

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Luka PREDOJEVIĆ

**SISTEMI ZA PRIVZEM ŽELEZA V IZOLATIH  
BAKTERIJE *Escherichia coli* IZ OKUŽB KOŽE IN  
MEHKIH TKIV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Luka PREDOJEVIĆ

**SISTEMI ZA PRIVZEM ŽELEZA V IZOLATIH BAKTERIJE  
*Escherichia coli* IZ OKUŽB KOŽE IN MEHKIH TKIV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**IRON UPTAKE SYSTEMS AMONG *Escherichia coli* ISOLATED  
FROM SKIN AND SOFT-TISSUE INFECTIONS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija Biologije. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Darjo Žgur-Bertok, za somentorico pa prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec ter doc. dr. Blagajano Herzog Velikonja za recenzentko.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Polona Zalar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Marjanca STARČIČ ERJAVEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 30. 9. 2015

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Luka Predojević

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 6:616 (043.2) = 163.6
KG	<i>Escherichia coli</i> /SSTI/PCR/prevalence/sistemi za privzem železa/patogeni/okužbe
AV	PREDOJEVIĆ, Luka
SA	ŽGUR-BERTOK, Darja (mentorica)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (somentorica)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2015
IN	SISTEMI ZA PRIVZEM ŽELEZA V IZOLATIH BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i> IZOLIRANIH IZ OKUŽB KOŽE IN MEHKIH TKIV
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	IX, 41 str., 9 pregl., 8 sl., 38 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<i>Escherichia coli</i> je bakterija, ki živi v spodnjem delu prebavil človeka in živali s stalno telesno temperaturo. Poleg sevov, ki so s človekom v mutualističnem odnosu, obstajajo tako črevesni kot tudi zunajčrevesni patogeni sevi <i>E. coli</i> , ki so zmožni povzročiti različne infekcije. Osredotočili smo se na patogene seve <i>E. coli</i> , izolirane iz okužb kože in mehkih tkiv - SSTI (Skin and soft tissue infections). Naš namen je bil pri teh sevih določiti prevalenco genov različnih sistemov za privzem železa. Uporabili smo metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) za pomnoževanje tarčnih zaporedij genov za sisteme privzema železa. Z agarozno gelsko elektroforezo smo določili produkte ustreznih velikosti, gele smo analizirali z gel dokumentacijskim sistemom. Za statistično obdelavo dobljenih rezultatov smo uporabili Fisherjev natančni test in Bonferronijevo korekcijo. Največjo prevalenco med geni za sisteme privzema železa je imel gen <i>fyuA</i> . Gen <i>fyuA</i> je bil med preiskovanimi geni edini, ki je bil močno statistično značilno povezan s filogenetsko skupino B2. Opazili smo tudi visoko korelacijo med geni <i>iha</i> in <i>iucD</i> ter <i>fyuA</i> in <i>kpsMTII</i> . Po prenovljeni Clermontovi metodi se je največ sevov SSTI uvrstilo v filogenetsko skupino B2. Primerjava med sevi SSTI in sevi <i>E. coli</i> iz blata zdravih ljudi je pokazala, da so prevalenca omenjenih genov enake pri obeh skupinah, razen v primeru <i>iro</i> , ki je imel večjo prevalenco pri SSTI, kar kaže na potencialno vlogo salmohelina kot virulentnega dejavnika.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Dn
- DC UDC 6:616 (043.2) = 163.6
- CX *Escherichia coli*/SSTI/PCR/prevalence/iron uptake systems/pathogens/infections
- AU PREDOJEVIĆ, Luka
- AA ŽGUR-BERTOK, Darja (supervisor)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca  
(co-advisor)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2015
- TI IRON UPTAKE SYSTEMS AMONG *Escherichia coli* ISOLATED FROM SKIN AND SOFT-TISSUE INFECTIONS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO IX, 41 p., 9 tab., 8 fig., 38 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB *Escherichia coli* is a bacterium that lives in the lower intestine of humans and warm-blooded animals. Apart from strains, which live in mutualistic relationship with their host, there are also pathogenic strains of *E. coli*, which are able to cause intestinal and extraintestinal infections. We focused on pathogenic strains of *E. coli* isolated from skin and soft tissue infections (SSTI). Our aim was to determine the prevalence of different iron uptake systems genes among SSTI strains. Methods used included polymerase chain reaction (PCR) for multiplying the target sequences associated with iron uptake system genes, agarose gel electrophoresis for determining the correct size of PCR products and usage of UV light equipment for visualisation. The obtained results were statistically processed with Fisher's exact test and Bonferroni correction. Among SSTI strains the *fyuA* gene showed the highest prevalence. Gene *fyuA* was also the only gene with a statistically significant correlation with the B2 phylogenetic group. Statistically significant strong correlations were also observed between *iha* and *iucD* genes, and *fyuA* and *kpsMTH* genes. Renewed Clermont's method for determination of phylogenetic groups showed that most of the SSTI strains belonged to the B2 group. Comparison between SSTI and the strains isolated from stools of healthy people showed that the prevalences of studied iron uptake system genes were almost equal in both kinds of strains, except for the *iro*, which had a higher prevalence in SSTI strains, indicating that salmochelin is a potential virulence factor.

## KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VII
	KAZALO SLIK	VII
	KAZALO PRILOG	VIII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
1.1	NAMEN DELA	2
1.2	DELOVNE HIPOTEZE	2
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1	BAKTERIJA <i>ESCHERICHIA COLI</i>	3
2.2	VIRULENTNI DEJAVNIKI	4
2.3	SISTEMI ZA PRIVZEM ŽELEZA	4
<b>2.3.1</b>	<b>Jersinijabaktin (Ybt)</b>	<b>5</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Hemoglobinska proteaza (Hbp)</b>	<b>6</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Dvofunkcijski enterobaktinski receptor/adhezin (Iha)</b>	<b>6</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Virulentni dejavnik, ki ga regulira železo, IreA</b>	<b>6</b>
<b>2.3.5</b>	<b>PicU</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b>	<b>8</b>
3.1	MATERIAL	8
<b>3.1.1</b>	<b>Bakterijski sevi</b>	<b>8</b>
3.1.1.1	Sevi SSTI	8
3.1.1.2	Sevi BJ	8
<b>3.1.2</b>	<b>Gojišča</b>	<b>8</b>
3.1.2.1	Priprava tekočih gojišč Lauria-Bertani (LB)	8
3.1.2.2	Priprava trdnih gojišč LB	8
<b>3.1.3</b>	<b>Pufri in reagenti</b>	<b>8</b>

3.1.3.1	Agarozna gelska elektroforeza	8
<b>3.1.4</b>	<b>Kemikalije</b>	<b>9</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Encimi</b>	<b>10</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Začetni oligonukleotidi</b>	<b>11</b>
<b>3.1.7</b>	<b>Oprema</b>	<b>12</b>
3.2	METODE	13
<b>3.2.1</b>	<b>Gojenje sevov</b>	<b>13</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Priprava bakterijskih lizatov</b>	<b>13</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Verižna reakcija s polimerazo</b>	<b>13</b>
3.2.3.1	Začetni test kvalitete lizatov – ERIC-PCR	13
3.2.3.2	Filogenetski PCR	15
3.2.3.3	PCR za pomnoževanje genov sistemov za privzem železa	17
<b>3.2.4</b>	<b>Gelska agarozna elektroforeza</b>	<b>20</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Pregledovanje rezultatov PCR</b>	<b>20</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Statistična obdelava rezultatov</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>21</b>
4.1	PREVALENCA PREUČEVANIH SISTEMOV ZA PRIVZEM ŽELEZA	21
4.2	FILOGENETSKE SKUPINE PO CLERMONT-OVI PRENOVLJENI METODI	24
4.3	KORELACIJE GENOV ZA SISTEME ZA PRIVZEM ŽELEZA S FILOGENETSKO SKUPINO	25
4.4	KORELACIJE GENOV ZA PRIVZEM ŽELEZA Z DRUGIMI VIRULENTNIMI DEJAVNIKI	27
4.5	PRIMERJAVA PREVALENC SISTEMOV ZA PRIVZEM ŽELEZA MED SEVI SSTI IN SEVI IZOLIRANIMI IZ BLATA ZDRAVIH LJUDI	28
<b>5</b>	<b>DISKUSIJA</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>34</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Uporabljeni začetni oligonukleotidi.....	11
Pregl. 2: Začetni test kvalitete lizatov z ERIC-PCR.....	15
Pregl. 3: Programi za verižno reakcijo s polimerazo za kvadrupleks, potrditev skupine C in potrditev skupine E.....	17
Pregl. 4: Programi za verižno reakcijo s polimerazo za gene <i>fyuA</i> , <i>hbp</i> , <i>iha</i> , <i>ireA</i> in <i>picU</i>	19
Pregl. 5: Prevalence genov za sisteme privzema železa.....	23
Pregl. 6: Porazdelitev sevov SSTI glede na filogenetske skupine po prenovljeni metodi po Clermontu (Clermont in sod., 2013).....	25
Pregl. 7: Korelacije preučevanih sistemov za privzem železa s filogenetsko skupino.....	26
Pregl. 8: Korelacije genov za sisteme privzema železa z drugimi virulentnimi dejavniki..	28
Pregl. 9: Primerjava prevalenc sistemov za privzem železa med sevi SSTI in sevi izoliranimi iz blata zdravih ljudi.....	29



## KAZALO SLIK

Sl. 1: Kolonije bakterije <i>Escherichia coli</i> na plošči MacConkey (Gonzalez Andres, CIBIN, Microbe World). .....	3
Sl. 2: Prenos kompleksa jersiniabaktin-Fe <sup>+</sup> skozi zunanjo membrano uropatogene bakterije <i>E. coli</i> s pomočjo receptorja FyuA v povezavi s TonB (Metallomics, 2015). .....	6
Sl. 3: Primeri elektroforeze pomnožkov, pridobljenih v PCR, specifični za gen <i>fyuA</i> . .....	21
Sl. 4: Primeri elektroforeze pomnožkov, pridobljenih v PCR, specifični za gen <i>hbp</i> . .....	21
Sl. 5: Primeri elektroforeze pomnožkov, pridobljenih v PCR, specifični za gen <i>iha</i> . .....	22
Sl. 6: Primeri elektroforeze pomnožkov, pridobljenih v PCR, specifični za gen <i>ireA</i> . .....	22
Sl. 7: Primeri elektroforeze pomnožkov, pridobljenih v PCR, specifični za gen <i>picU</i> . .....	23
Sl. 8: Primer elektroforeze pomnožkov, pridobljenih v filogenetskem PCR po prenovljeni Clermontovi metodi (Clermont in sod., 2013) .....	24

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

TLR	tip membranskih proteinov na imunskih celicah (angl. Toll-like receptors)
TcpC	(angl. toxin coregulated pilus (biosynthesis) outer membrane protein TcpC)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	zunajčrevesni patogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. extraintestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i> )
EHEC	enterohemoragična <i>Escherichia coli</i>
LB	tekoče gojišče Luria-Bertani
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
SSTI	okužba kože in mehkih tkiv (ang. skin and soft tissue infections)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
UPEC	uropatogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. uropathogenic <i>E. coli</i> )
UTI	okužba urinarne poti (ang. urinary tract infections)
Zbirka BJ	zbirka komenzalnih sevov <i>E. coli</i> Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani
Zbirka SSTI	klinična zbirka patogenih sevov <i>E. coli</i> , izoliranih iz različnih okužb kože in mehkih tkiv v Laboratoriju za diagnostiko aerobnih in anaerobnih bakterijskih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani

## 1 UVOD

Bakterije rodu *Escherichia* so globalno razširjene (Madigan M. in sod., 2015). Najpogosteje jih izoliramo iz prebavil živali s stalno telesno temperaturo, vključno s človekom. Njihov pomen v prebavilih gostitelja je v varovanju pred patogenimi bakterijami in prispevanju k metabolizmu gostitelja, npr. sinteza vitamina K. Ker so bakterije rodu *Escherichia* fakultativno anaerobne, porabijo kisik v prebavilih, tako ustvarijo anoksične pogoje in s tem vzpostavijo razmere za rast anaerobnih mikroorganizmov (Madigan in sod. 2015).

