

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Dunja Gamilec i Iva Živaljić

UTJECAJ RIBOSOMSKIH MUTACIJA NA BAKTERIJSKI RAST I
REZISTENCIJU NA AMINOGLIKOZIDNE ANTIBIOTIKE

Zagreb, 2010.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom
doc. dr. sc. Gordane Maravić Vlahoviček i predan je na natječaj za dodjelu
Rektorove nagrade u akademskoj godini 2010./2011.

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. RIBOSOMI.....	2
1.1.1. Struktura prokariotskih ribosoma.....	2
1.1.2. Funkcija.....	3
1.2. ANTIBIOTICI.....	4
1.2.1. Mehanizam djelovanja.....	4
1.2.2. Učinkovitost.....	6
1.2.3. Otpornost.....	8
1.2.3.1. <i>Mehanizmi stečene otpornosti</i>	8
1.3. AMINOGLIKOZIDI.....	9
1.3.1. Kemijska struktura aminoglikozida.....	11
1.3.2. Mehanizam djelovanja aminoglikozida.....	11
1.3.3. Otpornost na aminoglikozide.....	12
1.3.3.1. <i>Otpornost posredovana promjenom veznog mjesta za aminoglikozide na 16S rRNA</i>	13
1.3.3.2. <i>Otpornost posredovana metl-transferazama iz porodica Arm i Kam</i>	13
1.3.3.2.1. <i>Otpornost posredovana metil-transferazom RmtC</i>	15

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....16

3. MATERIJAL I METODE.....19

3.1. MATERIJAL.....	20
3.1.1. Standardne kemikalije.....	20
3.1.2. Hranjivi mediji.....	21
3.1.3. Enzimi.....	22
3.1.4. Nukleotidi i nukleinske kiseline.....	22
3.1.5. Specifične komercijalne smjese analitičkih reagensija- kompleti.....	23
3.2. BAKTERIJSKI SOJEVI I PLAZMIDI.....	23

3.3. HRANJIVE PODLOGE I UZGOJ BAKTERIJA.....	26
3.3.1. Noćna kultura.....	26
3.3.2. Glicerolna kultura.....	27
3.3.3. Rast bakterija u tekućoj hranjivoj podlozi.....	27
3.3.4. Rast bakterija u krutoj hranjivoj podlozi.....	28
3.3.5. Uzgoj <i>E.coli</i> MC338.....	28
3.4. CILJANA MUTAGENEZA MJESTA A U 16S rRNA.....	29
3.4.1. Sinteza mutiranog plazmida PCR reakcijom.....	30
3.4.2. Razgradnja hibrida i plazmida divljeg tipa.....	31
3.4.3. Transformacija superkompetentnih stanica XL-1 Blue.....	32
3.4.4. Određivanje nukleotidnog slijeda kloniranih fragmenata.....	32
3.5. IZOLACIJA PLAZMIDA.....	33
3.6. TRANSFORMACIJA SOJA <i>E. coli</i> MC338 PLAZMIDOM pLK35.....	35
3.6.1. Priprema kompetentnih stanica.....	35
3.6.2. Transformacija.....	36
3.7. TRANSFORMACIJA SOJA <i>E. coli</i> MC338-pLK35 PLAZMIDOM pBBR1MCS-3- <i>rmtC</i>	36
3.8. UZGOJ BAKTERIJA ZA DOBIVANJE KRIVULJA RASTA.....	37
3.9. IZRADA KRIVULJE RASTA.....	39
3.10. ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE KANAMICINA.....	41
4. REZULTATI.....	44
4.1. CILJANA MUTAGENEZA.....	45
4.2. ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE KANAMICINA ZA SOJ <i>E. coli</i> MC388/pLK35 S DIVLJIM TIPOM I MUTIRANIM VARIJANTAMA GENA ZA 16S Rrna.....	45
4.3. RAST <i>E. coli</i> MC338 PRI 37°C U MEDIJU LB UZ DODATAK AMPICILINA.....	46
4.3.1. Rast stanica <i>E. coli</i> MC338/pLK-35-wt.....	46
4.3.2. Rast stanica <i>E. coli</i> MC338/pLK-35-C1400U – M2.....	49
4.3.3. Rast stanica <i>E. coli</i> MC338/pLK-35-C1409U – M8.....	52

4.3.4. Rast stanica <i>E. coli</i> MC338/pLK-35G1491U – M9.....	55
4.3.5. Rast stanica <i>E. coli</i> MC338/pLK-35G1491C – M10	58
4.4. ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE KANAMICINA ZA SOJ <i>E. coli</i> MC388/pLK35 S DIVLJIM TIPOM I MUTIRANIM VARIJANTAMA GENA ZA 16S rRNA I PLAZMIDOM pBBR1MCS-3 <i>rmtC</i>	63
4.5. ODREĐIVANJE KRIVULJA RASTA ZA SOJ <i>E. coli</i> MC388/pLK35 S DIVLJIM TIPOM I MUTIRANIM VARIJANTAMA GENA ZA 16S rRNA I PLAZMIDOM pBBR1MCS-3 <i>rmtC</i>	64
4.5.1. Rast stanica <i>E. coli</i> MC338/pLK-35-wt/ pBBR1MCS-3 <i>rmtC</i>	64
4.5.2. Rast stanica <i>E. coli</i> MC338/pLK-35-C1400U-M2/ pBBR1MCS-3 <i>rmtC</i>	67
4.5.3. Rast stanica <i>E. coli</i> MC338/pLK-35-C1409U-M8/ pBBR1MCS-3 <i>rmtC</i>	70
4.5.4. Rast stanica <i>E. coli</i> MC338/pLK-35-G1491U-M9/ pBBR1MCS-3 <i>rmtC</i>	73
4.5.5. Rast stanica <i>E. coli</i> MC338/pLK-35-G1491C-M10/ pBBR1MCS-3 <i>rmtC</i>	76
5. RASPRAVA.....	81
6. ZAKLJUČAK.....	87
7. ZAHVALA.....	89
8. LITERATURA.....	91
9. SAŽETAK.....	97
10. SUMMARY.....	100

POPIS KRATICA

A – adenin

C – citozin

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

dNTP – deoksi nukleotid trifosfat

E. coli – *Escherichia coli*

FW – *eng.* forward

G – gvanin

LB-medij – Luria Bertani-medij

OD – *eng.* optical density

pb – parovi baza

PCR – *eng.* polymerase chain reaction

RmtC – ribosomska metil transferaza C

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

RV – *eng.* reverse

T – timin

U – uracil

WT – *eng.* wild type

1 UVOD

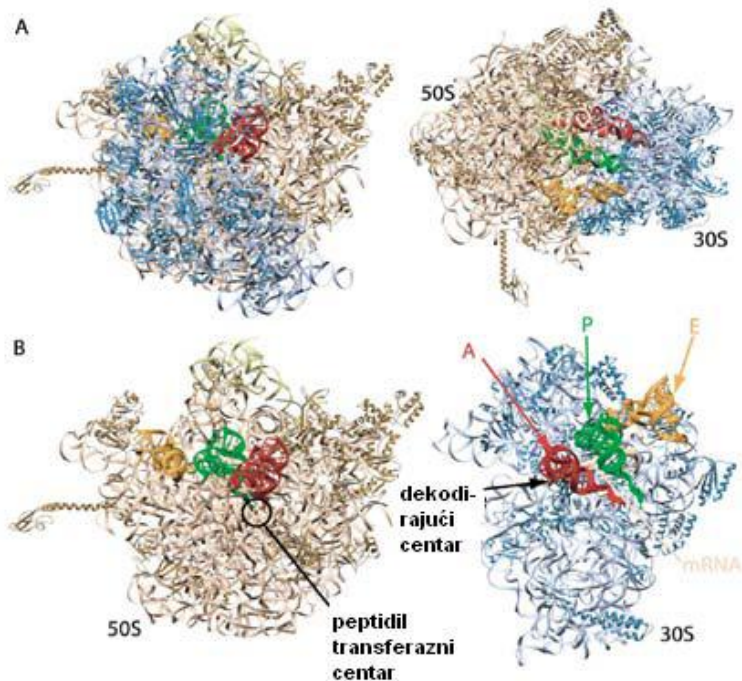
1.1.RIBOSOMI

Ribosomi su stanične strukture smještene slobodne citosolu ili vezane na endoplazmatski retikulum stanice. Sastoje se od ribosomske RNA i proteina. Ribosomi u prokariotskim stanicama razlikuju se od onih u eukariotskim. Osim što se razlikuju u brzini sedimentacije, kao 70S kod prokariota, odnosno 80S kod eukariota, razlike među njima su brojne, kako strukturne, tako i funkcijske pa oni predstavljaju odličnu selektivnu metu za djelovanje antibiotika, omogućujući selektivnu toksičnost prema patogenu.

1.1.1. Struktura prokariotskih ribosoma

Ribosomi su građeni od dvije podjedinice, velike i male, odnosno kod prokariota 50S i 30S. Mala podjedinica sastoji se od 16S rRNA i oko 20 proteina. Velika se sastoji od 23S i 5S rRNA te preko 30 proteina. Podjedinice se povezuju u ribosom tek pri inicijaciji translacije. Svaka sadrži tri vezna mjesta za tRNA, a to su mjesto A (od *eng.* Aminoacyl), mjesto P (od *eng.* Peptidyl) i mjesto E (od *eng.* Exit). Na mjesto A veže se tRNA koja nosi aminokiselinu koju treba dodati rastućem polipeptidu na temelju komplementarnosti sa slijedom na molekuli mRNA vezane na ribosom. Mjesto P veže tRNA na koju je sada vezan lanac koji nastaje, dok mjesto E veže praznu tRNA koja treba napustiti ribosom (Kolosterev i Noller, 2007.).

Iako je ovakva strukturna definicija ribosoma, dobivena primjenom drugih metoda, prihvaćena desetljećima, kristalografska struktura određena je tek 2000. godine (Ban et al; 2000.,slika 1.1.1).



Slika 1.1.1 Kristalna struktura ribosoma 70S iz *Thermus thermophilus*. **A** : kompleks 70S s vezanom mRNA i trima tRNA. **B**: strukture podjedinica 50S i 30S s vezanom mRNA i trima tRNA. Aminoacil-tRNA vezana na mjesto A prikazana je crvenom bojom, peptidil-tRNA u mjestu P zelenom i deacilirana tRNA u mjestu E žutom bojom (preuzeto i prilagođeno iz Ramakrishnan i sur., 2002.).

1.1.2. Funkcija

Ribosomi sudjeluju u procesu translacije te prevode slijed nukleotida u slijed amino kiselina, odnosno protein. Osim ribosoma u ovaj proces uključeni su i mRNA, aminoacil-tRNA te inicijacijski i elongacijski faktori. Proces translacije sastoji se od tri dijela: inicijacije, elongacije i terminacije. Na početku se vežu inicijacijski faktori, dvije podjedinice se povezuju te se veže N-formilmethionil-tRNA. Na kraju se otpuštaju inicijacijski faktori te se vežu elongacijski. Elongacija započinje vezanjem aminoacil-tRNA na mjesto A na temelju sparivanja kodona na mRNA s antikodonom na tRNA, zatim se tRNA smješta u peptidil-transferazni centar podjedinice 50S te nastaje peptidna veza između peptidnog lanca aminokiseline. Za vrijeme elongacije najvažniji korak je

pravilno prepoznavanje kodona i antikodona kako bi se omogućila ugradnja pravilne aminokiseline u protein. Elongacija peptidnog lanca se nastavlja sve dok u mjesto A ne dođe stop kodon – UAA, UAG ili UGA. U stanici ne postoje tRNA čiji bi antikodoni odgovarali tim kodonima već se na njih vežu faktori za otpuštanje. Vezanje faktora za otpuštanje na mRNA potiče hidrolizu veze između tRNA i peptidnog lanca što rezultira otpuštanjem peptida s ribosoma. Nakon otpuštanja peptida, ribosom napušta i tRNA, a ribosomske podjedinice i mRNA disociraju (Cooper i Hausman, 2004., Ramakrishnan i sur., 2002).

1.2. Antibiotici

Antibiotici su kemijski spojevi koji na mikroorganizme djeuju tako da ih ubijaju ili sprečavaju njihovo razmnožavanje te primijenjeni na ljudski ili životinjski organizam liječe ili sprečavaju bolesti koje su njima uzrokovane.

Klasificirati se mogu i prema njihovom porijeklu, kao oni koji nastaju sintetičkim putem, kao oni koji su dobiveni iz živih bića, bakterija i gljivica te kao oni nastali polusintetičkim postupkom, tj. dodatnom kemijskom modifikacijom produkta živog organizma. Moraju djelovati selektivno, što znači, eliminirati stanice patogena, a pritom ne oštetiti stanice domaćina. To postižu tako da djeluju na metaboličke putove mikroorganizama koji u se u domaćinu ne odvijaju ili interferiraju s makromolekularnim strukturama stanice patogena (Karakašević, 1987; Bulat i sur., 2001).

1.2.1. Mehanizam djelovanja

Antibiotici izazivaju promjenu u strukturi ili funkciji bakterijske stanice koja dovodi do inhibicije rasta i stanične diobe ili do njene smrti.

Poznajemo 5 osnovnih mehanizama po kojima antibiotici djeluju, prikazani su na slici 1.2.1, a to su:

1. Inhibicija sinteze stanične stijenke

Stanična stijenka bakterija građena je od kompleksnih polimera peptidoglikana, N-acetilmuraminske kiseline i N-acetilglukoamina, međusobno povezanih peptidnom vezom. Antibiotici koji ovako djeluju sprečavaju unakrsno povezivanje među ovim polimerima te stoga stanična stijenka gubi čvrstoću. Ovo je mehanizam djelovanja antibiotika iz skupine penicilina i cefalosporina, cikloserina, vankomicina i bacitracina.

2. Povećanje propusnosti stanične stijenke

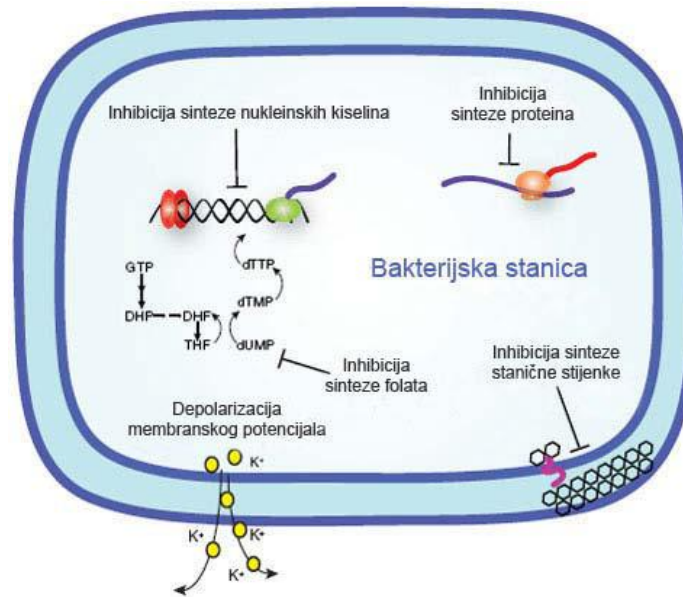
Povećanje propusnosti stanične stijenke dovodi do smrti stanice. Ovako djeluju polimiksin D i kolistin koji se vežu na fosfatne skupine fosfolipida u staničnoj membrani.

3. Blokiranje metaboličkih puteva

Antibiotici koji ovako djeluju inhibiraju metaboličke puteve u koje je uključena folna kiselina. Za razliku od mikroorganizama koji sintetiziraju folnu kiselinu, čovjek je unosi u organizam putem hrane. Stoga ljudi nemaju enzime uključene u njenu sintezu, a koji su meta djelovanja antibiotika. Ti enzimi su dihidropteroat-sintetaza (inhibiraju je sulfonamidi) i dihidrofolat-reduktaza (koju inhibira trimetoprim).

4. Inhibicija sinteze nukleinskih kiselina

Inhibirajući enzime u biosintetskom putu nukleinskih kiselina ovi antibiotici inhibiraju nastanak prokariotske RNA i DNA. Rifampicin inhibira DNA ovisnu RNA-polimerazu te posljednično nastanak RNA. Fluorokinoloni inhibiraju DNA-girazu čime onemogućavaju transkripciju i replikaciju DNA.



Slika 1.2.1 Ciljna mjesta djelovanja antibiotika (preuzeto i prilagođeno s www.nature.com).

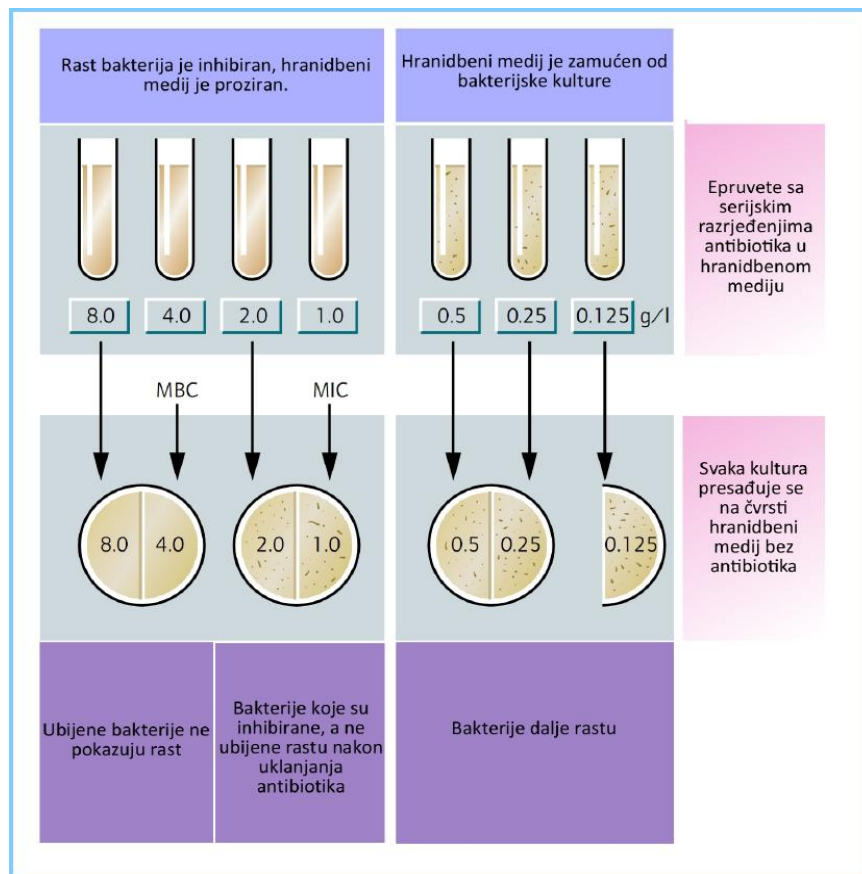
5. Inhibicija sinteze proteina

Djelujući na isključivo prokariotske ribosome ovi antibiotici djeluju selektivno toksično na mikroorganizam. Pri tom različiti antibiotici inhibiraju različite stupnjeve procesa sinteze: tetraciklini interferiraju s vezanjem aminoacil-tRNA na ribosom, kloramfenikol inhibira reakciju peptidil-transferaze, makrolidi i fuzidna kiselina ometaju translokaciju, dok aminoglikozidi uzrokuju pogrešno čitanje genetičkog koda na ribosomima.

1.2.2. Učinkovitost

Učinkovitost antibiotika temelji se na njegovom optimalnom doziranju, pri čemu je cilj postići djelotvornu koncentraciju u prostoru zahvaćenom infekcijom i to primjenom antibiotika na koji je uzročnik osjetljiv. Osjetljivost pojedinog bakterijskog soja na antibiotike procjenjuje se mjerenjem rasta bakterija u hranidbenom mediju s rastućom koncentracijom mjenog antibiotika.

Koncentracija lijeka koja u potpunosti inhibira rast nakon određenog vremena naziva se minimalnom inhibitornom koncentracijom (*eng.* Minimal inhibitory concentration, MIC) lijeka. Na slici 1.2.2 prikazan je postupak određivanja te koncentracije. Prilikom planiranja liječenja nastoji se na mjestu infekcije postići koncentracija antibiotika koja prelazi MIC (Bannister i sur., 2006; Greenwood i sur., 2007).



Slika 1.2.2 Određivanje minimalne inhibitorne (MIC) koncentracije antibiotika, prilagođeno iz Bannister i sur., 2006.

1.2.3. Otpornost

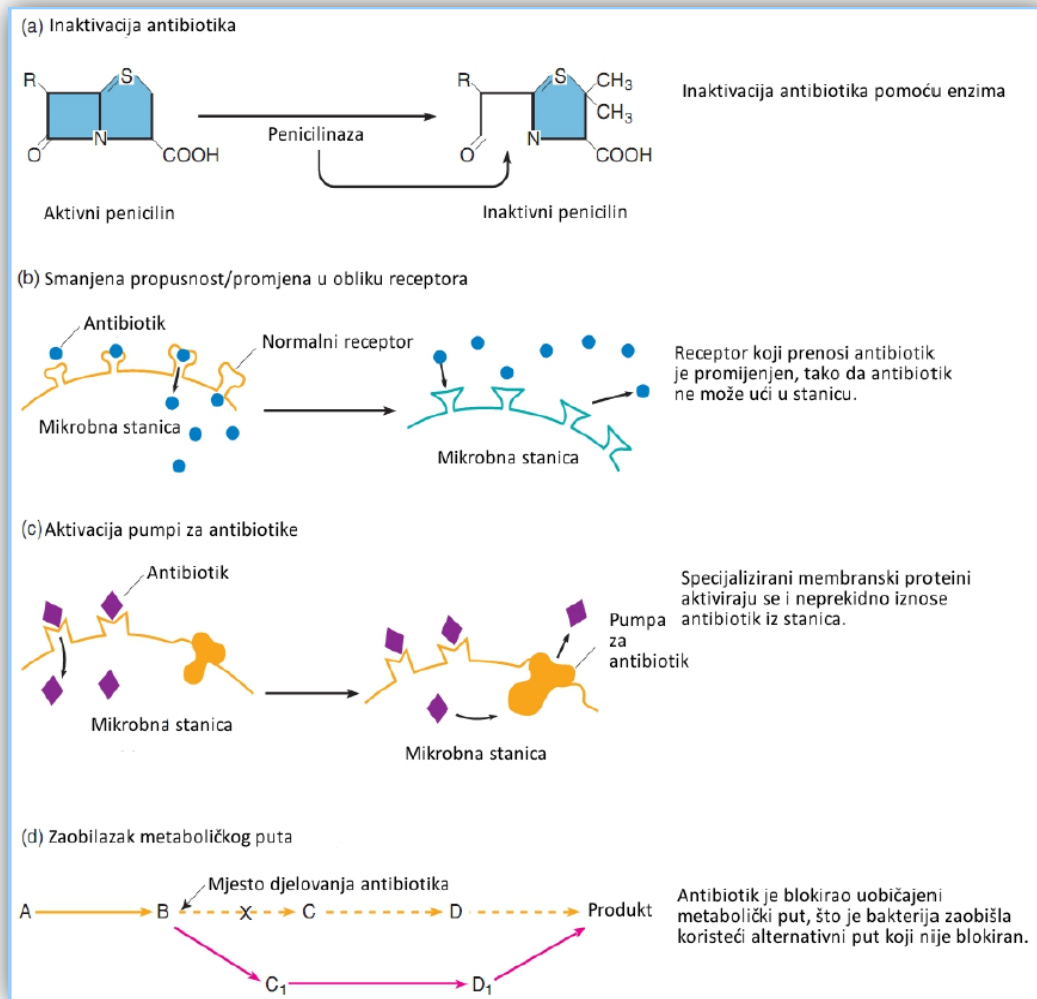
Otpornost na antibiotike je prirodno ili stečeno svojstvo neke vrste ili soja mikroorganizama da se obrani protiv prisutnosti antibiotika u svojem okolišu.

Otpornost se može steći mutacijom i selekcijom uz intenzivan evolucijski pritisak zbog česte uporabe antibiotika čime se takva otpornost prenosi na stanice kćeri, što zovemo vertikalnim prijenosom. Horizontalni prijenos označava prijenos genetičkog materijala između različitih različitih sojeva i vrsta mehanizmima transformacije, transdukcije ili konjugacije (Bockstael i sur., 2009).

1.2.3.1. Mehanizmi stečene otpornosti

Osnovni mehanizmi aktivne otpornosti bakterija na antibiotike su:

- **uništenje ili inaktivacija antibiotika** enzimski posredovanom promjenom molekule antibiotika;
- **promjena ili zaštita ciljnog mjesta djelovanja antibiotika** čime se antibiotiku onemogućuje vezanje;
- **sprečavanje nakupljanja antibiotika u stanicama** proteinskim pumpama vezanim uz staničnu membranu koje najčešće izbacuju lijek iz stanice;
- **zaobilazak metaboličkog puta** na koji djeluje antibiotik, primjerice, stvaranjem alternativnog puta (Bockstael i sur., 2009; Greenwood i sur., 2007; Wright, 2005):



Slika 1.2.3: Primjeri mehanizama stečene otpornosti na antibiotike, prilagođeno iz Talaro i sur., 2002.

