom nisu bili zadovoljavajući pa je idući korak bio prelazak na high fidelity DNA-polimerazu. PCR je dalje proveden s *Phusion* DNA-polimerazom. *Phusion* DNA-polimeraza je odabrana zbog svoje visoke vjernosti i male pojavnosti pogreške. Ta polimeraza dolazi s dva različita pufera, GC pufer koji je pogodan za reakcije s početnicama koje su bogate GC parovima baza, te HF pufer koji osigurava višu vjernost. Uvjeti reakcije su bili podešeni kako je predloženo od komercijalnog proizvođača *Phusion* DNA-polimeraze (*Thermo Scientific*). Reakcija je provedena i s GC i s HF puferom te je utvrđeno da najbolje rezultate daje *Phusion* DNA-polimeraza u kombinaciji s HF puferom. Nakon što je reakcija optimirana, s uvjetima koji su se pokazali najpovoljniji (opisano u poglavlju 3.2.1.3.), krenulo se u preparativni PCR. Primjer uspješno provedene PCR reakcije s *Phusion* DNA-polimerazom prikazan je na slici 4.3.

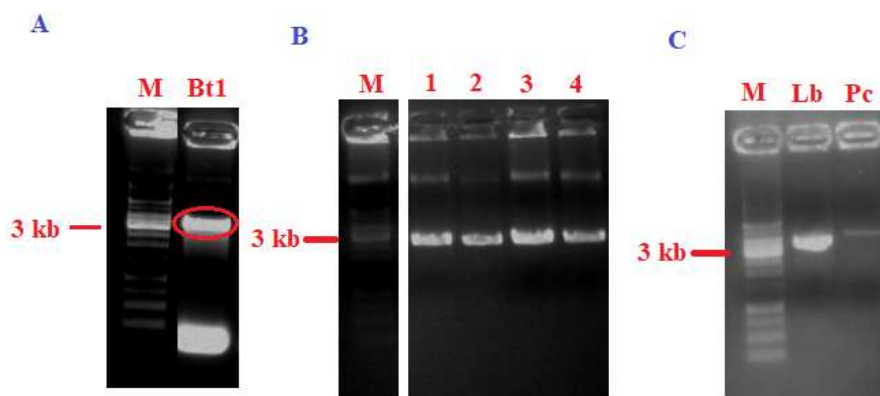


Slika 4.3. PCR reakcija s *Phusion* DNA-polimerazom nakon optimiranja uvjeta reakcije provedena za umnažanje *ileS1* iz *E. coli*. U prvoj koloni nalazi se marker molekulske mase GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*) (**M**) na kojemu je označena pruga koja odgovara veličini 3 kb, što je očekivana veličina produkta. Vidljivo je da su dobiveni čisti produkti odgovarajuće veličine i u dobrom prinosu (označeni s **Ec**).

4.1.3. Preparativni PCR

PCR reakcija s optimiranim uvjetima provedena je preparativno u volumenu od 100 μL , ali zbog ravnomjernog zagrijavanja i hlađenja reakcijske smjese nije povećavan volumen već broj tubica te je reakcija provedena u 4 tubice po 25 μL reakcijske smjese.

Rezultati PCR reakcije provedene s *Phusion* DNA-polimerazom provjereni su agaroznom gel elektrforezom (3.2.1.2). Kao marker veličine korišten je GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*). Rezultati se nalaze na slici 4.4.



Slika 4.4. Slika 1 %-tnih agaroznih gelova nakon provedene elektroforeze (120 V, 30 min). Prvi uzorak označen s **M** predstavlja marker veličine GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*) u sva tri dijela slike. Također, na markeru je označena pruga koja odgovara veličini od 3 kb. Reakcije su u svim slučajevima provedene s *Phusion* DNA-polimerazom. U **A** dijelu slike nalazi se gel na kojemu je uzorak nakon PCR reakcije s genomskom DNA iz *B. thuringiensis*, na **B** dijelu slike nalazi se gel s 4 uzorka koji svi predstavljaju rezultate PCR-a s genomskom DNA iz *E. coli* kao kalupom. Na **C** dijelu slike je gel koji sadrži produkte reakcije s genomskom DNA iz *L. brevis* (označeno s **Lb**) te genomskom DNA iz *P. curdlanolyticus* (označeno kao **Pc**).

Nakon provedene PCR reakcije s *Phusion* DNA-polimerazom (3.2.1.3.), u kojoj je kao kalup služila genomaska DNA izolirana iz *B. thuringiensis* (3.2.1.1.), a kao početnice komercijalne početnice navedene u tablici 3.2., rezultati reakcije provjereni su elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu na 120 V kroz 30 minuta. Reakcija je dala zadovoljavajuće i očekivane rezultate. Kao što je vidljivo na slici 4.4. **A**, uzorak nakon PCR reakcije označen s **Bt1** je dao 3 pruge na agaroznom gelu. Prva, najviša pruga predstavlja najveći fragment DNA jer se u agaroznom gelu najsporije kreću najveće molekule DNA. Taj fragment predstavlja genomsku DNA. Zaokružena pruga predstavlja produkt očekivane veličine, tj. najvjerojatnije umnoženi gen *ileS1*. Produkt je dobiven u velikom prinosu. Treća najniža pruga na gelu predstavlja nespecifični produkt i taj produkt je primer dimer (PD), tj. dimer početnica. Početnice hibridiziraju međusobno zbog niza komplementarnih baza te nastaje PD. Kako se početnice sastoje od nekoliko desetaka nukleotida, male su veličine pa će i njihovi dimeri biti mali te će se najbrže kretati kroz agarozni gel i najdalje će stići baš kao što je i slučaj na slici 4.4. **A**. Stvaranje PD potencijalno inhibira stvaranje specifičnog PCR produkta jer dolazi do kompeticije za reagense između specifičnog produkta i PD.

Uzorak koji sadrži umnoženi gen *ileSI* pročišćen je iz gela kao što je opisano u poglavlju 3.2. Metode (podpoglavljje 3.2.1.4.) te je do daljnje upotrebe pohranjen na -20 °C.

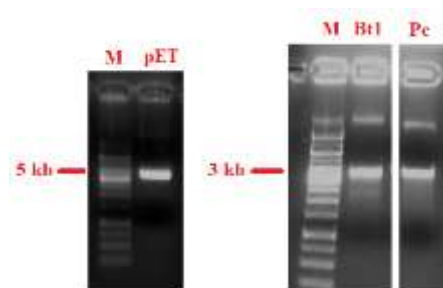
Preparativni PCR za umnažanje gena *ileSI* iz genomske DNA *E. coli* je proveden u 4 reakcijske smjese po 25 µL. Reakcije se odvijala kako je opisano u poglavlju 3.2.1.3. Nakon završetka reakcije, a prije nego su reakcijske smjese pomiješane, iz svake smjese je uzeto po 1 µL uzorka i stavljen je, zajedno s agaroznom bojom s Gel Red-om, na 1 %-tni agarozni gel. Nakon elektroforeze, utvrđeno je da je u svim reakcijskim smjesama nastao produkt koji veličinom od ~ 3 kb odgovara željenom produktu, genu *ileSI* iz *E. coli*, te da nema sporednih produkata. Dobiveni produkti vidljivi su na slici 4.4. B, oznake 1-4. U svim reakcijskim smjesama dobiven je samo jedan produkt te je smjese moguće pomiješati i zajedno pročistiti iz otopine (3.2.1.4.). Pruge vidljive u sva 4 uzorka koje se nalaze na samom vrhu gela odgovaraju genomskoj DNA. Rezultati ove reakcije predstavljaju idealan rezultat jer je željeni produkt dobiven u velikom prinosu (vidljivo prema debljini pruge na agaroznom gelu), te je iznimno čist bez bilo kakvih sporednih produkata PCR reakcije. Pročišćeni uzorci se čuvaju na -20 °C.

Preparativni PCR proveden u svrhu umnažanja gena *ileSI* iz genomske DNA *L. brevis* te gena *ileSI* iz genomske DNA *P. curdlanolyticus* proveden je na opisani način (3.2.1.3.). Rezultati reakcije vizualizirani su agaroznom gel-elektroforezom. Na slici 4.4.C prikazani su dobiveni produkti. Na gelu je vidljivo da su dobiveni produkti PCR reakcije s *Phusion* DNA-polimerazom očekivane veličine, tj. veličina produkata je ~3 kb te se time pretpostavlja da su umnoženi geni *ileSI* iz genomske DNA *L. brevis* (na slici označeno s **Lb**) i *P. curdlanolyticus* (na slici označeno s **Pc**). Dobiveni produkti su čisti te ih je moguće pročistiti iz otopine. Također, sa slike je vidljivo kako je gen za IleRS iz *L. brevis* (**Lb**) dobiven u puno većem prinosu od gena umnoženog iz genomske DNA *P. curdlanolyticus* (**Pc**).

4.1.4. Restriksijska razgradnja i ligacija

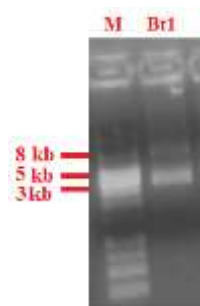
Nakon što su izolirani PCR produkti za koje se pretpostavlja da predstavljaju gene za IleRS iz odabranih mikroorganizama, te nakon što je izoliran plazmidni vektor pET28b, idući korak je restriksijska razgradnja inserta i plazmida istom kombinacijom restriksijskih enzima te ligacija. Restriksijske endonukleaze su enzimi koji cijepaju DNA molekulu. Restriksijske endonukleaze tipa II kakve se najčešće koriste u genskoj manipulaciji prepoznaju specifične, kratke, palindromske sljedove DNA te cijepaju DNA na tom mjestu. U radu su korišteni

enzimi koji stvaraju stršće krajeve (nespareni nukleotidi na krajevima). Kada se insert i vektor pocijepaju istom kombinacijom restriksijskih enzima, nastaju isti ljepljivi krajevi koje u idućem koraku kloniranja može povezati DNA-ligaza u rekombinantnu molekulu DNA.



Slika 4.5. Rezultat agarozne elektroforeze praznog plazmidnog vektora pET28b (NheI/XhoI) (pET na slici) te 2 uzorka, gen *ileS1* iz *B. thuringiensis* (Bt) (NheI/XhoI) i *ileS1* iz *P. curdlanolitycus* (Pc) (BamHI/NdeI) nakon restriksijske razgradnje. Marker molekulske mase GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*) označen je s M.

