GENETIČKI DOPRINOS MEHANIZMIMA VIRULENTNOSTI U VRSTE Campylobacter fetus subsp. venerealis

Vorkapić, Dina

Master's thesis / Diplomski rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:878268

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Dina Vorkapić

Genetički doprinos mehanizmima virulentnosti u vrste *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*

Diplomski rad

Osijek, 2012.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Diplomski rad

Odijel za biologiju

Diplomski znanstveni studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

GENETIČKI DOPRINOS MEHANIZMIMA VIRULENTNOSTI U VRSTE *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*

Dina Vorkapić

Rad je izrađen: 2012. na sveučilištu Karl Franzens u Grazu u sklopu Erasmus programa za razmjenu studenata

Mentor: Doc.dr. sc. Ljiljana Krstin

Komentor: Prof. dr. sc. Ellen Zechner (Sveučilište Karl-Franzens u Grazu)

Kratak sažetak diplomskog rada:

Campylobacter fetus subsp. *venerealis* (*Cfv*) je patogen koji kolonizira goveđi spolni sustav uzrokujući pobačaj i neplodnost. Pretpostavlja se da geni *fic1* i *fic2*, pronađeni u genomu ove podvrste, doprinose njenoj virulentnosti i prilagodbi na domaćina, te da produkti ovih gena, efektorni proteini Fic1 i Fic2, funkcioniraju kao „toksin-antitoksin sustav“ unutar bakterijske stanice. Navedeni geni proučavani su u ovom radu te je predložen njihov odnos i funkcija unutar *Cfv*.

Broj stranica: 46

Broj slika: 28

Broj tablica: 4

Broj literaturnih navoda: 39

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: fic geni *C. fetus venerealis*, toksin-antitoksin sustavi, virulentnost

Datum obrane:.17.listopada, 2012.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Elizabeta Has-Schön
2. Doc. dr. sc. Ljiljana Krstin
3. Doc. dr. sc. Ivna Štolfa

Rad je pohranjen: u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

BASIC DOCUMENTACION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek MS thesis

Department of Biology

Graduate Study of Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

GENETIC CONTRIBUTION TO VIRULENCE MECHANISMS IN *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*

Dina Vorkapić

Thesis performed at: Karl Franzens University of Graz through the Erasmus student exchange program, 2012.

Supervisior: Doc.dr. sc. Ljiljana Krstin

Co-supervisor: Prof. dr. sc. Ellen Zechner (Karl Franzens University of Graz)

Short abstract:

Campylobacter fetus subsp. *venerealis* (*Cfv*) is a pathogen which colonizes bovine genital tract, causing abortion and infetility. It is presumed that *fic1* and *fic2* genes, present in the genome of this subspecies, contribute to its virulence and host specificity, and that products of these genes, effector proteins Fic1 and Fic2, function as „toxin-antitoxin system“ within the bacterial cell. Above mentioned genes are investigated in this thesis, and their relation and function within *Cfv* is suggested.

Number of pages: 46

Number of figures: 28

Number of tables: 4

Number of references: 39

Original in: Croatian

Key words: *C. fetus venerealis* fic genes, toxin-antitoxin systems, virulence

Date of the thesis deference: October 17th, 2012

Reviewers:

1. Prof. dr. sc. Elizabeta Has-Schön
2. Doc. dr. sc. Ljiljana Krstin
3. Doc. dr. sc. Ivna Štolfa

Thesis deposited in: Library of Department od Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc Ljiljani Krstin na susretljivosti i pomoći, profesorici Ellen Zechner što mi je dala priliku da obnovim ljubav prema biologiji, te magistri Hanni Sprenger na svakoj minuti strpljenja.

Veliko hvala i mojoj obitelji i prijateljima, za sve ove godine ljubavi i podrške.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu Erasmus programa razmjene studenata na Odjelu molekularnih bioznanosti sveučilišta Karl Franzens u Grazu 2012. godine, pod vodstvom komentorice prof.dr.sc. Ellen Zechner, te mentorice doc.dr.sc. Ljiljane Krstin sa Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjela za biologiju.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Bakterije 1
1.1.1. Bakterijski rast 2
1.1.2. *Escherichia coli* u laboratorijskim istraživanjima 3
1.2. Toksin-antitoksin sustavi 3
1.3. FIC proteini 4
1.4. *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* 7
1.5. Cilj rada 9

2. MATERIJALI I METODE 10
2.1. Materijali 10
2.2. Metode 13
2.2.1. Gel elektroforeza 13
2.2.2. Izolacija DNA fragmenata iz agaroznog gela nakon elektroforeze 14
2.2.3. Izolacija plazmidne DNA 14
2.2.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR) 15
2.2.5. Kolonijska lančana reakcija polimerazom – kolonijski PCR (Colony PCR) 17
2.2.6. Pročišćavanje DNA fragmenata nastalih lančanom reakcijom polimerazom 18
2.2.7. Kreiranje mutacije u *fic1* genu korištenjem PCR metode u dva koraka 18
2.2.8. Molekularno kloniranje 20
2.2.8.1. Vektori u molekularnom kloniranju 20
2.2.8.2. pBAD24 20
2.2.8.3. Restrikcijske endonukleaze 22
2.2.8.4. DNA ligacija 22
2.2.8.5. Priprema elektrokompetentnih stanica *E.coli* 23
2.2.8.6. Bakterijska elektro-transformacija 23
2.2.9. „Screening“ bakterijskih kolonija 24
2.2.10. Restrikcijska analiza rekombinantnog plazmida 24
2.2.11. DNA sekvenciranje 25
2.2.12. Bioinformatika 25
2.2.13. Izrada bakterijskih krivulja rasta 25

3. REZULTATI 26
3.1. Kreiranje mutacije u *fic1* genu 26
3.2. Kreiranje rekombinantne DNA 27
3.2.1. Restrikcija plazmida i inserta 27
3.2.2. DNA ligacija 27
3.2.3. Transformacija elektrokompetentnih stanica *E.coli* DH5α 28
3.3. Kolonijski PCR 28
3.4. PCR i restrikcijske kontrole 29
3.4.1. Kontrola prisutnosti rekombinantne DNA pomoću PCR reakcije 29
3.4.2. Kontrola prisutnosti rekombinantne DNA pomoću restrikcijskih enzima 31
3.5. Provjera (S33A/E37A) mutacije sekvenciranjem DNA 32
3.6. Pohrana plazmidnog konstrukta 32
3.7. Koekspresija *fic1*(S33A/E37A) i *fic2* gena 32
3.8. Izrada bakterijskih krivulja rasta 36

4. RASPRAVA 41

5. ZAKLJUČAK 43

6. LITERATURA 44

1. UVOD

1.1. Bakterije

Bakterije su jednostanični prokariotski organizmi koji ne posjeduju jezgru i stanične organele, no imaju složenu staničnu strukturu i sposobni su prilagoditi se različitim staništima. Većina bakterija obavijena je staničnom ovojnicom koja se sastoji od 3 sloja: glikokaliksa, stanične stijenke i stanične membrane. Mnoge bakterije posjeduju proteinske nastavke (bičevi, pili) koji su usidreni u staničnu membranu, a omogućuju kretanje, prijanjanje na različite površine ili bakterijsku konjugaciju (prijenos bakterijske DNA iz jedne stanice u drugu) (Nester i sur., 2004).

Genetički materijal bakterije prisutan je u obliku jedinstvenog kromosoma koji se naziva nukleoid. Cijeli bakterijski genom je jedan kružni replikon - jedinica DNA koja se umnaža samostalno, jednom po staničnom ciklusu. Replikon sadrži početak mjesta replikacije, sekvencu ORI (origin of replication), a moguće je da sadrži i završetak (terminus) replikacije (Lewin, 2000).

Kako bi se nosile s promjenama okolišnih uvjeta, bakterije posjeduju kontrolne mehanizme koji im omogućuju sintezu velike količine staničnog materijala iz ograničenih energetskih izvora. Iz istog razloga, stanice imaju mogućnost kontrole ekspresije gena koji su im potrebni u određenom trenutku (Nester i sur., 2004). Bakterijski genom stoga često sadrži operone - sustave strukturalnih gena i elemenata koji kontroliraju gensku ekspresiju, formirane kao jedna regulatorna jedinica. Nisu svi geni podložni istom tipu regulacije, te se ponekad mogu uključiti ili isključiti kao odgovor na specifične okolišne uvijete. Sinteza enzima kao odgovor na prisutstvo određenog supstrata naziva se indukcija. Suprotno tome, represija predstavlja prestanak sinteze enzima kao odgovor na prisutstvo određenog supstrata – represora.

Bakterije često posjeduju plazmide - kružne dvolančane DNA molekule koje se repliciraju neovisno o kromosomalnoj DNA prije svake stanične diobe. Veličinom variraju od nekoliko tisuća parova baza do više od 100 kb. Sekvenca ORI prisutna je i u plazmida, te upravo ona omogućuje njegovo neovisno repliciranje. Geni koji se nalaze na plazmidima bakteriji omogućavaju nova i korisna svojstva koja nisu esencijalna za život (Lewin, 2000).

Prijenos genetskog materijala između bakterijskih vrsta odvija se putem tri mehanizma: transformacije (prijenos „gole“ DNA), transdukcije (prijenos DNA pomoću bakterijskog virusa) i konjugacije (prijenos DNA direktnim kontaktom stanica). Stjecanje novih gena koje nije rezultat razmnožavanja naziva se horizontalni ili lateralni prijenos gena i

čest je među prokariotima (Nester i sur., 2004). Ovakav prijenos gena moguć je i među nesrodnim vrstama, te povećava genetsku raznolikost i ubrzava evoluciju genoma. U bakterija se na ovaj način često prenose geni za otpornost na određene antibiotike (Jain i sur., 1999; Hacker i sur., 1997).

1.1.1. Bakterijski rast

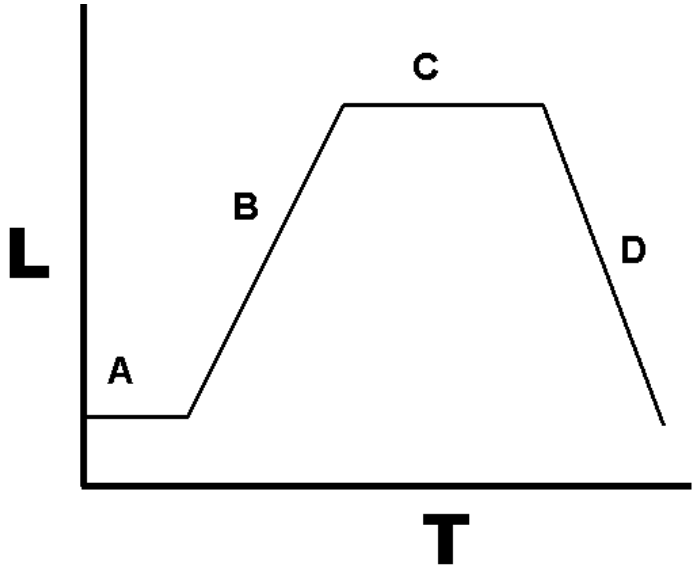
U uvjetima dovoljne količine nutrijenata i potrebnih okolišnih čimbenika rast bakterija događa se u 2 koraka – bakterijske stanice povećavaju volumen i sintetiziraju nove stanične sastavnice, a zatim se binarno dijele i broj stanica u populaciji se povećava. Vrijeme potrebno za diobu roditeljske stanice u dvije stanice kćeri naziva se generacijsko vrijeme i ovisi o bakterijskoj vrsti. Stanice se mogu eksponencijalno razmnožavati dok god su okolišni uvijeti povoljni. U laboratorijskim uvijetima model populacijskog rasta bakterija je karakterističan i predvidiv, obzirom da su nutrijenti i prostor za rast ograničeni, te ne postoji mehanizam za uklanjanje otpadnih produkata razmnožavanja (Talaro, 2005). Krivulja bakterijskog rasta (Slika1) karakterizirana je s četiri faze (Nester i sur., 2004):

1. Lag faza, tijekom koje se sintetiziraju makromolekule potrebne za umnožavanje, te se generira energija u obliku ATP-a.

2. Log faza (eksponencijalna faza), tijekom koje se stanice dijele konstantnom brzinom, te se nakon svakogn određenog vremenskog intervala broj stanica udvostručava.

3. Stacionarna faza, u koju stanice ulaze nakon što su iz medija iscrpile sve nutrijente potrebne za razmnožavanje. Ukupan broj stanica tijekom ove faze je relativno stalan, obzirom da neke stanice umiru, a neke se još uvijek dijele, dok vremensko trajanje ovisi o vrsti i okolišnim uvjetima (nekoliko sati do nekoliko dana).

4. Faza odumiranja, tijekom koje se ukupan broj živih stanica smanjuje tj. stanice eksponencijalno umiru.



Slika 1. Krivulja bakterijskog rasta. L predstavlja log broja CFU (colony forming units), dok T predstavlja vrijeme. Četiri glavne faze karakteriziraju bakterijski rast – lag faza (A), log faza (B), stacionarna faza (C) i faza odumiranja (D) (web navod 1).

1.1.2. *Escherichia coli* u laboratorijskim istraživanjima

E.coli je štapićasta Gram-negativna bakterija koja se često koristi kao model tijekom mikrobioloških istraživanja, te je kao takva prisutna u obliku brojnih sojeva sa specifičnim karakteristikama. Prvotno ju je izolirao i opisao Theodor Escherich, a prirodno stanište joj je debelo crijevo endotermnih organizama. Generacijsko vrijeme *E.coli* je približno 20 minuta, što ju čini povoljnim organizmom za uvođenje rekombinantne DNA i pregled ekspresije stranih gena tijekom metode molekularnog kloniranja (Nester i sur., 2004).

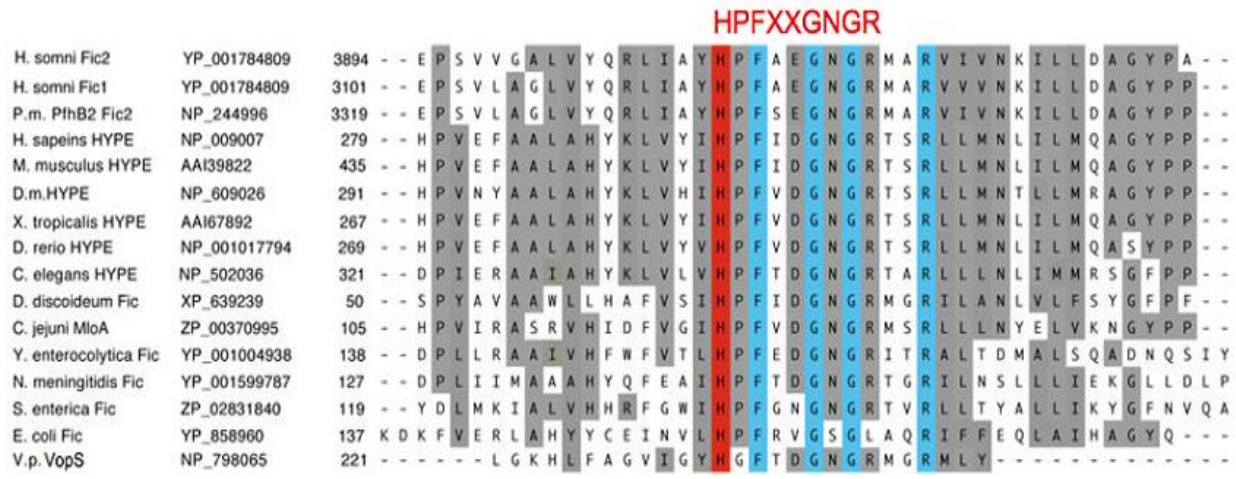
1.2. Toksin-antitoksin sustavi

Toksin-antitoksin (TA) sustavi su mali genetički moduli koji se sastoje od dvije komponente – stabilnog toksina i nestabilnog antitoksina. Uobičajena podjela TA sustava je u tri razreda, ovisno o prirodi antitoksina i načinu djelovanja. Dok su toksini uvijek proteini, antitoksini mogu biti RNA molekule (tip I i III) ili proteini (tip II). Tip II je visoko zastupljen u stanicama zbog svoje sposobnosti prijenosa horizontalnim prijenosom gena. Molekularni mehanizam djelovanja TA sustava počiva na različitoj stabilnosti njegove dvije komponente. Slobodni antitoksin je nestabilan u odnosu na svoj srodni toksin, te se u stanicama koje normalno rastu mora neprestano sintetizirati kako bi inhibirao funkciju toksina. Jednom kada je toksin oslobođen iz stabilnog TA kompleksa, očituje se njegov negativn utjecaj na stanicu - zastoj u rastu ili stanična smrt. Kao uloga TA sustava u bakterijskim stanicama predloženo

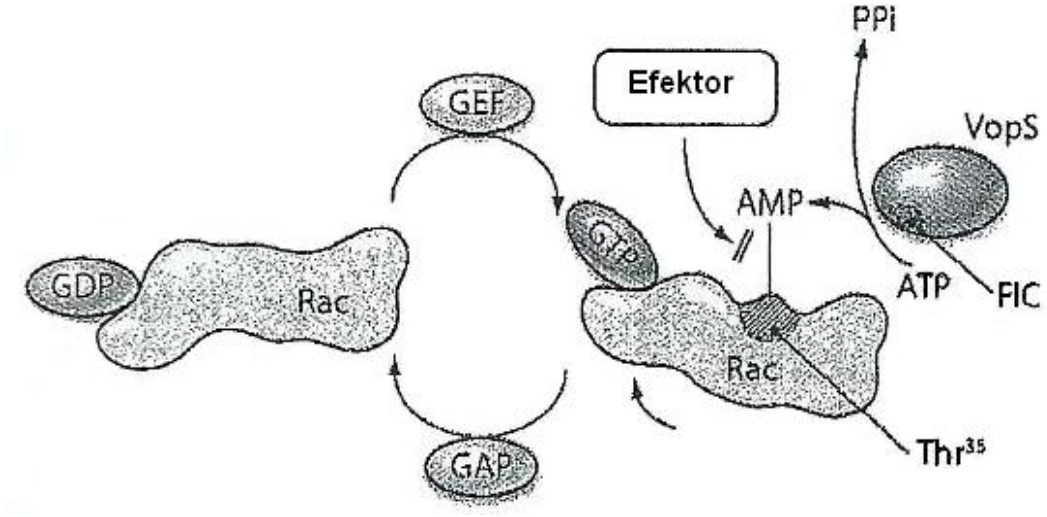
savlavadavanje stresa, očuvanje mobilnih genetičkih elemenata tj. zaštita od gubitka DNA, te zaštita od unosa strane DNA (Van Melderen, 2010; Yamaguchi i sur., 2011).

