

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Živa PETKOVŠEK

**IZOLACIJA IN PROTIMIKROBNA AKTIVNOST
KOLICINOV E1 IN E4 BAKTERIJE *Escherichia coli***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Živa PETKOVŠEK

**IZOLACIJA IN PROTIMIKROBNA AKTIVNOST KOLICINOV E1 IN
E4 BAKTERIJE *Escherichia coli***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ISOLATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COLICINS E1
AND E4 OF BACTERIUM *Escherichia coli***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

POPRAVKI:

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za molekularno genetiko na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Darjo Žgur Bertok in za recenzentko prof. dr. Ines Mandić Mulec.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Recenzentka: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor Nekrep
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Darja Žgur Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Ines Mandić Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Živa Petkovšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.61:616.98(043)=863
KG	<i>Escherichia coli</i> /bakteriocini/kolicini/kolicin E1/kolicin E4/izolacija/protimikrobna aktivnost/razvoj odpornosti
AV	PETKOVŠEK, Živa
SA	ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica)/MANDIĆ MULEC, Ines (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2007
IN	IZOLACIJA IN PROTIMIKROBNA AKTIVNOST KOLICINOV E1 IN E4 BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i>
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XIV, 67 str., 17 pregl., 28 sl., 1 pril., 72 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V diplomskem delu smo želeli proučiti protimikrobno aktivnost kolicinov E1 in E4, vendar smo se zaradi številnih težav v postopku izolacije kolicinov nazadnje osredotočili na kolicin E1. Po mehanizmu delovanja je kolicin E1 porotvoren kolicin, medtem ko je kolicin E4 nukleaza. Preko celične ovojnice občutljivih celic se prenašata s translokacijskim sistemom Tol, zato ju uvrščamo med kolicine tipa A. Kolicin E1 se sicer po načinu translokacije nekoliko razlikuje od ostalih kolicinov te skupine. Njegovo učinkovitost smo preverjali na 105 kliničnih izolatih uroseptičnih sevov <i>Escherichia coli</i> . Med 105 proučevanimi sevi je 45 kolicinogenih in 16 % slednjih ima strukturni gen za kolicin E1. Vsi sevi, ki proizvajajo kolicin E1, so se izkazali za neobčutljive na njegovo delovanje. Z metodo nakapljane plošče smo ugotovili, da je med 105 sevi 52 % sevov proti kolicinu E1 odpornih oziroma jih inhibira šele koncentracija kolicina 500 µg/mL ali več. 24 % sevov inhibira koncentracija kolicina 10 µg/mL ali manj. Primerjava deležev odpornih sevov ter tudi deležev sevov, ki jih inhibirajo nizke koncentracije kolicina kaže, da je kolicin E1 manj učinkovito protimikrobno sredstvo kot kolicin K. Metoda proučevanja aktivnosti kolicina E1 v tekočem gojišču je po 24 urah vselej izkazala rast izpostavljenih občutljivih celic. Proučevanje kolicinske aktivnosti po različnih metodah je pokazalo, da med dobljenimi rezultati lahko pride do odstopanj. Ob hkratni izpostavitvi občutljivega seva dvema kolicinoma, kolicinoma E1 in K, se rast nekoliko upočasni, vendar po 24 urah pri kliničnem izolatu ni bistvenih razlik med kontrolno ponovitvijo ter kolicinoma izpostavljeno ponovitvijo. Rast celic ni posledica izgube funkcije kolicinske molekule, pač pa mutacij, ki privedejo do razvoja odpornosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 579.61:616.98(043)=863
CX *Escherichia coli*/bacteriocins/colicins/colicin E1/colicin
E4/isolation/antimicrobial activity/resistance development
AU PETKOVŠEK, Živa
AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/MANDIĆ MULEC, Ines (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2007
TI ISOLATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COLICINS E1 AND E4
OF BACTERIUM *Escherichia coli*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIV, 67 p., 17 tab., 28 fig., 1 ann., 72 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The goal of the presented graduation thesis was to study the antimicrobial activity of colicins E1 and E4. However, due to numerous problems during colicin isolation we finally focused on studying antimicrobial activity of colicin E1. It functions as a pore-forming colicin while colicin E4 exhibits nuclease activity. Both colicins are translocated through the envelope of susceptible cells by the Tol translocation system. Although it is a type A colicin, E1 differs in translocation system from other colicins of this group. The efficiency of colicin E1 against 105 clinical urosepsis isolates of *Escherichia coli* was studied. This collection included 45 colicinogenic strains and we found that 16 % of them encoded a structural gene for colicin E1. All the encoding strains were shown to be resistant to colicin E1. Our results showed that the data, obtained by different methods of studying colicin E1 activity, might differ. A drop plate method revealed that 52 % of tested strains were resistant to colicin E1 or were inhibited by a concentration of at least 500 µg/mL. 24 % of the investigated strains were inhibited by colicin E1 at a concentration of 10 µg/mL or less. Colicin E1 is therefore a less effective antimicrobial means than colicin K which was studied previously. A method of studying colicin activity in liquid medium indicated growth of susceptible cells after 24 hour incubation. Treatment of a susceptible strain with two different colicins, colicin E1 and K, revealed slower growth, however there were no significant differences between a control culture and a culture, treated with two colicins after 24 hours. Our results also showed that the growth of the susceptible strain was not due to loss of colicin activity but was a result of mutations in a susceptible strain that led to resistance.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PRILOG.....	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE.....	1
1.1.1 NAMEN DELA.....	1
1.1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i>	3
2.2 INFEKCIJE URINARNEGA TRAKTA (UTI).....	3
2.3 OPIS KOLICINOV	4
2.3.1 URAVNAVA SINTEZE KOLICINOV	4
2.3.2 PLAZMIDI Col IN NJHOVA ORGANIZACIJA	4
2.3.2.1 Gen <i>cx</i>a - organizacija kolicinske molekule ter opis vloge posameznih domen.....	5
2.3.2.1.1 Vezava na kolicinski receptor.....	6
2.3.2.1.2 Prenos kolicinov	6
2.3.2.1.3 Mehanizem delovanja kolicinov.....	6
2.3.2.2 Gen <i>kil</i>- protein BRP (bakteriocin sprostitveni protein).....	7
2.3.2.3 Gen <i>imm</i>- protein imunosti	7
2.3.2.3.1 <i>imm</i> gen porotvornih kolicinov	7
2.3.2.3.2 <i>imm</i> gen nukleaznih kolicinov	8
2.3.3 ZAŠČITA PRED KOLICINOM	8
2.4 KOLICIN E1.....	9
2.4.1 SPLOŠNI OPIS	9
2.4.2 VNOS KOLICINA E1 PREKO ZUNANJE MEMBRANE IN PERIPLAZME	9
2.4.3 USIDRANJE KOLICINA E1 V CITOPLAZEMSKO MEMBRANO.....	11
2.4.4 BRP – BAKTERIOCIN SPROSTITVENI PROTEIN.....	12
2.4.5 PROTEIN IMUNOSTI.....	13
2.5 KOLICIN E4.....	13
2.5.1 SPLOŠNI OPIS	13
2.5.2 VSTOP V CELICO	14
2.6 KOLICIN K	14
2.6.1 SPLOŠNI OPIS	14
2.6.2 VSTOP V CELICO	14
2.7 UČINEK KOLICINOV NA EVKARIOTSKE CELICE	15
2.8 UPORABA KOLICINOV IN BAKTERIOCINOV	16