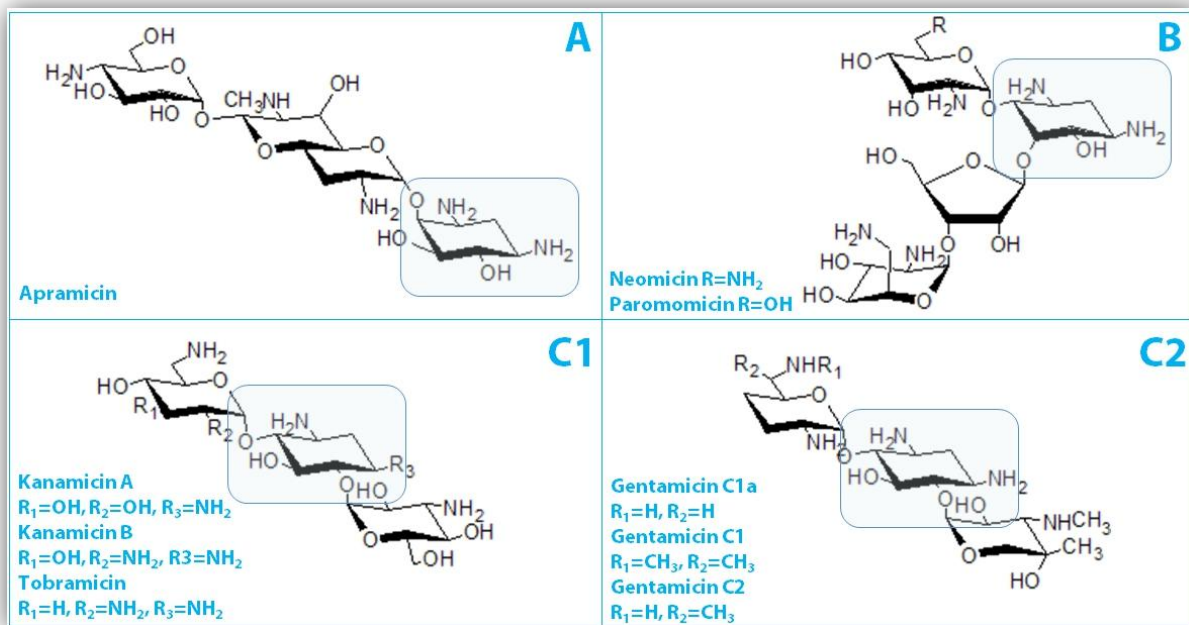
1.3.AMINOGLIKOZIDI

Prvi otkriveni aminoglikozidni antibiotik bio je streptomycin koji je 1944. godine izoliran iz aktinomiceta *Streptomyces griseus*. Otkriven je sustavnim istraživanjima bakterijskih lizata koji su pokazivali snažno djelovanje protiv tuberkuloze i bio je prvi učinkoviti lijek protiv tuberkuloze. Daljnjim istraživanjem otkriveni su i drugi aminoglikozidni antibiotici, a otkriće gentamicina predstavljalo je napredak u liječenju bolesti izazvanim Gram-negativnim bakterijama. Neki derivati dobiveni su polusintetskim

postupkom, npr. amikacin i dibekacin, čime im se povećala učinkovitost i smanjila toksičnost. Najnoviji aminoglikozidni antibiotik je derivat kanamicina B, arbekacin, čija je proizvodnja počela 1990. godine. (Jana i sur., 2006; Magnet i sur., 2005)

1.3.1. Kemijska struktura aminoglikozida

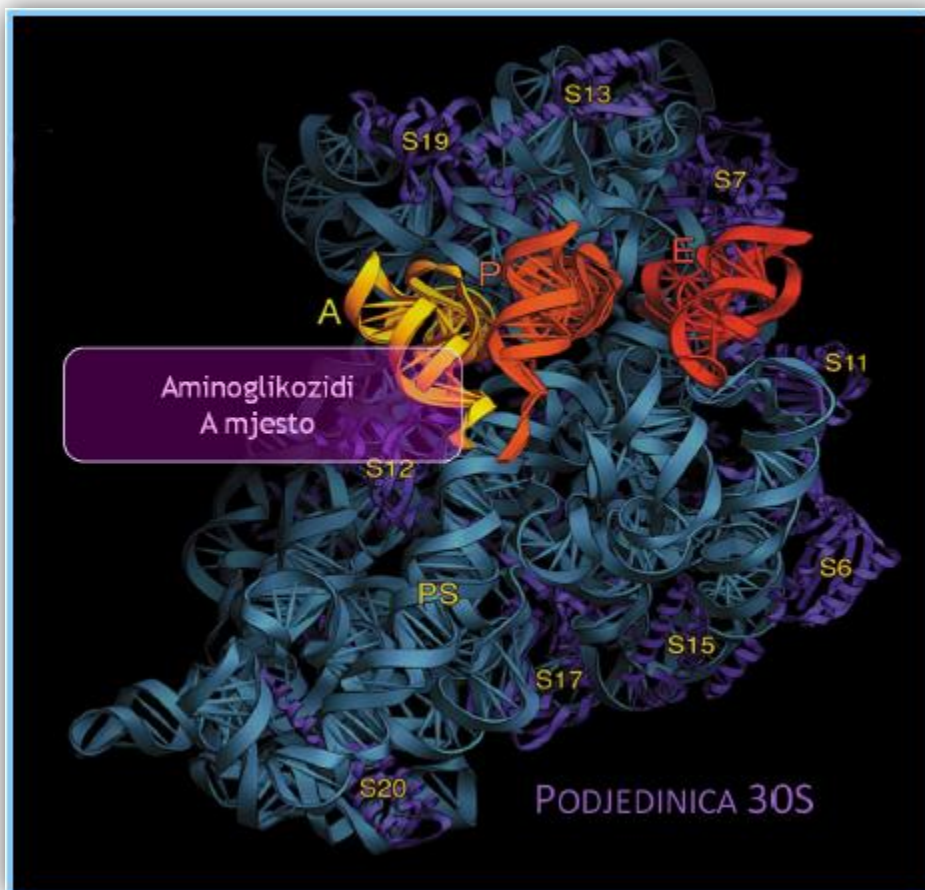
Osnovnu strukturu čini središnji aminociklitolni prsten na koji je pseudoglikozidnom vezom vezan jedan ili više amino šećera. Najviše korišteni aminoglikozidi kao aminociklitol sadrže streptamin ili 2-deoksistreptamin, koji mogu biti monosupstituirani na položaju 4 ili disupstituirani na položajima 4 i 5, odnosno 4 i 6. Atipične strukture pokazuju streptomycin koji kao središnji prsten sadrži streptidin i spektinomycin koji se sastoji od tri spojena prstena (Arya, 2007; Jana i sur., 2006; Magnet i sur., 2005). Strukture aminoglikozide prikazane su na slici 1.3.1.



Slika 1.3.1 Struktura aminoglikozida koji sadrže 2-deoksistreptamin. (A) monosupstituirani 2-deoksistreptamin: apramycin. (B) 4,5-disupstituirani 2-deoksistreptamini: neomicin, paromomicin. (C) 4,6-disupstituirani 2-deoksistreptamini: (1) kanamicin, tobramicin, (2) gentamicin. 2-deoksistreptaminski prsten osjenčan je plavom bojom.

1.3.2. Mehanizam djelovanja aminoglikozida

Aminoglikozidi su pozitivno nabijeni kationi dobro topljivi u vodi te imaju sposobnost vezanja na negativno nabijene molekule. U stanicu ulaze vežući se za lipopolisaharide u staničnoj membrani te time narušavaju njen integritet. Glavno mjesto djelovanja je mjesto A u 16S rRNA na maloj podjedinici prokariotskog ribosoma. Ometaju pravilno sparivanje kodona i anti kodona što dovodi do pogrešnog čitanja genetičkog koda te u konačnici do nastajanja nefunkcionalnih proteina i posljedične smrti stanice. Na slici 1.3.2. je prikazana mala podjedinica ribosoma s veznim mjestom za aminoglikozide.



Slika 1.3.2: Prikaz ribosomske podjedinice 30S s označenim veznim mjestom za aminoglikozidne antibiotike. Prilagođeno iz Yusupov i sur., 2001.

Mjesto A sastoji se od petlje 530, uzvojnice 34 i baze uzvojnice 44 u 16S rRNA (brojanje nukleotida u tekstu prema 16S rRNA iz *E. coli*, osim ako nije drugačije navedeno).

Osim strukture samog veznog mjesta, za bolje poznavanje mehanizma djelovanja važno je poznavati i strukturu kompleksa vezno mjesto-lijek. Prva stuktorna istraživanja koja su imala za svrhu odrediti prostorni položaj veza kojima se aminoglikozidi vežu za ribosom, uključivala su 27 evolucijski očuvanih nukleotida u mjestu A, a nalaze se u uzvojnici 44 unutar 16S rRNA. Prvi je takvom istraživanju potvrđen paromicin, pri čemu je otkriveno da se veže u veliki utor RNA gdje poprima konformaciju oblika slova L te ulazi u interakciju s baznim parom A1408 – A1493 i nesparenim A1492 (Fourmy i sur., 1996). Kasnije se pokazalo da stupa i u interakciju s nukleotidima G1491, A1408, G1494, U1495, C1490 i G1405. Kristalne strukture drugih dvaju aminoglikozida, gentamicina, (Yoshizawa i sur., 1998), i tobramicina, (Vicens i sur., 2002), u kompleksu s odsječkom 16S rRNA, pokazale su sličan obrazac vezanja kao i paromomicin, s dodatnim specifičnim vezama prema nukleotidu G1405. Streptomycin, atipične strukture, pokazao je sličan obrazac vezanja, ali se osim na navedena područja on veže i na druge dijelove iste RNA molekule i na ribosomski protein S12 (Carter i sur., 2000).

1.3.3 otpornost na aminoglikozide

Prvi sojevi patogenih bakterija rezistentni na streptomycin zabilježeni su već pedesetih godina prošlog stoljeća. Desetak godina kasnije otkriveno je da se ta otpornost prenosi genetičkim elementima (Doi i sur., 1968; Umezawa i sur., 1967). Otpornost nastala tim mehanizmima se brzo raširila po svijetu. Ubrzo je za svaki novi aminoglikozid na tržištu nastala rezistencija. Do ovog trenutka su pronađeni i opisani razni mehanizmi kojima nastaje otpornost na aminoglikozide: smanjenje propusnosti stanične membrane za antibiotik, aktivan prijenos antibiotika iz stanice membranskim pumpama, poništenje djelovanja antibiotika uzrokovano čvrstim vezanjem za određene enzime koji ga ne modificiraju, promjena ciljnog mjesta djelovanja antibiotika uvođenjem

promjene u 16S rRNA ili ribosomske proteine te inaktivacija antibiotika enzimskom modifikacijom, što je ujedno i najčešći mehanizam bakterijske otpornosti na aminoglikozide u kliničkoj praksi (Davies i sur., 1997; Jana i sur., 2006; Magnet i sur., 2005; Magnet i sur., 2003; Ramirez i sur., 2010).

Nedavno je otkriven još jedan mehanizam: metilacija određenih nukleotida u mjestu A koju provode enzimi metil-transferaze iz porodica Arm i Kam.

1.3.3.1. Otpornost posredovana promjenom veznog mjesta za aminoglikozide na 16S rRNA

Pri promjeni dušičnih baza unutar mjesta vezanja, određene točkaste mutacije mogu onemogućiti vezanje aminoglikozida jer se više ne mogu ostvariti interakcije antibiotika s rRNA.

Ovakva vrsta otpornosti pronađena je već u kličkim sojevima i pridonosi njihovoj ukupnoj rezistenciji na aminoglikozide (Wachino i sur., 2006).

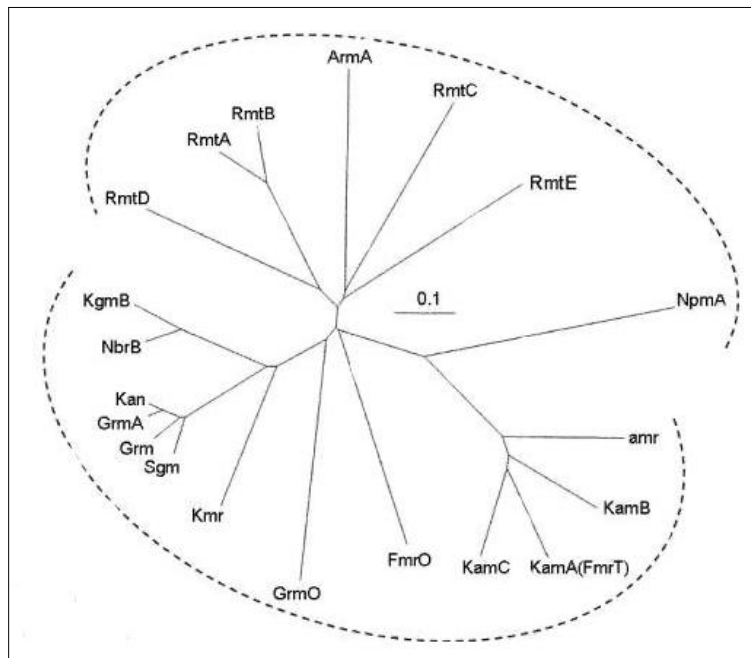
1.3.3.2. Otpornost posredovana metil-transferazama iz porodica Arm i Kam

Metil-transferaze iz porodica Arm i Kam već su odavno pronađene kod onih bakterija koje su proizvođači aminoglikozidnih antibiotika, a pripadaju aktinomicetima iz rodova *Streptomyces* ili *Micromonospora*. Ovim enzimima bakterijska se stanica sama štiti od vlastitog toksičnog produkta. Isto tako identificirani su i nukleotidi supstrati za ove metil-transferaze. Izolirano je više metil-transferaza iz različitih aktinomiceta proizvođača antibiotika te je utvrđeno da metiliraju jedan od dvaju nukleotida (G1405 ili A1408) u 16S rRNA, što bakterijama daje svojstvo visoke otpornosti na aminoglikozide, pri čemu metilacija nukleotida G1405 na položaju N7 (m7G) uzrokuje otpornost na kanamicin i gentamicin (4,6-disupstituirani deoksistreptamini), a metilacija nukleotida A1408 na položaju N1 (m1A) na kanamicin ali i apramicin (aminoglikozid alternativne strukture) (Beauclerk i sur., 1987; Cundliffe, 1992; Holmes i sur., 1991; Kelemen i sur., 1991; Kojic i sur., 1996; Ohta i sur., 1993). Metilacija nukleotida A1408 odvija se uz pomoć metil-

transferaza iz porodice enzima Kam, dok metil-transferaze iz porodice Arm metiliraju nukleotid G1405, a kao donor metilne skupine služi kofaktor S-adenozil metionin (AdoMet) (Beauclerk i sur., 1987; Holmes i sur., 1991; Kelemen i sur., 1991; Ohta i sur., 1993; Skeggs i sur., 1987).

Metil-transferaze iz porodica Arm i Kam nedavno su pronađene i u klinički značajnim rezistentnim sojevima. 2003. godine pronađeno je da su otpornost kliničkih sojeva bakterija *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae* na aminoglikozide uzrokovala 16S rRNA metil-transferaze RmtA i ArmA, redom (iz porodice Arm Galimand i sur., 2003; Yokoyama i sur., 2003). Uslijedilo je otkriće RmtB (Doi i sur., 2004), RmtC (Wachino i sur., 2006), RmtD (Doi i sur., 2007) i RmtE (Davis i sur., 2010). Otkriveno je pojavljivanje i jednog enzima porodice Kam u kliničkom soju patogene bakterije, gdje je enzim NpmA izoliran iz jednog soja *E. coli* (Wachino i sur., 2007).

Na slici 1.3.3.2. je prikazano zajedničko filogenetičko stablo enzima iz porodica Arm i Kam.



Slika 1.3.3.2 Filogenetičko stablo enzima iz porodica Arm i Kam. Metil-transferaze izolirane iz prirodnih proizvođača antibiotika nalaze se u donjem dijelu prikaza dok enzimi izolirani iz patogenih bakterijskih sojeva se nalaze u gornjem dijelu prikaza. Preuzeto iz Davis i sur.; 2010.

1.3.3.2.1. Otpornost posredovana metil-transferazom RmtC

Enzim RmtC pronađen je 2003. godine u soju ARS68 vrste *Proteus mirabilis* u Japanu. Prisutnost tog enzima u bakterijskoj stanici dovodi do otpornosti visokog stupnja na 4,6-disupstituirane deoksistreptamine ali ne i na druge aminoglikozide, kao što su streptomycin i neomicin (Wachino i sur.. 2006A). Gen *rmtC* pronađen je na odsječku DNA zajedno s genom *tnpA* koji kodira transpozazu. Ekspresija metil-transferaze RmtC posredovana je promotorom gena *tnpA*, a transpozaza omogućuje i horizontalni prijenos na plazmid iz *E. coli* (Wachino i sur.. 2006B). Prošle godine potvrđeno je da RmtC metilira mjesto G1405 na 16S rRNA 30S podjedinice prokariotskog ribosoma (ali ne i slobodnu 16S rRNA ili cjeloviti ribosom 70S) te da ta metilacija dovodi do visoke otpornosti Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija na aminoglikozide (Wachino JI i sur., 2010).

2 OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Svrha ovog rada je pridonijeti istraživanju mehanizma djelovanja i otpornosti na aminoglikozidne antibiotike posredovane metil-transferazama iz porodice Arm te omogućiti daljnji napredak u sprječavanju bakterijske rezistencije na aminoglikozidne antibiotike.

Cilj rada je ciljanom mutagenezom proizvesti točkaste mutacije u mjestu A 16S rRNA u svim ribosomima *E. coli*, utvrditi utjecaj ovih mutacija na bakterijski rast i rezistenciju na aminoglikozide te ispitati karakteristike veznog mjesta metil-transferaze RmtC na 16S rRNA.

Specifični ciljevi za ostvarivanje općeg cilja istraživanja su:

- Ciljana mutageneza nukleotida C1400U, C1409U, G1491U, G1491C u mjestu A na 16S rRNA na kalupu plazmida pLK-35
- Transformacija stanica XL1-Blue rekombinantnim plazmidima pLK-35 s divljim tipom gena za 16S rRNA i mutiranim varijantama (C1400U, C1409U, G1491U, G1491C)
- Izolacija plazmida pLK-35 s divljim tipom gena za 16S rRNA i mutiranim varijantama iz transformanata XL1-Blue
- Transformacija *E. coli* MC338 plazmidima pLK-35 s divljim tipom gena za 16S rRNA i mutantima C1400U, C1409U, G1491U, G1491C
- Određivanje generacijskog vremena stanica *E. coli* MC338 koje sadrže plazmid pLK-35 s divljim tipom gena za 16S rRNA ili mutirani gen (C1400U, C1409U, G1491U, G1491C)
- Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina u stanicama *E. coli* MC338 koji sadrže plazmid pLK-35 s divljim tipom gena za 16S rRNA ili mutirani gen (C1400U, C1409U, G1491U, G1491C)
- Transformacija *E. coli* MC338/pLK-35 koji nosi divlji tip ili mutirani gen za 16S rRNA plazmidom pBBR1MCS-3*rmtC* koji kodira metil-transferazu RmtC

- Određivanje generacijskog vremena stanica *E. coli* MC338 koje sadrže plazmid pLK-35 s divljim tipom gena za 16S rRNA ili mutirani gen (C1400U, C1409U, G1491U, G1491C) te plazmid pBBR1MCS-3*rmtC*
- Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina u stanicama *E. coli* MC338 koji sadrže plazmid pLK-35 s divljim tipom gena za 16S rRNA ili mutirani gen (C1400U, C1409U, G1491U, G1491C) te plazmid pBBR1MCS-3*rmtC*

3 MATERIYAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1 Standardne kemikalije

- agar (*Sigma*)
- agarozna (*Invitrogen*)
- amonijev klorid, NH_4Cl (*Sigma*)
- ampicilin (*Sigma*)
- dimetilsulfoksid, DMSO (*Finnzymmes*)
- etanol (*Sigma*)
- ekstrakt kvasca (*Difco*)
- glicerol (*Sigma*)
- glukoza (*Sigma*)
- kalcijev klorid, CaCl_2 (*Sigma*)
- kalijev acetat, KOAc (*Sigma*)
- kalijev klorid, KCl (*Sigma*)
- kanamicin (*Roth*)
- kloridna kiselina, HCl (*Sigma*)
- ledena octena kiselina (*Sigma*)
- magnezijev klorid, MgCl_2 (*Fluka*)
- magnezijev sulfat, MgSO_4 (*Sigma*)
- MOPS, 3-(N-morfolino)-propan-sulfonska kiselina (*Sigma*)
- natrijev hidroksid, NaOH (*Sigma*)
- natrijev klorid, NaCl (*Sigma*)
- rubidijev klorid, RbCl (*Fluka*)
- saharoza (*Roth*)
- tetraciklin (*Sigma*)
- tripton (*Difco*)

3.1.2. Hranjivi mediji

LB tekući medij

tripton.....10 g/L

ekstrakt kvasca5 g/L

natrijev klorid, NaCl.....10 g/L

pH 7.0 ± 0.2 pri 25°C

LB kruti medij

tripton.....10 g/L

ekstrakt kvasca.....5 g/L

natrijev klorid, NaCl.....10 g/L

agar.....15 g/L

pH 7.0 ± 0.2 pri 25°C

LB kruti medij s niskom koncentracijom soli i saharozom

tripton.....10 g/L

ekstrakt kvasca.....5 g/L

natrijev klorid, NaCl.....0.5 g/L

saharoza.....80 g/L

agar.....15 g/L

pH 7.0 ± 0.2 pri 25°C

SOC medij

tripton.....	20 g/L
ekstrakt kvasca.....	5 g/L
natrijev klorid, NaCl.....	0.58 g/L
kalijev klorid, KCl.....	0.185 g/L
magnezijev klorid, MgCl ₂	0.95 g/L
magnezijev sulfat, MgSO ₄	1.2 g/L
glukoza.....	3.6 g/L

pH 7.0 ± 0.2 pri 25°C

Dodaci mediju

- ampicilin u konačnoj koncentraciji 100 mg/L
- tetraciklin u konačnoj koncentraciji 12,5 mg/L

3.1.3. Enzimi

- Termostabilna DNA-polimeraza *PfuTurbo*[®] (*Stratagene*)

3.1.4 Nukleotidi i nukleinske kiseline

- smjesa deoksinukleotida (*Stratagene*)
- Početnice za ciljanu mutagenezu (*Sigma Genosys*). Sljedovi početnica navedeni su u tablici 3.1.4.

Tablica 3.1.4 Početnice za ciljanu mutagenezu mjesta A u 16S rRNA. Nukleotid kojim se uvodi mutacija je podebljan i označen narančasto.

Početnica	Slijed 5'-3'
C1400U_FW	CCTTGTACACAC GG CCCGTCACACCATGGG
C1400U_RV	CCCATGGTGTGACGGG CG TGTGTACAAGG
C1409U_FW	GTACACACCGCCCGTCAT T ACCATGGGAG
C1409U_RV	CTCCCATGGT AG GACGGGCGGTGTGTAC
G1491U_FW	GTGATTCATGACTGGGG T AAGTCGTAACAAGGTAAC
G1491U_RV	GTTACCTTGTTACGACTT A ACCCAGTCATGAATCAC
G1491C_FW	GTGATTCATGACTGGGG C AAGTCGTAACAAGGTAAC
G1491C_RV	GTTACCTTGTTACGACTT G ACCCAGTCATGAATCAC

3.1.5 Specifične komercijalne smjese analitičkih reagensija- kompleti

- QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*)
- Wizard[®]Plus SV Minipreps DNA Purification System (*Promega*)

3.2. BAKTERIJSKI SOJEVI I PLAZMIDI

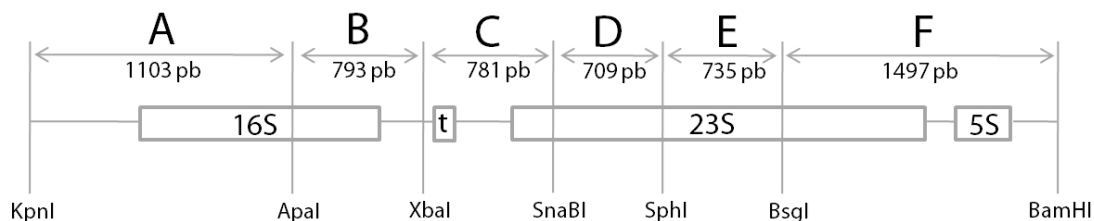
XL-1 Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn 10 (Tet^r)]*) je soj *E. coli* iz komercijalnog kompleta za ciljanu mutagenezu QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene, Agilent Technologies, Inc.*, 2009). Soj je korišten za kloniranje divljeg tipa gena za 16S rRNA i njegovih mutiranih varijanti (C1400U, C1409U, G1491U i G1491C) u plazmid pLK35.

Kod soja ***E. coli* MC338** (*ΔrrnA ΔrrnB ΔrrnC ΔrrnD ΔrrnE ΔrrnG ΔrrnH ΔrecA ΔlacZ ptRNA67 pCSacB7*) utišano je svih 7 operona za rRNA, a divlji se tip rRNA eksprimira s operona *rrnC* koji se nalazi na plazmidu pCSacB7. Plazmid pCSacB7 sadrži gen *sacB*. Gen *sacB* kodira enzim levansaharazu koja katalizira hidrolizu saharoze i sintezu levana, polimera fruktoze visoke molekulske mase. Ekspresija gena *sacB* u prisutnosti saharoze je letalna za stanice *E. coli* (Pelicic i sur., 1996), što

omogućava selekciju bakterija transformiranih mutiranim plazmidom pLK35 koji ne sadrži gen za osjetljivost na saharozu. Detaljnije, ako se bakterije nakon transformacije uzgajaju na mediju bogatom saharozom, bakterije koje nisu izbacile izvorni plazmid pCSacB7 s genom *sacB* s osjetljivošću na saharozu neće preživjeti zbog letalnosti saharoze iz medija, dok će bakterije uspješno transformirane plazmidom pLK35 stvoriti kolonije.

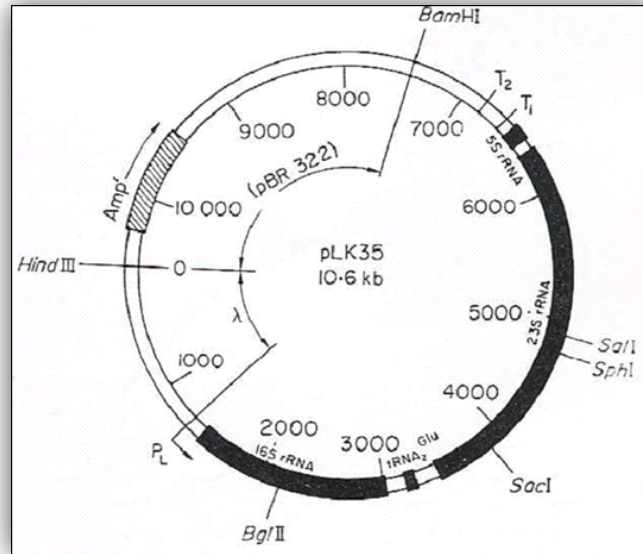
Ovaj je soj transformiran s plazmidom pLK35 u kojem se nalaze divlji tip i mutirani oblici gena (C1400U, C1409U, G1491U i G1491C) za 16S rRNA te s plazmidom pBBR1MCSu koji je kloniran gen za metil-transferazu RmtC.

Plazmid **pLK35** korišten je za mutagenezu gena za 16S rRNA te određivanje generacijskog vremena i minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina za konstruirane mutante. Sadrži cijeli operon *rrnB* iz *E. coli*, koji kodira 16S rRNA, unutar kojeg se uvode točkaste mutacije C1400U, C1409U, G1491U i G1491C. Restriksijska mjesta između kojih su načinjene navedene točkaste mutacije su Apal koje se nalazi usred gena za 16S rRNA i Xbal koje se nalazi 793 pb nizvodno ispred gena za tRNA (Douthwaite i sur., 1989) (Slika 3.2a).



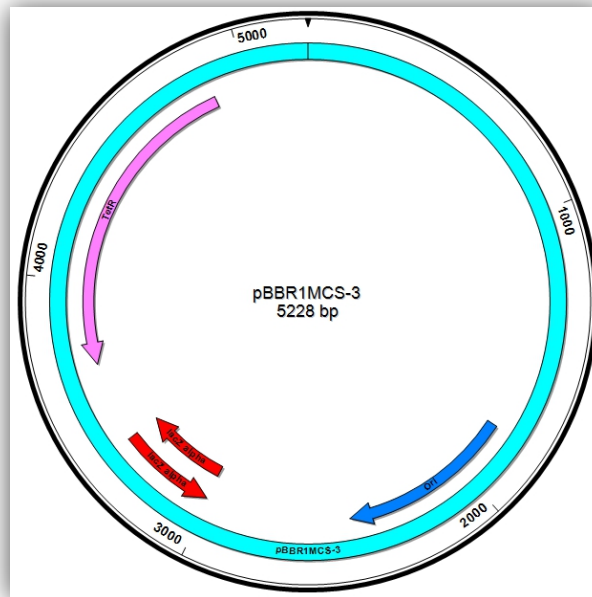
Slika 3.2a Operon *rrnB* iz *E. coli* s prikazanim restriksijskim mjestima (preuzeto iz Yassin i Mankin, 2007.)

Plazmid pLK35 derivat je plazmida pLK3535 koji je nastao kloniranjem operona *rrnB* iz *E. coli* u restriksijsko mjesto BamHI plazmida pBR322. Veličine je 10,5 kpb te sadrži gen za rezistenciju na ampicilin kao selektivni biljeg (Douthwaite i sur., 1989). Mapa plazmida pLK35 prikazana je na slici 3.2.b.



