Molekulski mehanizmi bakterijske perzistencije koji se ostvaruju kroz inhibiciju translacije

Štefanić, Gracia

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:215179

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MOLEKULSKI MEHANIZMI BAKTERIJSKE PERZISTENCIJE KOJI SE OSTVARUJU KROZ INHIBICIJU TRANSLACIJE

MOLECULAR MECHANISMS OF BACTERIAL PERSISTENCE MEDIATED BY TRANSLATION INHIBITION

SEMINARSKI RAD

Gracia Štefanić
Preddiplomski studij molekularne biologije
Undergraduate study of molecular biology
Mentorica: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2020.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. SUSTAV TOKSIN-ANTITOKSIN 2

2.1. HipA 4

3. TRANSLACIJA 4

3.1. INHIBICIJA TRANSLACIJE 6

4. UČINAK HipA NA TRANSLACIJU 7

4.1. ODBACIVANJE POČETNOG MODELA MEHANIZMA DJELOVANJA HipA NA EF-Tu 7

4.2. NOVI (VAŽEĆI) MODEL MEHANIZMA DJELOVANJA HipA 9

4.2.1. Neutralizacija HipA 9

4.2.2. Fosforilacija GltX 11

4.2.3. Inhibicija aminoacilirajuće aktivnosti 14

5. HipA INDUCIRA PERZISTENCIJU PREKO (p)ppGpp 15

6. LITERATURA 17

7. SAŽETAK 18

8. SUMMARY 19

1. UVOD

Perzistencija je fiziološko stanje bakterija koje karakterizira otpornost na više antibiotika i okolišnih stresnih uvjeta ulaskom u dormantno, nereplikativno stanje (Huang, 2020). Javlja se u svih bakterija, uključujući glavne patogene, i glavni je uzrok kroničnih i ponavljajućih infekcija. Klinički primjeri su infekcije mokraćnih puteva uzrokovane bakterijom *Escherichia coli*, infekcije uzrokovane *Mycobacterium tuberculosis* i oportunističke infekcije *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* na otvorenim ranama pacijenata (Harms, 2016). Eksperimenti na bakteriji *E. coli* pokazuju da perzistentne stanice nastaju nasumično u populaciji uključivanjem/isključivanjem sporog rasta. No, pokazano je da su potomci perzistentnih stanica ponovno osjetljivi na antibiotike, ukazujući na to da je bakterijska perzistencija nenasljedno epigenetsko svojstvo (Germain, 2013). Za razliku od perzistencije (tolerancija), rezistencija (otpornost) je nasljedna genetička promjena koja omogućava cijeloj populaciji bakterija rast u prisustvu antibiotika. S druge strane, perzistentne stanice genetički su identične svojim osjetljivim srodnicima, te uklanjanjem stresora mogu povratit normalan rast. Perzistencija je mehanizam bakterije kojim privremeno žrtvuje replikaciju u zamjenu za toleranciju na stres (Huang, 2020). Nadalje, pokazano je da ovisno o načinu doziranja antibiotika, bakterije mogu postati rezistentne ili perzistentne. Kontinuiranom primjenom i/ili pri niskim dozama antibiotika bakterije postaju rezistentne dok neredovitim tretmanima visoke koncentracije antibiotika bakterije razviju perzistenciju. Antibiotska perzistencija djeluje kao odskočna daska u evoluciji antibiotske rezistencije tako što osigurava veće preživljavanje stanica i učestalost mutacija. Prije više od 30 godina primijećeno je da često dolazi do pojavljivanja toleancije na penicilin u paru s rezistencijom na više drugih antibiotika. Kasnije je pokazano da kod bakterije *Streptococcus pneumoniae* tolerancija na antibiotik djeluje kao prednost prilikom transformacije bakterija genima za rezistenciju (Windels, 2019). Također, eksperimentalno je dokazano da većom frekvencijom nastaju *de novo* rezistentni mutanti iz perzistentne populacije *Mycobacterium tuberculosis* (Sebastian, 2016). Stanični signalni putevi koji su molekularna pozadina formacije perzistentih stanica najčešće uključuju (p)ppGpp. Gvanozin-tetrafosfat (ppGpp) i gvanozin-pentafosfat (pppGpp) sveprisutni su sekundarni glasnici koji djeluju zajedno u stresnim uvjetima kada je potrebno promijeniti fiziologiju stanice. Dva enzima u *E. coli* odgovorna za stvaranje odnosno

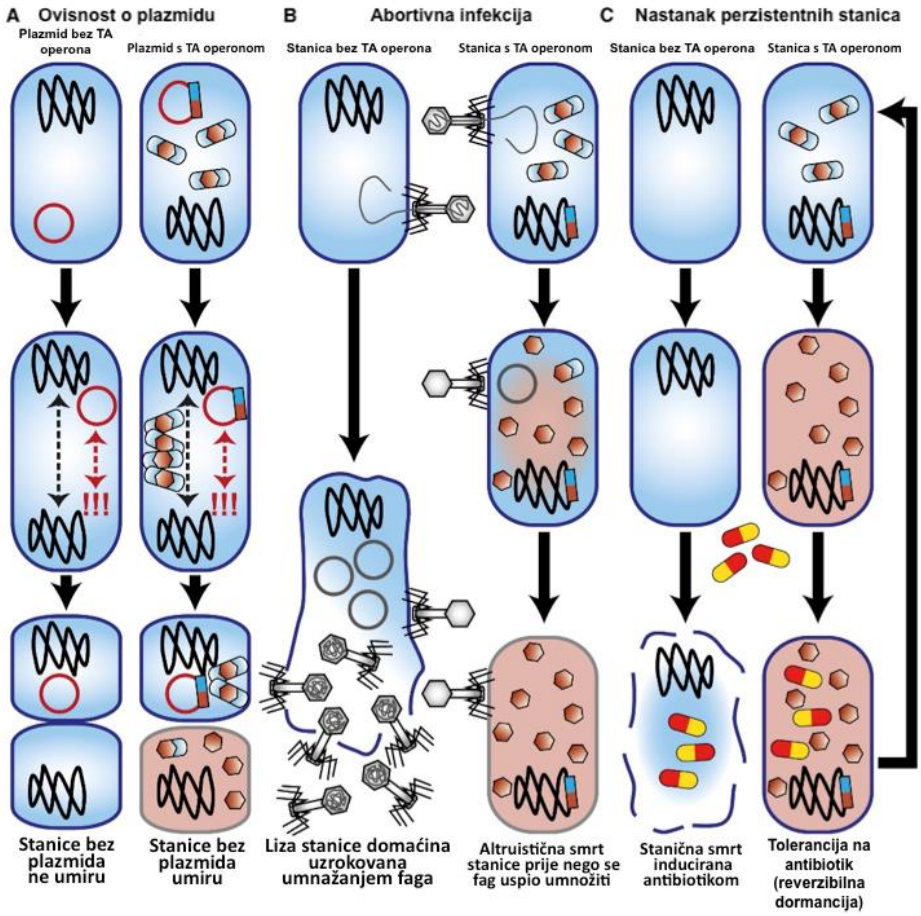
stvaranje i razgradnju (p)ppGpp su RelA (sintetaza) i SpoT (sintetaza/hidrolaza). Pokazano je da u *relA spoT* mutantnima *E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa* dolazi do poremećaja u nastanku perzistentnih stanica što upućuje na važnost tih enzima. Bakterijska perzistencija može biti uzrokovana nasumičnom aktivacijom (p)ppGpp signalnog puta u malom broju stanica populacije u fazi eksponencijalnog rasta ili okolišnim uvjetima koji stimuliraju nastanak (p)ppGpp (Harms, 2016).