1.3. Fic proteini

Dinamika staničnog kostura (citoskeleta) u eukariota regulirana je brojnim signalnim putevima koji uključuju proteine Rho obitelji guanin trifosfataza (GTP-aza). Ovi proteini sudjeluju u mehanizmima stanične obrane poput fagocitoze, transporta fagosoma, transkripcijskoj aktivaciji efektora imunosti, staničnoj smrti i sl., te su stoga često na meti patogenih mikroba. Na primjeru VopS proteina, izoliranog iz bakterije *Vibrio parahaemoliticus,* objašnjen je mehanizam putem kojeg patogen djeluje na Rho GTP-aze. Na C-terminalnom kraju proteina pronađen je motiv nazvan FIC domena (Yarbrough i sur., 2009). Proteini koji sadrže ovu konzerviranu domenu (HPFxxGNGR) (Slika 2) imaju mogućnost kataliziranja reakcije prijenosa cikličkog adenozin 5'-monofosfata (cAMP) na ključne aminokiselinske ostatke Rho GTP-aza, što uzrokuje njihovu inaktivaciju (Slika 3). Ovakva posttranslacijska modifikacija proteina naziva se naziva se adenililacija ili AMP-ilacija (AMPylation), a naziv FIC označava filamentaciju uzrokovanu cikličkim adenozin 5'-monofosfatom. Rezultat ovakvih interakcija može biti reorganizacija citoskeleta, fragmentacija Golgijevog aparata, te u konačnosti nekroza ili apoptoza stanice domaćina (Roy i Mukherjee, 2009; Yarbrough i sur., 2009). Konzervirani histidin na početku konsenzus sekvence je katalitički aminokiselinski ostatak, te ima ključnu ulogu prilikom citotoksičnog djelovanja Fic proteina (Worby i sur., 2009).



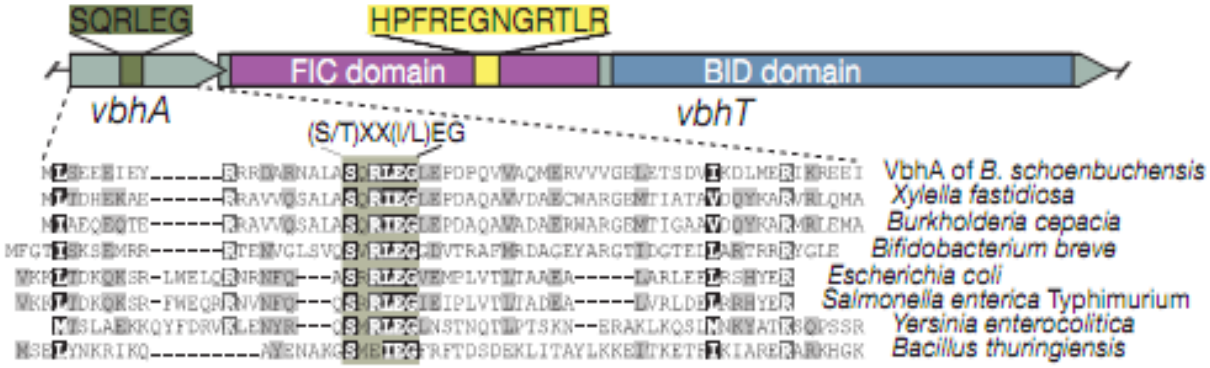
Slika 2. Konzervirana FIC domena (HPFxxGNGR) pronađena je u brojnim bakterijskim proteinima. Slika je preuzeta i prilagođena prema Worby i sur. (2009).



Slika 3. Adenililacija Rho GTP-aze (Rac) pomoću VopS proteina. FIC domena VopS proteina katalizira prijenos cAMP-a na ključni tirozinski ostatak (Thr^{35}) Rac GTP-aze, čime se sprječava njena interakcija s efektorom i sudjelovanje u kaskadi kontrole dinamike citoskeleta. Slika je preuzeta i prilagođena prema Roy i Mukherjee (2009).

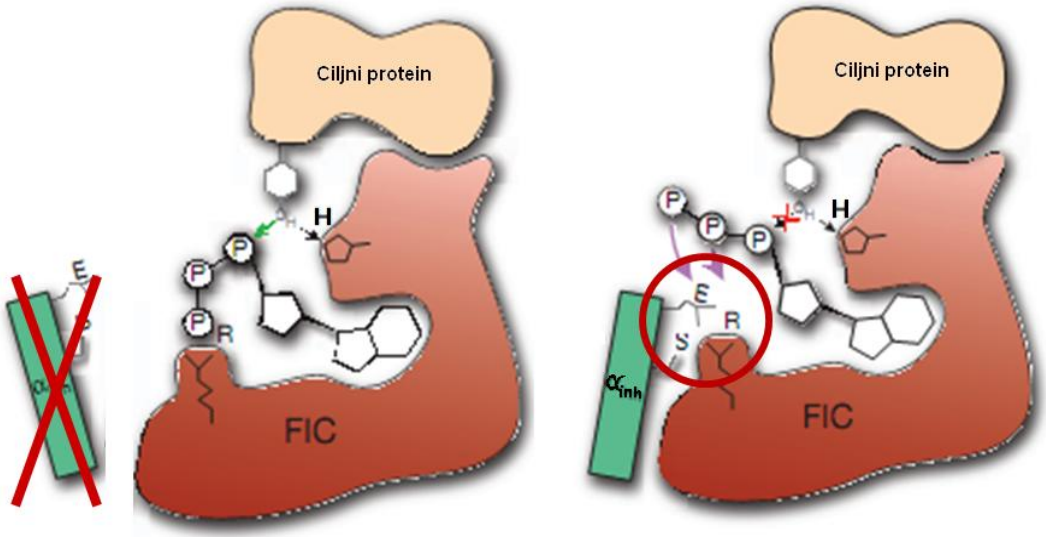
Mehanizam djelovanja Fic proteina objašnjen je i na primjeru VbhT proteina izoliranog iz patogene bakterije *Bartonella schoenbuchensis* (Engel i sur., 2012). VbhT protein sastoji se iz N-terminalne FIC domene, te C-terminalne BID domene (Slika 4.) koja katalizira prijenos Fic proteina u ciljnu stanicu pomoću tipa IV sekrecijskog sustava (T4SS). T4SS su kompleksni sustavi s funkcijom u translokaciji DNA i proteina preko stanične membrane u procesu koji zahtijeva direktan kontakt dvije stanice (Alvarez-Martinez i Christie, 2009).

Ekspresija VbhT u *E.coli* uzrokuje prestanak rasta populacije, otkrivajući citotoksično djelovanje VbhT proteina. Koekspresija VbhT i VbhA, malog proteina kodiranog uzvodno od gena *vbhT*, u potpunosti će suzbiti toksičan učinak na stanice što vodi do zaključka da VbhT i VbhA djeluju kao toksin-antitoksin sustav. Antitoksin VbhA posjeduje konzerviranu domenu, nazvanu inhibicijska domena (α_{inh}). Ova domena pronađena je i u brojnim drugim bakterijama, a ima strukturu α heliksa sa specifičnom konsenzus sekvencom ([S/T]xx[I/L]EG). Geni *vbhA* i *vbhT* preklapaju se u dva para baza (Slika 4).



Slika 4. Struktura genskog lokusa *B. schoenbuchensis*. Gen *vbhA* sadrži konsenzus sekvencu u inhibicijskoj domeni, dok se gen *vbhT* sastoji od FIC i BID domene. Slika je preuzeta iz Engel i sur. (2012)

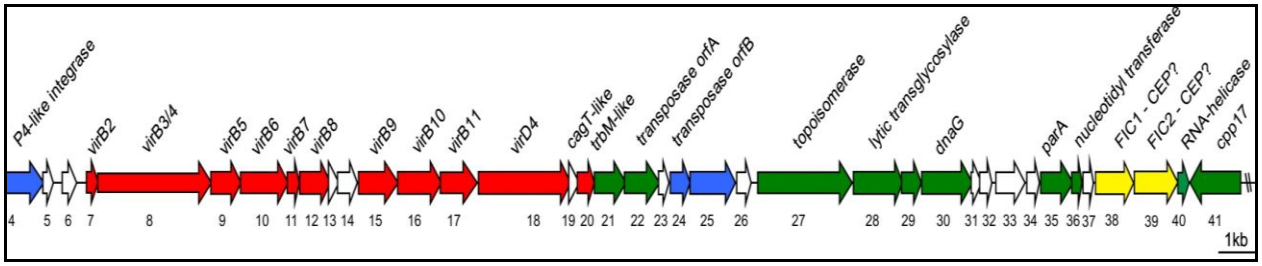
Također, ustanovljeno je da su serin (S) i glutamat (E) ključni aminokiselinski ostaci u motivu inhibicijske domene, te je prema tome predložen mehanizam interakcije FIC domene i inhibicijske domene (Slika 5). Kada je inhibicijska domena u interakciji s FIC domenom, ključni S i E ostaci formiraju vodikove veze s konzerviranim argininskim (R) ostatkom FIC domene, te se inhibicijska domena natječe za vezno mjesto s γ-fosfatom ATP-a. Kako je Fic protein onemogućen u vezanju ATP-a, adenililacija ciljnog proteina je onemogućena (Engel i sur., 2012).



Slika 5. Mehanizam interakcije FIC domene i inhibicijske domene (α_{inh}). Prilikom disocijacije α_{inh} vezno mjesto Fic proteina je slobodno, te se na njega veže ATP i ciljni se protein adenililira (lijevo). Ukoliko je α_{inh} u interakciji s FIC domenom, vezanje ATP-a je onemogućeno zbog formiranja vodikovih veza između ključnih aminokiselinskih ostataka inhibicijske domene i argininskog ostatka FIC domene (desno). Slika je preuzeta i prilagođena prema Engel i sur. (2012)

1.4. *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*

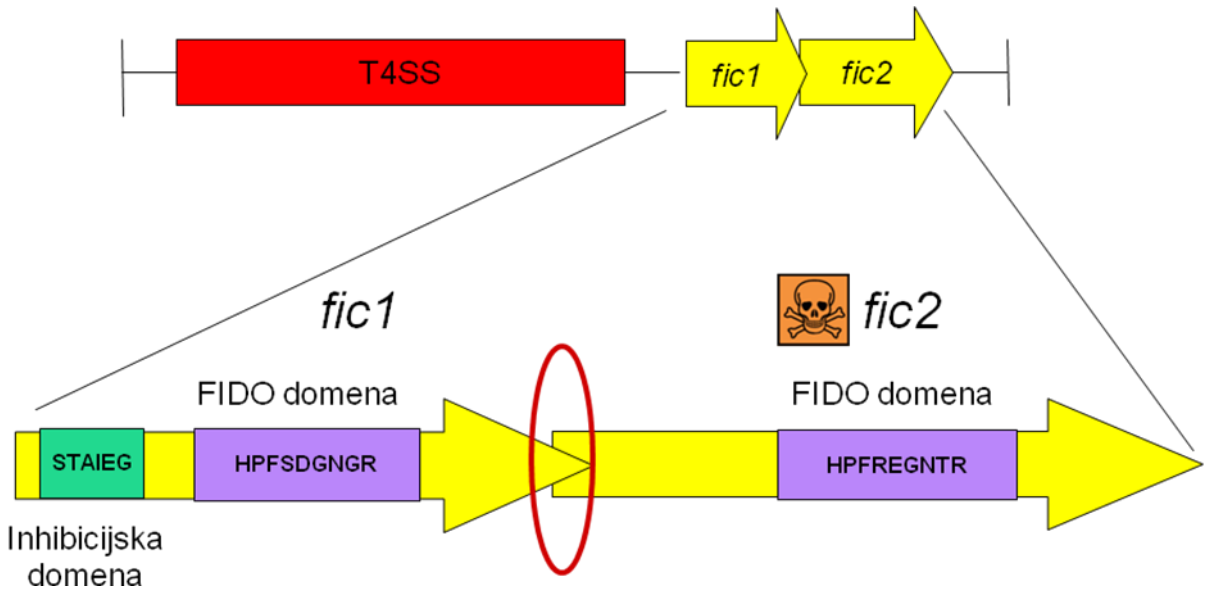
Campylobacter fetus subsp. *fetus* i *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* dvije su podvrste Gram-negativne bakterije *Campylobacter fetus*, koje su visoko povezane na genskoj razini, no razlikuju se u tkivima i domaćinima koje naseljavaju (Gorkiewicz i sur., 2010). *C. fetus* subsp. *fetus* je najčešće komenzal u tankom crijevu ovaca i krava, no može parazitirati i u probavnom sustavu čovjeka, te predstavlja opasnost za pacijente s slabim imunološkim sustavom. *C. fetus* subsp. *venerealis* izolirana je primarno iz spolnog sustava goveda gdje uzrokuje epidemičnu infekciju nazvanu BVC (bovine venereal campylobacteriosis) koja može dovesti do smrti embrija, pobačaja i neplodnosti (Blaser i sur., 2008). Glavnu razliku između dviju podvrsta predstavlja prisutstvo patogenog otoka (pathogenicity island – PAI) u genomu *C. fetus* subsp. *venerealis* (Slika 6). PAI predstavlja dio DNA koji se može prenositi horizontalnim transferom gena, a najčešće nosi nakupine gena koji doprinose virulentnosti organizma, te mogu pretvoriti benigni organizam u patogen (Groisman i Ochman, 1996). Glavne sastavnice PAI *C. fetus* subsp. *venerealis* su geni potrebni za oformljavanje tipa IV sekrecijskog sustava (T4SS), fic geni (*fic1* i *fic2*), te mobilni geni koji kodiraju transpozaze i integraze. Obzirom da se fic geni nalaze u neposrednoj blizini gena za T4SS, pretpostavlja se da se efektorni proteini Fic1 i Fic2 luče u stanice domaćina putem ovog sekrecijskog sustava (Gorkiewicz i sur., 2010), a novija istraživanja dokazala su ovu pretpostavku za protein Fic2 (Kienesberger i sur., 2011).



Slika 6. Patogeni otok u genomu *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Geni koji kodiraju tip IV sekrecijski sustav označeni su crveno. Fic geni označeni su žuto. Slika je preuzeta i prilagođena prema Gorkiewicz i sur. (2010).

Fic1 protein dugačak je 278, a Fic2 306 aminokiselinskih ostataka. Geni *fic1* i *fic2* preklapaju se u jednom paru baza, te sadrže FIC domenu (Slika 7), koja je ponešto modificirana obzirom na uobičajenu FIC konsenzus sekvencu.

Novija klasifikacija svrstava Fic1 i Fic2 u Fido proteine, s centralnom domenom (HPFx[D/E]GN[G/K]R) koja povezuje topološki slične domene FIC i doc (death on curing) (Kinch i sur., 2009). Doc protein pripada Phd-Doc toksin-antitoksin sustavu pronađenom u P1 bakteriofagu *E.coli*. U odsutstvu Phd antitokisina Doc ima toksičan učinak na stanice. Geni *phd* i *doc* također se preklapaju u jednom paru baza (Liu i sur., 2008). Gen *fic1* sadrži i dodatnu inhibicijsku domenu (STAIEG), uzvodno od FIDO domene. Pojedinačna ekspresija Fic proteina *C. fetus* subsp. *venerealis* u *E.coli* pokazala je da Fic2 ima toksičan učinak na stanice, dok isto nije slučaj za Fic1. Pretpostavka je da ključnu ulogu u tome ima upravo inhibicijska domena, koja može imati utjecaj na FIDO domene oba proteina.



Slika 7. Organizacija gena *fic1* i *fic2* na patogenom otoku *C. fetus* subsp. *venerealis*. Oba gena sadrže specifične FIDO konsenzus sekvence, te se preklapaju u jednom paru baza. Gen *fic1* sadrži i inhibicijsku domenu. Produkti ovih gena otkrivaju različit fenotip prilikom ispoljavanja u *E.coli* – Fic2 ima toksičan učinak na stanice, dok Fic1 nema (autorska slika).

