

Utjecaj mistranslacije i oksidacijskog stresa na bakteriju *Escherichia coli*

Prosinečki, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:217:833379>

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

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



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Marko Prosinečki

**UTJECAJ MISTRANSLACIJE I
OKSIDACIJSKOG STRESA NA BAKTERIJU**
Escherichia coli

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za Biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Jasmine Rokov Plavec i neposrednim voditeljstvom Valentine Ević, mag. chem.

Zahvale

Prije svega, najveće hvala neposrednoj voditeljici Valentini Ević, *mag. chem.* koja mi je asistirala i pravila društvo tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela i neiscrpno pomagala pri pisanju samog diplomskog rada. Hvala mentorici doc. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec na bezuvjetnoj pristupačnosti i smjernicama te članovima povjerenstva: doc. dr. sc. Đani Škalamera i izv. prof. dr. sc. Vladimir Stilinović na razumijevanju i toplim riječima pohvale.

Naravno, hvala i mojoj obitelji na razumijevanju i strpljivosti u posljednjih mjesec dana, ali i podršci tijekom cijelog šestogodišnjeg studiranja. Također, hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi učinili ovo iskustvo lakšim i zanimljivim. Naposljetku, hvala svim profesorima koji su mi izašli ususret tijekom studiranja i pogotovo onima koji nisu, jer je to ono što mi je u tom trenutku trebalo.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Cilj rada	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Oksidacijski stres	3
2.1.1. Djelovanje reaktivnih kisikovih vrsta.....	3
2.1.2. Odgovor na oksidacijski stres	4
2.1.3. RpoS regulon.....	5
2.2. Mistranslacija	6
2.2.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze	7
2.2.2. Izoleucil-tRNA sintetaza.....	9
2.2.3. Adaptivni utjecaj mistranslacije u odgovoru na drugi stres	10
2.3. PCR	12
2.4. Transdukcija.....	13
§ 3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Kemikalije	15
3.1.2. Instrumenti	15
3.1.3. Bakteriofagi.....	15
3.1.4. Aminokiseline, nukleotidi i enzimi.....	16
3.1.5. Boje	16
3.1.6. Početnice.....	16
3.1.7. Hranjivi mediji za uzgoj bakterija.....	16
3.1.8. Minimalni M9 mediji za uzgoj bakterija	16
3.1.9. Bakterijski sojevi.....	17
3.2. Metode rada s bakterijama	17
3.2.1. Rad u sterilnim uvjetima	17
3.2.2. Rad s bakterijama	17
3.2.3. Određivanje krivulje rasta	17
3.2.4. Mikroskopija	19
3.2.5. P1 transdukcija	19

3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama	19
3.3.1. <i>Kolonijski PCR</i>	19
3.3.2. <i>Agarozna gel elektroforeza</i>	21
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Usporedba rasta divljeg tipa MG1655 u kontrolnim i oksidacijskim uvjetima nakon prethodnog uzgoja u mediju s dodanim valinom ili norvalinom	22
4.2. Usporedba rasta soja IleRS ED⁻ u kontrolnim i oksidacijskim uvjetima nakon prethodnog uzgoja u mediju s dodanim valinom ili norvalinom	25
4.3. Usporedba rasta divljeg tipa soja i soja IleRS ED⁻ u kontrolnim i oksidacijskim uvjetima nakon prethodnog uzgoja u mediju s dodanim valinom ili norvalinom	28
4.4. Inaktivacija gena <i>rpoS</i> u soju IleRS ED⁻	32
4.5. Usporedba rasta soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ u kontrolnim i oksidacijskim uvjetima nakon prethodnog uzgoja u mediju s dodanim valinom ili norvalinom	37
4.6. Usporedba rasta sojeva IleRS ED⁻ i IleRS ED⁻ RpoS⁻ u kontrolnim i oksidacijskim uvjetima nakon prethodnog uzgoja u mediju s dodanim valinom ili norvalinom	40
4.7. Mikroskopska analiza bakterija soja IleRS ED⁻ RpoS⁻	43
§ 5. ZAKLJUČAK	45
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	46
§ 7. LITERATURNI IZVORI	48
§ 8. ŽIVOTOPIS	XV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

UTJECAJ MISTRANSLACIJE I OKSIDACIJSKOG STRESA NA BAKTERIJU

Escherichia coli

Marko Prosinečki

Translacija je stanični proces biosinteze proteina prema zapisu genetičke informacije u mRNA. Razina ugradnje pogrešne aminokiseline, odnosno mistranslacija, može se razlikovati u različitim organizmima i pri različitim uvjetima. Novija istraživanja pokazala su da povećana razina mistranslacije može imati pozitivan učinak na odgovor stanice na drugi stres. Istraživanje adaptacije na oksidacijski stres je značajno zato što je oksidacijski stres dio odgovora imunološkog sustava domaćina kojim ubija patogene bakterije. Prethodno je pripremljen soj bakterije *Escherichia coli* s nefunkcionalnom domenom za popravak pogreške izoleucil-tRNA-sintetaze što omogućuje povećanu specifičnu mistranslaciju izoleucina strukturno sličnim aminokiselinama valinom (Val) ili norvalinom (Nva). Praćen je rast ovog soja i uočeno je da uslijed prethodne mistranslacije dolazi do predaptacije stanica na oksidacijski stres. Preadaptacija može biti povezana s općim odgovorom stanice na stres, u kojem središnju ulogu ima protein RpoS, sigma faktor RNA-polimeraze. U svrhu utvrđivanja važnosti proteina RpoS u preadaptaciji stanice uslijed mistranslacije na oksidacijski stres pripremljen je mistranslatirajući soj s inaktiviranim genom *rpoS*. Rezultati upućuju da RpoS ima esencijalnu ulogu u obrani stanice od oksidacijskog stresa za bakterije koje su prethodno uzgajane pri nižim koncentracijama Val ili Nva dok pokazuje potpornu ulogu za bakterije koje su prethodno uzgajane pri višim koncentracijama Val ili Nva. Izgleda da u uvjetima povišene mistranslacije (više koncentracije Val ili Nva) bakterije pokreću dodatne mehanizme koji ne ovise samo o RpoS regulonu, a koji su dovoljni za preživljenje u oksidacijskom stresu.

(48 stranica, 22 slike, 2 tablice, 43 literaturna 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: adaptacija, izoleucil-tRNA-sintetaza, mistranslacija, oksidacijski stres, RpoS

Mentor: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
Neposredni voditelj: Valentina Ević, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
 2. doc. dr. sc. Đani Škalamera
 3. izv. prof. dr. sc. Vladimir Stilinović
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Datum diplomskog ispita: 24. veljače 2023.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

INFLUENCE OF MISTRANSLATION AND OXIDATIVE STRESS ON BACTERIA *Escherichia coli*

Marko Prosinečki

Translation is a cellular process of protein biosynthesis according to the genetic information in mRNA. The level of incorporation of the incorrect amino acid, or mistranslation, can differ in different organisms and under different conditions. More recent research has shown that increased levels of mistranslation can have a positive effect on the cell's response to other stresses. Research on adaptation to oxidative stress is significant because oxidative stress is part of the host's immune system response to kill pathogenic bacteria. Previously, a strain of *Escherichia coli* bacteria was prepared with a non-functional isoleucyl-tRNA-synthetase editing domain, which enables increased specific mistranslation of isoleucine to structurally similar amino acids valine (Val) or norvaline (Nva). The growth of this strain was monitored and it was observed that, due to the previous mistranslation, pre-adaptation of the cells to oxidative stress occurs. Preadaptation can be related to the general response of the cell to stress, in which the protein RpoS, the sigma factor of RNA polymerase, plays a central role. In order to determine the importance of the RpoS protein in the pre-adaptation of cells due to mistranslation to oxidative stress, a mistranslating strain with an inactivated *rpoS* gene was prepared. The results suggest that RpoS plays an essential role in the defense of the cell against oxidative stress for bacteria pre-cultured at lower concentrations of Val or Nva while it shows a supportive role for bacteria pre-cultured at higher concentrations of Val or Nva. It seems that under conditions of elevated mistranslation (higher concentration of Val or Nva), bacteria trigger additional mechanisms that do not depend only on the RpoS regulon, and which are sufficient for survival in oxidative stress.

(48 pages, 22 figures, 2 tables, 43 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: adaptation, isoleucyl-tRNA-synthetase, mistranslation, oxidative stress, RpoS

Mentor: Assistant Professor Jasmina Rokov Plavec
Assistant mentor: Valentina Ević, mag. chem.

Reviewers:

1. Assistant Professor Jasmina Rokov Plavec
 2. Assistant Professor Đani Škalamera
 3. Associate Professor Vladimir Stilinović
- Substitute: Associate Professor Vesna Petrović Peroković

Date of exam: February 24th, 2023.

§ 1. UVOD

Živi svijet na Zemlji temelji se na strukturama i funkcijama četiriju osnovnih biomakromolekula: masti, ugljikohidrata, nukleinskih kiselina i proteina. Proteini su, zbog velikog broja mogućih tercijskih struktura i različitih funkcionalnih skupina aminokiselina, zaslužni za gotovo sve funkcije u organizmu. Shodno tome, točnost u svim koracima biosinteze proteina je od egzistencijalne važnosti kako za kompleksnije eukariotske, tako i za prokariotske stanice.

U stanicama su se razvili mehanizmi kontrole točnosti i popravka pogreške na razini replikacije genoma, transkripcije i translacije. Međutim, unatoč potrebi stanica za visokom točnošću sintetiziranih proteina i mnogobrojnim mehanizmima popravka pogreški, ipak ponekad dolazi do ugradnje pogrešne aminokiseline, odnosno mistranslacije. Iako je poznatije da mistranslacija ima štetan utjecaj na stanicu, pokazano je kako u nekim organizmima povećana mistranslacija ima adaptivnu ulogu pri izlaganju stanice drugom stresu, primjerice temperaturnom, antibiotskom i oksidacijskom.¹ Postoji naznaka da je adaptivni odgovor na povećanu mistranslaciju povezan s općim odgovorom na stres koji je reguliran sigma faktorom RpoS. Jedan od najučestalijih stresova s kojim se bakterije susreću je oksidacijski stres.

Oksidacijski stres može biti egzogeni (nastaje u okolini) i endogeni (nastaje u stanici), a uzrokuju ga povećana količina reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *reactive oxygen species*), što je zajednički naziv za vodikov peroksid, superoksid i hiroksilni radikal. ROS-ovi imaju važnu ulogu u imunološkom sustavu u obrani od invazivnih patogena. Prethodna preliminarna istraživanja u laboratoriju su pokazala da u mutiranom soju bakterije *Escherichia coli*, koji ima povećanu razinu mistranslacije, specifična mistranslacija izoleucina valinom (Val) ili norvalinom (Nva) povoljno utječe u odgovoru na oksidacijski stres.²

1.1. Cilj rada

Prethodno je u laboratoriju pripremljen soj bakterije *Escherichia coli* koji eksprimira izoleucil-tRNA-sintetazu (IleRS) s nefunkcionalnom domenom za popravak pogreške (IleRS ED⁻). Pri tome dolazi do mistranslacije izoleucina strukturno sličnim aminokiselinama valinom i norvalinom. Cilj rada je detaljno istražiti utjecaj mistranslacije na stanični odgovor na oksidacijski stres. S obzirom da sigma faktor RpoS regulira opći odgovor na stres, cilj je

pripremiti mistranslatirajući soj s inaktivacijom gena *rpoS* kako bi odredili važnost proteina RpoS u prethodno uočenom pozitivnom utjecaju mistranslacije na odgovor bakterije *E. coli* na oksidacijski stres. Soj IleRS ED⁻ RpoS⁻ je pripremljen korištenjem metode P1 transdukcije, a praćenje krivulja rasta sojeva MG1655 (divlji tip soja), IleRS ED⁻ i IleRS ED⁻ RpoS⁻ omogućilo je uvid u stanične odgovore na mistranslaciju i oksidacijski stres.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Oksidacijski stres

2.1.1. Djelovanje reaktivnih kisikovih vrsta

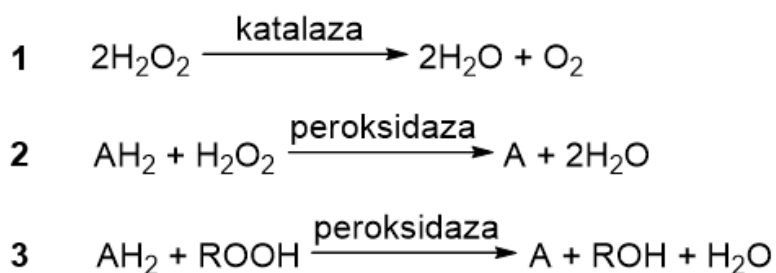
Oksidacijski stres je stanje u kojem je stanica izložena štetnoj količini vodikovog peroksida (H_2O_2), superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$) i hidroksilnog radikala (HO^{\cdot}) koji se zajednički nazivaju reaktivne kisikove vrste (ROS, engl. *reactive oxygen species*). Stanica održava nisku koncentraciju ROS-ova, no ona može porasti zbog unutarnjih (endogeni) ili vanjskih izvora (egzogeni). ROS-ovi nastaju kao neizbježna posljedica aerobnog života, a nusprodukti su raznih osnovnih, unutarstaničnih procesa, te sačinjavaju bazalnu koncentraciju ROS-ova. Najčešći izvor endogenih ROS-ova je stanično disanje pri čemu u lancu prijenosa elektrona dolazi do nepotpune redukcije kisika, te umjesto vode nastaju ROS-ovi. ROS-ovi iz unutarnjih izvora imaju ulogu u staničnoj signalizaciji i regulacijskim putevima te značajnu ulogu u sklopu imunološkog sustava, gdje NADPH oksidaza iz fagocita proizvodi velike količine superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$) kako bi se eliminirali invazivni patogeni.³ Egzogeni ROS-ovi nastaju u okolini, primjerice, kao produkt ionizirajućeg zračenja, uslijed zagađenja, djelovanjem metala te spojeva koji otpuštaju organizmi radi obrane ili stjecanja prednosti.

Pretjerana količina ROS-ova izaziva ireverzibilna oštećenja ili, u nekim slučajevima, smrt stanice tako što reagiraju s različitim komponentama stanice, primarno s lipidima, proteinima i DNA.³ U reakciji s membranskim lipidima, hidroksilni radikal oksidira nezasićeni lanac lipida te uz kisik dovodi do peroksidacije lipida koji potom u lančanoj reakciji reagiraju s ostalim nezasićenim lancima lipida te narušavaju integritet staničnih membrana. U DNA, ROS-ovi oksidiraju dušikove baze i deoksiribozu uvodeći fizikalno-kemijske promjene koji utječu na interpretaciju i prijenos informacije. S obzirom da proteini čine oko 70% suhe mase stanice, oni su glavna meta oksidacijskog stresa. ROS-ovi reagiraju s proteinima na primarno 3 načina: oduzimanjem vodikovog atoma iz C-H, S-H, N-H ili O-H veze čime nastaje radikal, oduzimanjem elektrona iz dijela molekule bogatog elektronima i dodavanjem elektrona u dijelove molekula bogate elektronima. Najčešće takve modifikacije proteina narušavaju

njihovu funkcionalnost, a rjeđe im dodaju novu funkciju. Također, ROS-ovi oksidiraju bočni lanac aminokiselina, cijepaju peptidnu vezu i dovode do agregacije proteina.^{3,4}

2.1.2. Odgovor na oksidacijski stres

Pri normalnim uvjetima, bakterija *Escherichia coli* je sposobna metabolizirati ROS-ove djelovanjem obrambenog sustava antioksidansa sačinjenog primarno od katalaza, koje kataliziraju razgradnju vodikovog peroksida na vodu i kisik, te peroksidaza koje kataliziraju redoks reakciju u kojoj se troši vodikov peroksid. Njihove reakcije prikazane su jednadžbama na slici 1.



Slika 1. Reakcije koje kataliziraju katalaze (**1**) i peroksidaze (**2** i **3**). AH_2 je reducens, a A njegov oksidirani oblik.