Jedan od najvažnijih koraka u kloniranju je povezivanje molekula DNA iz različitih izvora u rekombinantnu molekulu. DNA-ligaza je enzim koji spaja krajeve DNA stvarajući fosfodiesterske veze između 5'-fosfata jednog lanca i 3'-hidroksilne grupe na kraju drugog lanca. Prilikom reakcije ligacije, cilj je stvoriti rekombinantnu molekulu u kojoj svaki plazmidni vektor sadrži po jedan insert DNA. Kako plazmid i fragmenti DNA sadrže iste krajeve dobivene pomoću restriksijskih endonukleaza, moguće je dobiti više različitih produkata. Npr, moguće je dobiti produkte kao što su: jedan insert i jedan plazmidni vektor, više inserta i jedan vektor, više povezanih vektora, vektor koji se zatvorio bez inserta. Uspješnost ligacije ovisi o koncentracijama vektora i inserta.⁴¹ Ligaza koja se najčešće koristi i koja je korištena u ovom radu je T4-DNA-ligaza iz bakteriofaga T4.



Slika 4.6. Na slici je marker veličine GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*) (M) s oznakama koje odgovaraju veličini od 8, 5 i 3 kb. Također, na slici je uzorak nakon ligacije *ileS1* iz *B. thuringiensis* i pET28b.

Na slici 4.6. prikazan je uzorak koji potencijalno sadrži rekombinantni plazmid gena *ileSI* iz *B. thuringiensis* i pET28b. Vidljivo je da je dobiven produkt koji veličinom odgovara rekombinantnom plazmidu, to je pruga na 8 kb, te je dobivena pruga na 5 kb koja odgovara praznom plazmidnom vektoru pET28b.

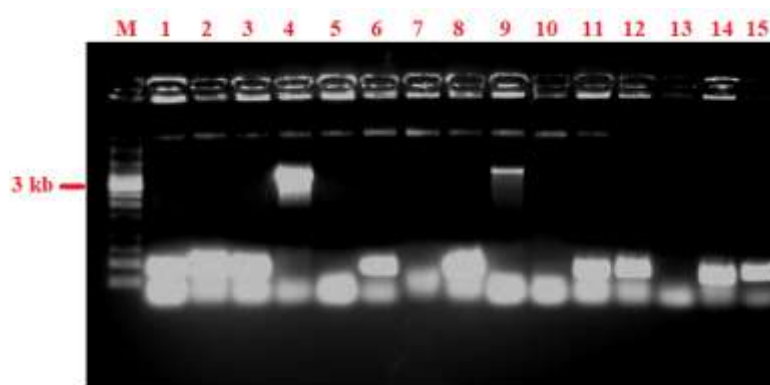
4.1.5. Identifikacija transformiranih bakterijskih kolonija

Transformacija je proces prilikom kojeg kompetentne bakterijske stanice primaju molekulu strane DNA. U radu je kao pogodni soj korišten soj *E. coli* X10 GOLD. Samo mali dio bakterijskih stanica će primiti stranu molekulu DNA. Kako bi se probrale samo transformirane bakterije, plazmidni vektor u sebi nosi gen za otpornost na određeni antibiotik. Korištena je otpornost na antibiotik kanamicin. Kako bi se gen za otpornost na antibiotik eksprimirao, stanice se nakon transformacije kratko oporavljaju u bogatom LB hranjivom mediju. Nakon toga stanice se nasađuju na LB ploču koja sadrži antibiotik kanamicin kako bi narasle samo transformirane stanice.

Transformirane stanice narasle na ploči provjeravaju se PCR-om na kolonijama, te se, od kolonija za koje se utvrdi da sadrže odgovarajući rekombinantni plazmid, izolira plazmid i podvrgne dodatnim provjerama restrikcijskom razgradnjom i sekvenciranjem kako bi se sa sigurnošću moglo utvrditi da je kloniranje bilo uspješno. PCR na kolonijama se većinom provodio s T7P_F i T7T_R početnicama, a ne s početnicama specifičnim za pojedini gen jer one mogu dati lažni pozitivan rezultat. T7 početnice sparuju se s regijama na plazmidu, pa nije moguća nespecifična amplifikacija genomskih regija. U nekim slučajevima se PCR na kolonijama ipak provodi s početnicama za ciljani gen.

Nakon transformacije (3.2.1.8. i 3.2.1.9.), na LB pločama koje sadrže antibiotik kanamicin narasle su bakterijske kolonije. Kako otpornost na antibiotik nosi plazmidni vektor pET28b, na ploči mogu narasti kolonije koje su transformirane praznim plazmidom ili bakterije koje su primile rekombinantni plazmid. Za identifikaciju rekombinantnih plazmida korišten je PCR na kolonijama koji je proveden s *Taq* DNA-polimerazom kako je opisano u poglavlju 3.2.1.10. Iz kolonija za koje je utvrđeno da sadrže rekombinantne plazmide, napravljene su prekonoćne kulture u LB mediju s kanamicinom te je rekombinantni plazmid izoliran na opisani način (3.2.1.5.).

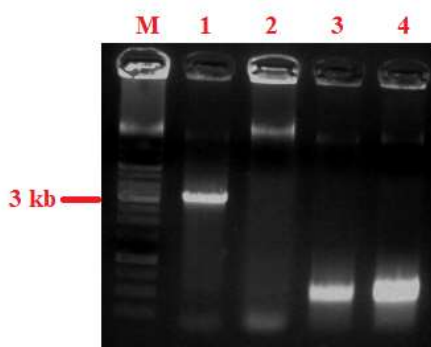
Transformacija bakterijskih stanica *E. coli* soja X10 GOLD genom *ileS1* iz *B. thuringiensis* bila je provedena fizikalnom metodom transformacije-elektroporacijom (3.2.1.9.). Na LB ploči koja sadrži kanamicin i na kojoj je razmazan alikvot transformiranih bakterijskih stanica, nakon inkubacije na 30°C kroz ~16 sati, narasle su kolonije. Na kolonijama je napravljen PCR na kolonijama. Rezultati su bili sljedeći.



Slika 4.7. Agarozni gel s rezultatima PCR-a na kolonijama. Uzorak označen s **M** je marker veličine GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*), oznaka 3 kb predstavlja veličinu očekivanog produkta, tj. gena *ileS1* koji je ugrađen u rekombinantni plazmid.

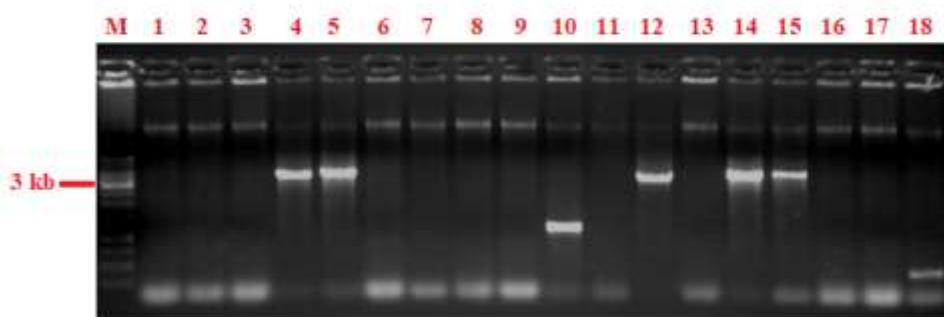
Na slici 4.7. vidljivo je da je od 15 nasumično odabranih kolonija dobiveno 2 pozitivna, tj. uzorci označeni s **4** i **9** sadrže umnoženi gen odgovarajuće veličine. Iz tih kolonija napravljene su prekonoćne kulture u LB mediju s kanamicinom te je rekombinantni plazmid izoliran na opisani način (3.2.1.5.). U uzorcima **4** i **9** uz željeni produkt dobiveni su i PD kao nespecifični produkti reakcije, dok u ostalim uzorcima koji sadrže 2 pruge pri dnu gela, može se pretpostaviti da niža pruga odgovara PD, a viša pruga je rezultat umnažanja dijela praznog pET vektora koji se nalazi između T7 promotora i T7 terminatora transkripcije na koji se vežu T7 početnice i umnažaju tu regiju koja je prikazana na slici 4.8. Od prikazanih uzoraka, samo uzorak 13 izgleda kao da nema nikakvog produkta, dok u ostalim uzorcima postoje produkti.

Rekombinantni plazmid s insertom gena *ileS1* iz *L. brevis* unesen je u X10 GOLD kompetentne stanice *E. coli* kemijskom metodom transformacije. Na LB ploči s kanamicinom narasle su samo 4 kolonije, a jedna od njih je, nakon PCR reakcije na kolonijama s *Taq* DNA-polimerazom te početnicama za gen *ileS1*, dala produkt koji veličinom potvrđuje da je došlo do ugradnje inserta gena *ileS1* u plazmidni vektor. Rezultati su vidljivi na slici 4.10.



Slika 4.10. Agarozni gel s uzorcima nakon *colony* PCR-a. Na gelu se nalazi marker veličine GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*) (M) s oznakom veličine od 3 kb, te produkti PCR reakcije provedene s *Taq* DNA-polimerazom na kolonijama.

Gen *ileS1* iz *P. curdlanolyticus* ukloniran je u plazmid i unesen u X10 GOLD kompetentne stanice elektroporacijom. Na LB ploči s kanamicinom naraslo je puno kolonija, od provjerenih kolonija dobiveno je 5 koje upućuju da su kolonije transformirane rekombinantnim plazmidom. Rezultati PCR-a na kolonijama su prikazani na slici 4.11.



Slika 4.11. Agarozni gel s uzorcima nakon PCR reakcije na kolonijama. M predstavlja marker veličine GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*) s oznakom očekivane veličine produkata, veličine od 3 kb

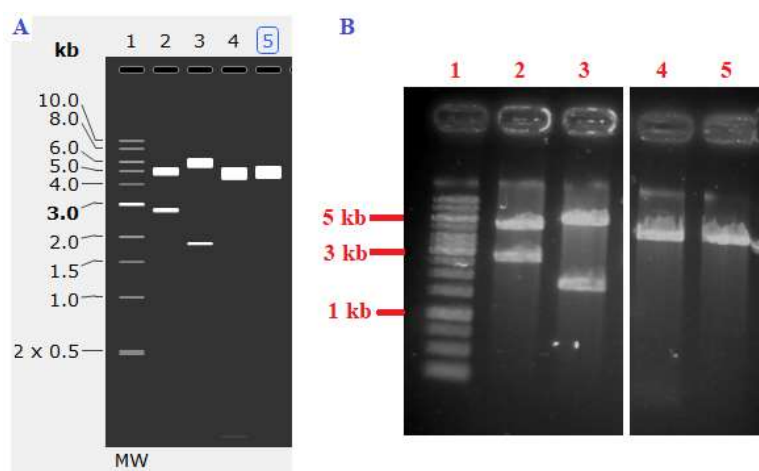
PCR na kolonijama proveden je s *Taq* DNA-polimerazom te s početnicama specifičnim za gen *ileS1* iz *P. curdlanolyticus*. Od nasumično odabranih kolonija, 5 kolonija dalo je produkte

s veličinom 3 kb što odgovara veličini inserta, to su uzorci označeni s 4, 5, 12, 14 i 15 na slici 4.11. Uzorak označen s 10 i 18 predstavlja koloniju u koju se ugradio neki manji, neželjeni insert. To je posljedica ligacije neželjenog inserta s plazmidnim vektorom pET28b. U svim uzorcima vidljivi su dimeri početnica. Iz uzoraka za koje se smatra da su pozitivni izoliran je rekombinantni plazmid iz prekonocnih kultura.