Gamaproteobakterije, kamor sodi rod *Escherichia*, so vrstno gledano najbolj pester razred debla *Proteobacteria*, ki zajema kar tretjino vseh opisanih vrst domene *Bacteria* (Madigan in sod., 2015).

Znamenita vrsta iz rodu *Escherichia* je *Escherichia coli*, ki je del normalne črevesne mikrobiote človeka in drugih organizmov s stalno telesno temperaturo. Živi v spodnjem delu prebavil, kjer predstavlja številčno najpomembnejšega fakultativnega anaeroba in velja za bakterijo, ki živi s svojim gostiteljem v mutualističnem odnosu (Singleton, 1999; Madigan in sod., 2015).

A ta bakterijska vrsta ima tudi seve, ki so patogeni. Poleg črevesnih okužb, še posebej driske, ki jo pogosto povzroča pri otrocih v državah v razvoju, so lahko sevi *E. coli* tudi vzrok urinarnih in drugih zunajčrevesnih infekcij, med njimi tudi okužb kože in mehkih tkiv (SSTI) (Madigan in sod., 2015).

Na področju mikrobiologije bakterija *E. coli* predstavlja centralni modelni organizem, ki se ga uporablja v širokem spektru znanstvenih raziskav. Na področju biotehnologije pa *E. coli* sodi med biotehnoško pomembnega gostitelja, s pomočjo katerega lahko na osnovi tehnologije rekombinantne DNA pridobivamo pomembne snovi, npr. humani inzulin, cepiva, biogoriva in podobno (Howard in sod., 2013).

*E. coli*, tako kot ostali organizmi, za svojo rast potrebuje železo. Sposobnost privzema železa, ki je zelo pomemben element, nakazuje zmožnost sevov za kolonizacijo in preživetje v gostitelju (Messenger in Barclay, 1983).

Mikroorganizmi potrebujejo železo za celo vrsto različnih metabolnih procesov, kot so recimo redukcija kisika ob tvorbi molekul ATP ali pa redukcija ribotidnih prekurzorjev DNA ter drugih življenjsko pomembnih procesov. Za optimalno rast mikroorganizmov je zadostna koncentracija železa že 1  $\mu\text{M}$ . Kljub razširjenosti železa v okolju in njegovi prisotnosti, je v gostitelju železo mikroorganizmom dostopno v omejenih količinah, tako da so bakterije morale razviti različne sisteme, ki omogočajo uspešen privzem železa v gostitelju (Neilands, 1995).

## 1.1 NAMEN DELA

Cilj diplomskega dela je bil pregledati 102 seva bakterije *E. coli*, izolirana iz SSTI (Skin and soft tissue infections), ki so zbrani v zbirki sevov *E. coli* Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo, za prisotnost genov različnih sistemov za privzem železa, in sicer *fyuA*, *ireA*, *iha*, *hbp* in *picU* z uporabo verižne reakcije s polimerazo. Na ta način smo pridobili podatke o prevalenci posameznih genov za sisteme privzema železa med sevi SSTI. Dobljene prevalenice smo primerjali s prevalencami teh genov pri sevih *E. coli*, izoliranih iz blata zdravih ljudi. Eden izmed ciljev je bil tudi poiskati korelacije teh genov s filogenetsko skupino in z geni nekaterih drugih virulentnih dejavnikov kot so recimo: *fimH*, *ibeA*, *hlyA* in *cnf*.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Naši predpostavki sta bili naslednji:

- Prevalence posameznih sistemov za privzem železa pri sevih SSTI so višje kot pri sevih, izoliranih iz blata zdravih ljudi.
- Nekateri virulentni dejavniki oz. filogenetske skupine so statistično značilno povezane s sistemi za privzem železa.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BAKTERIJA *ESCHERICHIA COLI*

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je mikroorganizem, ki živi v spodnjem delu prebavila človeka in drugih organizmov (živali) s stalno telesno temperaturo. *E. coli* predstavlja del normalne črevesne mikrobiote, ki živi s svojim gostiteljem v mutualističnem odnosu (Singleton, 1999)

Bakterijo je med raziskavami o povečane smrtnosti otrok zaradi driske odkril nemški pediater Theodor Escherich leta 1885. Bakteriji je dal ime *Bacillus coli commune*. Po njegovi smrti so, v čast velikemu zdravniku in bakteriologu, ime bakterije preoblikovali v *Escherichia coli* (Hacker in Blum-Oehler, 2007).

*E. coli* (slika 1) uvrščamo v skupino po Gramu negativnih bakterij. Je nesporulirajoča bakterija, za katero je značilen fakultativno anaerobni tip metabolizma. *E. coli* je paličaste oblike velikosti  $1,1\text{--}1,5\ \mu\text{m} \times 2,0\text{--}6,0\ \mu\text{m}$  (Darnton, 2007; Reshes in sod., 2007). Volumen celice je približno  $0,6\text{--}0,7\ \mu\text{m}^3$ , odvisno od seva. (Kubitschek, 1990). Celična stena je zgrajena iz plazemske membrane, vmesnega sloja peptidoglikana in zunanje membrane. Celice so večinoma negibljive, obstajajo tudi sevi, ki imajo flagele in so gibljivi (Medearis Jr. in sod., 1968).

Bakterijo *E. coli* običajno najdemo v prebavilih gostitelja, a prisotna je tudi v okolju in sicer v vodi in usedlinah, kjer lahko kaže na fekalno onesnaženost teh okolij. Nekatere raziskave kažejo, da je celo polovica vseh populacij *E. coli* prisotna v teh zunajčrevesnih okoljih (Perry, 2011).



Slika 1: Kolonije bakterije *Escherichia coli* na plošči MacConkey (Gonzales Andres, CIBIN, Microbe World).

Na podlagi odnosa, ki ga imajo bakterije *E. coli* do svojega gostitelja, razlikujemo komezalne in patogene seve. Komezalni sevi živijo v prebavilu gostitelja v stabilnem sožitju z gostiteljem, medtem ko so patogeni sevi zmožni povzročiti okužbe. Okužbe, ki jih povzroča *E. coli*, so lahko zelo različne, spekter okužb z *E. coli* obsega različne črevesne in zunajčrevesne okužbe, med njimi tudi okužbe kože in mehkih tkiv (Tenaillon in sod., 2010).

## 2.2 VIRULENTNI DEJAVNIKI

Patogeni sevi, torej sevi, ki jih povezujemo z okužbami, imajo zapise za virulentne dejavnike. To so različni dejavniki, ki jim omogočajo virulenco. Virulentnih dejavnikov je veliko in so zelo različni glede na strukturo in funkcijo, ki jo izvajajo. To so lahko različni adhezini (npr. fimbrije tipa 1, P-fimbrije), ki omogočajo pritrdjevanje bakterij na gostiteljeve površinske celične strukture, ali pa invazini (IbeA – Invasion of brain endothelium), ki so proteini na površini bakterijske celice, ki omogočajo vstop bakterije v celico gostitelja. To so lahko različni toksini (npr. citotoksični nekrotizirajoči faktor 1, alfa-hemolizin), ki prispevajo k razvoju okužbe, tako da poškodujejo tkiva ali onemogočajo normalno delovanje imunskega sistema. Lahko so protektini, kot je OmpT, ki služijo kot proteaze, ki režejo tuje peptidne verige v neposredni okolici bakterijske celice. Lahko so dejavniki, ki omogočajo bakteriji izogibanje imunskemu sistemu gostitelja, kot je TcpC, ki se vpleta v delovanje TLR, ter tudi dejavniki, ki jim omogočajo bolj učinkovito izkoriščanje določenih metabolno pomembnih snovi. Taki so recimo sistemi za privzem železa (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2015).

Seve *E. coli*, ki so sposobni povzročiti okužbe kože in mehkih tkiv (sevi SSTI), uvrščamo v skupino sevov *E. coli*, ki lahko povzročajo zunajčrevesne okužbe - ExPEC (Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* – »Zunajčrevesni patogeni (sevi) bakterije *Escherichia coli*«). (Johnson in Russo, 2002). Za skupino ExPEC je značilen točno določen nabor različnih virulentnih dejavnikov. Sevi SSTI so skupina patogenih bakterij *E. coli*, ki je še dokaj neraziskana skupina ExPEC. Prva obširnejša molekularna analiza teh sevov je bila narejena na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov v okviru doktorata Žive Petkovšek. V doktorski nalogi je Živa Petkovšek navedla podatke o prevalenci genov za različne virulentne dejavnike, ki jih je našla pri sevih SSTI, a od sistemov za privzem železa je preučevala samo aerobaktin. O drugih sistemih za privzem železa zaenkrat ne obstajajo podatki o prevalencah. O korelacijah sistemov za privzem železa z drugimi virulentnimi dejavniki prav tako še ni podatkov.

## 2.3 SISTEMI ZA PRIVZEM ŽELEZA

Najpogostejši sistemi za privzem železa so sideroforji. Sideroforji so relativno nizkomolekularni, za železo specifični kelatni agensi, ki jih bakterije in glive uporabljajo v razmerah (okoljskega) stresa zaradi znižane koncentracije dostopnega železa. Vloga teh

spojin je zbiranje železa iz neposredne okolice za potrebe rasti celice. Večina aerobnih in fakultativno anaerobnih mikroorganizmov kaže sposobnost sinteze vsaj enega od znanih sideroforjev, ki so povezani z mehanizmi virulence pri obojih živalskih in rastlinskih patogenih mikroorganizmih. Sideroforji so značilni le za mikroorganizme, saj imajo rastlinski in živalski organizmi sebi lastne načine privzema železa (Neilands, 1995). Sposobnost privzema železa v takšnih razmerah omogoča patogenemu mikrobu uspešno kolonizacijo in kot posledico pojav simptomov ter posledično razvoj bolezni.

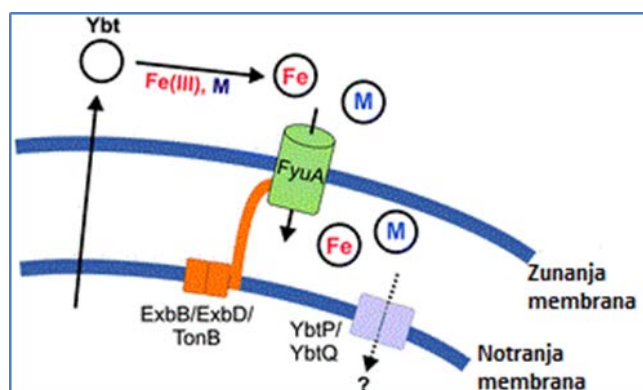
Obstajajo tudi drugi nesideroforni načini privzema železa. V teh primerih bakterije kot vir železa uporabijo hem, ki se lahko nahaja v različnih gostiteljevih proteinih (t. i. hemoproteini, kot je npr. hemoglobin). Za pridobitev hema bakterije sintetizirajo proteine, t. i. hemoforje, ki jih izločajo v okolje, kjer zasegajo hem iz hemoproteinov. Druga možnost so površinski proteinski receptorji za hemoproteine, ki jih imajo bakterije v svoji celični steni. Ti proteinski receptorji vežejo hemoproteine, ki so v bližini bakterijske celice (Wandersman in Delepelaire, 2004).

### 2.3.1 Jersinijabaktin (Ybt)

Jersinijabaktin je sideroforni sistem za privzem železa, ki se pojavlja pri nekaterih taksonih patogenih bakterij, kot so recimo nekateri predstavniki rodu *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. enterocolitica* in druge) ter nekateri enteropatogeni sevi *E. coli* (Perry in sod., 1999).