Kada količina ROS-ova nadmašuje kapacitet obrambenog sustava antioksidansa, dolazi do staničnog odgovora na oksidacijski stres. Potpuni odgovor stanica na oksidacijski stres još uvijek nije poznat, ali poznato je da, unatoč velikoj genomskoj raznolikosti različitih bakterijskih vrsta, glavnu ulogu imaju evolucijski očuvani regulacijski proteini OxyR, SoxR i RpoS, odnosno njihovi homolozi, što upućuje na važnost obrane od oksidacijskog stresa.⁵

OxyR je transkripcijski protein zadužen za regulaciju OxyR regulona. Prisutan je u citoplazmi te se u slučaju niske unutarstanične koncentracije ROS-ova nalazi u svojem reduciranom obliku. Osjetljiv je na povećanje koncentracije H_2O_2 . H_2O_2 ga oksidira te mu pritom mijenja konformaciju. Promjenom konformacije, OxyR se, kooperativno s RNA polimerazom, veže na DNA. Uspješnim vezanjem oksidiranog oblika OxyR, pospješuje se ekspresija gena u OxyR regulonu. OxyR regulon je sustav za brzi odgovor aktiviran unutar

nekoliko minuta nakon izloženosti oksidacijskom stresu u kojem se nalazi 38 gena predviđenih za detoksifikaciju od ROS-ova, popravak oštećene DNA i održavanje stanične homeostaze, uključujući *katG* i *ahpCF* gene za katalazu KatG i alkil-hidroperoksid reduktazu AhpCF. OxyR pozitivno regulira 28 gena i suprimira ekspresiju 10 gena. OxyR negativno regulira ekspresiju samog sebe mehanizmom povratne sprege.⁶

SoxRS je također regulacijski sustav odgovora na oksidacijski stres koji djeluje u dvije faze. U prvoj fazi se transkripcijski faktor SoxR u svojem reduciranom obliku veže na specifično promotorsko mjesto u DNA te se aktivira oksidacijom s različitim produktima oksidacijskog stresa. Nadalje, dolazi do restrukturiranja razmaknice spomenutog promotora te se inducira ekspresija *soxS*. U drugoj fazi, SoxS aktivira ekspresiju gena unutar SoxRS regulona. SoxR aktiviraju agensi generirani iz reakcije sa superoksidom ($O_2^{\cdot-}$) i radikali dušikovog (II) oksida (NO^{\cdot}) tako što oksidiraju, odnosno nitroziliraju, dva ključna [2Fe–2S] klustera u SoxR te dovedu do njegove konformacijske promjene. Osim superoksida i radikala dušikovog (II) oksida, novija istraživanja upućuju na to da je SoxR direktno ili indirektno osjetljiv i na prisutnost visokih koncentracija H_2O_2 . U slučaju aktivacije SoxR dolazi do povećanja razine dva antioksidansa iz SoxRS regulona, superoksid-dismutaze (SOD) i glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze (G6PDH) za 50-60%. SoxRS regulon sadrži preko 100 gena s time da se nezanemariv broj gena preklapa s OxyR regulonom i ostalim regulacijskim mrežama.^{7,8}

2.1.3. *RpoS regulon*

RpoS je sigma faktor RNA-polimeraze koji ima centralnu ulogu u općem odgovoru stanice na stres, odnosno u globalnoj adaptaciji bakterije na neoptimalne uvjete rasta i različite stresore. Također, ulaskom stanice u stacionarnu fazu, znatno se povećava ekspresija RpoS. Glavna zadaća mu je regulacija brojnih genskih sustava, uključujući one koji utječu na patogenezu, fenotip stanice, metaboličke puteve u stacionarnoj fazi i formaciju biofilma te ekspresiju gena potrebnih za preživljavanje u slučaju nedostatka nutrijenata. Nadalje, regulira ekspresiju virulentnih faktora, proteina za otpornost na kiseline i osmotski tlak, uključujući oksidacijski stres. Za razliku od OxyR i SoxR koji se aktiviraju oksidacijom te tako induciraju transkripciju svog regulona, RpoS nije potrebno aktivirati kako bi omogućio vezanje RNA-polimeraze na RpoS-ovisna promotorska mjesta na DNA i transkripciju RpoS regulona. RpoS regulon je sačinjen od preko 200 gena od kojih je 13 gena zajedničko OxyR regulonu. Kako bi se omogućila suvisla regulacija zajedničkih gena, razvila se dodatna regulacija između RpoS i

OxyR. Djelomično, regulacija se odvija na translacijskoj razini gdje OxyR negativno regulira translaciju RpoS.⁹ RpoS je reguliran na svim razinama: transkripcijskoj, translacijskoj te mu je regulirana aktivnost i razgradnja.

Unatoč ulozi u globalnoj adaptaciji stanice na razne stresore, niti RpoS, niti geni koje eksprimira nisu jednoznačni po obliku i funkciji među bakterijama, niti esencijalni za vijabilnost stanice. RpoS je polimorfan, odnosno sastav RpoS regulona i mehanizmi RpoS regulacije variraju čak unutar samih sojeva bakterije *E. coli*. Razlog tome je što globalna adaptacija zahtijeva značajno metaboličko obvezivanje na *de novo* ekspresiju novih proteina pri čemu selekcijski pritisak promiče efikasnu prilagodbu regulacijskog sustava na potrebe stanice u specifičnim uvjetima okoline. Iz tog razloga, nastavlja biti izazovno u potpunosti okarakterizirati mehanizam i sastav RpoS regulona.^{5,10}

2.2. Mistranslacija

Proteini su zaslužni za gotovo sve funkcije u stanici. Među ostalim, djeluju kao katalizatori, signalni receptori, sklopke, motori, pumpe, itd. Promjena samo jedne aminokiseline u primarnoj strukturi može dovesti do bolesti organizma, kao što je slučaj kod bolesti anemije srpastih stanica gdje je glutamat na poziciji 6 u β -globinu mutiran u valin.¹¹ U svim domenama života postoje mehanizmi kontrole kvalitete transliranih proteina, a uključuju molekulske šaperone, koji sudjeluju u smatanju proteina i sprječavaju nastajanje agregata, proteasomsku razgradnju ubikvitinom obilježenih proteina i autofagiju, koji razgrađuju pogrešno smotane proteine i agregate.¹²

Za točnu sintezu polipeptidnog lanca proteina potrebna je suradnja velikog broja molekula u stanici. Najprije, nužna je točnost genetske informacije kodirane u DNA, stoga u stanicama postoje mehanizmi koji sprječavaju i popravljaju mutacije. Mutacije su promjene nukleotidnog slijeda DNA, a mogu se dogoditi prilikom popravka oštećenog dijela DNA ili tijekom replikacije. Replikaciju u bakteriji *E. coli* vrši enzim DNA-polimeraza koja ima posebnu domenu za ispravak pogrešno ugrađenog nukleotida. Domena ima ulogu egzonukleaze, a ispravlja pogrešku tako što izreže pogrešno ugrađeni nukleotid. Iznos pogreške na razini replikacije iznosi 10^{-8} . I RNA-polimeraza može prepoznati i ispraviti svoje pogreške tijekom transkripcije DNA u mRNA, s time da je vjernost transkripcije manja u odnosu na replikaciju (10^{-5}).

Translacija je stanični proces u kojem se genetske informacija kodirana u mRNA translacija u aminokiselinski slijed. U tom procesu može doći i do ugradnje pogrešne aminokiseline u peptid, odnosno do mistranslacije. Razina mistranslacije može se razlikovati ovisno o različitim organizmima i različitim uvjetima rasta. U nekim organizmima je povišena u normalnim uvjetima rasta, no može biti i inducirana okolinom ili genetskim manipulacijama u laboratoriju. Često citirana vrijednost učestalosti pogreške u translaciji je 10^{-4} . Ovisno o vrsti mistranslacije, postoje tri vrste: lokalna, regionalna i globalna mistranslacija. Lokalna mistranslacija je pogrešno čitanje jednog kodona, regionalna (specifična) mistranslacija je zamjena dvije ili više aminokiselina na predvidljiv način neovisno o kodonu, a globalna mistranslacija je posljedica opće, nasumične pogreške mašinerije za biosintezu proteina. Do mistranslacije može doći na više načina. Pogreške na razini ribosoma događaju se s učestalošću 10^{-4} i izazivaju globalnu mistranslaciju, a radi se o sparivanju pogrešne aminoacil-tRNA s kodonom mRNA koja se translacija. Značajnija greška koja se može dogoditi na ribosomu je pomicanje okvira čitanja zbog proklizavanja ribosoma.^{13,14} Točnost translacije na ribosomu mogu narušiti antibiotici te uzrokovati štetne posljedice.¹⁵ Također, do pogreške može doći i na razini aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS). Učestalost pogreške je $3 * 10^{-4}$, no može se razlikovati ovisno o aaRS, organizmu i uvjetima rasta.¹⁴

Mistranslatirani proteini su ponekad pogrešno smotani, stoga im je narušena struktura ili su nefunkcionalni, što štetno utječe na stanicu. Unatoč tim posljedicama, mistranslacija proteina je češća nego što bi se očekivalo. U principu, povećana mistranslacija je inducirana neravnotežnom dostupnošću supstrata (kanonskih aminokiselina). U nekim prirodnim sojevima bakterije *E. coli*, inducirana je nedostatkom ugljika, oksidacijskim stresom, aminoglikozidima ili virusnom infekcijom, ali još nije poznato koji sve uvjeti i do koje mjere izazivaju mistranslaciju.¹⁶

2.2.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Aminoacil-tRNA-sintetaze kataliziraju kovalentno vezanje aminokiseline na odgovarajuću tRNA. Supstrati aminoacilacije su jedna proteinogena aminokiselina, ATP te sve pripadne izoakceptorske tRNA. Reakcija se odvija u dva koraka. Prvo aaRS u svoju sintetsku domenu veže aminokiselinu i ATP u reakciji aktivacije aminokiseline pri čemu nastaje intermedijer aminoacil-adenilat (aa-AMP) i oslobađa se pirofosfat, a zatim slijedi prijenos aminoacilne

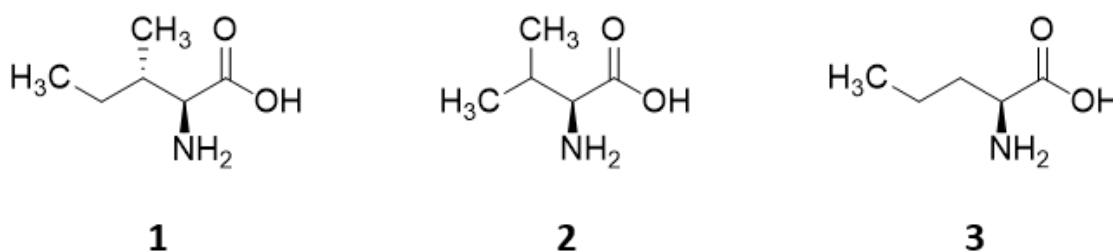
skupine na tRNA pri čemu nastaje produkt aminoacil-tRNA (aa-tRNA). Većina stanica ima 20 aaRS koje su podijeljene u dva razreda.¹⁷ U razred I spada 10 aaRS s karakterističnim Rossmannovim naborom u katalitičkoj domeni, dok u razred II spada ostalih 10 aaRS kojima je zajednička anti-paralelna β -ploča okružena α -zavojnica. Također, razlika između dva razreda je u tome što aaRS iz razreda I kataliziraju reakciju aminoacilacije vezanjem aminokiseline na 2'-OH A76 tRNA, dok razreda II preferiraju 3'-OH, osim fenilalanil-tRNA-sintetaze koja preferira 2'-OH A76 tRNA. U slučaju aaRS razreda I, limitirajući korak brzine aaRS je disocijacija produkta aa-tRNA, osim u slučaju nediskriminirajuće GluRS i IleRS, dok je kod aaRS klase II limitirajući korak aktivacija aminokiseline. Osim treonil-tRNA-sintetaze i triptofanil-tRNA-sintetaze koje su homodimeri, aaRS razreda I su monomeri, dok su aaRS razreda II dimeri ili multimeri. Razred I i razred II se također razlikuju u orijentaciji vezane tRNA, aaRS razreda I vežu manji utor akceptorske peteljke tRNA, dok aaRS razreda II vežu veći utor. Nadalje, aaRS su podijeljene u podkategorije ovisno o homologiji primarnog slijeda.¹⁸

Do pogreške u aminoaciliranju može doći ukoliko aaRS u sintetsko mjesto veže i aktivira pogrešnu aminokiselinu te je prenese na tRNA ili ako ispravno aktiviranu aminokiselinu veže na nepripadnu tRNA. Veći izazov za aaRS je diskriminacija između strukturno sličnih aminokiselina nego između pripadne i nepripadne tRNA. Razlog tome je što aaRS prepoznaju kompleksnije i veće tRNA pomoću elemenata identiteta dok pripadnu aminokiselinu prepoznaju samo prema bočnom lancu.¹⁹ Efikasnost diskriminacije nepripadne aminokiseline naspram pripadne aminokiseline u sintetskom mjestu određena je diskriminacijskim faktorom ($D = k_{\text{cat}}(\text{pripadna ak})/K_M(\text{pripadna}) / k_{\text{cat}}(\text{nepripadna})/K_M(\text{nepripadna})$), pri čemu veći iznos diskriminacijskog faktora označava bolju diskriminaciju nepripadne aminokiseline. Deset aaRS ima visoku specifičnost za pripadnu aminokiselinu, dok ostalih deset nema dovoljnu specifičnost za pripadnu aminokiselinu i mogu ponekad aktivirati nepripadnu aminokiselinu. Stoga su te aaRS razvile mehanizme popravka greške. Neke od tih aaRS su u sintetskom mjestu razvile dodatnu aktivnost te kataliziraju hidrolizu nepripadnog aa-AMP-a prije prijenosa nepripadne aminoacilne skupine na tRNA. Ova aktivnost naziva se popravak pogreške prije prijenosa. Od spomenutih deset aaRS, sedam ih također posjeduje domenu za popravak pogreške nakon prijenosa na tRNA (ED, engl. *post-transfer editing domain*). To su valil- (ValRS), leucil- (LeuRS), treonil-, alanil-, fenilalanil-, prolil- te izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS).¹⁴ Ovakav mehanizam provjere točnosti aaRS naziva se model dvostrukog sita, pritom

prvo sito čini sintetsko mjesto, a drugo mjesto za popravak pogreške. Točnost aaRS može se razlikovati te su aaRS u nekim organizmima izgubile sposobnost popravka pogreške nakon prijenosa. To je slučaj nekih mitohondrijskih aaRS i čest je slučaj kod parazita.^{20–22} Te aaRS imaju veću razinu pogreške što je pokazatelj da se u nekim slučajevima visoka razina mistranslacije može tolerirati ili čak ima pozitivne učinke (detaljnije u poglavlju 2.2.3. Adaptivni utjecaj mistranslacije u odgovoru na drugi stres). Točnost aaRS ovisi o uvjetima rasta stanice. U oksidacijskom stresu povećana je razina mistranslacije treonina serinom zbog oksidacije cisteina u aktivnom mjestu domene za popravak pogreške u ThrRS koja onemogućuje hidrolizu Ser-tRNA^{Thr}. U oksidacijskom stresu također se može oksidirati Phe do neproteinogene toksične aminokiseline *meta*-Tyr kojom PheRS nabija pripadnu tRNA^{Phe}, no većinom sprječava ugradnju *meta*-Tyr zahvaljujući popravku pogreške nakon prijenosa.

2.2.2. Isoleucil-tRNA sintetaza

IleRS katalizira kovalentno vezanje pripadne aminokiseline izoleucina (Ile) i tRNA^{Ile}. IleRS iz bakterije *E. coli* u primarnoj sekvenci ima 938 aminokiselina (NCBI: CUU93037.1) i spada u razred Ia aaRS zajedno s arginil-tRNA-sintetazom, metionil-tRNA-sintetazom, cisteinil-tRNA-sintetazom, LeuRS i ValRS. Kao što je napomenuto u prethodnom poglavlju, posjeduje sintetsku domenu i domenu za popravak pogreške nakon prijenosa na tRNA. Osim pripadne aminokiseline Ile, IleRS u značajnim količinama aktivira strukturno slične aminokiseline valin i norvalin koje, kao i Ile, imaju hidrofobne bočne ogranke (slika 2).



Slika 2. Strukture L-izoleucina (1), L-valina (2) i L-norvalina (3).

Norvalin je neproteinogena aminokiselina koju stanica proizvodi u mikroaerobnim uvjetima kao nusprodukt sinteze razgranatih aminokiselina²³ te je pokazano da je izuzetno toksičan u sojevima bakterije *E. coli* s defektnom domenom za popravak pogreške (ED) u LeuRS²⁴ i IleRS.²⁵ IleRS aktivira Val i Nva s diskriminacijskim faktorom 150, odnosno 240. Popravak pogreške prije prijenosa na tRNA u IleRS katalizira hidrolizu Val-AMP-a i Nva-AMP-a.^{14,26} Unatoč popravku pogreške prije prijenosa, u značajnim količinama nastaju Val-tRNA^{Ile} i Nva-tRNA^{Ile}, no IleRS održava nisku razinu mistranslacije zahvaljujući ED koja katalizira hidrolizu pogrešno aminoacilirane tRNA.

Prethodnim istraživanjima pokazano je da je brzina deacilacije Nva-tRNA^{Ile} ($k_{\text{deacil}} = 85 \pm 10 \text{ s}^{-1}$) dvostruko veća nego Val-tRNA^{Ile} ($k_{\text{deacil}} = 49 \pm 6 \text{ s}^{-1}$). Pretpostavlja se da je mjesto za popravak pogreške prvenstveno evoluiralo prema povećanju efikasnosti hidrolize Nva-tRNA^{Ile}, posebno s obzirom na to da mjesto za popravak pogreške uspostavlja više interakcija s Nva-tRNA^{Ile} nego Val-tRNA^{Ile}. Mutirana inačica IleRS T243R/D342A, koja je korištena u ovom istraživanju, pokazala je 10^4 puta manju brzinu hidrolize Nva-tRNA^{Ile} u odnosu na divlji tip IleRS ($k_{\text{deacil}} = 0.0046 \text{ s}^{-1}$). Zbog uvedenih mutacija u mjesto za popravak pogreške, povećana je razina mistranslacije. U soju PS7066 s mutiranom inaktivnom domenom za popravak pogreške, u kojoj je peptid N241-N250 u domeni za popravak pogreške zamijenjen s 10 Ala (IleRSAla10), podjednaka razina mistranslacije izoleucina valinom i norvalinom ima značajno različit toksični utjecaj, primjerice, 14 % mistranslacije norvalinom vodi do četiri puta niže vijabilnosti u odnosu na 19 % mistranslacije valinom. Također je pokazano da je s inaktivnom domenom za popravak pogreške učestalost *in vivo* mistranslacije izoleucina valinom i norvalinom dodanim u jednakim koncentracijama sličan što znači da Val i Nva podjednako kompetiraju za vezno mjesto za Ile.²⁵

2.2.3. Adaptivni utjecaj mistranslacije u odgovoru na drugi stres

Ponekad povećana mistranslacija ima pozitivan učinak na rast i preživljenje stanice. Razina mistranslacije je u nekim organizmima veća te je pokazano da ima povoljan utjecaj u uvjetima stresa. Primjerice, neke vrste roda *Candida* leucinski kodon CUG dekodiraju kao serin što vodi do povećane tolerancije na stres u uvjetima izlaganja plumbaginu, H₂O₂, NaCl, teškim metalima (arsenit, kadmijeva sol) te fungicidu cikloheksimidu.²⁷ Povećana mistranslacija je uočena i u *Mycoplasma* parazitima te se pretpostavlja da mistranslacija pomaže parazitima u generiranju

raznolikih antigena što im omogućuje izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina.^{28,29} U stanicama sisavaca primijećena je povećana ugradnja metionina u proteom kao odgovor na oksidacijski stres. Metionin se može reverzibilno oksidirati te na taj način pomaže u smanjenju oksidacijske štete.^{30,31} Povećana bazalna mistranslacija u mutiranim sojevima *E. coli* povećava toleranciju na toplinski,³² UV, antibiotski³³ i oksidacijski stres.¹⁶ U navedenim primjerima povećane tolerancije na stres uslijed mistranslacije u *E. coli*, radi se o globalnoj mistranslaciji koja je izazvana mutacijama na ribosomskom proteinu ili delecijom tri od četiri inicijatorske tRNA.