2. SUSTAV TOKSIN-ANTITOKSIN

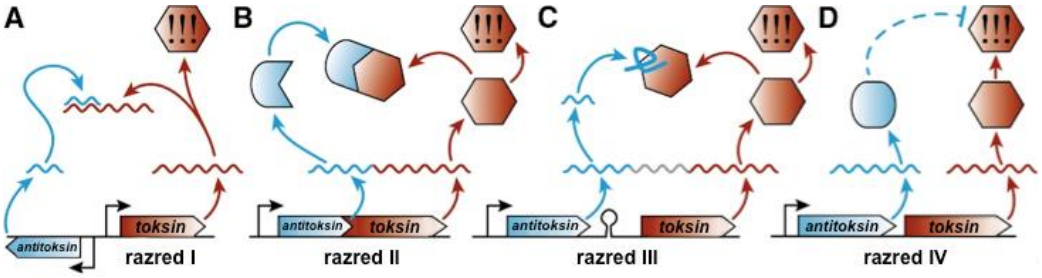
Sustav toksin-antitoksin mali su genetički elementi sastavljeni od gena za toksin i njemu srodnog gena za antitoksin. U svim poznatim TA (toksin-antitoksin) sustavima, toksini su proteini, dok antitoksini mogu biti ili proteini ili nekodirajuće RNA. Općenito, toksin je stabilnija molekula, no antitoksin je više eksprimiran te ako izvor antitoksina nestane, npr. izgubi se plazmid koji kodira TA sustav, toksin se aktivira i počne djelovati na svoje mete u stanici. Najviše cilja na ključne stanične procese kao što su translacija, replikacija, formiranje citoskeleta, integritet membrane i biosintezu stanične stijenke (Unterholzner, 2013). Tri su glavne biološke funkcije TA sustava koje su potkrijepljene eksperimentalnim dokazima: ovisnost stanice o plazmidu (A), abortivna infekcija (B) i nastanak perzistentnih stanica (C) (slika 1). Ovisnost o plazmidu znatno doprinosi stabilnosti plazmida u stanici na način da stanice koje ne naslijede plazmid umiru. Naime, na mnogo različitih plazmida pronađeni su geni TA operona, tj. na plazmidu se nalazi gen toksina i antitoksina. S obzirom da je toksin stabilnija molekula i zadržat će se u stanici dulje od antitoksina tako da sve stanice koje nisu naslijedile plazmid bit će promijenjene pod utjecajem aktivnog toksina i završit će smrću (Gerdes, 1986). Abortivna infekcija je oblik obrane bakterijske stanice od infekcije bakteriofagom, tj. podrazumijeva altruističnu smrt inficirane stanice kako bi spriječila daljnje umnožanje i širenje virusa po populaciji (Dy, 2014). Može se zaključiti da ovisnost o plazmidu i abortivna infekcija rezultiraju staničnom smrću zbog aktivacije toksina koja se događa zbog gubitka plazmida ili virusne infekcije. S druge strane, prilikom nastanka perzistentnih stanica aktiviraju se toksini koji induciraju reverzibilno stanje dormancije koje stanici pruža toleranciju na nepovoljne uvjete. Sustavi TA razvrstani su u 4 razreda s obzirom na vrstu molekule antitoksina i način interakcije s toksinom (prikazano na slici 2). U razredima I i III antitoksini su RNA molekule koje reguliraju količinu toksina u stanici inhibirajući translaciju mRNA toksina (razred

I) ili djelujući direktno na protein (razred III). U preostala dva razreda antitoksini su proteinske molekule koje se direktno vežu i inhibiraju protein toksina (razred II) ili djeluju indirektno revertirajući efekt koji toksin ima na ciljne molekule (razred IV). (Harms, 2018)

U kontekstu nastanka perzistentnih stanica za sada najbolje su istraženi razredi I i II sustava TA. Toksini razreda I najčešće su mali proteini koji formirajući pore u membranama bakterija narušuju protonski gradijent i zaustavljaju sintetu ATP-a, dok su toksini razreda II obično inhibitori translacije (Harms, 2016). HipA, koji je tema ovog rada, pripada u toksine razreda II.



Slika 1. Biološke funkcije TA sustava. Usporedba sudbina bakterijskih stanica sa ili bez TA operona. Geni/proteini toksina prikazani su crveno, a antitoksina plavo. Crveno obojana citoplazma označava narušeno funkcioniranje stanice djelovanjem toksina. Preuzeto i dorađeno iz "Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology" Harms, 2018.



Slika 2. Glavni razredi TA sustava. Antitoksini su prikazani plavo, a toksini crveno. Prikazani su i lokusi (plava i crvena strelica) i smještaj promotora (crna strelica). Valovite crte i zavijene (razred III) prikazuju RNA molekule, a slobodan aktivan toksin naglašen je uskličnicima. Preuzeto i dorađeno iz "Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology" Harms, 2018.