Slika 3.2.b Mapa plazmida pLK35 (preuzeto iz Douthwaite i sur., 1989)

Plazmid **pBBR1MCS-3** korišten je za ekspresiju metil-transferaze *rmtC* u soju *E. coli* MC338 koji sadrži plazmid pLK35 s divljim tipom ili mutiranim varijantama gena za 16S rRNA. Veličine je 5,2 kpb, a kao selektivni biljeg sadrži gen za otpornost na tetraciklin (Tc) (Kovach i sur., 1995). Mapa plazmida prikazana je na slici 3.2.c



Slika 3.2.c Mapa plazmida pBBR1MCS-3 (preuzeto iz Kovach i sur., 1995)

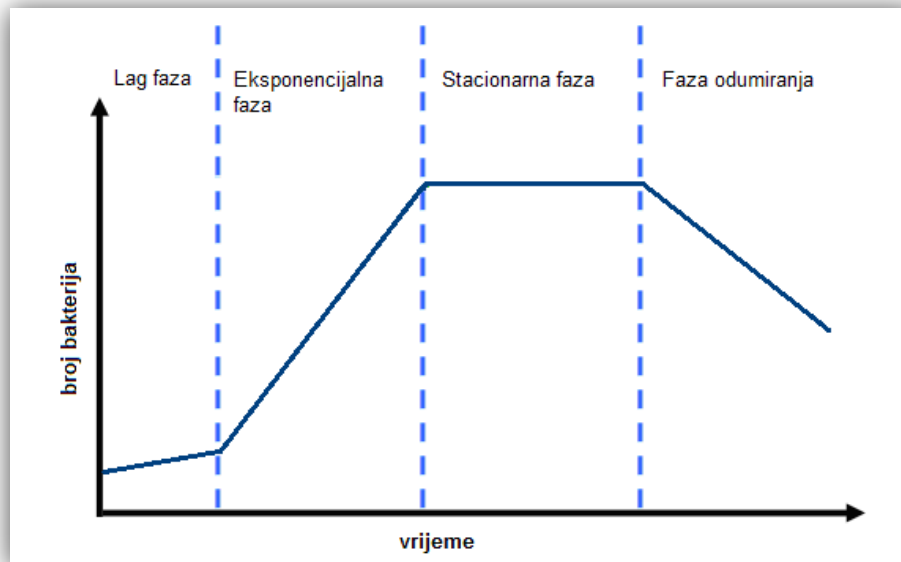
3.3. HRANJIVE PODLOGE I UZGOJ BAKTERIJA

3.3.1. Noćna kultura

Zasićena bakterijska kultura u stacionarnoj fazi za koju je optička gustoća pri 600 nm (OD_{600}) veća od 1, dobiva se inkubacijom koja traje 15-24 h, odnosno preko noći (Ambrović-Ristov i sur., 2007).

Krivulja rasta bakterijske kulture može se podijeliti na 4 karakteristične faze:

- *lag* faza – faza prilagodbe okolišu; bakterija se još nije sposobna dijeliti, no u ovoj fazi sintetizira molekule RNA, enzime i slično;
- *eksponencijalna* ili *log* faza – faza ubrzanog rasta bakterijske kulture, pri čemu se stanična masa udvostručuje pri svakoj diobi;
- *stacionarna* faza – rast kultura drastično je usporen i broj stanica relativno je stalan, nastupa kao posljedica smanjenja količine hranjivih tvari i akumulacije toksičnih produkata u mediju;
- *faza odumiranja* – nastupa kao posljedica potpunog iscrpljenja nutrijenata u hranjivom mediju (Slika 3.3.1.).



Slika 3.3.1. Faze rasta bakterijske kulture (preuzeto i prilagođeno s <http://gcserevision101.wordpress.com>).

Cilj je uzgoja noćne kulture uzgojiti bakterije u stacionarnoj fazi rasta, u kojoj je broj bakterija relativno stalan, a presađivanjem na svježiju hranjivu podlogu, bakterije su sposobne rasti i dijeliti se. Noćna kultura poslužila je kao pretkultura za inokulaciju bogatog medija LB za praćenje rasta bakterija, određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika ili za izradu glicerolne kulture.

3.3.2. Glicerolna kultura

Glicerolne kulture izrađuju se kako bi se bakterijske kulture pohranile kroz dulje vrijeme (do nekoliko godina), uz zadržanu vijabilnost. Glicerol je pogodan medij za zamrzavanje kultura na -80°C jer ne stvara kristaliće koji mogu oštetiti stanične dijelove.

Za regeneraciju i ponovno korištenje stanica iz glicerolne kulture, potrebno ih je zagrijati u mediju kako bi izašle iz hibernacije, ubrzale metabolizam i počele diobu. Glicerolne kulture izrađuju se iz noćne kulture u koju se dodaje glicerol u konačnoj koncentraciji 8% (Ambrović-Ristov i sur., 2007).

3.3.3. Rast bakterija u tekućoj hranjivoj podlozi

Bakterije se mogu uzgajati u tekućim podlogama određenog minimalnog sastava (tzv. minimalni definirani medij), koje sadrže izvor ugljika (šećer ili glicerol) i mineralne soli te aminokiseline koje se mogu dodati, ako je potrebno (40-100 mg/L). Koriste se i bogate hranjive podloge neodređenog sastava, koje sadrže kvaščeve, mesne ili mliječne ekstrakte. Bogata tekuća podloga je **LB (Luria Bertani) medij**, a izrađuje se iz triptona, ekstrakta kvasca i otopine natrijeva klorida u miliQ vodi. pH se podešava otopinom natrijeva hidroksida (Ambrović-Ristov i sur., 2007).

Hranjivi medij, stakleno i plastično posuđe steriliziraju se autoklaviranjem, odnosno oslobađanjem topline kondenzacije vodene pare na hladnoj površini materijala koji se autoklavira. Kondenzirana vodena para brzo zagrijava materijal, čime ga sterilizira. Temperatura, tlak i vrijeme autoklaviranja za sve hranjive podloge, otopine i pufere su 121°C , 1.1. bar (ili 100kPa), 20min.

Za uzgoj bakterijskih sojeva s genom za otpornost na određeni antibiotik ugrađenim u plazmid, dodatkom prikladnog antibiotika u tekuću podlogu, sprečava se

gubitak plazmida s genom za otpornost te se omogućava selekcija bakterija s plazmidom.

3.3.4. Rast bakterija na krutoj hranjivoj podlozi

Kruta hranjiva podloga sastoji se od bogate tekuće hranjive podloge Luria Bertani i agara, koji su prethodno autoklavirani. Smjesa se ulijeva u Petrijeve zdjelice do polovice volumena i ostavlja na sobnoj temperaturi dok se ne ohladi i skrutne. Ploče se pohranjuju na 4°C, a ako su priređene s antibiotikom kao selektivnim biljegom, trebaju se iskoristiti unutar 14 dana.

3.3.5. Uzgoj *E.coli* MC338

Za uzgoj soja *E.coli* MC338 koristi se kruti medij LB s niskim udjelom soli (SF-LB, *eng.* Salt free LB) i tekući medij LB, uz različite dodatke za selekciju transformanata i određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika.

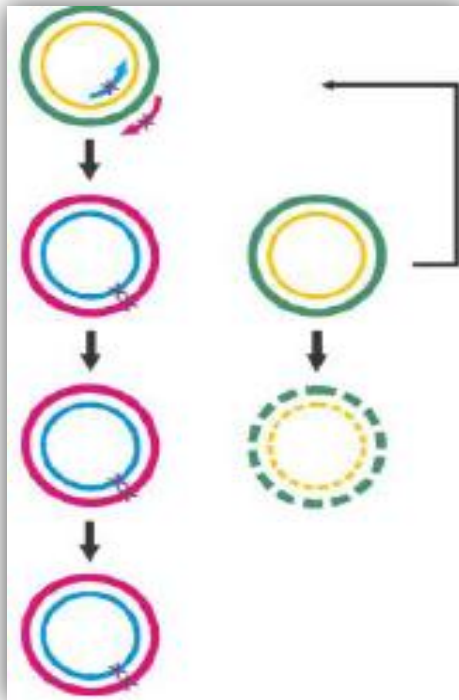
- Kruti medij SF-LB: tripton 10 g/L, kvašćev ekstrakt 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, agar 15 g/L, pH 8,0 prilagođen dodatkom 10 M NaOH
 - Dodaci za selekciju transformanata: ampicilin konačne koncentracije 100 mg/L, saharoza 8% w/v
- Tekući medij LB: tripton 10 g/L, kvašćev ekstrakt 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 8,0 prilagođen dodatkom 10M NaOH
 - Dodaci za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina za bakterije koje imaju divlji tip i mutirane oblike operona *rrnB*: ampicilin konačne koncentracije 100 mg/L, kanamicin konačnih koncentracija 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 i 1024 mg/L
 - Dodaci za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina za bakterije koje imaju divlji tip i mutirane oblike operona *rrnB* i eksprimiraju metil-transferazu RmtC: ampicilin konačne koncentracije 100 mg/L, tetraciklin konačne koncentracije 12,5 mg/L, kanamicin konačnih koncentracija 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 i 1024 mg/L.

3.4. CILJANA MUTAGENEZA MJESTA A U 16S rRNA

Kako bi se ispitalo vezno mjesto metil-transferaze *rmtC* na bakterijskom ribosomu, mutirani su nukleotidi u mjestu A unutar 16S rRNA. Ciljana mutageneza provedena je na plazmidu pLK35 unutar gena za 16S rRNA u operonu *rrnB* (DNA kalup) na kalupu cijelog plazmida uz dvije mutagene početnice.

Uporaba početnica koje nisu u potpunosti komplementarne kalupu omogućava se ciljano uvođenje točkastih mutacija, čime se postiže amplifikacija plazmidne DNA s promijenjenim slijedom nukleotida (Higuchi i sur., 1988).

Ciljana mutageneza A mjesta 16S rRNA provedena je metodom lančane reakcije polimeraze, PCR (*eng.* polymerase chain reaction) uporabom komercijalnog kompleta *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Stratagene*). Shematski prikaz metode prikazan je na slici 3.4a.



Slika 3.4a Shematski prikaz PCR-mutageneze cijelog plazmida uz dvije mutagene ishodnice. Oznakom x označen je položaj točkaste mutacije (preuzeto i prilagođeno iz <http://cp.literature.agilent.com/litweb/pdf/5989-8097EN.pdf>).

Metoda PCR-mutageneze cijelog plazmida uz dvije mutagene početnice sastoji se od tri dijela:

- U prvom dijelu metode sintetizira se mutirani plazmid PCR reakcijom uz termostabilnu DNA-polimerazu *PfuTurbo*[®]
- U drugom dijelu razgrađuju se hibridi i plazmidi divljeg tipa uporabom restriksijske endonukleaze DpnI koja kida metiliranu DNA
- U trećem dijelu transformiraju se superkompetentne stanice XL-1 Blue.

3.4.1. Sinteza mutiranog plazmida PCR reakcijom

Za PCR reakciju potreban je kalup DNA koji se želi umnožiti (plazmid pLK35), dvije početnice komplementarne kalupu (FW i RV, od *eng.* forward i reverse), koje sadrže točkastu mutaciju (C1400U, C1409U, G1491U ili G1491C), smjesa deoksinukleotida, pufer s magnezijevim ionima i termostabilna DNA-polimeraza (*PfuTurbo*[®]). Načinjena je reakcijska smjesa ukupnog volumena 50 μ L.

Reakcijska smjesa za PCR reakciju:

H ₂ O.....	40 μ L
10x reakcijski pufer.....	5 μ L
smjesa dNTP.....	1 μ L
DNA kalup (vektor pLK3 50 ng/ μ L).....	1 μ L
FW početnica s mutacijom – 100 ng/ μ L).....	1 μ L
RV početnica s mutacijom – 100 ng/ μ L).....	1 μ L
Pfu Turbo – 2.5 U/ μ L).....	1 μ L

Nakon predzagrijavanja od 30 sekundi na 95°C, reakcijska smjesa zagrijava se na 95°C kako bi se kalup DNA denaturirao. Nakon toga, temperatura se spušta na 55°C za vezanje početnica na kalup. Temperatura vezanja početnica ovisi o duljini i sastavu

baza početnica. Potom se temperatura diže na optimalnu temperaturu za rad DNA-polimeraze; za DNA-polimerazu *PfuTurbo*[®] optimalna temperatura je 68°C. Ciklus se bez predzagrijavanja ponavlja dvanaest puta za dobivanje dovoljne količine mutiranog plazmida. Na kraju se smjesa hladi na ledu 2 minute kako bi temperatura smjese pala ispod 37°C. Korišten PCR program prikazan je u tablici 3.4a.

Tablica 3.4a Program korišten u PCR-mutagenezi. Prikazane su temperature i vremensko trajanje faza denaturacije, vezanja početnica i elongacije.

segment	Broj ponavljanja ciklusa	Temperatura/°C	Vrijeme trajanja ciklusa/s	Faza ciklusa
1	1	95	30	predzagrijavanje
2	12*	95	30	denaturacija
		55	60	vezanje početnica
		68	630**	elongacija

* prema *QuikChange* protokolu, potrebno je 12 ponavljanja ciklusa za točkastu mutaciju u početnici

** elongacija traje 1 minutu za 1 kpb kalupa. Budući da pLK35 ima 10,5 kpb, elongacija traje 10,5 minuta (630 s)

3.4.2. Razgradnja hibrida i plazmida divljeg tipa

DpnI je restrikcijska endonukleaza koja razgrađuje metiliranu DNA kalupa, odnosno plazmid divljeg tipa. Na taj način u smjesi produkata PCR reakcije ostaju samo mutirani plazmidi.

Razgradnja plazmida divljeg tipa u smjesi produkata PCR reakcije provodi se neposredno nakon PCR reakcije opisane u poglavlju 3.4.1., uz dodatak 1 µL restrikcijskog enzima DpnI u reakcijsku smjesu.

3.4.3. Transformacija superkompetentnih stanica XL-1 Blue

Superkompetentne stanice XL-1 Blue transformirane su plazmidom pLK35 s genom za 16S rRNA koji sadrži jednu od točkastih mutacija C1400U, C1409U, G1491U ili G1491C, a pripremljen je metodom mutageneze cijelog plazmida uz dvije mutagene početnice, opisanom u poglavlju 3.4.1. i 3.4.2.

U 100 µL prethodno otopljenih superkompetentnih stanica XL-1 Blue dodan je 1 µL PCR smjese razgrađene s DpnI. Smjesa je lagano promućkana i stavljena na led na 30 min. Nakon hlađenja, smjesa je inkubirana u vodenoj kupelji (*BioSan Water Bath WB4*) na 42°C u trajanju od 45 s i odmah ohlađena na ledu u trajanju od 2 minute. Zatim je dodano 0,5 mL SOC medija prethodno zagrijanog na 42°C i smjesa je inkubirana 1h u zračnoj tresilici (*Stuart, orbital incubator SI500*) podešenoj na 37°C i 200 okretaja u minuti. 250 µL transformacijske smjese nanijeto je na kruti medij LB s ampicilinom u konačnoj koncentraciji 100 mg/L.

3.4.4. Određivanje nukleotidnog slijeda kloniranih fragmenata

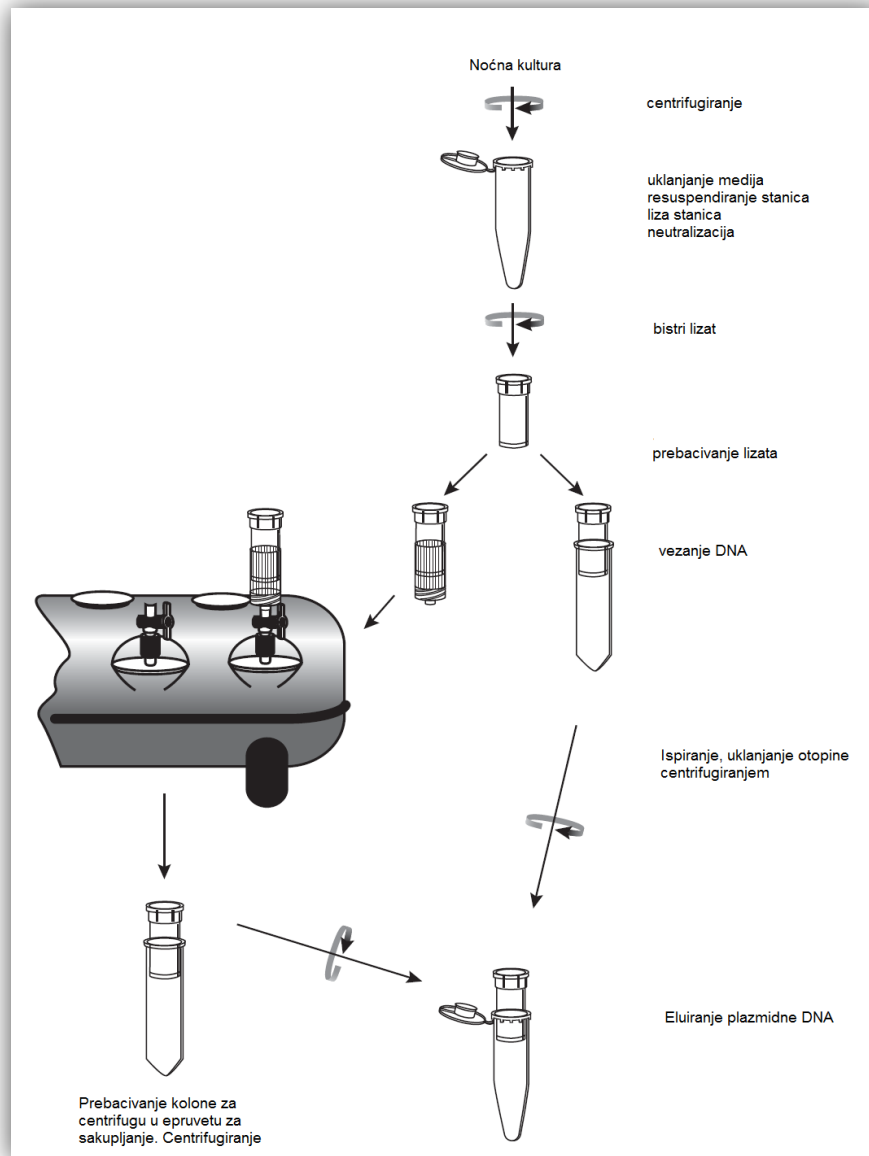
Točnost provedene mutageneze određena je sekvenciranjem plazmida pLK35 s početnicama prikazanim u tablici 3.4.4. Nukleotidni slijed kloniranih fragmenata utvrđen je sekvenciranjem dideoksi metodom (Sanger i sur., 1977) pomoću komercijalnog servisa tvrtke Macrogen Inc. (Južna Koreja).

Tablica 3.4.4 Početnice za sekvenciranje gena za 16S rRNA

POČETNICA	NUKLEOTIDNI SLIJED 5'-3'
16S_FW_mut_seq	GAGCTAACGCGTTAAGTCGA
16S_RV_mut_seq	CGGCGACTTTCCTCACA

3.5. IZOLACIJA PLAZMIDA

Za izolaciju plazmida pLK35 s divljim tipom i mutiranim varijantama gena za 16S rRNA iz stanica XL-1 Blue, korišten je komercijalno dostupan komplet Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System (*Promega*). Shema protokola za izolaciju plazmidne DNA je na slici 3.5.



Slika 3.5 Shema protokola za izolaciju plazmidne DNA (preuzeto i prilagođeno iz Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System (*Promega*, 2009))

Protokol Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System (*Promega*) za izolaciju sastoji se od četiri dijela:

- Izrada bistrog lizata
- Vežanje plazmidne DNA
- Ispiranje plazmidne DNA
- Eluiranje plazmidne DNA

3 mL LB-medija sa 100 mg/L ampicilina inokulirano je jednom bakterijskom kolonijom te je kultura uzgajana preko noći u zračnoj tresilici podešenoj na 37°C i 200 okretaja u minuti. 1,5 mL noćne kulture centrifugirano je 1 minutu pri maksimalnoj brzini (centrifuga: 5417, Eppendorf, supernatant je odstranjen aspiracijom te je cijeli postupak ponovljen s preostalim 1,5 mL noćne kulture.

Dobiveni talog bakterija resuspendiran je u 250 µL otopine za resuspenziju *Cell Resuspension Solution*®. Suspenziji je dodano 250 µL otopine za lizu stanica *Cell Lysis Solution*® i 10 µL otopine alkalne proteaze *Alkaline Protease Solution*®, nakon čega je inkubirana na sobnoj temperaturi 5 minuta. Smjesa je zatim neutralizirana dodatkom 350 µL otopine za neutralizaciju *Neutralization Solution*®, pri čemu nastaju netopive nakupine proteina i denaturiranih nukleinskih kiselina, i centrifugirana 5 minuta na maksimalnoj brzini.

Supernatant je nanesen na kolonu na čiju se membranu veže plazmidna DNA *Spin Column*® koja je umetnuta u epruvetu za sakupljanje *Collection Tube*®, sve se zajedno centrifugira 1 minutu na maksimalnoj brzini, nakon čega je filtrat odbačen, a kolona umetnuta u novu epruvetu za sakupljanje.

Plazmidna DNA vezana za kolonu u epruveti za sakupljanje isprana je dodatkom 750 µL otopine za ispiranje *Wash Solution*® i centrifugirana 1 minutu na maksimalnoj brzini, nakon čega je filtrat odbačen, a kolona umetnuta u novu epruvetu za sakupljanje, što se ponovi uz dodatak 250 µL otopine za ispiranje. Na kraju se sve još jednom centrifugira 2 minute na maksimalnoj brzini.

Kolona s vezanom plazmidnom DNA prebačena je u sterilnu Eppendorf epruvetu od 1,5 mL, pazeći da se ne prenese filtrat. U kolonu je dodano 100 µL vode bez nukleaza *Nuclease-Free Water*[®] i centrifugirano 1 minutu na maksimalnoj brzini. Kolona je odbačena, a DNA u Eppendorf epruveti pohranjena na temperaturu nižu od -20°C (Promega, 2009).

Izoliranim plazmidom transformiran je soj *E. coli* MC338.

3.6. TRANSFORMACIJA SOJA *E. coli* MC338 PLAZMIDOM pLK35

Stanice *E. coli* MC388 transformirane su plazmidom pLK35 s divljim tipom i mutiranim varijantama gena za 16S rRNA metodom s rubidijevim kloridom (Glover et al 1995).

3.6.1. Priprema kompetentnih stanica

3 mL tekućeg LB-medija inokulirano je bakterijskom kolonijom soja *E. coli* MC338 te inkubirano preko noći u zračnoj tresilici podešenoj na 37°C i 200 okretaja u minuti. Zasićena kultura razrijeđena je LB-medijem u omjeru 1:100 te je glavna kultura u istim uvjetima inkubirana do rane eksponencijalne faze, odnosno dok optička gustoća pri 600 nm nije dosegla vrijednost 0,375-0,500 (mjereno spektrofotometrom Ultrospec[®] 1000, Amersham Biosciences). Rast stanica zaustavljen je prebacivanjem kulture u ohlađenu plastičnu epruvetu (Falcon[®]) volumena 50 mL i držanjem na ledu 15 minuta.

Stanice su potom centrifugirane (15min, 4°C, 1000g, centrifuga: Jouan MR23i, *Thermo electron corporation*), supernatant odstranjen, a talog resuspendiran u 1/3 volumena hladnog pufera RF1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 30 mM KOAc, glicerol 15% w/v, pH 7,5). Potom su stanice inkubirane na ledu 2 h. Nakon taloženja centrifugiranjem (15min, 4°C, 1000g, centrifuga: Jouan MR23i, *Thermo electron corporation*), supernatant je odstranjen, a talog resuspendiran u 1/12,5 volumena hladnog pufera RF2 (10 mM RbCl, 70 mM CaCl₂, 10 mM MOPS, glicerol 15%

w/v, pH 6,8). Nakon inkubacije od 15 minuta na ledu, stanice su podijeljene u uzorke od 200 µL u prethodno ohlađene Eppendorf epruvete od 1,5 mL i pohranjene na -80°C do uporabe.

3.6.2. Transformacija

200 µL smrznutih kompetentnih stanica otopljeno je na sobnoj temperaturi i pomiješano s 1-2 µL plazmida pLK35 s divljim tipom i mutiranim varijantama gena za 16S rRNA. Nakon inkubacije od 20 minuta na ledu, smjesa je podvrgnuta toplinskom šoku na temperaturi 42°C u trajanju od 90 sekundi, nakon čega je odmah vraćena na led. U smjesu je dodano 800 µL SOC medija, nakon čega su stanice inkubirane 45 minuta u zračnoj tresilici podešenoj na 37°C i 200 okretaja u minuti. Po 200 µL kulture nanijeto je na ploče sa selektivnim krutim medijem LB s niskim udjelom soli, koji je opisan u poglavlju 3.3.5.

3.7. TRANSFORMACIJA SOJA *E. coli* MC338-pLK35 PLAZMIDOM pBBR1MCS-3-*rmtC*

Kompetentne stanice pripravljene su iz soja *E. coli* MC338 s plazmidom pLK35 koji sadrži divlji tip ili jednu od mutiranih varijanti (C1400U, C1409U, G1491U i G1491C) gena za 16S rRNA, na način kako je opisano u poglavlju 3.6.1. Kompetentne stanice transformirane su plazmidom pBBR1MCS-3 s genom za metil-transferazu RmtC (pBBR1MCS-3-*rmtC*) na način opisan u odjeljku 3.6.2.

3.8. UZGOJ BAKTERIJA ZA DOBIVANJE KRIVULJA RASTA

Za dobivanje krivulja rasta bakterija i generacijskih vremena, svi su uzorci načinjeni u dvije serije neovisnih mjerenja u triplikatu, radi optimiranja točnosti i reproducibilnosti rezultata. Jedna serija mjerenja sadrži:

- Uzorak kulture stanica *E. coli* MC338 transformiranih plazmidom pLK35 s divljim tipom gena za 16S rRNA (pLK35-wt, od *eng.* wild type, divlji tip);
- Četiri uzorka kulture stanica *E. coli* MC338 transformiranih plazmidom pLK35 koji sadrže mutiranu varijantu gena za 16S rRNA s jednom od točkastih mutacija C1400U, C1409U, G1491U ili G1491C;
- Uzorak kulture stanica *E. coli* MC338 plazmidom pLK35-wt i plazmidom pBBR1MCS-3*rmtC*;
- Četiri uzorka kulture stanica *E. coli* MC338 transformiranih plazmidom pLK35 koji sadrže mutiranu varijantu gena za 16S rRNA s jednom od točkastih mutacija (C1400U, C1409U, G1491U ili G1491C) i plazmidom pBBR1MCS-3*rmtC*.

Bakterije su inkubirane u LB-mediju s dodatkom antibiotika, na mikrotitarskim pločicama, u zračnoj tresilici podešenoj na 37°C i 200 okretaja u minuti. Noćne kulture uzgojene su u LB-mediju

- s dodatkom 100 mg/L ampicilina za stanice s plazmidom pLK35
- s dodatkom 100 mg/L ampicilina i 12,5 mg/L tetraciklina za stanice transformirane plazmidima pLK35 i pBBR1MCS-3.

Noćne kulture razrijeđene su u omjeru 1:10 i 250 µL je prebačeno u bunariće mikrotitarske pločice. Tablica 3.8. prikazuje shemu pokusa na mikrotitarskoj pločici.

Mikrotitarske pločice inkubirane su u zračnoj tresilici podešenoj na 37°C i 200 okretaja u minuti. Rast stanica praćen je spektrofotometrijski, mjerenjem optičke gustoće uzoraka na mikrotitarskoj pločici na valnoj duljini 600 nm svakih 30 minuta na čitaču mikrotitarskih pločica *Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer Life Sciences*.