Specifična mistranslacija može biti izazvana uvođenjem mutacija u domenu za popravak pogreške u aaRS. Ova istraživanja su također dovela do uočavanja povoljnog utjecaja mistranslacije u drugom stresu. Primjerice, pogrešna ugradnja *meta*-Tyr u *E. coli* s mutiranom PheRS u domeni za popravak pogreške vodi do povećane razine još neistraženog regulona povezanog s odgovorom na stres, *htrA*.³⁴ Također, unatoč štetnosti pogrešne ugradnje Val i pogotovo Nva umjesto Ile, istraživanje je pokazalo da uvođenjem mutacije u domenu za popravak pogreške u *ileS* (IleRS10Ala) u *E. coli* soj, koji je auksotrof za Ile, Leu i Val, dodatak Val ili Nva vodi do većeg broja vijabilnih stanica mistranslatirajućeg soja u odnosu na soj s divljim tipom *ileS* u stacionarnoj fazi. Previsoke koncentracije su se u konačnici pokazale toksične, no niže koncentracije su pokazale da, unatoč kasnijem ulasku u eksponencijalnu fazu, mistranslatirajući soj ima veću brzinu rasta i može u stacionarnoj fazi prerasti bakterije s divljim tipom enzima IleRS.³⁵ Isti gen ukloniran u soj bakterije *Acinetobacter baylyi*, koji je auksotrof za Ile, Val i Leu, uzrokuje veću brzinu rasta ako je u medij dodan Val u odnosu na divlji tip IleRS.³⁶ Mogućnost ugradnje neprikladnih aminokiselina se pokazala korisna pri niskim koncentracijama kada organizam nema drugi izvor nutrijenata. Mistranslatirajući soj *E. coli* koji eksprimira IleRS10Ala nije pokazao veću rezistenciju na antibiotike u odnosu na divlji soj te je neznatna razlika u uvjetima s povećanom koncentracijom soli, kiselina, baza, CaCl₂, hidroklorida, dimetilformamida.³⁷ No u našem laboratoriju otkriveno je da povećana mistranslacija izoleucina valinom ili norvalinom u soju *E. coli* koji eksprimira mutiranu inačicu IleRS s mutacijom u domeni za popravak pogreške T243R/D342A (nadalje IleRS ED⁻) omogućuje povećanu rezistenciju na oksidacijski stres (neobjavljeni rezultati).

Pretpostavlja se da je povećana razina mistranslacije indikativna promjeni uvjeta okoline te signalizira stanici da je potrebno aktivirati odgovor na stres. Primarni odgovor je opći odgovor na stres reguliran RpoS regulonom koji dovodi do kaskade drugih odgovora koji štite stanice

od različitih stresora.³² Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdio cjeloviti adaptivni mehanizam na različite tipove mistranslacije i njihovu toksičnost.

2.3. PCR

Lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je *in vitro* metoda umnažanja određenog fragmenta nukleinske kiseline. Temelji se na funkciji termostabilne DNA polimeraze koja replicira specifični dio ili cijeli kalup DNA uz pomoć početnica i nukleotida (dNTP). Metodu je razvio američki biokemičar 1983. godine čime je pokrenuta revolucija u biološkim znanostima. Naime, prije razvoja PCR-a, jedini način umnažanja nekog fragmenta bilo je moguće klasičnim kloniranjem koje je dugotrajan proces i na kraju iziskuje izolaciju i pročišćavanje željenog produkta. PCR omogućuje detekciju i proizvodnju velikih količina DNA višestrukim umnažanjem određenog DNA fragmenta unutar nekoliko sati pri čemu se često izbjegava potreba za izolacijom i pročišćavanjem. Umnažanje specifičnog DNA fragmenta može se provesti iz male količine kalupa. Primjenjuje se za razne medicinske i znanstvene svrhe, primjerice, za dijagnosticiranje bolesti, detekciju patogena, kloniranje, sekvenciranje gena, forenziku i druge svrhe.³⁸

PCR je dobio ime po specifičnoj, cikličkoj reakciji koja se odvija u uređaju za PCR u tri koraka. Najprije se povišenjem temperature denaturira dvolančana DNA. Snižavanjem temperature dolazi do sljepljivanja početnica. Naposljetku, DNA-polimeraza pomoću sljepljenih početnica sintetizira komplementarni lanac. Postupak se ponavlja u sljedećem ciklusu, ali s dvostruko više kalupa (dvolančanih DNA) zbog čega je svega 20 ciklusa dovoljno za sintezu 10^6 kopija produkta. Reakcija staje zbog ograničene količine enzima i ostalih komponenti ili smanjene aktivnosti DNA-polimeraze. Najpoznatija termostabilna DNA-polimeraza je *Taq*-DNA-polimeraza iz termofilnog mikroorganizma *Thermus aquaticus* otkrivenom u nacionalnom parku Yellowstone. Ukoliko je vjernost sinteze od iznimne važnosti, koriste se druge termostabilne DNA polimeraze kao na primjer *Pfu*-DNA-polimeraza izolirana iz arheje *Pyrococcus furiosus*. Svaka DNA polimeraza zahtijeva posebne uvjete za optimalni rad, stoga su komercijalno dostupne u sklopu pufera s različitim pH i koncentracijom Mg^{2+} iona. Ioni Mg^{2+} stvaraju komplekse s dNTP-ovima i ujedno služe kao kofaktori DNA-polimeraze. Ključni koraci u PCR reakciji su denaturacija dvolančane DNA i sljepljivanje početnica. Preniska temperatura dovodi do nepotpune denaturacije kalupa, stoga dozvoljava ponovno prijanjanje denaturiranih dijelova te naposljetku smanjenog prinosa reakcije. S druge

strane, previsoka temperatura denaturacije nepotrebno šteti funkcionalnosti DNA-polimeraze. *Taq*-DNA-polimeraza ima znatno različit poluživot pri malim promjenama u temperaturi. Pri 92,5 °C poluživot joj je manji od 2 h, pri 95 °C 40 min, a pri 97,5 °C 5 min. Sljepljivanje početnica je također vrlo osjetljivo na temperaturu, što se uzima u obzir prilikom njihovog dizajna. Temperatura sljepljivanja početnice se procjenjuje na temelju njezine veličine i udjela GC parova, odnosno temperature mekšanja. Nadalje, produljenje početnica se obično provodi pri 72 °C, a broj ciklusa se limitira kako bi se umanjio broj i kompleksnost pozadinskih produkata. Unatoč brojnim pogodnostima, PCR ima svoje nedostatke. Zbog svoje izrazite osjetljivosti može dovesti do umnažanja kontaminacija koje se nalaze u malim količinama. Također, za dizajn početnica potrebno je već poznavati dijelove sekvence, a početnice se mogu slijepiti na komplementarno slične, ali netočne sekvence. Uz to, termostabilne DNA-polimeraze su sklone pogreškama.

Postoji više varijanti PCR metode s obzirom na potrebe eksperimenta. Neki od njih su višestruki (engl. *multiplex*) PCR, koji koristi nekoliko parova početnica za simultanu analizu više fragmenta u jednom uzorku, ugniježđeni (engl. *nested*) PCR, u kojem produkt prvog PCR-a služi kao kalup sljedećem PCR-u, *hot-start* PCR, u kojem se DNA-polimeraza dodaje nakon prvotne denaturacije, kvantitativni PCR (*real time* PCR), u kojem se u stvarnom vremenu prati umnažanje fragmenta, kolonijski PCR (engl. *colony-PCR*), u kojem su direktno pretražuju bakterijske kolonije za prisutnost odgovarajućeg fragmenta, i mnogi drugi.

2.4. Transdukcija

Bakteriofagi (skraćeno fagi) su virusi bakterija. Najbrojniji su entitet na svijetu. Fagi se sastoje od kapside i genetskog materijala. Razlikuju se po strukturi kapsida, vrsti genetskog materijala te prirodnom ciklusu života. Kao i svi ostali virusi, metabolički su neaktivni i preživljenje im u potpunosti ovisi o inficiranoj stanici za proizvodnju energije i proteina, odnosno za umnažanje. Život faga može biti lizogeni (temperirani fagi) ili litički ciklus (virulentni fagi). U litičkom ciklusu fag unosi svoj genetski materijal u stanici, sintetiziraju se enzimi koji razgrađuju bakterijsku DNA. Unutar genetskog materijala nalaze se svi geni potrebni za nastajanje novih faga u stanici. Fag koristi mašineriju bakterijske stanice za umnažanje vlastitog genoma i sintezu proteina. S vremenom se stanica raspadne, odnosno dođe do lize stanice, te omogućiti fagima da inficiraju ostale stanice. U lizogenom ciklusu fag ubrizgava svoj genetski materijal u stanicu domaćina te se rekombinira u genom domaćina i kao takav se umnaža s bakterijskim

genomom. Fag u takvom stanju naziva se profag te ne šteti stanici domaćina, dapače, štiti stanicu od infekcije drugim fagom. Prilikom replikacije stanice, profag se također replicira. U nepovoljnim uvjetima može doći do indukcije profaga te ulaska u litički ciklus. U litičkom ciklusu dolazi do ubrzane replikacije i izgradnje novih faga u citoplazmi, razgradnje DNA domaćina te, naposljetku, puknuća stanice. Neki od najpoznatijih temperiranih faga su λ i P1 fag.

Fagi mogu slučajno ugraditi dio bakterijske DNA te prenijeti genetsku informaciju u novu stanicu domaćina. Ovaj način prijenosa genetske informacije naziva se transdukcija. Virulentni fagi dovode do opće, a temperirani najčešće do specijalne transdukcije. U općoj transdukciji dolazi do nasumičnog upakiravanja malih komadića genomske DNA domaćina u novoizgrađene fage, dok u specijalnoj transdukciji, prilikom izrezivanja profaga, mali komadić genomske DNA se upakira uz genetsku informaciju faga. S obzirom da se profag nalazi u specifičnim dijelovima genoma, dijelovi DNA domaćina koji se prenose su specifični po čemu je specijalna transdukcija dobila naziv. Iznimka je P1 fag koji je temperirani fag, ali može posredovati općoj transdukciji između bakterija *E. coli* i drugih gram-negativnih bakterija. Također, P1 fag ne integrira svoju dvolančanu DNA u genom domaćina kao tipičan temperirani fag, već se cirkularizira te replicira kao plazmid.^{39,40}

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Agar (*Liofilchem*, 61101), agarozna (Carl Roth, 3810.3), EDTA- $\text{Na}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, p.a. (*Kemika*, 1136808), glicerol, redestilirani, 100 %, p.a. (*Kemika*, 0711901), glukoza, p.a. (*Gram-Mol*, 50-99-7), kalcijev klorid (CaCl_2), p.a. (*Kemika*, 11540), kanamicin-sulfat (*Gibco BRL Life Technologies*, 11815-032), kvašćev ekstrakt (*Liofilchem*), M9 minimalne soli (*Becton, Dickenson and Company*, 248510), magnezijev sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), p.a. (*Kemika*, 1303406), marker za agaroznu elektroforezu (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, SM0313), natrijev acetat (CH_3COONa), p.a. (*Gram-Mol*, P143420), natrijev citrat dihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), p.a. (*Kemika*, 1405407), natrijev klorid (NaCl), p.a. (*Gram-Mol*, P148520), tetraciklin hidroklorid (*Sigma-Aldrich*, T-3383), tiamin hidroklorid, p.a. (*Sigma-Aldrich*, T1270), tripton (*Liofilchem*, 611004), vodikov peroksid (H_2O_2), 30% (*Kemika*, 2107806).

3.1.2. Instrumenti

Autoklav (*Systec DX-150, Systec*), CCD kamera (*ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad*), centrifuga (SL 16R Centrifuge, *Thermo Scientific*), čitač mikrotitarskih pločica (*SpectraMax iD3, Molecular Devices*), fluorescentni mikroskop (*Olympus BX51, Olympus*), inkubator (*Digitheat 2001243, JP Selecta.*), PCR uređaj (T100 *Thermo Cycler, Bio-Rad*), spektrofotometar (*Evolution 60S, Thermo Scientific*), tresilica (*MaxQ 420 HP, Thermo Scientific*), uređaj za agaroznu elektroforezu (EPS 600 *Electrophoresis Power Supply, 120 V, Pharmacia Biotech*), vaga (*Electronic Balance FA-200, AND Company*).

3.1.3. Bakteriofagi

Lizat donorskog soja STL7291 inficiran P1 bakteriofagom (*rpoS::Tn10*), 10^9 - 10^{10} pfu cm^{-3} .

3.1.4. Aminokiseline, nukleotidi i enzimi

Taq-DNA-polimeraza (*Thermo Scientific*, EPO404), dNTP (ekvimolarna smjesa dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Thermo Scientific*, R0192), izoleucin (*Sigma-Aldrich*, I7383) leucin (*Sigma-Aldrich*, L1512), norvalin (*Sigma-Aldrich*, N7627), valin (*Sigma-Aldrich*, V0500).

3.1.5. Boje

6x boja za nanošenje uzorka pripremljena je razrjeđivanjem boje *GelRed* (*Biotium*, 41003) u puferu konačnog sastava sastava 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7,6, 0,03% (w/v) bromfenol plavo (BFB) (*Serva*, 15375), 0,03% (w/v) ksilencijanil-fluorofosfat (XCFF) (*Serva*, 38505), 60 mmol/L EDTA i 60% glicerol.

3.1.6. Početnice

Početnice su naručene od komercijalnog proizvođača (*Macrogen*): rpoS_for (5' – GCAAAGTGATCGAAACCTTTGG – 3'), rpoS_rev (5' – ACCTGCCTCTGTTACCAGC – 3'), Tn10 (5' – GTTCGCACATCTTGTTGTCTG – 3').

3.1.7. Hranjivi mediji za uzgoj bakterija

Kruti LB medij pripremljen je otapanjem triptona ($\gamma = 10$ g/L), kvašćevog ekstrakta ($\gamma = 5$ g/L), NaCl ($\gamma = 10$ g/L) i agara ($\gamma = 20$ g/L) u vodi i zatim steriliziran u autoklavu 20 min na 121 °C. Za pripremu LB ploča s antibioticima potrebnima u transdukciji, nakon autoklaviranja u LB medij je dodan tetraciklin (10 μ g/mL) ili kanamicin (30 μ g/mL).

3.1.8. Minimalni M9 mediji za uzgoj bakterija

Minimalni M9 medij pripremljen je otapanjem M9 soli (47,8 mmol/L Na₂HPO₄, 22,0 mmol/L KH₂PO₄, 8,6 mmol/L NaCl, 18,7 mmol/L NH₄Cl), glukoze (0,4 %), MgSO₄ (2 mmol/L), CaCl₂ (0,1 mmol/L) i tiamin hidroklorid (50 μ mol/L). Zbog pseudoauksotrofije za izoleucin u medij je dodan izoleucin (100 μ mol/L), leucin (100 μ mol/L) i valin (100 μ mol/L).

3.1.9. Bakterijski sojevi

MG1655 (F^- λ $ilvG^-$ $rfb-50$ $rph-1$): nepatogeni laboratorijski soj, najbliži divljem tipu bakterije *E. coli*.

IleRS ED⁻: MG1655 *ileSed⁻ kan^R* (F^- λ $ilvG^-$ $rfb-50$ $rph-1$ T243R/D342A IleRS), laboratorijski soj, varijanta MG1655 soja koji ima nefunkcionalnu domenu za popravak pogreške nakon prijenosa IleRS zbog dvije aminokiselinske promjene T243R i D342A.

IleRS ED⁻ RpoS⁻: MG1655 *ileSed⁻ kan^R* (F^- λ $ilvG^-$ $rfb-50$ $rph-1$ T243R/D342A IleRS *rpoS::Tn10*), derivat soja IleRS ED⁻ pripremljen u ovom diplomskom radu. U gen *rpoS* ugrađen je transpozon Tn10 koji nosi rezistenciju na tetraciklin te ne dolazi do ekspresije funkcionalnog RpoS.

3.2. Metode rada s bakterijama

3.2.1. Rad u sterilnim uvjetima

Za rad u sterilnim uvjetima korišten je laminar te su površina laminara i korišteni pribor sterilizirani 70 %-tnim etanolom. Mediji i otopine su sterilizirani u autoklavu.

3.2.2. Rad s bakterijama

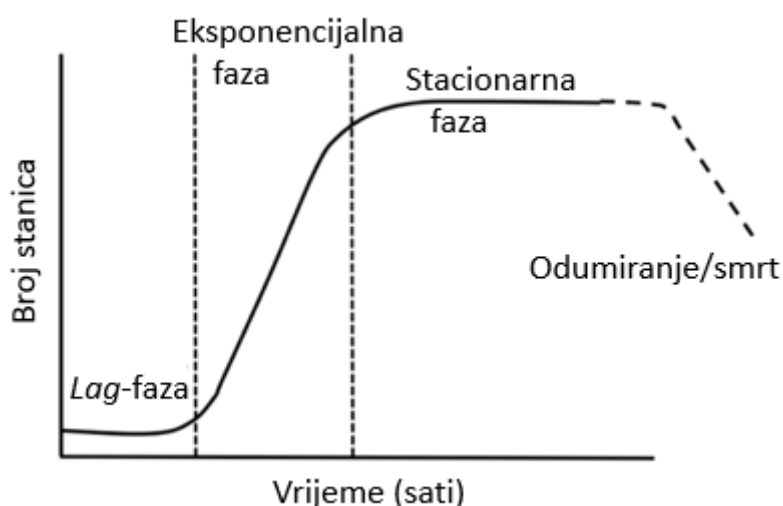
Za pripremu glicerolske kulture, uzgojena je prekonoćna kultura koja se izmiješa 1:1 s 50 % glicerolom i zamrzne na -80 °C. Za eksperimente je korištena bakterijska kultura iz pojedinačne kolonije na LB ploči. Za razmazivanje glicerolskih kultura na ploče, korištena je eza koja se temeljito sterilizira šušćim plamenom te se ohladi prislanjanjem na kruti medij. LB ploče se inkubiraju oko 16 sati pri 37 °C. Nakon što kolonije narastu, ploča se do upotrebe čuva na 4 °C, a ista ploča se koristi najviše sedam dana.