3	MATERIALI IN METODE	17
3.1	MATERIAL	17
3.1.1	BAKTERIJSKI SEVI	17
3.1.1.1	Laboratorijski sevi <i>E. coli</i>	17
3.1.1.2	Kolicinogeni sevi iz Pugsleyeve zbirke	17
3.1.1.3	Klinični izolati uroseptičnih sevov <i>E. coli</i> (zbirke sevov H, HS, CH, CHS)	17
3.1.2	PLAZMIDI	18
3.1.2.1	pET8c	18
3.1.2.2	pColK	18
3.1.3	GOJIŠČA	18
3.1.3.1	Tekoče gojišče LB (Luria-Bertani)	18
3.1.3.2	Tekoče gojišče LB z antibiotiki	18
3.1.3.3	Trdo gojišče LB	19
3.1.3.4	Trdo gojišče LB z antibiotiki	19
3.1.3.5	Mehki agar	19
3.1.4	KEMIKALIJE	19
3.1.5	ENCIMI	21
3.1.6	ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI	21
3.1.7	PUFRI IN REAGENTI	21
3.1.8	OPREMA	22
3.2	METODE	23
3.2.1	IZOLACIJA TER PRIDOBIVANJE USTREZNIH KOLIČIN KOLICINA - PRISTOP 1	23
3.2.1.1	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	23
3.2.1.1.1	Priprava celičnega lizata/supernatanta za PCR	23
3.2.1.1.2	PCR reakcija	24
3.2.1.2	Agarozna gelska elektroforeza	26
3.2.1.3	Ekstrakcija DNA iz agaroznega gela s kompletom »QIAQuick« (Qiagen, Hamburg, Nemčija)	26
3.2.1.4	Izolacija plazmidne DNA s kompletom »Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System« (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA)	27
3.2.1.5	Restrikcija z restriktijskima endonukleazama <i>MluI</i> in <i>XhoI</i>	27
3.2.1.6	Ligacija cepljenega fragmenta s cepljenim plazmidom	28
3.2.1.7	Transformacija	28
3.2.1.7.1	Priprava komepetentnih celic DH5α in BL21 (DE3)	28
3.2.1.7.2	Transformacija kompetentnih celic	29
3.2.1.8	Etanolna precipitacija DNA	29
3.2.1.9	Določanje sposobnosti tvorbe kolicina	29
3.2.1.10	Razbijanje celic z ultrazvokom	30
3.2.1.11	Preverjanje aktivnosti kolicinov E1 in E4 – ustreznosti transformant BL21 (DE3) s pET8c – sprožitev izražanja kolicina	30
3.2.1.12	Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja gena <i>colE4</i>	30
3.2.2	IZOLACIJA TER PRIDOBIVANJE USTREZNIH KOLIČIN KOLICINA E1 - PRISTOP 2	32
3.2.2.1	Ugotavljanje ravni sproženja izražanja kolicina E1	32