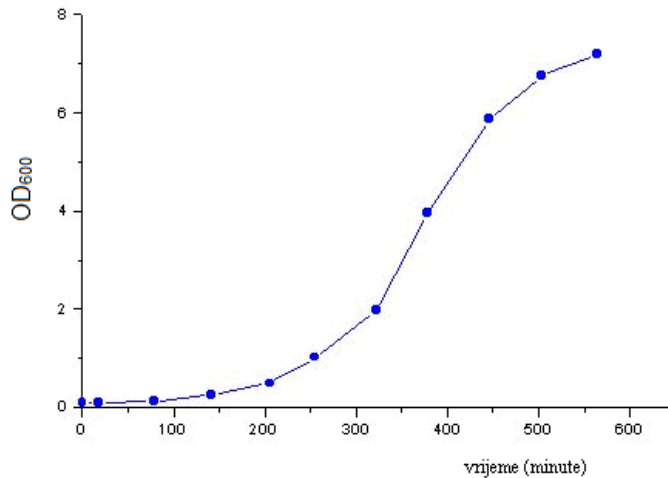
Porast izmjerene OD₆₀₀ odražava povećanje stanične mase u kulturi. Rast bakterija prati se sve dok OD₆₀₀ ne dosegne vrijednost koja upućuje na stacionarnu fazu razvoja kulture.

Tablica 3.8. Shema pokusa na mikrotitarskoj pločici; **M2** – soj *E. coli* MC338 s plazmidom pLK35 s genom za 16S rRNA koji sadrži mutaciju C1400U; **M8** – soj *E. coli* MC338 s plazmidom pLK35 s genom za 16S rRNA koji sadrži mutaciju C1409U; **M9** – soj *E. coli* MC338 s plazmidom pLK35 s genom za 16S rRNA koji sadrži mutaciju G1491U; **M10** – soj *E. coli* MC338 s plazmidom pLK35 s genom za 16S rRNA koji sadrži mutaciju G1491C; **WT** – soj *E. coli* MC338 s plazmidom pLK35 s divljim tipom gena za 16S rRNA; **M2rmtC** –M2 s plazmidom pBBR1MCS-3rmtC; **M8rmtC** –M8 s plazmidom pBBR1MCS-3rmtC; **M9rmtC** –M9 s plazmidom pBBR1MCS-3rmtC; **M10rmtC** –M10 s plazmidom pBBR1MCS-3rmtC; **WT rmtC** –WT s plazmidom pBBR1MCS-3rmtC; svi uzorci su u triplikatu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M2(1)	M2(2)	M2(3)	M8(1)	M8(2)	M8(3)	M9(1)	M9(2)	M9(3)			
B	M10(1)	M10(2)	M10(3)	WT(1)	WT(2)	WT(3)						
C												
D	M2rmtC (1)	M2rmtC (2)	M2rmtC (3)	M8rmtC (1)	M8rmtC (2)	M8rmtC (3)	M9rmtC (1)	M9rmtC (2)	M9rmtC (3)			
E	M10rmt C(1)	M10rmt C(2)	M10rmt C(3)	WT rmtC (1)	WT rmtC (2)	WT rmtC (3)						
F												
G												
H												

3.9. IZRADA KRIVULJE RASTA

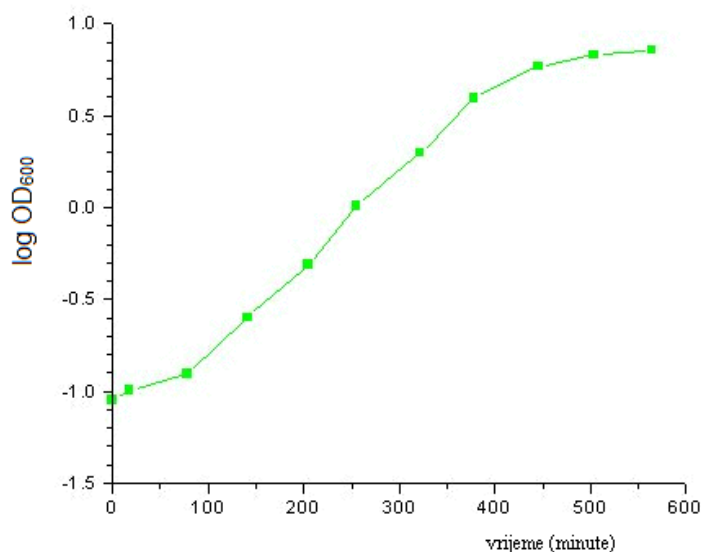
Krivulja rasta prikazuje kinetiku diobe bakterijske kulture, a predstavlja grafički prikaz parametra koji je ovisan o rastu i diobi, odnosno, broju stanica u nekoj bakterijskoj kulturi (u ovom slučaju to je optička gustoća bakterijske kulture izmjerena na 600nm, OD_{600}) u ovisnosti o vremenu. Na taj način dobije se sigmoidna krivulja (S-krivulja) rasta bakterijske kulture, kao što je prikazano na slici 3.9a (Marchetti, 1982).



Slika 3.9.a Sigmoidna krivulja rasta bakterijske populacije (preuzeto s www.mikeblaber.org)

Ako se vrijednosti na y-osi sigmoidne krivulje logaritmiraju i prikažu na logaritamskoj skali, središnji dio krivulje, koji predstavlja logaritamsku fazu rasta bakterija, postaje pravac. Konstruiranjem regresijskog pravca iz linearnog dijela dobiju se veličine koje opisuju rast bakterijske populacije pri određenim uvjetima. Logaritamsku krivulju rasta bakterijske populacije prikazuje slika 3.9.b (Marchetti, 1982).

Za vrijeme eksponencijalne (ili logaritamske) faze rasta bakterija, nagib regresijskog pravca je stopa prirasta bakterijske populacije u vremenu, a zove se *specifični prirast bakterija (k)*.



Slika 3.9.b Logaritamska krivulja rasta bakterijske populacije koja prikazuje linearizaciju eksponencijalne faze rasta bakterijske populacije (preuzeto s www.mikeblaber.org)

Generacijsko vrijeme bakterija iz kulture je vrijeme potrebno da se udvostruči broj stanica. Broj stanica (N) u trenutku t i broj stanica na početku (N_0) pokazuju eksponencijalnu ovisnost, uz konstantu k koja se naziva *specifični prirast bakterija*, prema sljedećoj jednadžbi:

$$N=N_0 \cdot 10^{kt} \tag{1}$$

Logaritmiranjem jednadžbe (1) dobije se:

$$\log(N)=\log(N_0)+kt \tag{2}$$

Za izračunavanje specifičnog prirasta bakterija k , potrebno je izlučiti k iz jednadžbe (2):

$$k = \frac{\log(N) - \log(N_0)}{t}$$

Generacijsko vrijeme je vrijeme u kojem se broj bakterija udvostruči, dakle $N=2N_0$, čijim se uvrštavanjem u jednadžbu (2) dobije izraz za vrijeme udvostručenja, odnosno generacijsko vrijeme (Marchetti, 1982):

$$\log(2)=\log(1) + kt$$

$$0,301 = kt$$

$$t=0,301/k$$

Na pokazani način iz grafa ovisnosti logaritma vrijednosti OD₆₀₀ o vremenu može se izračunati specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t . Iz navedenih vrijednosti može se procijeniti brzina rasta bakterija u kulturi.

3.10. ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE KANAMICINA

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) najmanja je koncentracija antibiotika koja sprječava rast bakterija, što se određuje mjerenjem optičke gustoće bakterijske kulture na 600nm (OD₆₀₀).

Određivanjem MIK kanamicina transformanata soja *E.coli* MC338 ispitan je utjecaj mutacija u mjestu A 16S rRNA na osjetljivost bakterija na kanamicin. MIK kanamicina određen je metodom razrjeđenja u tekućem LB mediju za sojeve *E. coli* MC338 transformirane plazmidom pLK35 s divljim tipom i mutiranim varijantama (C1400U, C1409U, G1491U ili G1491C) gena za 16S rRNA uz dodatak ampicilina u konačnoj koncentraciji 100 mg/L te za iste sojeve transformirane plazmidom pBBR1MCS-3-*rrmC* uz dodatak ampicilina u konačnoj koncentraciji 100 mg/L i tetraciklina u konačnoj koncentraciji 12,5 mg/L.

Noćne kulture priređene su inokulacijom iz glicerolnih kultura u tekući LB-medij s dodatkom antibiotika. Noćna kultura razrijeđena je u omjeru 1:100 svježim tekućim LB-medijem s odovarajućim antibioticima je glavna kultura inkubirana u zračnoj tresilici na 37°C i 200 okretaja u minuti sve dok optička gustoća mjerena na 600 nm nije dosegla vrijednost 0,800-1,000, odnosno do logaritamske faze rasta. 1 mL kulture *E. coli* pri OD₆₀₀=1 sadrži oko 5×10^8 stanica. Kanamicin se dodaje na mikrotitarsku pločicu u

konačnim koncentracijama pripremljenim serijskim razrjeđenjem redom: 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 i 1024 mg/L.

Koncentracija bakterijskih stanica mora biti oko 10^5 stanica u 200 μ L tekućeg LB-medija s antibioticima u bunariću mikrotitarske pločice. Uzorak noćne kulture uzgojene na $OD_{600}=0,800-1,000$ prenese se na mikrotitarsku pločicu u triplikatu za svaku odgovarajuću koncentraciju kanamicina, u dva neovisna mjerenja, tako da ukupni volumen u pojedinom bunariću bude 200 μ L. Uz to su načinjene i kontrola sterilnosti (LB-medij s ampicilinom), negativna kontrola (LB-medij s ampicilinom i najvećom koncentracijom kanamicina) te pozitivne kontrole za svaki od ispitanih sojeva (LB-medij s ampicilinom, odnosno ampicilinom i tetraciklinom te kulturom pojedinog soja). Shema pokusa za sojeve M2 (soj *E. coli* MC338 s plazmidom pLK35 s genom za 16S rRNA koji sadrži mutaciju C1400U) i M8 – soj *E. coli* MC338 s plazmidom pLK35 s genom za 16S rRNA koji sadrži mutaciju C1409U) prikazana je u tablici 3.10.

Mikrotitarska pločica inkubirana je 18h u zračnoj tresilici na 37°C i 200 okretaja u minuti, nakon čega je provjeren bakterijski rast mjerenjem optičke gustoće na 600 nm na čitaču *Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer Life Sciences*. MIK kanamicina određen je kao minimalna inhibitorna koncentracija kanamicina koja inhibira vidljiv rast bakterija (Wood i sur., 1995).

Tablica 3.10 Shematski prikaz mikrotitarske pločice s naznačenim koncentracijama kanamicina ($\mu\text{g/L}$) u pojedinom bunariću. M2 – soj *E. coli* MC338 s plazmidom pLK35 s genom za 16S rRNA koji sadrži mutaciju; M8 – soj *E. coli* MC338 s plazmidom pLK35 s genom za 16S rRNA koji sadrži mutaciju C1409U; I – kontrola sterilnosti (LB-medij s ampicilinom); II – negativna kontrola (LB-medij s ampicilinom i najvećom koncentracijom kanamicina); III – pozitivna kontrola (LB-medij s ampicilinom i kulturom M2); IV– pozitivna kontrola (LB-medij s ampicilinom i kulturom M8)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M2 0,5	M2 1	M2 2	M2 4	M2 8	M2 16	M2 32	M2 64	M2 128	M2 256	M2 512	M2 1024
B	M2 0,5	M2 1	M2 2	M2 4	M2 8	M2 16	M2 32	M2 64	M2 128	M2 256	M2 512	M2 1024
C	M2 0,5	M2 1	M2 2	M2 4	M2 8	M2 16	M2 32	M2 64	M2 128	M2 256	M2 512	M2 1024
D												
E	M8 0,5	M8 1	M8 2	M8 4	M8 8	M8 16	M8 32	M8 64	M8 128	M8 256	M8 512	M8 1024
F	M8 0,5	M8 1	M8 2	M8 4	M8 8	M8 16	M8 32	M8 64	M8 128	M8 256	M8 512	M8 1024
G	M8 0,5	M8 1	M8 2	M8 4	M8 8	M8 16	M8 32	M8 64	M8 128	M8 256	M8 512	M8 1024
H	I	II		III	IV							

4 REZULTATI

PCR-mutagenezom načinjene su mutacije C1400U, C1409U, G1491U i G1491C u genu za 16S rRNA na kalupu plazmida pLK35. Točnost mutageneze provjerena je sekvenciranjem Sangerovom dideoksi metodom te su rekombinantnim plazmidom pLK35 s divljim tipom i mutiranim varijantama gena za 16S rRNA transformirane stanice *E. coli* MC338. Utjecaj mutacija na bakterijski rast i rezistenciju na aminoglikozide analiziran je određivanjem generacijskog vremena minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina. Stanice *E. coli* MC388 koje proizvode divlji tip ili mutirane varijante ribosoma transformirane su i plazmidom pBBR1MCS-3*rmtC* koji kodira za metil-transferazu RmtC te je određivanjem generacijskog vremena minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina ispitan utjecaj mutacija na interakciju enzima RmtC s ribosomom.

4.1.CILJANA MUTAGENEZA

Za postizanje mutacije C1400U (M2), C1409U (M8), G1491U (M9) i G1491C (M10) u 16S rRNA korištena je metoda PCR-mutageneze uz uporabu komercijalno dostupnog kompleta. Nukleotidni slijed plazmidnih produkata određen je sekvenciranjem dideoksi metodom (Sanger i sur., 1977) pomoću komercijalnog servisa tvrtke Macrogen Inc. (Južna Koreja).

4.2.ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE KANAMICINA ZA SOJ *E. coli* MC388/pLK35 S DIVLJIM TIPOM I MUTIRANIM VARIJANTAMA GENA ZA 16S rRNA

Ranije opisanim postupkom izmjerene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za bakterije koje sadrže plazmid pLK35 s divljim tipom i mutiranim varijantama (M2, M8, M9, M10) gena za 16S rRNA. U bunariću u kojem je došlo do rasta bakterija dolazi do zamućenja, dok onaj u kojem nije došlo do rasta ostaje bistar. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.2.

Tablica 4.2. Minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina za bakterijske stanice *E. coli* MC338/pLK35.

<i>E. coli</i> MC338/pLK35	Minimalna inhibitorna koncentracija kanamicina (mg/L)
WT	2
C1400U (M2)	2
C1409U (M8)	32
G1491U (M9)	256
G1491C (M10)	256

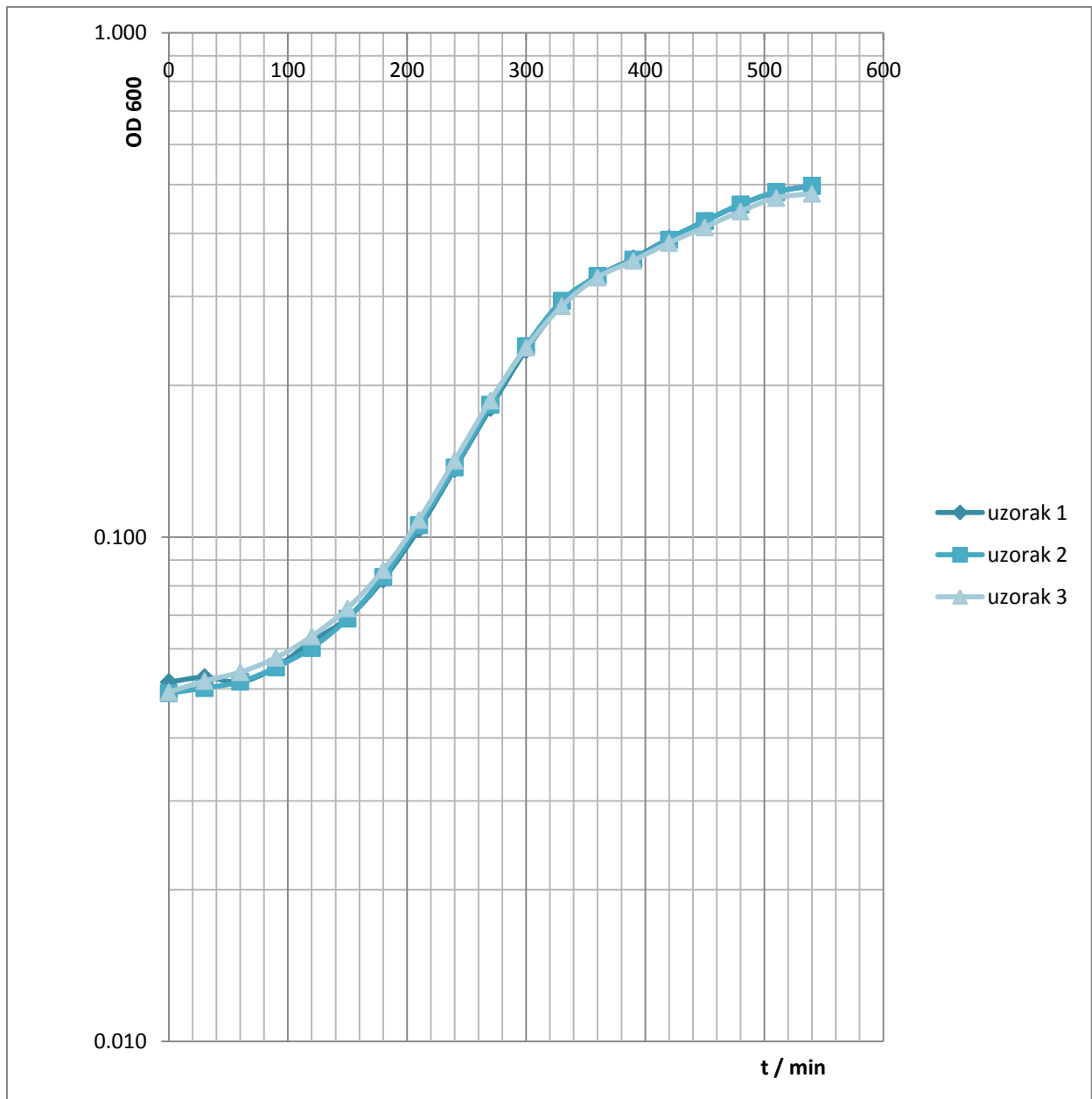
Mutacija C1400U ne dovodi do promjene MIK-a, dok se vrijednost za mutaciju C1409 malo povećala. Mutacije G1491U i G1491C dovode do nešto značajnijeg smanjenja osjetljivosti na kanamicin, što upućuje da ovi nukleotidi sudjeluju u tvorbi veznog mjesta za kanamicin na bakterijskom ribosomu.

4.3. RAST *E. coli* MC338 PRI 37°C U MEDIJU LB UZ DODATAK AMPICILINA

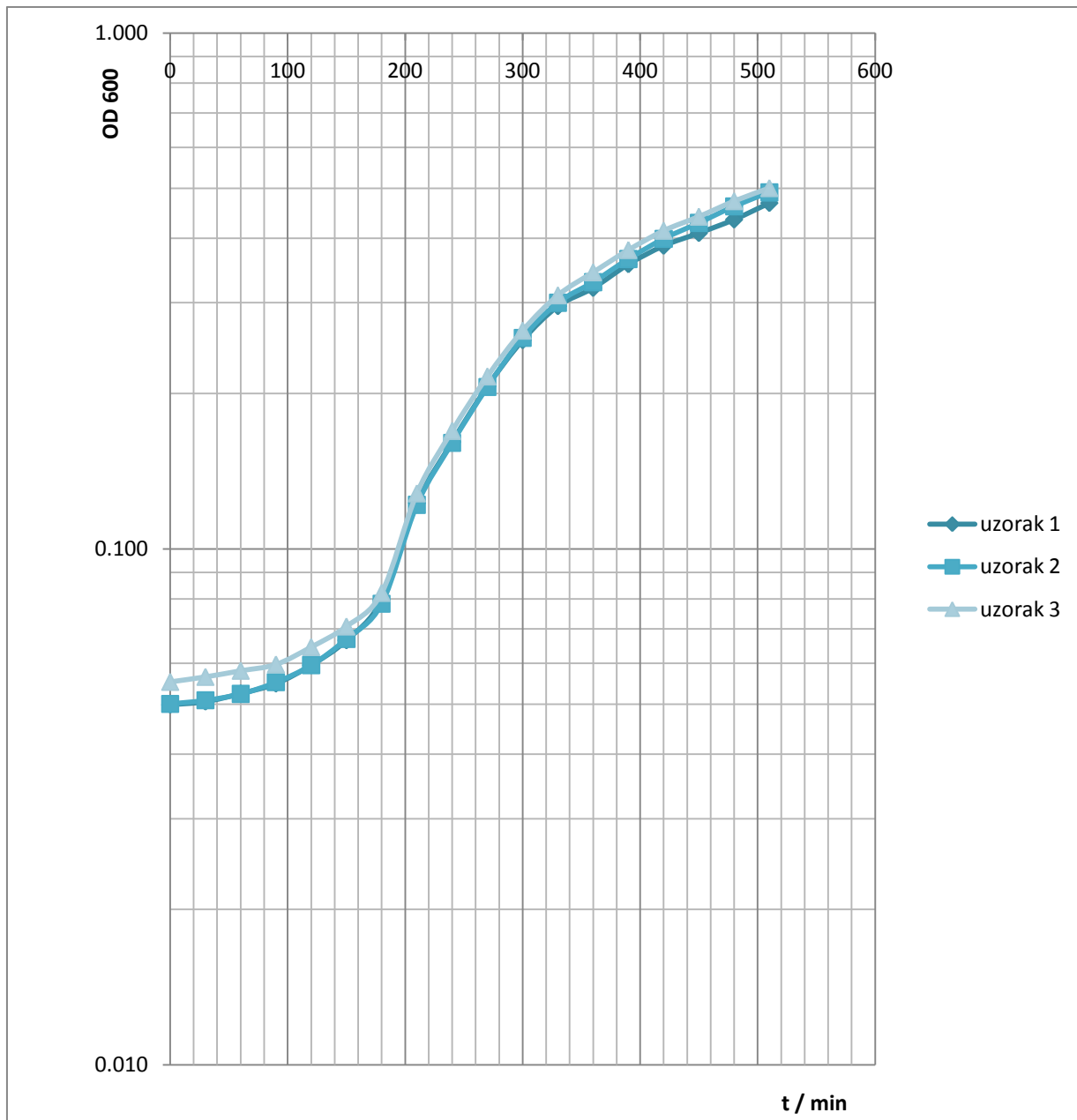
Brzina rasta bakterijskih stanica MC338 s mutacijom u A-mjestu 16S rRNA praćena je pri temperaturi 37°C u LB-mediju uz dodatak ampicilina u konačnoj koncentraciji 100 mg/L. Optička gustoća mjerena je na 600 nm svakih 30 minuta.

4.3.1. Rast stanica *E. coli* MC338/pLK35-wt

Rast bakterijskih stanica s divljim tipom plazmida praćen je mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm do vrijednosti redom za uzorke 1, 2 i 3 $OD_{600} = 0.497$, $OD_{600} = 0.497$, $OD_{600} = 0.480$ za prvo mjerenje uzoraka i $OD_{600} = 0.468$, $OD_{600} = 0.491$ i $OD_{600} = 0.500$ za drugo mjerenje uzorka. Iz dobivenih vrijednosti mjerenja izrađen je grafički prikaz logaritamskog oblika krivulje rasta za oba mjerenja uzoraka (Slika 4.3.1a i 4.3.1b) i pomoću njega izračunati su parametri *specifični prirast bakterija* k i *generacijsko vrijeme* t . Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 4.3.5.



Slika 4.3.1a. Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-wt za prvo mjerenje uzoraka u triplikatu.



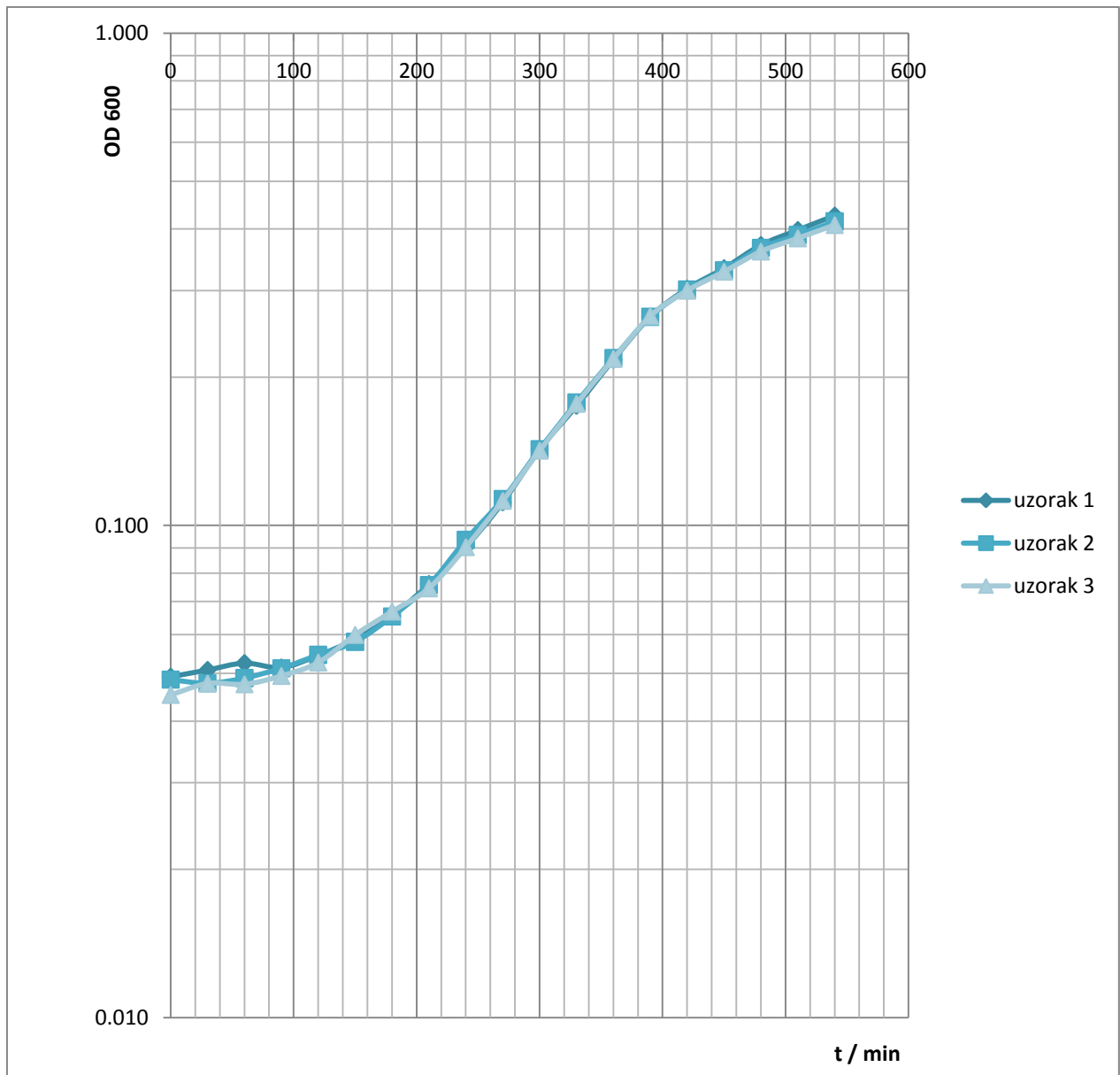
Slika 4.3.1b. Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-wt za drugo mjerenje uzoraka u triplikatu.