Jersinijabaktin ima visoko afiniteto do vezave železa in lahko razdre kovinsko vez med železom in proteini gostitelja ter železo prenese do bakterije. Kompleks jersinijabaktin- $\text{Fe}^{3+}$  na bakterijski zunanji strani prepozna receptor FyuA, ki s pomočjo drugih membranskih proteinov omogoča prenos kompleksa skozi membrano v citosol bakterije. V citosolu se železo sprostí s sideroforja in postane dostopno za različne metabolne procese (Perry in sod., 2003). Gen *fyuA* kodira receptor za jersinijabaktin (FyuA) in je zelo pomemben za tvorbo biofilmov v okoljih, revnih z železom, kot je recimo človeški urin (Hancock in sod., 2008).

FyuA je od TonB-odvisni receptor, ki se nahaja na zunanji membrani bakterijske celice. Izražanje gena *fyuA* je uravnavaano z železom. Receptor FyuA deluje tudi kot receptor za bakteriocin pesticin (Rakin, 1994) TonB je transperiplazemski protein, ki reagira z ligand-vezavnimi receptorji na zunanji membrani in omogoča energetsko odvisen prenos substrata (recimo kompleksa jersinijabaktin- $\text{Fe}^{3+}$ ) v periplazemski prostor (Koebnik, 2005), (slika 2).



Slika 2: Prenos kompleksa jersiniabaktin-Fe<sup>+</sup> skozi zunanjo membrano uropatogene bakterije *E. coli* s pomočjo receptorja FyuA v povezavi s TonB (Metallogenics, 2015).

### 2.3.2 Hemoglobinska proteaza (Hbp)

Številne patogene bakterije, med temi tudi patogeni sevi *E. coli*, lahko uporabljajo spojine, ki vsebujejo hem, kot vir železa. Ena izmed hem-vsebujočih spojin je hemoglobin. Hemoglobinska proteaza (Hbp) je encim, ki razgrajuje hemoglobin in obenem deluje kot vezavni protein za molekulo hema. Hbp reagira s hemoglobinom, ga razgradi in potem veže sproščeni hem. Hbp pripada skupini IgA1-proteazam-podobnih proteinov in so njen zapis prvotno našli v velikem plazmidu bakterije *E. coli* pColV-K30. Hbp bi zaradi omenjenih značilnosti lahko obravnavali kot pomembni virulentni faktor, ki ima vlogo v patogenezi *E. coli* (Otto in sod., 1998). Hemoglobinska proteaza (Hbp) deluje najprej kot serinska proteaza, ki razgradi hemoglobin, potem pa kot avtotransporter, ki prenese hem v celico (Otto in sod., 2005).

### 2.3.3 Dvofunkcijski enterobaktinski receptor/adhezin (Iha)

Gen *iha* ima zapis za adhezin (Iha) ki je IrgA-ju homologni protein in ima dve funkciji. Po eni strani je adhezin, ki omogoča vezavo bakterij, po drugi strani pa receptor za sideroforni sistem. Na izražanje gena *iha* negativno vpliva železo, saj zavira ekspresijo (Johnson in sod., 2005). Iha je protein na zunanji membrani bakterije.

### 2.3.4 Virulentni dejavnik, ki ga regulira železo, IreA

Gen *ireA* kodira receptor za vezavo siderofornega sistema IreA. Raziskave so pokazale, da je ekspresija tega proteina 3,6-krat večja v urinu, 16,2-krat večja v ascitesu in 6,6-krat večja v človeški krvi, v primerjavi s pogoji v gojišču LB. Opažena je inhibicija ekspresije gena *ireA* v prisotnosti Fe (Russo in sod., 2001). IreA kaže visoko peptidno podobnost z



drugimi, že opisanimi proteinskimi siderofornimi receptorji, kar kaže na morebitno vpletenost IreA v procese privzema železa.

### 2.3.5 PicU

Gen *picU* kodira protein PicU, ki pripada družini visokomolekularnih serinskih proteaznih avtotransporterjev. Ti prenašalci izvirajo iz enteroagregativnih sevov bakterije *E. coli* (Dutta in sod., 2002). Tej skupini proteinov pravijo SPATE (serinski proteazni avtotransporterji enterobakterij) in jih izločajo po Gramu negativne bakterije po avtotransportni poti. Tarče omenjenih proteinov so različni adhezinski proteini človeških levkocitov. Zanimivi so podatki, da ima PicU-ju sorodna proteaza - protein Tsh/Hbp, v primeru zunajčrevesnih infekcij, podoben spekter substratov kot jih ima PicU (Ruiz-Perez in sod., 2011).

### **3 MATERIAL IN METODE**

#### **3.1 MATERIAL**

##### **3.1.1 Bakterijski sevi**

###### **3.1.1.1 Sevi SSTI**

Sevi SSTI, ki smo jih uporabljali, izvirajo iz zbirke sevov *E. coli* Skupine za molekularno genetiko, Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Sevi SSTI so bili izolirani iz okužb kože in mehkih tkiv pri bolnikih (Arbiter, 2007).

###### **3.1.1.2 Sevi BJ**

Sevi BJ, ki smo jih uporabljali, izvirajo iz zbirke sevov *E. coli* Skupine za molekularno genetiko, Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Sevi BJ so bili izolirani iz fecesa zdravih ljudi (Jesenko, 2011).

##### **3.1.2 Gojišča**

###### **3.1.2.1 Priprava tekočih gojišč Lauria-Bertani (LB)**

Tekoče gojišče LB smo pripravili po naslednjem protokolu. V 0,5 l destilirane vode smo raztopili 12,5 g osnove za gojišče LB. Tako pripravljeno gojišče smo odpipetirali po 5 ml v epruvete in jih potem s postopkom avtoklaviranja (15 min pri 121 °C) sterilizirali. Po sterilizaciji smo epruvete shranili v hladni sobi pri 4 °C do uporabe.

###### **3.1.2.2 Priprava trdnih gojišč LB**

Priprava trdnih gojišč LB, poleg osnove za gojišče LB, vključuje še agar in sicer smo k 12,5 g osnove za gojišče LB v 0,5 l vode dodali še 7 g agarja. Med avtoklaviranjem oz. sterilizacijo se agar v gojišču raztopi, zato po končanem avtoklaviranju gojišče hitro prenesemo v vodno kopel, kjer se shladi do 50 °C. Potem tako shlajeno gojišče v laminariju, ob ognju, razlijemo v plastične petrijevke. Gojišče po prekonočnem ohlajanju in strjevanju do uporabe shranimo pri 4 °C v hladni sobi.

##### **3.1.3 Pufri in reagenti**

###### **3.1.3.1 Agarozna gelska elektroforeza**

Agarozni gel za elektroforezo smo pripravili tako, da smo v 30 ml 0,5 × TBE, glede na potrebno gostoto gela, dodali ustrezno količino agaroze (0,3 g, 0,45 g oz. 0,6 g). Mešanico

smo potem segrevali, dokler se agarozna ni raztopila. Na to smo gel ohladili do 60 °C in mu dodali 1,3 µl etidijevnega bromida (10 mg/ml).

Pripravljen 5 × TBE (0,45 mM Tris-borat, 10 mM EDTA) smo hranili pri sobni temperaturi. Za uporabo smo ga redčili z destilirano vodo do koncentracije 0,5 × TBE.

Nanašalni pufer, ki smo ga uporabljali za vnos vzorca v jamice gela, je vseboval 0,25 % bromfenol modrega, 0,25 % ksilen cianola ter 40 % saharoze.

### 3.1.4 Kemikalije

BIOLABS, Milano, Italija

- standardna DNA-lestevica 100-bp

BIOLIFE, Milano, Italija

- agar
- tripton

BMA, Rockland, ME, ZDA

- agarozna

FERMENTAS

- nanašalni pufer za elektroforezo
- standardna DNA-lestevica 100-bp
- standardna DNA-lestevica 1-kb
- standardna DNA-lestevica 1-kb plus
- mešanica "PCR Master Mix" (0,05 enot/µL *Taq*-polimeraze v reakcijskem pufru: 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dNTP)
- pufer za *Taq*-polimerazo z (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>

KEMIKA, Zagreb, Hrvaška

- EDTA

MERCK, Darmstadt, Nemčija

- 96% alkohol (EtOH)

ROTH, Karlsruhe, Nemčija

- gojišče LB
- agar

SIGMA Chemicals, St. Luis, MO, ZDA

- etidijev bromid (EtBr)

### **3.1.5 Encimi**

FERMENTAS, Vilna, Litva

*Taq*-polimeraza

### 3.1.6 Začetni oligonukleotidi

Preglednica 1: Uporabljeni začetni oligonukleotidi

Oznaka	nukleotidno zaporedje (5' - 3')	Velikost produkta (bp)
Acek f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400
ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA	
ArpAgpE f	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301
ArpAgpE r	GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	
chuA 1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288
chuA 2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
fyuA f	TGATTAACCCCGCGACGGGAA	880
fyuA r	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	
Hbp f	GGTGAAGGTACGCTGACGGT	925
Hbp r	GCGTGACGCTGGAGTTATCT	
iha f	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	827
iha r	TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA	
ireA f	TGGTCTTCAGCTATATGG	415
ireA r	ATCTATGATTGTGTTGGT	
ompT-APEC f	CAGAGTATCTGTCCGGTGCCTCA	581
ompT-APEC r	TACGGTTCCATGTTCTTCGAC	
picU f	TCAGGCCGGTAAGAACAGCAAAAT	372
picU r	ACGGTAAGAGTGTGGATGGCGGAGTC	
trpAgpC 1	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219
trpAgpC 2	TCTGCGCCGGTCACGCCC	
trpBA f	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489
trpBA r	GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	
TspE4C2 1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152
TspE4C2 2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	

### 3.1.7 Oprema

Pri delu v laboratoriju smo uporabljali naslednje aparature:

- avtomatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- centrifuga (Biofuge 13, Heraeus Sepatech, Nemčija; Centrifuge 5415R, 5424, Eppendorf, Nemčija)
- elektroforezne banjice (Mini Sub Cell, Bio-Rad, ZDA; Hoefer™-HE33 (mini horizontal submarine unit))
- usmernik električnega toka (Power Station 300 Plus, Labnet International, ZDA; Electrophoresis power supply consort (300 V - 500 mA) E835, Consort Belgija)
- naprava za slikanje elektroforeznih gelov (transiluminator UVItec Limited 230V – 50/60 Hz UV radiation, St John's innovation centre, Anglija)
- aparatura za PCR (GeneAmp PCR System 2400, 9600, Perkin Elmer, ZDA)
- mešalo vorteks (EV – 100 Tehnica, Železniki, Jugoslavija)
- stresalnik (Innova 2300 Platform –shaker, New Brunswick Scientific, USA)
- tehtnica (ET 1111, Tehnica, Jugoslavija; EXACTA 310 EB, Tehnica, Jugoslavija)
- kuhalnik (Eltac, Nemčija, CL4 TRONIC, Nemčija)
- vodna kopel (Navedi katera firma)
- mikrovalovna pečica (Gorenje, Slovenija)
- avtoklav (Kambič, Slovenija)
- plinski gorilnik (Tlos, Hrvaška)
- magnetno mešalo (Rotamix, Tehnica, Jugoslavija; IKA RCT Standard, IKA, Kitajska)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Gojenje sevov

Seve, shranjene pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , smo najprej nacepili na trdna LB gojišča. Po prekonočni inkubaciji pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  smo naslednji dan po eno kolonijo s površine trdnega gojišča prenesli v 5 ml tekočega gojišča LB v steklenih epruvetah. Epruvete smo potem ponovno čez noč inkubirali in sicer na stresalniku pri temperaturi  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2 Priprava bakterijskih lizatov

En ml prekonočne tekoče kulture posameznih sevov *E. coli* smo prenesli v 1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko in najprej centrifugirali 1 min pri 13.000 obr./min. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant, ne da bi ob tem poškodovali usedlino oz. pelet na dnu mikrocentrifugirke. Usedlino smo resuspendirali v 200  $\mu\text{l}$  destilirane vode in s pipeto premešali. Potem smo suspenzijo bakterijskih celic inkubirali 10 min v vodni kopeli pri  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . S plastičnim "kljuncem" smo zavarovali pokrov mikrocentrifugirke, da se pri kuhanju ne bi odprl in bi se tako lahko vzorec kontaminiral.

Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali in sicer 10 min pri 13.000 obratih/min. Po centrifugiranju smo supernatant, ki je vseboval bakterijsko DNA, previdno odpipetirali v novo mikrocentrifugirko. Le-to smo pravilno označili in do uporabe shranili v skrinji pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda, ki se uporablja za pomnoževanje različno dolgih delov molekule DNA. V procesu se v zaporednih ciklih izvajajo trije koraki: i) denaturacija – ločitev obeh verig DNA, ii) prileganje – vezava začetnih oligonukleotidov in iii) sinteza DNA. Pogosto pred tem cikličnim ponavljanjem naredimo tudi začetno ločevanje verig DNA (začetna denaturacija) in na koncu cikličnega ponavljanja še končno podaljševanje verig DNA (končna sinteza). Vsak od teh korakov se izvaja pri določenih pogojih (ustrezna temperatura in čas). Najpogosteje se za PCR uporablja encim *Taq*-polimeraza. Ta encim sintetizira DNA pri  $72^{\circ}\text{C}$ . Po določenem številu ciklov, običajno od 25 do 40, se pridobi zadostna količina produkta oz. pomnoženega tarčnega zaporedja verige DNA, ki omogoča nadaljnje delo (Žgur-Bertok in Starčič Erjavec, 2009).

#### 3.2.3.1 Začetni test kvalitete lizatov – ERIC-PCR

Za uspešno pomnoževanje DNA s PCR je pomembno, da je matrična DNA pripravljena tako, da omogoča potek reakcije. Zato se vsak lizat pred nadaljnjo uporabo najprej preveri, če je bil ustrezno pripravljen da omogoča pomnoževanje DNA. Z vsakim pripravljenim lizatom se tako naredi PCR, ki zagotovo mora dati pomnožek. Ena izmed takih reakcij je test ERIC-PCR. V tem testu uporabljamo začetne oligonukleotide, ki se vežejo na

zaporedja ERIC. Zaporedja ERIC («Enterobacterial repetitive intergenic consensus») so 127 bp dolga palindromska zaporedja, ki se pojavljajo v večkratnih kopijah v genomih enterobakterij (Versalovic in sod., 1991).

Za 25 µl-reakcijsko mešanico za ERIC-PCR smo uporabili:

- 13,375 µl destilirane vode,
- 2,5 µl pufru za *Taq*-polimerazo brez MgCl<sub>2</sub>,
- 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> s koncentracijo 25 mM,
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida ERIC1R s koncentracijo 20 pmol/µl
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida ERIC2 s koncentracijo 20 pmol/µl
- 0,5 µl mešanice dNTP-jev s koncentracijo 10 mM,
- 0,125 µl *Taq*-polimeraze (5 U/µl),
- 5 µl celičnega lizata

Izvedbo ERIC-PCR smo začeli s pripravo osnovne mešanice za PCR, v katero smo dodali vse sestavine, razen celičnega lizata, v tolikšni količini, da so zadostovale za vse reakcije. Po končani pripravi osnovne mešanice, smo v mikrocentrifugirke odpipetirali po 20 µl osnovne mešanice za PCR. Po tem smo v vsako mikrocentrifugirko dodali po 5 µl posameznega celičnega lizata. Pripravili smo tudi pozitivno kontrolo (dodali smo matrično DNA, ki je vsebovala zaporedje DNA, ki smo ga pomnoževali) in negativno kontrolo (dodali smo sterilno destilirano vodo). Delali smo aseptično, z uporabo rokavic in ob ognju. Posamezne mikrocentrifugirke smo po končani pripravi reakcijskih mešanic postavili na ustreznega nosilec v aparaturi za PCR in izvedli PCR po programu za pomnoževanje DNA (glej preglednico 2).



Preglednica 2: Začetni test kvalitete lizatov z ERIC-PCR

PCR	Začetna oligonukleotida	Velikost produkta (bp)	Program za PCR			Referenca
			94 °C	4 min	1x	
ERIC	ERIC1R ERIC2	različni	94 °C	4 min	1x	Versalovic in sod., 1991
			94 °C	30 sek		
			40 °C	15 sek	35x	
			72 °C	5 min		
			72 °C	7 min	1x	

### 3.2.3.2 Filogenetska PCR

Ta tip PCR omogoča uvrstitev testiranih sevov v posamezne filogenetske skupine. Za naše preučevane seve je metoda ugotavljanja filogenetskih skupin s PCR temeljila na prenovljeni metodi po Clermontu (Clermont in sod., 2013).

Filogenetska PCR smo izvedli v 20- $\mu$ l reakcijski mešanici, ki je vsebovala:

1. V primeru kvadrupleksa:

- 0,4  $\mu$ l dNTP (10 mM)
- 2  $\mu$ l pufra za *Taq* DNA-polimerazo
- 2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 0,5  $\mu$ l *Taq* DNA-polimeraze
- 0,5  $\mu$ l začetnega oligonukleotida Acek.f s koncentracijo 40 pmol/l
- 0,5  $\mu$ l začetnega oligonukleotida ArpA1.r s koncentracijo 40 pmol/l
- 0,5  $\mu$ l začetnega oligonukleotida chuA.1b s koncentracijo 20 pmol/l
- 0,5  $\mu$ l začetnega oligonukleotida chuA.2 s koncentracijo 20 pmol/l
- 0,5  $\mu$ l začetnega oligonukleotida YjaA.1b s koncentracijo 20 pmol/l
- 0,5  $\mu$ l začetnega oligonukleotida YjaA.2b s koncentracijo 20 pmol/l
- 0,5  $\mu$ l začetnega oligonukleotida TspE4C2.1b s koncentracijo 20 pmol/l

- 0,5 µl začetnega oligonukleotida TspE4C2.2b s koncentracijo 20 pmol/l
- 8,1 µl dH<sub>2</sub>O
- 3 µl celičnega lizata

2. V primeru določanja in potrditve skupine C

- 0,4 µl dNTP (10 mM)
- 2 µl pufra za *Taq* DNA-polimerazo
- 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 0,5 µl *Taq* DNA-polimeraze
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida trpAgpC.1 s koncentracijo 20 pmol/l
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida trpAgpC.2 s koncentracijo 20 pmol/l
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida trpBA.f s koncentracijo 12 pmol/l
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida trpBA.r s koncentracijo 12 pmol/l
- 10,1 µl dH<sub>2</sub>O
- 3 µl celičnega lizata

3. V primeru določanja in potrditve skupine E

- 0,4 µl dNTP (10 mM)
- 2 µl pufra za *Taq* DNA-polimerazo
- 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 0,5 µl *Taq* DNA-polimeraze
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida ArpAgpE.f s koncentracijo 20 pmol/l
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida ArpAgpE.r s koncentracijo 20 pmol/l
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida trpBA.f s koncentracijo 12 pmol/l
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida trpBA.r s koncentracijo 12 pmol/l
- 10,1 µl dH<sub>2</sub>O
- 3 µl celičnega lizata

Programi za verižno reakcijo s polimerazo so povzeti v preglednici 3: najprej program za kvadrupleks, potem program za potrditev filogenetske skupine C in na koncu program za potrditev filogenetske skupine E.

Preglednica 3: Programi za verižno reakcijo s polimerazo za kvadrupleks, potrditev skupine C in potrditev skupine E

Geni	Začetni nukleotidi	Velikost produkta (bp)	Program PCR			Referenca
<i>arpA</i>	Acek.f	400	94 °C	4.5 min	1x	Clermont in sod., 2013
	ArpA1.r		94 °C	30 sek		
<i>chuA</i>	chuA.1b	288	59 °C	30 sek	30x	
	chuA.2		72 °C	2 min		
<i>yjaA</i>	YjaA.1b	211	72 °C	5 min	1x	
	YjaA.2b					
TspE4C2	TspE4C2.1b	152				
	TspE4C2.2b					
<i>trpA</i>	trpAgpC.1	219	94 °C	4.5 min	1x	
<i>trpA</i> -interna kontrola	trpAgpC.2	489	94 °C	30 sek		
	trpBA.f		59 °C	30 sek	30x	
	trpBa.r		72 °C	30 sek		
			72 °C	5 min	1x	
<i>arpA</i>	ArpAgpE.f	301	94 °C	4 min	1x	
<i>trpA</i> -interna kontrola	ArpAgpE.r	489	94 °C	1.5 min		
	trpBA.f		59 °C	1.5 min	30x	
	trpBA.r		72 °C	2 min		
			72 °C	5 min	1x	

### 3.2.3.3 PCR za pomnoževanje genov za sisteme privzema železa

Vse reakcije za pomnoževanje genov sistemov za privzem železa smo izvedli v 25- $\mu$ l reakcijskih mešanica, ki so vsebovale:

- 13,375  $\mu$ l destilirane vode
- 2,5  $\mu$ l pufru za *Taq* DNA-polimerazo brez  $MgCl_2$
- 2,5  $\mu$ l  $MgCl_2$  s koncentracijo 25 mM
- 0,5  $\mu$ l ustreznega začetnega oligonukleotida 1 s koncentracijo 20 pmol/ $\mu$ l

- 0,5 µl ustreznega začetnega oligonukleotida 2 s koncentracijo 20 pmol/µl
- 0,5 µl mešanice dNTPjev s koncentracijo 10 mM
- 0,125 µl *Taq* DNA-polimeraze (5 U/ µl)
- 5 µl celičnega lizata

Za vsak preučevan sistem za privzem železa (*fyuA*, *hbp*, *iha*, *ireA* in *picU*) smo uporabili specifični par začetnih oligonukleotidov (glej preglednico 1). Izvedba teh PCR je tekla po protokolu za ERIC-PCR. Programi, ki smo jih uporabili za pomnoževanje odsekov preiskovanih genov za sisteme privzema železa, so navedeni v preglednici 4.

Preglednica 4: Programi za verižno reakcijo s polimerazo za gene *fyuA*, *hbp*, *iha*, *ireA* in *picU*

Gen	Začetna oligonukleotida	Velikost produkta (bp)	Program PCR			Referenca
<i>fyuA</i>	fyuA 1	785	94 °C	2.5 min	1x	Johnson & Stell, 2000; Schubert in sod., 1998
	fyuA 2		94 °C	0.5 min	25x	
			63 °C	0.5 min		
			72 °C	3 min		
	72 °C	10 min	1x			
<i>hbp</i>	Hbp f	925	94 °C	4.5 min	1x	Starčič Erjavec in sod., 2009
	Hbp r		94 °C	0.5 min	35x	
			65 °C	1 min		
			72 °C	1 min		
	72 °C	10 min	1x			
<i>iha</i>	iha f	827	94 °C	4 min	1x	Johnson in sod., 2000
	iha r		94 °C	0.5 min	30x	
			58 °C	0.5 min		
			72 °C	1 min		
	72 °C	8 min	1x			
<i>ireA</i>	ireA f	421	94 °C	2.5 min	1x	Russo in sod., 2001
	ireA r		94 °C	0.5 min	25x	
			55 °C	1 min		
			72 °C	0.5 min		
	72 °C	7 min	1x			
<i>picU</i>	picUf	372	94 °C	2 min	1x	Parham in sod., 2005
	picUr		94 °C	15 sek	30x	
			70 °C	0.5 min		
			72 °C	45 sek		
	72 °C	10 min	1x			

Za ugotavljanje prisotnosti posameznih genov za sisteme privzema železa smo vsako reakcijo izvedli v duplikatih in jo po potrebi ponavljali do nedvoumnosti rezultatov.