1.5. Cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti odnos *fic1* i *fic2* gena patogene bakterije *C. fetus* subsp. *venerealis*. Pretpostavka je da efektorni proteini Fic1 i Fic2, kodirani ovim genima, funkcioniraju kao toksin-antitoksin sustav unutar bakterijske stanice, pri čemu Fic1 ima funkciju antitoksina zbog posjedovanja inhibicijske domene. Ova domena može imati utjecaj na toksičnost oba proteina, te je stoga potrebno prvobitno utvrditi njenu funkciju i pojedinačni odnos s Fic1 i Fic2 proteinima.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

Mediji:

LB (Luria-Bertani) medij (tekući)

LB s agarom u Petri zdjelicama s odgovarajućim antibiotikom

Antibiotici:

Kloramfenikol – 12,5 µg/ml

Ampicilin - 100µg/ml

Šećeri:

D(+)Glukoza monohidrat – otopina 20%

L(+)Arabinoza – otopina 5%

Glicerin 87%

Dvostruko destilirana voda (dd H_2O) proizvođača Fresenius

Gel za elektroforezu:

Agaroza – peqGOLD Universal Agarose proizvođača Peqlab

Etidij bromid

TAE (Tris-acetat-EDTA) pufer 10X

Obojeni pufer za nanošenje uzoraka na gel (Loading dye 10X):

0,1 mL SDS (natrij dodecil sulfat) 20%

5,7mL glicerin 87%

4,2 mL TAE 1X

5 mg boja Bromphenol blue

5 mg boja Xylene cyanol

Enzimi:

Restrikcijske endonukleaze proizvođača Fermentas ili New England BioLabs (uz odgovarajući pufer):

KpnI – DNA sekvenca **5'...G G T A C^C...3'**

3'...C^C A T G G...5'

*Bam*HI – DNA sekvenca **5'...G^G A T C C...3'**

3'...C C T A G^G...5'

*Sal*I – DNA sekvenca **5'...G^T C G A C...3'**

3'...C A G C T^G...5'

*Eco*RI – DNA sekvenca **5'...G^A A T T C...3'**

3'...C T T A A^G...5'

*Pvu*I – DNA sekvenca **5'...C G A T^C G...3'**

3'...G C^T A G C...5'

DNA Polimeraze proizvođača Fermentas:

Taq Polimeraza

Phusion Polimeraza

DNA ligaza proizvođača Fermentas:

T4 DNA ligaza

Puferi proizvođača Fermentas:

1X Buffer R – pufer uz restrikcijski enzim *Pvu*I

1X Buffer O - pufer uz restrikcijski enzim *Sal*I

1X Buffer *Bam*HI - pufer uz restrikcijski enzim *Bam*HI

1X Buffer *Eco*RI - pufer uz restrikcijski enzim *Eco*RI

Thermo Pol 10x Buffer – pufer uz enzim Taq DNA polimeraza

Phusion 10X Buffer – pufer uz enzim Phusion DNA polimeraza

T4 DNA ligase 10X Buffer – pufer uz enzim T4 DNA ligaza

Pufer proizvođača New England BioLabs:

NEBuffer 4 – pufer uz restrikcijske enzime *Kpn*I i *Sal*I

DNA standardi proizvođača Fermentas:

O'GeneRuler 1kb DNA Ladder, 250-10,000 bp

O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder, 100-1000 bp

Početnice (primers) korištene u ovom radu dane su u Tablici 1:

Tablica 1. Početnice korištene pri izradi diplomskog rada

Ime početnice	**Sekvenca**	**T_m**
Fic1pBAD24_KpnI_fwd	TAAGGTACCGCATGGCGGTGTAAATTTAGG	62°C
Fic1_SalI_rev	CTAGTCGACTTATCTCTCCTTTTCCTTTGAAT	60°C
Fic1_SEAA_fwd	GCTCATCATGCAACAGCAATCGCAGGCAATAC	96°C
Fic1_SEAA_rev	GTATTGCCTGCGATTGCTGTTGCATGATGAGC	96°C
pBAD_araC	CTGGCTCTTCTCGCTAAC	56°C
rrnB_rev	GTATCAGGCTGAAAATCTTC	56°C
Pvu_CmR_fwd	GGATTCGATCGGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAA	102°C
Pvu_CmR_rev	GGATTCGATCGATTATCACTATTCAGGCGTAGCAC	102°C
Fic2pBAD24_KpnI_fwd	TAAGGTACCCCAAGAACAATATACGGAAATC	60°C
Fic2_SalI_rev	CTAGTCGACTTATCTTTCCTTTTCTTTTGATTTT	60°C

Bakterijski sojevi:

E.coli DH5α

Campylobacter fetus subsp. *venerealis* 84-112 (V81) – bakterijska DNA

Plazmidi:

E.coli [pBAD24]

Izolacijski pribori:

QIAquick Gel Extraction Kit proizvođača QIAGEN

QIAquick PCR Purification Kit proizvođača QIAGEN

QIAprep Spin Miniprep Kit proizvođača QIAGEN

Midi prep Nucleobond AX 100 isolation kit proizvođača MACHEREY-NAGEL

Uređaji:
Stolne centrifuge Eppendorf Microcentrifuge 5424 i Eppendorf Centrifuge 5804R
PCR uređaj Bio-Rad C1000 Thermal Cycler
Elektroporator Eppendorf Electroporator
UV sterilizator Bio-Rad GS Gene Linker UV Chamber
Spektrofotometri Thermo Fisher Scientific Inc Nano Drop spektrofotometar i Bio-Rad xMark Microplate Spectrophotometer
Stolni inkubator ThermoStat plus proizvođača Eppendorf

Ostala laboratorijska oprema:
Aparatura za izvođenje gel-elektroforeze proizvođača BioRad
Mikropipete proizvođača Gilson
Milipore mikrofilteri (korišteni nakon DNA ligacije za odstranjenje preostalih fragmenata DNA molekula)
Plastična plitica sa šest utora (6-well Cell Culture Insert Companion Plate)

2.2. Metode

2.2.1. Gel elektroforeza

Gel elektroforeza je metoda pomoću koje možemo razdvajati molekule iz smjese upotrebom električnog polja, pri čemu će se molekule u gelu kretati ovisno o omjeru naboja i mase. DNA molekula je negativno nabijena pri neutralnom pH jer svaki nukleotid sadrži negativno nabijenu fosfatnu grupu. Kada je tijekom elektroforeze izložena električnom naponu, DNA se giba u smjeru pozitivne elektrode pri čemu se manje molekule gibaju brže jer lakše prolaze kroz pore u gelu. Na ovaj način možemo razdvojiti fragmente DNA različitih dužina, te također procijeniti dužinu fragmenta uspoređujući ju s migracijom molekula poznate dužine. DNA molekule veličine 100 pb do 20 kb obično razdvajamo koristeći agarozni gel. Povećanjem koncentracije agaroze smanjujemo pore u gelu te omogućavamo razdvajanje i razlikovanje manjih fragmenata (Lodish i sur., 2000).

Za izradu gela u ovom radu korištena je koncentracija agaroze 1% ili 2%, pomiješana s odgovarajućim volumenom 1X TAE pufera te zagrijavana u mikrovalnoj pećnici dok se u potpunosti ne otopi. Nakon hlađenja, u smjesu je dodan etidij-bromid, fluorescentna boja koja se veže za DNA molekulu i na taj način omogućava njenu vidljivost prilikom osvjetljavanja s

UV svjetlom. Tehnika obilježavanja DNA molekula pomoću etidijevog bromida često se koristi prilikom razdvajanja DNA fragmenata nastalih cijepanjem restrikcijskim endonukleazama jer je jeftina, brza i zahtijeva male količine DNA (0.05 µg DNA dovoljno je kako bi na UV svjetlu uočili signal) (Sharp i sur., 1973). Koncentracija etidijevog bromida u gelu iznosila je 0,5 µg/mL. Elektroforeza je najčešće trajala oko 45-60 minuta, uz napon 80-100V. Kako bismo odredili veličinu ili koncentraciju DNA, na gel je uz uzorke nanešen i DNA standard (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder, 250-10,000 bp ili O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder, 100-1000 bp) koji služi kao usporedba.

2.2.2. Izolacija DNA fragmenata iz agaroznog gela nakon elektroforeze

Ukoliko je nakon elektroforeze potrebno DNA molekulu izolirati iz gela, koristimo QIAquick Gel Extraction Kit proizvođača QIAGEN. Protokol je dizajniran za izolaciju DNA veličine 70 pb – 10 kb iz agaroznog gela u prisutstvu TAE pufera. DNA fragment izrezujemo iz gela, te otapamo gel u prisutstvu odgovarajućeg pufera i visoke koncentracije soli. DNA molekula vezuje se na silikatnu membranu u odgovarajućoj koloni, dok se ostale nečistoće (ostaci gela, boje itd.) ispiru s membrane. Završni korak je ispiranje DNA molekule s membrane pomoću destilirane vode. Otapanje gela vrši se u inkubatoru na 50°C, dok se ostali koraci izvode na sobnoj temperaturi i uz pomoć stolne centrifuge (prema protokolu iz QIAquick Spin Handbook).

2.2.3. Izolacija plazmidne DNA

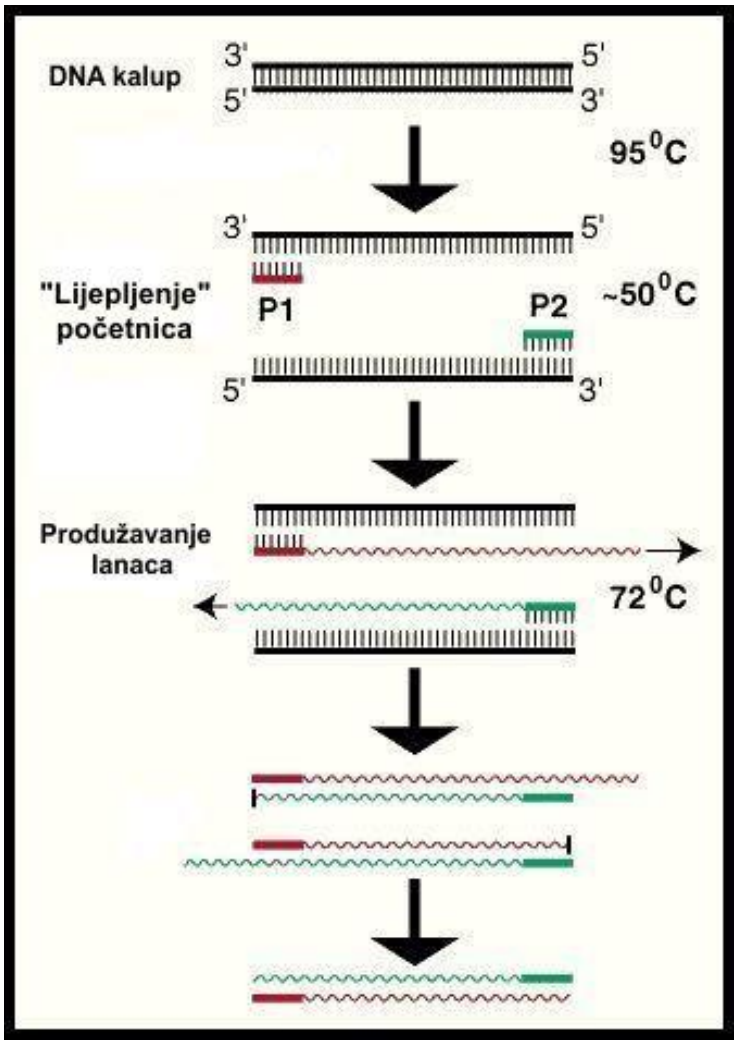
U radu su korišteni izolacijski pribori Mini Prep, proizvođača QIAGEN i Midi Prep proizvođača Macherey-Nagel koji koriste tehniku alkalne lize bakterijskih stanica te adsorpcije DNA na silikatnu membranu. Razdvajanje plazmidne od kromosomalne DNA zasniva se na razlikama njihovoj denaturaciji – kromosomalna DNA visoke molekularne mase biti će selektivno denaturirana, dok će kovalentno zatvorena kružna plazmidna DNA ostati intaktna (Birnboim i Doly, 1979).

Razlika između Mini Prep i Midi Prep izolacijskog pribora je u koncentraciji plazmidne DNA koju dobivamo po završetku izolacije, te je stoga količina bakterijske kulture koju koristimo prilikom Midi Prep izolacije veća. Plazmidna DNA se nizom postupaka i korištenjem odgovarajućih pufera veže za membranu, dok se ostale tvari ispiru. U konačnici, plazmidnu DNA ispiremo s membrane korištenjem ddH_2O uz kratko centrifugiranje (QIAquick Spin Handbook, 2008, Machery Nagel User manual, 2008).

2.2.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (Polymerase chain reaction - PCR) je metoda koja omogućava umnožavanje dijela molekule DNA u veliki broj kopija u relativno kratkom vremenu. Odabrana DNA sekvenca na ovaj način može biti „pročišćena“ od ostatka genoma u *in vitro* uvjetima. Poznavanje DNA sekvence ključno je za dizajn oligonukleotida – početnica (primers) koje su komplementarne sekvenci od interesa. PCR se sastoji od nekoliko koraka (Slika 8), od kojih se svaki odvija na različitoj temperaturi, a za uspješnu reakciju obično je potrebno 20-30 ciklusa. U svakom ciklusu udvostručuje se prethodno sintetizirana količina DNA (Alberts i sur., 2008).

PCR reakcija uključuje razdvajanje dvostrukog DNA lanca pod utjecajem visoke temperature, „lijepljenje“ (annealing) početnica na komplementarnu sekvencu DNA lanca koji će biti umnožen, te produžavanje početnica uz pomoć DNA polimeraze (Saiki i sur., 1988).



Slika 8. Tijek PCR reakcije (web navod 2).

Obzirom na visoku temperaturu koja je potrebna za razdvajanje lanaca, u reakciji se koriste posebne DNA polimeraze koje mogu podnijeti ovako visoke temperature i pri tome zadržati svoju efikasnost. Najčešće korištena polimeraza je Taq polimeraza, izolirana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* (Saiki i sur., 1988). Tijekom izrade ovog diplomskog rada korištena je i Phusion polimeraza, ukoliko je bilo posebno bitno da je DNA sekvenca točna nakon amplifikacije. Phusion polimeraza posjeduje 5'→3' polimeraznu aktivnost i 3'→5' egzokukleaznu aktivnost, te je jedna od najtočnijih komercijalno dostupnih termostabilnih DNA polimeraza.

Temperatura „lijepljenja“ (annealing temperature) izračunava se posebno za svaku početnicu, pri čemu ključnu ulogu igra sadržaj nukleotida. Kako bismo ju odredili, prvo moramo izračunati T_m (melting temperature) za svaku početnicu. Formula za početnice dužine do 30 parova baza glasi: T_m = 4*(broj GC parova) + 2*(broj AT parova), a rezultat izražavamo u °C. Nakon izračuna T_m za obje početnice, određujemo temperaturu lijepljenja po principu: T = najniža T_m - 2°C.

Nakon prijanjanja početnica na jednostruki DNA lanac, polimeraza koristi nukleotide dodane u reakcijsku smjesu kako bi sintetizirala ostatak lanca. Vrijeme potrebno za produžavanje lanaca (extension time) također se određuje za svaku reakciju, te je za sintezu DNA sekvence duljine 1kb potrebna približno jedna minuta.

PCR reakcije danas odvijaju se u posebnim uređajima, PCR thermocyclers, koje brzo i točno vrše izmjene temperature, omogućavajući da se cijela reakcija (20-30 ciklusa) odvije kroz nekoliko sati.

<u>PCR reakcijska smjesa – Taq polimeraza</u>

12,5µL Taq pufer 2X (sadrži Taq pufer 10X i dNTP)
1,25µL „Forward“ početnica
1,25µL „Reverse“ početnica
8,1µL ddH_2O
0,4µL Taq polimeraza
1,5µL DNA kalup

<u>PCR reakcijska smjesa – Phusion polimeraza</u>

8µL Phusion pufer 5X
0,4µL dNTP
2µL „Forward“ početnica

2µL „Reverse“ početnica

25,2µL ddH_2O

0,4µL Taq polimeraza

2µL DNA kalup

PCR program (Thermocycler)

1. 94°C – 2 minute (početna denaturacija DNA molekule)
2. 94°C – 15 sekundi (denaturacija DNA molekule)
3. X°C – 30 sekundi („lijepljenje“ početnica na DNA kalup; ovisi o sadržaju nukleotida početnica)
4. 72°C – X minuta (produžavanje lanaca; ovisi o dužini lanca)
5. 72°C – 5 minuta
6. 4°C - ∞

Koraci 2.-4. Ponavljaju se 30 puta

2.2.5. Kolonijska lančana reakcija polimerazom – kolonijski PCR (Colony PCR)

Kolonijsku lančanu reakciju polimerazom koristimo kako bismo direktno provjerili nosi li određena bakterijska kolonija plazmid od interesa. Bakterijsku koloniju uzimamo pomoću sterilne mikrobiološke ušice te ju resuspendiramo u 10µL ddH_2O. Dio resuspenzije nasađujemo u Petrijevu zdjelicu s agarom i odgovarajućim antibiotikom, a 1,5µL resuspenzije koristimo za PCR reakciju. Program za kolonijski PCR razlikuje se od uobičajenog PCR programa u prvom koraku, obzirom da se bakterijske stanice prvo moraju denaturirati kako bi DNA molekula bila dostupna za reakciju. Protokol za izradu PCR smjese ostaje isti, uz upotrebu Taq polimeraze.

Program za kolonijski PCR (Thermocycler):

1. 94°C – 2 minute (početna denaturacija DNA molekule)
2. 94°C – 15 sekundi (denaturacija DNA molekule)
3. X°C – 30 sekundi („lijepljenje“ početnica na DNA kalup; ovisi o sadržaju nukleotida početnica)
4. 72°C – X minuta (produžavanje lanaca; ovisi o dužini lanca)
5. 72°C – 5 minuta
6. 4°C - ∞

Koraci 2.-4. Ponavljaju se 30 puta

2.2.6. Pročišćavanje DNA fragmenata nastalih lančanom reakcijom polimerazom

Kako bi jednolančanu ili dvolančanu DNA večičine 100 pb – 10 kb pročistili nakon PCR reakcije ili drugih enzimatskih reakcija (npr. cijepanja restrikcijskim endonukleazama), koristimo QIAquick PCR Purification Kit proizvođača QIAGEN. Princip protokola je vezanje DNA molekule na silikatnu membranu pri visokim koncentracijama soli i uz odgovarajući pH, dok se ostali sadržaj reakcijske smjese ispire kroz kolonu. Čista DNA se ispire s membrane pomoću destilirane vode. Svi koraci izvode se na sobnoj temperaturi uz primjenu stolne centrifuge (QIAquick Spin Handbook, 2008).

2.2.7. Kreiranje mutacije u *fic1* genu korištenjem PCR metode u dva koraka

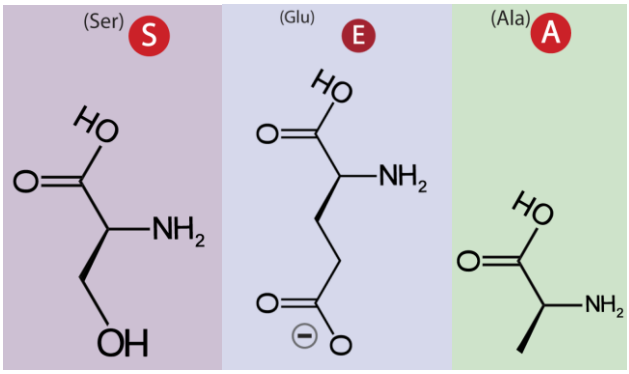
Kako bismo provjerili funkciju inhibicijske domene *fic1* gena i utvrdili ima li utjecaj na *fic1* i *fic2* gen, prvi korak je kreirati mutaciju unutar (STAIEG) konsenzus sekvence. Mutacije aminokiselina serin, na položaju 33 i glutamat, na položaju 37 (S33A/E37A) odabrane su zbog ključne uloge ovih aminokiselina u interakciji s FIC domenom (Engel i sur., 2012).

Za izradu mutacije (S33A/E37A) unutar inhibicijske domene *fic1* gena korištena je PCR metoda u dva koraka. Prvi korak je umnožavanje 2 fragmenta *fic1* gena, pri ćemu će kraći fragment nositi dvostruku mutaciju aminokiselina serin i glutamat (Slika 9).



Slika 9. Shema prvog PCR koraka u kreiranju (S33A/E37A) mutacije *fic1* gena. Za umnožavanje 2 fragmenta *fic1* gena korištena su dva para početnica: Fic1pBAD24_KpnI_Fwd i Fic1_SEAA_rev (plavo) za kraći fragment, te Fic1_SalI_rev i Fic1_SEAA_fwd (ružičasto) za duži fragment (autorska slika).