3.2.2.2	Sproženje izražanja kolicina E1	33
3.2.2.3	Ultrafiltracija	33
3.2.2.4	Določanje koncentracije proteinov	33
3.2.2.5	Hitra proteinska tekočinska kromatografija (FPLC)	34
3.2.2.6	Dializa	34
3.2.2.7	NaDS-poliakrilamidna gelska elektroforeza	34
3.2.3	PREVERJANJE (NE)OBČUTLJIVOSTI RAZLIČNIH UROSEPTIČNIH SEVOV NA RAZLIČNE KONCENTRACIJE KOLICINA E1	35
3.2.3.1	Metoda nakapljane plošče	35
3.2.3.2	Metoda izpostavitve v tekočem gojišču.....	36
3.2.3.3	Metoda mikrotitrskih plošč	36
4	REZULTATI	37
4.1	IZOLACIJA TER PRIDOBIVANJE USTREZNIH KOLIČIN KOLICINA - PRISTOP 1	37
4.1.1	POMNOŽEVANJE FRAGMENTOV Z METODO PCR	37
4.1.2	RESTRIKCIJA FRAGMENTOV IN VEKTORSKEGA PLAZMIDA.....	38
4.1.3	UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI GENA <i>colE1</i> MED KOLICINOGENIMI SEVI ZBIRKE UROSEPTIČNIH SEVOV	39
4.1.3.1	Restrikcija genov <i>colE1</i> iz kliničnih izolatov	41
4.1.4	PREVERJANJE KOLICINSKE AKTIVNOSTI	41
4.2	IZOLACIJA TER PRIDOBIVANJE USTREZNIH KOLIČIN KOLICINA E1 -PRISTOP 2	41
4.2.1	SPROŽITEV IZRAŽANJA KOLICINA E1	41
4.2.2	HITRA PROTEINSKA TEKOČINSKA KROMATOLOGRAFIJA (FPLC)..	42
4.2.2.1	Ugotavljanje aktivnosti različnih frakcij FPLC v pufru Tris-Cl pH 8	45
4.2.2.2	Ugotavljanje aktivnosti različnih frakcij FPLC v pufru Tris-Cl pH 6	45
4.2.2.2.1	Ugotavljanje čistosti frakcij FPLC v pufru TRIS-Cl pH 6.....	46
4.2.3	PREVERJANJE (NE)OBČUTLJIVOSTI UROSEPTIČNIH SEVOV NA RAZLIČNE KONCENTRACIJE KOLICINA E1	46
4.2.3.1	Metoda razlivanja na plošče LB.....	46
4.2.3.2	Metoda izpostavitve uroseptičnih sevov kolicinu v tekočem gojišču	48
4.2.4	UGOTAVLJANJE RAZVOJA ODPORNOSTI OB HKRATNI IZPOSTAVITVI CELIC DVEMA KOLICINOMA.....	51
4.2.4.1	Preverjanje vzrokov za rast občutljivega seva v gojišču z dodanim kolicinom po 24 urah.....	54
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	56
5.1	PRIDOBIVANJE ZADOSTNIH KOLIČIN KOLICINA ZA NADALJNJE TESTIRANJE NJEGOVE UČINKOVITOSTI PROTI UROSEPTIČNIM SEVOM ZBIRK H, HS, CH, CHS	56
5.1.1	PRISTOP 1	56
5.1.1.1	Kolicin E1	56
5.1.1.2	Kolicin E4	57
5.1.2	PRISTOP 2	58
5.2	TESTIRANJE UČINKOVITOSTI KOLICINA E1 PROTI UROSEPTIČNIM SEVOM ZBIRK H, HS, CH, CHS	58

5.2.1	METODA NAKAPLJANE PLOŠČE	58
5.2.2	METODA IZPOSTAVITVE KOLICINU V TEKOČEM LB	59
5.3	RAZVOJ ODPORNOSTI OBČUTLJIVIH SEVOV PROTI KOLICINU E1 TER V KOMBINACIJI DVEH KOLICINOV – KOLICINA E1 IN K.....	60
5.4	SKLEPI	61
6	POVZETEK	62
7	VIRI.....	63
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Laboratorijski sevi <i>E. coli</i>	17
Preglednica 2: Kolicinogena seva iz Pugsleyeve zbirke.	17
Preglednica 3: Koncentracije antibiotikov v gojišču LB.....	18
Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo gena <i>colE1</i>	24
Preglednica 5: Začetni nukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo gena <i>colE4</i>	24
Preglednica 6: Standardna PCR mešanica.....	25
Preglednica 7: »High Fidelity PCR Enzyme mix« - PCR mešanica.	25
Preglednica 8: »Vent« PCR mešanica.....	25
Preglednica 9: PCR mešanica za potrjevanje transformacije ter ugotavljanje razširjenosti gena za kolicin E1 med kolicinogenimi sevi iz uroseptične zbirke.	25
Preglednica 10: Restrikcija plazmida z restrikcijskima endonukleazama <i>MluI</i> in <i>XhoI</i>	28
Preglednica 11: Restrikcija fragmenta (kolicinskega gena) z restrikcijskima endonukleazama <i>MluI</i> in <i>XhoI</i>	28
Preglednica 12: Ligacija cepljenega fragmenta (gena) s cepljenim plazmidom.	28
Preglednica 13: Mešanica za določanje nukleotidnega zaporednja izbranega dela DNA...	30
Preglednica 14: Kolicinogeni sevi iz uroseptične zbirke sevov, ki imajo zapis za tvorbo kolicina E1.	40
Preglednica 15: Sinteza kolicina pod inducibilnimi ter neinducibilnimi pogoji.	41
Preglednica 16: Ugotavljanje kolicinske aktivnosti posameznih frakcij FPLC pri pH 8.	45
Preglednica 17: Ugotavljanje kolicinske aktivnosti posameznih frakcij FPLC pri pH 6.	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Organizacija genov v kolicinskem operonu (Šmarda in Šmajš, 1998).	5
Slika 2: Splošna organizacija domen kolicinske molekule (Baty in sod., 1988; Šmarda in Šmajš, 1998).	5
Slika 3: Model vezave kolicina E1 na receptor (Zakharov in Cramer, 2002).	10
Slika 4: Shematski potek nastanka kolicinskega kanala (Zakharov in Cramer, 2002).	11
Slika 5: Shematski model predpostavke, da je vstavev porotvorne domene kolicina E1 v membrano <i>in vitro</i> odvisna od pH. (Davidson in sod., 1985).	12
Slika 6: Model translokacije kolicina E1 preko celične ovojnice v odsotnosti proteina imunosti (A) ter v prisotnosti proteina imunosti (B) (Song in Cramer, 1991).	13
Slika 7: Mehanizem vstopa kolicina A v občutljivo celico (Lazzaroni in sod., 2002).	15
Slika 8: Velikosti genov <i>colE1</i> in <i>colE4</i> pred restrikcijo (PCR pomnožek).	37
Slika 9: Gena <i>colE1</i> in <i>colE4</i> po cepitvi z restriktazama <i>MluI</i> in <i>XhoI</i>	38
Slika 10: Gen <i>colE1</i> po cepljenju z restriktazama <i>MluI</i> in <i>XhoI</i>	38
Slika 11: Ugotavljanje razširjenosti kolicina E1 med kolicinogenimi sevi.	39
Slika 12: Kromatogram FPLC, izveden pri pH 8.	43
Slika 13: Kromatogram FPLC, izveden pri pH 6.	44
Slika 14: NaDS gelska elektroforeza frakcij, pridobljenih s FPLC pri pH 6.	46
Slika 15: MIC seva, dobljena z metodo nakapljanje plošče.	47
Slika 16: Število uroseptičnih sevov <i>E. coli</i> s pripadajočo minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC); rezultati so bili pridobljeni z metodo razlivanja sevov na plošče in nakapljanjem različnih koncentracij kolicina E1.	47
Slika 17: Primerjava občutljivosti sevov <i>E. coli</i> na kolicin E1 in kolicin K (Rijavec in sod., 2007).	48
Slika 18: Rast uroseptičnega seva H78 v tekočem gojišču ob prisotnosti različnih koncentracij kolicina E1 v 6 urah.	49
Slika 19: Rast uroseptičnega seva H78 v tekočem gojišču ob prisotnosti različnih koncentracij kolicina E1 v 24 urah.	49
Slika 20: Rast uroseptičnega seva HS27 v tekočem gojišču ob prisotnosti različnih koncentracij kolicina E1 v 6 urah.	50
Slika 21: Rast uroseptičnega seva H4 v tekočem gojišču ob prisotnosti različnih koncentracij kolicina E1 v 6 urah.	50
Slika 22: Rast uroseptičnega seva H30 v tekočem gojišču ob prisotnosti različnih koncentracij kolicina E1 v 6 urah.	51
Slika 23: Rast uroseptičnega seva H78 v tekočem gojišču ob prisotnosti kolicina E1 in kolicina K ter ob prisotnosti obeh kolicinov hkrati. Meritve so opravljene po 3 h, 6 h, 9 h in 24 h.	52
Slika 24: Rast laboratorijskega seva DH5 α v tekočem gojišču ob prisotnosti kolicina E1 in kolicina K ter ob prisotnosti obeh kolicinov hkrati. Meritve so opravljene po 3 h, 6 h, 9 h in 24 h.	52
Slika 25: Rast uroseptičnega seva H78 v tekočem gojišču ob prisotnosti kolicina E1 in kolicina K ter ob prisotnosti obeh kolicinov hkrati. Meritve so bile opravljene na vsake 3 h, 24 ur.	53