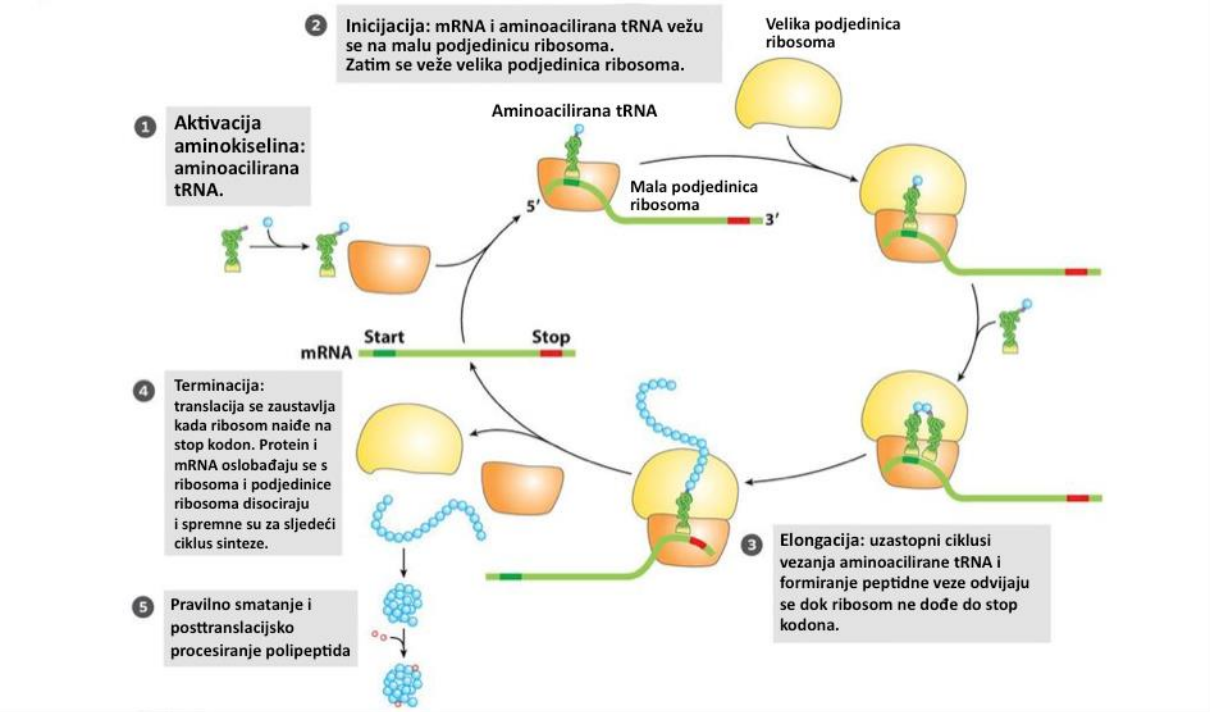
2.1. HipA

Niskom ekspresijom *hipA* inducirano je statično stanje u bakterija koje može biti suzbijeno uzvodnim genom *hipB*. Također, pokazano je da HipA i HipB formiraju kompleks koji autoregulira transkripciju *hipBA* operona. S obzirom na sve navedeno, predloženo je da *hipBA* čini tip II TA lokus, što je kasnije eksperimentalno potvrđeno. Razred II TA sustava čini protein antitoksin koji direktno interagira s proteinom toksina i inhibira ga (slika 2). Većina toksina tog razreda djeluje preko inhibicije translacije inducirajući statično, perzistentno stanje bakterije iz kojeg se stanice mogu oživjeti indukcijom gena za anitoksin. Prvi otkriveni gen perzistencije, *hipA* u *E.coli*, kodira serin/treonin kinazu te zaustavlja rast i snažno inhibira transkripciju, translaciju i replikaciju. Prvo je predloženo da HipA fosforilira EF-Tu i time inhibira translaciju, međutim time nije objašnjena inhibicija transkripcije i replikacije (Germain, 2013).

3. TRANSLACIJA

Sinteza proteina može se podijeliti na dva procesa: transkripciju i translaciju. Tokom transkripcije geni, dijelovi DNA koji kodiraju proteine, prepisuju se u molekulu mRNA (glasnička RNA, *messenger RNA*) enzimom RNA-polimeraza. U eukariota ovaj proces odvija se u jezgri, dok u prokariota transkripcija i translacija nisu odvojene prostorno ni vremenski. Prema *Lehninger,*

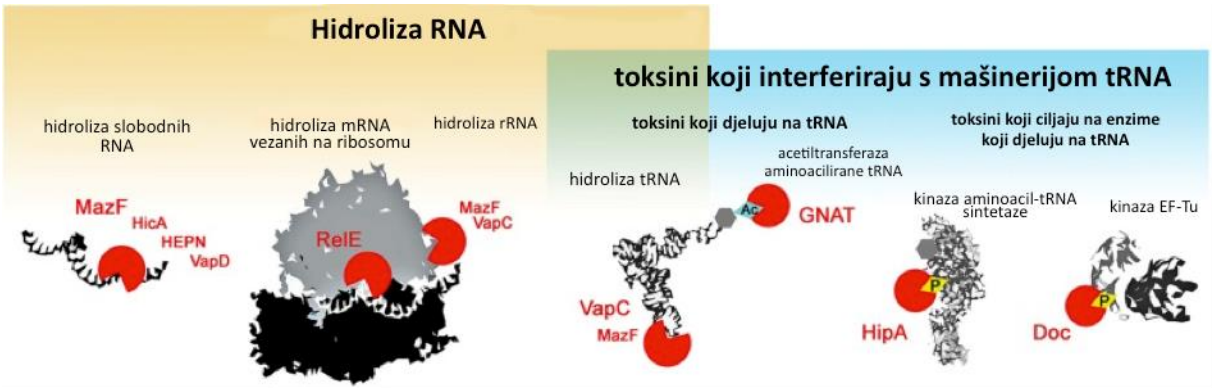
Principles of Biochemistry, sixth edition, D.L. Nelson, M.M. Cox sinteza proteina podrazumijeva samo proces translacije koji se može podijeliti na 5 koraka (slika 3). Prvi korak je aktivacija aminokiselina, monomera čijim povezivanjem nastaje protein. Aktivacija se događa kovalentnim povezivanjem odgovarajuće aminokiseline na odgovarajuću molekulu tRNA (prijenosna RNA, *transfer RNA*). Proces se odvija u citosolu/organelima, ali ne u jezgri, uz utrošak ATP-a i pomoću enzima aminoacil-tRNA sintetaze (aaRS). Produkt je aminoacilirana tRNA. Sljedeća 3 koraka su inicijacija, elongacija i terminacija. Inicijacija obuhvaća vezanje mRNA i inicirajuće aminoacil-tRNA na malu podjedinicu ribosoma. Inicirajuća aminoacil-tRNA prepoznaje startni kodon AUG na mRNA. Na kraju inicijacije veže se velika podjedinica ribosoma i formira se inicijacijski kompleks. Za proces inicijacije potreban je GTP i citosolni proteini, faktori inicijacije. Tokom elongacije dolazi do produživanja nastajućeg polipeptida kovalentnim povezivanjem aminokiselina. Elongacijski faktor EF-Tu u kompleksu s GTP do ribosoma dovodi aminoacilirane tRNA čiji se antikodon sparuje s kodonom na mRNA. Vezanje aminoacilirane tRNA na ribosomsko vezno mjesto A praćeno je hidrolizom GTP-a te se kompleks EF-Tu-GDP oslobađa s ribosoma. Do terminacije translacije dolazi kada ribosom naiđe na stop kodon na mRNA. Novosintetizirani polipeptid oslobađa se s ribosoma uz pomoć faktora otpuštanja (proteinske molekule), podjedinice ribosoma disociraju i spremne su za sljedeći ciklus sinteze. Posljednji korak u sintezi proteina je pravilno smatanje i posttranslacijsko procesiranje polipeptida kako bi postao biološki aktivan (Nelson, 2013).