4.1.6. Restriksijska razgradnja rekombinantnih plazmida

Nakon što su pomoću PCR-a na kolonijama identificirane one kolonije koje potencijalno sadrže rekombinantni plazmid s insertom odgovarajuće veličine, za dodatnu potvrdu koristi se restriksijska razgradnja plazmida. Odgovarajući rekombinantni plazmid mora imati mjesta koja prepoznaju restriksijske endonukleaze korištene prilikom kloniranja. Kao dodatna provjera, odabere se još jedan restriksijski enzim koji jednom cijepa gen *ileS*. Ti restriksijski enzimi su odabrani jer korištenjem iste kombinacije restriksijskih enzima kao i prilikom kloniranja, insert koji sadrži gen bi se trebao izrezati van iz plazmida te bi se trebale dobiti 2 pruge na agaroznom gelu nakon razgradnje i elektroforeze. Veća pruga trebala bi odgovarati praznom plazmidnom vektoru, a manja insertu, tj., ukloniranom genu *ileS*. Odabir restriksijskog enzima koji cijepa na jednom mjestu u insertu načinjen je pomoću alata NEBcloner od proizvođača koji proizvodi korištene restriksijske enzime (<https://nebcloner.neb.com>). Provjera restriksijskom razgradnjom napravljena je na uzorcima koji potencijalno sadrže uklonirani gen *ileS1* iz *B. thuringiensis*, *L. brevis* i *P. curdlanolyticusa*. Restriksijska razgradnja provedene je kako je opisano u poglavlju 3.2.1.6., enzimi korišteni za pojedine plazmide nalaze se u tablici 3.5. Kako bi se dobio ispravan uvid u to kako treba izgledati agarozni gel nakon elektroforeze uzoraka koji su podvrgnuti restriksijskoj razgradnji korištena je aplikacija SnapGene[®].⁴⁴ Aplikacija daje uvid u to koja je veličina fragmenata dobivenih restriksijskom razgradnjom odabranim enzimima ako je naš uzorak željeni rekombinantni plazmid.

Restriksijska razgradnja prvo je napravljena na plazmidu koji potencijalno sadrži insert gena *ileS1* iz *B. thuringiensis*. Nakon restriksijske razgradnje provedena je agarozna gel-elektroforeza kako bi se rezultati vizualizirali. Rezultati su bili sljedeći.

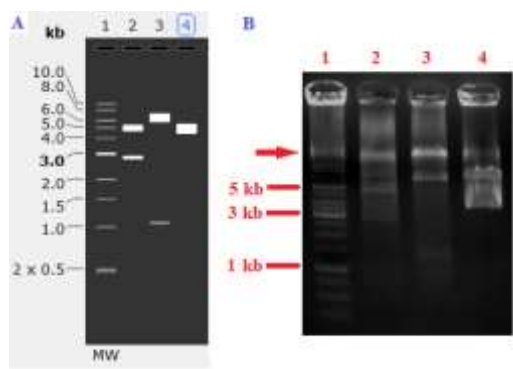


Slika 4.12. A dio slike je prikaz agaroznog gela napravljen pomoću simulacije u aplikaciji SnapGene®, tj. prikaz gela kako bi trebao izgledati nakon što se rekombinantni plazmid *ileS1* iz *B. thuringiensis* + pET28b ili prazan plazmid pocijepaju odabranim kombinacijama restriksijskih enzima, dok je B dio slike gel s uzorcima podvrgnutim restriksijskoj razgradnji. Na oba gela redosljed je jednak, tj. oznaka 1 je marker veličine GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*), 2 je rekombinantni plazmid pocijepan s restriksijskim enzimima NheI i XhoI, 3 je rekombinantni plazmid pocijepan s NcoI. Oznaka 4 je prazni plazmidni vektor pocijepan s NheI i XhoI, te 5 također prazan plazmid pocijepan s NcoI.

Rekombinantni plazmidi, koji potencijalno sadrže insert *ileS1* iz *B. thuringiensis*, nakon restriksijske razgradnje prikazani su na slici 4.12.B. Uzorak označen s 2 pocijepan je kombinacijom restriksijskih enzima NheI i XhoI. Ta kombinacija bila je korištena i prilikom kloniranja inserta u plazmidni vektor pa je nakon razgradnje dobiven fragment koji odgovara praznom plazmidu približne veličine 5 kb, te fragment koji odgovara insertu. Insert ima veličinu ~ 3 kb te to upućuje da se u plazmid ugradio gen odgovarajuće veličine. Uzorak označen s 3 je rekombinantni plazmid pocijepan s enzimom NcoI. U ovom uzorku također su dobivene dvije pruge no različite veličine od onih u slučaju 2. To je zato jer enzim cijepa na 2 različita mjesta u rekombinantnom plazmidu te su dobiveni fragmenti drugačije veličine. Očekivane veličine fragmenata su ~6,3 kb te 1,7 kb. Uzorci 4 i 5 predstavljaju prazan plazmidni vektor pocijepan enzimima NheI i XhoI, odnosno NcoI. U oba slučaja vidljiva je po jedna pruga koja predstavlja linearizirani plazmid. Pruga je malo ispod oznake 5 kb što je očekivana veličina tog uzorka. Budući da su dobiveni rezultati u dobroj korelaciji sa simuliranim podacima prikazanim na A dijelu slike 4.12., tj. fragmenti imaju očekivane

veličine, može se reći da i ovaj test upućuje na to da je došlo do ugradnje gena *ileS1* iz *B. thuringiensis* u pET28b.

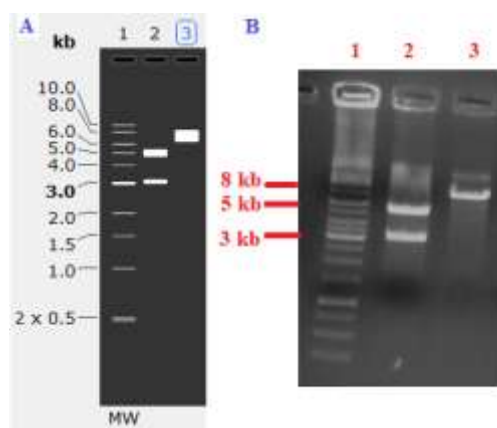
Sljedeća je bila provjera rekombinantnog plazmida koji potencijalno sadrži fragment gena *ileS1* iz *L. brevis*.



Slika 4.13. A dio slike je simulacija gela s rekombinantnim plazmidom *ileS1* iz *L. brevis* + pET28b ili prazan pET28b pocijepan s odabranim restriksijskim enzimima. B dio slike predstavlja gel nakon restriksijske razgradnje. Na oba dijela slike oznaka **1** je marker veličine GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*), **2** je rekombinantni plazmid pocijepan s enzimima NheI i XhoI, **3** je rekombinantni plazmid pocijepan s enzimom BglII, dok je **4** prazan plazmid pocijepan s BglII.

Uzorak **2** na slici 4.13.B predstavlja rekombinantni plazmid pocijepan s kombinacijom restriksijskih enzima korištenih u kloniranju, NheI i XhoI. Cijepanjem se insert izreže, na gelu su prisutne 2 pruge. Gornja pruga trebala bi predstavljati prazan plazmid, a druga pruga u izrezani insert gena *ileS1* iz *L. brevis*. Fragmenti su veličine 5, odnosno 3 kb. Uzorak **3** je uzorak rekombinantnog plazmida koji je pocijepan restriksijskim enzimom BglII. Očekivane veličine fragmenata su 7 kb i 1 kb. Na gelu su opet vidljive 2 pruge koje veličinom fragmenata potvrđuju ugradnju gena u plazmid. Uzorak **4** predstavlja prazni plazmid pocijepan s enzimom BglII. Enzim cijepa plazmid jednom. Na gelu je dosta nejasna, razmazana pruga koja djeluje kao da se dio plazmida razgradio i linearizirao, a dio ostao nepocijepan. Kako A dio slike predstavlja kako bi gel trebao izgledati u slučaju rekombinantnog plazmida, rezultati na B dijelu slike su u dobroj korelaciji, fragmenti su odgovarajuće veličine. Najviša pruga u svim uzorcima ovdje predstavlja onečišćenje pufera u kojem je provedena elektroforeza (označeno crvenom strelicom).

Uspješnost kloniranja provjerena je restrikcijskom razgradnjom i na uzorku koji potencijalno sadrži insert gena *ileS1* iz *P. curdlanolyticus*.



Slika 4.14. A dio slike je simulacija gela s rekombinantnim plazmidom *ileS1* iz *P. curdlanolyticus* + pET28b pocijepanim enzimima NdeI i BamHI te KpnI. Na B dijelu slike je gel dobiven razgradnjom rekombinantnog plazmida istim restrikcijskim enzimima kao i u simulaciji. U oba dijela slike 1 predstavlja marker veličine GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*), 2 je rekombinantni plazmid pocijepan s NdeI i BamHI, a 3 je rekombinantni plazmid pocijepan s enzimom KpnI.