Slika 26: Rast laboratorijskega seva DH5 α v tekočem gojišču ob prisotnosti kolicina E1 in kolicina K ter ob prisotnosti obeh kolicinov hkrati. Meritve so bile opravljene na vsake 3 h, 24 ur.	53
Slika 27: Rast uroseptičnega seva H78, prenešenega iz gojišča s kolicinoma E1 in K po 24 urah.	54
Slika 28: Rast laboratorijskega seva DH5 α , prenešenega iz gojišča z dodanima kolicinoma E1 in K po 24 urah.	55

KAZALO PRILOG

- Priloga A.** Cone lize uroseptičnih sevov *E. coli* iz zbirke H, HS, CH in CHS. Rezultati so pridobljeni z metodo nakapljane plošče.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ap	ampicilin
APS	amonijev persulfat
AU	arbitrarna enota
bp	bazni par
BRP	bakteriocin sprostitveni protein (Bacteriocin Release Protein)
BtuB	vitamin B ₁₂ -vezavni receptor
CFU	kolonijska enota (Colony Forming Unit)
CH	uroseptični sevi, izolirani iz otrok, identificirani s hemokulturo
CHS	uroseptični sevi, izolirani iz otrok, identificirani s hemokulturo in metodo po Sanfordu
<i>cka</i>	strukturni gen, ki kodira kolicin K
<i>colE1</i>	strukturni gen, ki kodira kolicin E1
ColE1	kolicin E1
ColE1-f	vodilni začetni oligonukleotid (»forward«) za namnoževanje gena <i>colE1</i>
ColE1-r	povratni začetni oligonukleotid (»reverse«) za namnoževanje gena <i>colE1</i>
<i>colE4</i>	strukturni gen, ki kodira kolicin E4
ColE4	kolicin E4
ColE4-f	vodilni začetni oligonukleotid (»forward«) za namnoževanje gena <i>colE4</i>
ColE4-r	povratni začetni oligonukleotid (»reverse«) za namnoževanje gena <i>colE4</i>
ColK	kolicin K
<i>cx</i>	strukturni gen, ki kodira nedefinirani kolicin
Cy5-ddNTP	dideoksiribonukleotid trifosfat, označen s cianinom
Da	dalton
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNaza	encim, ki cepi molekule DNA
dNTP	deoksiribonukleozid trifosfat
DTT	ditiotreitrol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EtBr	etidijev bromid
FPLC	hitra proteinska tekočinska kromatografija (Fast Protein Liquid Chromatography)
GRAS status	status, ki označuje varna živila (Generally Recognized As Safe)
H	uroseptični sevi, identificirani s hemokulturo
His	histidin
HS	uroseptični sevi, identificirani s hemokulturo in metodo po Sanfordu
<i>imm</i>	strukturni gen, ki kodira protein imunosti
IPTG	izopropil-beta-D-tiogalaktopiranozid
kb	kilo baze (število baz × 1000)
<i>kil</i>	strukturni gen, ki kodira bakteriocin sprostitveni protein
LB	gojišče Luria-Bertani
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (Minimum Inhibitory Concentration)