3.2.3. Određivanje krivulje rasta

Za mjerenje krivulja rasta, uzgojena je predkultura u sterilnoj konusnoj epruveti u 5 mL M9 medija + 100 μM ILV inokulacijom pojedinačne kolonije pomoću sterilnog nastavka mikropipete. Uzgoj predkulture je trajao oko 10 sati. Iz iste predkulture pripremljene su prekonoćne kulture razrjeđivanjem do iste vrijednosti $OD_{600} = 0,01$ u 4 mL M9 medija bez ili

s različitim koncentracijama Val/Nva (0,25, 0,50, 0,75 i 1,00 mM). Prekonočne kulture su zatim razrijeđene u svježem M9 mediju bez Val/Nva do $OD_{600} = 0,1$, alikvoti od 1 mL su dodani u mikrotitarsku pločicu od 24 jažice (Falcon, 353047). Za potrebe indukcije oksidacijskog stresa dodan je H_2O_2 tako da konačna koncentracija bude 1 mM. Tijekom 24 sata mjeri se OD_{600} u čitaču mikrotitarskih pločica. Predkulture i prekonočne kulture su uzgojene u tresilici pri $37\text{ }^\circ\text{C}$ i 250 rpm, za mjerenje krivulja rasta kulture su uzgojene u čitaču mikrotitarskih pločica pri $37\text{ }^\circ\text{C}$ i srednje jakim intenzitetom orbitalnog miješanja. OD_{600} je optička gustoća (engl. *optical density*) stanica pri 600 nm koja je proporcionalna broju bakterijskih stanica.

Tipična krivulja rasta bakterija ima četiri faze: lag-fazu ili fazu prilagodbe, eksponencijalnu ili log fazu, stacionarnu fazu i fazu odumiranja (slika 3). U fazi prilagodbe stanice se još nisu počele intenzivno dijeliti, već se bakterije prilagođavaju na medij i uvjete inkubacije. U eksponencijalnoj fazi rasta broj stanica povećava se eksponencijalno; dioba stanica se odvija konstantnom brzinom, te se broj stanica udvostručuje u određenom vremenskom razmaku. U stacionarnoj fazi stanice se prestaju intenzivno dijeliti zbog smanjene količine hranjivih tvari i akumulacije toksičnih produkata; brzina rasta jednaka je brzini odumiranja. U fazi odumiranja stanice ubrzano ugibaju zbog istrošenosti svih hranjivih tvari i velike količine toksičnih metaboličkih nusprodukata.



Slika 3. Krivulja rasta bakterijskih stanica. Preuzeto i prilagođeno prema https://www.researchgate.net/publication/335378365_Rivalry_in_Sibling_Bacillus_subtilis_Colonies_Enemy_or_Family/figures?lo=1&utm_source=google&utm_medium=organic

3.2.4. Mikroskopija

Na predmetno stakalce doda se 5 μL prekonoćne kulture. Slike bakterijskih stanica snimljene su s povećanjem 400x.

3.2.5. P1 transdukcija

Uzgoji se prekonoćna kultura primateljskog soja *E. coli* IleRS ED⁻. Prekonoćna kultura se razrijedi 20x u 10 mL M9 medija i uzgaja u termostatiranoj tresilici do OD₆₅₀ = 0,8. Zatim se prenese u konusnu epruvetu od 15 mL i centrifugira na 4500 xg 6 min pri 4 °C. Supernatant se odlije, a talog resuspendira u 1 mL MC otopine (5 mmol dm⁻³ CaCl₂, 100 mmol dm⁻³ MgSO₄ x 7 H₂O) i ostavi 5-10 min na sobnoj temperaturi. Otpipetira se 0,2 mL stanica u četiri zasebne mikroeprevete. U prvi mikroeprevetu se doda 100 μL , u drugu 200 μL , a u treću 300 μL P1 lizata (10⁹-10¹⁰ pfu/mL). Četvrta se ostavi kao neinficirana kontrola. Sva četiri uzorka se inkubiraju pri 37 °C 25-30 min u termostatiranoj kupelji. U međuvremenu se pripreme LB ploče s dodanim tetraciklinom (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) te se otopi 0,6 %-tni agar s kojim će se miješati svaki uzorak prije nanošenja na ploče. Inficirane stanice se maknu s kupelji te se doda 0,2 mL Na₃C₆H₅O₇ (*c* = 1 mol dm⁻³) kako bi se zaustavila infekcija. Odmah potom stanice se miješaju s 3,5 mL 0,6 %-tnim agarom te izliju na LB + Tc ploče. Inkubiraju se 1 do 2 dana pri 37 °C. Kao kontrola sterilnosti P1 lizata, lizat se pomiješa s 0,6 %-tnim agarom te nanese na LB ploču s tetraciklinom. Također, neinficirani primateljski soj IleRS ED⁻ se pomiješa s 0,6 %-tnim agarom te nanese na LB ploču s tetraciklinom te bez miješanja s agarom na LB + Tc i LB + Kan ploču.

3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama

3.3.1. Kolonijski PCR

Kolonijski PCR je korišten za provjeru uspješnosti P1 transdukcije primateljskog soja IleRS ED⁻ (Kan^R) lizatom soja STL7291 (*rpoS::Tn10*) i rekombinacije između genoma primatelja i transducirajuće čestice. Analiziralo se pet kolonija. Korištene su početnice naručene od komercijalnog proizvođača (*Macrogen*) *rpoS_for* i *rpoS_rev*, čiji je nukleotidni slijed prikazan u poglavlje „3.1.6. Početnice“, te Tn10 početnica koja je komplementarna krajevima

transpozona Tn10. Također, korištena je polimeraza *Taq*-DNA-polimeraza (*Thermo Scientific*, EPO404) i njegov pripadajući *Taq* pufer 10x. Za pripremu uzoraka pripremljene su tri zasebne *mastermix* otopine koje sadrže sve komponente potrebne za PCR reakciju za tri para početnica. Sastav uzoraka s konačnim koncentracijama prikazan je u tablici 1, a korišteni program PCR-a u tablici 2.

Tablica 1. Sastav uzoraka kolonijskog PCR za provjeru uspješnosti P1 transdukcije primateljskog soja IleRS ED^r (Kan^R) lizatom soja STL7291 (*rpoS::Tn10*) i rekombinacije između genoma primatelja i transducirajuće čestice.

Komponenta PCR-a	Finalna količina
<i>Taq</i> pufer 10x	1x
25 mmol dm ⁻³ MgCl ₂	2,5 mmol dm ⁻³
1 mmol dm ⁻³ dNTP-Mix	200 mmol dm ⁻³
rpoS_for (10 μmol dm ⁻³) / Tn10 (10 μmol dm ⁻³)	1 μmol dm ⁻³
rpoS_rev (10 μmol dm ⁻³) / Tn10 (10 μmol dm ⁻³)	1 μmol dm ⁻³
Kalup (genom)	-
<i>Taq</i> -DNA-polimeraza (1 U μL ⁻¹)	0,025 U μL ⁻¹
ReH ₂ O	Ostatak do 20 μL

Tablica 2. Program kolonijskog PCR-a za provjeru uspješnosti P1 transdukcije primateljskog soja IleRS ED^r (Kan^R) lizatom soja STL7291 (*rpoS::Tn10*) i rekombinacije između genoma primatelja i transducirajuće čestice. Korištene su *de novo* dizajnirane početnice u svrhu provjere uspješnosti transdukcije rpoS_for i rpoS_rev te Tn10 koji su početnice komplementarne krajevima transpozona Tn10. Korištena je *Taq*-DNA-polimeraza.

Korak	T / °C	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	10 min	1
Denaturacija	95	30 s	30
Sljepljivanje početnica	55	30 s	
Elongacija	72	1 h 45 min	
Završna elongacija	72	4 min	1
Čuvanje uzorka	4	/	/

3.3.2. Agarozna gel elektroforeza

Korišteni su 1 % (w/v) agarozni gelovi, pripremljeni otapanjem 3 g agaroze u 300 mL pufera TAE sastava Tris ($c = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$), octena kiselina ($c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$), EDTA ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 8,0$). Uzorak je nanesen na gel u smjesi s bojom za nanošenje uzorka (finalno *GelRed* otopljen u puferu konačnog sastava sastava 10 mmol/L Tris-HCl, $\text{pH} = 7,6$, 0,03% (w/v) bromfenol plavo, 0,03% (w/v) ksilencijanол-fluorofosfat). Elektroforeza je provedena u aparaturi za horizontalnu elektroforezu (*EPS 600, Pharmacia Biotech*) u TAE puferu pri naponu od 120 V, pri sobnoj temperaturi. Uzorci su vizualizirani bojom *GelRed*. Uz uzorke na gel je nanesen komercijalno dostupni marker za agaroznu elektroforezu (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, SM0313) radi procjene veličine razdvojenih fragmenata.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Usporedba rasta divljeg tipa MG1655 u kontrolnim i oksidacijskim uvjetima nakon prethodnog uzgoja u mediju s dodanim valinom ili norvalinom

Krivulje rasta divljeg tipa MG1655 u kontrolnim uvjetima te u uvjetima oksidacijskog stresa induciranog dodatkom H_2O_2 prikazane su na slikama 4 i 5. Bakterije su prethodno uzgojene preko noći do stacionarne faze u mediju bez ili s različitim koncentracijama Val (slika 4) ili Nva (slika 5). Korištene su četiri različite koncentracije Val/Nva (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM). Medij se sastojao od M9 medija suplementiranog sa 100 μ M Ile, Leu i Val zbog pseudoauksotrofije za izoleucin u uvjetima s dodanim valinom.²⁵ Prekonoćne bakterijske kulture su razrijeđene do istog OD_{600} (0,1) u mediju bez dodanog Val/Nva (tzv. nemistranslatirajući medij) te razdijeljene u dva alikvota. Jednom alikvotu je dodan H_2O_2 do konačne koncentracije 1 mM.

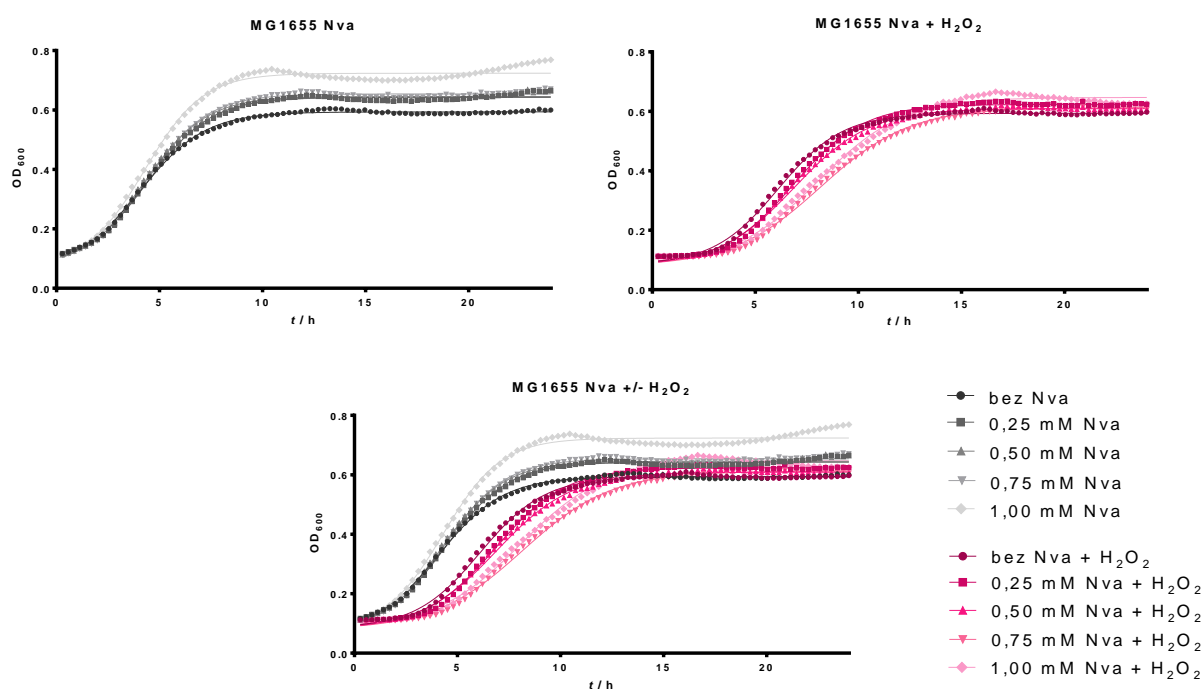
Nakon prethodnog uzgoja s Val, daljnji rast kultura MG1655 u nemistranslatirajućem mediju je vrlo sličan i ne ovisi značajno o koncentraciji Val s kojom su prekonoćne kulture prethodno uzgojene što je i očekivano jer divlji tip soja ima IleRS s funkcionalnom domenom za popravak pogreške koja bi trebala smanjiti potencijalnu mistranslaciju s Val na najmanju moguću mjeru (slika 4, gore lijevo).

Kada je u medij dodan H_2O_2 (slika 4, gore desno), bakterijske kulture rastu različito te sve imaju *lag*-fazu koja pokazuje da oksidacijski stres štetno djeluje na rast. Odgođen je ulazak u eksponencijalnu fazu dok bakterijske stanice ne nadvladaju štetni utjecaj H_2O_2 . Bakterijska kultura uzgojena u kontrolnim uvjetima prva ulazi u eksponencijalnu fazu, a zatim redom koncentracije Val: 0,75 mM, 1,00 mM, 0,50 mM i 0,25 mM. Stacionarne faze pokazuju vrlo slične vrijednosti OD_{600} , ali nešto niže nego u slučaju bez dodatka H_2O_2 ($OD_{600} = 0,60$).

Direktnom usporedbom prvog i drugog grafa (slika 4, donji graf) primjećuju se tri značajke bakterijskog rasta u oksidacijskom stresu izazvanim s H_2O_2 . H_2O_2 produljuje *lag*-fazu indikativno njegovoj detoksifikaciji i odstranjivanju iz stanice, produljuje eksponencijalnu fazu rasta kao posljedica metaboličkog umora te snižava vrijednost OD_{600} stacionarne faze. Iako u odsustvu H_2O_2 bakterijske kulture uzgajane u različitim koncentracijama Val ne pokazuju

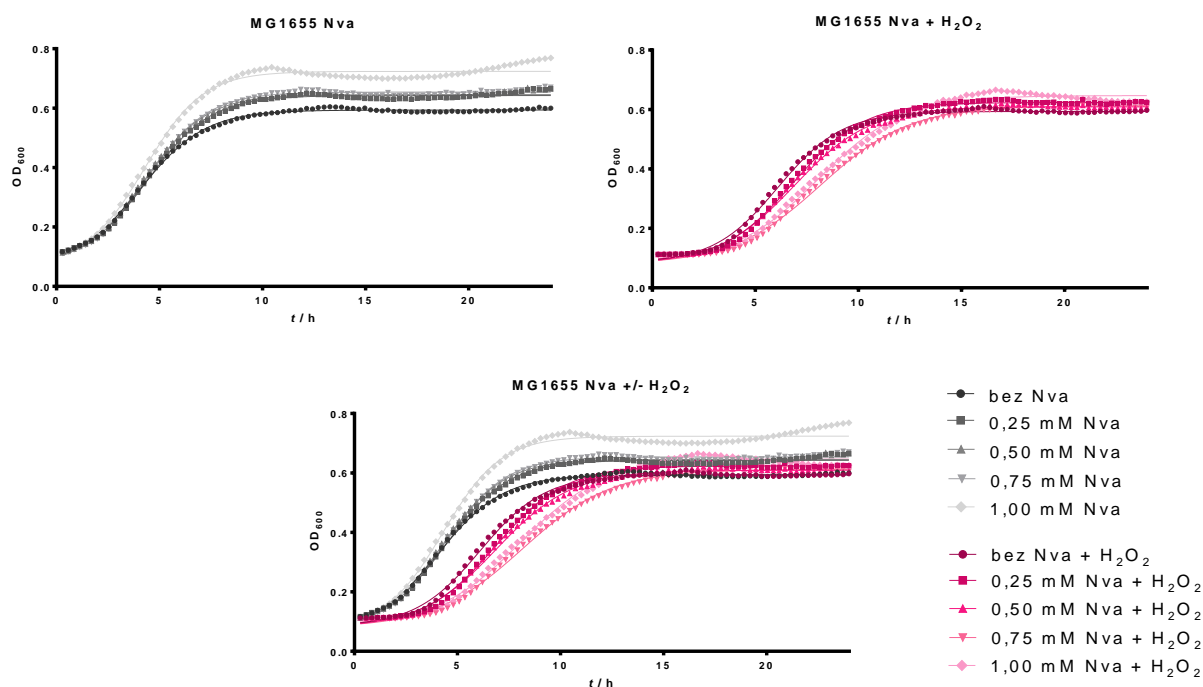
otežan rast (slika 4, donji graf), dodatkom H_2O_2 rastu lošije nego bakterije bez dodatka Val (slika 4, donji graf). Međutim, redosljed izlaska iz *lag*-faze bakterijskih kultura koje su uzgajane s različitim koncentracijama Val je pomalo neočekivan. Soj MG1655 eksprimira divlji tip IleRS koji ima normalnu funkciju popravka pogreške te ne dolazi do povećane mistranslacije što je pokazano sličnim rastom neovisno o prisutnosti Val u kontrolnim uvjetima (slika 4, gore lijevo).