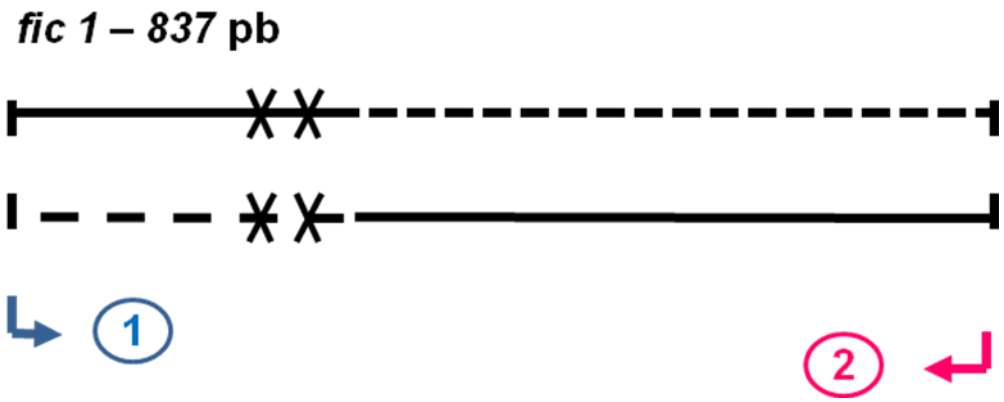
U oba slučaja ključne aminokiseline zamijenjene su aminokiselinom alanin, kako bi steričke smetnje bile što manje, što je vidljivo iz strukture tih aminokiselina (Slika 10).



Slika 10. Strukture aminokiselina serin (S), glutamat (G) i alanin (A) (web navod 5).

Početnice korištene za dizajn ove mutacije izradila je mag.sc. Hanna Sprenger s Instituta molekularnih bioznanosti na Sveučilištu Karl Franzens u Grazu. PCR reakcije s Phusion polimerazom provodimo u dvije mini epruvete, pod različitim uvjetima. Za umnožavanje kraćeg fragmenta *fic1* gena koristimo Fic1pBAD24_KpnI_Fwd i Fic1_SEAA_rev početnice, a PCRIa protokol podešavamo tako da temperatura „lijepljenja" iznosi 58°C dok vrijeme produžavanja lanaca iznosi 20 sekundi. Za umnožavanje dužeg fragmenta koristimo Fic1_SalI_rev i Fic1_SEAA_fwd početnice, pri čemu temperatura „lijepljenja" u PCRIb protokolu iznosi 60°C, a vrijeme produžavanja lanaca 50 sekundi. Kao negativnu kontrolu koristimo ddH_2O, pri čemu provjeravamo je li prilikom protokola došlo do kontaminacije PCR smjese stranom DNA.

Slijedi drugi korak kreiranja mutacije odnosno spajanje kraćeg i dužeg fragmenta, a možemo ga podijeliti na dva dijela: elongacija lanaca te umnožavanje produkta (Slika 11).



Slika 11. Shema drugog PCR koraka u kreiranju (S33A/E37A) mutacije *fic1* gena. Duži i kraći fragment gena produžuju se uz pomoć DNA polimeraze, nakon čega slijedi kloniranje gena pomoću početnica Fic1pBAD24_KpnI_fwd (1) i Fic1_SalI_rev (2) (autorska slika).

Elongacija lanaca odvija se po PCR protokolu za Phusion polimerazu, no ponavljanje središnjih koraka reakcije izvodi se 10 puta, umjesto standardnih 30 puta. Pri ovom koraku u PCR reakciju ne dodajemo početnice, obzirom da svaki fragment zasebno služi kao svojevrsna početnica DNA polimerazi. Temperatura „lijepljenja“ pri tome iznosi 62°C, dok je vrijeme produžavanja lanaca jedna minuta.

Nakon elongacije slijedi umnožavanje produkta, na način da u PCRII reakciju dodamo početnice Fic1pBAD24_KpnI_fwd i Fic1_SalI_rev. PCR program odvija se uobičajenih 30 ciklusa uz temperaturu „lijepljenja“ 58°C, te vrijeme elongacije od jedne minute. Nakon ovih koraka, u PCRII smjesi očekujemo *fic1* gen s željenom mutacijom.

2.2.8. Molekularno kloniranje

2.2.8.1. Molekularno kloniranje s plazmidnim vektorima

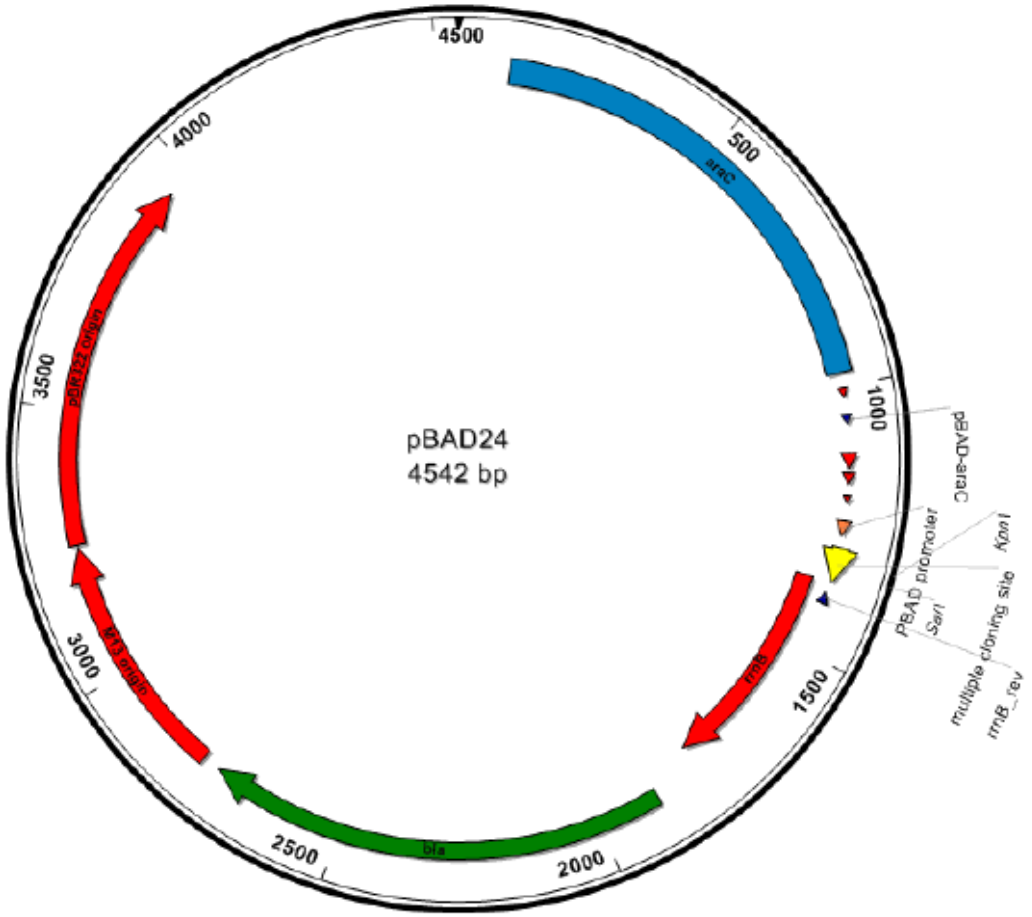
Umnožavanje željenog DNA fragmenta putem unošenja u određeni plazmidni vektor jedna je od ključnih metoda u molekularnoj biologiji i rekombinantnoj DNA tehnologiji, a omogućava dobivanje velikog broja kopija određenog gena u relativno kratkom vremenu. Prvi korak je cijepanje odabranog vektora i DNA fragmenta od interesa istim restrikcijskim enzimima kako bismo dobili kompatibilne krajeve. Slijedi ligacija odnosno spajanje vektora i fragmenta, te transformacija bakterijskih stanica rekombinantnom DNA molekulom. DNA fragment od interesa će se replicirati u bakterijskoj stanici zajedno s vektorom, te kao rezultat dobivamo veliki broj kopija - klonova (Lodish i sur., 2000). Nakon kloniranja slijedi pretraživanje bakterijskih kolonija kako bismo izdvojili one pozitivne na željeni produkt, te naposlijetku sekvenciranje DNA.

Kao vektori u molekularnom kloniranju najčešće se koriste bakterijski plazmidi veličine ~ 1.2-3 kb, a sadrže ORI sekvencu koja omogućuje autonomni početak replikacije, te gen ili gene koji omogućavaju selekciju, najčešće putem rezistentnosti na određene antibiotike (Lodish i sur., 2000). Moderni vektori često sadrže višestrula mjesta kloniranja ili polilinkere (multiple-cloning sites – MCS), DNA sekvence s velikim brojem mjesta restrikcije koja se pojavljuju samo na tom mjestu u plazmidu, a prepoznaju ih određeni restrikcijski enzimi (Preston, 2003).

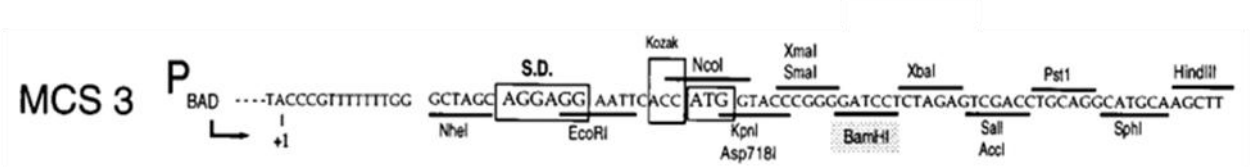
2.2.8.2. pBAD24

Kao vektor pri molekularnom kloniranju u ovom radu korišten je pBAD24, plazmid koji sadrži *ara*BAD (arabinozni) operon s P_{BAD} promotorom, te regulatornim genom *araC*

koji služi kao pozitivni i negativni regulator. U prisutstvu arabinoze inicirat će se transkripcija s P_{BAD} promotora, dok će prisutstvo glukoze smanjiti njegovu ekspresiju (Lee i sur., 1987; Miyada i sur., 1984). U ovom radu korišten je pBAD24 vektor (Guzman i sur., 1995) (Slika 12) koji se koristi za kloniranje gena kojima nedostaju sekvence za inicijaciju translacije. Višestruko mjesto kloniranja (MCS3) ovog plazmida sadrži Shine-Dalgarno sekvencu (AGGAGG), Kozak sekvencu (ACC), start kodon ATG, te mjesta za cijepanje brojnim restrikcijskim enzimima (Slika 13). pBAD24 sadrži i *bla* gen odgovoran za rezistenciju na ampicilin. Kako bi inducirali transkripciju, koristimo medij s 0,05% arabinoze, dok je za represiju potrebno u tekući medij ili Petrijeve zdjelice s agarom dodati 0,2% glukoze.



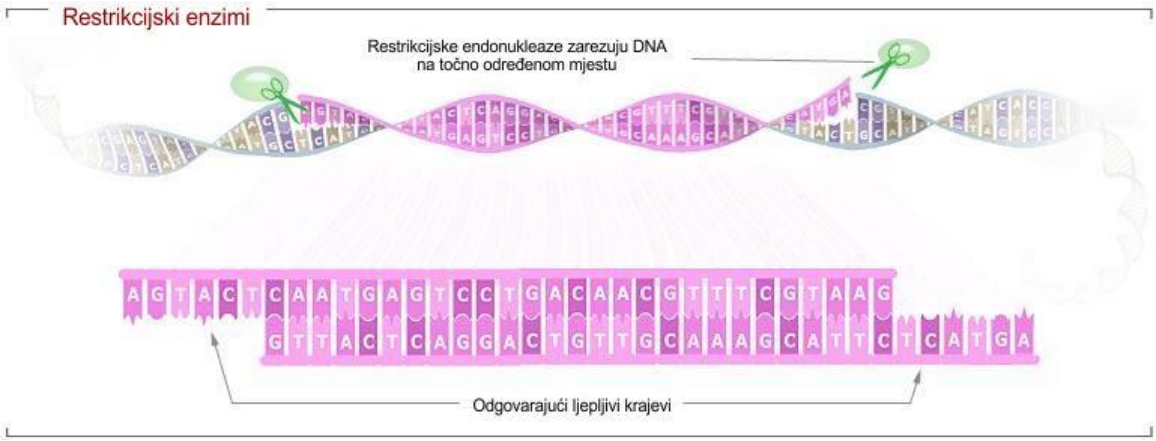
Slika 12. pBAD24 vektor. Preuzeto i prilagođeno prema Guzman i sur. (1995)



Slika 13. Višestruko mjesto kloniranja vektora pBAD24. Preuzeto iz Guzman i sur. (1995)

2.2.8.3. Restrikcijske endonukleaze

Restrikcijske endonukleaze su enzimi izolirani iz bakterija koji imaju sposobnost cijepanja dvostruke DNA molekule na mjestima koja su definirana točno određenim slijedom nukleotida (Alberts i sur., 2008). U bakterija zajedno s DNA metiltransferazama štite kromosomalnu DNA od bakterijskih virusa cijepajući stranu DNA, pri čemu je kromosomalna DNA zaštićena metilacijom specifičnih mjesta prepoznavanja. Svaka endonukleaza prepoznaje specifičnu palindromsku DNA sekvencu dugu 4-8 nukleotida, te cijepa DNA ostavljajući za sobom tupe krajeve, ljepljive krajeve (Slika 14) ili dvostruke rezove (Jeltsch i Pingoud, 2001). Za maksimalnu učinkovitost cijepanja, prilikom reakcije koriste se određeni puferi. U ovom radu, reakcijski puferi su uvijek korišteni u razrjeđenju 1:10. Količina enzima koja se dodaje u reakciju ovisi o količini DNA koji treba razgraditi, kao i o vremenu razgradnje. Izražavaju se u jedinicama U/µL pri čemu je jedna jedinica enzima (U) količina enzima potrebna za razgradnju 1µg DNA u jednom satu (Sambrook i Russel, 2001).



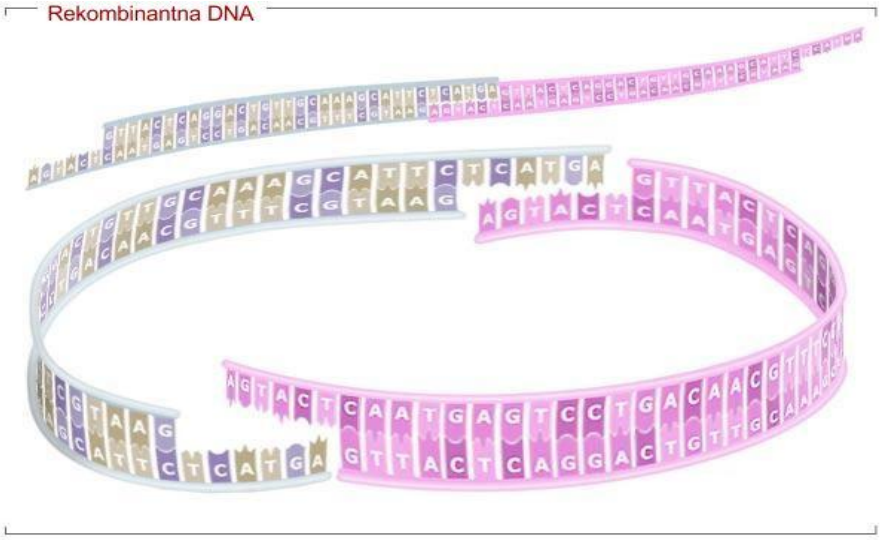
Slika 14. Primjer cijepanja DNA molekule restrikcijskim enzimima (web navod 3).

2.2.8.4. DNA ligacija

DNA ligacija proces je spajanja dvaju linearnih DNA fragmenata (vektora i inserta), prethodno pocijepanih istim restrikcijskim endonukleazama, u kružnu dvolančanu rekombinantnu DNA molekulu (Slika 15). Ljepljivi komplementarni DNA krajevi lako će biti spojeni uz pomoć enzima DNA ligaze koja katalizira stvaranje 3'→5' fosfodiesterske veze između 3' hidroksilnog kraja jednog lanca i 5' fosfatnog kraja drugog lanca uz pomoć ATP-a (Lodish i sur., 2000).

Omjer koncentracija DNA vektora i DNA inserta u ovom radu iznosio je 1:3. Ligacija se vršila kroz 12-16 sati u inkubatoru pri 16°C. Ligacijska smjesa zatim je pročišćena pomoću

plutajućih Micropore filtera, 60 minuta na sobnoj temperaturi. Ovaj korak potreban je kako bi iz smjese odstranili ostaci DNA koji nisu sudjelovali u procesu ligacije, te kako bi odstranili soli koje tijekom bakterijske elektro-transformacije mogu uzrokovati kratki spoj i ubiti bakterijske stanice.



Slika 15. Rekombinantna DNA molekula (web navod 4).

2.2.8.5. Priprema elektrokompetentnih stanica *E.coli*

Baktrijska kultura uzgaja se 16 sati na temperaturi 37°C u rotacijskom inkubatoru. 2mL pripremljene bakterijske kulture odvoji se i suspendira u 100mL LB medija uz dodatak određenog antibiotika. Suspenzija se inkubira na 37°C na u rotacijskom inkubatoru dok ne postigne optičku gustoću od 0,5 – 0,7 pri 600 nm. Suspenziju zatim razdvojimo u dvije sterilne epruvete, inkubiramo 10 minuta na ledu, te centrifugiramo 7 minuta pri 4°C i pri brzini 5000 rmp (okretaja po minuti). Supernatant dekantiramo, a pelet resuspendiramo u 5mL 10%-tnog glicerina ohlađenog na 4°C. Postupak centrifugiranja i resuspenzije ponavljamo ukupno 4 puta, uz promjenu volumena glicerina (5mL, 5mL, 10mL, 300µL). Nakon zadnje resuspenzije peleta, elektrokompetentne stanice *E.coli* raspoređene su u sterilne mini epruvete, pri čemu je svaka epruveta sadržavala 40µL stanica. Ovako pripremljene stanice možemo odmah koristiti za elektro-transformaciju ili ih pohraniti na -80°C.