MIC ₉₀	minimalna inhibitorna koncentracija, pri kateri je inhibirana rast 90 % bakterij testirane vrste
v	frekvenca (pojavljanja mutacij)
NaDS	natrijev dodecilsulfat
Nal	nalidiksična kislina
obr./min	obrati na minuto
OD	optična gostota
OD ₆₀₀	optična gostota pri 600 nm
OD ₅₆₂	optična gostota pri 562 nm
pI	izoelektrična točka
PCR	verižna reakcija s polimerazo
Rif	rifampicin
RNA	ribonukleinska kislina
RNaza	encim, ki cepi molekule RNA
rRNA	ribosomalna RNA
rRNaza	encim, ki cepi molekule rRNA
Ser	serin
TBE	Tris-boratni elektroforezni puffer
Tc	tetraciklin
TEMED	N,N,N,N – tetrametil-etilendiamin
tRNA	prenašalna RNA
Tsx	integralni protein zunanje membrane, ki deluje kot kanalček za vnos deoksinukleozidov
UTI	infekcije urinarnega trakta
UV	ultravioletska svetloba

1 UVOD

Odkritje penicilina leta 1928 predstavlja pomemben mejnik v boju proti nalezljivim boleznim. L. 1943 je penicilin postal široko dosegljiv in uporaben; z njegovo pomočjo so premagali najpogostejši vzrok smrti v vojnem času – okužene rane. Odkritju prvega antibiotika je sledilo odkritje ter razvoj preko 100 antibiotikov, učinkovitih proti širokemu spektru človeških pa tudi živalskih patogenih bakterij. Zahvaljujoč penicilinu je umrljivost otrok za pljučnico v Ameriki med letoma 1939 in 1996 upadla za 97 % (Lewis, 1995; Dowell in sod., 2000; Gillor in sod., 2005).

Že 4 leta po začetku masovne proizvodnje in uporabe penicilina so rezultati testiranj kazali rast mikrobov kljub prisotnosti penicilina. V naslednjih letih se je število bakterij, odpornih proti penicilinu ter ostalim antibiotikom, še povečevalo. Dandanes številne raziskave potekajo v smeri odkrivanja in razvoja novih antibiotikov, učinkovitih proti multiodpornim bakterijam (bakterijam, odpornim proti več antibiotikom). Čedalje bolj pa narašča tudi zanimanje za alternativna protimikrobna sredstva – bakteriofage, probiotične bakterije, naravne rastlinske izvlečke in bakteriocine (Lewis, 1995; Nascimento in sod., 2000; Reid in sod., 2003; Weber-Dabrovska in sod., 2003; Gillor in sod., 2005).

Kolicini so daleč najboljše proučena skupina bakteriocinov. V predhodnih raziskavah so se že izkazali kot učinkovita protimikrobna sredstva. Citotoksično delovanje je dokazano proti številnim uropatogenim ter diarejogenim sevom *Escherichia coli*; med drugim tudi proti serotipu O157:H7. Z uporabo kolicinov v boju proti patogenim bakterijam bi razširili spekter protimikrobnih učinkovin, s kombinacijo z drugimi protimikrobnimi sredstvi pa bi otežili razvoj odpornosti ter povečali spekter delovanja (Murinda in sod., 1996; Trautner in sod., 2005; Schamberger in sod., 2006; Rijavec in sod. 2007).

Kolicina E1 in E4 imata nekaj skupnih lastnosti (uporabljata isti primarni receptor, v celico se preneseta preko sistema Tol), vendar se razlikujeta po mehanizmu delovanja. Kolicin E1 je protovoren kolicin in citotoksično lahko deluje le z zunanje strani celice (proizvajalsko celico mora najprej zapustiti), medtem ko je kolicin E4 rRNA endonukleaza in v odsotnosti proteina imunosti lahko takoj kritično poškoduje nukleinsko kislino proizvodilne celice. Kolicin E1 je zelo dobro proučen, kolicin E4 pa slabše. Raziskave v zvezi z rRNA endonukleaznimi kolicini potekajo večinoma na kolicinu E3, na podlagi ugotovitev pa sklepamo o delovanju kolicina E4.

1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

1.1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, v kolikšni meri sta kolicina E1 in E4 učinkovita proti uroseptičnim sevom bakterijske vrste *E. coli*. Kolicinsko aktivnost smo testirali na klinično izoliranih sevih. Zanimalo nas je, kolikšen delež testiranih sevov je občutljiv na dodani kolicin ter kolikšne koncentracije so potrebne za inhibicijo rasti. Želeli smo tudi preveriti, kolikšna je učinkovitost obravnavanih kolicinov v kombinaciji s še kakšnim protimikrobnim sredstvom.

1.1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Naše predpostavke so bile sledeče:

- metoda izolacije rekombinantnega kolicina z dodanim histidinskim repkom omogoča pridobitev čistega kolicina.
- uroseptični sevi *E. coli* se razlikujejo po občutljivosti na kolicin E1 in na kolicin E4;
- kolicin E1 ima podobno protimikrobno aktivnost kot kolicin K;
- različne metode izpostavitve celic istemu kolicinu privedejo do enakih podatkov o minimalni inhibitorni koncentraciji;
- pri izpostavitvi celic dvema kolicinoma hkrati, je rast proučevanih sevov učinkoviteje inhibirana, kot v primeru izpostavitve enemu kolicinu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) je po gramu negativna nesporogena paličasta bakterija, velikosti $1,1-1,5 \mu\text{m} \times 2,0-6,0 \mu\text{m}$. Ime je dobila po odkritelju, bakteriologu Theodoru Escherichu. Po Bergeyevem priročniku jo uvrščamo med γ -proteobakterije, v družino *Enterobacteriaceae* (Scheutz in Strockbine, 2005).