Slika 3. Pet koraka translacije. Aktivacija aminokiselina (1), inicijacija (2), elongacija (3), terminacija (4), smatanje proteina i posttranslacijske modifikacije (5). Preuzeto i dorađeno iz *Lehninger, Principles of Biochemistry, sixth edition, D.L. Nelson, M.M. Cox*

3.1. INHIBICIJA TRANSLACIJE

Toksini razreda II inhibiraju razne stanične procese, no najčešće djeluju na translaciju. Razlikujemo nekoliko glavnih mehanizama inhibicije translacije (slika 4.): hidroliza slobodnih RNA, hidroliza mRNA vezanih na ribosomu, hidroliza rRNA, tRNA ili interferencija s tRNA. Također, toksini mogu ciljati na enzime koji djeluju na tRNA, npr. aminoacil-tRNA sintetaze ili EF-Tu. Rezultat je generalna inhibicija sinteze proteina i posljedična inhibicija rasta. Velika brojnost potencijalnih molekula na koje će toksini djelovati daje prostora za specijalizaciju toksina. (Jurenas, 2020)



Slika 4. Aktivnosti toksina razreda II. Elementi u stanici na koje djeluju prikazani su crno i bijelo. Toksini su prikazani kao crveni krugovi. Otvoreni krugovi su toksini koji hidroliziraju kemijske veze, a krugovi sa skupinom Ac acetiliraju, a s P fosforiliraju. Preuzeto i dorađeno iz "The Variety in the Common Theme of Translation Inhibition by Type II Toxin–Antitoxin Systems" Jurenas, 2020.

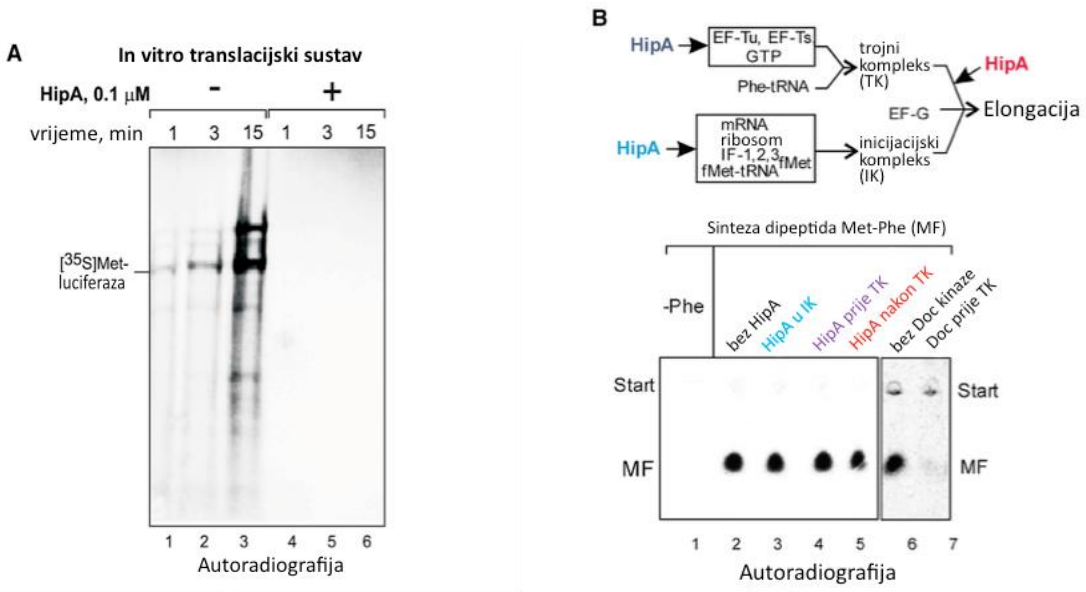
4. UČINAK HipA NA TRANSLACIJU

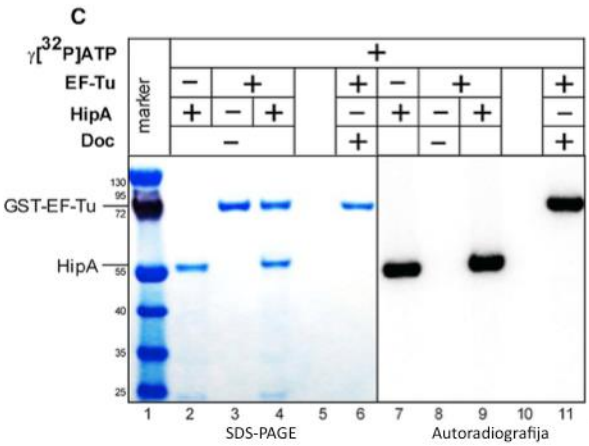
4.1. ODBACIVANJE POČETNOG MODELA MEHANIZMA DJELOVANJA HipA NA EF-Tu

Pretpostavka da HipA inhibira *in vitro* translaciju potvrđena je eksperimentalno te su rezultati prikazani na slici 5. A. Dokazano je da dodatkom HipA u *in vitro* translacijski sustav nema signala nastanka [^{35}S]Met-luciferaze. Nadalje, bilo je potrebno otkriti na koji dio translacijskog sustava toksin djeluje. U *in vitro* sustavu korištena je mRNA koja kodira za dipeptid Met-Phe (kratica MF). Translacija je inicirana dodatkom pročišćenih ribosoma, faktora inicijacije IF-1, IF-2 i IF-3 te [^{35}S]-fMet-tRNA^{fMet} . Zatim, elongacija ribosoma za 1 kodon potaknuta je dodatkom trojnog kompleksa EF-Tu:GTP:Phe-tRNA^{Phe} , elongacijskog faktora EF-G i GTP-a. Kratki peptidi, produkti reakcije, analizirani su tankoslojnom elektroforezom i autoradiografijom. Toksin HipA dodan je u rekciju u 3 različite faze: tokom formiranja inicijacijskog kompleksa (prikazano plavo na slici 5.B), prije formiranja trojnog kompleksa (prikazano ljubičasto na slici 5.B) i već formirani trojni kompleks (prikazano crveno na slici 5.B). Kao pozitivna kontrola korištena je Doc kinaza koja inhibira translaciju fosforilacijom EF-Tu. Rezultati elektroforeze prikazani su na slici 5.B.