Unatoč tome što IleRS WT ima normalnu aktivnost popravka pogreške nakon prijenosa, pokazano je da neki organizmi imaju povećanu razinu mistranslacije u stacionarnoj fazi, primjerice *Bacillus subtilis*,⁴¹ *Mycobacteria*⁴² i *E. coli* (Močibob, neobjavljeni rezultati). Iako sama stacionarna faza izaziva opći odgovor na stres, i različite koncentracije Val imaju različite utjecaje s obzirom da se razlikuju *lag*-faze ovisno o koncentraciji Val. Dodatna analiza je potrebna kako bi se odredilo dolazi li u *E. coli* do mistranslacije u stacionarnoj fazi te da li ovisi o koncentraciji Val.



Slika 4. Krivulje rasta divljeg soja bakterije *E. coli* MG1655 u M9 mediju bez dodatka (sive nijanse) te uz dodatak H_2O_2 do konačne koncentracije 1 mM (magenta nijanse). Bakterije su prethodno uzgojene preko noći u M9 mediju bez dodanog valina ili u M9 mediju s četiri različite koncentracije valina (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM) te su razrijeđene do istog OD_{600} . Rast je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C.

Kao i slučaju predinkubacije s Val, u slučaju predinkubacije s Nva krivulje rasta divljeg soja soja u kontrolnim uvjetima (bez dodanog H_2O_2) su slične, osim manjeg odstupanja bakterijske kulture prethodno uzgojene s 1 mM Nva (slika 5, gore lijevo). Kao i u eksperimentu s Val, kada je dodan H_2O_2 i ovdje prva ulazi u eksponencijalnu fazu kultura koja prethodno nije inkubirana s Nva (slika 5, gore desno). Međutim, predinkubacija s Nva ne usporuje rast u oksidacijskom stresu toliko kao predinkubacija s Val. Direktnom usporedbom prvog i drugog grafa (slika 5, donji graf) opet se primjećuje nedvojbeni utjecaj oksidacijskog stresa izazvanog s H_2O_2 zbog produljivanja *lag*-faze u odnosu na kontrolne uvjete.



Slika 5. Krivulje rasta divljeg soja bakterije *E. coli* MG1655 u M9 mediju bez dodatka (sive nijanse) te uz dodatak H_2O_2 do konačne koncentracije 1 mM (magenta nijanse). Bakterije su prethodno uzgojene preko noći u M9 mediju bez dodanog norvalina ili u M9 mediju s četiri različite koncentracije norvalina (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM), te su razrijeđene do istog OD_{600} . Rast je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C.

4.2. Usporedba rasta soja IleRS ED⁻ u kontrolnim i oksidacijskim uvjetima nakon prethodnog uzgoja u mediju s dodanim valinom ili norvalinom

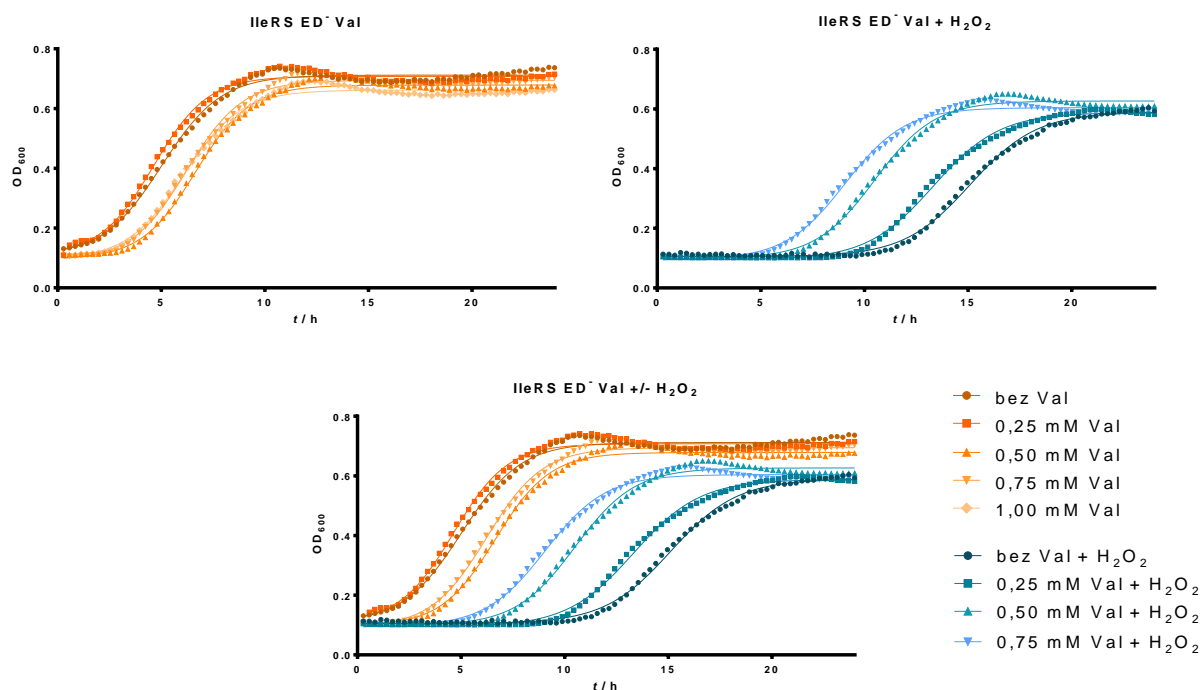
Nakon analize divljeg tipa soja, napravljena je analiza soja IleRS ED⁻ koji eksprimira IleRS koji nema funkcionalnu domenu za popravaka pogreške (slike 6 i 7). Takav soj pokazuje povišenu razinu mistranslacije u eksponencijalnoj fazi rasta kad je u medij dodan Val ili Nva (Močibob i Pranjčić, neobjavljeni rezultati). Bakterije su prethodno uzgojene preko noći do stacionarne faze u M9 mediju bez dodanog Val/Nva ili u M9 mediju s tri koncentracije Val/Nva za uzgoj s oksidacijskim stresom (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM; slika 6 i 7, plave nijanse), odnosno s četiri različite koncentracije Val/Nva za kontrolni uzgoj bez H₂O₂ (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM; slika 6 i 7, narančaste nijanse). Prekonoćne bakterijske kulture su razrijeđene do istog OD₆₀₀ u mediju bez dodanog Val/Nva (tzv. nemistranslatirajući medij) te razdijeljene u dva alikvota. Jednom alikvotu je dodan H₂O₂ do konačne koncentracije 1 mM. Rast bakterija je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C.

Kada u medij nije dodan H₂O₂ (slika 6, gore lijevo/narančaste nijanse), opažaju se dvije grupe odgovora. Bakterije uzgajane bez dodatka i uz 0,25 mM Val nemaju *lag*-fazu te im se krivulje rasta podudaraju u fazi eksponencijalnog rasta i stacionarnoj fazi. Bakterije uzgajane u mediju s koncentracijom Val: 0,50 mM, 0,75 mM i 1,00 mM Val, imaju sličnu *lag*-fazu (2 h) te se također podudaraju u ostalim fazama rasta. Unatoč razlikama u *lag*-fazama sve bakterije rastu do jednake optičke gustoće (OD₆₀₀ = 0,65).

Kada je u medij dodan H₂O₂ (slika 6, gore desno), bakterijske kulture rastu različito te sve imaju *lag*-fazu. Vremena *lag*-faze im variraju između 4 i 10 h. Bakterijska kultura prethodno uzgajana u mediju s 0,75 mM Val prva ulazi u eksponencijalnu fazu, a zatim redom kulture prethodno uzgojene s 0,50 mM i 0,25 mM Val te bakterijske kulture bez dodanog Val. Sve bakterije su narasle do jednake optičke gustoće u stacionarnoj fazi. Zanimljivo je da bakterijske kulture prethodno uzgojene s većim koncentracijama Val u oksidacijskom stresu imaju znatno kraću *lag*-fazu što je pokazatelj da veća mistranslacija valinom pomaže u boljem odgovoru na oksidacijski stres.

Direktnom usporedbom prvog i drugog grafa (slika 6, donji graf) primjećuju se vrlo izražen utjecaj H₂O₂ zbog produljivanja *lag*-faze, produljenja trajanja eksponencijalne faze i niže optičke gustoće stacionarne faze. Bakterije uzgajane bez dodatka Val uz dodatak H₂O₂ imaju *lag*-fazu 10 h dulju od istovjetnih bakterija bez dodatka H₂O₂. S obzirom da u oksidacijskom

stresu *lag*-faza traje kraće kod bakterija soja IleRS ED⁻ koje su prethodno preko noći bile inkubirane s Val nego kod bakterija koje nisu bile inkubirane s Val, može se zaključiti da prethodna mistranslacija omogućava bolji odgovor soja na oksidacijski stres, tj. da prethodna mistranslacija preadaptira stanicu na oksidacijski stres.

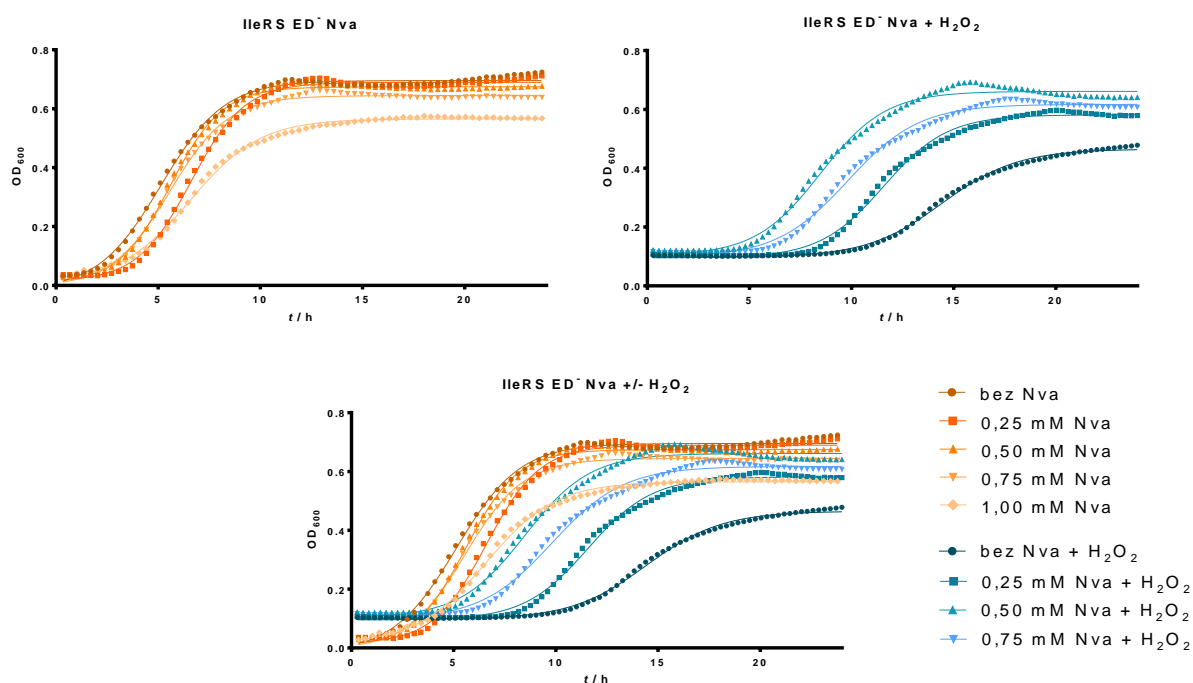


Slika 6. Krivulje rasta bakterija *E. coli* soja IleRS ED⁻ u M9 mediju bez dodatka (narančaste nijanse) te uz dodatak H₂O₂ do konačne koncentracije 1 mM (plave nijanse). Bakterije su prethodno uzgojene preko noći u M9 mediju bez dodanog valina ili u M9 mediju s tri različite koncentracije Val (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM; plave nijanse), odnosno četiri različite koncentracije Val (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM; narančaste nijanse). Rast je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C.

Na slici 7 prikazane su krivulje rasta bakterija soja IleRS ED⁻ koje su prethodno bile inkubirane s Nva. U kontrolnim uvjetima bakterije uzgojene bez dodatka Nva imaju vrlo kratku *lag*-fazu, tj. prve ulaze u fazu eksponencijalnog rasta (slika 7, gore lijevo). Za razliku od krivulja rasta bakterija koje su bile uzgajane u 0,25 mM Val i koje pokazuju sličan rast s bakterijama bez dodatka Val (slika 7, gore lijevo), rast bakterija uzgajanih u 0,25 mM Nva sličniji je rastu bakterija uzgajanih pri ostalim koncentracijama Nva, a ne rastu bakterija bez dodatka Nva (slika

7, gore lijevo). Krivulja rasta bakterija prethodno uzgojenih uz 1,00 mM Nva znatno odskaače od ostalih u odnosu na oblik i optičku gustoću stacionarne faze. Postoji mogućnost da je odskakanje rezultat toksičnosti 1 mM Nva. Sve ostale bakterije rastu do stacionarne faze iste optičke gustoće ($OD_{600} = 0,65$).

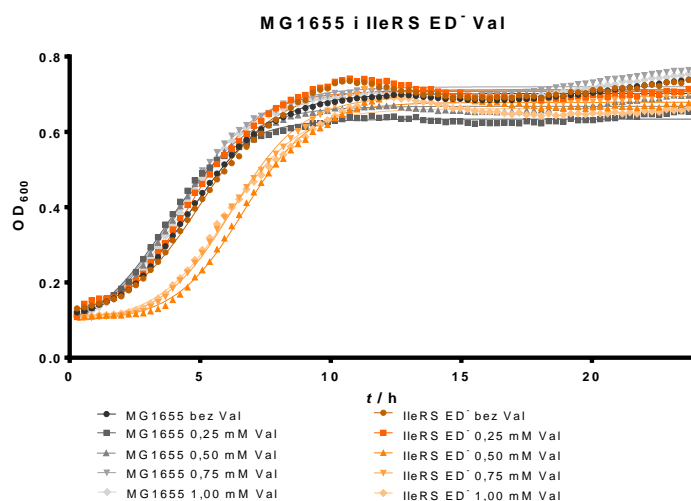
Kada je u medij dodan H_2O_2 (slika 7, gore desno), opažaju se različita vremena *lag*-faze kao i u slučaju bakterija prethodno uzgajanih s Val (slika 6, gore desno). Vremena *lag*-faze variraju od 4 do 10 h. Jedina razlika između bakterija prethodno uzgajanih u mediju s Val i Nva je redoslijed izlaska iz *lag*-faze. Najprije iz *lag*-faze izlaze bakterije prethodno uzgojene s dodatkom 0,50 mM Nva, zatim redom: 0,75 mM, 0,25 mM te bakterije bez dodatka Nva.



Slika 7. Krivulje rasta bakterija *E. coli* soja IleRS ED⁻ u M9 mediju bez dodatka (narančaste nijanse) te uz dodatak H_2O_2 do konačne koncentracije 1 mM (plave nijanse). Bakterije su prethodno uzgojene preko noći u M9 mediju bez dodanog norvalina ili u M9 mediju s tri različite koncentracije Nva (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM; plave nijanse), odnosno četiri različite koncentracije norvalina (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM; narančaste nijanse). Rast je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C. Podaci za bakterije *E. coli* soja IleRS ED⁻ uzgojene u M9 mediju s dodanim norvalinom bez dodatka H_2O_2 (narančaste nijanse) preuzeti su od *mag. chem.* Valentine Ević (neobjavljeni rezultati).

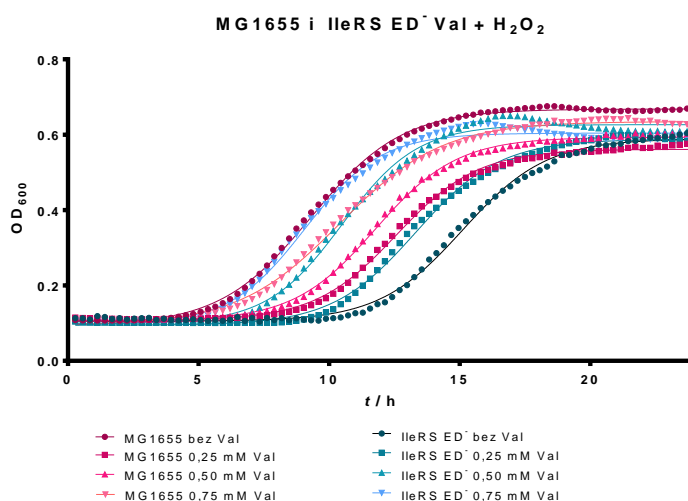
4.3. Usporedba rasta divljeg tipa soja i soja IleRS ED⁻ u kontrolnim i oksidacijskim uvjetima nakon prethodnog uzgoja u mediju s dodanim valinom ili norvalinom

Uspoređen je utjecaj povećane razine mistranslacije inducirane različitim koncentracijama Val na rast soja IleRS ED⁻ u odnosu na divlji tip MG1655, koji je uzgojen u istim uvjetima, u mediju bez (slika 8), odnosno s dodatkom H₂O₂ (slika 9) do konačne koncentracije 1 mM. U kontrolnim neoksidacijskim uvjetima sve krivulje rasta divljeg tipa MG1655 podudaraju se s krivuljama rasta soja IleRS ED⁻ uzgajanog u mediju bez dodatka Val i uz 0,25 mM Val te nemaju *lag*-fazu (slika 8). Bakterijske kulture soja IleRS ED⁻ uzgajane u mediju s dodatkom 0,50 mM, 0,75 mM i 1,00 mM Val imaju *lag*-fazu od 2 h. Sve kulture oba soja rastu do stacionarne faze slične optičke gustoće (OD₆₀₀ = 0,65) bez primjetne pravilnosti u redoslijedu njihovih visina. Kasniji početak rasta mistranslatirajućeg soja IleRS ED⁻ prethodno inkubiranog s većim koncentracijama Val može biti uzrokovan štetnim djelovanjem mistranslacije na stanice. Tijekom mistranslacije mogu nastati djelomično funkcionalni i nefunkcionalni proteini koji usporuju rast stanica i potrebno je neko vrijeme da se oni razgrade. Nakon što se takvi proteini uklone, stanice mogu nesmetano nastaviti rasti (slika 8).