Večinoma je gibljiva s peritrihimi flageli. Nekateri sevi imajo tudi fimbrije, ki sodelujejo pri pritrjevanju bakterije na gostiteljsko celico, ter pile, ki sodelujejo pri izmenjavi genetskega materiala med dvema celicama. Pri nekaterih sevih najdemo tudi kapsulo.

Kromosom je krožen, pogosti so izvenkromosomski elementi DNA – plazmidi. Velikost genoma med različnimi sevi variira od $4,6 \times 10^6$ bp do $5,3 \times 10^6$ bp, razlike pa so tudi v številu genov (Blattner in sod., 1997).

E. coli je fakultativno anaerobna, kemoorganotrofna bakterija. Energijo lahko pridobiva z respiratornim ali fermentativnim metabolizmom. Prehransko je nezahtevna, saj kot vir ogljika lahko uporablja številne snovi. Optimalno raste pri 37°C . Živi v črevesju človeka in drugih toplokrvnih živali, najdemo pa jo tudi v zemlji in vodi. Otrokov prebavni trakt kolonizira v prvih urah po porodu. V prebavilih ščiti črevo pred vdorom patogenih bakterij ter proizvaja vitamin K in vitamine skupine B (Nataro in Kaper, 1998; Madigan in sod., 2003).

Patogeni sevi *E. coli* povzročajo različna obolenja. Najpogosteje povzročajo okužbe, kot so infekcije urinarnega trakta (UTI), sepsa, driska, pljučnice, vnetje možganske ovojnice, vnetje potrebušnice, vnetje prsi. Glede na mehanizem patogeneze ločimo enterotoksigene (ETEC), enteropatogene (EPEC), enterohemoragične (EHEC), enteroinvazivne (EIEC) ter enteroagregativne (EAaggEC) seve.

2.2 INFEKCIJE URINARNEGA TRAKTA (UTI)

Infekcija urinarnega trakta (UTI) je bakterijska okužba, ki prizadene kateri koli del urinarnega trakta. Če je organizem zdrav, bakterij v urinu ni. Ko pa pride do okužbe mehurja ali ledvic, se bakterije množijo v urinu in povzročijo UTI.

Infekcije urinarnega trakta so med najpogostejšimi bakterijskimi okužbami človeka. V 75 – 85 % primerov te okužbe povzročajo patogeni sevi *E. coli*. Najpogostejše bolezni, ki spremljajo infekcije urinarnega trakta, so uretritis (vnetje sečnice), cistitis (vnetje mehurja), akutni in kronični pielonefritis (vnetje ledvic) ter pri moških prostatitis (vnetje prostate). Epidemiologija okužb je odvisna od spola (pri ženskah je UTI pogostejša), starosti in pravilne razvitosti urinarnega trakta (Nicolle, 2002).

2.3 OPIS KOLICINOV

Kolicini so toksični eksoproteini, ki jih tvorijo bakterije kolicinogenih sevov *E. coli* in nekatere sorodne vrste iz družine *Enterobacteriaceae*. Njihova naloga je zaviranje rasti sorodnih vrst. Opisanih je več kot 34 tipov kolicinov. Približno 35 % sevov vrste *E. coli*, ki se pojavljajo v človekovem intestinalnem traktu, je kolicinogenih (Riley, 1993; Šmarda in Šmajš, 1998; Cursino in sod., 2002).

Pod stresnimi pogoji se inducira manjši ali večji del potencialno kolicin sintetizirajočih celic. Te začnejo proizvajati toksični protein – kolicin, ki se sprosti z lizo proizvajalske celice. Sproščeni kolicin je letalen za vse okoliške bakterije, ki nanj niso imune, odporne ali tolerantne (Riley, 1993).

2.3.1 URAVNAVA SINTEZE KOLICINOV

Sintezo kolicinov uravnavajo številni mehanizmi. Tvorbo večine kolicinov sproži aktivacija sistema SOS. Slednji je udeležen v uravnavi izražanja genov, ki sodelujejo pri popravilu poškodovane DNA. Prepisovanje kolicinov tako lahko sprožimo z dodajanjem mitomicina C v gojišče ali z UV sevanjem. Pod normalnimi pogoji se sinteza kolicina v večini celic ne vrši; v majhnem deležu populacije pa prepisovanje poteka kot posledica naključne spontane aktivacije sistema SOS. V primeru sprožitve prepisovanja kolicinskega gena se sinteza poveča tudi do tisočkrat (Ebina in sod., 1982; Šmarda in Šmajš, 1998).

Sintezo kolicinov poleg sistema SOS uravnavajo tudi drugi dejavniki – nespecifična katabolna represija, anaerobioza, velika gostota populacije, odziv na pomanjkanje hranil (stringent response) (Lotz, 1978; Ebina in Nakazawa, 1983; Salles in sod., 1987; Eraso in Weinstock, 1992; Šmarda in Šmajš, 1998).