2.2.8.6. Bakterijska elektro-transformacija

Transformacija označava genetičku modifikaciju stanica uzrokovanu unosom i ekspresijom strane DNA (Lodish i sur., 2000). Sposobnost transformacije ili primanja strane

DNA označava se kao kompetencija, te je prirodno svojstvo nekih bakterija, a može se izazvati kemijski u laboratorijskim uvjetima, što je bitan korak prije same elektro-transformacije (Swords, 2003). U ovom radu koristili smo elektrokompetentne *E.coli* DH5α stanice. Elektro-transformacija se provela po sljedećem protokolu: kivete za elektrotransformaciju steriliziramo 15 minuta u UV sterilizatoru te ih ohladimo na ledu, a za to vrijeme elektrokompetentne *E.coli* DH5α stanice (40µL), prethodno pohranjene na -80°C, pustimo da se otope na ledu. Rekombinantnu plazmidnu DNA (produkt ligacije vektora i inserta) dodamo u epruvetu s 40µL *E.coli* DH5α stanica i prebacimo smjesu u kivetu za elektro-transformaciju. Kivetu stavimo u elektroporator i provodimo transformaciju pri 2000V – električni impuls uzrokovat će otvaranje pora na membrani bakterijske stanice i preuzimanje strane DNA. Kivetu zatim izvadimo iz elektroporatora i stanicama dodamo 1mL LB medija kako bi se oporavile od šoka. Smjesu prebacimo u sterilnu epruvetu i transformirane stanice inkubiramo jedan sat u vodenoj kupelji na 37°C. Nakon inkubacije stanice nasađujemo u Petrijeve zdjelice s LB medijem i agarom, uz dodatak odgovarajućeg antibiotika te ih inkubiramo preko noći na 37°C.

2.2.9. „Screening“ bakterijskih kolonija

Ukoliko nakon elektro-transformacije u Petrijevim zdjelicama narastu bakterijske kolonije, provjeravamo sadrže li rekombinantni plazmid i nalazi li se insert na njemu u dobroj orijentaciji. Prvi korak je kolonijski PCR, pri čemu možemo koristiti početnice koje opisuju fragment od interesa ili vektorsku okosnicu. Pozitivne kolonije ponovno nasađujemo u Petrijeve zdjelice ili u tekući LB medij kako bi ih pripremili za izolaciju plazmida.

2.2.10. Restrikcijska analiza rekombinantnog plazmida

Restrikcijskim kontrolama možemo potvrditi prisutnost DNA fragmenta od interesa i/ili njegovu orijentaciju u rekombinantnom plazmidu. Prvi korak je izolacija plazmida iz bakterijskih stanica, nakon čega slijedi cijepanje DNA određenim restrikcijskim endonukleazama. Fragmente DNA zatim nanosimo na gel, te vršimo elektroforezu. U konačnici, dužinu dobivenih fragmenata uspoređujemo s dužinom očekivanih fragmenata, ovisno o restrikcijskoj mapi očekivanog rekombinantnog plazmida (Goranson-Siekierke i Erbe, 2003).

2.2.11. DNA sekvenciranje

Sekvenciranje DNA je određivanje njenog nukleotidnog slijeda. Na ovaj način možemo odrediti slijed aminokiselina određenog genskog produkta te utvrditi je li tijekom molekularnog kloniranja došlo do mutacije u DNA molekuli. Za potrebe ovog rada, rekombinantne plazmide smo izolirali iz bakterijskih stanica korištenjem QIAprep Spin protokola. Otopinu podijelimo u dvije sterilne epruvete, te u svaku epruvetu zasebno dodajemo i početnicu za sekvenciranje. Sekvenciranje ovako pripremljene DNA za nas je obavila njemačka tvrtka Eurofins MWG Operon.

2.2.12. Bioinformatika

Bioinformatika je grana informatike koja se posebno brzo razvija posljednih godina obzirom na potrebu da se velike količine genoma i proteinskih sekvenci analiziraju, pohrane i usporede. Novo-sintetizirane DNA sekvence mogu se usporediti s prethodno determiniranim sekvencama u potrazi za sličnostima, a regije koje kodiraju proteine mogu se prevesti u lako usporediv slijed aminokiselina (Lodish i sur., 2000). U ovom radu korišten je računarski program Lasergene SeqMan Pro koji je omogućio usporedbu DNA sekvenci dobivenih nakon sekvenciranja rekombinantne DNA u potrazi za mutacijama.

2.2.13. Izrada bakterijskih krivulja rasta

Bakterijske krivulje rasta izradili smo mjereći optičku gustoću (optical density – OD) bakterijske kulture pri 600 nm koristeći spektrofotometar Bio-Rad xMark Microplate Spectrophotometer i plastičnu pliticu sa šest utora. Bakterijske kulture uzgojene su preko noći u tekućem LB mediju uz dodatak određenog antibiotika i 0,2% glukoze. Obzirom da istovremeno pratimo rast više bakterijskih kultura, neophodno je imati iste početne uvjete tj. OD_{600} pri t_0 za sve kulture treba iznositi 0,05. Prvo mjerenje izvedeno je s 100 µL bakterijske kulture suspendirane u 900 µL LB medija, a iz rezultata je upotrebom formule dobiven volumen kulture koji trebamo dodati u svaki utor:

$$OD_1V_1 = OD_2V_2,$$

pri čemu su nam poznate vrijednosti OD_1 (optička gustoća bakterijske kulture izmjerena na početku eksperimenta), OD_2 (željena početna optička gustoća – 0,05), te V_2 (volumen LB medija koji se dodaje u svaki utor). Optička gustoća je mjerena svakih 15 minuta kroz osam sati, a rezultati su obrađeni u Microsoft Excel programu.

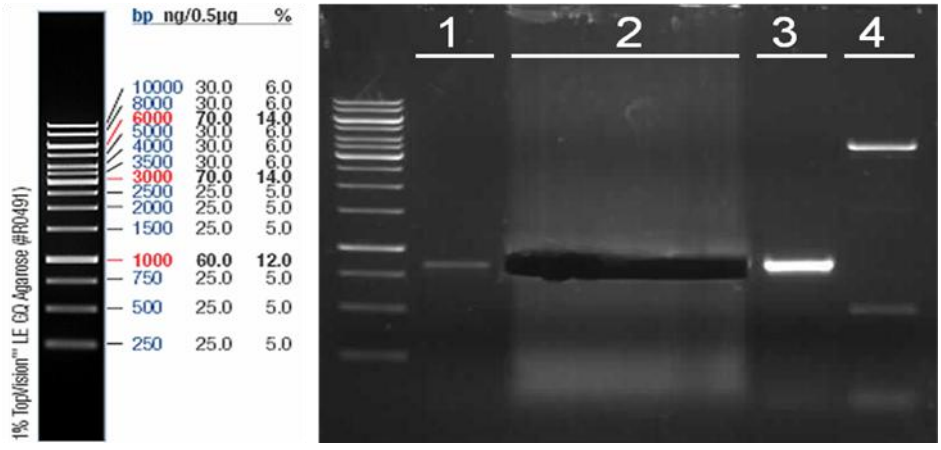
3. REZULTATI

3.1. Kreiranje mutacije u *fic1* genu

Mutacija (S33A/E37A) izađena je pomoću PCR metode u dva koraka. Za umnožavanje kraćeg fragmenta *fic1* gena (100 pb) koristimo Fic1pBAD24_KpnI_Fwd i Fic1_SEAA_rev početnice, dok za umnožavanje dužeg fragmenta (730 pb) koristimo Fic1_SalI_rev i Fic1_SEAA_fwd početnice. Kao negativnu kontrolu koristimo ddH_2O.

Nakon PCR reakcije provodimo elektroforezu, te fragmente izrezujemo i izoliramo iz gela. Koristeći spektrofotometar procjenjujemo koncentraciju DNA PCRIa i PCRIb produkta:
PCRIa → c(DNA) = 87,3 ng/µL
PCRIb → c(DNA) = 97,0 ng/µL.
Za nastavak protokola potrebna je DNA koncentracija svakog fragmenta 50 ng/µL.

U drugom koraku kreiranja mutacije spajamo kraći i duži fragment putem elongacije lanaca te umnožavanja produkta. U PCRII reakciju dodajemo početnice Fic1pBAD24_KpnI_fwd i Fic1_SalI_rev, te u PCRII smjesi očekujemo *fic1* gen s željenom mutacijom. Kao pozitivnu kontrolu koristimo kromosomalnu DNA *Cfv* V81, dok ddH_2O predstavlja negativnu kontrolu. Ukoliko je PCR reakcija uspješna, pozitivna kontrola dati će bend dužine 837 pb, obzirom da je *fic1* gen prisutan u kromosomalnoj DNA. Očekivana dužina DNA fragmenta PCRII reakcije iznosi 837 pb, što odgovara bendu vidljivom na gelu (Slika 16). Dobiveni DNA fragment izrezujemo, te izoliramo iz gela. Negativna kontrola kontaminirana je stranom DNA, no eksperiment je nastavljen.

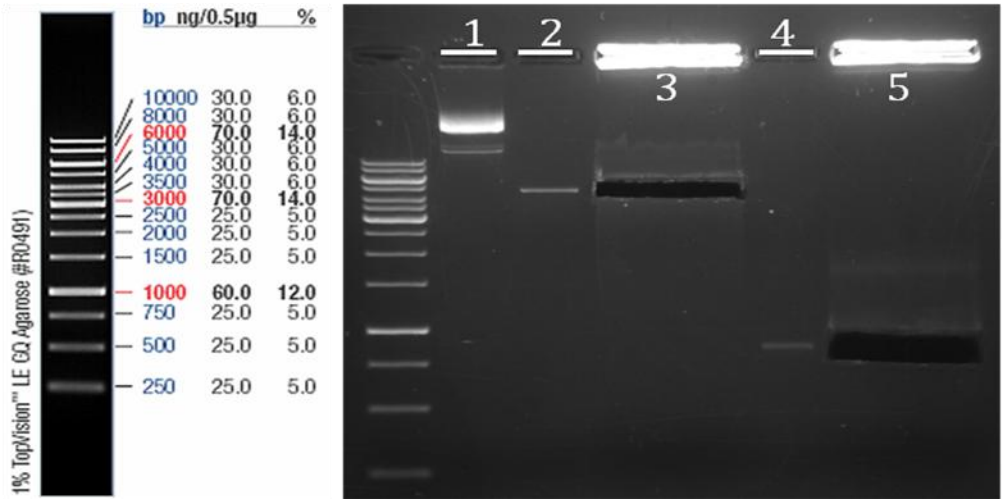


Slika 16. Vrijednosti DNA standarda za usporedbu (lijevo). Konačni produkt nakon PCR reakcije u dva koraka (desno). Na gel smo nanijeli 1µL reakcijske smjese (1), te preostali dio reakcijske smjese (2). Kao pozitivnu kontrolu koristimo kromosomalnu DNA *Cfv* V81 (3), dok kao negativnu kontrolu koristimo ddH_2O (4).

3.2. Kreiranje rekombinantne DNA

3.2.1. Restrikcija plazmida i inserta

Kako bismo mutirani *fic1*(S33A/E37A) gen inkorporirali u pBAD24 plazmid, obje DNA molekule moramo pocijepati restrikcijskim enzimima *Kpn*I i *Sal*I. Pomoću njih nije moguće napraviti istovremeno dvostruko cijepanje, te su uzorci prvo pocijepani s *Kpn*I i pročišćeni pomoću gel elektroforeze i pribora za ekstrakciju iz gela. Uslijedilo je ponavljanje istog postupka s restrikcijskom endonukleazom *Sal*I. Očekivani rezultati restrikcije su fragmenti dužine ~4500 pb (pBAD24), te 837 pb *fic1*(S33A/E37A) što je potvrđeno gel elektroforezom (Slika 17). U konačnici, dobivamo vektor i insert s komplementarnim „ljepljivim“ krajevima koje je moguće spojiti pomoću DNA ligaze.



Slika 17. DNA standard za usporedbu (lijevo). Pročišćavanje pBAD24 plazmida i *fic1*(S33A/E37A) DNA inserta (desno). Nepocijepani plazmid pBAD24 nanesen je na gel radi usporedbe (1), slijedi 1µL pBAD24 plazmida pocijepanog s *Kpn*I i *Sal*I (2), pBAD24 plazmid pocijepan s *Kpn*I i *Sal*I (3), 1µL *fic1*(S33A/E37A) DNA inserta pocijepanog s *Kpn*I i *Sal*I (4), te *fic1*(S33A/E37A) DNA insert pocijepan s *Kpn*I i *Sal*I (5) i izrezan iz gela.

3.2.2. DNA ligacija

U svrhu uspješnog provođenja DNA ligacije pomoću T4 DNA ligaze, korišten je omjer DNA vektora i inserta 1:3. Kako bismo provjerili učinkovitost DNA ligaze, koristili smo pBAD24 plazmid pocijepan s restrikcijskim enzimima *Kpn*I i *Sal*I. Ukoliko je DNA ligaza aktivna, doći će do ligacije samog vektora, pri čemu se ne očekuje rast bakterijskih stanica nakon transformacije.

3.2.3. Transformacija elektrokompetentnih stanica *E.coli* DH5α

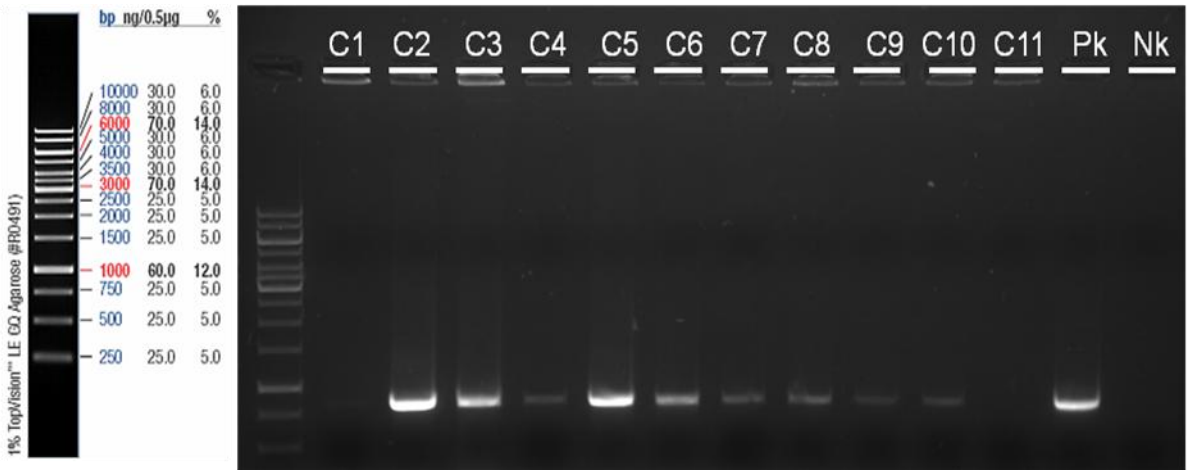
Za elektro-transformaciju smo koristili prethodno pripremljene elektrokompetentne bakterije soja *E.coli* DH5α. Prva elektro-transformacija provedena je s prethodno izrađenim konstruktom, dok je druga provedena s praznim pBAD24 vektorom kao kontrolom. Nakon inkubacije bakterije su nasađene su u Petrijeve zdjelice s ampicilinom i glukozom. U tri Petrijeve zdjelice nasađeno je po 300µL bakterijske suspenzije transformirane rekombinantnom DNA, dok je u jednu Petrijevu zdjelicu nasađeno 100µL iste suspenzije. U ovim Petrijevim zdjelicama očekujemo rast bakterijskih kolonija, ukoliko su ligacija i transformacija bile uspješne. Kontrolna suspenzija koja sadrži prazni vektor nasađena je u dodatnu Petrijevu zdjelicu. Broj kolonija nakon inkubacije prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Broj bakterijskih kolonija u Petrijevim zdjelicama nakon transformacije *E.coli* DH5α stanica

	Količina bakterijske suspenzije nasađena na hranjivu podlogu	Broj bakterijskih kolonija
E.coli DH5α transformirane rekombinantnom DNA	300µL	32
	300µL	37
	300µL	17
	100µL	7
E.coli DH5α transformirane praznim vektorom	100µL	2

3.3. Kolonijski PCR

Kako bismo provjerili nalazi li se rekombinantna DNA od interesa u bakterijskim kolonijama, nasumično smo odabrali 10 pozitivnih kolonija, te jednu koloniju iz kontrolne Petrijeve zdjelice. Kolonijska PCR reakcija provedena je uz početnice Fic1pBAD24_KpnI_fwd i Fic1_SalI_rev koje opisuju *fic1* insert. Na ovaj način možemo provjeriti sadrže li kolinije *fic1* insert, ali ne i prisutstvo mutacije u inhibicijskoj domeni. U svim kolonijama (C1-C10) dokazali smo prisutstvo 837 pb dugog *fic1* inserta, dok isti očekivano nije bio prisutan u koloniji C11 koja sadrži prazan vektor (Slika 18). Kao pozitivnu kontrolu ove PCR reakcije koristili smo kromosomalnu DNA *Cfv* V81, a kao negativnu ddH_2O.



Slika 18. DNA standard za usporedbu (lijevo). Kolonijski PCR (desno). U kolonijama C1-C10 dokazano je prisutstvo *fic1* inserta. Pk označava pozitivnu kontrolu (kromosomalna DNA *Cfv*), dok Nk označava negativnu kontrolu reakcije (ddH_2O).

3.4. PCR i restrikcijske kontrole

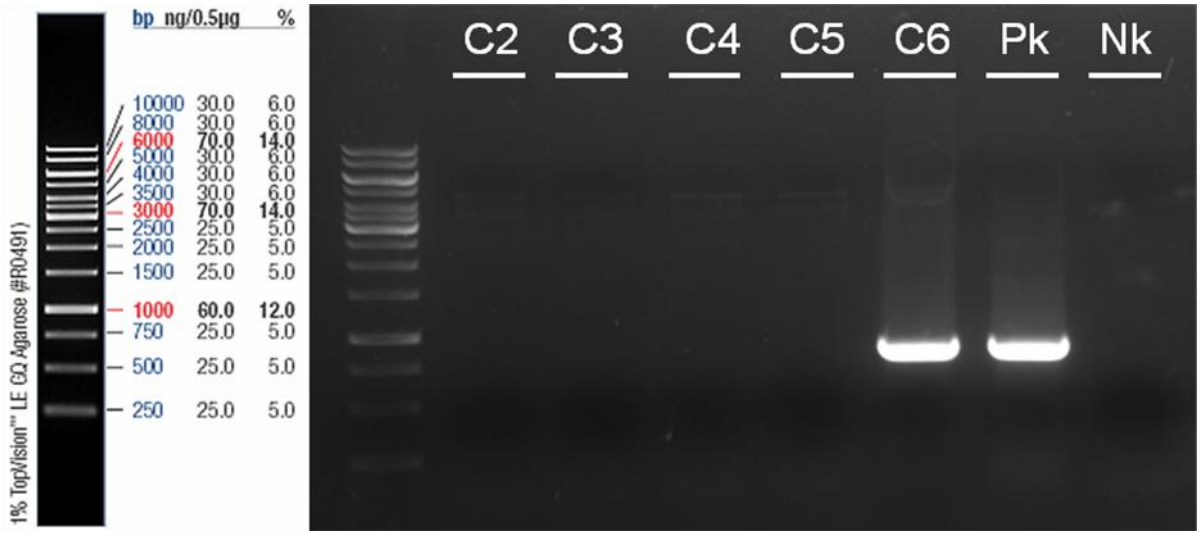
Nakon izolacije pojedinačnih kolonija, provjeravamo nalazi li se rekombinantna DNA u sljedećim generacijama bakterijskih stanica, odnosno je li se plazmid od interesa replicirao prilikom stanične diobe. Pet kolonija nasumično je odabrano za ovu analizu (C2 – C5). Plazmid izoliran iz bakterijskih kolonija korišten je za 2 tipa kontrole – pomoću PCR reakcije i restrikcijskih enzima.