Iznenađujuće, HipA ni u kojem slučaju nije imao efekt na reakciju, tj. u sva 3 slučaja vidljiva je vrpca dipeptida (jažice 3-5). Doc kinaza uspješno je inhibirala translaciju, nema vrpce dipeptida (jažica 7) (Germain, 2013). Dobiveni rezultati u kontradikciji su s prvim predloženim modelom u kojem HipA inhibira translaciju fosforilirajući EF-Tu (Schumacher, 2009). Također, proveden je i drugi eksperiment u kojem je analizirana fosforilacija EF-Tu s HipA koristeći γ[^{32}P]ATP. S obzirom da EF-Tu i HipA slično migriraju na SDS-PAGE elektroforezi na EF-Tu dodan je GST biljeg. Rezultati su prikazani na slici 5.C. Lijevo je prikazan gel dobiven SDS-PAGE na kojem se mogu jasno razlikovati vrpce HipA i GST-EF-Tu, dok je desno prikazana autoradiografija. HipA nije fosforilirao GST-EF-Tu (slika 5.C, jažica 9) već je taj signal rezultat autofosforilacije HipA. Inaktivacija toksina HipA događa se autofosforilacijom, no to je spriječeno kada je HipA u kompleksu s HipB. Jedino gdje je GST-EF-Tu uspješno fosforiliran jest uz dodatak Doc kinaze (slika 5.C, jažica 11). Proveden je i *in vivo* eksperiment. U stanicama su istovremeno nadeksprimirali HipA i EF-Tu, no korišten je soj stanica s deletiranim *hipBA* operonom kako bi se izbjegla neutralizacija toksina HipA antitoksinom HipB. Izoliran je EF-Tu prije i poslije nadekspresije HipA te analiziran na spektrometriji masa. Nije zabilježena fosforilacija EF-Tu, u oba slučaja molekularna masa EF-Tu iznosi 45,692 Da (Germain, 2013).

S obzirom na dobivene rezultate u sva 3 eksperimenta početni model mehanizma djelovanja HipA na EF-Tu jest pogrešan.





Slika 5. Utjecaj HipA na proces translacije i molekulu EF-Tu. (A) Dodatkom HipA u *in vitro* translacijski sustav ne nastaje [^{35}S]Met-luciferaza, tj. translacija je inhibirana. (B) Dodatkom HipA tokom formiranja inicijacijskog kompleksa (plavo), prije formiranja trojnog kompleksa EF-Tu:GTP:Phe-tRNA^{Phe} (ljubičasto) i u već formirani trojni kompleks (crveno) nije došlo do inhibicije translacije, tj. na elektroforezi je vidljiva vrpca dipeptida Met-Phe (MF). Doc kinaza, pozitivna kontrola, dodana je u zadnju jažicu prije formiranja trojnog kompleksa te inhibira translaciju fosforilirajući EF-Tu. Dipeptid Met-Phe (MF), produkt translacije, analiziran je tankoslojnom elektroforezom i autoradiografijom. (C) Gel dobiven metodom SDS-PAGE (lijevo) i autoradiografija (desno) za analizu fosforilacije EF-Tu s HipA koristeći γ[^{32}P]ATP. Iznad gela označeno je koja komponenta je dodana u koju jažicu. Zabilježena je autofosforilacija HipA (jažice 7 i 9). Samo je Doc kinaza uspješno fosforilirala GST-EF-Tu (jažica 11). Preuzeto i dorađeno iz "Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA." Germain, 2013.

4.2. NOVI (VAŽEĆI) MODEL MEHANIZMA DJELOVANJA HipA

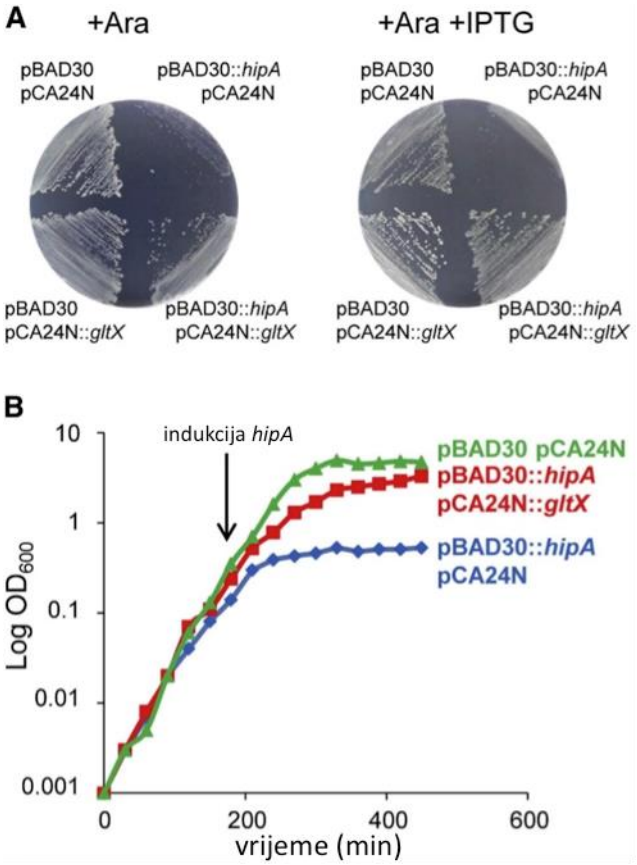
4.2.1. Neutralizacija HipA

Kako bi se objasnio točan mehanizam djelovanja HipA na inhibiciju translacije selektirani su geni čijom nadekspresijom dolazi do neutralizacije toksičnosti HipA. Analizirana je zbirka plazmida koja sadrži većinu gena *E. coli*. Svaki gen kloniran je na zasebni vektor pCA24N, prisutan u velikom broju kopija, te se nalazi pod IPTG inducibilnim lac promotorom. Samo je plazmid

pCA24N::*gltX* rezultirao supresijom inhibicije rasta uzrokovanom HipA (slika 6.A). Praćene su i krivulje rasta i može se uočiti da najbolje raste soj bez *hipA*, a najlošije raste soj s dodanim *hipA*, no bez dodanog *gltX* (slika 6.B). Gen *gltX* kodira za glutamil-tRNA-sintetazu, enzim iz skupine aminoacil-tRNA-sintetaza. Ovaj rezultat sugerira da HipA inihbira translaciju djelujući na glutamil-tRNA-sintetazu, GltX (Germain, 2013). Tokom prvog koraka sinteze proteina koji se događa u citosolu, enzim aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS) povezuje 20 aminokiselina na njihovu odgovarajuću tRNA. Svaki enzim specifičan je za jednu, određenu aminokiselinu i jednu ili više odgovarajućih tRNA (obično za jednu aminokiselinu kodira više različitih kodona koje onda čitaju različiti antikodoni na više tRNA). Znanstvenici su aaRS podijelili na dvije klase s obzirom na bitne razlike u primarnoj i tercijarnoj strukturi enzima i reakcijskom mehanizmu. Ta podjela univerzalna je za sve organizme. Reakcija katalizirana aaRS može se prikazati jednadžbom:

aminokiselina + tRNA + ATP → aminoacil-tRNA + AMP + PP_i .