### 3.2.4 Gelska agarozna elektroforeza

Za gelsko elektroforezo pomnožkov PCR smo uporabili agarozne gele. Agarozni gel smo pripravili tako, da smo želeno količino agaroze raztopili v 30 ml pufru  $0,5 \times$  TBE s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Pufer z raztopljeno agarozo smo ohladili do  $\approx 60$  °C, dodali etidijev bromid (1,3  $\mu$ l raztopine etidijevega bromida s koncentracijo 10 mg/ml) in razlili v pripravljen plastični model (nosilec), na katerem je postavljen glavnik z ustreznim številom zobcev, glede na to, koliko jamic potrebujemo. Potem smo počakali, da se gel strdi. Ko se je gel strdil, smo previdno odstranili glavnik in nosilec skupaj z gelom prenesli v elektroforezno banjico, ki smo jo pred tem napolnili s pripravljenim pufrom  $0,5 \times$  TBE, ki ga mora v elektroforezni banjici biti toliko, da prekrije zgornjo površino gela. V jamicah ne sme biti zraka. Vzorcem, ki smo jih želeli analizirati, smo dodali nanašalno barvilo in jih vnesli v luknjice gela. Pri vnosu vzorca smo pazili, da se vzorci ne prelivajo v sosednje jamice. Po vnosu vseh vzorcev smo elektroforezno banjico zaprli s pokrovom in jo priklopili na usmerjevalnik električnega toka. Elektroforeza je tekla pri 120 V.

### 3.2.5 Pregledovanje rezultatov PCR

Po končanem pomnoževanju s PCR smo vzorce vnesli v agarozne gele z ustrežno gostoto agaroze in izvedli elektroforezo. Gele smo po končani elektroforezi obsevali z UV lučjo v za to posebej prilagojenih napravah, ki imajo možnost zaznavanja fluorescence, ki izvira iz etidijevega bromida. Z računalnikom, na katerega je snemalna komora priključena, smo upravljali z nastavitvami, ki so nam omogočale čim boljše slike analiziranih vzorcev. Slike smo posneli in shranili za nadaljnjo analizo.

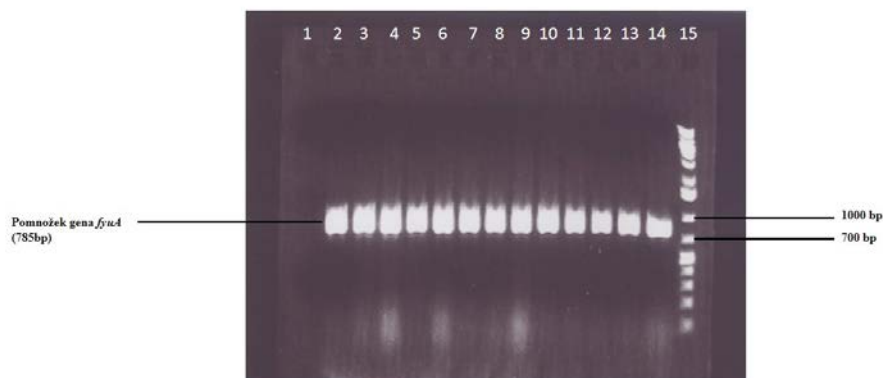
### 3.2.6 Statistična obdelava rezultatov

Dobljene rezultate smo statistično obdelali s pomočjo Fisherjevega natančnega testa, ki je dostopen na medmrežju na spletni strani: <http://www.langsrud.com/fisher.htm>. P-vrednosti dobljene v Fisherjevem natančnem testu smo še korigirali z Bonferronijevo korekcijo.

## 4 REZULTATI

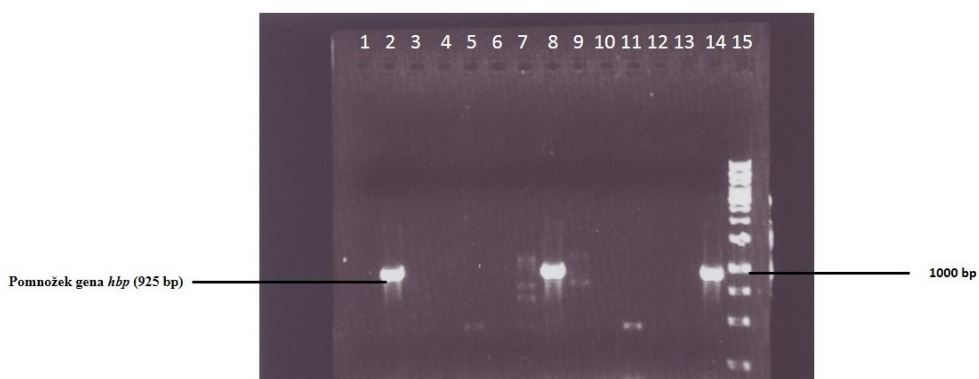
### 4.1 PREVALENCA PREUČEVANIH SISTEMOV ZA PRIVZEM ŽELEZA

Ugotavljali smo prevalenco za naslednje gene sistemov privzema železa: *fyuA*, *hbp*, *iha*, *ireA*, ter *picU*.



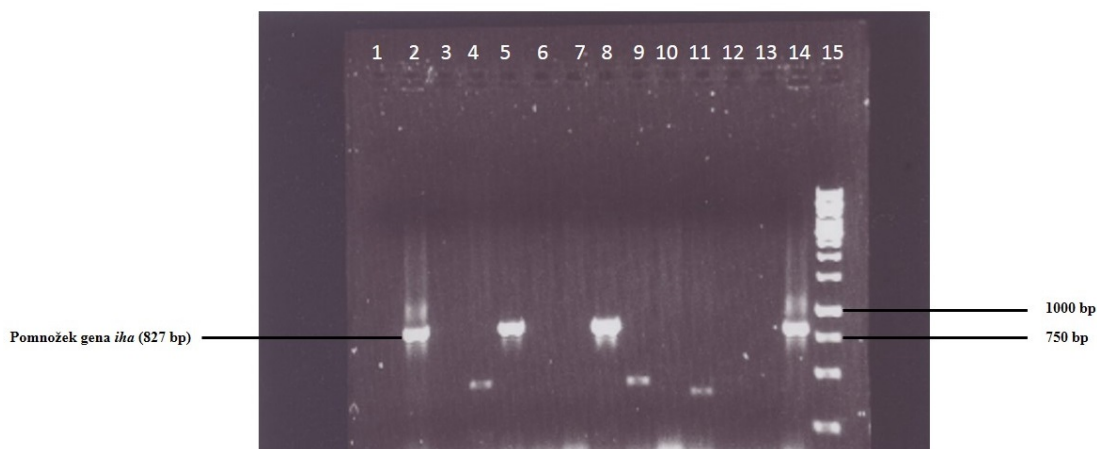
Slika 3: Primeri elektroforeze pomnožkov, pridobljenih v PCR, specifični za gen *fyuA*.

Legenda: : 1 - negativna kontrola (dH<sub>2</sub>O); 2 - *E.coli* BJ34 (pozitivna kontrola); 3 – sev TA70; 4 – sev TA67; 5 – sev TA65; 6 – sev TA60; 7 – sev TA57; 8 – sev TA56; 9 – sev TA55; 10 – sev TA50; 11 – sev TA49; 12 – sev TA46; 13 – sev TA45; 14 – sev TA44; 15 – standardna DNA - lestvica 1-kbp Plus (Fermentas).



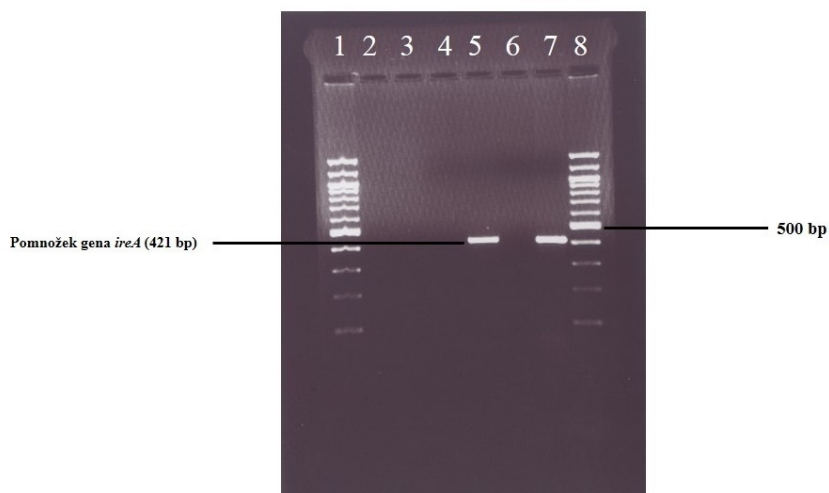
Slika 4: Primeri elektroforeze pomnožkov, pridobljenih v PCR, specifični za gen *hbp*.

Legenda: 1 – negativna kontrola (sterilna destilirana voda); 2 – *E. coli* BJ93 (pozitivna kontrola); 3 – sev TA24; 4 – sev TA20; 5 – sev TA18; 6 – sev TA16; 7 – sev TA11; 8 – sev TA10; 9 – sev TA8; 10 – sev TA7; 11 – sev TA6; 12 – sev TA5; 13 – sev TA3; 14 – *E. coli* BJ93 (pozitivna kontrola); 15 – standardna DNA - lestvica 1-kbp (Fermentas)



Slika 5: Primeri elektroforeze pomnožkov, pridobljenih v PCR, specifični za gen *iha*.

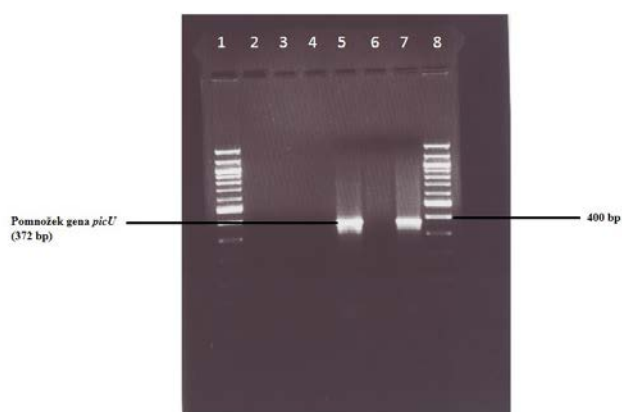
Legenda: 1 – negativna kontrola (sterilna destilirana voda); 2 – *E. coli* BJ11 (pozitivna kontrola); 3 – sev TA162; 4 – sev TA161; 5 – sev TA158; 6 – sev TA157; 7 – sev TA156; 8 – sev TA155; 9 – sev TA147; 10 – sev TA144; 11 – sev TA143; 12 – sev TA142; 13 – sev TA140; 14 – *E. coli* BJ11 (pozitivna kontrola); 15 – standardna DNA - lestvica 1-kbp (Fermentas).



Slika 6: Primeri elektroforeze pomnožkov, pridobljenih v PCR, specifični za gen *ireA*.

Legenda: 1 – standardna DNA - lestvica 100-bp (Biolabs); 2,3 – ni vzorec; 4 – negativna kontrola (sterilna destilirana voda); 5 – *E. coli* BJ34 (pozitivna kontrola); 6 – sev TA65; 7 – sev TA67; 8 – standardna DNA - lestvica 100-bp (Biolabs)





Slika 7: Primeri elektroforeze pomnožkov, pridobljenih v PCR, specifični za gen *picU*.

Legenda: 1 – standardna DNA - lestvica 100-bp (Biolabs); 2,3 – ni bilo vzorcev; 4 – negativna kontrola (sterilna destilirana voda); 5 - sev IVZ8 (pozitivna kontrola); 6 – sev TA209; 7 – sev TA208; 8 – standardna DNA - lestvica 100-bp (Biolabs).