3.4.1. Kontrola prisutnosti rekombinantne DNA pomoću PCR reakcije

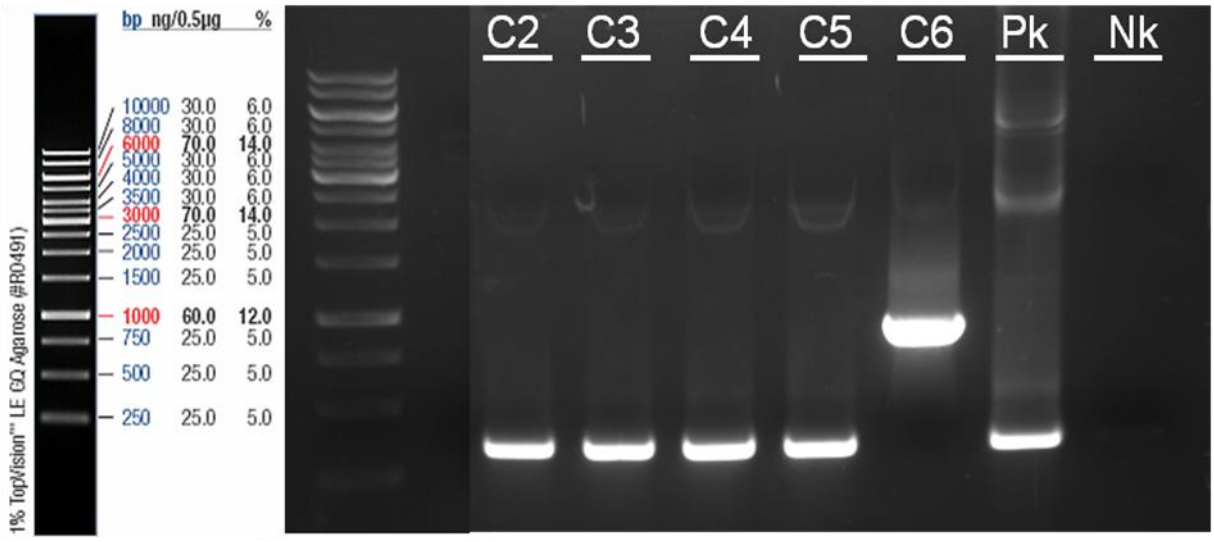
Tri tipa početnica korištena su u zasebnim PCR reakcijama:

1. Fic1pBAD24_KpnI_fwd i Fic1_SalI_rev koristimo kako bismo dokazali prisutstvo *fic1* inserta. Očekivani fragment imat će dužinu 837 pb (Slika 19).
2. pBAD_araC i rrnB_rev koristimo kako bismo opisali vektorsku okosnicu i potvrdili da je zaista riječ u plazmidu pBAD24. Oba enzima cijepaju specifične DNA sekvence prisutne na vektoru. Očekivani fragment imat će dužinu 354 pb (udaljenost između mjesta cijepanja koja na pBAD24 plazmidu prepoznaju navedeni enzimi, determinirana pomoću restrikcijske mape plazmida). Ukoliko je u plazmidu prisutan *fic1* insert, bend na gelu bit će dužine 1191 pb što odgovara zbroju dužina plazmidne okosnice (354 pb) i *fic1* inserta (837 pb) (Slika 20).
3. Fic1pBAD24_KpnI_fwd i rrnB_rev koristimo kako bismo potvrdili ligaciju između pBAD24 vektora i *fic1* inserta. Očekivani fragment omat će dužinu 917 pb (Slika 21).

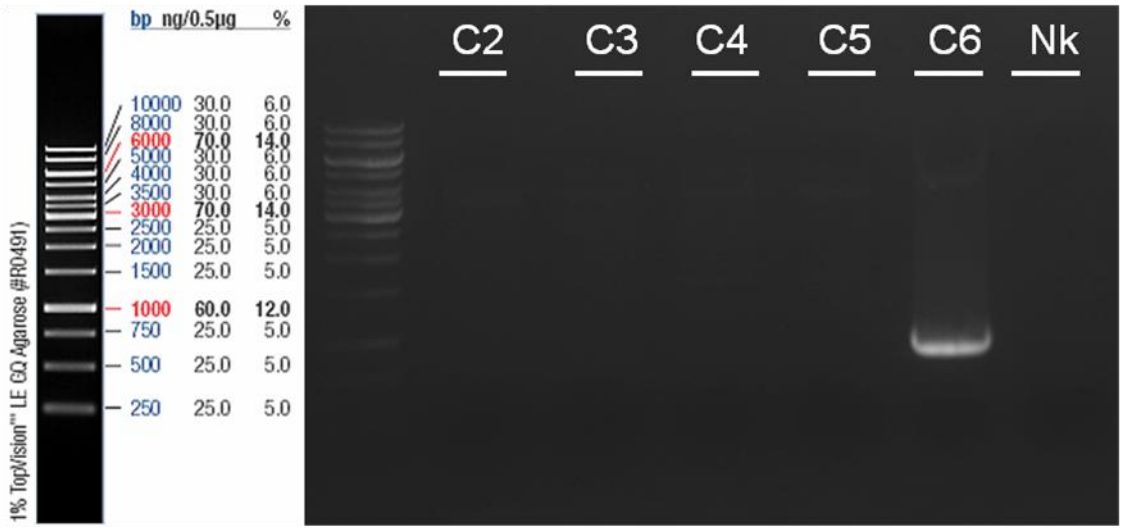
Kao pozitivnu kontrolu u prvoj reakciji koristimo kromosomalnu DNA *Cfv* V81, dok u drugoj reakciji koristimo pBAD24 plazmid. Za treću reakciju pozitivna kontrola ne postoji. U sve tri reakcije kao negativna kontrola korištena je ddH_2O.



Slika 19. DNA standard za usporedbu (lijevo). Gel elektroforeza PCR produkata u reakciji s početnicama Fic1pBAD24_KpnI_fwd i Fic1_SalI_rev (desno). U koloniji C6 potvrđen je očekivanji fragment dužinje 837 pb (*fic1* insert). Kao pozitivna kontrola (Pk) korištena je kromosomalna DNA *Cfv*, dok je kao negativna kontrola (Nk) korištena ddH_2O.



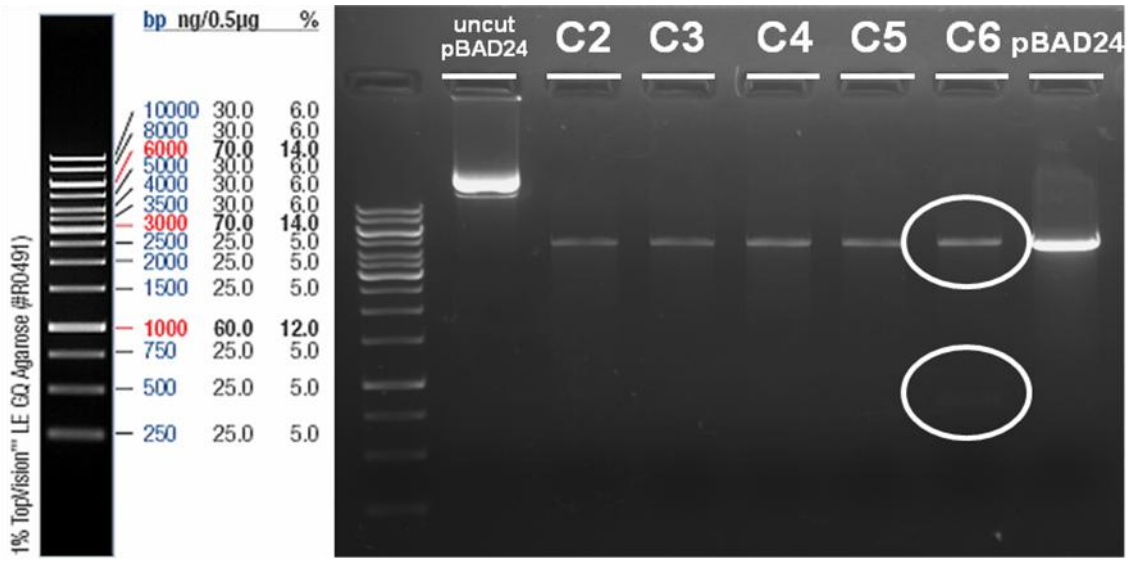
Slika 20. DNA standard za usporedbu (lijevo). Gel elektroforeza PCR produkata u reakciji s početnicama pBAD_araC i rrnB_rev (desno). U kolonijama C2 – C5 potvrđen je fragment dužine 354 pb. Kolonija C6 posjeduje fragment dužine 1191 pb. Kao pozitivna kontrola (Pk) korišten je pBAD24 plazmid, dok je kao negativna kontrola (Nk) korištena ddH_2O.



Slika 21. DNA standard za usporedbu (lijevo). Gel elektroforeza PCR produkata u reakciji s početnicama Fic1pBAD24_KpnI_fwd i rrnB_rev (desno). U koloniji C6 potvrđen je fragment dužine 917 pb. Kao negativna kontrola (Nk) korištena je ddH_2O.

3.4.2. Kontrola prisutnosti rekombinantne DNA pomoću restrikcijskih enzima

Pomoću enzima koje smo prethodno koristili za stvaranje homolognih „ljepljivih" krajeva vektora i inserta, možemo napraviti dodatnu kontrolu kolonija u potrazi za rekombinantnom DNA od interesa. Nakon restrikcije endonukleazama *Kpn*I i *Sal*I, DNA nanosimo na gel zajedno s praznim pBAD24 vektorom kao kontrolom. Ukoliko kolonija sadrži željeni konstrukt, na gelu očekujemo 2 benda – prvi dužine 837 pb (*fic1* insert) i drugi dužine ~4510 pb (plazmid u linearnoj formi, kojemu nedostaje kratka DNA sekvenca između restrikcijskih mjesta za *Kpn*I i *Sal*I). Rezultati su potvrdili da kolonija C6 sadrži željeni konstrukt, iako je bend koji opisuje insert na gelu slabo vidljiv zbog male koncentracije (Slika 22).



Slika 22. DNA standard za usporedbu (lijevo). Gel elektroforeza DNA fragmenata nakon cijepanja restrikcijskim enzimima *Kpn*I i *Sal*I (desno). U kolonijama C2 – C5 vidljiv je jedan bend dužine ~4510 pb, dok su u koloniji C6 vidljiva 2 benda dužina 837 pb i 4510 pb.

3.5. Provjera (S33A/E37A) mutacije sekvenciranjem DNA

Plazmid izoliran iz bakterijske kolonije C6 sekvencirali smo uz korištenje početnica pBAD_araC (nalazi se uzvodno od višestrukog mjesta kloniranja prisutnog na pBAD24 plazmidu), te rrnB_rev (nalazi se nizvodno od istog mjesta). Na ovaj će način biti sekvenciran dio plazmidne okosnice i insert koji je inkorporiran u plazmid. Dobivena sekvenca uspoređena je sa sekvencom *fic1* gena prisutnog u kromosomalnoj DNA *Cfv* V81, te je potvrđena mutacija *fic1* gena (S33A/E37A).

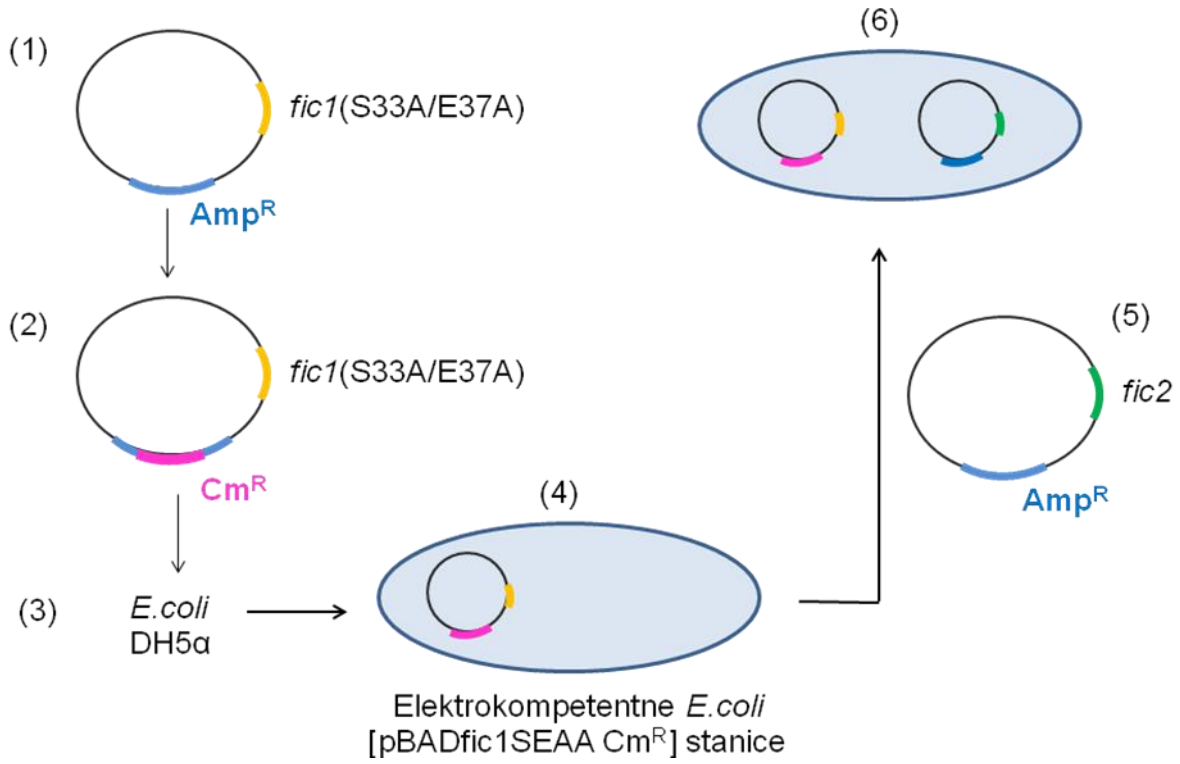
3.6. Pohrana plazmidnog konstrukta

Novi plazmidni konstrukt nazvan je *E.coli* [pBAD-fic1SEAA], te nosi gen *bla* koji omogućuje otpornost na ampicilin. Bakterijske kulture s ovim konstruktom pohranjene su na -80°C.

3.7. Koekspresija *fic1*(S33A/E37A) i *fic2* gena

Budući da želimo provjeriti utječe li inhibicijska domena *fic1* gena na *fic2* gen, neophodno je da *fic1*(S33A/E37A) gen i *fic2* gen eksprimiramo u istoj bakterijskoj stanici. *E.coli* [pBAD-fic2Amp] vektor (konstruirala mag.sc. Hanna Sprenger) također nosi rezistenciju na ampicilin. Koekspresija 2 plazmida s istim replikonom mogla bi dovesti do toga da stanica odbaci jedan plazmid. Stoga će strategija za koekspresiju biti sljedeća (Slika 23):

1. Unutar *bla* gena *E.coli* [pBAD-fic1SEAA] plazmida ugraditi Cm^R kazetu koja nosi gen *cat*. Navedeni gen kodira kloramfenikol acetil transferazu koja omogućuje rezistenciju na kloramfenikol.
2. Bakterijske stanice koje nose plazmid *E.coli* [pBAD-fic1SEAACm] učiniti elektrokompetentnima.
3. Elektrokompetentne stanice s plazmidom *E.coli*[pBAD-fic1SEAACm] transformirati plazmidom *E.coli* [pBAD-fic2Amp].
4. Promatrati rast bakterijskih stanica koje nose oba plazmida.



Slika 23. Shema koekspresije *fic1*(S33A/E37A) i *fic2* gena. Unutar Amp^R kazete plazmida *E.coli* [pBAD-fic1SEAA] (1) ugradimo Cm^R kazetu (2). Elektrokompetentne *E.coli* DH5α stanice transformiramo ovim konstruktom (3). Novi soj bakterija koji nosi *E.coli* [pBAD-fic1SEAACm] plazmid učinimo elektrokompetentnim (4), te transformiramo s *E.coli* [pBAD-fic2Amp] plazmidom. U konačnici dobivamo soj bakterija koji nosi oba konstrukta (5) (autorska slika).

Ugrađivanje Cm^R kazete u *E.coli* [pBAD-fic1SEAA] plazmid započinjemo izolacijom plazmida *E.coli* [pBAD-fic1SEAA]. Izolirani plazmid pocijepamo uz pomoć enzima *Pvu*I, dajući mu homologne „ljepljive“ krajeve. Restrikcijsko mjesto za *Pvu*I nalazi se unutar *bla* gena. Cm^R kazeta prethodno je izolirana iz plazmida pACYC184 restrikcijom uz pomoć enzima *Pvu*I, što znači da oba kraja gena posjeduju restrikcijska mjesta za taj enzim. Slijedi

ligacija plazmida *E-coli* [pBAD-fic1SEAA] i Cm^R kazete pri čemu se koristi 300 ng DNA inserta i 100 ng plazmidne DNA. *E.coli* DH5α stanice transformirane su rekombinantnom DNA i nasađene u Petrijeve zdjelice s agarom uz dodatak glukoze i kloramfenikola. Kao kontrola ligaciji korištene su *E.coli* DH5α stanice transformirane s ddH_2O, pri čemu se u Petrijevim zdjelicama ne očekuje rast kolonija. Broj kolonija nakon inkubacije dan je u Tablici 3.