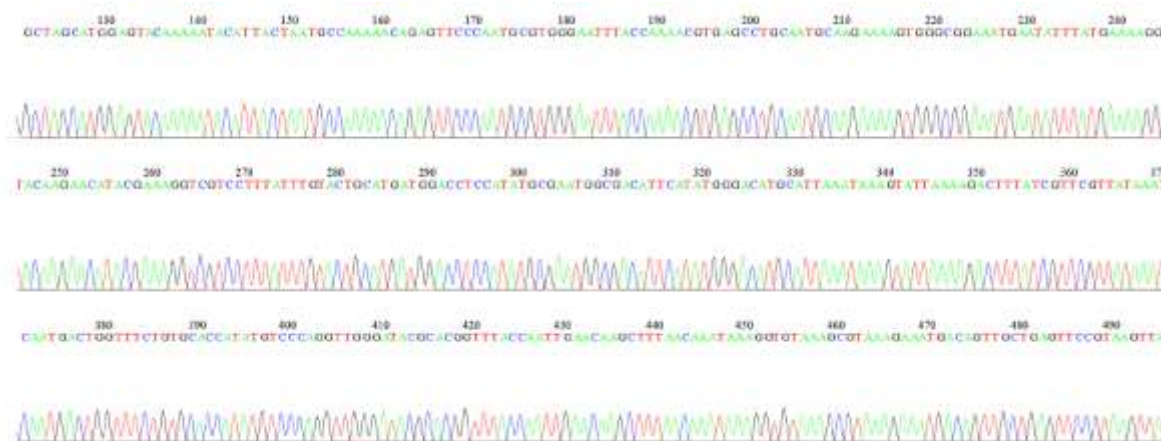
Restrikcijska razgradnja uzorka koji potencijalno sadrže insert gena *ileS1* iz *P. curdlanolyticus* dala je rezultate koji su prikazani na slici 4.14. A dio slike predstavlja kako treba izgledati gel ako je došlo do ugradnje inserta gena u pET28b. Prema markeru veličine su vidljive veličine fragmenata dobivene nakon cijepanja restrikcijskim enzimima. Uzorak 2 predstavlja rekombinantni plazmid pocijepan s NdeI i BamHI. Dobivene veličine fragmenata vidljive na B dijelu slike se poklapaju s očekivanim veličinama, pruga na 5 kb je prazan plazmid, dok pruga veličine 3 kb predstavlja izrezani insert. Uzorak označen s 3 je rekombinantni plazmid pocijepan s enzimom KpnI. Taj enzim cijepa samo na jednom mjestu unutar inserta te samo linearizira cijeli rekombinantni vektor pa je na gelu dobivena samo jedna pruga. I u ovom slučaju su teorijska i eksperimentalna pruga jednake veličine, tj. 8 kb što odgovara veličini rekombinantnog plazmida. Restrikcijska razgradnja je u ovom slučaju pokazala da je najvjerojatnije ugrađeni insert upravo *ileS* gen iz *P. curdlanolyticus*.

4.1.7. Sekvenciranje gena

Nakon što su rezultati PCR-a na kolonijama i restrikcijske razgradnje rekombinantnih plazmida upućivali na uspješnost kloniranja, treća, najpouzdanija metoda za provjeru uspješnosti kloniranja je sekvenciranje. Uzorci koji sadrže rekombinantni plazmid poslani su

na sekvenciranje u *Macrogen Europe Laboratory* u Nizozemskoj. Rezultati sekvenciranja prikazani su u nastavku.

Bacillus thuringiensis, ileS1



Slika 4.15. Dio kromatograma sekvenciranja dobiven nakon sekvenciranja rekombinantnog plazmida koji sadrži insert gena *ileS1* iz *B. thuringiensis*, pETBtlleRS1.

Na kromatogramu na slici 4.15. vidljivi su pikovi koji predstavljaju nukleotide. Zelena boja predstavlja adenin, plava citozin, crna gvanin te crvena timin. Pikovi su pravilni i dobrog intenziteta što govori o uspješnosti provedenog sekvenciranja. Pikovi su dobiveni tako što su u sekvenciranju korišteni fluorescentno obilježeni dideoksi analozi nukleotida. Obilježeni su različitim fluorescentnim bojama. Kako sinteza lanca napreduje, na mjestu gdje se ugradi dideoksi analog, sinteza se zaustavlja, a prema fluorescentnoj boji poznat je nukleotid koji je zadnji ugrađen. Iako su suvremene metode sekvenciranja brže i pouzdanije od metoda sekvenciranja prve generacije, još uvijek je ograničena duljina fragmenta koji se može sekvencirati.

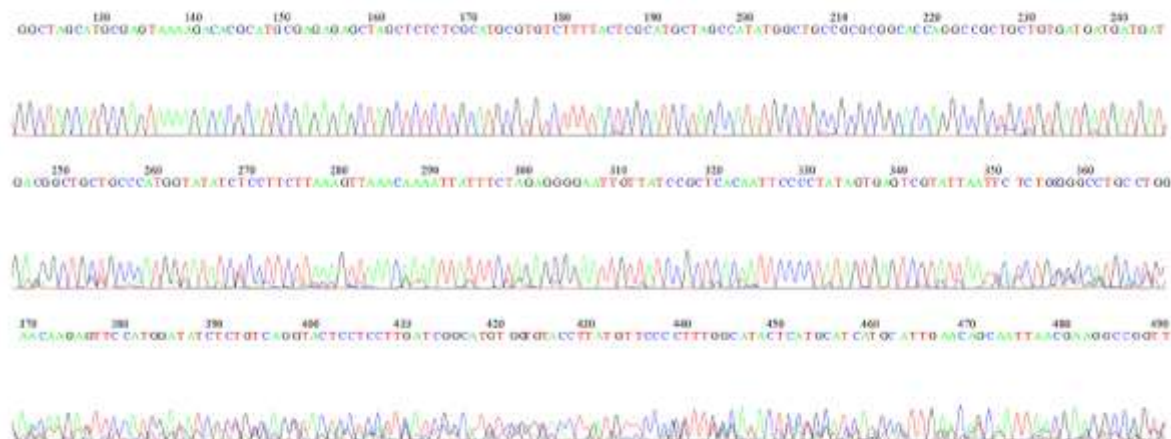
Sekvenca dobivena nakon sekvenciranja uzorka uspoređena je sa sekvencom gena iz baze NCBI. Usporedba je rađena pomoću alata BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). U početnom dijelu sekvence, prvih 800 nukleotida, sekvenciranje je još uvijek pouzdano i u tom dijelu pikovi su pravilni i preklapanje sekvence nakon sekvenciranja i sekvence iz baze je potpuno. Time je potvrđeno da je gen *ileS1* iz *B. thuringiensis* uspješno ukloniran u plazmidni vektor. Uspoređene sekvence prikazane su ispod, pri čemu sekvenca označena s Query predstavlja sekvencu dobivenu nakon sekvenciranja, a Sbjct sekvencu iz baze NCBI.

Query	125	AGCATGGAGTACAAAAATACATTACTAATGCCAAAAACAGAGTTCCCAATGCGTGGGAAT	184
Sbjct	1020415	AGCATGGAGTACAAAAATACATTACTAATGCCAAAAACAGAGTTCCCAATGCGTGGGAAT	1020474
Query	185	TTACCAAAACGTGAGCCTGCAATGCAAGAAAAGTGGGCGGAAATGAATATTTATGAAAAG	244
Sbjct	1020475	TTACCAAAACGTGAGCCTGCAATGCAAGAAAAGTGGGCGGAAATGAATATTTATGAAAAG	1020534
Query	245	GTACAAGAACATACGAAAGGTCGTCCTTTATTTGTACTGCATGATGGACCTCCATATGCG	304
Sbjct	1020535	GTACAAGAACATACGAAAGGTCGTCCTTTATTTGTACTGCATGATGGACCTCCATATGCG	1020594
Query	305	AATGGCGACATTCATATGGGACATGCATTAATAAAGTATTTAAAAGACTTTATCGTTCGT	364
Sbjct	1020595	AATGGCGACATTCATATGGGACATGCATTAATAAAGTATTTAAAAGACTTTATCGTTCGT	1020654
Query	365	TATAAATCAATGACTGGTTTCTGTGCACCATATGTCCCAGGTTGGGATACGCACGGTTTA	424
Sbjct	1020655	TATAAATCAATGACTGGTTTCTGTGCACCATATGTCCCAGGTTGGGATACGCACGGTTTA	1020714
Query	425	CCAATTGAACAAGCTTTAACAAAATAAAGGTGTAAGCGTAAAGAAAATGACAGTTGCTGAG	484
Sbjct	1020715	CCAATTGAACAAGCTTTAACAAAATAAAGGTGTAAGCGTAAAGAAAATGACAGTTGCTGAG	1020774
Query	485	TTCCGTAAGTTATGTGCAGAGTATGCATATGAACAAGTAGAACGTC AACGTGAACAATTT	544
Sbjct	1020775	TTCCGTAAGTTATGTGCAGAGTATGCATATGAACAAGTAGAACGTC AACGTGAACAATTT	1020834
Query	545	AAGCGTTTAGGTGTACGTGCTGATTGGGATAACCCGTACATTACTTTAGAGCCAGCTTAT	604
Sbjct	1020835	AAGCGTTTAGGTGTACGTGCTGATTGGGATAACCCGTACATTACTTTAGAGCCAGCTTAT	1020894
Query	605	GAAGCACAACAAATTAAGTGTGGTGATATGGCGAAAAAAGGTTATATCTATAAAGGA	664
Sbjct	1020895	GAAGCACAACAAATTAAGTGTGGTGATATGGCGAAAAAAGGTTATATCTATAAAGGA	1020954
Query	665	CAAAAACAGTTTACTGGTCACCAACGAGTGAATCAGCTTTAGCGGAAGCTGAAATTGAA	724
Sbjct	1020955	CAAAAACAGTTTACTGGTCACCAACGAGTGAATCAGCTTTAGCGGAAGCTGAAATTGAA	1021014
Query	725	TACCAAGATAAGAAATCAGCATCTATTTACGTAGCATTCCTGTTAAAGATGGAAAGAAC	784
Sbjct	1021015	TACCAAGATAAGAAATCAGCATCTATTTACGTAGCATTCCTGTTAAAGATGGAAAGAAC	1021074
Query	785	GTATTAGAAGGTGATGAGAAATACATTATCTGGACAACCTACACCTTGGACGTTACCTGCA	844
Sbjct	1021075	GTATTAGAAGGTGATGAGAAATACATTATCTGGACAACCTACACCTTGGACGTTACCTGCA	1021134
Query	845	AACTTAGGTATTTCTGTTCCATCCAGAAGTGAATACGCTATTGTTAAAAGTAAATGATGAA	904
Sbjct	1021135	AACTTAGGTATTTCTGTTCCATCCAGAAGTGAATACGCTATTGTTAAAAGTAAATGATGAA	1021194
Query	905	AAATATATTATTGCTTCTGAACCTATTGAGACAGTTGCAAAAACGTTAGAGTGGGAAAAT	964
Sbjct	1021195	AAATATATTATTGCTTCTGAACCTATTGAGACAGTTGCAAAAACGTTAGAGTGGGAAAAT	1021254
Query	965	GCTGAAGTTGTGAAAACGGTAAAAGGTAGCGAACTTGAGTATACAGTTGCAAAAACATCCA	1024
Sbjct	1021255	GCTGAAGTTGTGAAAACGGTAAAAGGTAGCGAACTTGAGTATACAGTTGCAAAAACATCCA	1021314
Query	1025	TTCTATGATCGTGATTCATTAGTTATGCTAGGAGATCACGTAACAACAGATGCAGGTACA	1084
Sbjct	1021315	TTCTATGATCGTGATTCATTAGTTATGCTAGGAGATCACGTAACAACAGATGCAGGTACA	1021374
Query	1085	GGTTGTGTTTCATACAGCACCAGGACACGGGAAGATGACTTC-TTGTTGGT-AAAAGTAT	1142
Sbjct	1021375	GGTTGTGTTTCATACAGCACCAGGACACGGGAAGATGACTTCATTGTTGGTAAAAGTAT	1021434
Query	1143	GGATTAAAA-TACTTTGCCG-GTTGATGATAAAGGGT-TTAACAAA-GAAGCACCTGGA	1198
Sbjct	1021435	GGATTAGAAGTACTTTGCCAGTTGATGATAAAGGGTATTAAACAGAGGAAGCACCTGGA	1021494
Query	1199	TTT-AAGG-TTATTCT-TGATAA-GCTA-CA-GCCCTTCC-GAAAA-TTAGA-GAAATA	1249
Sbjct	1021495	TTTGAAGGCTTATTCTATGATAAAGCTAACAAGCCAATTACAGAAAAATTAGAAGAAGTA	1021554