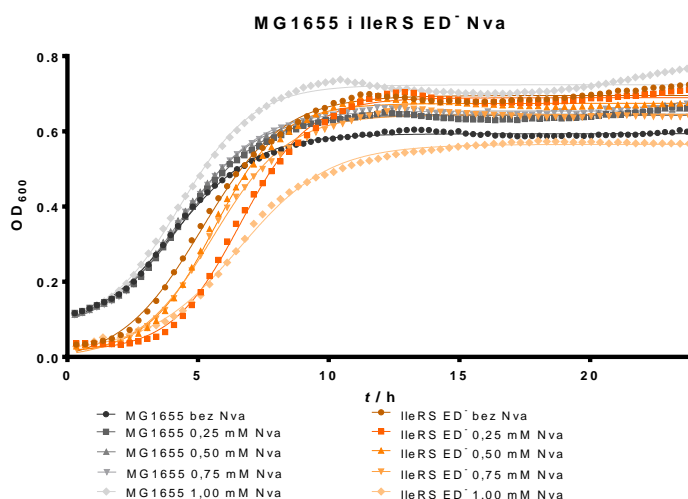
Slika 8. Krivulje rasta divljeg soja bakterije *E. coli* MG1655 (sive nijanse) i soja IleRS ED⁻ (narančaste nijanse) u M9 mediju. Bakterije su prethodno uzgojene preko noći u M9 mediju bez dodanog valina ili u M9 mediju s četiri različite koncentracije valina (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM) i razrijeđene do istog OD₆₀₀. Rast je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C.

Dodatkom H₂O₂ (slika 9), bakterijske kulture MG1655 i IleRS ED⁻ potpuno različito rastu. Naime, iz *lag*-faze najprije izlaze bakterijske kulture divljeg soja MG1655 uzgojene u mediju bez dodatka Val, dok bakterije soja IleRS ED⁻ uzgojene u mediju bez dodatka Val najkasnije izlaze. Može bitno objašnjenje je da funkcionalnost ED, kao jedan od osnovnih mehanizama stanice da kontrolira razinu mistranslacije, ima važnu ulogu u oksidacijskom stresu. Nadalje, bakterijske kulture divljeg soja MG1655 uzgojene u mediju s Val kasnije ulaze u fazu eksponencijalnog rasta nego bakterijske kulture divljeg soja MG1655 bez dodatka Val. Suprotno, bakterijske kulture soja IleRS ED⁻ uzgojene u mediju s Val ranije ulaze u fazu eksponencijalnog rasta nego bakterijske kulture soja IleRS ED⁻ bez dodatka Val, što je dokaz adaptacije soja IleRS ED⁻ uslijed povećane razine mistranslacije. Ovo zanimljivo opažanje moglo bi se objasniti time da veća razina mistranslacije potiče stanične odgovore na stres koji kasnije olakšavaju borbu stanice s oksidacijskim stresom. Dakle, prethodna mistranslacija predaptira stanicu na oksidacijski stres. S obzirom da stanice soja IleRS ED⁻ koje prethodno nisu bile inkubirane s Val imaju najdulju *lag*-fazu izgleda da je razina mistranslacije u tom slučaju nedovoljna da potakne stanične odgovore na stres koji bi mogli pomoći stanici u obrani od oksidacijskog stresa. Potentnost preadaptacije pokazana je time što bakterijske kulture IleRS ED⁻ uzgojene u mediju s 0,75 mM Val jednako uspješno rastu u oksidacijskom stresu kao i bakterijske MG1655 uzgojene koje ne bi trebale mistranslatirati. U oba slučaja, veće koncentracije Val imaju povoljniji učinak u odnosu na niže koncentracije što upućuje na to da dolazi do određenog adaptivnog učinka zbog mistranslacije valinom.



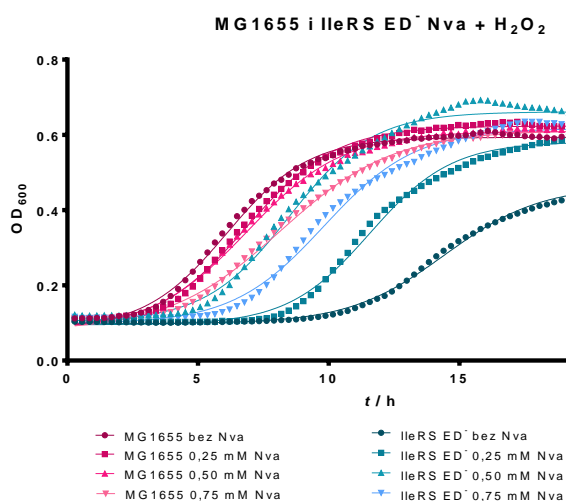
Slika 9. Krivulje rasta divljeg soja bakterije *E. coli* MG1655 (magenta nijanse) i soja IleRS ED⁻ (plave nijanse) u M9 mediju uz dodatak H₂O₂ do konačne koncentracije 1 mM. Bakterije su prethodno uzgojene preko noći u M9 mediju bez dodanog valina ili u M9 mediju s tri različite koncentracije valina (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM), razrijeđene do istog OD₆₀₀ te im je dodan 1 mM H₂O₂. Rast je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C.

Slika 10 pokazuje usporedbu divljeg tipa soja i mistranslatirajućeg soja prethodno inkubiranih sa Nva. Opaža se da sve bakterijske kulture divljeg tipa MG1655 nemaju *lag*-fazu te pokazuju sličan rast u fazi eksponencijalnog rasta i stacionarnoj fazi, izuzev bakterijske kulture uzgajane s 1,00 mM Nva. S druge strane, bakterijske kulture soja IleRS ED⁻ uzgajane bez dodatka Nva prve ulaze u fazu eksponencijalnog rasta, zatim bakterijske kulture uzgajane s 0,50 mM i 0,75 mM Nva, a zadnje bakterijske kulture uzgajane u 0,25 mM Nva. Stacionarne faze za bakterije divljeg tipa MG1655 i soj IleRS ED⁻ nije moguće usporediti iz različitosti u provedbe pokusa.



Slika 10. Krivulje rasta divljeg soja bakterije *E. coli* MG1655 (sive nijanse) i soja IleRS ED⁻ (narančaste nijanse) u M9 mediju. Bakterije su prethodno uzgojene preko noći u M9 mediju bez dodanog norvalina ili u M9 mediju s četiri različite koncentracije norvalina (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM) i razrijeđene do niskog OD₆₀₀. Rast je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C. Podaci za bakterije *E. coli* soja IleRS ED⁻ uzgojene u M9 mediju s dodanim norvalinom bez dodatka H₂O₂ (narančaste nijanse) preuzeti su od *mag. chem.* Valentine Ević (neobjavljeni rezultati).

Dodatkom H₂O₂ (slika 11), opaža se različiti rast bakterijskih kultura MG1655 i IleRS ED⁻ prethodno uzgojenih u mediju s različitim koncentracijama Nva. Jedina razlika u rastu bakterijskih kultura IleRS ED⁻ uzgojenih u mediju s različitim koncentracijama Val i Nva je redoslijed izlaska iz *lag*-faze. Kod uzgoja s Nva, najprije iz *lag*-faze izlaze bakterijske kulture uzgojene u mediju s 0,50 mM Nva, zatim redom koncentracije 0,75 mM i 0,25 mM Nva te naposljetku bakterijske kulture bez dodatka Nva. Dakle, i u ovom slučaju dolazi do predaptacije tijekom mistranslacije s Nva što omogućuje bolji odgovor stanica na oksidacijski stres.



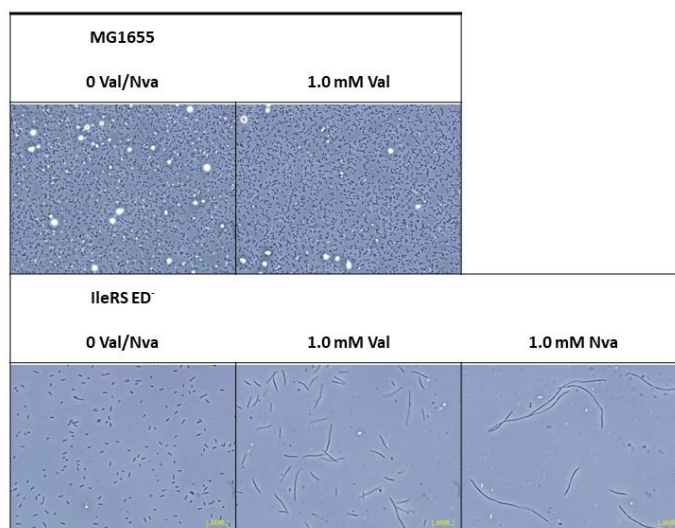
Slika 11. Krivulje rasta divljeg soja bakterije *E. coli* MG1655 (magenta nijanse) i soja IleRS ED⁻ (plave nijanse) u M9 mediju uz dodatak H₂O₂ do konačne koncentracije 1 mM. Bakterije su prethodno uzgojene preko noći u M9 mediju bez dodanog norvalina ili u M9 mediju s tri različite koncentracije norvalina (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM), razrijeđene do istog OD₆₀₀. Rast je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C.

4.4. Inaktivacija gena *rpoS* u soju IleRS ED⁻

U prethodnim poglavljima potvrđena su dosad neobjavljena istraživanja koja upućuju na fenomen preadaptacije bakterija *E. coli* soja IleRS ED⁻ povećanjem razine mistranslacije s Val ili Nva i njezinog pozitivnog učinka u odgovoru stanice na oksidacijski stres. Također, u dosad neobjavljenim istraživanjima primijećene su morfološke promjene stanica nakon prekonocnog uzgoja s Val ili Nva (slika 12). Bakterijske stanice su poprimile duguljaste oblike, odnosno filamente koji nastaju umnažanjem stanica bez formiranja septuma, jer se podijeljene stanice ne odvajaju jedne od drugih. Filamentacija se povezuje s odgovorom stanice na stres⁴³ te je potvrdila pretpostavku da je u mistranslatirajućim uvjetima aktiviran opći odgovor na stres. RpoS je sigma faktor RNA-polimeraze koji ima centralnu ulogu u općem odgovoru stanice na stres, stoga se postavlja pitanje je li RpoS povezan s uočenim preadaptacijskim učinkom mistranslacije.

Kako bi se istražio utjecaj RpoS regulona u povećanoj toleranciji oksidacijskog stresa uslijed prethodne mistranslacije, pripremljen je soj IleRS ED⁻ koji ima inaktiviran gen *rpoS*. U tu svrhu, soj IleRS ED⁻ je transduciran s česticama P1 bakteriofaga koje su nastale lizom soja

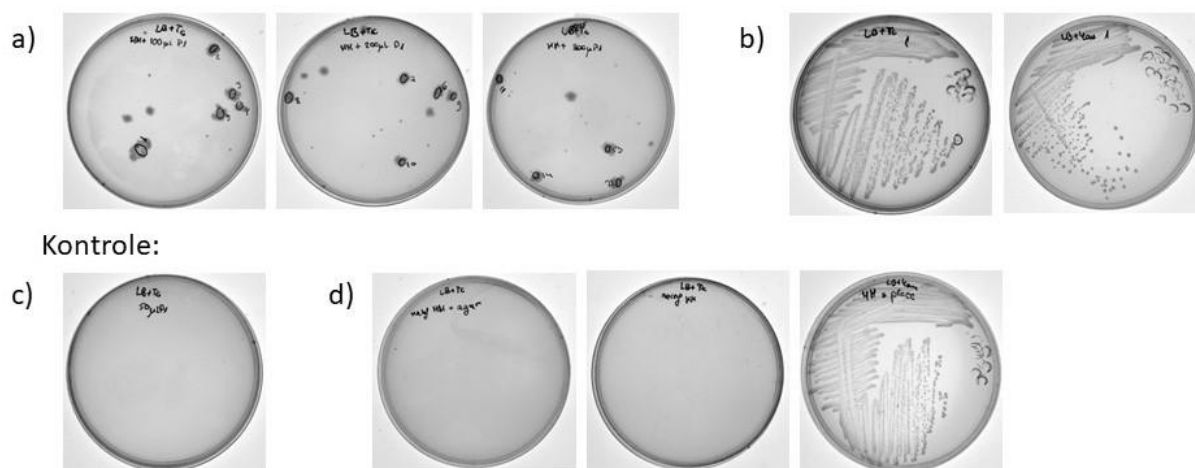
STL7291 koji ima inaktiviran gen *rpoS* zbog ugradnje transpozona Tn10 (*rpoS::Tn10*). S obzirom da se u transducirajuće čestice bakteriofaga P1 mogu nasumično ugraditi fragmenti genomske DNA moguće je da neka od čestica nosi fragment s inaktiviranim genom *rpoS*. Takva čestica može inficirati primateljski soj (u ovom slučaju soj IleRS ED⁻) u kojem može doći do homologne rekombinacije u genomu na mjestu gena *rpoS*. U tom slučaju u genomu primatelja funkcionalni *rpoS* gen se zamjenjuje s genom *rpoS* koji je inaktiviran transpozonom Tn10. Transpozon Tn10 nosi gen za rezistenciju na tetraciklin te je uspješnost transdukcije i rekombinacije između genoma primatelja i transducirajuće čestice provjerena testiranjem fenotipa na antibiotskim LB pločama (slika 13) te dodatno potvrđena kolonijskim PCR-om.



Slika 12. Rezultati mikroskopske analize divljeg soja bakterija *E. coli* MG1655 i soja IleRS ED⁻ nakon uzgoja preko noći u M9 mediju bez ili s dodatkom Val ili Nva do konačne koncentracije 1,00 mM. Podatci su preuzeti od Valentine Ević, *mag. chem.* (neobjavljeni rezultati).

Postupak provedene P1 transdukcije detaljnije je opisan u poglavlju „*Materijali i metode*“. Tijekom transdukcije, stanicama je dodan natrijev citrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) kako bi se zaustavila infekcija sprječavanjem adsorpcije P1 faga na površinu bakterije *E. coli*, a prije razmazivanja na ploče, uzorci su izmiješani s 0,6 %-tnim agarom koji „odgađa“ selekcijski pritisak i omogućuje više vremena za rekombinaciju. Na LB + Tc pločama narasle su kolonije transduktanata (slika 13a). Primateljski soj IleRS ED⁻ već ima rezistenciju na kanamicin (Kan)

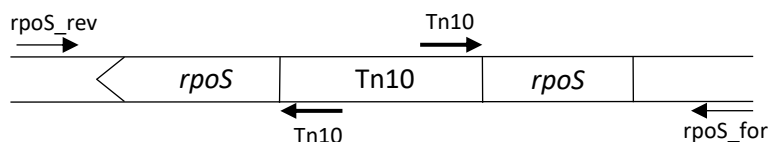
koja je uvedena tijekom postupka uvođenja mutacije u domeni za popravak pogreške IleRS, ali nema rezistenciju na tetraciklin, stoga jedini način na koji bi bakterije mogle narasti na podlozi s tetraciklinom je ukoliko je došlo do rekombinacije genoma primatelja i transducirajuće čestice koja u sebi sadrži rezistenciju na tetraciklin (Tc). Uspješnost transdukcije i rekombinacije je provjerena nasađivanjem odabranih kolonija na LB + Tc ploče (slika 13b, prva ploča) i na LB + Kan ploče (slika 13b, druga ploča). Bakterije su narasle na obje podloge što potvrđuje da je došlo do transdukcije i rekombinacije te da iz genoma nije slučajno izbačena rezistencija na kanamicin. Nasađivanje P1 lizata, prethodno izmiješanog s mekim agarom, na LB + Tc ploče potvrđeno je da P1 lizat nije kontaminiran od ostataka donorskog soja koji bi dali lažno pozitivni rezultat (slika 13c). Neinficirani soj IleRS ED⁻ je izmiješan s mekim agarom i nasađen na LB + Tc ploče (slika 13d, prva ploča) te je nasađen bez miješanja s agarom (slika 13d, druga ploča) kao kontrola da primateljski soj ne nosi rezistenciju na tetraciklin, da osjeti toksičnu količinu tetraciklina unatoč sloju agara i da nema kontaminaciju koja može dati lažno pozitivne rezultate. Također, IleRS ED⁻ je nasađen na LB + Kan ploče kao kontrola da sadrži rezistenciju na kanamicin, odnosno da glicerolska kultura nije kontaminirana (slika 13d, treća ploča).



Slika 13. Provjera uspješnosti P1 transdukcije primateljskog soja IleRS ED⁻ (Kan^R) lizatom soja STL7291 (*rpoS::Tn10*) i rekombinacije između genoma primatelja i transducirajuće čestice pomoću provjere fenotipa na antibiotskim LB pločama. a) Kolonije transduktanata dobivene inkubacijom primateljskog soja sa 100, 200 i 300 µL P1 lizata, izmiješane s 0,6 % agarom i nasađene na LB + Tc ploče. Preživjele kolonije nose antibiotski marker i pokazatelj su uspješne rekombinacije. b) Transdukcija je potvrđena nasađivanjem odabranih kolonija na LB + Tc ploče te na LB + Kan ploče. c) P1 lizat pomiješan s 0,6 % agarom i nasađen na LB + Tc ploče kao kontrola sterilnosti. d) Neinficirani soj IleRS ED⁻ je izmiješan s 0,6 % agarom i nasađen na LB + Tc ploče te bez agara na LB + Tc i LB + Kan ploče.