Odvija se u 2 koraka u aktivnom mjestu enzima. U prvom koraku formira se intermedijer aminoacil-adenilat (aminoacil-AMP) koji je vezan na enzim. U drugom koraku aminoacilna skupina prebacuje se s intermedijera na specifičnu tRNA (Nelson, 2013).

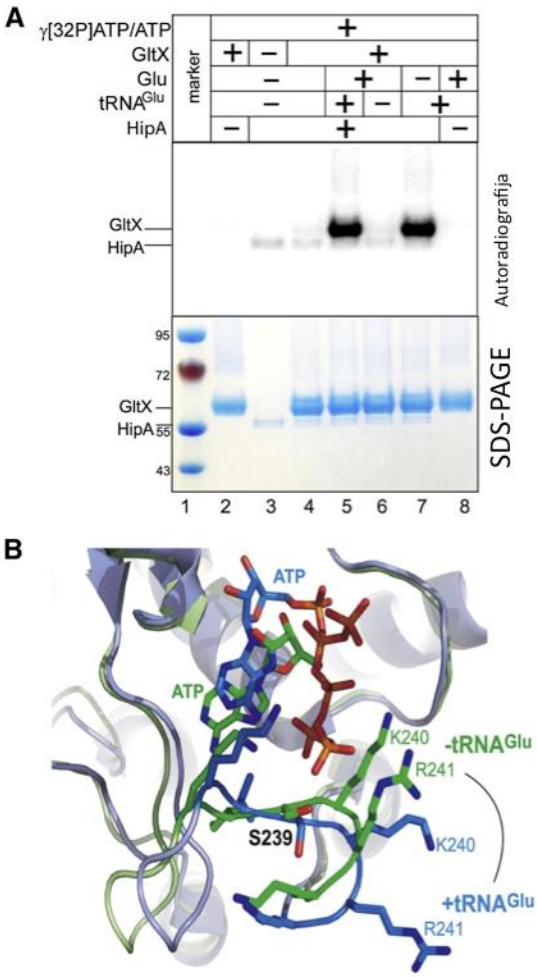


Slika 6. Nadekspresijom gena *gltX* suprimirana je toksičnost HipA. (A) Soj MG1655Δ*hipAB* koji sadrži ili prazan plazmid pBAD30 (kontrola s arabinozno inducibilnim promotorom) ili plazmid pBAD30 s ubačenim genom *hipA*, pBAD30::*hipA* (pEG3) transformiran je ili praznim plazmidom pCA24N (konotrola s IPTG inducibilnim promotorom) ili plazmidom pCA24N s ubačenim genom *gltX* (pCA24N::*gltX*). Dobivena 4 soja nasađena su na podloge s arabinozom uz dodatak IPTG-a (desno) i bez IPTG-a (lijevo). Može se uočiti da prisutnost plazmida s *gltX* neutralizira toksičnost HipA s dodanim IPTG-om i bez IPTG-a (zbog curenja lac promotora). Neutralizacija HipA bila je jača uz indukciju *gltX*, tj. uz dodatak IPTG-a. (B) Krivulje rasta soja MG1655Δ*hipAB* transformiranog naznačenim plazmidima. U sva tri slučaja dodan je IPTG. Strelica ukazuje na indukciju *hipA* dodatkom arabinoze pri OD_{600} = 0,2. Preuzeto i dorađeno iz "Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA." Germain, 2013.

4.2.2.Fosforilacija GltX

Nadalje, znanstvenici su postavili hipotezu da HipA fosforilira GltX. Kako bi provjerili tu hipotezu iz soja koji nadeksprimira HipA pročistili su GltX prije i nakon indukcije *hipA* i uzorke analizirali

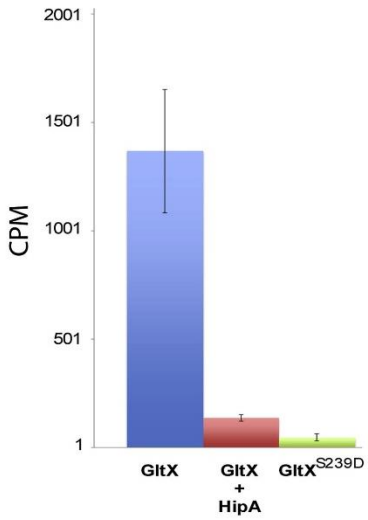
spektrometrijom masa. Uočeno je da indukcijom *hipA* poveća se molekularna masa pročišćenog GltX za 80 Da, što odgovara supstituciji vodika fosforilnom skupinom ($H_2PO_3^-$) (Germain, 2013). Zatim je provedena analiza fosforilacije GltX s HipA u *in vitro* uvjetima koristeći γ[^{32}P]ATP. Prije dodatka radioaktivno obilježenog ATP-a pomiješaju se svi ostali sastojci kako bi se izbjegla predinkubacija HipA s ATP-om koja rezultira autofosforilacijom HipA (iako i dalje je zamijećen slab signal u jažicama 3-7, slika 7.A). Dodan je i neradioaktivni ATP kako bi se postigla željena koncentracija ATP-a. Međutim, zabilježena je neznatna fosforilacija GltX s HipA kada je u rekacijsku smjesu dodan samo HipA i γ[^{32}P]ATP, bez dodatka aminokiseline Glu i $tRNA^{Glu}$ (jažica 4, slika 7. A). Zbog tog rezultata predložena je hipoteza da fosforilacija GltX s HipA ovisi o konformacijskoj promjeni GltX. Naime, Ser^{239}, dio GltX na kojem dolazi do fosforilacije, dio je visoko konzervirane fleksibilne omče koja mijenja konformaciju vezanjem $tRNA^{Glu}$ (sam glutamat ili ATP ne izazivaju promjenu konformacije, slika 7.B). Kako bi provjerili hipotezu uspoređena je fosforilacija kompleksa GltX:ATP, GltX:ATP:Glu, GltX:ATP:$tRNA^{Glu}$, GltX:ATP:$tRNA^{Glu}$:Glu. U skladu s očekivanjem do znatne fosforilacije GltX došlo je samo kada je u reakcijskoj smjesi bila prisutna $tRNA^{Glu}$ (jažica 5 i 7, slika 7.A). Kao što je vidljivo na kristalnoj strukturi (slika 7.B) u slobodnom GltX Ser^{239} zaklonjen je s nekoliko pozitivno nabijenih aminokiselina. Vezanjem $tRNA^{Glu}$ dolazi do većeg izlaganja Ser^{239} te je on dostupniji toksinu HipA (Germain, 2013).