V preglednici so zbrani podatki o prevalencah posameznih preučevanih genov:

Preglednica 5: Prevalence genov za sisteme privzema železa

Gen sistema za privzem železa	Število pozitivnih	%
<i>fyuA</i>	78	76
<i>hbp</i>	5	5
<i>iroCD</i> *	61	60
<i>iucD</i> *	48	47
<i>iha</i>	31	30
<i>ireA</i>	19	19
<i>picU</i>	10	10

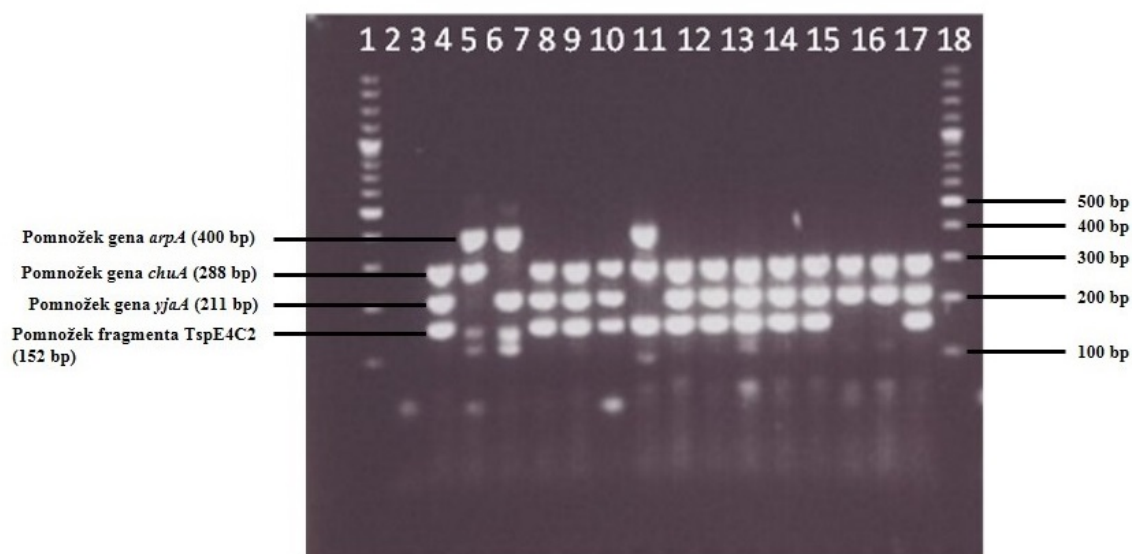
\* podatka sta iz doktorske naloge Žive Petkovšek in sta dodana samo za primerjavo z drugimi.

Iz preglednice je razvidno da je najpogostejši gen *fyuA*, ki smo ga našli pri kar 78 od preiskovanih sevov SSTI, kar pomeni, da je bila njegova prevalenca 76 odstotna.

Najredkeje smo zasledili gen *hbp*, ki smo ga našli le pri 5 od preiskovanih 102 sevov (5 %).

#### 4.2 FILOGENETSKE SKUPINE PO CLERMONT-OVI PRENOVLJENI METODI

Prenovljena Clermont-ova metoda razvršča seve *E. coli* v naslednje filogenetske skupine: A, B1, B2, C, D, E, F in U. Sliko enega izmed agaroznih gelov, ki smo jih uporabili za ugotavljanje filogenetskih skupin kaže slika 8.



Slika 8: Primer elektroforeze pomnožkov, pridobljenih s filogenetsko PCR po prenovljeni Clermontovi metodi (Clermont in sod., 2013)

Legenda: 1 – standardna DNA - lestvica 100-bp (Fermentas); 2 – negativna kontrola (sterilna destilirana voda); 3 – *E.coli* sev TA71 (pozitivna kontrola); 4 – sev TA73; 5 – sev TA72; 6 – sev TA70; 7 – sev TA67; 8 – sev TA65; 9 – sev TA60; 10 – sev TA57; 11 – sev TA56; 12 – sev TA55; 13 – sev TA50; 14 – sev TA49, 15 – sev TA46; 16 – sev TA45; 17 – *E.coli* sev TA71 (pozitivna kontrola); 18 – standardna DNA - lestvica 100-bp (Fermentas).

V prilogi 1 so zbrani podatki o uvrstitvi posameznih preučevanih sevov SSTI v filogenetske skupine. V preglednici 6 so podani podatki o prevalenci posamezne filogenetske skupine med preučevanimi sevi SSTI.

Preglednica 6: Porazdelitev sevov SSTI glede na filogenetske skupine po prenovljeni metodi po Clermontu (Clermont in sod., 2013)

Filogenetska skupina	Število pozitivnih	%
A	10	10
B1	8	8
B2	64	63
C	3	3
D	5	5
E	8	8
F	3	3
U	1	1

Iz preglednice 6 je razvidno, da med vsemi preiskovanimi sevi SSTI največ sevov pripada filogenetski skupini B2. V to skupino smo uvrstili 64 sevov SSTI, kar ustreza 63 % vseh preiskovanih SSTI sevov. Najmanj sevov je bilo uvrščenih v filogenetsko skupino U in sicer le en sev, kar predstavlja 1 % vseh preučevanih sevov SSTI.

#### 4.3 KORELACIJE GENOV ZA SISTEME PRIVZEMA ŽELEZA S FILOGENETSKO SKUPINO

V preglednici 7 so zbrani rezultati analize statistično značilnih korelacij med v nalogi preučevanimi geni za sisteme privzema železa s filogenetskimi skupinami. Posebej sta izpostavljeni dve, ki sta bili statistično značilni, z rdečo je označena pozitivno povezana korelacija, z zeleno je označena negativno povezana korelacija.

Preglednica 7: Korelacije preučevanih sistemov za privzem železa s filogenetsko skupino

Gen za sistem privzema železa	Korelira s filogenetsko skupino	P-vrednost po Fisherjevem natančnem testu	P-vrednost po Bonferronijevi korekciji
<i>fyuA</i>	A	0,006263	0,206679664
	B1	$2,56 \times 10^{-3}$	0,000845371
	B2	$1,45 \times 10^{-10}$	$4,79379 \times 10^{-9}$
	D	0,053553	1,767245581
<i>hbp</i>	A	0,104214	3,439048
	B1	1	33
	B2	0,349979	11,5493
	D	0,581875	19,20189
<i>iha</i>	A	0,337166	11,12646609
	B1	0,053995	1,781832219
	B2	0,374791	12,36811482
	D	0,241296	7,962758951
<i>ireA</i>	A	0,456375	15,06036474
	B1	1	33
	B2	0,186021	6,13868117
	D	0,729767	24,08230132
<i>iroCD</i>	A	0,537256	17,72944
	B1	0,73696	24,31969
	B2	0,096183	3,174024
	D	0,056637	1,869034
<i>iucD</i>	A	0,540938	17,85096021
	B1	0,033756	1,113933483
	B2	1	33
	D	0,586564	19,35662532
<i>picU</i>	A	0,602127	19,8702
	B1	0,593607	19,58903
	B2	0,089209	2,943898
	D	1	33

Edina opazna korelacija med geni za sisteme privzema železa in filogenetsko skupino je bila med *fyuA* in filogenetsko skupino B2. Ugotovljena korelacija je bila zelo močna (P vrednost po Bonferroniju  $4,79379 \times 10^{-9}$ ). Po drugi strani navidezno močna korelacija med *fyuA* in filogenetsko skupino B1 je dejansko negativna korelacija.

#### 4.4 KORELACIJE GENOV ZA PRIVZEM ŽELEZA Z DRUGIMI VIRULENTNIMI DEJAVNIKI

V preglednici 8 so predstavljeni rezultati analize statistično značilnih korelacij med v nalogi preučevanimi geni za sisteme privzema železa in geni drugih virulentnih dejavnikov, za katere je bilo že v predhodnih raziskavah ugotovljeno, da jih imajo ti sevi. Z rdečo je označena pozitivno povezana korelacija, z zeleno je označena negativno povezana korelacija.

Preglednica 8: Korelacije genov za sisteme privzema železa z drugimi virulentnimi dejavniki

Gen za sistem privzema železa	Geni drugih virulentnih dejavnikov	P-vrednost po Fisherjevem natančnem testu	P-vrednost po Bonferronijevi korekciji
<i>fyuA</i>	<i>cnfI</i>	$5,17 \times 10^{-6}$	0,000170453
	<i>hlyA</i>	$5,17 \times 10^{-6}$	0,000170453
	<i>kpsMTII</i>	$3,49 \times 10^{-9}$	$1,15216 \times 10^{-6}$
	<i>ompT</i>	$6,4 \times 10^{-7}$	$2,1135 \times 10^{-5}$
	<i>usp</i>	$1,05 \times 10^{-7}$	$3,45607 \times 10^{-6}$
<i>hbp</i>	<i>ompT<sub>APEC</sub></i>	0,00014	0,004607
	<i>mccV</i>	0,001082	0,035693
<i>iha</i>	<i>papGII</i>	0,000295	0,009722458
	<i>papGIII</i>	0,001294	0,042686677
	<i>iucD</i>	$1,31 \times 10^{-10}$	$4,32093 \times 10^{-9}$
<i>ireA</i>	<i>papGII</i>	$9,35 \times 10^{-7}$	$3,08696 \times 10^{-5}$
<i>iroCD</i>	<i>mccH</i>	0,000492	0,016241
	<i>sfa</i>	0,000196	0,006472
<i>iucD</i>	<i>iha</i>	$1,31 \times 10^{-10}$	$4,32093 \times 10^{-9}$
	<i>papGII</i>	0,000541	0,017864377
	<i>papGIII</i>	$5,36 \times 10^{-6}$	0,000176768
<i>picU</i>	ni korelacij		

Iz preglednice je razvidno, da so najmočnejše korelacije med geni *iha* in *iucD* (in sicer  $4,32093 \times 10^{-9}$  po Bonferroniju), ter *fyuA* in *kpsMTII* ( $1,15216 \times 10^{-6}$  po Bonferroniju). V primeru gena *picU* nismo našli značilnih korelacij.

#### 4.5 PRIMERJAVA PREVALENC SISTEMOV ZA PRIVZEM ŽELEZA MED SEVI SSTI IN SEVI, IZOLIRANIMI IZ BLATA ZDRAVIH LJUDI

V preglednici 9 so zbrani podatki o primerjavi prevalenc genov za sisteme privzema železa med 102 sevoma SSTI in 90 sevi, izoliranimi iz blata zdravih ljudi (sevi BJ). Statistično značilne razlike so obarvane rdeče.

Preglednica 9: Primerjava prevalenc sistemov za privzem železa med sevi SSTI in sevi izoliranimi iz blata zdravih ljudi

Gen za sistem privzema železa	SSTI (N)	SSTI (%)	Sevi iz blata zdravih ljudi (N)	Sevi iz blata zdravih ljudi (%)	P-vrednost po Fischerjevem natančnem testu)	P-vrednost po Bonferronijevi korekciji
<i>fyuA</i>	78	76	59	66	0,1106969	0,774878
<i>hbp</i>	5	5	7	8	0,5527346	3,86914
<i>iha</i>	31	30	35	39	0,2271128	1,58978
<i>ireA</i>	19	19	18	20	0,8557576	5,99030
<i>iro*</i>	61	60	26	29	0,0000225	$1,575 \times 10^{-4}$
<i>iucD</i>	47	46	35	39	0,3805824	2,66407
<i>picU</i>	10	10	3	3	0,0895272	6,26690

\*SSTI so bili testirani na *iroCD*, med tem ko so bili komenzalni sevi (BJ) testirani na *iroN*

Iz primerjave prevalenc genov za sisteme privzema železa, prikazane v preglednici 9, sledi, da je edina očitna in statistično značilna korelacija v primeru genov *iroCDN* (P-vrednost  $1,6 \times 10^{-4}$ ). Ker je prevalenca *iro* pri sevih SSTI občutljivo večja, kot v primeru komenzalnih sevov (BJ), lahko predvidevamo, da edino *iro* lahko kodira potencialni virulentni dejavnik, med tem ko so vsi ostali geni verjetno (le) geni za preživetvene dejavnike. Prevalence ostalih preučevanih genov so dokaj enake pri obeh skupinah sevov.

## 5 DISKUSIJA

Pri naših raziskavah o razširjenosti genov za sisteme privzema železa med 102 sevoma SSTI, smo ugotovili in potrdili, da lahko vse omenjene gene najdemo pri sevih SSTI, ampak različno pogosto. Najbolj pogosta sta bila gena *fyuA* in *iroCD*.