Slika 16: Usporedba sekvenca nakon sekvenciranja rekombinantnog plazmida pETBtlleRS1 te sekvence iz baze podataka NCBI.

Rezultati sekvenciranja na uzorcima koji sadrže gene iz *E. coli* i *P. curdolanolitycus* također su potvrdili uspješnost kloniranja gena u plazmidni vektor pET28b.

Lactobacillus brevis, ileS1



Slika 4.17. Dio kromatograma sekvenciranja dobiven nakon sekvenciranja rekombinantnog plazmida koji sadrži gen *ileS1* iz *L. brevis*, pETLbIleRS1

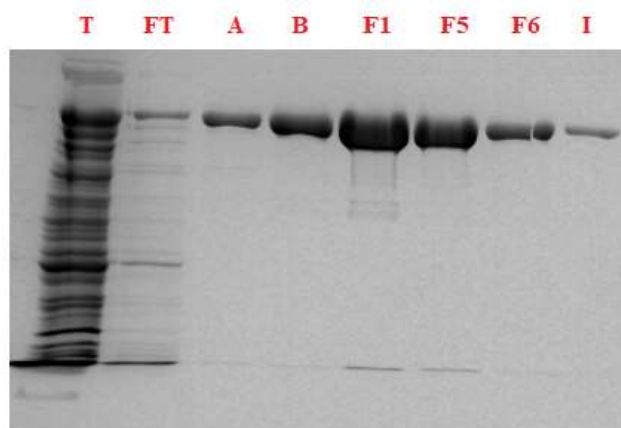
Na slici 4.17. neki pikovi su pravilni, no neki nisu, preklapaju se i imaju mali intenzitet što znači da sekvenciranje nije u potpunosti uspješno.

Rekombinantni plazmid je radi dodatne provjere ponovo izoliran te poslan na sekvenciranje ali rezultati su bili isti kao i nakon prvog sekvenciranja. Sekvenca dobivena sekvenciranjem plazmida za koji se pretpostavljalo da sadrži insert *ileS1* iz *L. brevis* također je uspoređena sa sekvencom iz baze NCBI pomoću alata BLAST⁴⁵. Poklapanje je vrlo kratko, što upućuje da se u plazmidu ne nalazi željeni gen. Ovakav plazmid ne može se koristiti za daljnja istraživanja te bi se gen *ileS1* trebao ponovo uklonirati u plazmidni vektor.

4.2. Afinitetna kromatografija izoleucil-tRNA-sintetaze tipa 1 iz *Bacillus thuringiensis*

Gen *ileS1* iz *B. thuringiensis* ukloniran je u plazmidni vektor pET28b tako da se nakon ekspresije u pogodnom soju *E. coli* dobije fuzijski protein s His-privjeskom na N-terminalnom kraju. Soj korišten za prekomjernu ekspresiju bio je BL21 (DE3) zato što ima mutacije u genima *lon* i *ompT* koji kodiraju za proteaze čime se sprječava razgradnja proteina prilikom pročišćavanja. Također, ovaj soj omogućuje pravovremenu ekspresiju proteina s pET vektora. Transkripcija se inducira dodatkom IPTG-a. Ekspimirani protein pročišćen je afinitetnom kromatografijom na Ni²⁺-NTA koloni kako je opisano u poglavlju 3.2.2.5. Sakupljene frakcije su stavljene na poliakrilamidni gel i provedena je SDS-poliakrilamidna elektroforeza (3.2.2.2.).

Dobiveni su sljedeći rezultati.



Slika 4.18. Poliakrilamidni gel nakon elektroforeze u denaturirajućim uvjetima. Na gelu su uzorci nakon pročišćavanja IleRS1 iz *B. thuringiensis*. Uzorak označen s **T** predstavlja talog stanica nakon sonikacije, **FT** predstavlja uzorak nakon propuštanja kroz kolonu 3 puta, engl. *flow through*, **A** je frakcija nakon ispiranja kolone puferom A, **B** je frakcija nakon ispiranja puferom B, **F1**, **F5** i **F6** predstavljaju frakcije nakon elucije proteina s kolone puferom D, te **I** predstavlja uzorak nakon ispiranja kolone 2 mol dm⁻³ imidazolom.

Nakon pročišćavanja izoleucil-tRNA-sintetaze tipa 1 iz *B. thuringiensis* afinitetnom kromatografijom na Ni²⁺-NTA koloni, provedena je SDS-poliakrilamidna elektroforeza kako bi se vizualizirali rezultati pročišćavanja. IleRS1 se veže na Ni²⁺ na koloni pomoću svog afinitetnog, histidinskog privjeska. Nakon što je resuspendiran taloga bakterijskih stanica u puferu A, lizozimu i Dnazi I, te nakon soniciranja i centrifugiranja 1 h na 10 000 g, dobiven je talog i supernatant. Na poliakrilamidni gel prvo je nanesen uzorak taloga. Talog sadrži mnoge

bakterijske proteine te je na gelu dobivena velika količina proteina različite mase. To je vidljivo na slici 4.18, uzorak označen s **T**. Supernatant se propušta 3 puta kroz kolonu kako bi se što više IleRS1 afinitetno vezalo na kolonu. Nakon trećeg propuštanja, taj uzorak se također nanosi na gel, to je uzorak označen s **FT** (engl. *flow through*) na slici. U tom uzorku se nalaze topljivi proteini, od kojih je dio ostao vezan za kolonu. Kako se na kolonu ne veže samo željeni protein, tj., IleRS1, već i drugi proteini koji imaju nekoliko uzastopnih histidinskih ostataka, prvo je potrebno ukloniti proteine koji su vezani manjim afinitetom. To se postiže tako da se kolona ispiri s imidazolom, prvo manjim koncentracijama, pa sve većim. Imidazol se koristi jer ima veliki afinitet vezanja na Ni^{2+} pa se natječe s proteinima za vezne interakcije. Proteini koji su slabije vezani prvi će se eluirati s kolone, a povećanjem koncentracije imidazola eluiraju se jače vezani proteini. Uzorak dobiven nakon ispiranja kolone puferom A (10 mmol dm^{-3} imidazol) prikazan je na slici 4.18. oznakom **A**. U uzorku je vidljiva pruga velikog intenziteta koja predstavlja IleRS1, te pruga jako malog intenziteta koja predstavlja neki od staničnih proteina koji se slabim interakcijama vezao na kolonu. Uzorak dobiven nakon ispiranja kolone puferom B (20 mmol dm^{-3} imidazol), prikazan je s **B**. Kako je korišten imidazol veće koncentracije, više IleRS1 se eluiralo s kolone. Dobivena je pruga IleRS1 većeg intenziteta nego nakon ispiranja kolone puferom A. Protein je zatim eluiran s kolone puferom za eluciju koji sadrži 200 mmol dm^{-3} imidazol. Sakupljeno je 6 frakcija, na gel su nanosene frakcije 1, 5 i 6. Na slici 4.18. prikazane su te frakcije kao **F1**, **F5** i **F6**. Prva frakcija sadrži puno ciljnog proteina, a kako se proteini dalje eluiraju, sve je manje vezanog IleRS1 na koloni pa su zato pruge u slučaju **F5** i **F6** manjeg intenziteta. Na kraju je kolona isprana 2 mol dm^{-3} imidazolom kako bi se isprali jako vezani proteini IleRS1 s kolone. Na gelu je dobivena pruga malog intenziteta od preostalog IleRS1 na koloni jer je većina proteina već sišla s kolone ranijim ispiranjima.

Nakon provedene elektroforeze na poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima, može se reći da je IleRS1 uspješno pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni^{2+} -NTA koloni. Frakcije dobivene ispiranjem kolone puferom D (F1-F6) ukoncentrirane su u centrikonu te pohranjene za daljnja istraživanja na -80°C . Molarna masa IleRS1 iz *B. thuringiensis* iznosi 104 kDa, a iz 0,5 L bakterijske kulture je dobiveno 2,8 mg IleRS1.

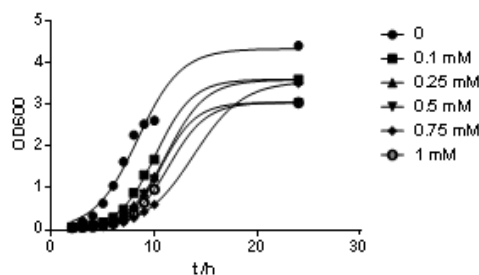
4.3. Krivulje rasta mikroorganizama

Prilikom rada s bakterijama, svi postupci provedeni su u sterilnoj okolini laminara i sa sterilnim priborom kako bi se mogućnost kontaminacije svela na najmanju razinu.

Mjerene su krivulje rasta mikroorganizama u odsutnosti i u prisutnosti mupirocina te je praćen utjecaj koncentracije mupirocina na rast pojedinog mikroorganizma. Mjerenja su najprije provedena na manjoj skali mjerenjem na manje pouzdanom uređaju, a tek onda na većoj, pri čemu su uzimani alikvoti kultura za mjerenje kako bi mjerenje bilo što preciznije. Sva mjerenja ponovljena su više puta.