Tablica 4.3.1 *Specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t za uzorke bakterija MC338/pLK35-wt.*

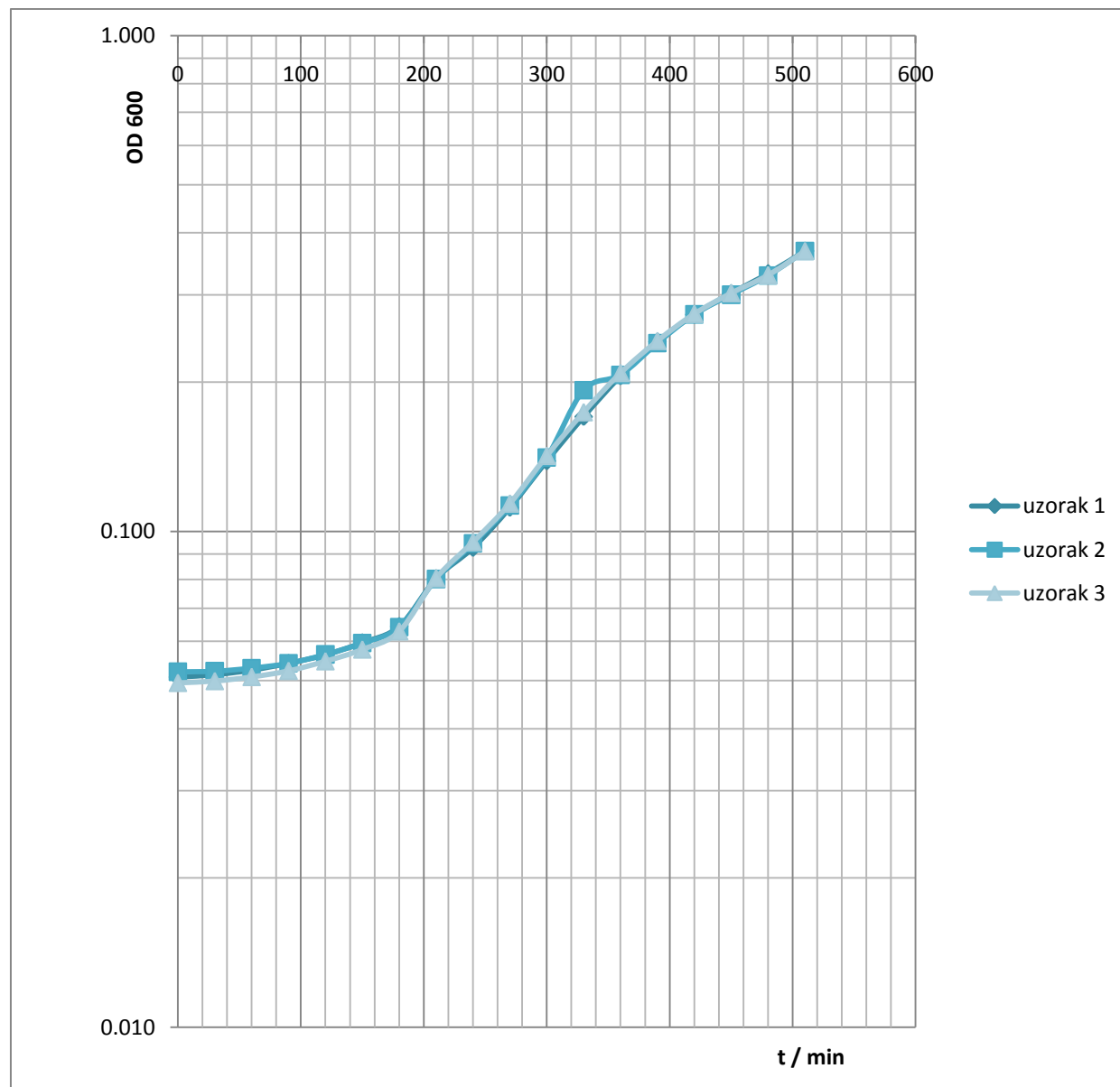
MC338/pLK35- wt	$k (x10^{-3}) /$ min^{-1}	t/min	Srednja vrijednost mjerjenja / min	Rezultat / min
1.	0.003795	79.31		
2.	0.003794	79.33	79.61	
3.	0.003753	80.20		79.56
4.	0.003769	79.87		
5.	0.003808	79.04	79.54	
6.	0.003777	79.70		

4.3.2. Rast stanica *E. coli* MC338/pLK-35-C1400U – M2

Rast bakterijskih stanica s mutacijom C1400U u genu za 16S rRNA praćen je mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm do vrijednosti redom za uzorke 1, 2 i 3 $OD_{600} = 0.411$, $OD_{600} = 0.402$, $OD_{600} = 0.391$ za prvo mjerenje uzoraka i $OD_{600} = 0.368$ $OD_{600} = 0.368$ i $OD_{600} = 0.368$ za drugo mjerenje uzorka. Iz dobivenih vrijednosti mjerenja izrađen je grafički prikaz logaritamskog oblika krivulje rasta za oba mjerenja uzoraka (Slika 4.3.2a i 4.3.2b) i pomoću njega izračunati su parametri *specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t*. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 4.3.2.



Slika 4.3.2a. Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-C1400U za prvo mjerenje uzoraka u triplikatu.



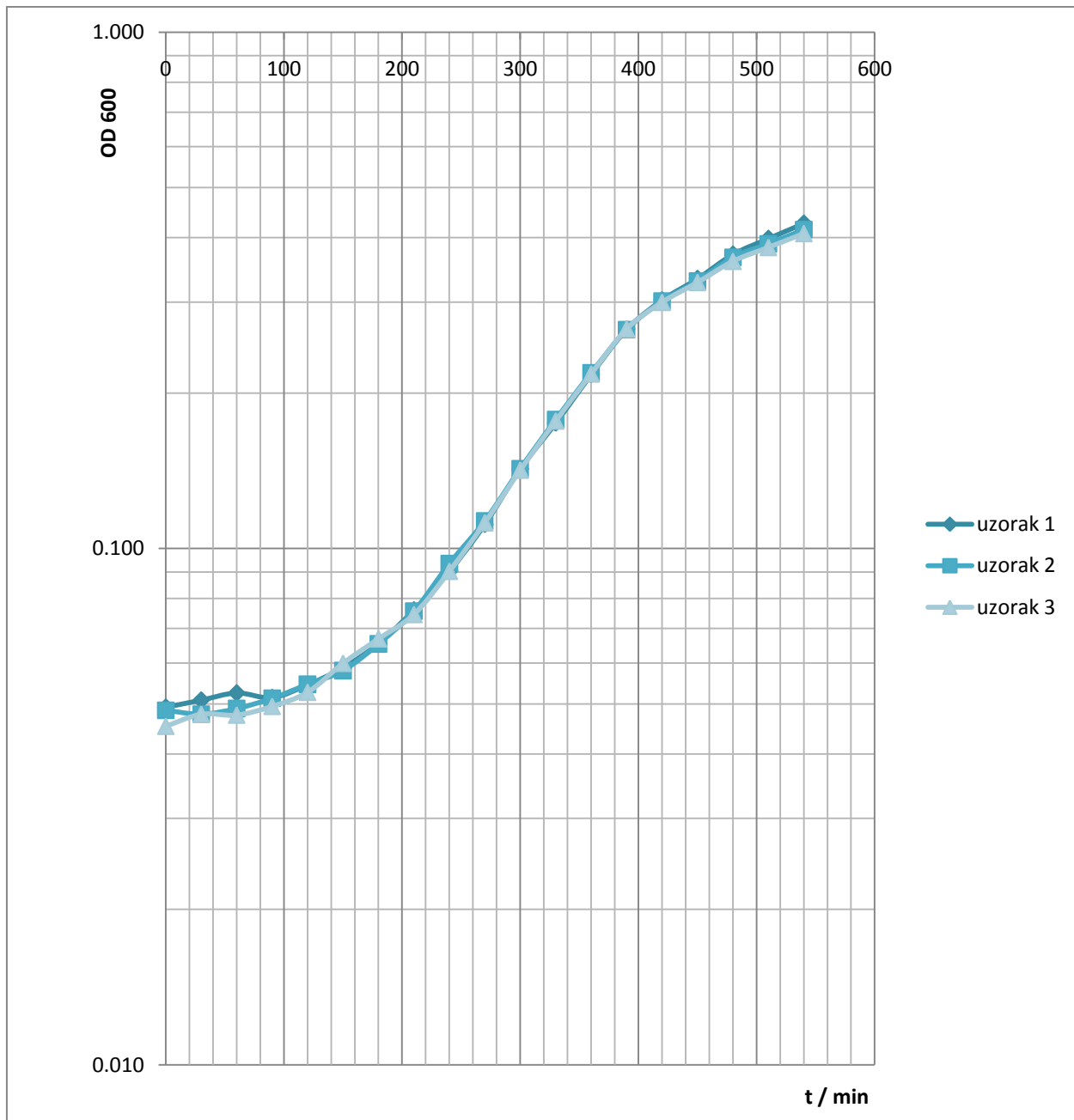
Slika 4.3.2b. Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-C1400U za drugo mjerenje uzoraka u triplikatu.

Tablica 4.3.2. *Specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t za uzorke bakterija MC338/pLK35-C1400U*

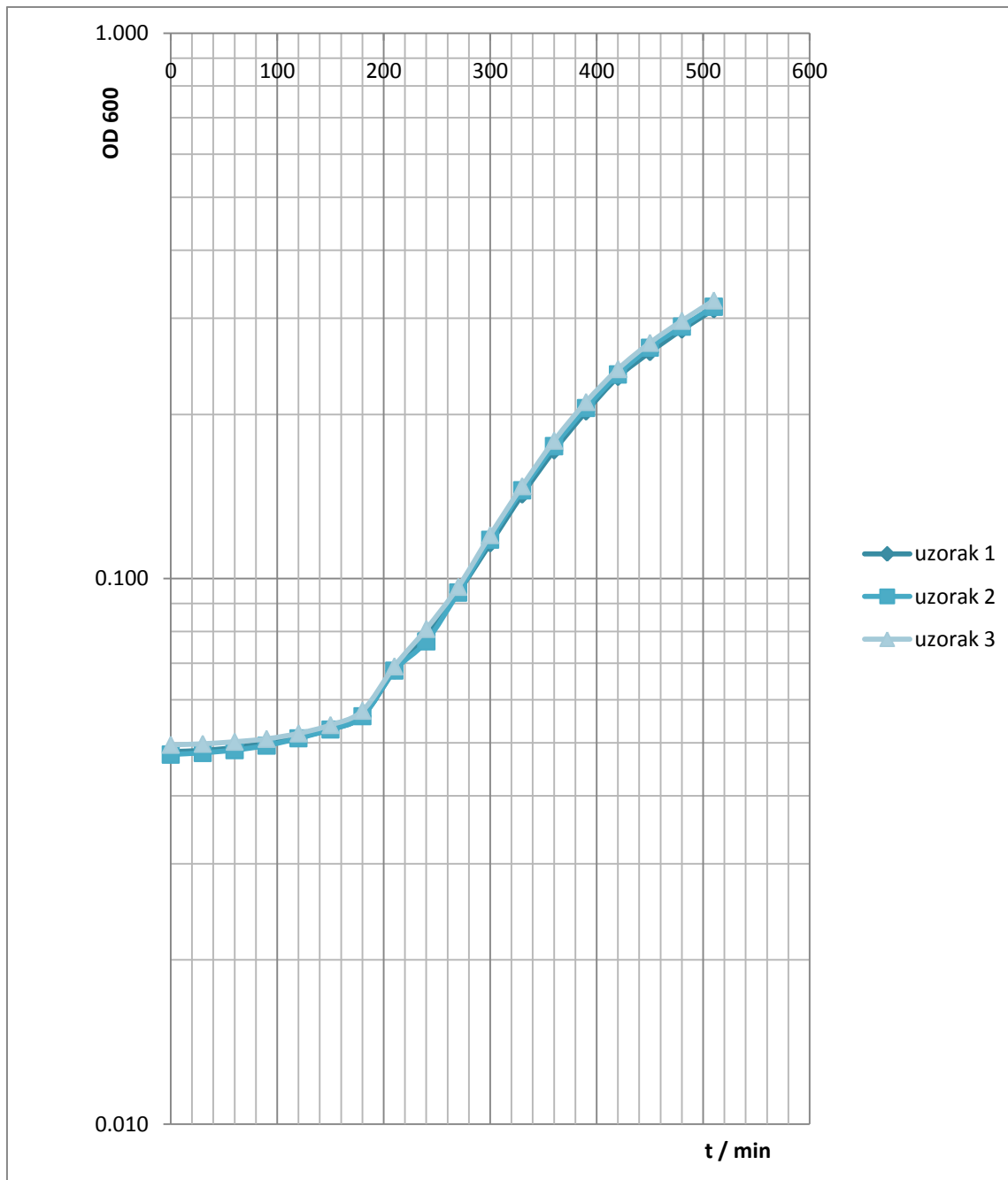
MC338/pLK35-C1400U	k (x10⁻³) / min⁻¹	t/min	Srednja vrijednost mjerenja / min	Rezultat / min
1.	0.002908	103.51		
2.	0.002958	101.77	101.81	
3.	0.003005	100.16		101.05
4.	0.003054	98.56		
5.	0.002886	104.28	100.28	
6.	0.003072	98.00		

4.3.3. Rast stanica *E. coli* MC338/pLK35-C1409U – M8

Rast bakterijskih stanica s mutacijom C1409U u genu za 16S rRNA praćen je mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm do vrijednosti redom za uzorke 1, 2 i 3 $OD_{600} = 0.398$, $OD_{600} = 0.389$, $OD_{600} = 0.383$ za prvo mjerenje uzoraka i $OD_{600} = 0.311$ $OD_{600} = 0.315$ i $OD_{600} = 0.324$ za drugo mjerenje uzorka. Iz dobivenih vrijednosti mjerenja izrađen je grafički prikaz logaritamskog oblika krivulje rasta za oba mjerenja uzoraka (Slika 4.3.3a i 4.3.3b) i pomoću njega izračunati su parametri *specifični prirast bakterija k* i *generacijsko vrijeme t*. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 4.3.3.



Slika 4.3.3a. Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-C1409U za prvo mjerenje uzoraka u triplikatu.



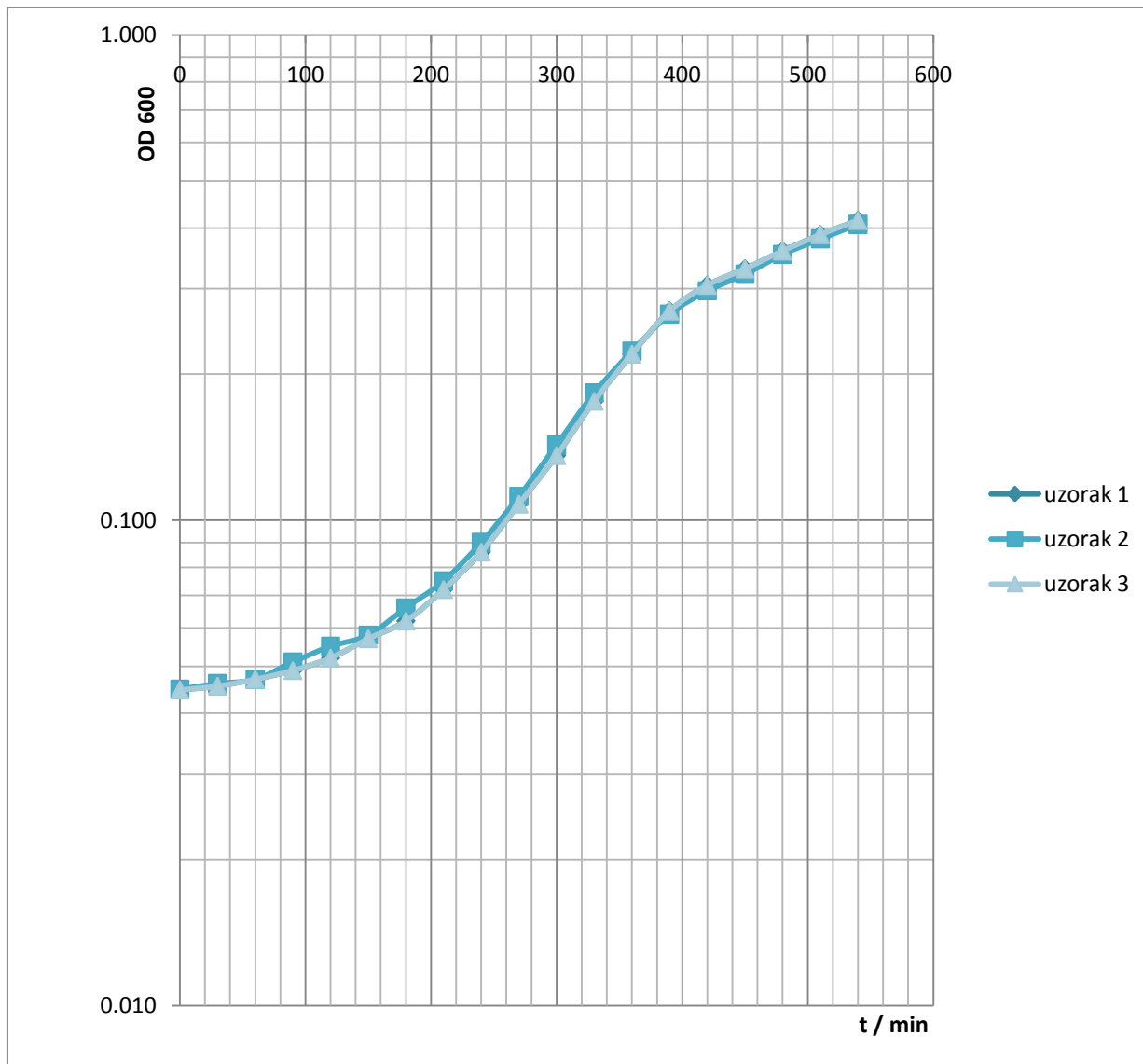
Slika 4.3.3b. Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-C1409U za drugo mjerenje uzoraka u triplikatu.

Tablica 4.3.3. *Specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t za uzorke bakterija MC338/pLK35-C1409U.*

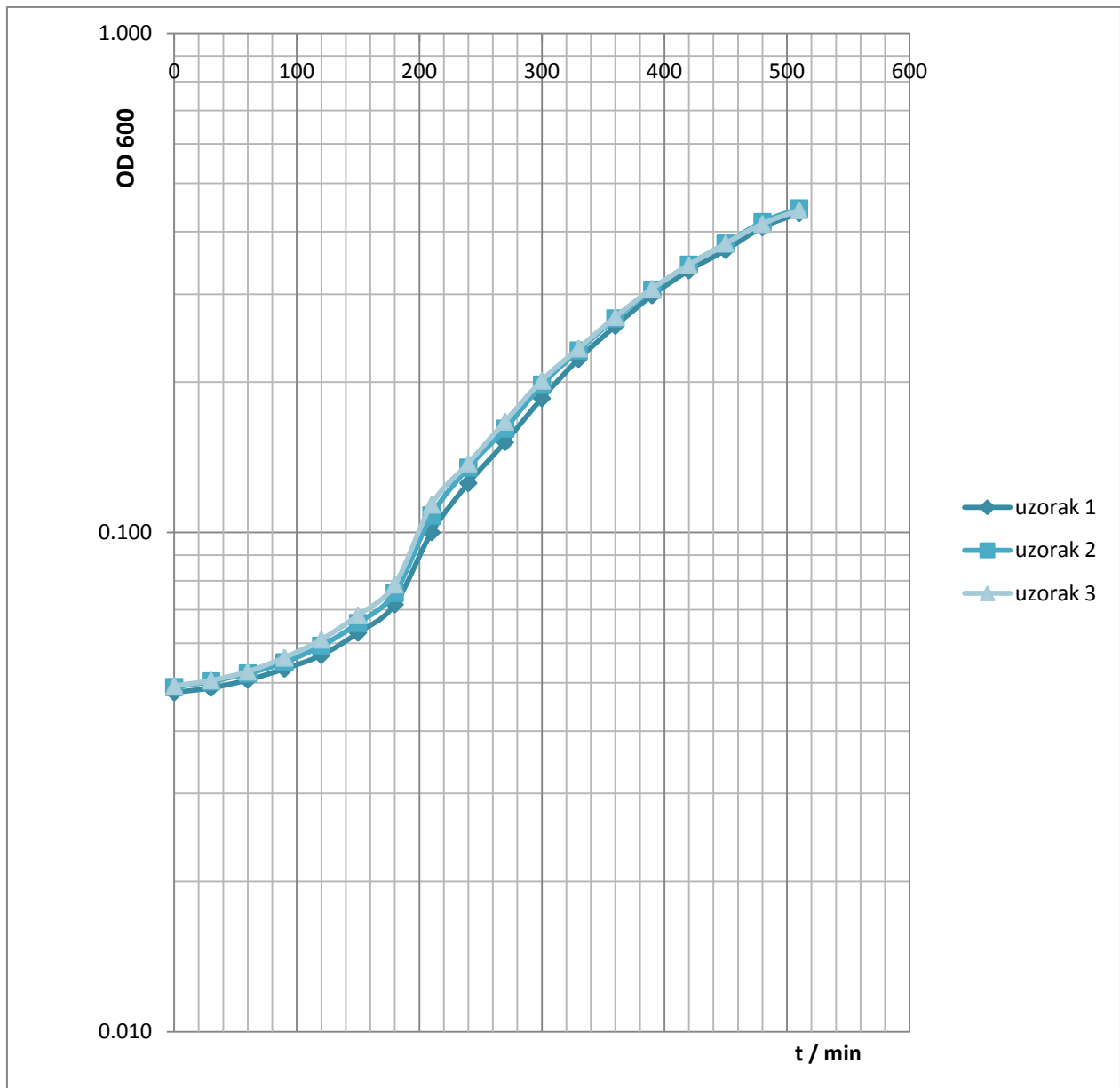
MC338/pLK35-C1409U	$k (x10^{-3}) / \text{min}^{-1}$	t/min	Srednja vrijednost mjerenja / min	Rezultat / min
1.	0.003197	94.14		
2.	0.003183	94.55	94.24	
3.	0.003201	94.04		96.31
4.	0.002980	101.02		
5.	0.003125	96.31	98.38	
6.	0.003077	97.82		

4.3.4. Rast stanica *E. coli* MC338/pLK35-G1491U – M9

Rast bakterijskih stanica s mutacijom G1491U u genu za 16S rRNA praćen je mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm do vrijednosti redom za uzorke 1, 2 i 3 $OD_{600} = 0.415$, $OD_{600} = 0.407$, $OD_{600} = 0.417$ za prvo mjerenje uzoraka i $OD_{600} = 0.436$ $OD_{600} = 0.445$ i $OD_{600} = 0.442$ za drugo mjerenje uzorka. Iz dobivenih vrijednosti mjerenja izrađen je grafički prikaz logaritamskog oblika krivulje rasta za oba mjerenja uzoraka (Slika 4.3.4a i 4.3.4b) i pomoću njega izračunati su parametri *specifični prirast bakterija k* i *generacijsko vrijeme t*. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 4.3.4.



Slika 4.3.4a. Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-G1491U za prvo mjerenje uzoraka u triplikatu.



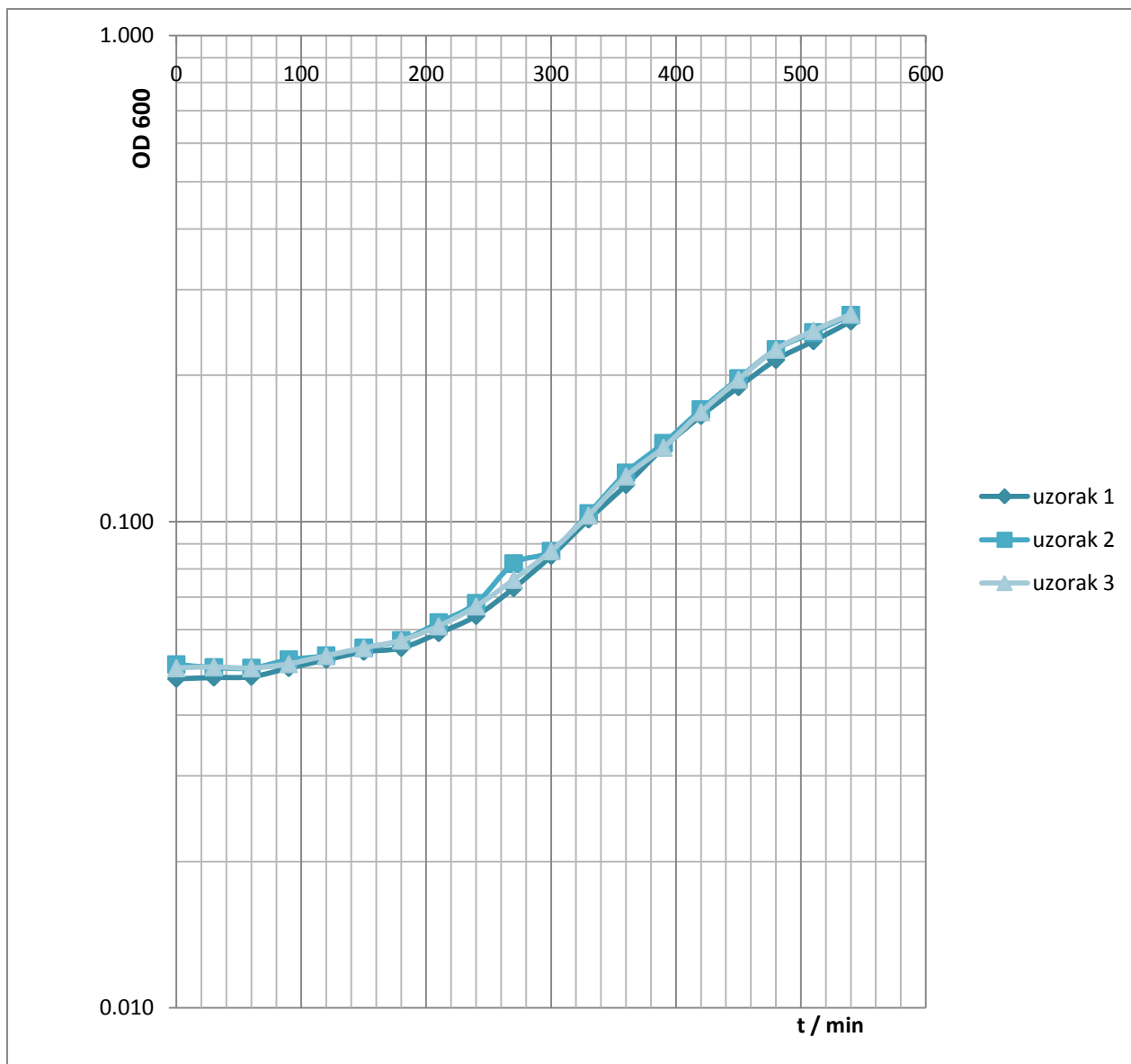
Slika 4.3.4b. Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-G1491U za drugo mjerenje uzoraka u triplikatu.