V predhodnih raziskavah sistemov za privzem železa, ki so bile izvedene na patogenih sevih bakterije *E. coli*, in sicer na enteroagregativnih sevih (EAEC), je med ostalimi tudi dokazana visoka prevalenca gena *fyuA*, in sicer so ta gen našli kar v približno 70 % testiranih sevov EAEC (Sobieszczkańska, 2008). V isti raziskavi je dokazana prisotnost tudi gena *iroN*, za katerega je značilno, da močno korelira z *iroCD*, ampak v veliko nižji incidenci. Pri določanju prevalenca sistemov za privzem železa pri sevih SSTI smo opazili še višjo prevalenco gena *fyuA*, in sicer pri 76 % sevov SSTI. Gen *iroCD* pa je bil prisoten v 60 % sevov SSTI. Iz tega sklepamo, da je gen *fyuA* v primeru patogenih sevov *E. coli* v obojih preučevanih sevih SSTI in omenjenih sevih EAEC prisoten s podobno prevalenco. Če temu dodamo pogostost gena *fyuA* pri sevih *E. coli* iz blata zdravih ljudi, ki znaša 60 % teh sevov, postane očitno, da ta gen ne kodira očitnega virulentnega dejavnika, ampak le preživetveni dejavnik, saj je ob majhnih odstopanjih prisoten pri vseh teh skupinah sevov *E. coli*. Po drugi strani gen *iroN*, v zgoraj omenjeni raziskavi (Sobieszczkańska, 2008), ni bil zelo pogost in se je pojavljal s prevalenco v okrog 14 % testiranih sevov EAEC. V primeru preučevanih sevov SSTI je prevalenca gena *iroCD* zmeroma visoka in sicer 60 %. Če še to primerjamo s prevalenco gena *iroN* pri sevih *E. coli*, izoliranih iz blata zdravih ljudi, kjer ta prevalenca znaša 29 %, ugotovimo, da je ob predpostavki močne korelacije med *iroCD* in *iroN*, pogostost *iro* občutljivo višja pri zunajčrevesnih patogenih sevih *E. coli*, kot v primeru črevesnih patogenih sevov. Očitno v prebavilih salmohelin, ki ga kodira *iro*, ni bistveni virulentni dejavnik, v primeru zunajčrevesnih sevov pa postane bolj pomemben. V prid domnevi, da je salmohelin bolj pomemben virulentni dejavnik v zunajčrevesnih sevih, je tudi raziskava patogeneze *E. coli* pri razvoju neonatalnega meningitisa na modelu podgan (Lefranc Nègre in sod., 2004). Dokazali so, da je vsaj v prvi fazi infekcije – v fazi bakteremije, *iroN* ključnega značaja za vzpostavitev infekcije.

Drugi aspekt naše raziskave je bil iskanje korelacij med preiskovanimi geni, ki kodirajo sisteme za privzem železa, in filogenetskimi skupinami. Ugotovili smo, da je bila edina prava korelacija med genom *fyuA* in filogenetsko skupino B2.

V primeru raziskave molekularnega pregleda sevov ExPEC iz vzorcev človeške krvi v Braziliji, je dokazano da je večina sevov *E. coli* pripadala filogenetski skupini B2 (Koga in sod., 2014).

Druga raziskava je pokazala visoko korelacijo med HPI (High pathogenicity island), ki ima zapis za jersiniabaktinski siderfor (Ybt) in filogenetsko skupino B2 pri ExPEC (Schubert in sod., 2002). V primeru preučevanih sevov SSTI smo med sevi imeli kar visoko prevalenco gena *fyuA*, ki kot celični receptor za jersiniabaktin predstavlja sestavni del tega tipa sistema



za privzem železa. Lahko rečemo, da se rezultat, ki smo ga dobili za seve SSTI, ujema z ugotovitvami zgoraj omenjene raziskave. Po drugi strani smo odkrili, da obstaja tudi zelo močna, ampak negativna korelacija med genom *fyuA* in filogenetsko skupino B1.

Za našo skupino 102 sevov SSTI smo določali pripadnost posameznih sevov (SSTI) filogenetskim skupinam in sicer po novi, prenovljeni metodi določanja filogenetskih skupin po Clermont-u (Clermont in sod., 2013). Ugotovili smo, da je porazdelitev približno enaka, kot je bila prej, in sicer da največ sevov SSTI pripada filogenetski skupini B2.

Še en cilj naše raziskave je bil iskanje možnih korelacij med preiskovanimi geni, ki kodirajo sisteme za privzem železa v primeru sevov SSTI *E. coli* in genov za druge virulentne dejavnike. Najmočnejša korelacija, ki smo jo srečali pri preučevanih sevih SSTI, je zabeležena v primeru genov *iha* in *iucD*. Druge raziskave, recimo na uropatogenih sevih *E. coli*, izoliranih iz urinarnega trakta na Japonskem, so tudi pokazale zelo močno korelacijo med genoma *iucD* in *iha* (Kanamaru in sod., 2003). Druga po jakosti korelacija, v primeru sevov SSTI, je bila korelacija med genoma *fyuA* in *kpsMTII*. V primeru sevov SSTI sta opaženi še dve korelaciji in sicer med genoma *fyuA* in *usp* ter med genoma *ireA* in *papGII*.

Po preučevanju razširjenosti genov za privzem železa med sevi SSTI *E. coli* nas je tudi zanimala primerjava med prevalencami enakega nabora genov, ki kodirajo sisteme za privzem železa med sevi iz SSTI in med sevi *E. coli*, ki so bili izolirani iz blata zdravih ljudi in za katere lahko predpostavimo, da so sevi, ki živijo s človekom v mutualističnem odnosu. Primerjava je izpostavila *iro* kot edini statistično značilno drugačen sistem za privzem železa med obema skupinama *E. coli*, saj je šlo za razliko med prevalenco tega gena pri sevih SSTI, kjer je bil zastopan s 60 %, in prevalenco le 29 % pri sevih, izoliranih iz blata zdravih ljudi. Zaradi njegove bolj pogoste prisotnosti med patogenimi sevi, kot med sevi, ki so s človekom v mutualističnem odnosu, lahko rečemo, da je sistem za privzem železa, ki je zapisan v *iro*, možen potencialni virulentni dejavnik.

Prvi cilj naše raziskave je bil določiti prevalenco petih genov, ki kodirajo za različne sisteme privzema železa in sicer *fyuA*, *hbp*, *iha*, *ireA* ter *picU* in te prevalence primerjati s prevalencami istih genov pri sevih *E. coli*, izoliranih iz blata zdravih ljudi. Prva delovna hipoteza, ki smo jo postavili je bila, da so prevalence posameznih sistemov za privzem železa v primeru sevov SSTI večje kot v primeru sevov *E. coli*, izoliranih iz blata zdravih ljudi. Primerjava prevalenc petih omenjenih genov (*fyuA*, *hbp*, *iha*, *ireA* ter *picU*) pri eni in drugi skupini sevov (po izvedenem Fisherjevem natančnem testu in Bonferronijevi korekciji) ni pokazala, da bi omenjeni geni bili statistično bolj pogosti v sevih SSTI kot v sevih, izoliranih iz blata zdravih ljudi. Torej prva hipoteza je s tem zavržena. Če pa vzamemo že obstoječe podatke še o drugih sistemih za privzem železa in njihovimi prevalencami pri eni in drugi skupini sevov, ugotovimo, da edino *iro*, ki kodira salmohelinski sistem za privzem železa, kaže višjo prevalenco pri sevih SSTI kot pri sevih *E. coli*, izoliranih iz blata zdravih ljudi, kar govori v prid prvi hipotezi.

Druga hipoteza je bila, da obstaja statistično pomembna povezava (korelacija) med nekaterimi geni, ki kodirajo sisteme za privzem železa in sicer *fyuA*, *hbp*, *iha*, *ireA* in *picU* in nekaterimi filogenetskimi skupinami ter drugimi virulentnimi dejavniki v sevih SSTI. Naši rezultati so potrdili drugo hipotezo v primeru gena *fyuA*, ki je statistično močno povezan s filogenetsko skupino B2 (s P vrednostjo po Bonferroniju  $4,79379 \times 10^{-9}$ ). V primeru ostalih štirih genov (*hbp*, *iha*, *ireA* in *picU*), rezultati niso pokazali statistično pomembne povezave med temi geni in filogenetskimi skupinami.

Kot že omenjeno, druga hipoteza je vključevala tudi predpostavko, da obstaja statistično pomembna povezava med geni, ki kodirajo sisteme za privzem železa in drugimi virulentnimi dejavniki. Rezultati so predstavljeni v preglednici 7. Glede na rezultate je druga hipoteza potrjena le v primeru genov *fyuA*, *hbp*, *iha* in *ireA*, saj v primeru gena *picU* ni bilo statistično pomembnih korelacij med tem genom in drugimi virulentnimi dejavniki.

## 6 SKLEPI

Pri preučevani skupini 102 sevov SSTI smo glede na dobljene rezultate prišli do naslednjih sklepov:

- Med preučevanjem razširjenosti genov, ki kodirajo sisteme za privzem železa, *fyuA*, *hbp*, *iha*, *ireA*, *iroCD*, *iucD* in *picU* smo pokazali, da je gen *fyuA* najbolj razširjen in prisoten v kar 76 % vseh (102) preučevanih sevov SSTI. Po pogostosti izstopa tudi *iroCD*, toda prisoten je v nekoliko manjši meri kot *fyuA*, in sicer v 60 % preučevanih sevov SSTI.
- Najbolj redek je bil *hbp*, ki smo ga našli le v 5 % preučevanih sevov SSTI.
- S prenovljeno Clermontovo metodo določanja filogenetskih skupin (Clermont in sod., 2013) smo ugotovili, da največ preučevanih sevov SSTI pripada filogenetski skupini B2 in sicer kar 63 %. Najmanj sevov SSTI je pripadalo filogenetskima skupinama F in U. V filogenetsku skupino F smo uvrstili 3 seve, v filogenetsko skupino U pa le en sev.
- Pri preučevanju korelacij med virulentnimi dejavniki (v našem primeru sistemi za privzem železa) in filogenetskimi skupinami smo pokazali, da je gen *fyuA* povezan s filogenetsko skupino B2. Moč korelacije je po izvedeni Bonferroni-jevi korelaciji bila kar  $4,79379 \times 10^{-9}$ .
- Pri iskanju korelacij med preiskovanimi geni, ki kodirajo sisteme za privzem železa, in drugimi virulentnimi dejavniki, smo odkrili, da obstaja veliko korelacij, najmočnejša korelacija pa je med genoma *iha* in *iucD*, ki je po Bonferronijevi korekciji znašala  $4,32093 \times 10^{-9}$ . Nekoliko manj, ampak vseeno močno korelacijo, smo našli med genoma *fyuA* in *usp* (P-vrednost  $3,45607 \times 10^{-6}$ ), med genoma *fyuA* in *kpsMTII* (P-vrednost  $1,15216 \times 10^{-6}$ ), ter med genom *fyuA* in genom *ompT* (P-vrednost  $2,1135 \times 10^{-5}$ ).
- Po primerjavi prevalenc sistemov za privzem železa med sevi SSTI in sevi izoliranimi iz blata zdravih ljudi, smo opazili razliko le v primeru *iro* čigar prevalenca je bila občutljivo večja pri sevih SSTI (pri 60 % sevov) kot v primeru sevov izoliranih iz blata zdravih ljudi (pri 29 % sevov). Sklepamo, da *iro* kodira za edini potencialni virulentni dejavnik, med tem ko so vsi ostali preiskovani geni, ki kodirajo sisteme za privzem železa, prisotni v približno podobnih odstotkih pri obeh skupinah sevov in s tem verjetno kodirajo le preživetvene dejavnike.