Podaci dobiveni nakon provedenog mjerenja su obrađeni u programu *GraphPad Prism*.⁴⁶ Za utočnjavanje podataka korištena je logistička jednačba $Y=A/(1+\exp(4*m/A*(1-x)+2))$ u kojoj Y predstavlja izmjerenu optičku gustoću pri 600 nm, koja odgovara gustoći stanica, X je vrijeme u satima, A odgovara maksimalnom rastu, tj., platou rasta, l je duljina lag faze, m je brzina rasta i predstavlja nagib krivulja. Početna ideja bila je odrediti koncentraciju mupirocina koja inhibira rast stanica za 50 % (IC50), no zbog utjecaja ovog antibiotika i na brzinu rasta i na maksimalni rast (kao što je pokazano kasnije), to nije bilo moguće pouzdano učiniti.

Agrobacterium fabrum

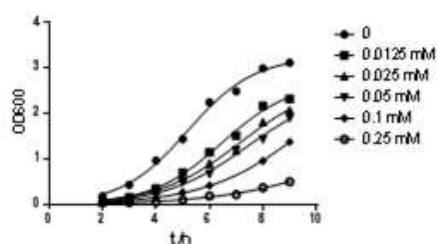


Slika 4.19. Krivulje rasta *A. fabrum* u LB mediju bez antibiotika (oznaka 0, •) te u prisutnosti antibiotika mupirocina u različitim koncentracijama. Raspon koncentracija antibiotika bio je od 0,1-1 mmol dm⁻³.

Rast *A. fabrum* mjereno je u LB mediju bez dodatka antibiotika i u prisutnosti mupirocina pri različitim koncentracijama (0,1 0,25, 0,5, 0,75 i 1 mmol dm⁻³). Na slici 4.19. prikazane su krivulje rasta *A. fabrum* u LB mediju sa i bez antibiotika mupirocina. Krivulja koja predstavlja rast bez prisutnosti antibiotika označena je s oznakom •. Krivulja ima pravilan

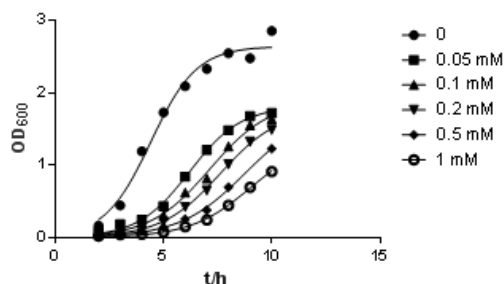
oblik, kratku lag fazu, log fazu te stacionarnu fazu. Ispod te krivulje nalaze se krivulje rasta u prisutnosti mupirocina u rasponu koncentracija od 0,1-1 mmol dm⁻³. Vidljivo je da je maksimalni rast manji u prisutnosti svih mjerenih koncentracija antibiotika. Isto tako, i brzina rasta je smanjena kod svih kultura s dodanim antibiotikom.

Bacillus thuringiensis



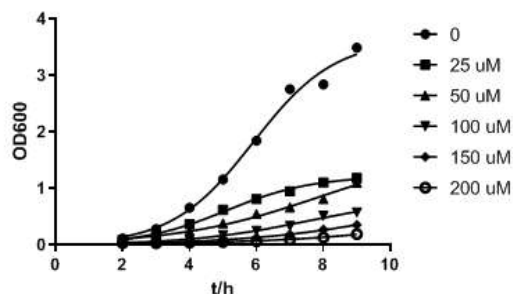
Slika 4.20. Krivulje rasta *B. thuringiensis* sa i bez antibiotika mupirocina. Krivulja mjerena u čistom, LB mediju prikazana je oznakom •. Raspon koncentracija mupirocina korišten u mjerenjima bio je od 0,0125-0,25 mmol dm⁻³.

Rast *B. thuringiensis* također je praćen u čistom LB mediju i u mediju u koji je dodan mupirocin u koncentracijama 0,0125, 0,025, 0,05, 0,1 te 0,25 mmol dm⁻³. Krivulje su vidljive na slici 4.20. U prisutnosti mupirocina plato stacionarne faze se nešto snižava. Također, nagib krivulja, koji predstavlja brzinu rasta, ovisi o koncentraciji mupirocina te se može zaključiti da mupirocin već pri niskim koncentracijama utječe na brzinu rasta *B. thuringiensis*.

Deinococcus radiodurans

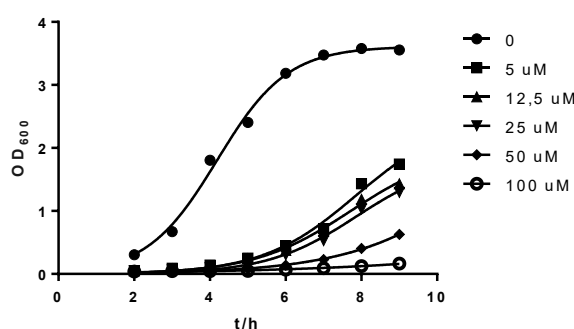
Slika 4.21. Krivulje rasta *D. radiodurans* sa i bez antibiotika mupirocina. Krivulja mjerena u čistom, LB mediju prikazana je oznakom •. Raspon koncentracija mupirocina korišten u mjerenjima bio je od 0,05-1 mmol dm⁻³.

D. radiodurans raste u LB mediju. Prilikom praćenja rasta korištene su koncentracije mupirocina 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 te 1 mmol dm⁻³. Krivulje su prikazane na slici 4.21. Iz krivulja je vidljivo da mupirocin utječe na brzinu rasta i na plato stacionarne faze.

Escherichia coli

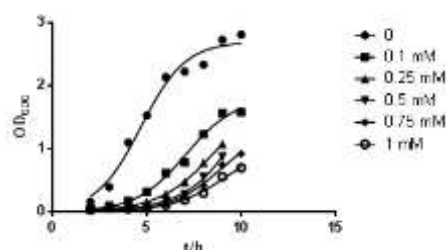
Slika 4.22. Krivulje raste *E. coli* praćene u LB mediju sa i bez mupirocina. Raspon koncentracija mupirocina varira od 25-200 μmol dm⁻³.

Krivulje rasta *E. coli* vizualizirane su na slici 4.22. *E. coli* raste u LB mediju. Kod mjerenja u prisutnosti mupirocina u koncentracijama 25, 50, 100, 150 te 200 μmol dm⁻³ krivulje imaju jako malu brzinu rasta te je i maksimalni rast jako mali u odnosu na mjerenje u čistom mediju. Može se reći da mupirocin ima velik utjecaj na rast *E. coli*, čak i u jako niskim koncentracijama.

Lactobacillus brevis

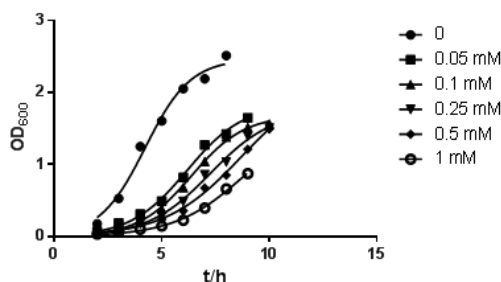
Slika 4.23. Krivulje rasta *L. brevis* u MRS mediju. Vidljiva je krivulja rasta u čistom mediju (•), te u mediju u koji je dodan mupirocin u rasponu koncentracija 5-100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$.

L. brevis raste u MRS mediju te su mjerenja provedena u tom mediju. Mupirocin utječe na rast *L. brevis* već pri jako niskim koncentracijama smanjujući brzinu rasta.

Micrococcus luteus

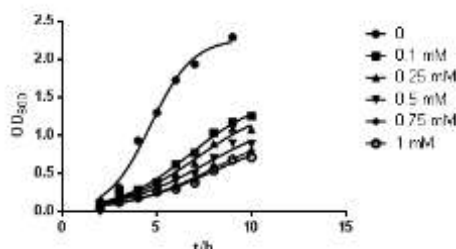
Slika 4.24. Krivulje rasta *M. luteus* u LB mediju. Vidljiva je krivulja rasta u čistom mediju (•), te u mediju u koji je dodan mupirocin u rasponu koncentracija 0,1-1 mmol dm^{-3} .

Rast *M. luteusa* praćen je u čistom LB mediju te u mediju s dodatkom mupirocina u koncentracijama 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 i 1 mmol dm^{-3} . Krivulje su prikazane na slici 4.24. Krivulja koja predstavlja rast u čistom mediju (označena s •) prikazuje značajnije brži rast od rasta bakterija koje rastu u uvjetima s antibiotikom. Krivulje rasta koje prikazuju rast uz antibiotik imaju vrlo slične nagibe, tj. brzina rasta nije uvelike ovisila o koncentraciji mupirocina, ali se značajnije razlikuje se i bez prisutnosti mupirocina.

Mycobacterium smegmatis

Slika 4.25. Krivulje rasta *M. smegmatis* u LB mediju. Vidljiva je krivulja rasta u čistom mediju (•), te u mediju u koji je dodan mupirocin u rasponu koncentracija 0,05-1 mmol dm⁻³

Rast *M. smegmatis* praćen je u LB mediju. Krivulje koje prikazuju rast u čistom mediju te u mediju s mupirocinom prikazane su na slici 4.25. Koncentracije mupirocina korištene za praćenje rasta bile su 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 te 1 mmol dm⁻³. Iz krivulja je vidljivo da mupirocin ima utjecaj na brzinu rasta, no ta brzina se ne mijenja značajno u ovisnosti o izabranim koncentracijama mupirocina.