Tablica 4.3.4 *Specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t za uzorke bakterija MC338/pLK35-G1491U.*

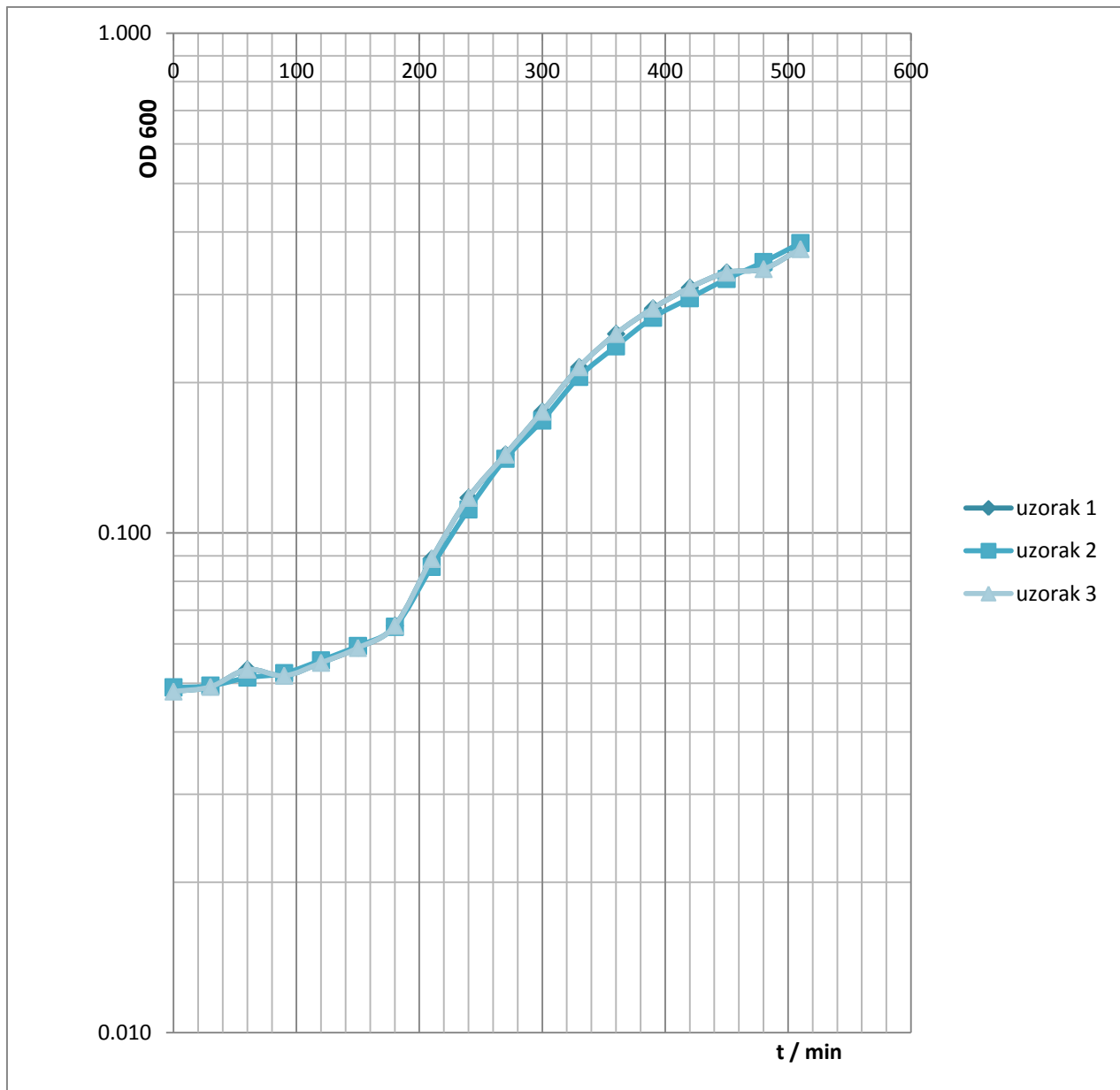
MC338/pLK35- G1491U	$k (x10^{-3}) /$ min^{-1}	t/min	Srednja vrijednost mjerjenja / min	Rezultat / min
1.	0.003317	90.74		
2.	0.003352	89.81	94.08	
3.	0.00296	101.7		104.91
4.	0.002774	108.52		
5.	0.002607	115.45	115.73	
6.	0.002443	123.20		

4.3.5. Rast stanica *E. coli* MC338/pLK35-G1491C – M10

Rast bakterijskih stanica s mutacijom G1491C u genu za 16S rRNA praćen je mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm do vrijednosti redom za uzorke 1, 2 i 3 $OD_{600} = 0.258$, $OD_{600} = 0.266$, $OD_{600} = 0.267$ za prvo mjerenje uzoraka i $OD_{600} = 0.370$ $OD_{600} = 0.380$ i $OD_{600} = 0.369$ za drugo mjerenje uzorka. Iz dobivenih vrijednosti mjerenja izrađen je grafički prikaz logaritamskog oblika krivulje rasta za oba mjerenja uzoraka (Slika 4.3.5a i 4.3.5b) i pomoću njega izračunati su parametri *specifični prirast bakterija k* i *generacijsko vrijeme t*. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 4.3.5.



Slika 4.3.5a. Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-G1491C za prvo mjerenje uzoraka u triplikatu.



Slika 4.3.5b. Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-G1491C za drugo mjerenje uzoraka u triplikatu.

Tablica 4.3.5 *Specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t za uzorke bakterija MC338/pLK35-G1491C.*

MC338/pLK35-G1491C	k (x10⁻³) / min⁻¹	t/min	Srednja vrijednost mjerenja / min	Rezultat / min
1.	0.002435	123.59		
2.	0.002681	112.28	117.74	
3.	0.002565	117.35		111.51
4.	0.002914	103.28		
5.	0.00273	110.25	105.28	
6.	0.002942	102.31		

Rezultati, prikazani u tablici 4.3., pokazuju da nema velike razlike u generacijskim vremenima među mutantima, dok divlji tip raste nešto brže. S obzirom da je regija 1400 do 1500 16S rRNA uključena u stabilizaciju interakcija mRNA i tRNA kao i interakcija mRNA s ribosomom pretpostavljeno je da će mutacije unutar ove regije dovesti do pogrešaka u translaciji te tako usporiti rast bakterija. Dobiveni rezultati pokazuju da zamjena baza na položajima 1400, 1409 i 1491 ipak ne narušava funkcionalnost dekodirajućeg centra ribosoma, barem ne u toj mjeri koja ne bi mogla biti kompenzirana normalnom aktivnošću ostalih regija 16S rRNA uključenih u pravilno prepoznavanje kodona i antikodona u A- i P-mjestu ribosoma.

Tablica 4.3 Usporedba generacijskih vremena mutanata stanica *E. coli* MC338.

t/min	<i>E. coli</i> MC338/pLK35
wt	79.56
C1400U (M2)	101.05
C1409U (M8)	96.31
G1491U (M9)	104.91
G1491C (M10)	111.51

4.4. ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE KANAMICINA ZA SOJ *E. coli* MC388/pLK35 S DIVLJIM TIPOM I MUTIRANIM VARIJANTAMA GENA ZA 16S rRNA I PLAZMIDOM pBBR1MCS-3*rmtC*

Izmjerene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za bakterije koje sadrže plazmid pLK35 s divljim tipom i mutiranim varijantama (C1400U (M2), C1409U (M8), G1491U (M9) i G1491C (M10) gena za 16S rRNA i plazmid za ekspresiju metil-transferaze RmtC, pBBR1MCS-3*rmtC*. U bunariću u kojem je došlo do rasta bakterija dolazi do zamućenja dok onaj u kojem nije došlo do rasta ostaje bistar.

Tablica 4.4 Minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina za bakterijske stanice *E. coli* MC338/pLK35/ pBBR1MCS-3*rmtC*.

<i>E. coli</i> MC33/pLK35 / pBBR1MCS-3 <i>rmtC</i>	Minimalna inhibitorna koncentracija kanamicina (mg/L)
wtrmtC	1024
M2rmtC	2
M8rmtC	1024
M9rmtC	1024
M10rmtC	1024

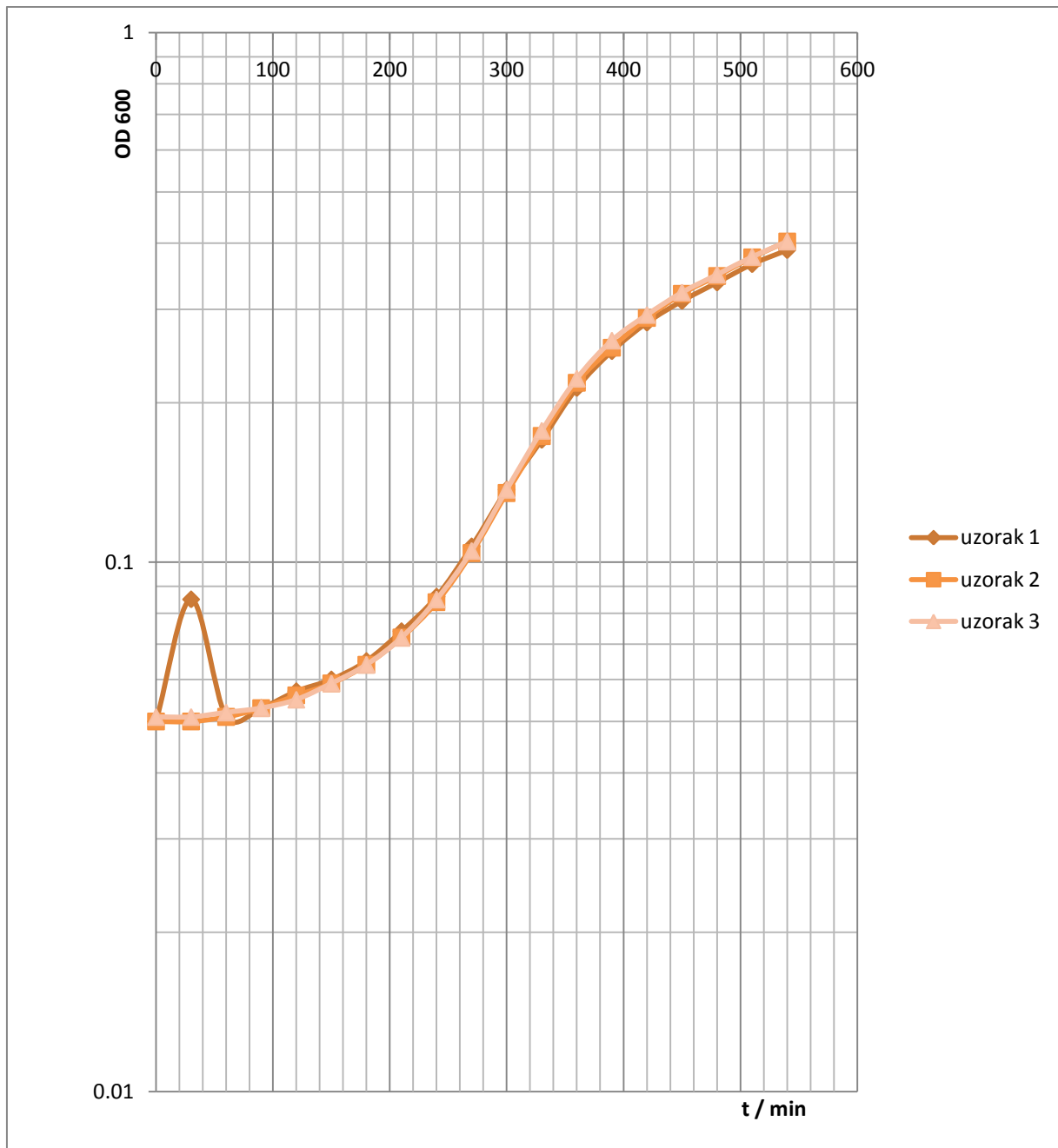
Uvođenje gena za metil-transferazu RmtC u stanice koje proizvode ribosome divljeg tipa i one s mutacijom dovodi do visoke otpornosti na kanamicin (MIK=1024 mg/L) kod svih stanica osim kod onih koje proizvode ribosome s mutacijom C1400U gdje osjetljivost ostaje nepromijenjena u odnosu na iste stanice bez metil-transferaze RmtC. To daje naznaku da je citozin na položaju 1400 u 16S rRNA uključen u interakcije enzima RmtC s bakterijskim ribosomom.

4.5. ODREĐIVANJE KRIVULJA RASTA ZA SOJ *E. coli* MC388/pLK35 S DIVLJIM TIPOM I MUTIRANIM VARIJANTAMA GENA ZA 16S rRNA I PLAZMIDOM pBBR1MCS-3rmtC

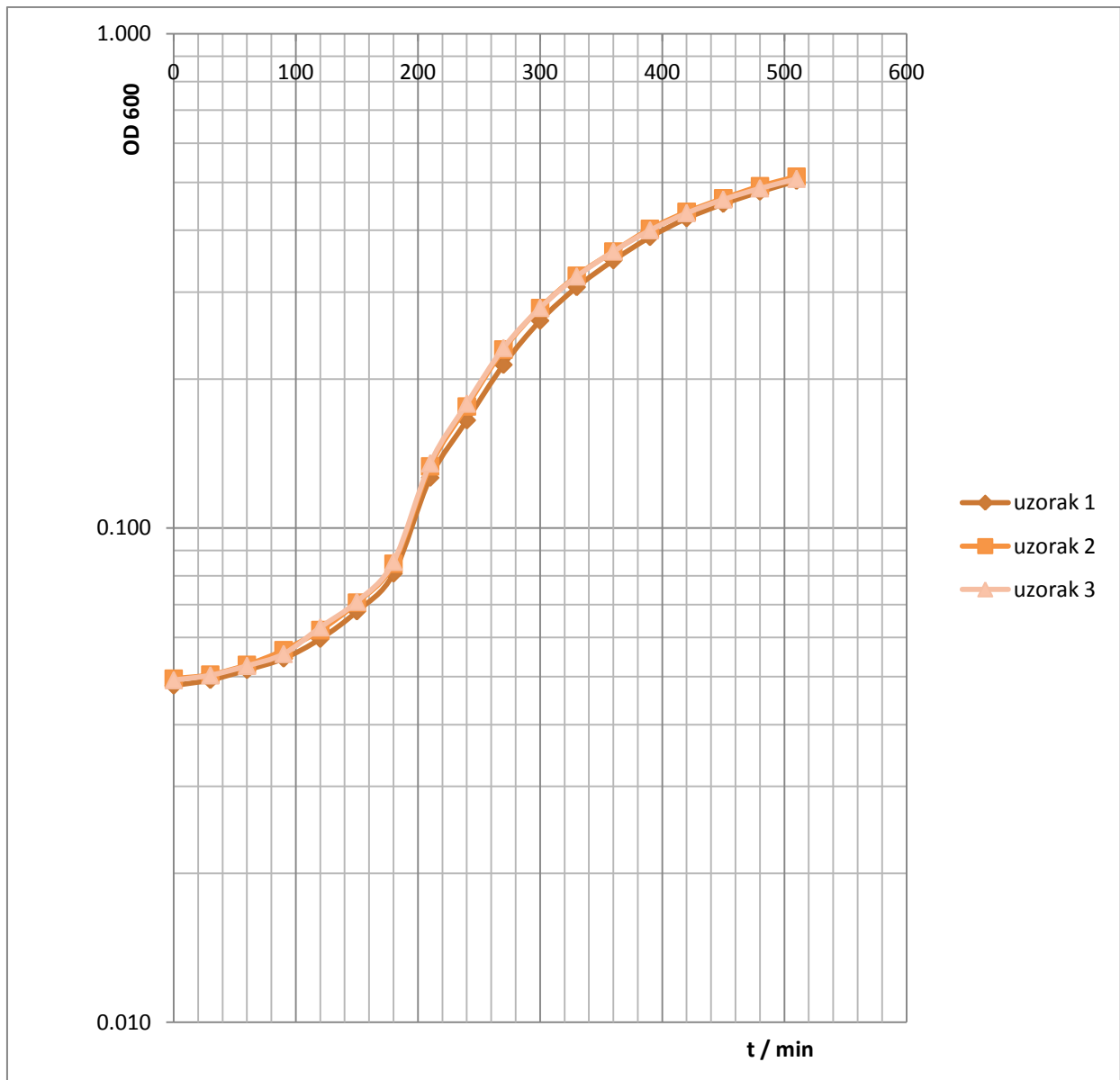
Brzina rasta bakterijskih stanica *E. coli* MC338 s divljim tipom, odnosno s mutacijom u A-mjestu 16S rRNA transformirane plazmidom pBBR1MCS-3rmtC s genom za metil-transferazu RmtC praćena je pri temperaturi 37°C u LB mediju uz dodatak ampicilina u konačnoj koncentraciji 100 mg/L i tetraciklina u konačnoj koncentraciji 12,5 mg/L . Optička gustoća mjerena je na 600 nm svakih 30 minuta.

4.5.1. Rast stanica *E. coli* MC338/pLK35-wt/ pBBR1MCS-3rmtC

Rast bakterijskih stanica s divljim tipom plazmida pLK-35 i s plazmidom pBBR1MCS-3rmtC praćen je mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm do vrijednosti redom za uzorke 1, 2 i 3 $OD_{600} = 0.388$, $OD_{600} = 0.403$, $OD_{600} = 0.403$ za prvo mjerenje uzoraka i $OD_{600} = 0.504$, $OD_{600} = 0.514$ i $OD_{600} = 0.509$ za drugo mjerenje uzorka. Iz dobivenih vrijednosti mjerenja izrađen je grafički prikaz logaritamskog oblika krivulje rasta za oba mjerenja uzoraka (Slika 4.5.1a i 4.5.1b) i pomoću njega izračunati su parametri *specifični prirast bakterija* k i *generacijsko vrijeme* t . Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 4.5.1.



Slika 4.5.1a Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-wt/ pBBR1MCS-3rmtC za prvo mjerenje uzoraka u triplikatu.



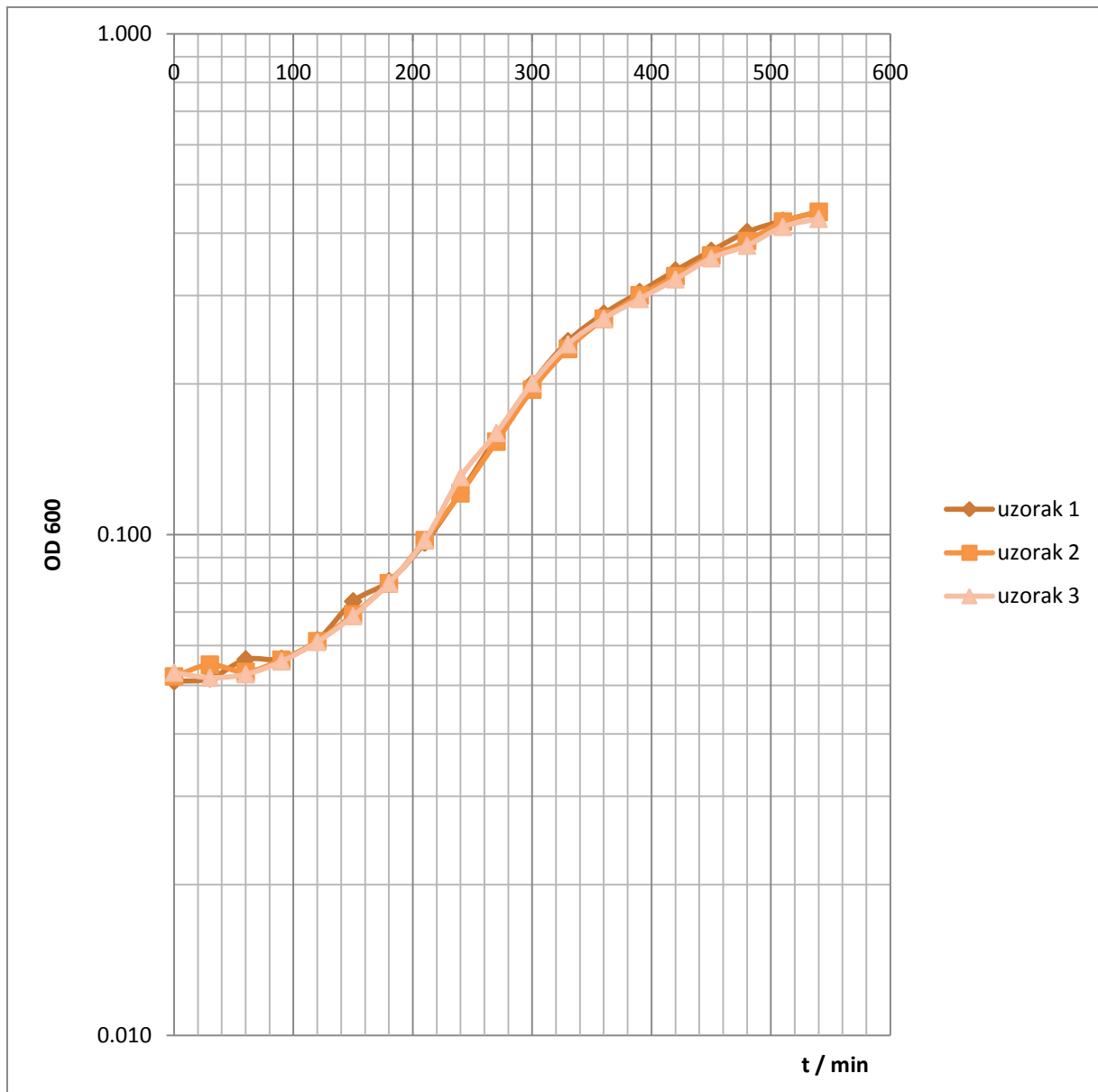
Slika 4.5.1b Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-wt/ pBBR1MCS-3*rmtC* za drugo mjerenje uzoraka u triplikatu.

Tablica 4.5.1 *Specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t za uzorke bakterija MC338/pLK35-wt/ pBBR1MCS-3rmtC.*

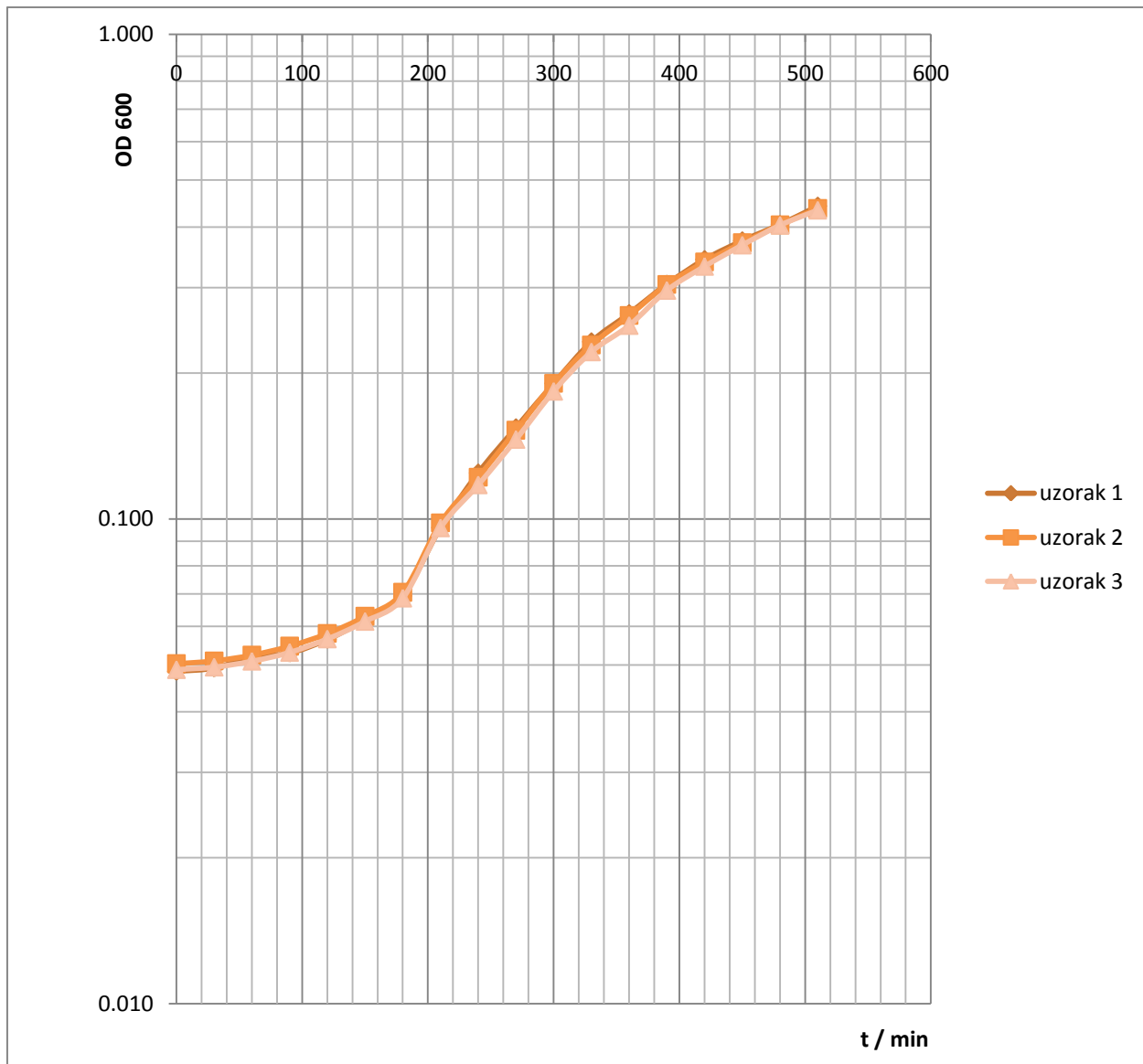
MC338/pLK35-wt/ pBBR1MCS-3rmtC	$k (x10^{-3}) / \text{min}^{-1}$	t/min	Srednja vrijednost mjerenja / min	Rezultat / min
1.	0.003351	89.82		
2.	0.003684	81.72	83.72	
3.	0.00378	79.64		80.67
4.	0.003808	79.05		
5.	0.003937	76.45	77.61	
6.	0.003892	77.33		

4.5.2. Rast stanica *E. coli* MC338/pLK35-C1400U-M2/ pBBR1MCS-3rmtC

Rast bakterijskih stanica s mutacijom C1400U u genu za 16S rRNA i s plazmidom pBBR1MCS-3rmtC praćen je mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm do vrijednosti redom za uzorke 1, 2 i 3 $OD_{600} = 0.441$, $OD_{600} = 0.441$, $OD_{600} = 0.427$ za prvo mjerenje uzoraka i $OD_{600} = 0.442$ $OD_{600} = 0.437$ i $OD_{600} = 0.434$ za drugo mjerenje uzorka. Iz dobivenih vrijednosti mjerenja izrađen je grafički prikaz logaritamskog oblika krivulje rasta za oba mjerenja uzoraka (Slika 4.5.2a i 4.5.2b) i pomoću njega izračunati su parametri *specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t*. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 4.5.2.



Slika 4.5.2a Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-C1400U/pBBR1MCS-3*rmtC* za prvo mjerenje uzoraka u triplicatu.