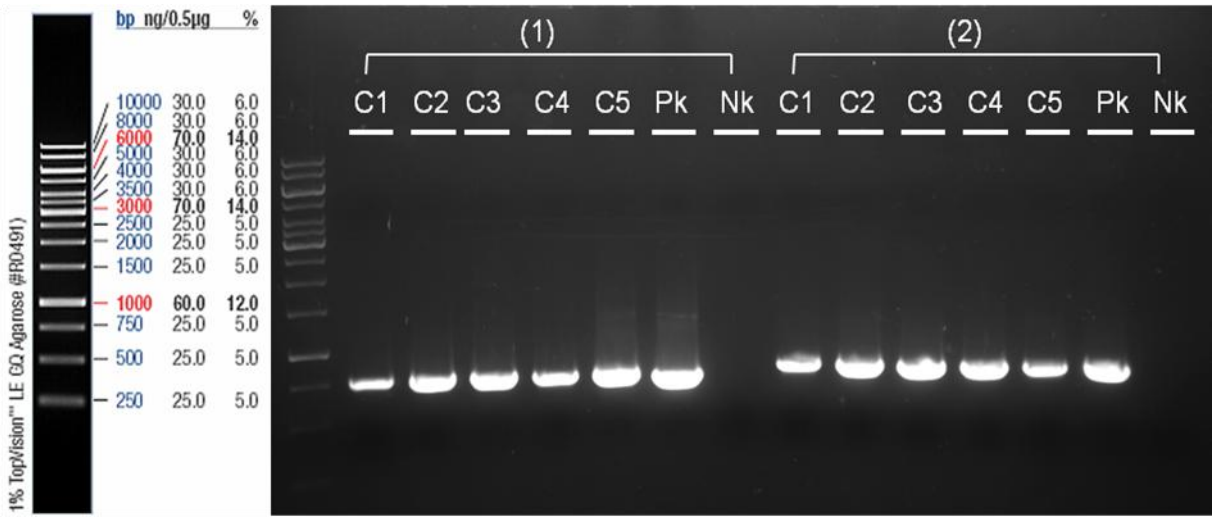
Tablica 3. Broj bakterijskih kolonija u Petrijevim zdjelicama nakon transformacije *E.coli* DH5α stanica

	Količina bakterijske suspenzije nasađena na hranjivu podlogu	Broj bakterijskih kolonija
E.coli DH5α transformirane plazmidom *E.coli*[pBAD-fic1SEAACm]	300µL	2
	300µL	2
	300µL	1
	100µL	0
E.coli DH5α transformirane praznim vektorom	100µL	0

Obzirom da je nakon ligacije u Petrijevim zdjelicama pod selektivnim pritiskom izraslo samo pet bakterijskih kolonija, u svih pet smo pomoću kolonijskog PCR-a pokušali dokazati prisutnost Cm^R kazete (Slika 24). Za reakciju smo koristili dva para početnica:

1. Pvu_CmR_fwd i Pvu_CmR_rev, za dokazivanje Cm^R kazete, pri čemu je očekivana dužina fragmenta 750 pb. Kao pozitivna kontrola korištena je kromosomalna DNA *Cfv* V81 dok je kao negativna kontrola korištena ddH_2O.

2. Fic1pBAD24_KpnI_fwd i Fic1_SalI_rev, za dokazivanje *fic1* gena, pri čemu je očekivana dužina fragmenta 837 pb. Kao pozitivna kontrola korištena je kromosomalna DNA *Cfv* V81 dok je kao negativna kontrola korištena ddH_2O.



Slika 24. DNA standard za usporedbu (lijevo). Gel elektroforeza DNA fragmenata nakon kolonijske PCR reakcije s početnicama Pvu_CmR_fwd i Pvu_CmR_rev (1), te Fic1pBAD24_KpnI_fwd i Fic1_SalI_rev (2). Prisutstvo Cm^R kazete, kao i *fic1* gena potvrđeno je u svim kolonijama. Kao pozitivna kontrola (Pk) korištena je kromosomalna DNA *Cfv* V81, dok je kao negativna kontrola (Nk) korištena ddH_2O.

Kolonija C1 s plazmidnim konstruktom *E.coli* [pBAD-fic1SEAACm] upotrijebljena je za pripremu elektrokompetentnih bakterijskih stanica koje su zatim transformirane *E.coli* [pBAD-fic2Amp] plazmidom, te nasađene u Petrijeve zdjelice s agarom uz dodatak kloramfenikola, ampicilina i glukoze. Negativnu kontrolu predstavljaju stanice koje nose *E.coli* [pBAD-fic1SEAACm] transformirane ddH_2O i nasađene u Petrijeve zdjelice s različitim kombinacijama antibiotika i glukoze. Rast kolonija očekuje se samo u Petrijevim zdjelicama s kloramfenikolom. Broj kolonija nakon inkubacije prikazan je u Tablici 4.

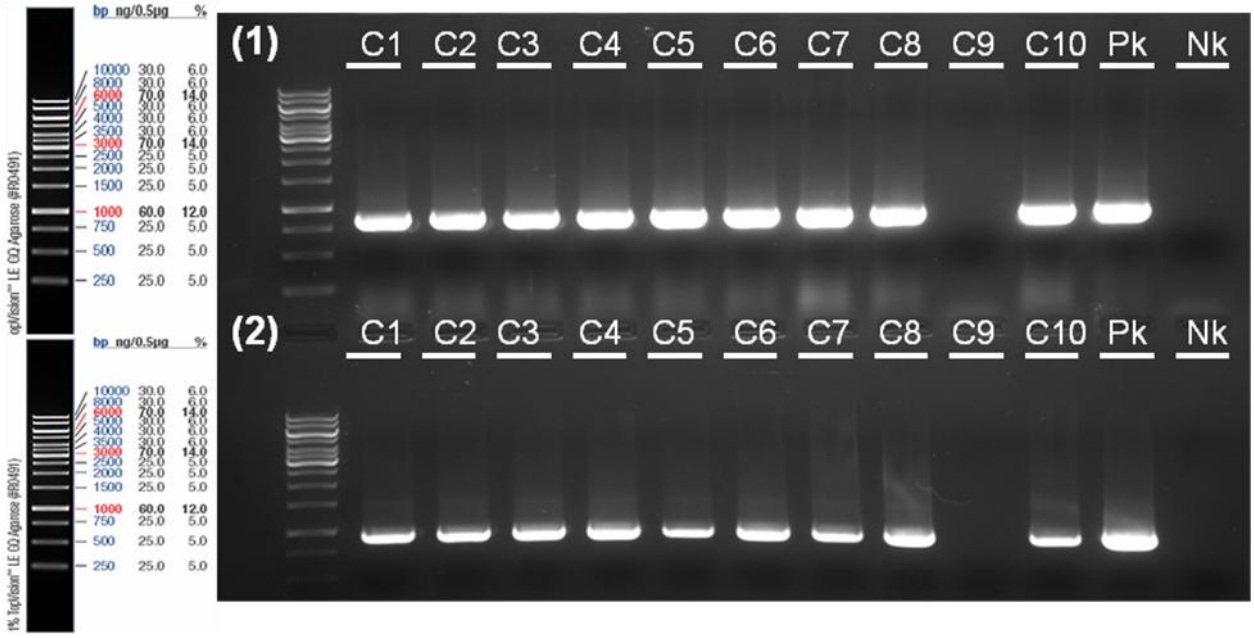
Tablica 4 . Broj bakterijskih kolonija u Petrijevim zdjelicama nakon transformacije stanica s *E.coli* [pBAD-fic1SEAACm] plazmidom.

	Količina bakterijske suspenzije nasađena na hranjivu podlogu	Broj bakterijskih kolonija
Stanice *E.coli* [pBAD-fic1SEAACm] transformirane s *E.coli*[pBAD-fic2Amp]	300µL	31
	300µL	33
	300µL	24
	100µL	3
E.coli [pBAD-fic1SEAACm] transformirane s ddH_2O	100µL (ampicilin+glukoza)	0
	100µL (kloramfenkol+glukoza)	Mnoštvo bakterija

Deset kolonija odabrano je za PCR analizu, kako bismo provjerili sadrže li plazmide s *fic1* i *fic2* genom. Zasebno su napravljene dvije kolonijske PCR analize (Slika 25):

1. S početnicama Fic1pBAD24_KpnI_fwd i Fic1_SalI_rev, koje opisuju *fic1* gen, pri čemu na gelu nakon elektroforeze očekujemo fragment dužine 837 pb.
2. S početnicama Fic2pBAD24_KpnI_fwd i Fic2_SalI_rev, koje opisuju gen *fic2*, pri čemu na gelu očekujemo fragment dužine 921 pb.

Kao pozitivna kontrola u obje reakcije korištena je kromosomalna DNA *Cfv* V81, dok je kao negativna kontrola korištena ddH_2O.



Slika 25. DNA standardi za usporedbu (lijevo). Gel elektroforeza DNA fragmenata nakon kolonijske PCR reakcije s početnicama Fic1pBAD24_KpnI_fwd i Fic1_SalI_rev (1), te Fic2pBAD24_KpnI_fwd i Fic2_SalI_rev (2). U svim kolonijama, osim u koloniji C9, dokazano je prisutstvo *fic1* i *fic 2* gena. Kao pozitivna kontrola (Pk) korištena je kromosomalna DNA *Cfv* V81, dok je kao negativna kontrola (Nk) korištena ddH_2O.

3.8. Izrada bakterijskih krivulja rasta

Kako bismo dali odgovor na pitanje o međusobnom djelovanju *fic1* i *fic2* gena tj. njihovih produkata, moramo promotriti njihov utjecaj na bakterijske stanice, pojedinačno i u koekspresiji. Rast bakterija pratili smo putem bakterijskih krivulja rasta, za čiju smo izradu koristili bakterijske sojeve *E.coli* koje sadrže sljedeće plazmide:

1. *E.coli* [pBAD24]
2. *E.coli* [pBAD-fic1Cm]
3. *E.coli* [pBAD-fic1SEAACm]
4. *E.coli* [pBAD-fic2Amp]
5. *E.coli* [pBAD-fic1Cm] + *E.coli*[pBAD-fic2Amp]
6. *E.coli* [pBAD-fic1SEAACm] + *E.coli* [pBAD-fic2Amp]

Sojevi 1, 2 i 4 dostupni su u bazi sojeva Odjela za molekularne bioznanosti sveučilišta u Grazu, dok su sojevi 3, 5 i 6 konstruirani tijekom izrade ovog diplomskog rada. Napravljena su tri individualna eksperimenta, pri čemu je svaki soj bio zastupljen u tri replike. Rezultati su prikazani zasebno za svaki eksperiment (Slike 26, 27 i 28), obzirom da ih je statistički nemoguće prikazati zajedno zbog prevelike standardne devijacije. Kako bi se inducirala aktivnost P_{BAD} promotora i ekspresija pojedinih gena, u LB medij je prije početka eksperimenta dodana arabinoza (0,05%). U svaku bakterijsku kulturu dodana je i određena količina antibiotika, ovisno o kojem se soju radi. Rast bakterija praćen je kroz osam sati, te su obuhvaćene lag i log faze populacijskog rasta.

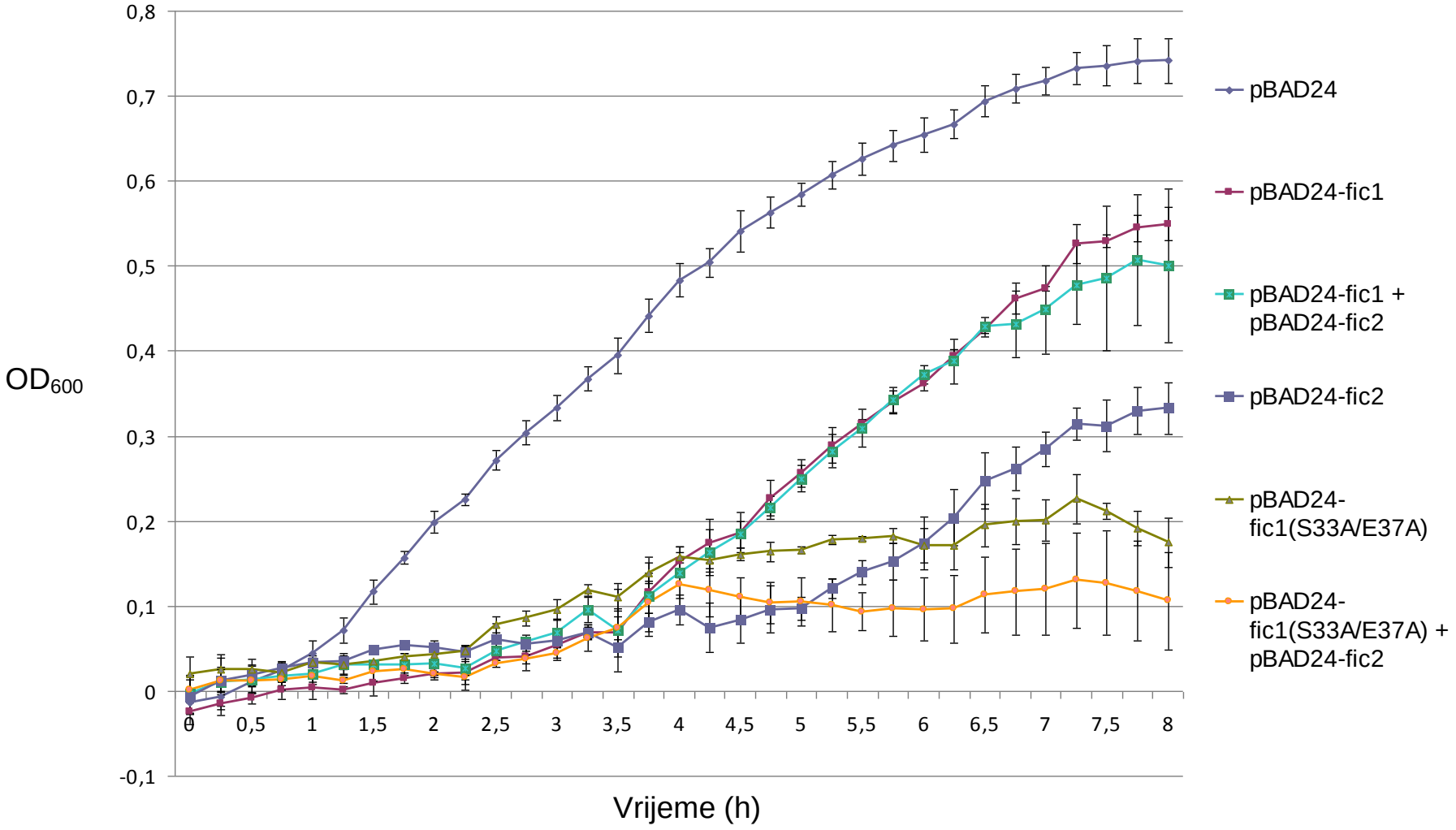
U sva tri eksperimenta kao kontrolne stanice korištene su *E.coli* stanice koje sadrže *E.coli* [pBAD24] vektor. Ove stanice pokazuju normalan eksponencijalan rast u log fazi.

Rast stanica s *E.coli* [pBAD-fic1Cm] plazmidom također je gotovo identičan u sva tri eksperimenta, s tim da je uočljiv slabiji rast u odnosu na kontrolu, te stanice počinju normalno rasti tek nakon ~4 sata, što možemo promatrati kao produženu lag fazu.

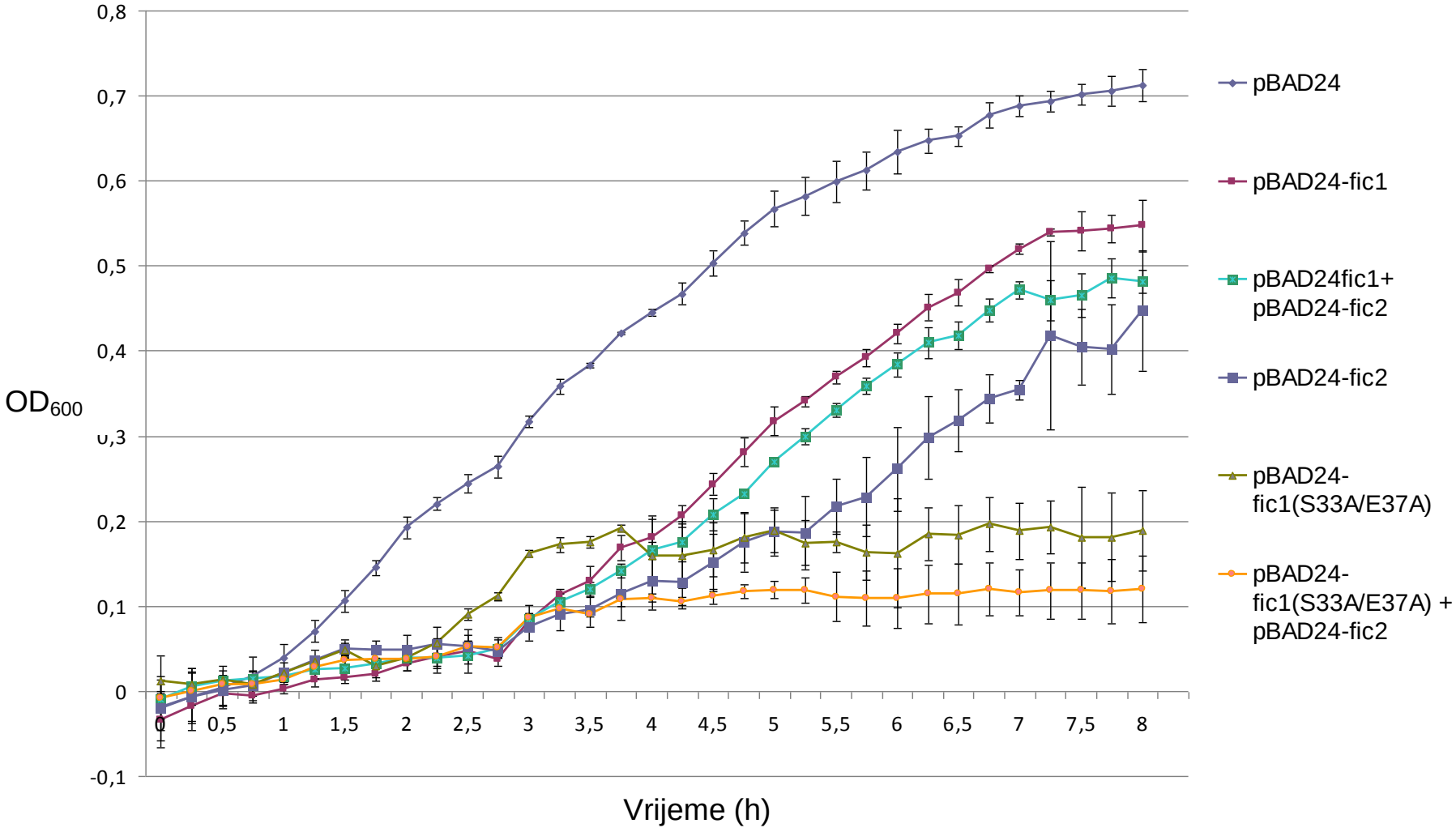
Nasuprot tome, stanice koje nose *E.coli* [pBAD-fic1SEAACm] plazmid ne pokazuju gotovo nikakav rast ili dolazi do vrlo slabog rasta nakon ~4 sata.