2.3.2 PLAZMIDI Col IN NJIHOVA ORGANIZACIJA

Sinteza kolicinov je zapisana v genih, ki se nahajajo na ti. plazmidih Col. Glede na velikost, število kopij na celico ter sposobnost neodvisnega prenosa z mehanizmom konjugacije jih delimo v 2 skupini:

skupina I: majhni plazmidi (3 – 6 Mda), ki se v celici nahajajo v številnih kopijah (15-30 spontanih kopij brez sprožitve namnoževanja) in se ne prenašajo s konjugacijo;

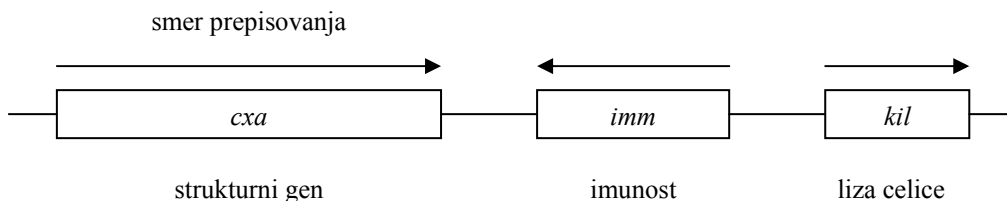
skupina II: veliki plazmidi (70 – 90 Mda) v le nekaj kopijah na celico, nezmožni amplifikacije, vendar pogosto zmožni konjugativnega prenosa (Riley, 1993; Šmarda in Šmajš, 1998).

Plazmid Col ima strukturni gen za kolicin (*cx*a; kjer je x specifični kolicin; npr. *caa* kodira ColA), gen za specifično imunost proti kodiranemu kolicinu (*imm*), ki proizvajalke kolicina ščiti pred njegovo citotoksično aktivnostjo, ter v primeru skupine I še *kil* gen, ki kodira BRP (bakteriocin sprostitveni protein) – ta omogoči sprostitvev kolicina iz celice (van der Wal in sod., 1995; Šmarda in Šmajš, 1998).

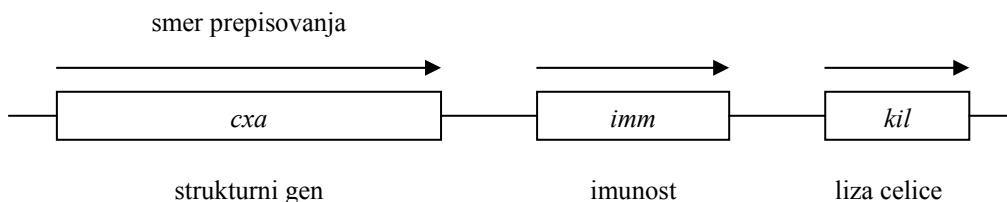
Organizacija genov na plazmidu Col je odvisna od mehanizma delovanja zapsanega kolicina. Gen za specifično imunost (*imm*) se pri kolicinih, ki tvorijo pore, prepisuje

konstitutivno in v nasprotni smeri glede na strukturni (*cx*) in lizirajoči gen (*ki*). Pri kolicinih z nukleazno aktivnostjo pa je *imm* gen orientiran v smeri transkripcije preostalih dveh genov in se prepisuje hkrati z njima (slika 1, Šmarda in Šmajš, 1998).

Kolicini, ki tvorijo pore:



Kolicini z nukleazno aktivnostjo:



Slika 1: Organizacija genov na plazmidu Col. Gen za imunost se nahaja med strukturnim genom za kolicin in genom celične lize. Pri porotvornih kolicinih se prepisuje v nasprotno smer, pri nukleaznih genih pa v isto glede na preostala dva gena (Šmarda in Šmajš, 1998).

2.3.2.1 Gen *cx* - organizacija kolicinske molekule ter opis vloge posameznih domen

Glede na pripadajočo vlogo v splošnem lahko govorimo o treh domenah kolicinske molekule (slika 2; Baty in sod., 1988; Šmarda in Šmajš, 1998).



Slika 2: Splošna organizacija domen kolicinske molekule: na N-terminalnem koncu se nahaja translokacijska (T) domena, na C-terminalnem koncu pa citotoksična (C) domena. Osrednji del ima vlogo vezave na receptor, zato jo imenujemo domena R (Baty in sod., 1988; Šmarda in Šmajš, 1998).

Interakcija kolicina z občutljivo bakterijsko celico v grobem poteka v treh korakih, ki odgovarjajo posameznim domenam (Šmarda in Šmajš, 1998):

- prepozna specifičnega receptorja v zunanji bakterijski membrani in vezava nanj,
- translokacija kolicina preko celične ovojnice,
- letalno delovanje kolicina na specifično celično tarčo.

2.3.2.1.1 Vezava na kolicinski receptor

Receptorji, ki jih kolicini uporabljajo pri interakciji s tarčno celico, primarno služijo prepoznavi in vezavi ligandov, pomembnih za bakterijo. Kolicini skupine E na primer prepoznajo in se vežejo na receptor BtuB, ki primarno služi prepoznavi in vezavi vitamina B₁₂. Na receptorje se kolicini vežejo preko domene R (Di Masi in sod., 1973).

Vezava domene R na receptor verjetno povzroči konformacijsko spremembo v kolicinski molekuli, kar vodi do interakcije domene T s proteini translokacijskega sistema. Kolicini z nukleazno aktivnostjo, prisotni v obliki heterodimerov s pripadajočimi proteini imunosti, se ob vezavi na receptor ločijo od proteina imunosti.

Kolicini skupine A poleg prepoznavne in vezave s specifičnim primarnim receptorjem, vzpostavijo tudi interakcijo s sekundarnimi receptorji - porini OmpF, OmpA, OmpC ali proteinom TolC. Pri kolicinih skupine B sodelovanje porinov ni znano (Šmarda in Šmajš, 1998).