## 7 VIRI

- Arbiter T. 2007. Zapisi za sisteme privzema železa in otoke patogenosti v konjugativnih plazmidih izvenčrevesnih sevov *Escherichia coli*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 102 str.
- Clermont O., Christenson J. K., Denamur E., Gordon D. M. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiology Reports*, 5: 58–65
- Darnton N. C., Turner L., Rojevsky S., Berg H.C. 2007. On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189, 5: 1756–1764
- Dutta P. R., Cappello R., Navarro-García F., Nataro J.P. 2002. Functional comparison of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*. *Infection and Immunity*, 70, 12: 7105-7113
- Hacker J., Blum-Oehler G. 2007. In appreciation of Theodor Escherich. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 902
- Hancock V., Ferrières L., Klemm P. 2008. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology*, 154, 1: 167–175
- Howard T. P., Middelhaufe S., Moore K., Edner C., Kolaka D. M., Taylor G. N., Parker D. A., Lee R., Smirnoff N., Aves S. J., Love J. 2013. Synthesis of customized petroleum-replica fuel molecules by targeted modification of free fatty acid pools in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 19: 7636–7641
- Jesenko, B. 2011. Razlikovanje izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi z metodo ERIC-PCR. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 54 str.
- Johnson J. R., Russo T. A., Tarr P. I., Carlino U., Bilge S. S., Vary J. C., Stell A. L. 2000. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN<sub>E.coli</sub>*, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infection and Immunity*, 68, 5: 3040–3047
- Johnson J. R., Stell A.L. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 1: 261–272

- Johnson J.R., Jelacic S., Schoening L. M., Clabots C., Shaikh N., Mobley H. L. T., Tarr P. I, 2005. The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 73, 2: 965–971
- Johnson J.R., Russo T.A., 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139, 3: 155–162
- Koebnik R. 2005. TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends in Microbiology*, 13, 8: 343–347
- Koga V. L., Tomazetto G., Cyoia P. S., Neves M. S., Vidotto M. C., Nakazato G., Kobayashi R. K. T. 2014. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. *BioMed Research International*, 2014: 1-9
- Kubitschek H. E. 1990. Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media. *Journal of Bacteriology*, 172, 1: 94–101
- Lefranc Nègre V., Bonacorsi S., Schubert S., Bidet P., Nassif X., Bingen E. 2004. The siderophore receptor IroN, but not the High-Pathogenicity Island or the hemin receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis. *Infection and Immunity*, 72, 2: 1216–1220
- Madigan M., Martinko J., Bender K., Buckley D., Stahl D. 2015. *Brock Biology of Microorganisms*. 14th edition. Boston, Pearson: 1030 str.
- Medearis Jr. D. N., Camitta B. M., Heath E. C. 1968. Cell wall composition and virulence in *Escherichia coli*. *The Journal of Experimental Medicine*, 128, 3: 399–414
- Messenger A. J. M, Barclay R. 1983. Bacteria, iron and pathogenicity. *Biochemical Education*, 11, 2: 54–63
- Nataro J. P., Kaper J. B., Robins-Browne R., Prado V., Vial P., Levine M. M. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 6: 829–831
- Neilands J.B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 26723–26726
- Otto B. R., van Dooren S. J., Dozois C. M., Luirink J., Oudega B. 2002. *Escherichia coli* hemoglobin protease autotransporter contributes to synergistic abscess formation and heme-dependent growth of *Bacteroides fragilis*. *Infection and Immunity*, 70, 1: 5–10
- Parham N.J., Pollard S.J., Chaudhuri R. R., Beatson S. A., Desvaux M., Russel M. A., Ruiz J., Fivian A., Vila J., Henderson I.R. 2005. Prevalence of pathogenicity island

- IICFT073 genes among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. 43, 5: 2425–2434
- Perry A. 2011. *E. coli* can survive in streambed sediments for months. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service. <http://www.ars.usda.gov/is/pr/2011/110701.htm> (15. sep. 2015)
- Perry R. D., Balbo P. B., Jones H.A., Fetherston J. D., DeMoll E. 1999. Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology*, 145, 5: 1181-1190
- Reshes G., Vanounou S., Fishov I., Feingold M. 2007. Cell shape dynamics in *Escherichia coli*. *Biophysical Journal*, 94, 1: 251–264
- Ruiz-Perez F., Wahid R., Faherty C.S., Kolappaswamy K., Rodriguez L., Santiago A., Murphy E., Cross A., Sztein M. B., Nataro, J. P. 2011. Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 31: 12881-12886
- Russo T. A., Carlino U. B., Johnson J. R. 2001. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 69, 10: 6209–6216
- Schubert S., Picard B., Gouriou S., Heesemann J., Denamur E. 2002. *Yersinia* High-Pathogenicity Island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Infection and Immunity*, 70, 9: 5335–5337
- Schubert S., Rakin A., Karch H., Carniel E., Heesemann J. 1998. Prevalence of the "High-pathogenicity Island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infection and Immunity*, 66, 2: 480–485
- Singleton P. 1999. *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*. 5th edition. Chichester, Wiley: 499 str.
- Sobieszczńska, B.M. 2008. Distribution of genes encoding iron uptake systems among enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from adults with irritable bowel syndrome. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 11: 1083–1086
- Staćič Erjavec M., Arbiter T., Žgur-Bertok D. 2009. Pathogenicity islands, plasmids and iron uptake systems in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Acta Biologica Slovenica*, 52, 2: 73–83

- Starčič Erjavec M, Žgur-Bertok D. 2015. Virulence potential for extraintestinal infections among commensal *Escherichia coli* isolated from healthy humans – the Trojan horse within our gut. *FEMS Microbiology Letters*, 362, 5: 1-9
- Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 207–217
- Versalovic J., T. Koeth, Lupski J. R., 1991, Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes, *Nucleic Acids Research*; 19: 6823-6831
- Wandersman C., Delepelaire P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology*, 58: 611–647
- Žgur-Bertok, D., Starčič Erjavec, M. 2009. Teoretične osnove in navodila za vaje pri predmetu Mikrobna genetika. Ljubljana, Študentska založba: 116 str.

## ZAHVALA

Najlepše bi se zahvalil somentorici prof. dr. Marjanci Starčič Erjavec za potrpljenje, prijazno pomoč, strokovne nasvete in temeljiti pregled diplomskega dela.

Zahvala za temeljiti pregled in nasvete gre tudi mentorici prof. dr. Darji Žgur-Bertok ter recenzentki doc. dr. Blagajani Herzog Velikonja.

Hvala tudi vsemu osebju Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za Biologijo, ki so mi nudili pomoč in podporo.

Hvala vsem prostovoljcem, ki so na direkten ali posreden način prispevali k mojemu diplomskemu delu.

Zahvala gre tudi mojim staršem in prijateljem za vso podporo in potrpljenje.



PRILOGA 1. Sevi SSTI, uvrstitev v filogenetsko skupino in prisotnost genov za sisteme privzema železa.

OZNAKA SEVA	GEN ZA SISTEM PRIVZEMA ŽELEZA					FILOGENETSKA SKUPINA
	<i>fyuA</i>	<i>hbp</i>	<i>iha</i>	<i>ireA</i>	<i>picU</i>	
TA 3	1	0	0	0	0	B2
TA 5	1	0	0	0	0	B2
TA 6	0	0	0	0	0	B1
TA 7	1	0	0	0	0	B2
TA 8	1	0	1	1	0	B2
TA 10	1	1	0	0	0	B2
TA 11	1	0	1	0	1	B2
TA 16	1	0	0	0	0	B2
TA 18	0	0	0	0	0	B1
TA 20	1	0	1	1	0	B2
TA 24	0	0	0	0	0	E
TA 25	1	0	0	0	0	B2
TA 26	1	0	0	0	0	B2
TA 27	1	0	1	0	0	B2
TA 30	0	0	0	1	0	B1
TA 31	1	0	0	0	0	B2
TA 33	0	0	0	0	0	B1
TA 35	0	0	0	0	0	A
TA 36	1	0	1	0	0	E
TA 37	1	0	0	0	0	B2
TA 42	1	0	0	0	0	B2
TA 43	1	0	1	0	0	B2
TA 44	1	0	0	0	0	B2
TA 45	1	0	0	0	0	B2
TA 46	1	0	0	0	0	B2
TA 49	1	0	1	0	0	B2
TA 50	1	0	1	0	0	B2
TA 55	1	0	0	0	0	B2
TA 56	1	0	0	0	1	B2
TA 57	1	0	0	0	1	B2
TA 60	1	0	1	0	0	E
TA 65	1	0	1	0	0	B2
TA 67	1	0	0	1	1	B2
TA 70	1	0	0	0	0	B2
TA 71	1	0	1	0	0	B2
TA 72	1	1	1	1	0	C
TA 73	1	1	0	1	0	E
TA 81	1	0	0	0	0	B2
TA 82	1	0	1	1	0	B2
TA 83	0	0	0	0	0	A
TA 84	0	0	0	0	0	E

OZNAKA SEVA	GEN ZA SISTEM PRIVZEMA ŽELEZA					FILOGENETSKA SKUPINA
	<i>fyuA</i>	<i>hbp</i>	<i>iha</i>	<i>ireA</i>	<i>picU</i>	
TA 85	1	0	1	1	0	B2
TA 91	0	0	0	0	0	D
TA 93	0	0	1	0	0	D
TA 94	1	0	0	1	0	B2
TA 95	1	0	0	1	0	B2
TA 96	1	0	0	1	0	B2
TA 99	1	0	0	0	0	B2
TA 101	1	0	0	0	0	B2
TA 103	0	0	0	0	0	D
TA 106	0	0	0	0	0	B1
TA 107	0	0	1	0	0	E
TA 110	1	0	0	1	1	B2
TA 112	0	0	0	0	0	B1
TA 113	1	0	1	0	0	A
TA 115	1	0	1	0	0	B2
TA 116	1	0	1	1	0	F
TA 117	1	0	0	0	0	D
TA 118	1	0	1	0	0	B2
TA 127	1	0	0	0	0	E
TA 128	0	0	0	0	0	F
TA 129	1	0	1	1	1	B2
TA 130	1	0	1	1	0	B2
TA 131	1	0	1	0	0	B2
TA 133	1	0	0	0	1	B2
TA 136	1	0	0	0	0	B2
TA 140	0	0	0	0	0	A
TA 142	1	0	0	0	0	B2
TA 143	0	0	0	0	0	A
TA 144	0	0	0	0	0	A
TA 147	1	0	0	0	0	B2
TA 155	1	0	1	0	0	B2
TA 156	1	1	0	0	0	C
TA 157	1	1	0	0	0	E
TA 158	1	0	1	0	0	B2
TA 161	1	0	0	0	1	B2
TA 162	1	0	0	0	0	B2
TA 168	0	0	0	0	0	A
TA 169	1	0	0	0	0	B2
TA 171	0	0	0	0	0	A
TA 174	0	0	0	0	0	A
TA 176	0	0	0	0	0	A
TA 178	0	0	0	0	0	B1
TA 179	1	0	0	1	0	B2

OZNAKA SEVA	GEN ZA SISTEM PRIVZEMA ŽELEZA					FILOGENETSKA SKUPINA
	<i>fyuA</i>	<i>hbp</i>	<i>iha</i>	<i>ireA</i>	<i>picU</i>	
TA 180	1	0	1	1	0	U
TA 183	1	0	0	0	1	B2
TA 186	1	0	0	0	0	B2
TA 188	1	0	0	0	0	B2
TA 192	1	0	0	1	1	B2
TA 194	1	0	0	0	0	C
TA 195	1	0	1	0	0	B2
TA 196	1	0	1	0	0	F
TA 198	0	0	0	0	0	D
TA 199	1	0	0	0	0	B2
TA 203	1	0	0	0	0	B2
TA 206	1	0	1	0	0	B2
TA 207	1	0	0	1	0	B2
TA 208	1	0	1	0	0	B2
TA 209	1	0	0	0	0	B2
TA 210	1	0	1	0	0	B2
TA 213	1	0	0	0	0	B2
TA 216	1	0	0	0	0	B1