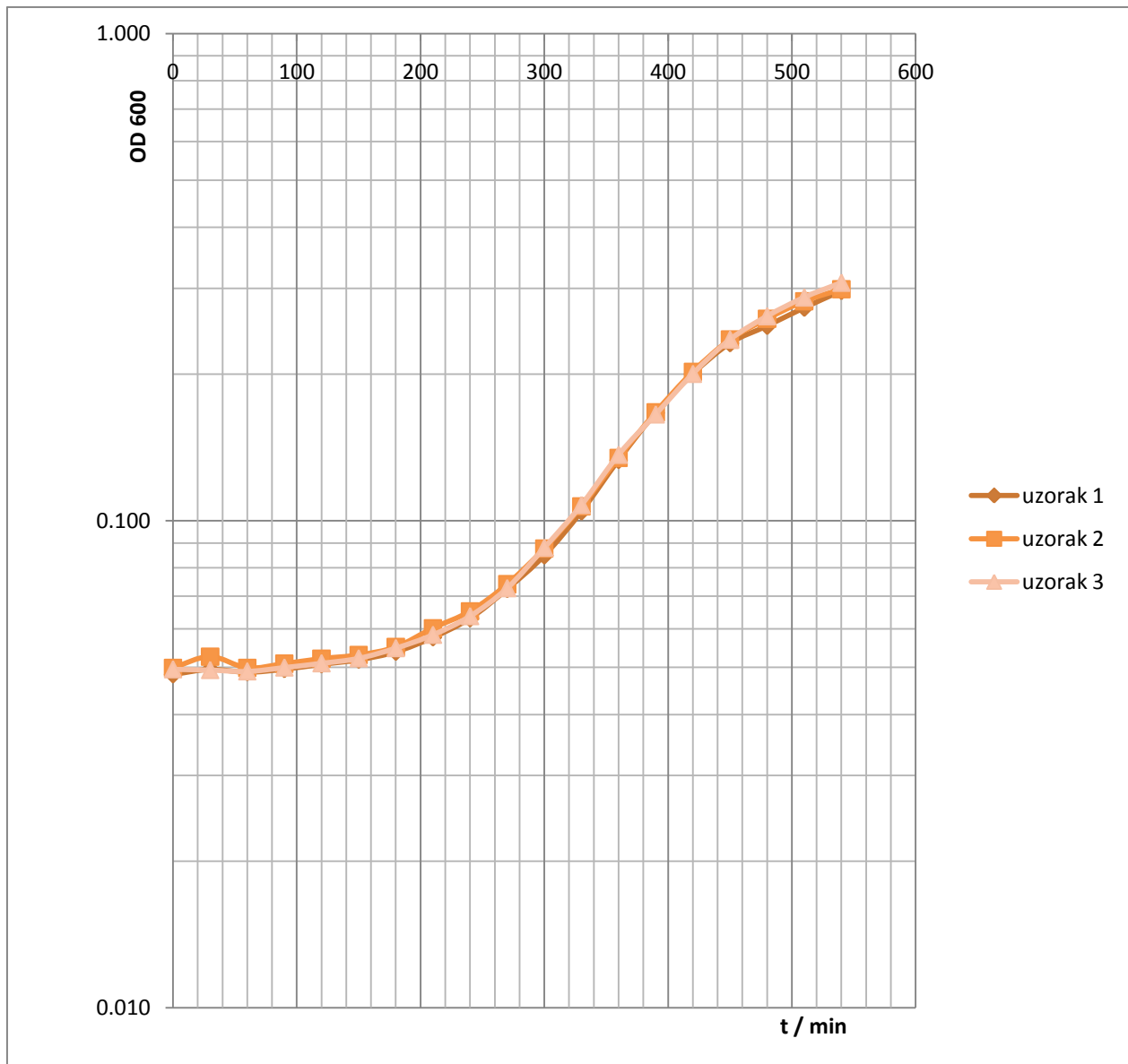
Slika 4.5.2b Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-C1400U/pBBR1MCS-3*rmtC* za drugo mjerenje uzoraka u triplikatu.

Tablica 4.5.2. *Specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t za uzorke bakterija MC338/pLK35-C1400U/ pBBR1MCS-3rmtC.*

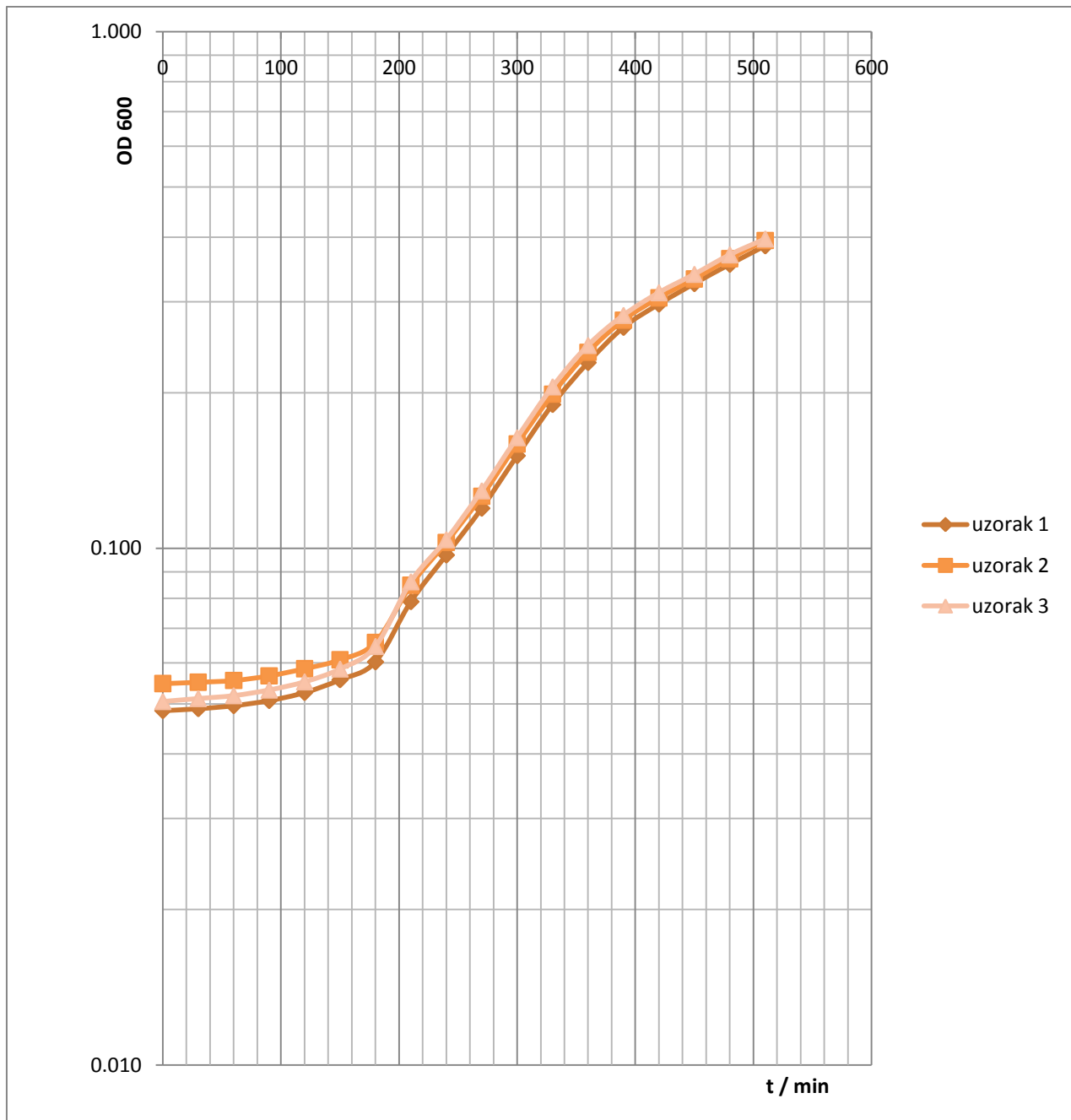
MC338/pLK35-C1400U/ pBBR1MCS-3rmtC	k ($\times 10^{-3}$) / min⁻¹	t/min	Srednja vrijednost mjerjenja / min	Rezultat / min
1.	0.003379	89.087		
2.	0.003233	93.09	92.86	
3.	0.003123	96.38		92.16
4.	0.003435	87.63		
5.	0.003231	93.16	91.45	
6.	0.003218	93.55		

4.5.3. Rast stanica *E. coli* MC338/pLK35-C1409U-M8/ pBBR1MCS-3rmtC

Rast bakterijskih stanica s mutacijom C1409U u genu za 16S rRNA i s plazmidom pBBR1MCS-3rmtC praćen je mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm do vrijednosti redom za uzorke 1, 2 i 3 $OD_{600} = 0.296$, $OD_{600} = 0.299$, $OD_{600} = 0.308$ za prvo mjerenje uzoraka i $OD_{600} = 0.385$, $OD_{600} = 0.394$ i $OD_{600} = 0.397$ za drugo mjerenje uzorka. Iz dobivenih vrijednosti mjerenja izrađen je grafički prikaz logaritamskog oblika krivulje rasta za oba mjerenja uzoraka (Slika 4.5.3a i 4.5.3b) i pomoću njega izračunati su parametri *specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t*. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 4.5.3.



Slika 4.5.3a Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-C1409U/pBBR1MCS-3*mtC* za prvo mjerenje uzoraka u triplikatu.



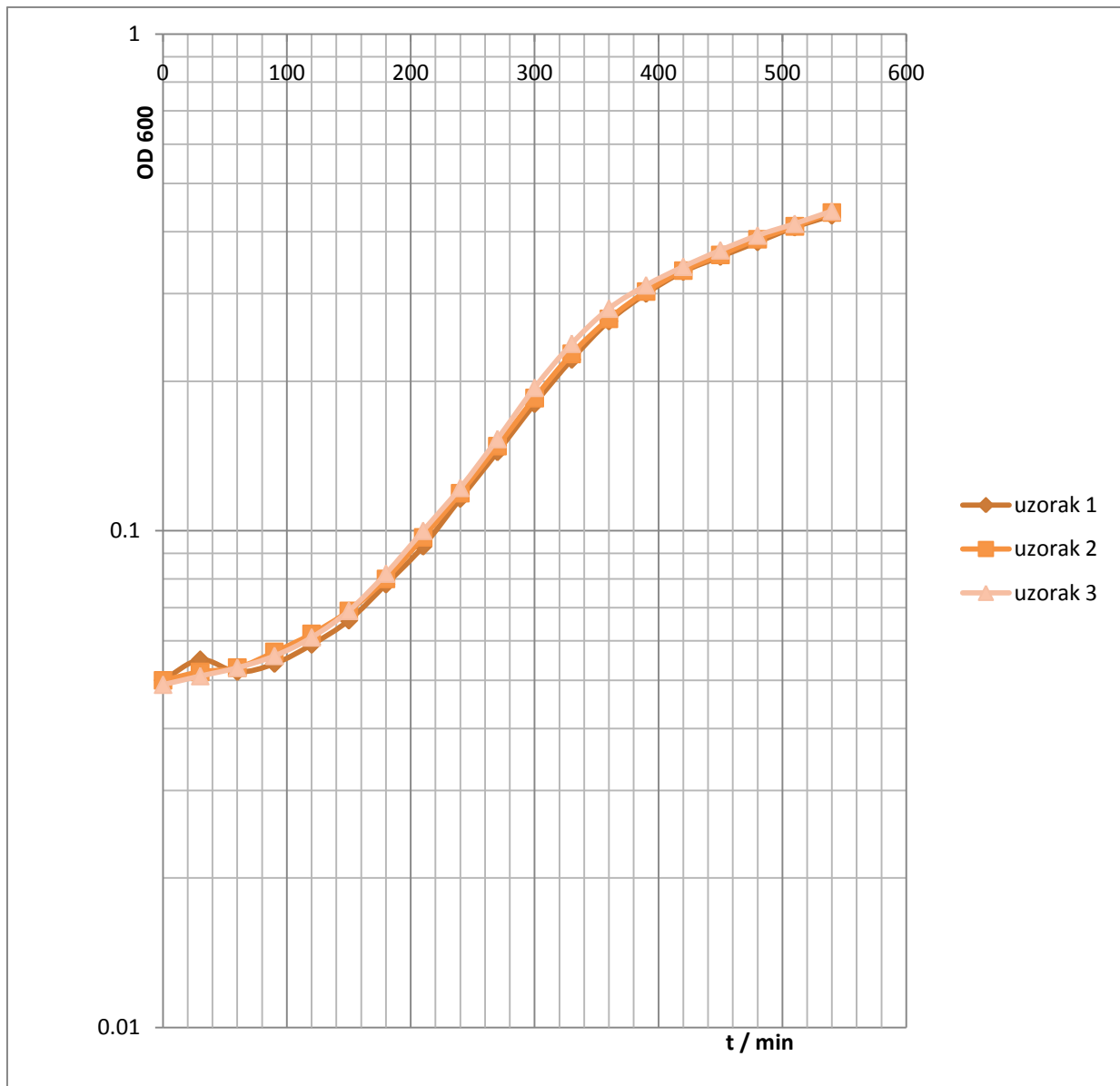
Slika 4.5.3b Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-C1409U/pBBR1MCS-3*mtC* za drugo mjerenje uzoraka u triplikatu.

Tablica 4.5.3 *Specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t za uzorke bakterija MC338/pLK35-C1409U/pBBR1MCS-3rmtC.*

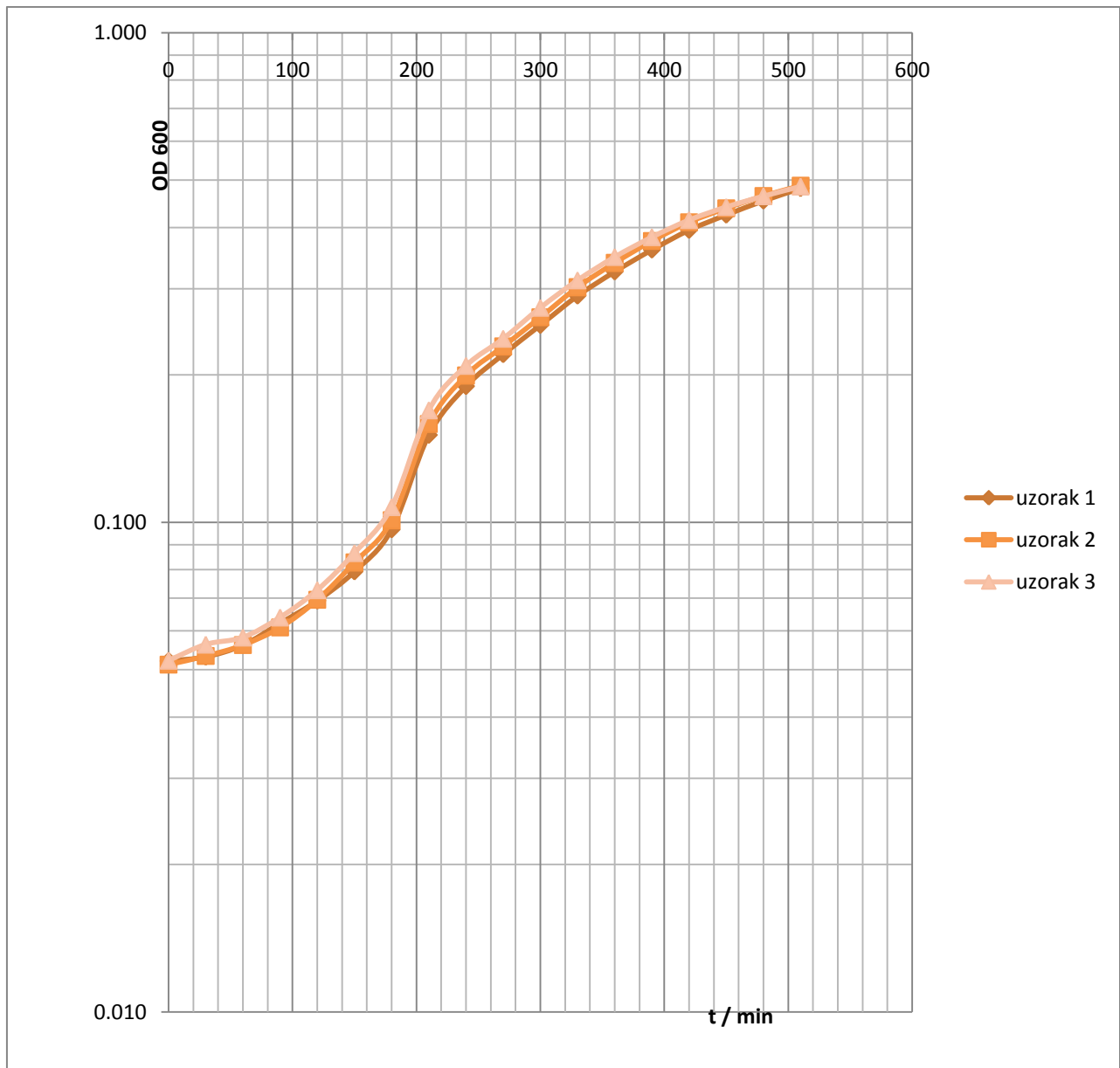
MC338/pLK35-C1409U/pBBR1MCS-3rmtC	k (x10⁻³) / min⁻¹	t/min	Srednja vrijednost mjerenja / min	Rezultat / min
1.	0.003374	89.21		
2.	0.003222	93.41	93.42	
3.	0.003083	97.63		93.43
4.	0.00320	93.96		
5.	0.003175	94.81	93.43	
6.	0.003289	91.53		

4.5.4. Rast stanica *E. coli* MC338/pLK35-G1491U-M9/ pBBR1MCS-3rmtC

Rast bakterijskih stanica s mutacijom G1491U u genu za 16S rRNA i s plazmidom pBBR1MCS-3rmtC praćen je mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm do vrijednosti redom za uzorke 1, 2 i 3 $OD_{600} = 0.431$, $OD_{600} = 0.437$, $OD_{600} = 0.440$ za prvo mjerenje uzoraka i $OD_{600} = 0.481$ $OD_{600} = 0.487$ i $OD_{600} = 0.485$ za drugo mjerenje uzorka. Iz dobivenih vrijednosti mjerenja izrađen je grafički prikaz logaritamskog oblika krivulje rasta za oba mjerenja uzoraka (Slika 4.5.4a i 4.5.4b) i pomoću njega izračunati su parametri *specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t*. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 4.5.4.



Slika 4.5.4a Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-G1491U/pBBR1MCS-3*rmtC* za prvo mjerenje uzoraka u triplikatu.



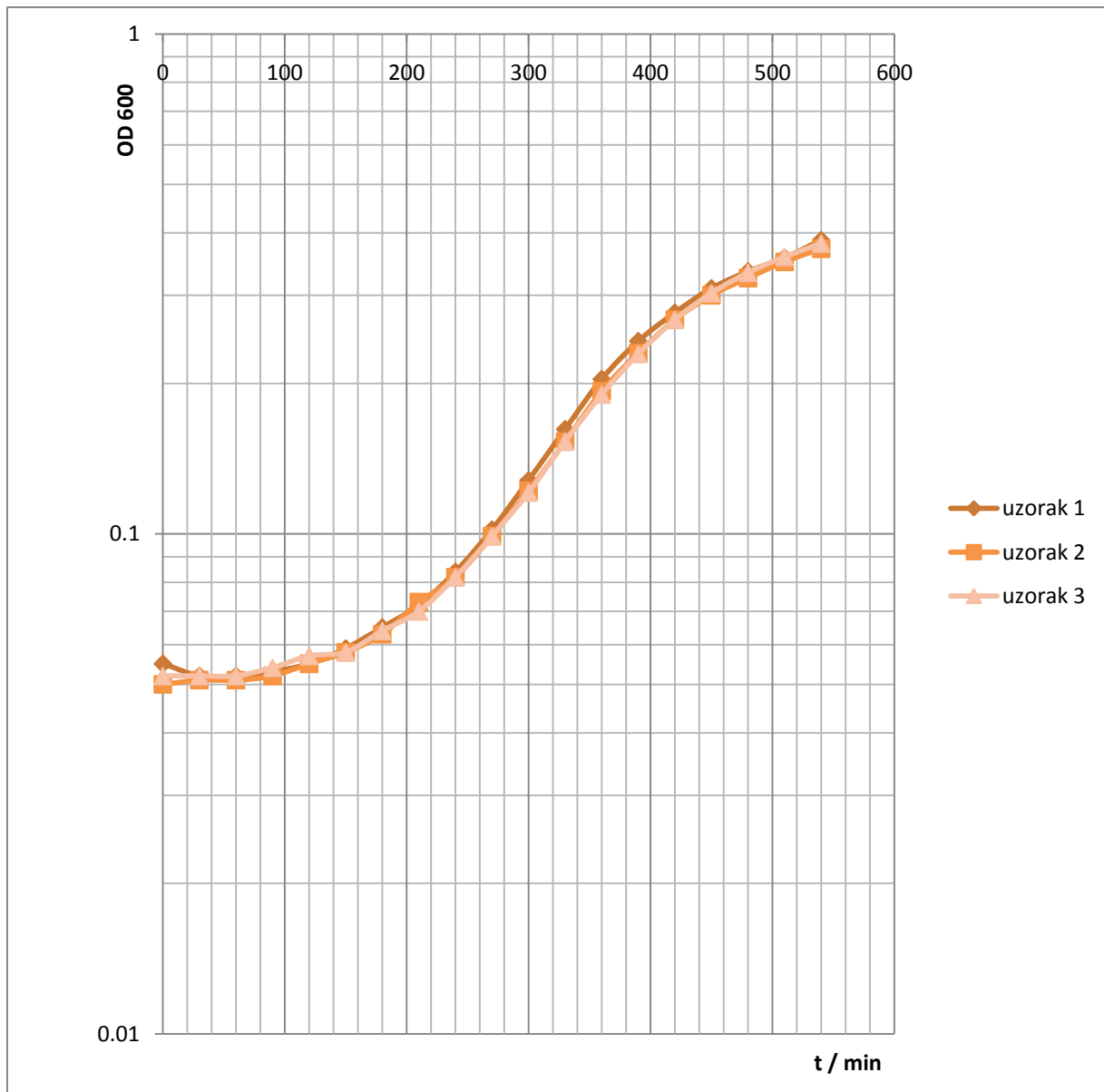
Slika 4.5.4b Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-G1491U/pBBR1MCS-3*mtC* za drugo mjerenje uzoraka u triplikatu.

Tablica 4.5.4 *Specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t za uzorke bakterija MC338/pLK35-G1491U/ pBBR1MCS-3rmtC.*

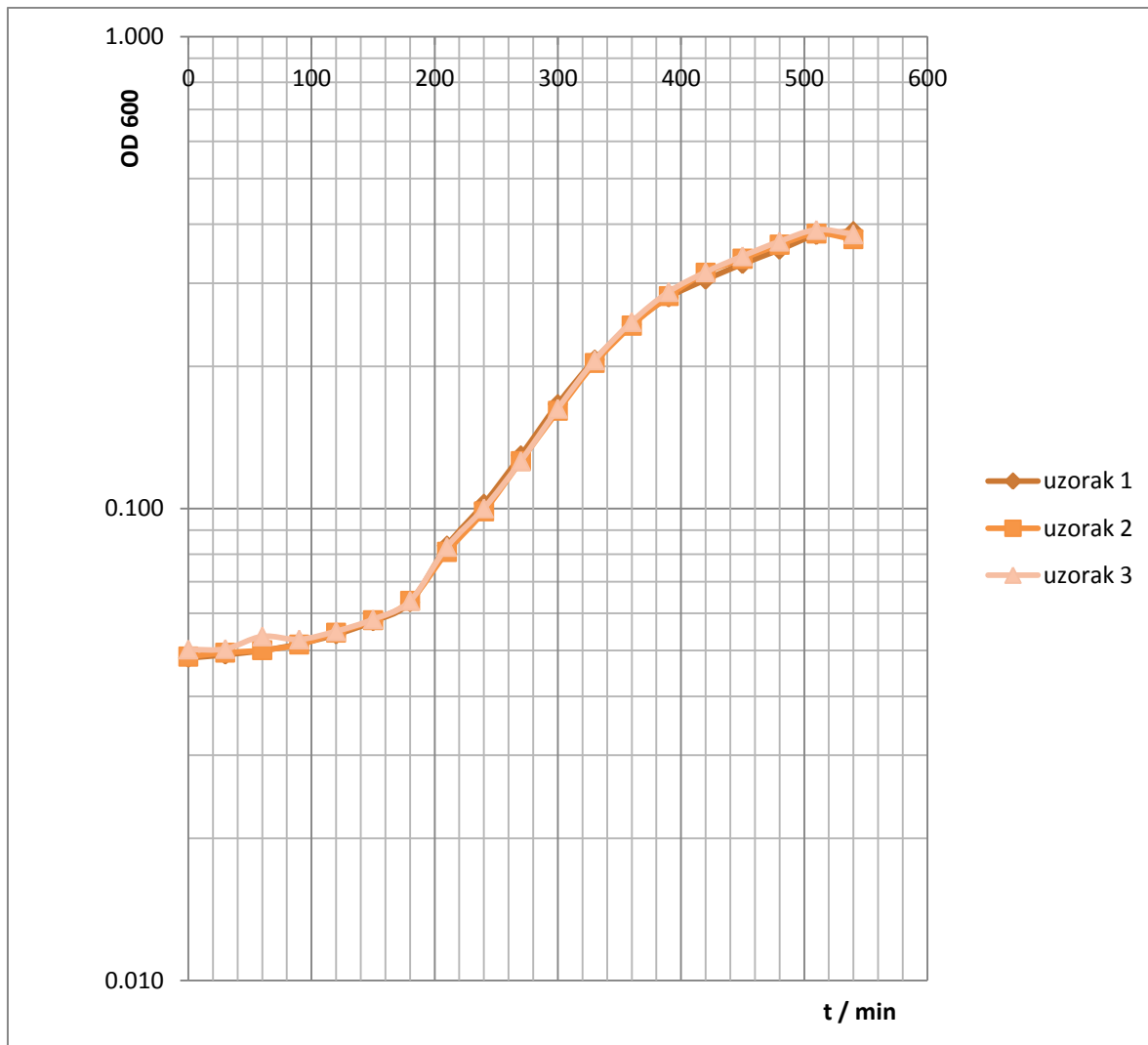
MC338/pLK35-G1491U/ pBBR1MCS-3rmtC	k (x10⁻³) / min⁻¹	t/min	Srednja vrijednost mjerjenja / min	Rezultat / min
1.	0.003181	94.63		
2.	0.00312	96.48	95.00	
3.	0.003206	93.89		98.19
4.	0.002747	109.60		
5.	0.002639	114.07	101.37	
6.	0.003742	80.45		

4.5.5. Rast stanica *E. coli* MC338/pLK35-G1491C-M10/ pBBR1MCS-3rmtC

Rast bakterijskih stanica s mutacijom G1491C u genu za 16S rRNA i s plazmidom pBBR1MCS-3rmtC praćen je mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm do vrijednosti redom za uzorke 1, 2 i 3 $OD_{600} = 0.387$, $OD_{600} = 0.372$, $OD_{600} = 0.381$ za prvo mjerenje uzoraka i $OD_{600} = 0.387$, $OD_{600} = 0.372$ i $OD_{600} = 0.381$ za drugo mjerenje uzorka. Iz dobivenih vrijednosti mjerenja izrađen je grafički prikaz logaritamskog oblika krivulje rasta za oba mjerenja uzoraka (Slika 4.5.5a i 4.5.5b) i pomoću njega izračunati su parametri *specifični prirast bakterija k* i *generacijsko vrijeme t*. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 4.5.5.



Slika 4.5.5a Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-G1491C/pBBR1MCS-3*mtC* za prvo mjerenje uzoraka u triplikatu.



Slika 4.5.5b Logaritamska krivulja rasta soja *E. coli* MC338/pLK35-G1491C/pBBR1MCS-3*rmfC* za drugo mjerenje uzoraka u triplikatu.

Tablica 4.5.5 *Specifični prirast bakterija k i generacijsko vrijeme t za uzorke bakterija MC338/pLK35-G1491C/ pBBR1MCS-3rmtC.*

MC338/pLK35-G1491C/ pBBR1MCS-3rmtC	k (x10⁻³) / min⁻¹	t/min	Srednja vrijednost mjerjenja / min	Rezultat / min
1.	0.003049	98.73		
2.	0.002876	104.67	103.43	
3.	0.002816	106.88		102.60
4.	0.002812	107.04		
5.	0.003011	99.96	101.76	
6.	0.003063	98.27		

Usporedni rezultati, prikazani u tablici 4.5., pokazuju da stanice *E. coli* MC338 s mutiranim ribosomima koje ekspimiraju metil-transferazu RmtC rastu nešto sporije od istih stanica koje imaju ribosome divljeg tipa, na sličan način kao što je to zamijećeno kod stanica bez metil-transferaze RmtC.

Usporedbom generacijskih vremena stanica bez i s metil-transferazom RmtC vidi se da stanice s mutiranim genima za 16S rRNA koje ekspimiraju enzim RmtC rastu malo brže, gdje je najveća razlika od oko 8 % primijećena za stanice koje proizvode ribosome s mutacijom C1400U. Stanice s ribosomima divljeg tipa ne pokazuju razliku u brzini rasta u prisutnosti metil-transferaze RmtC.