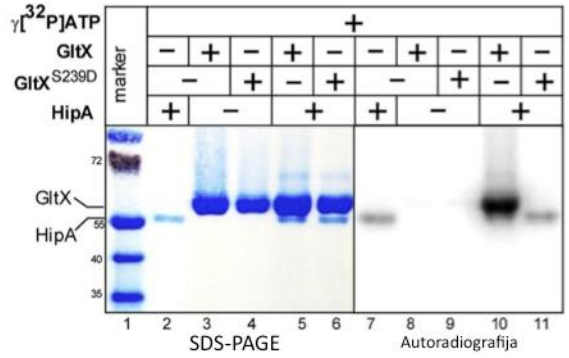
Slika 7. Fosforilacija GltX s HipA na Ser^{239} u *in vitro* uvjetima događa se u prisutnosti tRNA^{Glu}. (A) Fosforilcija GltX *in vitro*. GltX, radioaktivno označeni ATP (γ[^{32}P]ATP) i neoznačeni ATP inkubirani su sa ili bez HipA, glutamatom (Glu) ili neaminoaciliranom tRNA^{Glu} 45 minuta. Ako je dodan HipA važno ga je dodati prije drugih komponenata (GltX, Glu, tRNA^{Glu} i ATP). (B) Struktura očuvanog motiva enzima GltX koja sadrži Ser^{239}. Zeleno je prikazana konformacija omče enzima koji sadrži vezan ATP, a plavo ATP-tRNA^{Glu}. Linijom je prikazana promjena konformacije. Numeriranje odgovara aminokiselinskom slijedu GltX *E. coli*. Preuzeto i dorađeno iz "Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA." Germain, 2013.

4.2.3.Inhibicija aminoacilirajuće aktivnosti

Utvrdivši mehanizam djelovanja HipA, potrebno je ispitati utječe li fosforilacija na aktivnost glutamil-tRNA-sintetaze. Za praćenje aminoaciliranja $tRNA^{Glu}$ složene su *in vitro* aminoacilacijske reakcije s ATP-om, [^{3}H]-glutamatom i nativnim GltX, odnosno GltX fosforiliranim HipA. Reakcija aminoacilacije praćena je kroz nastajanje Glu-$tRNA^{Glu}$. Nativni GltX uspješno je aminoacilirao $tRNA^{Glu}$, no nakon tretmana s HipA efikasnost aminoacilacije GltX drastično se smanjila (slika 8.). To ukazuje da HipA inhibira aminoacilirajuću aktivnost GltX. Nadalje, kako bi istražili učinak fosforilacije na konzerviranom Ser^{239} , složen je GltX mutant koji na poziciji 239 umjesto serina ima aspartat. Mutant $GltX^{S239D}$ nije fosforiliran s HipA *in vitro* (jažica 11, slika 9.) što dovodi do zaključka da je Ser^{239} jedino mjesto fosforilacije HipA. To je uočeno i u prije opisanoj spektrometriji masa GltX gdje je indukcijom *hipA* došlo do promjene mase GltX uvijek za točno 80 Da, odnosno jedna fosforilna skupina. Također, ovaj mutant nije mogao aminoacilirati $tRNA^{Glu}$ (slika 8.) što znači da negativan naboj aspartata narušava katalitičku aktivnost enzima (Germain, 2013).



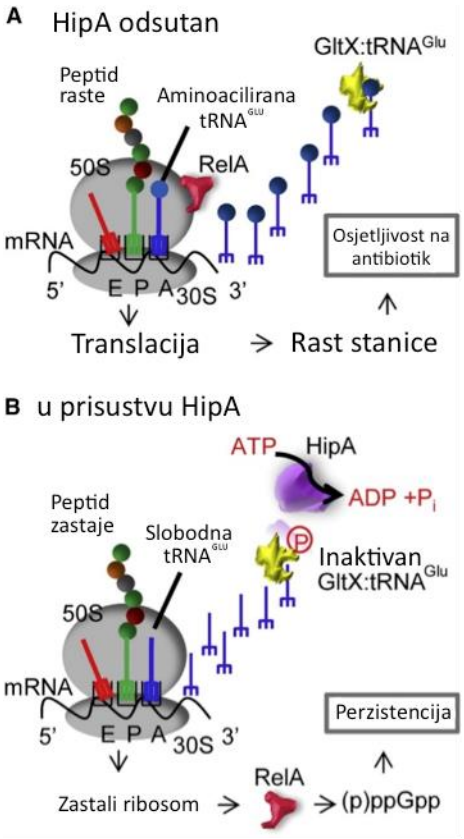
Slika 8. *In vitro* aminoacilirajuća aktivnost nativnog GltX, fosforiliranog GltX s HipA i mutanta $GltX^{S239D}$. Reakcija aminoacilacije praćena je kroz nastajanje Glu-$tRNA^{Glu}$. Naznačena je i standardna devijacija za sva tri eksperimenta. Preuzeto iz "Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA." Germain, 2013.



Slika 9. GltX^{S239D} nije fosforiliran s HipA *in vitro*. Nativni GltX, odnosno mutant GltX^{S239D} inkubirani su sa i bez HipA. Lijevo je prikazan gel dobiven elektroforezom, a desno autoradiografija. Može se uočiti razlika u fosforilaciji nativnog GltX i mutiranog (jažica 10 i 11). U jažici 11 došlo je do autofosforilacije HipA. Preuzeto iz "Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA." Germain, 2013.

5. HipA INDUCIRA PERZISTENCIJU PREKO (p)ppGpp

Prema konačnom modelu prikazanom na slici 10. B slobodan HipA fosforilira GltX te njegova inhibicija povećava koncentraciju neaminoaciliranih tRNA^{Glu} koji dolaze na A mjesto ribosoma. Zastali ribosom oslobađa i aktivira RelA koja sintetizira sekundarni glasnik (p)ppGpp. Zatim (p)ppGpp pokreće put prijenosa signala koji inhibira translaciju, transkripciju, replikaciju, sintezu stanične stijenke što konačno rezultira usporenim rastom i perzistencijom. HipA se može inaktivirati vezanjem na antitoksin HipB ili se inaktivira autofosforilacijom. U tom slučaju GltX je aktivna, translacija se odvija normalno, a RelA je utišana vezanjem na ribosom kao što je prikazano na slici 10.A (Germain, 2013).



Slika 10. Model inhibicije translacije i staničnog rasta s HipA. (A) U slučaju kada HipA nije aktivan GltX aktivira glutamate vezanjem na $tRNA^{Glu}$, translacija se odvija normalno, a bakterija je osjetljiva na antibiotik. (B) Kada je HipA slobodan inaktivira GltX fosforilacijom. Povećava se kocentracija neaminoaciliranih $tRNA^{Glu}$ u blizini ribosoma te se ona veže na A mjesto ribosoma zbog čega ribosom zastaje. Oslobađa se RelA koja je sad aktivna i stvara (p)ppGpp. Usporava se stanični rast i bakterija je perzistentna. Preuzeto i dorađeno iz "Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA." Germain, 2013.