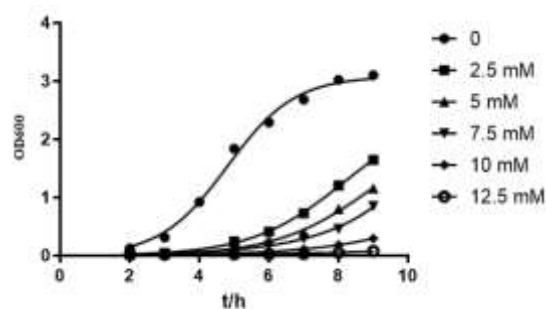
Pseudomonas fluorescens

Slika 4.26. Krivulje rasta *P. fluorescens* u MP mediju. Vidljiva je krivulja rasta u čistom mediju (•), te u mediju u koji je dodan mupirocin u rasponu koncentracija 0,1-1 mmol dm⁻³

P. fluorescens raste u MP mediju te je rast praćen u tom mediju. Postoji više različitih sojeva *P. fluorescens*. Tako, osim soja koji proizvodi mupirocin i koji je ranije opisan u ovom radu, za ovo istraživanje je korišten soj koji posjeduje samo izoleucil-tRNA-sintetazu tipa 1. Koncentracije mupirocina korištene u radu bile su 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 te 1 mmol dm⁻³. Ovdje je opet vidljiva velika razlika u brzini rasta *P. fluorescens* u čistom mediju (krivulja označena s • na slici 4.26) te u mediju s dodatkom mupirocina. Mupirocin utječe na brzinu rasta, ali ona

se ne mijenja značajno u ovisnosti o koncentraciji mupirocina, razlika je značajna samo u prisutnosti i odsutnosti antibiotika.

Streptomyces griseus



Slika 4.27. Krivulje rasta *S. griseus* u LB mediju. Vidljiva je krivulja rasta u čistom mediju (•), te u mediju u koji je dodan mupirocin u rasponu koncentracija 2,5-12,5 mmol dm⁻³

Rast *S. griseus* u LB mediju sa i bez prisutnosti mupirocina prikazan je krivuljama na slici 4.27. koncentracije mupirocina bile su 2,5, 5, 7,5, 10 i 12,5 mmol dm⁻³. Iz nagiba krivulja vidljivo je da mupirocin ima utjecaj na brzinu rasta. No, ovdje je riječ o vrlo visokim koncentracijama mupirocina – dakle, ovaj organizam je iznimno otporan na djelovanje mupirocina, što je i ranije poznato.⁸

Kako je u ovom mjerenju cilj bio dobiti uvid u to kako koncentracija mupirocina utječe na rast mikroorganizama u ovisnosti o tipu IleRS-a koji mikroorganizam posjeduje, iz dobivenih rezultata može se zaključiti samo da rast ne ovisi samo o tipu IleRS-a. Mupirocin utječe na rast *E. coli* i *L. brevis* već pri iznimno niskim koncentracijama, dok na rast *S. griseus* mupirocin utječu samo pri visokim koncentracijama, što je očekivano s obzirom da *E. coli* i *L. brevis* imaju IleRS1, dok *S. griseus* ima IleRS2. Ostali ispitivani organizmi pokazuju osjetljivost između tih dvaju ekstrema i ne postoji oštra granica između organizama koji imaju IleRS2 i onih koji nemaju.

U svim mjerenjima mupirocin utječe ili na maksimalni rast ili na brzinu rasta te se vrijednost inhibitorne koncentracije mupirocina koja inhibira 50 % rasta bakterija nije mogla jednoznačno odrediti. To je vrlo čest slučaj, budući da su krivulje rasta bakterija složene funkcije više efekata. Upravo zato se najčešće određuje minimalna inhibitorna koncentracija, što smo i mi učinili za mupirocin.

4.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije mupirocina

Minimalna inhibitorna koncentracija mupirocina mjerena je kako bi se pokušali dobiti zaključci o korelaciji između vrijednosti MIC-a i tipa IleRS-a. Također, mjerenje je provedeno u bogatom mediju i u minimalnom mediju s dodatkom izoleucina kako bi se mogao dobiti uvid o tome kako medij, tj., uvjeti rasta, utječu na MIC. Osim toga, budući da je mupirocin kompetitivni inhibitor prema izoleucinu, dodatak izoleucina je osigurao da uvijek postoji dovoljna i kontrolirana koncentracija izoleucina u mediju.

U radu su određivane minimalne inhibitorne koncentracije mupirocina za 9 mikroorganizama. Kao bogati hranjivi medij korišten je LB medij za *A. fabrum*, *B. thuringiensis*, *D. radiodurans*, *E. coli*, *M. luteus*, *M. smegmatis*, *P. curdlanolyticus* i *S. griseus*, a u slučaju *P. fluorescens* korišten je MP medij, te u slučaju *L. brevis* MRS medij. Kao minimalni medij korišten je M9 medij s dodatkom izoleucina. Sva mjerenja ponovljena su 3 puta. U radu je korišten soj *P. fluorescens* koji ne posjeduje IleRS2, već samo IleRS1 kako je već ranije spomenuto.

U pogodnom bogatom hranjivom mediju bakterije su rasle ~16-20 h na 30 °C uz 250 rpm. U minimalnom hranjivom mediju *P. fluorescens* i *E. coli* također su narasle za ~20 h na 30 °C uz 250 rpm, *A. fabrum* i *M. smegmatis* narasli su tek 5. dan nakon što su stavljeni na rast. Ostali mikroorganizmi nisu rasli u minimalnom mediju.

Nakon što su mikroorganizmi narasli iz prekonocnih kultura, startana je nova kultura dodatkom zasićene u razrjeđenju i dodan im je antibiotik mupirocin u različitim koncentracijama. Kulture su bile spremne za razrjeđenje kad je OD₆₀₀ bio 2,00 ili veći od 2,00. Prilikom rada u minimalnom mediju, *P. fluorescens* i *E. coli* zadovoljile su taj uvjet, no *A. fabrum* i *M. smegmatis* nisu narasle do OD₆₀₀=2,00. *A. fabrum* dosegla je 5. dan rasta vrijednost OD₆₀₀=0,7, a *M. smegmatis* OD₆₀₀=1,4.

Nakon rasta u prisutnosti antibiotika, vizualno je procijenjeno koje kulture su narasle (zamućeni medij), a koje nisu (medij je ostao bistar).

U tablici 4.3. prikazane su vrijednosti MIC-a mupirocina za pojedine mikroorganizme u bogatom i minimalnom hranjivom mediju.

Tablica 4.3. Vrijednosti MIC-a mupirocina u bogatom i minimalnom hranjivom mediju za pojedine mikroorganizme

mikroorganizam	MIC (bogat medij)/mmol dm ⁻³	MIC (M9 medij)/mmol dm ⁻³
<i>Agrobacterium fabrum</i> (IleRS1)	2,5	1,25
<i>Bacillus thuringiensis</i> (IleRS1 i 2)	0,625	-
<i>Deinococcus radiodurans</i> (IleRS2)	2,5	-
<i>Escherichia coli</i> (IleRS1)	0,5	1
<i>Lactobacillus brevis</i> (IleRS1)	1	-
<i>Micrococcus luteus</i> (IleRS2)	16	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (IleRS2)	2	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (IleRS1)	4	4
<i>Streptomyces griseus</i> (IleRS2)	20	-

Pored navedenog mikroorganizma u zagradi se nalazi tip IleRS koji posjeduje. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti dobivene nakon tri mjerenja.

Kako je opisano u literaturi, organizmi koji posjeduju IleRS2 trebali bi biti manje osjetljivi na inhibiciju mupirocinom od onih s IleRS1.^{7,8,11} Iz dobivenih podataka prikazanih u tablici 4.3., vidi se da ta korelacija postoji samo kod nekih mikroorganizama. Kako je navedeno u referenci 7, dobra korelacija između vrijednosti MIC-a za mupirocin i tipa IleRS-a uočena je kod brojnih bakterija, no ne i kod svih. U ovom radu također je dobivena dobra korelacija za neke bakterije, dok za neke nije. Mikroorganizmi s IleRS1 trebali bi imati niske vrijednosti MIC-a. Mikroorganizmi koji posjeduju samo IleRS1 imaju vrijednosti MIC-a između 0,5 i 4 mmol dm⁻³ mupirocina. Za mikroorganizme koji posjeduju samo IleRS2 ili u slučaju *B. thuringiensis* IleRS1 i IleRS2 očekivane su veće vrijednosti MIC-a. Izmjerene vrijednosti za njih su u rasponu od 0,625-20 mmol dm⁻³.

Usporede li se vrijednosti iz referenca 27, za *E. coli* je dobivena vrijednost MIC-a 0,256 mmol dm⁻³ dok je u ovom radu dobivena vrijednost od 0,5 mmol dm⁻³. U slučaju *M. luteus* u referenci je navedena vrijednost veća od 0,256 mmol dm⁻³ dok je u ovom radu vrijednost 16 mmol dm⁻³. Za ostale organizme ne postoje prijašnja mjerenja. Iako nema jasne granice, u literaturi se također navodi da je visoka razina osjetljivosti na mupirocin ona u koncentracijama od 0,016-0,5 mmol dm⁻³, dok je niska osjetljivost iznad 0,5 mmol dm⁻³.²⁵ Vrijednosti koje su veće od očekivanih su one u slučaju *A. fabrum* te *P. fluorescens* (imaju IleRS1, a nisu jako osjetljivi), dok se vrijednost manja od predviđene javlja u slučaju *B. thuringiensis* (ima oba tipa IleRS, ali je visoko osjetljiv).

Neka ranija istraživanja govore kako medij nema utjecaj na vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije.²⁷ Ovdje se ne može u potpunosti potvrditi ta činjenica jer je samo u slučaju *P. fluorescens* dobivena ista vrijednost MIC-a u bogatom i minimalnom mediju, dok se za *E. coli* i *A. fabrum* određeni MIC-ovi razlikuju za dva puta. Izoleucin je bio dodan u minimalni medij radi kompeticije sa samim antibiotikom, odnosno mupirocinom jer on djeluje kao kompetitivni inhibitor prema Ile. Usporedbom vrijednosti MIC-a u M9 mediju s vrijednostima iz bogatog hranjivog medija ustanovljeno je da se vrijednosti donekle poklapaju. U slučaju *M. smegmatis* rast u minimalnom hranjivom mediju dovodio je do nastanka neke vrste bakterijskih nakupina te izmjerene vrijednosti optičke gustoće ne odgovaraju rastu stanica i MIC se ne može odrediti.

Inhibicija rasta mupirocinom ovisi o tipu IleRS koji mikroorganizam posjeduje, ali na inhibiciju utječu i drugi čimbenici kao što su unos mupirocina u stanicu i uvjeti rasta. Dobivene eksperimentalne vrijednosti ne mogu točno prikazati ovisnost tipa IleRS-a i vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije mupirocina. Čimbenici koji još utječu na MIC su sastav medija, pH vrijednost medija te inokulacija. Dobar i ispravan uvid u tu ovisnost može se dobiti jedino provedbom *in vitro* eksperimenta s izoliranim proteinima. U tu svrhu potrebno je pročistiti izoleucil-tRNA-sintetaze te provjeriti konstante inhibicije mupirocinom u reakciji aktivacije aminokiseline.