Tablica 4.5. Usporedba generacijskih vremena stanica *E. coli* MC338 koje proizvode divlji tip i mutirane varijante ribosoma i istih stanica koje ekspimiraju metil-transferazu RmtC.

t/min	<i>E. coli</i> MC338/pLK35	<i>E. coli</i> MC338/pLK35/ pBBR1MCS-3rmtC
wt	79.56	80.67
C1400U (M2)	101.05	92.86
C1409U (M8)	96.31	93.43
G1491U (M9)	104.91	98.19
G1491C (M10)	111.51	102.60

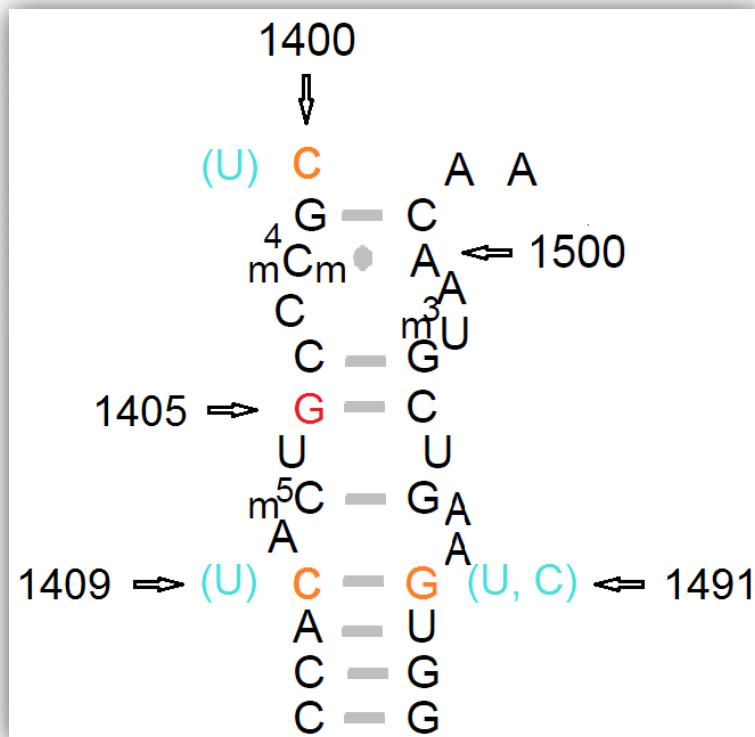
5 RASPRAVA

Ribosomi su nukleoproteini koji u stanici sintetiziraju proteine prevođenjem nukleotidnog slijeda s mRNA u slijed aminokiselina. Prokariotski i eukariotski ribosomi se značajno strukturno razlikuju. Vitalna funkcija i mogućnost primjene kemijskog spoja koji je selektivno toksičan za bakteriju čine ih dobrim metama za antibiotik pa mnogi imaju mehanizam djelovanja koji počiva na ometanju funkcije ribosoma.

Aminoglikozidi su antibiotici koji vezanjem na mjesto A 30S podjedinice prokariotskog ribosoma ometaju pravilno očitavanje genetičkog koda. Vežu se na specifične baze u 16S rRNA te uzrokuju promjenu u konformaciji baza A1492 i A1493 koje su preko interakcija s uzvojnicom kodon/antikodon uključene u stabilizaciju pravilno vezane t-RNA. Promjenom konformacije ovih baza smanjuje se sposobnost dekodirajućeg centra ribosoma za razlikovanje pravilno i pogrešno sparenih kodona i antikodona.

Pojava otpornosti veže se uz sve antibiotike koji su u uporabi, čak i ako se novi preparat pojavi na tržištu, gotovo je izvjesno da će se kroz nekoliko godina pojaviti otpornost i na njega. Otpornost na aminoglikozide poznata je još od pedesetih godina prošlog stoljeća, a do danas je otkriveno više mehanizama kojima ona nastaje. Jedni od njih su promjena strukture veznog mjesta u 16S rRNA i metilacija dušičnih baza u veznom mjestu pomoću enzima metil-transferaza iz porodica Arm i Kam.

Prvi cilj ovog rada bio je dobiti kulture stanica *E. coli* koje sadrže točkastu mutaciju unutar A-mjesta 16S rRNA na svim svojim ribosomima te istražiti utjecaj mutacija na rast bakterija i rezistenciju na aminoglikozide. Mutacije koje su uvedene u staničnu 16S rRNA su C1400U, C1409U, G1491U i G1491C, a njihov položaj u sekundarnoj strukturi 16S rRNA prikazan je na slici 5a. Kako bi se postigla uniformnost ribosoma u stanicama bakterija, korišten je soj *E. coli* MC338 koji ima delecije u svih sedam operona koji kodiraju za rRNA tako da svu staničnu rRNA prepisuje s unijetog plazmida pLK35 koji nosi odgovarajuću mutaciju ili bez mutacije ako je riječ o divljem tipu.



Slika 5a Prikaz dijela mjesta A u 16S rRNA. Crvenom bojom označen je ciljni nukleotid kojeg metilira RmtC. Narančastom bojom označeni su nukleotidi koji su zamijenjeni nukleotidima označenim plavom bojom u zagradama.

Mutacije su u plazmid unešene metodom PCR-mutageneze cijelog plazmida uz dvije mutagene početnice. U tu svrhu korišten je komercijalni komplet *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)*. Prednosti ove metode uz primjenu komercijalnog kompleta u odnosu na druge metode korištene u ovu svrhu su brzina i reproducibilnost, koji su omogućeni uporabom malih volumena, standardiziranih reagensa i dobro validirane metode. U kompletu se nalaze i kompetentne stanice XL1-Blue što dodatno skraćuje postupak. Dobiveni transformanti svu staničnu rRNA prepisuju s operona koji se nalazi na ubačenom plazmidu pLK35. Prednost ovakvog sustava u *E. coli* je što će rezultati svih daljnjih istraživanja koja se provode na njemu, a odnose se na vezanje aminoglikozida ili bakterijsku rezistenciju koja se ostvaruje metilacijom baza unutar A-mjesta djelovanjem metil-transferaza, imati veću vrijednost s obzirom da optimalni uvjeti rasta *E. coli* odgovaraju uvjetima u ljudskom organizmu.

Kako bi se utvrdio utjecaj mutacija na aktivnost i funkciju ribosoma, praćen je rast mutanata u LB mediju uz dodatak ampicilina te su izračunata generacijska vremena za stanice koje sadrže divlji tip, odnosno mutirane varijante gena za 16S rRNA. Dobiveni rezultati ovog pokusa pokazuju da navedeni mutanti rastu sporije od stanica *E. coli* MC338 s divljim tipom plazmida. Iz toga se naslućuje da bi te mutacije mogle narušavati funkciju ribosoma.

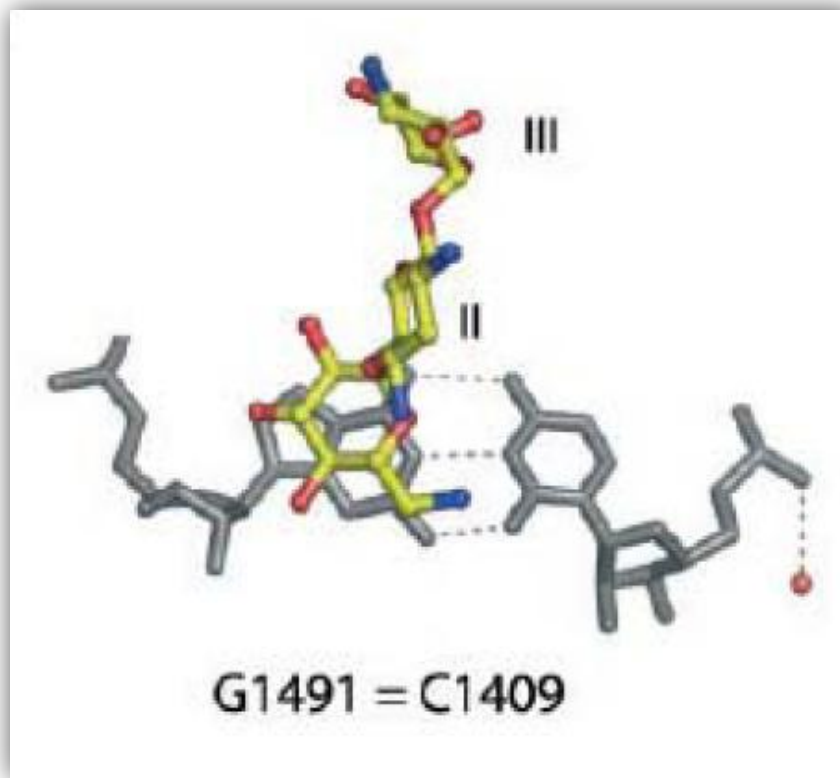
Da bi se istražio utjecaj mutacija u 16S rRNA na osjetljivost bakterija na aminoglikozide, određena je MIK kanamicina za svaki mutant i za stanice *E. coli* MC338 s divljim tipom gena za 16S rRNA.

Rezultati pokazuju da stanice s mutacijom C1400U (MIK=2 mg/L) ne pokazuju promjenu osjetljivosti na kanamicin u odnosu na stanice bez mutacije (MIK=2 mg/L). Ovi rezultati su u skladu s dosadašnjim istraživanjima vezanja kanamicina koja pokazuju da ovaj antibiotik ne ostvaruje interakcije s C1400.

Bakterijske stanice s mutacijom C1409U pokazuju malo smanjenje osjetljivosti (MIK = 32 mg/L) na kanamicin u odnosu na stanice bez mutacije (MIK= 2 mg/L). Ovi rezultati su u skladu s dosadašnjim istraživanjima vezanja kanamicina, koja pokazuju da ovaj antibiotik ne ostvaruje vodikove veze s C1409 koji je vezan u baznom paru s G1491 i time doprinosi prostornoj strukturi veznog mjesta. Zamjenom citozina na položaju 1409 uracilom, gubi se Watson-Crickov par između baza na položajima 1409 i 1491, a time i prostorni raspored baza, stoga bi se moglo zaključiti da navedena promjena mijenja i prostornu strukturu veznog mjesta, što može promijeniti interakciju s antibiotikom, odnosno smanjiti afinitet kanamicina za A mjesto 16S rRNA i porast vrijednosti MIK-a.

Mutacije G1491U (MIK=256 mg/L) i G1491C(MIK= 256 mg/L) pokazale su značajnije smanjenje osjetljivosti na kanamicin. Ovi rezultati su u skladu s prethodnim rezultatom, budući da je ovo drugi od baznog para G1491-C1409. Razlog veće otpornosti može biti u zamjeni većeg nukleotida manjim (purinskog nukleotida gvanina pirimidinskim nukleotidima citozinom ili uracilom). Izuzev gubitka Watson-Crickova

baznog para, navedena zamjena nukleotida dovodi do smanjenja broja vodikovih veza jer citozin i uracil mogu tvoriti po dvije vodikove veze, a gvanin tri, čime se dodatno smanjuje jačina interakcije nukleotida na položajima 1491 i 1409. Dodatno, zbog manjeg molekuskog promjera citozina i uracila u odnosu na gvanin, atomi koji sudjeluju u vodikovim vezama se udaljavaju, što dodatno oslabljuje vezu. Na slici 5b prikazan je odnos molekula kamicina s baznim parom G1491-C1409 (Hobbie i sur., 2005.).



Slika 5b Prikaz vezanja G1491-C1409 s kanamicinom. Vodikove veze označene su isprekidanim crtama, atomi kisika crvenom, a atomi dušika plavom bojom. Preuzeto iz (Hobbie i sur., 2005.).

Nakon unosa plazmida pBBR1MCS-3*rmtC* u soj *E. coli* MC338 koji sadrži divlji tip ili mutirane varijante gena za 16S rRNA, ponovljen je postupak mjerenja krivulja rasta. U ovom slučaju, mutanti s genom za metil-transferazu RmtC rasli su neznatno brže nego oni koji ne nose taj gen, no rastu jednako kao i bakterije s plazmidom pBBR1MCS-3*rmtC* i divljim tipom plazmida pLK35. Rezultati upućuju da metil-transferaza RmtC ne ometa normalno funkcioniranje stanice.

Rezultati mjerenja minimalne inhibitorne koncentracije za navedene sojeve pokazuju da su svi mutanti (MIK= 1024 mg/L) razvili otpornost na kanamicin u odnosu na mutante bez plazmida pBBR1MCS-3*rmtC*, osim nositelja mutacije C1400U (MIK= 2 mg/L), u čijem se slučaju ova koncentracija nije promijenila u odnosu na stanice istog mutanta bez gena za RmtC, što bi moglo implicirati da C1400 predstavlja vezno mjesto za metil-transferazu RmtC, dok su kod ostalih mutanata vezanje enzima RmtC za 16S rRNA i metilacija G1405 očuvani jer mutirani nukleotidi vjerojatno ne ostvaruju ključne interakcije sa enzimom.

Dobiveni rezultati daju podlogu za daljnja istraživanja veznog mjesta metil-transferaze RmtC na bakterijskom ribosomu. Važno je definirati mjesta vezanja metil-transferaze RmtC, mutacije koje utječu na aktivnost enzima, odnosno cjelovit mehanizam metiliranja baze gvanina na položaju 1405 bakterijske 16S rRNA. Proširivanjem znanja o mehanizmu djelovanja metil-transferaza u rezistenciji na aminoglikozid, odnosno definiranjem svih potencijalnih veznih mjesta enzima, kao i interakcija s enzimom, mogli bi se razviti potencijalni lijekovi inhibitori tog procesa i suzbiti rezistencija kliničkih sojeva temeljena na djelovanju metil-transferaza iz porodice Arm.

6 ZAKLJUČAK

Metil-transferaza RmtC uzrokuje rezistenciju kliničkih sojeva bakterija na aminoglikozidne antibiotike metilacijom gvanina na položaju 1405 u 30S podjedinici bakterijskog ribosoma, u mjestu A 16S rRNA. U ovom radu mutirane su pojedine baze mjesta A (C1400U, C1409U, G1491U i G1491C) kako bi se ispitaio utjecaj na interakciju s aminoglikozidnim antibiotikom kanamicinom i interakciju s metil-transferazom RmtC. Na temelju dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Mutacije C1400U, C1409U, G1491U i G1491C u A mjestu bakterijske 16S rRNA nisu letalne za *E. coli*, no usporavaju rast stanica vjerojatno zbog blago narušene strukture dekodirajućeg centra ribosoma;
- Mutacija C1400U ne uzrokuje promjenu osjetljivosti bakterijske stanice na kanamicin jer aminoglikozid ne stupa u interakciju s citozinom na položaju 1400 bakterijske 16S rRNA;
- Mutacije C1409U, G1491U i G1491C uzrokuju pojavu rezistencije na kanamicin, u odnosu na stanice bez mutacije zbog promjene prostorne strukture veznog mjesta za kanamicin;
- Stanice s mutacijom C1400U u genu za 16S rRNA koje eksprimiraju metil-transferazu RmtC ne pokazuju otpornost na kanamicin, što upućuje da C1400 čini dio veznog mjesta enzima RmtC na bakterijskom ribosomu;
- Mutacije C1409U, G1491U i G1491C u 16S rRNA ne utječu na vezanje metil-transferaze RmtC na bakterijski ribosom;
- Dobiveni rezultati daju temelj za daljnja istraživanja mehanizma djelovanja metil-transferaza iz porodice Arm i za dizajn specifičnih inhibitora koji bi spriječili bakterijsku rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike.

7 ZAHVALA

Zahvaljujemo se našoj mentorici doc. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček što nam je pružila uvid u znanstveni rad te se posebno zahvaljujemo na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog rada.

Također zahvaljujemo asistenticama Sonji Obranić i Fedori Babić na strpljivosti i korisnim savjetima pri eksperimentalnoj izradi rada.

8 LITERATURA

1. Ambrović-Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Četković H, Hranilović D, Herak Bosnar M, Katušić Hećimović S, Meštrović Radan N, Slade N, Vujaklija D. Eksperimentalni sustavi. In: Metode u molekularnoj biologiji. 1.izdanje. Zagreb: Institut Ruđer Bošković; 2007. p.1-138.
2. Arya DP. Aminoglycoside Antibiotics. Wiley-Interscience; 2007.
3. Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. Science 2000; 289(5481): 905-920.
4. Bannister BA, Gillespie SH, Jones J. Infection: microbiology and management. Wiley-Blackwell; 2006.
5. Beauclerk AA, Cundliffe E. Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. J Mol Biol 1987; 193:661-671.
6. Bockstael K, Van Aerschot A. Antimicrobial resistance in bacteria. Central European Journal of Medicine 2009; 4:141-155.
7. Bulat M, Geber J, Lacković Z. Lijekovi protiv mikroba i parazita. In: Medicinska farmakologija. 2.izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2001. p.405.-463.
8. Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. Nature 2000; 407:340-348.
9. Cooper GM, Hausman RE. Sinteza, dorada i regulacija proteina. In: Stanica: molekularni pristup. 3.izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. p.281-319.
10. Cundliffe E. Resistance to macrolides and lincosamides in *Streptomyces lividans* and to aminoglycosides in *Micromonospora purpurea*. Gene 1992; 115:75-84.
11. Davies J, Wright GD. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. Trends Microbiol 1997; 5:234-240.
12. Davis MA, Baker KN, Orfe LH, Shah DH, Besser TE & Call DR. Discovery of a gene conferring multiple aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents 2010; 54:2666–2669.
13. Department of Biomedical Sciences Florida State University, 2011, <http://www.mikeblaber.org/>, pristupljeno 24.04.2011.

14. Doi O, Miyamoto M, Tanaka N, Umezawa H. Inactivation and phosphorylation of kanamycin by drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied microbiology* 1968; 16: 1282-1284.
15. Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents* 2007; 51:852–856.
16. Douthwaite S, Powers T, Lee JY, Noller HF. Defining the Structural Requirements for a Helix in 23S Ribosomal RNA that Confers Erythromycin Resistance. *Journal of Medical Biology* 1989; 209:655-665.
17. Fourmy D, Recht MI, Blanchard SC, Puglisi JD. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* 1996; 274:1367-1371.
18. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2565-2571.
19. GCSE Revision 101 discussion forum, 2011, [http:// gcserevision101.wordpress.com/](http://gcserevision101.wordpress.com/), pristupljeno 24.04.2011.
20. Greenwood D, Finch R, Davey P, Wilcox M. *Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press; 2007.
21. Hobbie SN, Pfister P, Brüll C, Westhof E, Bötger EC. Analysis of contribution of individual substituents in 4,6-aminoglycoside-ribosome interaction. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005; 49(12):5112-5118.
22. Holmes DJ, Drocourt D, Tiraby G, Cundliffe E. Cloning of an aminoglycoside resistance-encoding gene, *kamC*, from *Saccharopolyspora hirsuta*: comparison with *kamB* from *Streptomyces tenebrarius*. *Gene* 1991; 102:19-26.
23. Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 70:140-150.
24. Karakašević B. *Mikrobiologija i parazitologija*. Zagreb: Medicinska knjiga; 1987.

25. Kelemen GH, Cundliffe E, Financsek I. Cloning and characterization of gentamicin resistance genes from *Micromonospora purpurea* and *Micromonospora rosea*. *Gene* 1991; 98:53-60.
26. Kojic M, Topisirovic L, Vasiljevic B. Translational autoregulation of the *sgm* gene from *Micromonospora zionensis*. *J Bacteriol* 1996; 178:5493-5498.
27. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 1995; 166:175-176.
28. Korostelev A, Noller HF. The ribosome in focus: new structures bring new insights. *Trends in biochemical sciences* 2007; 32(9):434-441.
29. Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev* 2005; 105:477-498.
30. Magnet S, Smith TA, Zheng R, Nordmann P, Blanchard JS. Aminoglycoside resistance resulting from tight drug binding to an altered aminoglycoside acetyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1577-1583.
31. Marchetti C. Die magische Entwicklungskurve. *Bild der Wissenschaft* 1982; 19(10):114-128.
32. O'Connor M. Selection of intragenic suppressors of lethal 23S rRNA mutations in *Escherichia coli* identifies residues important for ribosome assembly and function. *Mol Genet Genomics* 2007; 278:677-687.
33. Ohta T, Hasegawa M. Analysis of the self-defense gene (*fmrO*) of a fortimicin A (astromicin) producer, *Micromonospora olivasterospora*: comparison with other aminoglycoside-resistance-encoding genes. *Gene* 1993; 127:63-69.
34. Pelicic V, Reytrat JM, Gicquel B. Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol* 1996; 178:1197-1199.
35. Ramakrishnan V, Brodersen DE, Clemons WM, Carter AP, Wimberly BT. Crystal structures of the 30S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16S rRNA. *J Mol Biol* 2002; 316:725-768.
36. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 13(6):151-71.

37. Reed R, Holmes D, Weyers J, Jones A. Practical skills in biomolecular sciences. Harlow: Pearson education Limited and associated companies throughout the world; 2007.
38. Stratagene Mutagenesis Solutions for Your Protein Engineering Needs, Stratagene, An Agilent Technologies Company, 2008, <http://cp.literature.agilent.com/litweb/pdf/5989-8097EN.pdf>, pristupljeno 24.04.2011.
39. Skeggs PA, Holmes DJ, Cundliffe E. Cloning of aminoglycoside-resistance determinants from *Streptomyces tenebrarius* and comparison with related genes from other actinomycetes. J Gen Microbiol 1987; 133:915-923.
40. Talaro K, Talaro A. Foundations in microbiology. McGraw-Hill; 2002.
41. Umezawa H, Okanishi M, Kondo S, Hamana K, Utahara R, Maeda K, Mitsushashi S. Phosphorylative inactivation of aminoglycosidic antibiotics by *Escherichia coli* carrying R factor. Science 1967; 157:1559-1561.
42. Vicens Q, Westhof E. Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding a site. Chem Biol 2002; 9: 747-755.
43. Wachino JI, Shibayama K, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Arakawa Y. RmtC introduces G1405 methylation in 16S rRNA and confers high-level aminoglycoside resistance on Gram-positive microorganisms. FEMS Microbiol Lett 2010; 311:56–60.
44. Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Shibata N, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(12): 4401-9.
45. Wachino J, Yamane K, Kimura K, Shibata N, Suzuki S, Ike Y, Arakawa Y. Mode of Transposition and Expression of 16S rRNA Methyltransferase Gene rmtC Accompanied by ISEcp1. ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER 2006; 51(9):3212–3215.

46. Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, Doi Y, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:178-184.
47. Wood GL, Washington JA. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. Murray PR (ed). Washington DC: ASM Press; 1995. p.1327-1341.
48. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews* 2005; 57:1451-1470.
49. Yassin A, Mankin AS. Potential new antibiotic sites in the ribosome revealed by deleterious mutations in RNA of the large ribosomal subunit. *J Biol Chem* 2007; 282(33):24329-42.
50. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 2003; 362:1888-1893.
51. Yoshizawa S, Fourmy D, Puglisi JD. Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J* 1998; 17: 6437-6448.
52. Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JH, Noller HF. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 2001; 292:883-896.

9 SAŽETAK

UTJECAJ RIBOSOMSKIH MUTACIJA NA BAKTERIJSKI RAST I REZISTENCIJU NA AMINOGLIKOZIDNE ANTIBIOTIKE

Rezistencija bakterija na aminoglikozidne antibiotike postaje sve veći problem u liječenju infekcija, zbog pojave patogenih sojeva bakterija koje su razvile novi mehanizam rezistencije. Mehanizam otpornosti na aminoglikozide modifikacijom ciljnog mjesta djelovanja posredovan 16S rRNA metil-transferazama iz porodica Arm i Kam uobičajen je kod bakterija koji su prirodni proizvođači antibiotika. Nedavno je isti mehanizam rezistencije pronađen kod patogenih bakterija, no posredovan je novim metil-transferazama iz porodice Arm, koje su nađene isključivo u novim patogenim sojevima.

Cilj je rada odrediti kako mutacije evolucijski očuvanog ribosomskog mjesta A unutar 16S rRNA utječu na bakterijski rast i rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike i to u bakterijskim stanicama koje su prirodno osjetljive na aminoglikozide i u onima koje su rezistentne jer proizvode metil-transferazu RmtC. PCR-mutagenезom načinjene su mutacije C1400U, C1409U, G1491U i G1491C te je određivanjem generacijskog vremena bakterija i minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina ispitan utjecaj mutacija na vezanje aminoglikozida u mjesto A te na interakciju metil-transferaze RmtC s ribosomom.

Rezultati pokazuju da mutacije C1409U, G1491U i G1491C uzrokuju pojavu rezistencije na kanamicin, što upućuje da su navedeni nukleotidi dio veznog mjesta kanamicina na bakterijskom ribosomu. Unosom gena za metil-transferazu RmtC u bakteriju s mutacijom C1400U nije došlo do pojave rezistencije kao kod bakterija s ostalim ispitanim mutacijama, što znači da citozin na položaju 1400 u 16S rRNA stupa u interakciju s enzimom i dio je veznog mjesta enzima na ribosomu.

Rad daje uvid u ulogu evolucijski očuvanog mjesta A u bakterijskom ribosomu, a dobiveni rezultati daju temelj za daljnja istraživanja o mehanizmu djelovanja metil-transferaza u rezistenciji na aminoglikozidne antibiotike u smjeru razvoja lijekova

inhibitora tog procesa, kojima bi se suzbila rezistencija kliničkih sojeva temeljena na djelovanju metil-transferaza iz porodice Arm.

Ključne riječi: aminoglikozidni antibiotici, rezistencija, metil-transferaza RmtC, ciljana mutageneza, bakterijski ribosom, 16S rRNA

10 SUMMARY

EFFECTS OF RIBOSOMAL MUTATIONS ON BACTERIAL CELL GROWTH AND RESISTANCE TO AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTICS

Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics becomes an increasing problem in treating infections due to occurrence of pathogenic strains of bacteria that have developed a new mechanism of resistance. The mechanism of resistance to aminoglycosides by modification of target sites mediated by 16S rRNA methyltransferase from Arm and Kam families is common in bacteria that are natural producers of antibiotics. Recently, the same mechanism of resistance was found in clinical pathogens and is mediated by new methyltransferases from Arm family.

The aim of the study was to determine how mutations in evolutionarily conserved ribosomal A site in 16S rRNA affect bacterial growth and resistance to aminoglycoside antibiotics in cells susceptible to aminoglycoside antibiotics, as well as to those that became resistant by expressing the RmtC methyltransferase. Mutations C1400U, C1409U, G1491U and G1491C were introduced into 16S rRNA gene by PCR mutagenesis. Effects of mutations on kanamycin binding and on interaction of RmtC enzyme with the ribosome were examined by *in vivo* tests, including determination of the bacterial generation time and minimal inhibitory concentration of kanamycin.

The results show that mutations C1409U, G1491U and G1491C render bacteria resistant to kanamycin, suggesting that these nucleotides form kanamycin binding site on bacterial ribosome. In bacteria with the mutation C1400U that were expressing the RmtC methyltransferase there was no occurrence of resistance as observed with other examined mutations, which indicates that C1400 in 16S rRNA interacts with RmtC enzyme and is a part of RmtC binding site on the ribosome.

The study provides insight into the possible role of evolutionarily conserved A site in bacterial ribosome and the results will foster further research of the mechanism of action and specific inhibitors of aminoglycoside resistance methyltransferases from Arm family, which would combat the aminoglycoside resistance of clinical strains.

Key words: aminoglycoside antibiotics, resistance, RmtC methyltransferase, targeted mutagenesis, bacterial ribosome, 16S rRNA