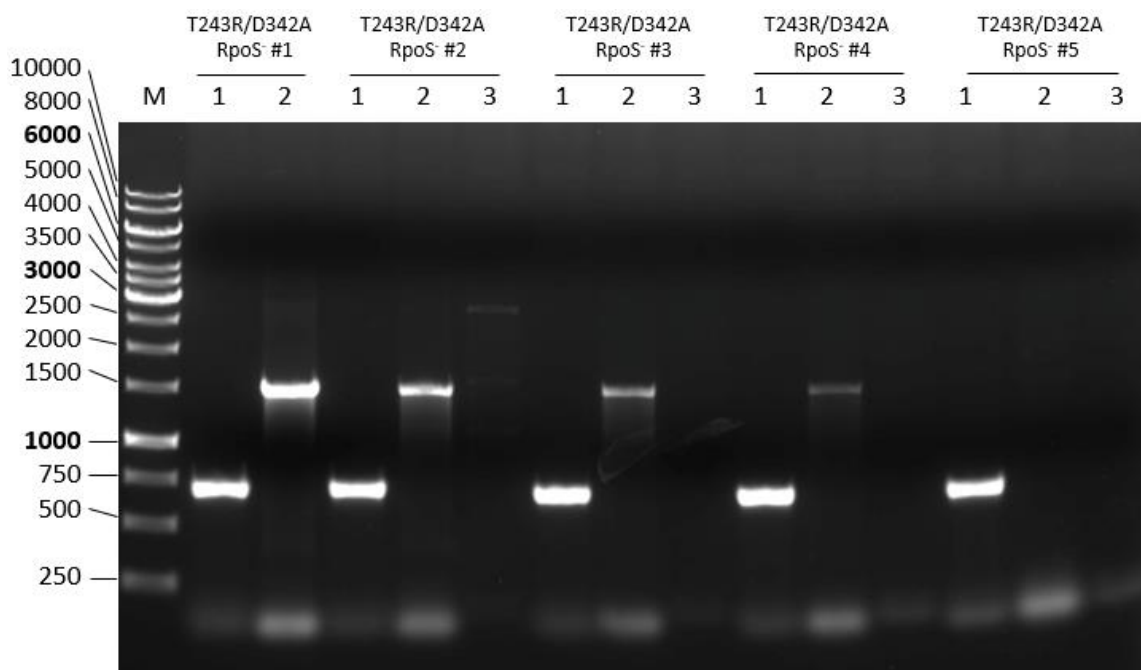
Uspješnost je dodatno provjerena kolonijskim PCR-om i agaroznom gel elektroforezom (slika 15). Sastav uzoraka kolonijskog PCR-a naveden je u tablici 1, a korišten program za PCR u tablici 2 u poglavlju Materijali i metode. U kolonijskom PCR-u kao kalup je korištena pojedinačna kolonija s ploče. PCR je napravljen s pet klonova transduktanata. Produkti PCR reakcija su nanoseni na gel u smjesi s bojom za nanošenje uzorka koja sadrži glicerol za lakše nanošenje samog uzorka u horizontalno položeni gel te boje koje omogućuju vizualizaciju tijekom elektroforeze. Elektroforeza u gelu agaroze je metoda odjeljivanja nukleinskih kiselina s obzirom na njihovu pokretljivost u električnom polju. Negativno nabijene nukleinske kiseline se u električnom polju gibaju u smjeru pozitivne elektrode anode. Molekule se kroz gel agaroze gibaju različitim brzinama s obzirom na svoju veličinu i stupanj superzavijenosti pa se tako brže gibaju manje molekule i molekule superzavijene strukture. Veličina očekivanog fragmenta PCR reakcije ovisi o tome gdje se u mjestu gena *rpoS* ugradio Tn10. Ukoliko je ugrađen uz

početni kraj *rpoS* gena, za početnice 1 fragment poprima minimalnu veličinu, tj. veličinu udaljenosti početnice od kraja gena zbrojeno s udaljenošću Tn10 početnice od kraja Tn10 gena i iznosi 510 parova baza. Za početnice 2 fragment poprima minimalnu veličinu ukoliko je Tn10 ugrađen uz drugi kraj *rpoS*-a te u teoriji iznosi 514 parova baza. Za početnice 3 se ne očekuje signal na gelu ukoliko je ugrađen Tn10 zbog prevelike veličine fragmenta.



Slika 14. Skica ugrađenog transpozona Tn10 veličine sekvence 9147 bp (NCBI: AP000342.1) u gen *rpoS* veličine sekvence 993 bp (NCBI: NC_000913.3) te skica položaja početnica korištenih u PCR reakcijama

Na gelu (slika 15) se, kod svih uzoraka za početnice *rpoS_for* i Tn10, opaža intenzivan signal na oko 700 pb. Također se opaža vrpca na oko 1500 pb za par početnica Tn10 i *rpoS_rev* kod svih uzoraka osim #5, što upućuje na to da je transdukcija uspješno provedena i da je Tn10 ugrađen blizu početnog kraja *rpoS*-a. Nedostatak vrpce uzorka klona #5 se čini kao rezultat pogreške u radu. Početnice *rpoS_for* i *rpoS_rev* ne daju signale, osim za koloniju #2 gdje se mogu primijetiti tri vrpce vrlo slabog intenziteta pri otprilike 1000, 1500 i 2500 parova baza. Moguće objašnjenje je da nisu sve bakterijske stanice u ovoj glicerolskoj kulturi transducirane. Ovi eksperimenti su pokazali da kolonije 1, 3 i 4 potpuno odgovaraju traženom soju IleRS ED⁻ koji ima inaktiviran gen za *rpoS*. Taj soj je nazvan IleRS ED⁻ RpoS⁻.



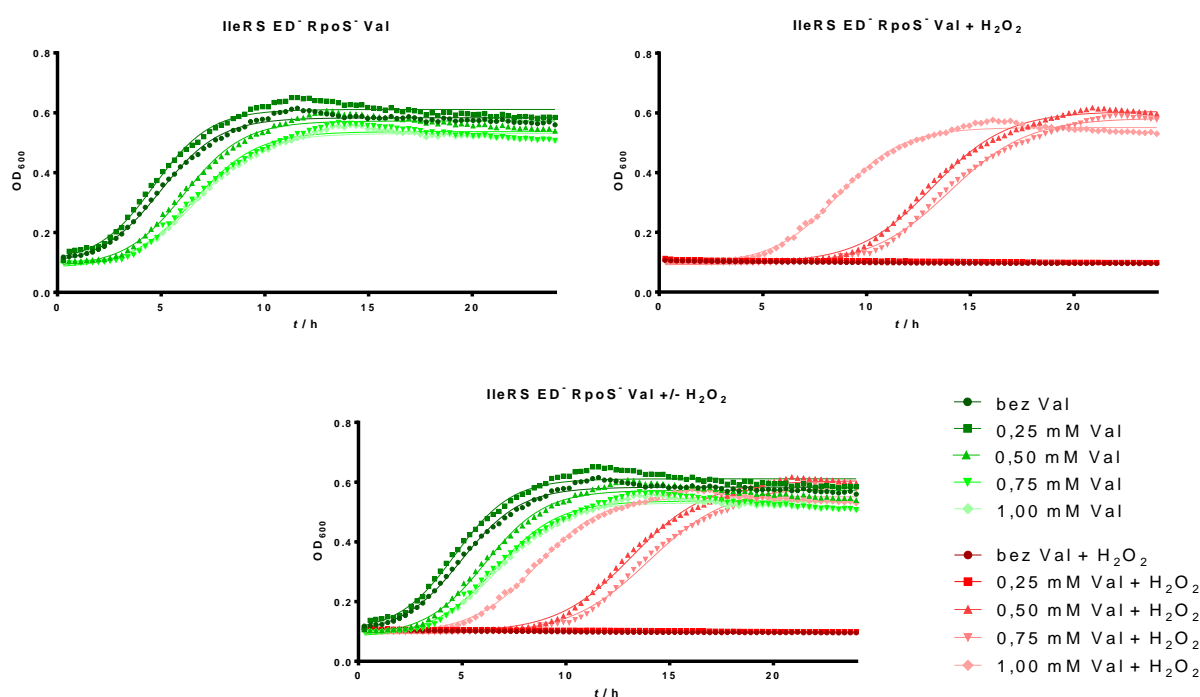
Slika 15. Prikaz rezultata agarozne gel elektroforeze (*colony*) PCR-a za provjeru uspješnosti P1 transdukcije primateljskog soja IleRS ED⁻ (Kan^R) lizatoma soja STL7291 (*rpoS::Tn10*) i rekombinacije između genoma primatelja i transducirajuće čestice. Korišten je marker molekularnih masa za agaroznu elektroforezu *DNA GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Scientific, kataloški broj SM0313). Broj 1 označava par *rpoS_for* i Tn10 početnica, broj 2 označava par Tn10 i *rpoS_rev* početnica, a broj 3 par *rpoS_for* i *rpoS_rev* početnica.

4.5. Usporedba rasta soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ u kontrolnim i oksidacijskim uvjetima nakon prethodnog uzgoja u mediju s dodanim valinom ili norvalinom

Nakon pripreme soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ analizirane su krivulje rasta na isti način kao što je prethodno opisano za sojeve MG1655 i IleRS ED⁻. Rezultati utjecaja povećane razine mistranslacije inducirane različitim koncentracijama Val, odnosno Nva na rast IleRS ED⁻ RpoS⁻ u mediju bez i s dodanim H₂O₂ do konačne koncentracije 1 mM prikazani su na slici 16, odnosno slici 17. Kada u medij nije dodan H₂O₂ (slika 16, gore lijevo), bakterijske kulture soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ vrlo slično rastu kao soj IleRS ED⁻ (slika 6, gore lijevo), tj. opažaju se dvije grupe odgovora. Bakterije uzgajane bez dodatka i uz 0,25 mM Val nemaju *lag*-fazu te im se krivulje rasta podudaraju u fazi eksponencijalnog rasta i stacionarnoj fazi. Bakterijske kulture uzgajane u mediju s većim koncentracijom Val, 0,50 mM, 0,75 mM i 1,00 mM, imaju sličnu *lag*-fazu (2 h) te se također podudaraju u ostalim fazama rasta. Osim razlike u duljini *lag*-faza

između bakterija dviju grupe odgovora, potonje bakterije su narasle do stacionarne faze niže optičke gustoće.

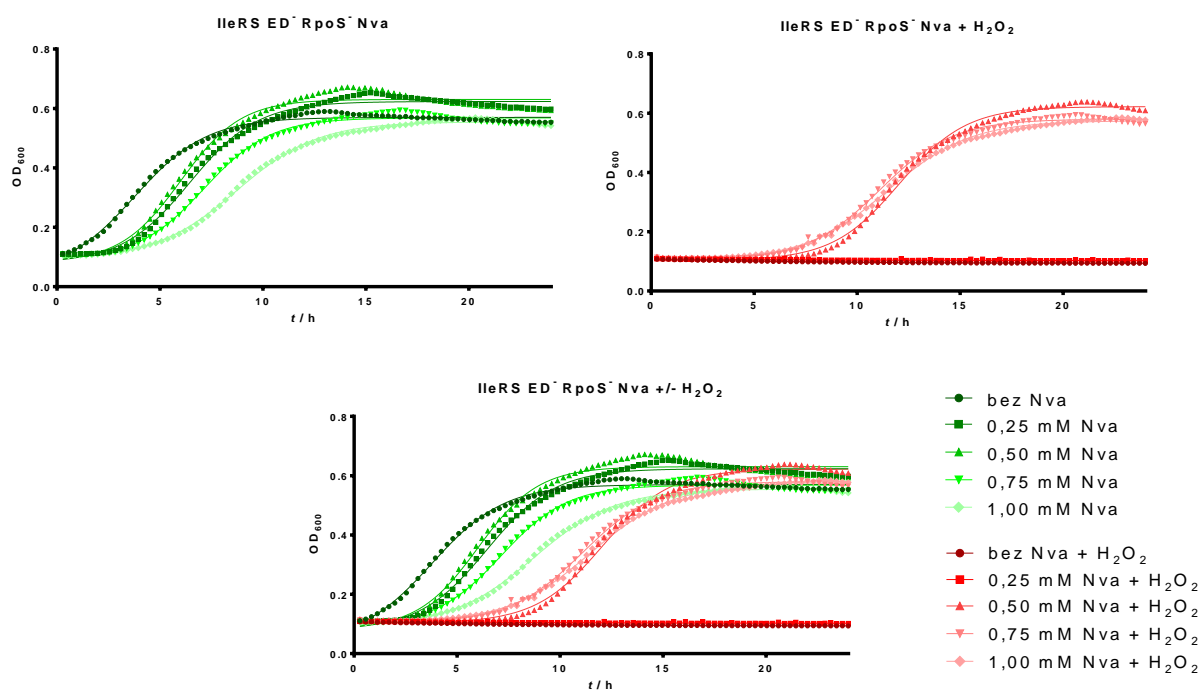
Uz dodatak H_2O_2 (slika 14, gore lijevo/crvene nijanse), bakterije uzgojene bez dodatka Val i s koncentracijom Val 0,25 mM, ne pokazuju nikakav rast. Za njih je nedostatak funkcionalnog RpoS-a smrtonosan u odgovoru na oksidacijski stres. Međutim, bakterije uzgojene u mediju s 0,50 mM, 0,75 mM i 1,00 mM Val preživljavaju što upućuje na prisutnost pozitivnog učinka preadaptacije uz inaktivan *rpoS* gen. Među njima, bakterije uzgojene u mediju s 1,00 mM Val pokazuju znatno bolji rast od 0,50 mM i 0,75 mM Val.



Slika 16. Krivulje rasta bakterija *E. coli* soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ u M9 mediju bez dodatka (zelene nijanse) te uz dodatak H_2O_2 do konačne koncentracije 1 mM (crvene nijanse). Bakterije su prethodno uzgojene preko noći u M9 mediju bez dodanog valina ili u M9 mediju s četiri različite koncentracije valina (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM) i razrijeđene do istog OD₆₀₀. Rast je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C.

U slučaju Nva, u odsutnosti oksidacijskog stresa (slika 17, gore lijevo), bakterijske kulture prethodno uzgojene bez dodatka Nva nemaju *lag*-fazu, dok bakterijske kulture prethodno uzgojene u mediju s različitim koncentracijama Nva imaju *lag*-fazu u trajanju od 2 do 3 sata.

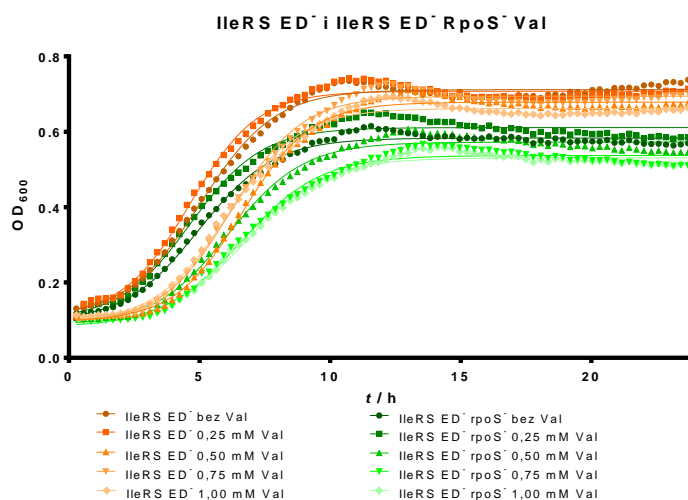
Bitna razlika koja se opaža je ta što bakterijske kulture prethodno uzgojene u mediju s 0,25 mM Nva znatno kasnije ulaze u fazu eksponencijalnog rasta nego bakterije uzgojene u mediju s 0,25 mM Val, što može upućivati na veću toksičnost Nva naspram Val. U oksidacijskom stresu bakterijske kulture prethodno uzgojene bez dodatka Nva i s 0,25 mM Nva ne rastu (slika 17, gore desno) kao ni u slučaju s Val (slika 16, gore desno), dok bakterijske kulture uzgojene u mediju sa svim ostalim koncentracije Nva (0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM) pokazuju međusobno vrlo sličan rast. U usporedbi s Val, jedina razlika je u tome što bakterije uzgojene u mediju s 1,00 mM Nva ne ulaze u fazu eksponencijalnog rasta znatno prije nego 0,50 mM i 0,75 mM Nva, kao što je to slučaj s Val.



Slika 17. Krivulje rasta bakterija *E. coli* soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ u M9 mediju bez dodatka (zeleno) te uz dodatak H₂O₂ do konačne koncentracije 1,00 mM (crveno). Bakterije su prethodno uzgojene preko noći u M9 mediju bez dodanog norvalina ili u M9 mediju s četiri različite koncentracije norvalina (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM) i razrijeđene do istog OD₆₀₀. Rast je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C.

4.6. Usporedba rasta sojeva IleRS ED⁻ i IleRS ED⁻ RpoS⁻ u kontrolnim i oksidacijskim uvjetima nakon prethodnog uzgoja u mediju s dodanim valinom ili norvalinom

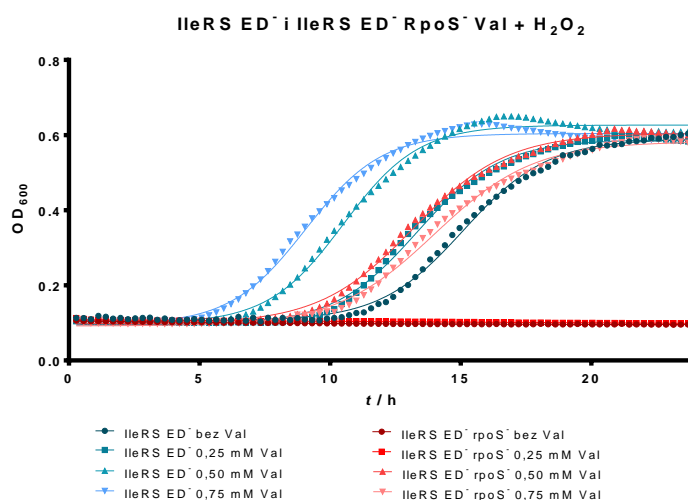
Rezultati utjecaja povećane razine mistranslacije inducirane različitim koncentracijama Val na sojeve IleRS ED⁻ i IleRS ED⁻ RpoS⁻ na rast u mediju bez, odnosno s 1 mM H₂O₂ prikazani su na slici 18, odnosno 19. Kada u medij nije dodan H₂O₂ (slika 18), rast bakterijskih kultura ova dva soja je sličan pri istim uvjetima rasta. Jedina razlika je nagib u fazi eksponencijalnog rasta te vrijednosti OD₆₀₀ stacionarnih faza. Bakterijske kulture soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ rastu sporije te imaju niži OD₆₀₀ stacionarne faze. Navedeno opažanje indikativno je ulozu RpoS-a, odnosno općeg odgovora stanice na stres.