§ 5. ZAKLJUČAK

1. Nakon provedenog PCR-a na kolonijama, restriksijske razgradnje rekombinantnog plazmida te sekvenciranja, zaključak je da su uspješno uklonirani geni *ileS1* iz *B. thuringiensis*, *E. coli* i *P. curdlanolyticus* u plazmidni vektor pET28b.
2. Afinitetnom kromatografijom na Ni²⁺-NTA koloni uspješno je pročišćen IleRS1 iz *B. thuringiensis* vezanjem na kolonu pomoću afinitetnog, histidinskog privjeska. Pročišćeno je 2,8 mg proteina iz 0,5 L medija.
3. Mupirocin utječe na rast odabranih mikroorganizama tako što utječe na brzinu rasta i maksimalni rast te se ne može jednoznačno odrediti vrijednost koncentracije mupirocina koja inhibira 50% rasta.
4. Izmjerene vrijednosti MIC-e za mupirocin ne daju dobar uvid o ovisnosti vrijednosti MIC-a i tipu IleRS-a koji posjeduje mikroorganizam. Na vrijednosti MIC-a utječu brojni čimbenici kao što su uvjeti rasta, unos mupirocina u stanicu, sastav medija, pH vrijednost medija te inokulacija te se dobra procjena o inhibiciji mupirocinom različitih tipova IleRS može dobiti jedino provedbom *in vitro* eksperimenata s izoliranim proteinima u mjerenjima konstante inhibicije mupirocina u reakciji aktivacije aminokiseline.

§ 6. POPIS KRATICA

6.1. Popis kratica korištenih u radu

Tablica 6.1. Popis korištenih kratica u radu navedenih abecednim redom.

Kratica	Puni naziv na hrvatskom jeziku	Puni naziv na izvorniku
aa	aminokiselina	engl. <i>amino acid</i>
aaRS	Aminoacil-tRNA-sintetaza	engl. <i>aminoacyl-tRNA-synthetasa</i>
APS	Amonijev peroksodisulfat	-
ATP	Adenozin-5'-trifosfat	engl. <i>adenosine-5'-triphosphate</i>
CIP	Alkalna fosfataza	engl. <i>Calf Intestinal Phosphatase</i>
CP1	Vezni peptid 1	engl. <i>connective peptide 1</i>
CTP	Citozin-5'-trifosfat	engl. <i>cytosine-5'-triphosphate</i>
EB	Pufer za eluciju	engl. <i>elution buffer</i>
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina	engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EF	Elongacijski faktor	engl. <i>Elongation factor</i>
GTP	Gvanozin-5'-trifosfat	engl. <i>gvanosine-5'-triphosphate</i>
HEPES	N-(2-hidroksietil) piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina	-
HF		engl. <i>High fidelity</i>
IF	Inicijacijski faktor	engl. <i>Initiation factor</i>
IleRS	Izoleucil-tRNA-sintetaza	engl. <i>isoleucyl-tRNA-synthetasa</i>
IPTG	Izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid	-
kb	Kilobaza	engl. <i>kilobase</i>
LB	Lauria-Bertani	-
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija	engl. <i>Minimal inhibitory concentration</i>
mRNA	Glasnička RNA	engl. <i>Messenger RNA</i>
MP		engl. <i>Meat pepton</i>
NCBI	Nacionalni centar za biotehnoške informacije	engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEB		engl. <i>New England Biolabs</i>
NTA	Nitrilotrioctena kiselina	engl. <i>nitrilotriacetic acid</i>
OD	Optička gustoća	engl. <i>Optical density</i>
pb	Bazni parovi	engl. <i>Base pair</i>
PCR	Lančana reakcija polimerazom	engl. <i>Polymerase chain reaction</i>
PD	Dimer početnica	engl. <i>primer dimer</i>
PEG	Polietilen glikol	-
PMSF	Fenilmetilsulfonil-fluorid	-
RF	Raktor otpuštanja	engl. <i>Release factor</i>
rpm	Okretaji u minuti	engl. <i>Revolutions per minute</i>
RRF	Ribosomski faktor recikliranja	engl. <i>Ribosome recycling factor</i>
SDS	Natrijev dodecil-sulfat	-
TEMED	Tetrametiletildiamin	-
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan	-
tRNA	Transfer RNA	engl. <i>transfer RNA</i>
TTP	Timidin-5'-trifosfat	engl. <i>tymidin-5'-triphosphate</i>

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. Dulić, Oprečne katalitičke aktivnosti unutar sintetskog mjesta izoleucil-tRNA-sintetaze iz bakterije *Escherichia coli*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2012, str. 4-27
2. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 225-226, 857-878
3. J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *Top. Curr. Chem.***344** (2013) 1-41
4. I. Živković, Mehanizam diskriminacije leucina u mjestu za popravak pogreške leucil-tRNA-sintetaze, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016, str. 3-14
5. B. E. Nordin, P. Schimmel (2005) Isoleucyl-tRNA synthetases U: M. Ibba, C. S. Francklyn, S. Cusaek (eds): The aminoacyl-tRNA synthetases, Landers Bioscience/Eurekah.com, Georgetown, Texas, 24-35
6. M. Dulic, N. Cvetesic, J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *JBC***285** (2010) 23799-23809
7. M. Dulic, J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *Biochemistry***53** (2014) 6189-6198
8. N. Cvetesic, M. Dulic, M. Bilus, N. Sostaric, B. Lenhard, I. Gruic-Sovulj, *J. Biol. Chem.***291** (2016) 8618-8631
9. A. Brkić, Utjecaj mistranslacije na stabilnost modelnih proteina u staničnom ekstraktu, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019, str. 5-10, 16-23
10. A. T. Fuller, G. Mellows, M. Woolford, *Nature***234** (1971) 416-417
11. T. Yanagisawa, M. Kawakami, *JBC***278** (2003) 25887-25894
12. P. Khade, S. Joseph, *FEBS Letters***584** (2010) 420-426
13. D. Voet, J. G. Voet, Biochemistry, John Willey & Sons Inc, 4. Izdanje, 2011.
14. N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science***289** (2000) 905-920
15. B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. Clemons Jr, R. J. Morgan-Warren, A. P. Carten, C. Wornhein, T. Hartsch, V. Ramakrishnan, *Nature***407** (2000) 327-339
16. <https://molbioandbiotech.wordpress.com/2007/09/13/trna/> (datum pristupa 3.7.2019.)
17. <https://pt.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/translation-polypeptides/a/trna-and-ribosomes> (datum pristupa 3.7.2019.)

18. R. Banerjee, S. Chen, K. Dare, M. Gilreath, M. Praetorius-Ibba, M. Raina, N. M. Reynolds, T. Rogers, H. Roy, S. S. Yadavalli, M. Ibba, *FEBS Letters***584** (2010) 387-395
19. M. Ibba, D. Söll, *Annu. Rev. Biochem.***69** (2000) 617-650
20. R. Poupplan L, P. Schimmel, *Biochem Sci***10** (2001) 591-596
21. A. Crnković, Dinamika sklapanja aminoacil-tRNA-sintetaznog kompleksa, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 6-14
22. M. Viher, Drevni proteini kao termički stabilniji analozi postojećih proteina, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017, str. 7-11
23. O. Nureki, D. G. Vassylyev, M. Tateno, A. Shimada, T. Nakama, S. Fukai, M. Konno, T. L. Hendrickson, P. Schimmel, S. Yokoyama, *Science***280** (1998) 578-582
24. E. Glasfeld, J. A. Landro, P. Schimmel, *Biochemistry***35** (1996) 4139-4145
25. P. Schimmel, E. Schmidt, *Biochem Sciences***1** (1995) 1-2
26. B. E. Griffin, M. Jarman, C. B. Reese, J. E. Sulston, D. R. Trentham, *Biochemistry***5** (1966) 3638-3649
27. R. Sutherland, R. J. Boon, K. E. Griffin, P. J. Masters, B. Slocombe, A. R. White, *AAC***27** (1985) 495-498
28. C. M. Thomas, J. Hothersall, C. L. Willis, T. J. Simpson, *Microbiology***8** (2010) 281-289
29. T. Nakama, O. Nureki, S. Yokoyama, *JBC***276** (2001) 47387-47393
30. T. Yanagisawa, J. T. Lee, H. C. Wu, M. Kawakami, *JBC***269** (1994) 24304-24309
31. J. Sambrook, D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. izdanje, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
32. <https://assets.thermofisher.com> (datum pristupa 17.6.2019.)
33. <https://www.researchgate.net> (datum pristupa 13.6.2019.)
34. <https://Qiagen MiniPrep/svpticket2ana.wordpress.com> (datum pristupa 13.6.2019.)
35. H. Zhu, R. A. Dean, *Nucleic Acids Research***27** (1998) 910-911
36. *pET System Manual*, Novagen[®]
37. <https://orbitbiotech.com/bacterial-growth-curve-generation-time-lag-phase-log-phase-exponential-phase-decline-phase/> (datum pristupa 14.6.2019.)
38. I. Wiegand, K. Hilpert, R. E. W. Hancock, *Nature protocols***3** (2008) 163-175

39. K. Hayashi (1994) Manipulation of DNA by PCR U: K. B. Mullis, F. Ferré, R. A. Gibbs (eds): The polymerase chain reaction, Birkhäuser Boston, USA, str. 3-13
40. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (datum pristupa 23.10.2018.)
41. T. Thiel, S. Bissen, E. M. Lyons, Biotechnology: DNA to Protein, McGraw-Hill Higher Education, New York, 2002, str. 48-54, 123-125
42. <https://biochem.web.utah.edu/hill/links/pET28.pdf> (datum pristupa rujan 2019.)
43. <https://nebcloner.neb.com> (datum pristupa veljača 2019.)
44. <https://www.snapgene.com/> (datum pristupa kolovoz 2019.)
45. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (datum pristupa 8.7.2019.)
46. <https://graphpad.com/scientific-software/prism/> (datum pristupa kolovoz 2019.)

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Lucija Pavlak

Datum rođenja: 24.11.1993.

Mjesto rođenja: Zagreb, Hrvatska

Obrazovanje

- | | |
|-----------|--|
| 2000–2008 | Osnovna škola Mihaela Šiloboda, Sveti Martin pod Okićem |
| 2008–2012 | Srednja škola Zdravstveno učilište Zagreb |
| 2012–2017 | Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb |
| 2017-2019 | Diplomski studij kemije, grane: Anorganska kemija i biokemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb |

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

- | | |
|-----------|---|
| 2015-2019 | Otvoreni dan kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb |
|-----------|---|