6. LITERATURA

Dy, Ron L., Corinna Richter, George P.C. Salmond, and Peter C. Fineran. "Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections." *Annual Review of Virology* 1, no. 1 (November 3, 2014): 307–31.

Gerdes, K., P. B. Rasmussen, and S. Molin. "Unique Type of Plasmid Maintenance Function: Postsegregational Killing of Plasmid-Free Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83, no. 10 (May 1, 1986): 3116–20.

Germain, Elsa, Daniel Castro-Roa, Nikolay Zenkin, and Kenn Gerdes. "Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA." *Molecular Cell* 52, no. 2 (October 2013): 248–54.

Harms, Alexander, Ditlev Egeskov Brodersen, Namiko Mitarai, and Kenn Gerdes. "Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology." *Molecular Cell* 70, no. 5 (June 2018): 768–84.

Harms, Alexander, Etienne Maisonneuve, and Kenn Gerdes. "Mechanisms of Bacterial Persistence during Stress and Antibiotic Exposure." *Science* 354, no. 6318 (December 16, 2016): aaf4268

Huang, Charlie Y., Carlos Gonzalez-Lopez, Céline Henry, Ivan Mijakovic, and Kathleen R. Ryan. "HipBA Toxin-Antitoxin Systems Mediate Persistence in Caulobacter Crescentus." *Scientific Reports* 10, no. 1 (December 2020): 2865.

Jurėnas, Dukas, and Laurence Van Melderen. "The Variety in the Common Theme of Translation Inhibition by Type II Toxin–Antitoxin Systems." *Frontiers in Genetics* 11 (April 17, 2020): 262.

Nelson, David Lee, and Michael M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2013.

Schumacher, M. A., K. M. Piro, W. Xu, S. Hansen, K. Lewis, and R. G. Brennan. "Molecular Mechanisms of HipA-Mediated Multidrug Tolerance and Its Neutralization by HipB." *Science* 323, no. 5912 (January 16, 2009): 396–401.

Sebastian, Jees, Sharmada Swaminath, Rashmi Ravindran Nair, Kishor Jakkala, Atul Pradhan, and Parthasarathi Ajitkumar. "De Novo Emergence of Genetically Resistant Mutants of Mycobacterium Tuberculosis from the Persistence Phase Cells Formed against Antituberculosis Drugs In Vitro." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61, no. 2 (February 2017): e01343-16, e01343-16.

Unterholzner, Simon J, Brigitte Poppenberger, and Wilfried Rozhon. "Toxin–Antitoxin Systems: Biology, Identification, and Application." *Mobile Genetic Elements* 3, no. 5 (September 20, 2013): e26219.

Windels, Etthel Martha, Joran Elie Michiels, Maarten Fauvart, Tom Wenseleers, Bram Van den Bergh, and Jan Michiels. “Bacterial Persistence Promotes the Evolution of Antibiotic Resistance by Increasing Survival and Mutation Rates.” *The ISME Journal* 13, no. 5 (May 2019): 1239–51.

7. SAŽETAK

Cilj ovog rada jest objasniti bakterijsku perzistenciju, sustav toksin-antitoksin i načine njegovog djelovanja, proces translacije i načine njene inhibicije te postizanje perzistencije toksinom HipA i model njegova djelovanja. Perzistencija je stanje usporenog rasta bakterije u kojem ona postaje tolerantna na antibiotike i druge okolišne stresne uvjete. Pokazano je da perzistencija olakšava nastanak rezistencije i glavni je uzrok kroničnih infekcija te u svrhu razvitka ciljane terapije važno je razjasniti njen mehanizam. Genski krivac za bakterijsku perzistenciju jest sustav toksin-antitoksin. Aktivacijom toksina inhibira se najčešće proces translacije te stanica ulazi u dormantno stanje usporenog rasta i postaje perzistentna. Inaktivacijom toksina stanica može ponovno uspostaviti normalan rast, ali u tom slučaju gubi perzistenciju. Prvi otkriveni gen perzistencije u *E. coli* je *hipA* koji kodira za serin/treonin kinazu i inhibira translaciju, transkripciju i replikaciju. Dio je *hipBA* operona koji još čini gen za antitoksin HipB. Po početnom modelu mehanizma djelovanja HipA, predloženo je da on fosforilira elongacijski faktor EF-Tu, koji dovodi aminoacilirane tRNA na ribosom, i time inhibira translaciju. Međutim, eksperimentom *in vitro* u kojem je korišten γ[^{32}P]ATP pokazano je da HipA ne fosforilira EF-Tu. Daljnjim eksperimentima opisanim u radu utvrđeno je da HipA fosforilira glutamil-tRNA-sintetazu i time dolazi do inhibicije translacije i aktivacije enzima RelA koji stvara (p)ppGpp. Pokazano je da fosforilacija ovisi o konformaciji glutamil-tRNA-sintetaze. S obzirom na to da HipA uvijek fosforilira na konzerviranom Ser^{239} koji je dio fleksibilne omče, vezanjem tRNA^{Glu} mijenja se konformacija i Ser^{239} postane više izložen i dostupan HipA.

8. SUMMARY

Aim of this review is to explain bacterial persistence, toxin-antitoxin module and the way it works, protein translation and possible mechanisms of its inhibition and molecular mechanisms of bacterial persistence mediated by HipA. Baterial persistence is a dormant state in which bacteria tolerates many antibiotics and other stressful conditions. It is known that bacterial persistence promotes evolution of antibiotic resistence and it is the main cause of many chronic infections. In order to develop targeted therapy it is important to understand molecular mechanism by which bacteria become persistant. Genes which cause persistance are toxin-antitoxin modules. Toxin activation usually inhibits translation after which cell enters physiological state of slow growth and becomes persistant. If the toxin is inactivated then the cell restores its normal growth but is no longer persistant. First gene discovered in *E. coli* that causes persistance is *hipA*. It codes for serine/threonine kinase which inhibits translation, transcription and replication. Together with *hipB* (gene for anitoxin) is part od *hipBA* operon. The first model of persistence mediated by HipA suggested that HipA inhibits translation by phosphorylating EF-Tu, the elongation factor which brings charged tRNA molecules to the ribosome. However, *in vitro* experiments in which they used $\gamma[^{32}P]$ATP results did not confirm the initial model. The further experimental work revealed that HipA phosphorylates glutamyl-tRNA-synthetase (GltX) which results in translation inhibition and activation of the enzyme RelA which produces (p)ppGpp. Finally, the results showed that phosphorylation depends on conformation of GltX. HipA always phosphorylates on Ser^{239} which is part of a conserved flexible loop that changes conformation when $tRNA^{Glu}$ binds and Ser^{239} becomes more exposed.