Slika 18. Krivulje rasta bakterija *E. coli* soja IleRS ED⁻ (narančaste nijanse) i soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ (zelene nijanse) u M9 mediju. Bakterije su prethodno uzgojene preko noći u M9 mediju bez dodanog valina ili u M9 mediju s četiri različite koncentracije valina (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM) i razrijeđene do istog OD₆₀₀. Rast je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C.

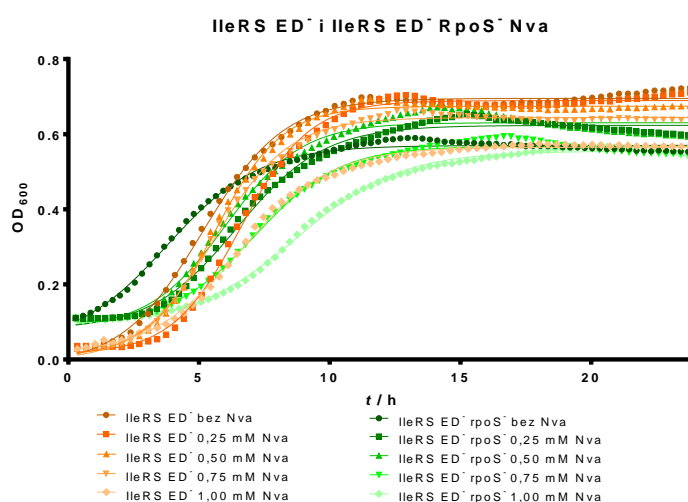
U oksidacijskom stresu opaža se značajno različit odgovor IleRS ED⁻ i IleRS ED⁻ RpoS⁻ nego u odsutnosti H₂O₂ (slika 19). U odnosu na IleRS ED⁻, bakterijske kulture IleRS ED⁻ RpoS⁻ ne mogu preživjeti u oksidacijskom stresu ako su prethodno uzgojene bez dodanog Val ili s 0,25 mM Val. U slučaju veće prethodno izazvane mistranslacije dodatkom 0,50 mM ili 0,75 mM Val, IleRS može rasti u oksidacijskom stresu, no lag-faza je ipak veća i nagib eksponencijalne

faze manji u odnosu na IleRS ED⁻ u istim uvjetima. Ovom usporedbom je pokazano još jednom da je IleRS ED⁻ RpoS⁻ osjetljiviji soj, no zanimljivo je da raste u oksidacijskom stresu nakon prethodno inducirane veće razine mistranslacije.



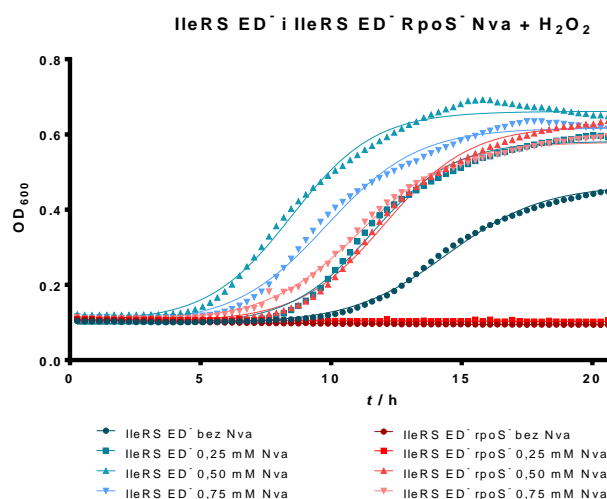
Slika 19. Krivulje rasta bakterija *E. coli* soja IleRS ED⁻ (plave nijanse) i soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ (crvene nijanse) u M9 mediju uz dodatak H₂O₂ do konačne koncentracije 1 mM. Bakterije su prethodno uzgojene preko noći u M9 mediju bez dodanog valina ili u M9 mediju s tri različite koncentracije valina (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM), razrijeđene do istog OD₆₀₀. Rast je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C.

Rezultati utjecaja povećane razine mistranslacije inducirane različitim koncentracijama Nva u sojevima IleRS ED⁻ i IleRS ED⁻ RpoS⁻ na rast u mediju bez, odnosno s dodanim H₂O₂ do konačne koncentracije 1 mM prikazani su na slici 20, odnosno slici 21. U uvjetima bez oksidacijskog stresa (slika 20), opaža se da prethodni uzgoj s Nva utječe na trajanje lag-faze i brzinu rasta IleRS ED⁻ RpoS⁻, dok na rast IleRS ED⁻ ne utječe značajno koncentracija Nva u kojoj je prethodno uzgojen. Trajanje lag-faze i nagib eksponencijalne faze ovise o koncentraciji Nva te je soj IleRS ED⁻ RpoS⁻ osjetljiviji na veće koncentracije Nva.



Slika 20. Krivulje rasta bakterija *E. coli* soja IleRS ED⁻ (narančaste nijanse) i soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ (zelene nijanse) u M9 mediju. Bakterije su prethodno uzgojene preko noći u M9 mediju bez dodanog norvalina ili u M9 mediju s četiri različite koncentracije norvalina (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM) i razrijeđene do istog OD₆₀₀. Rast je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C. Podaci za bakterije *E. coli* soja IleRS ED⁻ uzgojene u M9 mediju s dodanim norvalinom bez dodatka H₂O₂ (narančaste nijanse) preuzeti su od *mag. chem. Valentine Ević* (neobjavljeni rezultati).

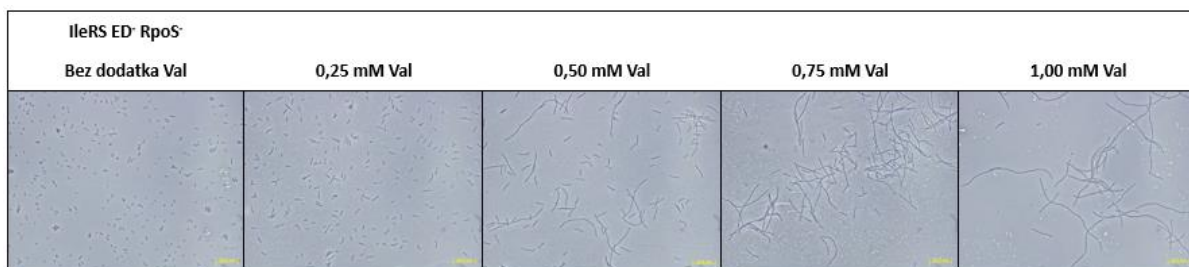
Dodatkom H₂O₂ bakterijske kulture IleRS ED⁻ i IleRS ED⁻ RpoS⁻ prethodno uzgojene u mediju s različitim koncentracijama Nva znatno slabije rastu (slika 21) nego u odsutnosti H₂O₂ (slika 20) kao što je to slučaj s Val. Još jednom se opaža da bakterijske kulture IleRS ED⁻ RpoS⁻ prethodno uzgojene u mediju s različitim koncentracijama Nva kasnije ulaze u fazu eksponencijalnog rasta nego u slučaju s Val, što podržava opažanje da RpoS nema esencijalnu ulogu u adaptaciji bakterija na povećanu mistranslaciju, nego pomaže u odgovoru stanice na stres.



Slika 21. Krivulje rasta bakterija *E. coli* soja IleRS ED⁻ (plave nijanse) i soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ (crvene nijanse) u M9 mediju uz dodatak H₂O₂ do konačne koncentracije 1 mM. Bakterije su prethodno uzgojene preko noći u M9 mediju bez dodanog valina ili u M9 mediju s tri različite koncentracije valina (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM), razrijeđene do istog OD₆₀₀. Rast je praćen u čitaču mikrotitarskih pločica tijekom 24 h pri 37 °C.

4.7. Mikroskopska analiza bakterija soja IleRS ED⁻ RpoS⁻

Mikroskopskom analizom pri povećanju 400x provjereno je dolazi li do filamentacije bakterijskih kultura soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ uzgojenih u mediju s četiri različite koncentracije Val (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM) kao što dolazi do filamentacije u soju IleRS ED⁻ (slika 22). Filamentacija se primjećuje pri koncentracijama 0,50 mM, 0,75 mM i 1,00 mM Val, što odgovara koncentracijama Val pri kojima bakterijske kulture soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ uspijevaju rasti uz dodatak 1,0 mM H₂O₂ (slika 16). Shodno tome, zaključuje se da je filamentacija usko povezana s adaptacijskim odgovorom bakterije *E. coli* na povećanu razinu mistranslacije pri čemu RpoS nema esencijalnu ulogu u ovoj filamentaciji.



Slika 22. Rezultati mikroskopske analize bakterija *E. coli* soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ nakon uzgoja preko noći u M9 mediju bez dodatka Val ili s različitim koncentracijama Val (0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM).

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu istražen je utjecaj specifične mistranslacije izoleucina proteinogenom aminokiselinom, valinom, i neproteinogenom aminokiselinom, norvalinom na rast stanica u oksidacijskom stresu.

Uzgajanjem bakterija *E. coli* soja IleRS ED⁻ u mediju s različitim koncentracijama Val i Nva dolazi do preadaptacije i pozitivnog učinka na odgovor stanice na kasniji oksidacijski stres. Različita razina mistranslacije dovodi do različitog intenziteta pozitivnog učinka pri čemu koncentracije koje pokazuju najveći pozitivan učinak su 0,75 mM Val i 0,50 mM Nva, a pritom koncentracije 0,25 mM Val i Nva pokazuju vrlo slab učinak preadaptacije.

Konstruirana je varijanta soja IleRS ED⁻ koja sadrži inaktivirani gen za RpoS, sigma podjedinicu RNA-polimeraze, koja omogućuje ekspresiju mnogih gena koji sudjeluju u općem odgovoru na stresna stanja. Rezultati analize soja IleRS ED⁻ RpoS⁻ upućuju da RpoS ima esencijalnu ulogu u obrani stanice od oksidacijskog stresa za bakterije koje imaju malu razinu prethodne mistranslacije (prethodni uzgoj bez Val/Nva ili uz 0,25 mM Val/Nva) dok pokazuje potpornu ulogu za bakterije koje su prethodno uzgajane pri većim koncentracijama Val/Nva. Izgleda da u uvjetima povišene mistranslacije stanica pokreće dodatne mehanizme koji ne ovise samo o RpoS regulonu, a koji su dovoljni za preživljenje u oksidacijskom stresu.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

aa	aminokiselina (engl. <i>amino acid</i>)
aa-AMP	aminoacil-AMP
aaRS	aminoacil-tRNA-sintetaza
AMP	adenozin-monofosfat
ATP	adenozin-trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoksiribonukleozid-trifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	domena za popravak pogreške nakon prijenosa koja se nalazi u nekim aminoacil-tRNA-sintetazama
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
G6PDH	glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza
GluRS	glutamil-tRNA-sintetaza
Ile	izoleucin
IleRS	izoleucil-tRNA-sintetaza
IleRS ED ⁻	soj <i>E. coli</i> s nefunkcionalnom domenom za popravak pogreške IleRS
IleRS ED ⁻ RpoS ⁻	soj <i>E. coli</i> s inaktivnom ED i RpoS
Kan	kanamicin
MG1655	divlji soj bakterije <i>E. coli</i>
LB	Luria-Bertani
Leu	leucin
LeuRS	leucil-tRNA-sintetaza
Nva	norvalin
pb	par baza
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
<i>Pfu</i>	lat. <i>Pyrococcus furiosus</i>
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RpoS	sigma faktor zadužen za regulaciju općeg odgovora stanice na stres

<i>rpoS</i>	gen koji kodira za RpoS
SOD	superoksid-dismutaza
<i>Taq</i>	lat. <i>Thermus aquaticus</i>
TAE	skraćeni naziv za pufer koji sadrži tris, octenu kiselinu i EDTA
Tc	tetraciklin
Tn10	Transpozon 10
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
tRNA	prijenosna ribonukleinska kiselina (engl. <i>transfer ribonucleic acid</i>)
tRNA ^{aa}	prijenosna ribonukleinska kiselina s antikodonom za odgovarajuću aminokiselinu (aa)
Tyr	tirozin
Val	valin
ValRS	valil-tRNA-sintetaza
WT	divlji tip (engl. <i>wild type</i>)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. H. Schwartz, T. Pan, *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **52** (2017) 205-219.
2. K. Mohler, M. Ibba, *Nat Microbiol.* **2** (2017).
3. C. Andres Juan, J. Manuel Pérez de la Lastra, F. J. Plou, E. Pérez-Lebeña, S. Reinbothe, *Int J Mol Sci.* **22** (2021).
4. C. L. Hawkins, M. J. Davies, *Journal of Biological Chemistry.* **294** (2019) 19683-19708.
5. S. M. Chiang, H. E. Schellhorn, *Arch Biochem Biophys.* **525** (2012) 161-169.
6. S. Altuvia, D. Weinstein-Fischer, A. Zhang, L. Postow, G. Storz. *A Small, Stable RNA Induced by Oxidative Stress: Role as a Pleiotropic Regulator and Antimutator.* **50** (1997).
7. H. Semchyshyn, T. Bagnyukova, K. Storey, V. Lushchak, *Cell Biol Int.* **29** (2005) 898-902.
8. D. Touati, *Redox Report.* **5** (2000) 287-293.
9. A. Zhang, S. Altuvia, A. Tiwari, L. Argaman, R. Hengge-Aronis. G. Storz, *EMBO Journal.* **17** (1998) 6061-6068.
10. H. E. Schellhorn, *Front Microbiol.* **11** (2020).
11. C. Ferrer-Costa, M. Orozco, X. de La Cruz, *J Mol Biol.* **31** (2002) 771-786.
12. D. Balchin, M. Hayer-Hartl, F. U. Hartl, *Science (1979).* **353** (2016).
13. N. M. Reynolds, B. A. Lazazzera, M. Ibba, *Nat Rev Microbiol.* **8** (2010) 849-856.
14. D. S. Tawfik, I. Gruic-Sovulj, *FEBS Journal.* **287** (2020) 1284-1305.
15. L. P. Kotra, J. Haddad, S. Mobashery, *Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance.* **44** (2000).
16. Y. Fan, J. Wu, M. H. Ung, N. de Lay, C. Cheng, J. Ling, *Nucleic Acids Res.* **43** (2015) 1740-1748.
17. C. R. Woese, G. J. Olsen, M. Ibba, D. So"ll, S. So"ll, *Aminoacyl-TRNA Synthetases, the Genetic Code, and the Evolutionary Process.* **64** (2000).
18. J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *Topics in Current Chemistry.* **344** (2013) 1-41.
19. D. Moras, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107** (2010) 21949-21950.
20. H. Roy, J. Ling, J. Alfonzo, M. Ibba, *Journal of Biological Chemistry* **280** (2005) 38186-38192.
21. S. W. Lue, S. O. Kelley, *Biochemistry* **44** (2005) 3010-3016.
22. Q. Ye, M. Wang, Z. P. Fang, *Journal of Biological Chemistry* **290** (2015) 24391-24402.
23. J. Soini, C. Falschlehner, C. Liedert, J. Bernhardt, J. Vuoristo, P. Neubauer, *Microb Cell Fact.* **7** (2008) 1-14.
24. V. A. Karkhanis, A. P. Mascarenhas, S. A. Martinis, *J Bacteriol* **189** (2007) 8765-8768.
25. M. Bilus, M. Semanjski, M. Mocibob, *J Mol Biol.* **431** (2019) 1284-1297.
26. E. Schmidt, P. Schimmel, *Mutational Isolation of a Sieve for Editing in a Transfer RNA Synthetase.* **8097** (2015).
27. M. A. S. Santos, C. Cheesman, V. Costa, P. Moradas-Ferreira, M. F. Tuite, *Mol Microbiol* **31** (1999) 937-947.
28. L. Li, M. T. Boniecki, J. D. Jaffe, *Naturally occurring aminoacyl-tRNA synthetases editing-domain mutations that cause mistranslation in Mycoplasma parasites.* doi:10.1073/pnas.1016460108/-/DCSupplemental
29. S. S. Yadavalli, M Ibba, *Nucleic Acids Res.* **41** (2013) 1104-1112.
30. N. Netzer, J. M. Goodenbour, A. David, *Nature* **462** (2009) 522-526.
31. S. Luo, R. L. Levine, *The FASEB Journal* **23** (2009) 464-472.
32. C. R. Evans, Y. Fan, J. Ling, *FEBS Lett.* **593** (2019) 3220-3227.

33. L. Samhit, P. K. Raval, D. Agashe, *PLoS Genet.* **16** (2020).
34. T. J. Bullwinkle, M. Ibba, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **113** (2016) 2252-2257.
35. V. Pezo, D. Metzgar, T. L. Hendrickson, *Artificially Ambiguous Genetic Code Confers Growth Yield Advantage.* (2004).
36. J. M. Bacher, W. F. Waas, D. Metzgar, V. de Crécy-Lagard, P. Schimmel, *J Bacteriol.* **189** (2007) 6494-6496.
37. J. M. Bacher, V. Rie De Cré Cy-Lagard, P. R. Schimmel, *Inhibited Cell Growth and Protein Functional Changes from an Editing-Defective TRNA Synthetase* (2004)
38. L. Garibyan, N. Avashin, *Journal of Investigative Dermatology* **133** (2013) 1-4.
39. Y. N. Chiang, J. R. Penadés, J. Chen, *PLoS Pathog* **15** (2019).
40. S. Moineau, *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition.* (2013) 280-283.
41. M. Meyerovich, G. Mamou, S. Ben-Yehuda, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107** (2010) 11543-11548.
42. T. Leng, M. Pan, X. Xu, B. Javid, *Tuberculosis.* **95** (2015) 678-681.
43. D. C. Karasz, A. I. Weaver, D. H. Buckley, R. C. Wilhelm, *Conditional Filamentation as an Adaptive Trait of Bacteria and Its Ecological Significance in Soils.*

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Marko Prosinečki

Datum rođenja: 15. listopada 1997.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2004–2012 Osnovna škola Kustošija

2012–2016 Prirodoslovna škola Vladimira Preloga

2016–2020 Preddiplomski studij kemije, smjer istraživački; Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2020–2023 Diplomski studij kemije, biokemija i organska kemija; Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2017, 2018, 2020 Dan i noć PMF-a