Rast stanica s *E.coli* [pBAD-fic2Amp] plazmidom je neočekivan. U prva dva eksperimenta (Slike 26 i 27) stanični rast suprimiran je tijekom prva 4 sata, da bi nakon toga stanice počele rasti, uz manje oscilacije. U trećem eksperimentu (Slika 28) rast ovih je u potpunosti eksponencijalan, te prati rast kontrolnih stanica.

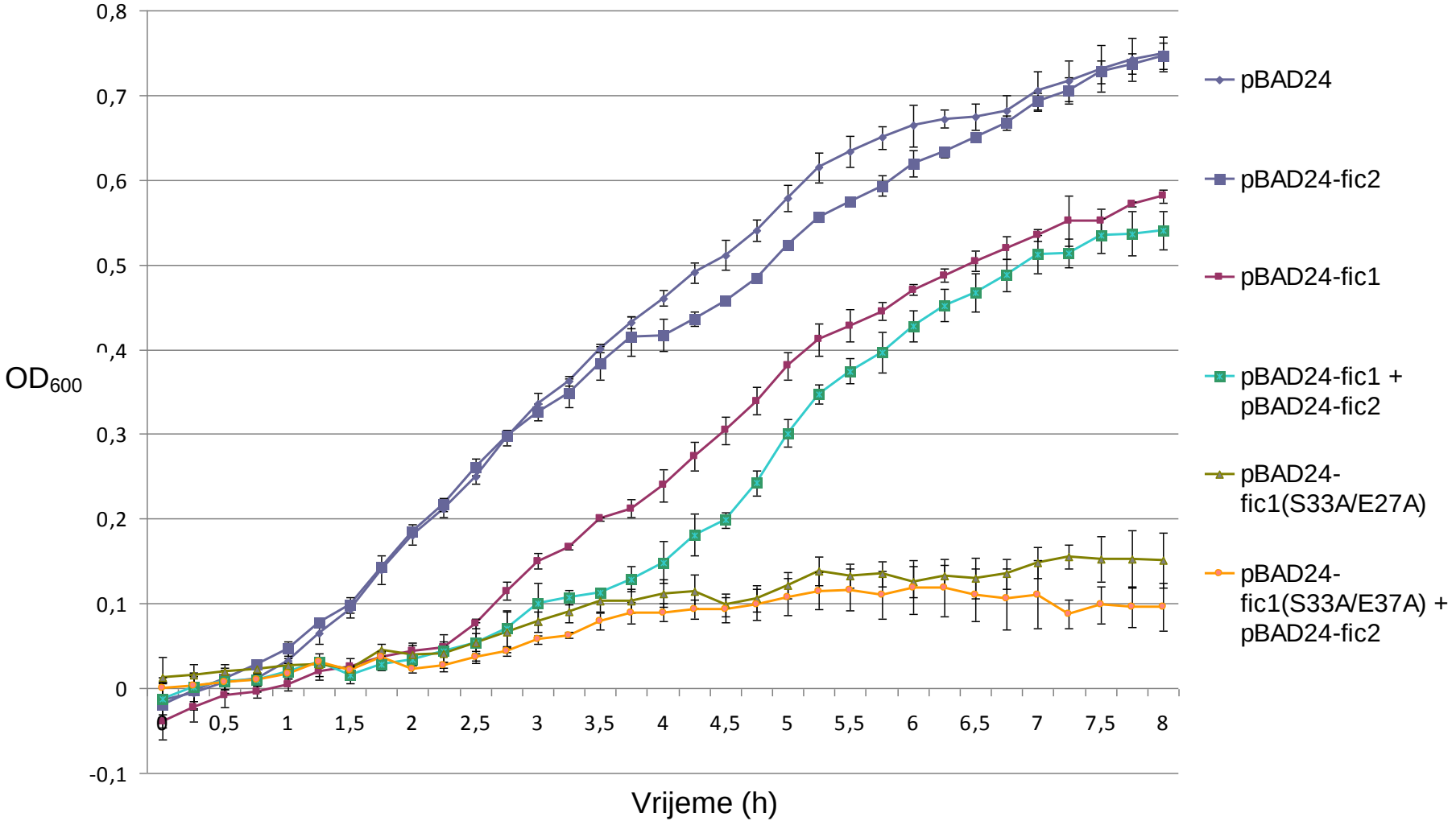
Naposlijetku, cilj nam je promotriti koekspresiju *fic1* i *fic2* gena u usporedbi s koekspresijom *fic1*(S33A/E37A) i *fic2* gena. Rast stanica koje sadrže plazmide *E.coli* [pBAD-fic1Cm] i *E.coli* [pBAD-fic2Amp] pokazuje sličnost s rastom stanica koje sadrže *E.coli* [pBAD-fic1Cm] plazmid – produžena lag faza nakon koje ipak dolazi do eksponencijalnog rasta, nešto slabijeg u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, stanice koje sadrže plazmide *E.coli* [pBAD-fic1SEAACm] i *E.coli* [pBAD-fic2Amp] ne pokazuju gotovo nikakav rast u sva tri eksperimenta, najslabiji u usporedbi s ostalim kulturama.



Slika 26. Krivulje rasta *E.coli* sa specifičnim plazmidima. Prvi eksperiment. OD_{600} predstavlja optičku gustoću pri 600nm.



Slika 27. Krivulje rasta *E.coli* sa specifičnim plazmidima. Drugi eksperiment. OD_{600} predstavlja optičku gustoću pri 600nm.



Slika 28. Krivulje rasta *E.coli* sa specifičnim plazmidima. Treći eksperiment. OD_{600} predstavlja optičku gustoću pri 600nm.

4. RASPRAVA

C. fetus subsp. *fetus* i *C. fetus* subsp. *venerealis* su zbog svoje genske sličnosti izvrsni modelni organizmi za istraživanje bakterijskih gena koji doprinose prilagodbi na domaćina i nove ekološke niše (Sprenger, 2012). Ovaj rad dio je istraživanja o fic genima, specifičnim za *C. fetus* subsp. *venerealis,* za koje se smatra da doprinose virulentnosti ove patogene bakterije. Kromosomalna DNA korištena za izolaciju fic gena potječe iz soja *C. fetus* subsp. *venerealis* 84-112 (V81) koji predstavlja goveđi izolat iz genitalnog sekreta (Perez-Perez i sur., 1986). Istraživanja gena *fic1* i *fic2* su tek u začetku, no obzirom na svoju strukturu i smještaj u genomu pretpostavlja se da imaju dvojaku funkciju. Budući da se nalaze u neposrednoj blizini i nizvodno od gena za tip IV sekrecijski sustav, razumno je pretpostaviti da se efektorni proteini Fic1 i Fic2 putem ovog sustava izlučuju u stanice domaćina, te doprinose virulentnosti organizma putem infekcije (Kienesberger i sur., 2011). Ukoliko pak djeluju kao toksin-antitoksin sustav unutar *C. fetus* subsp. *venerealis,* zadaća bi im mogla biti održavanje stabilnosti patogenog otoka na kojemu se nalaze. Plazmidom kodirani toksin-antitoksin sustavi često imaju funkciju očuvanja plazmidne DNA unutar bakterijske stanice mehanizmom koji se naziva „postsegregacijsko ubijanje“. Ukoliko stanica izgubi plazmid, labilni antitoksin se u kratkom vremenu razgrađuje te dolazi do smrti stanice zbog djelovanja toksina. Na ovaj način preživljavaju samo one stanice u kojima je plazmid prisutan (Liu i sur., 2008; Jensen i Gerdes, 1995).

Geni *fic1* i *fic2,* kao i ostali geni prisutni na patogenom otoku, vjerojatno imaju bitnu ulogu u mehanizmima virulentnosti *C. fetus* subsp. *venerealis,* te stoga opstaju u njenom genomu. Patogene bakterije koriste tip IV sekrecijski sustav kako bi isporučile efektorne proteine i DNA u stanice domaćina (Backert i Meyer, 2006). Proteini s FIC domenom koji se translokacijom prenose u druge bakterije putem tipa IV sekrecijskog sustava do sada su pronađeni i u drugim bakterijskim vrstama (Roy i Mukherjee, 2009). Pretpostavka je da je patogeni otok evolucijski stečen horizontalnim transferom gena, te je kao mobilni element s novim i korisnim svojstvima opstao u bakterijskom genomu. Dokaz tomu je izostanak patogenog otoka u nekim drugim izolatima *C.fetus* subsp. *venerealis* (Gorkiewicz i sur., 2010), kao i prisutstvo mobilnih gena (integraza i transpozaza) na ovom dijelu DNA.

Praćenjem bakterijskih krivulja rasta pokušali smo dobiti odgovor o međusobnom djelovanju proteina Fic1 i Fic2. Prijašnjim eksperimentima dokazano je da Fic1 nema toksični učinak na stanice, kada se eksprimira zasebno, dok Fic2 u potpunosti inhibira stanične diobe (Sprenger, neobjavljeni podaci). U tri nezavisna eksperimenta provedena tijekom izrade ovog

diplomskog rada uočeno je da Fic1 nije toksičan za bakterijske stanice, no ipak uzrokuje određene stanične promjene, obzirom da stanice koje nose plazmid *E.coli* [pBAD-fic1Cm] pokazuju nešto slabiji populacijski rast u usporedbi s kontrolom. Ono što sa sigurnošću možemo tvrditi je da mutacija inhibicijske domene *fic1* gena u potpunosti mijenja fenotip njegovog proteinskog produkta. Bakterijske stanice koje nose plazmid *E.coli* [pBAD-fic1SEAACm] ne pokazuju gotovo nikakav populacijski rast. Mutacija (S33A/E37A) time se još jednom pokazala kao ključna (Engel i sur., 2012), te potvrđuje da inhibicijska domena *fic1* gena suprimira toksični fenotip samog Fic1 proteina.

Rast stanica koje sadrže plazmid *E.coli* [pBAD-fic2Amp] pokazuje očekivane negativne rezultate u prva dva eksperimenta, no u trećem eksperimentu populacija stanica pokazuje normalan rast, identičan kontroli. Obzirom da je prijašnjim eksperimentima potvrđen negativan učinak proteina Fic2 na stanice *E.coli,* pretpostavka da se tijekom provođenja eksperimenta dogodila jedna ili više spontanih mutacija *fic2* gena, koja je uzrokovala potpunu promjenu njegovog fenotipa.

Koekspresija *fic1* i *fic2* gena, u usporedbi s koekspresijom *fic1*(S33A/E37A) i *fic2* gena dala je rezultate koji nam na prvi pogled potvrđuju hipotezu o djelovanju Fic1 i Fic2 kao toksin-antitoksin sustava unutar bakterijske stanice. Stanice koje sadrže mutirani *fic1*(S33A/E37A) i *fic2* gen pokazuju zastoj u populacijskom rastu, za razliku od normalnog rasta stanica koje sadrže *fic1* i *fic2* gen. Koekspresija oba gena u *E.coli* ipak ostaje nerazjašnjena iz dva razloga: 1) *fic1* i *fic2* geni nalaze se na dva različita plazmida koja nose i gene za rezistenciju na različite antibiotike, što može imati utjecaj na formiranje toksin-antitoksin sustava, 2) moguće je da se i u ovom slučaju dogodila spontana mutacija *fic2* gena, koja mijenja fenotip Fic2 proteina od toksičnog u netoksični. Sljedeći koraci stoga su konstrukcija plazmida koji nosi oba gena, te sekvenciranje fic gena nakon ekspresije u *E.coli* kako bismo provjerili jesu li zadržali prvobitan slijed nukleotida. Također, moguće je sekvenciranje obaviti u različitim vremenskim točkama tijekom provođenja eksperimenta, kako bismo saznali u kojem trenutku rasta bakterijske populacije dolazi do mutacije fic gena.

Istraživanja efektornih Fic proteina nastavit će se u svrhu boljeg razumijevanja patogeneze *C. fetus* subsp. *venerealis* obzirom da je BVC značajna bolest goveda koja uzrokuje brojne poteškoće u rasplođivanju stoke, te trgovanju životinjama i njihovim proizvodima.

5. ZAKLJUČAK

Praćenjem proteinske ekspresije putem bakterijskih krivulja rasta dokazano je da je inhibicijska domena Fic1 proteina odgovorna za supresiju njegovog toksičnog učinka na stanice *E.coli*. Nije bilo moguće sa sigurnošću utvrditi ima li ista domena utjecaj na Fic2 protein. Potrebno je provesti sekvenciranje *fic2* gena nakon eksponencijalne log faze bakterijskog rasta, kako bi se otklonila mogućnost stvaranja spontanih mutacija *fic2* gena.

Prema prvobitnim rezultatima zaista se čini kako Fic1 i Fic2 djeluju kao toksin-antitoksin sustav, no daljnja istraživanja su potrebna kako bi se ova hipoteza potvrdila.

6. LITERATURA

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. Molecular Biology of the Cell – 5th edition. Garland Science, New York, USA, 1268 pp.

Alvarez-Martinez CE, Christie PJ. 2009. Biological diversity of procariotic type IV secretion systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73, 775-808

Backert S, Meyer TF. 2006. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 9(2):207-17.

Blaser MJ, Newell DG, Thompson SA, Zechner EL. 2008. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. U: Campylobacter, 3rd edition. Urednici Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ, ASM Press, Washington DC, pp. 401-428.

Engel P, Goepfert A, Stanger FV, Harms A, Schmidt A, Schirmer T, Dehio C. 2012. Adenylylation control by intra- or intermolecular active-site obstruction in Fic proteins. *Nature* 482(7383):107-10.

Goranson-Siekierke J, Erbe JL. 2003. Restriction analysis of recombinant plasmids. *Methods in Molecular Biology* 235:175-81.

Gorkiewicz G, Kienesberger S, Schober C, Scheicher SR, Gülly C, Zechner R, Zechner EL. 2010. A genomic island defines subspecies-specific virulence features of the host-adapted pathogen *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Journal of Bacteriology* 192(2):502-17.

Groisman EA, Ochman H. 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87(5):791-4.

Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. 1995. Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose P_{BAD} Promoter. *Journal of Bacteriology* 177(14):4121-30.

Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology* 23(6):1089-97.

Jain R, Rivera MC, Lake JA. 1999. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96(7):3801-6.

Jeltsch A, Pingoud AM. 2001. Methods for determining activity and specificity of DNA binding and DNA cleavage by class II restriction endonucleases. *Methods in Molecular Biology* 160:287-308.

Jensen RB, Gerdes K. 1995. Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. *Molecular Microbiology* 17:205-10

Kienesberger S, Gorkiewicz G, Wolinski H, Zechner EL. 2011. New molecular microbiology approaches in the study of *Campylobacter fetus. Microbial Biotechnology* 4(1):8-19.

Kienesberger S, Trummler CS, Fauster A, Lang S, Sprenger H, Gorkiewicz G, Zechner EL. 2011. Interbacterial Macromolecular Transfer by the *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* Type IV Secretion System. *Journal of Bacteriology* 193(3):744-58.

Kinch LN, Yarbrough ML, Orth K, Grishin NV. 2009. Fido, a Novel AMPylation Domain Common to Fic, Doc, and AvrB. *PloS One* 4(6):e5818.

Lee N, Francklyn C, Hamilton EP. 1987. Arabinose-induced binding of AraC protein to araI2 activates the araBAD operon promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(24):8814-8.

Lewin B. 2000. Genes VII. Oxford University Press Inc., New York, USA, 990 pp.

Liu M, Zhang Y, Inouye M, Woychik NA. 2008. Bacterial addiction module toxin Doc inhibits translation elongation through its association with the 30S ribosomal subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105(15):5885-90.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2000. Molecular Cell Biology - 4th edition. W.H.Freeman and Company, New York, USA, 1084 pp.

Machery Nagel. 2008. Plasmid DNA Purification - User Manual

Miyada CG, Stoltzfus L, Wilcox G. 1984. Regulation of the araC gene of Escherichia coli: catabolite repression, autoregulation, and effect on araBAD expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81(13):4120-4.

Nester EW, Anderson DG, Roberts Jr CE, Pearsall NN, Nester MT, Hurley D. 2004. Microbiology: A Human Perspective, Fourth edition. McGraw Hill, New York, USA, 817 pp.

Perez-Perez GI, Blaser MJ, Bryner JH. 1986. Lipopolysaccharide structures of Campylobacter fetus are related to heat-stable serogroups. *Infection and Immunity* 51(1):209-12.

Preston A. 2003. Choosing a cloning vector. *Methods in Molecular Biology* 235:19-26.

QIAprep® Miniprep Handbook For purification of Plasmid DNA. 2006. QIAGEN

QIAquick® Spin Handbook. 2008. QIAGEN

Roy CR, Mukherjee S. 2009. Bacterial FIC Proteins AMP Up Infection. *Science Signaling* 2(62):pe14.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839):487-91.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839):487-91.

Sambrook J, Russel DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA

Sharp PA, Sugden B, Sambrook J. 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose--ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12(16):3055-63.

Sprenger H, Zechner EL, Gorkiewicz G. 2012. So close and yet so far – molecular microbiology of *Campylobacter fetus* subspecies. *European Journal of Microbiology and Immunology 2 (2012) 1*, pp.66-75.

Swords WE. 2003. Chemical transformation of *E. coli*. *Methods in Molecular Biology* 235:49-53.

Talaro KP. 2005. Foundations in microbiology: Basic principles, fifth edition. McGraw Hill, New York, USA, 535 pp.

Van Melderen L. 2010. Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? *Current Opinion in Microbiology* 13:781-785.

Worby CA, Mattoo S, Kruger RP, Corbeil LB, Koller A, Mendez JC, Zekarias B, Lazar C, Dixon JE. 2009. The Fic domain: regulation of cell signaling by adenylylation. *Molecular Cell* 34(1):93-103.

Yamaguchi Y, Park JH, Inouye M. 2011. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annual Review of Genetics* 45:61-79.

Yarbrough ML, Li Y, Kinch LN, Grishin NV, Ball HL, Orth K. 2009. AMPylation of Rho GTPases by Vibrio VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science* 323(5911):269-72.

Web stranice:

1. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bacterial_growth.png
2. http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html
3. http://www.personal.psu.edu/staff/d/r/drs18/bisciImages/index.html
4. http://www.personal.psu.edu/staff/d/r/drs18/bisciImages/index.html
5. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Amino_acids.png
6. www.neb.com
7. www.qiagen.com