2.3.2.1.2 Prenos kolicinov

Prenos kolicina preko celične ovojnice poteka preko enega izmed dveh proteinskih sistemov: Tol ali Ton. Glede na to, s katerim sistemom se kolicin prenese preko celične ovojnice, jih delimo v skupini A in B.

Ton sistem sestavljajo proteini TonB-ExbB-ExbD. Na ta način se v celico prenese vitamin B₁₂ ter kolicini skupine B (Ahmer in sod., 1995; Šmarda in Šmajš, 1998).

Tol sistem vključuje proteine TolA-TolB-TolQ-TolR. Preko Tol sistema se v celico prenesejo kolicini skupine A. Protein TolC je nujno potreben za prenos kolicina E1, ne sodeluje pa pri prenosu ostalih kolicinov skupine A (Lazzaroni in sod., 1995; Šmarda in Šmajš, 1998).

2.3.2.1.3 Mehanizem delovanja kolicinov

S citotoksično domeno, ki se nahaja na C-terminalnem koncu kolicinske molekule, kolicini povzročijo smrt občutljive celice.

Ločimo 4 različne mehanizme delovanja kolicinov (Šmarda in Šmajš, 1998):

- tvorba kanala v citoplazemski membrani,
- cepitev DNA,
- inhibicija sinteze proteinov (cepitev RNA),
- inhibicija sinteze mureina in lipopolisaharida.

2.3.2.2 Gen *kil*– protein BRP (bakteriocin sprostitveni protein)

Kolicini se razlikujejo od drugih proteinov, ki se sproščajo v zunajcelični prostor, saj (Jakes in Model, 1979; van der Waal in sod., 1995; Hands, 2004):

- nimajo signalne sekvence,
- sprostitvev iz celice je odvisna od izražanja enega samega gena – gena *kil*,
- iznos poteka precej kasneje kot sama sinteza,
- sprostitvev je nespecifična – je posledica povečane prepustnosti membrane in povzroči smrt proizvodjalske celice.

BRP, prevedeni protein gena *kil*, je majhen lipoprotein, ki posreduje sprostitvev kolicinov v zunajcelični prostor (Cavard, 1991). Za razliko od kolicina je BRP sintetiziran kot preproteina. Iz citoplazme potuje v periplazemski prostor, kjer potečeta acetilacija ter cepitev signalne sekvence. Nastane zrel BRP, ki se večinsko nahaja v zunanji celični membrani. Nenavadno stabilna signalna sekvenca se ne razgradi, temveč verjetno sodeluje pri iznosu kolicina iz proizvodjalske celice. Sprostitvev kolicinov spodbudi tudi aktivacija fosfolipaze A v zunanji celični membrani (Pugsley in Schwartz, 1984; van der Waal in sod. 1995; Šmarda in Šmajš, 1998; Cascales in sod., 2007).

Kako se kolicini sprostitjo v zunajcelični prostor, še ni znano, je pa predlaganih več mehanizmov.

Eden izmed modelov predpostavlja, da z BRP aktivirana fosfolipaza povzroči spremembe v sestavi lipidov zunanje membrane, kar omogoči prepuščanje kolicina in drugih proteinov iz celice. Vloga BRP pri tem je posredovanje pri prenosu kolicina preko notranje membrane ter aktivacija fosfolipaze A (Pugsley in Schwartz, 1984).

Drug model predlaga vpletenost stabilnega signalnega peptida, ki nastane ob cepitvi preproteina BRP (van der Waal in sod. 1995; Šmarda in Šmajš, 1998).

2.3.2.3 Gen *imm*– protein imunosti

Delovanje vseh kolicinov je v proizvodjalskih celicah onemogočeno. Specifična interakcija med kolicinsko molekulo ter odgovarjajočim proteinom imunosti onemogoča citotoksično aktivnost kolicina. Protein imunosti ima visoko afiniteto do C-terminalnega konca kolicina, mehanizem delovanja proteina imunosti pa je odvisen od citotoksične aktivnosti kolicina (Šmarda in Šmajš, 1998).

2.3.2.3.1 *imm* gen protovrtnih kolicinov

Proteini imunosti protovrtnih kolicinov so visoko specifični in zagotavljajo popolno odpornost proti enemu samemu protovrtnemu kolicinu. Njihova naloga je, da ščitijo celico pred aktivnostjo kolicinov, ki jih tvorijo sosednje celice (Song in Cramer, 1991).

Celice, ki sintetizirajo specifični protein imunosti, so približno 10^5 -krat bolj odporne proti odgovarjajočemu kolicinu kot celice, ki proteina imunosti ne tvorijo (Hands, 2004).

Proteini imunosti porotvornih kolicinov se nahajajo v citoplazemski membrani kolicin-sintetizirajočih celic in varujejo pred učinkom kolicinov, ki se membrani približajo z zunanje strani. Aktivnost endogenih kolicinov je onemogočena zaradi negativnega naboja na citoplazemski strani membrane (Song in Cramer, 1991; Šmarda in Šmajs, 1998).

2.3.2.3.2 *imm* gen nukleaznih kolicinov

Kolicin z nukleazno aktivnostjo se takoj po sintezi poveže v kompleks s proteinom imunosti. Na ta način je njegova aktivnost nevtralizirana.

Protein imunosti kolicina E3 se veže med domeni T in C kolicina. Za razliko od številnih encimskih inhibitorjev, se protein imunosti ne veže neposredno na aktivno mesto kolicina, pač pa fizično onemogoči napad encima na substrat. Ker je protein imunosti, tako kot nukleinska kislina, nabit negativno, še dodatno otežuje kolicinsko aktivnost (Kühlman in sod., 2000; Soelaiman in sod., 2001).

Kolicin postane aktiven, ko kompleks s proteinom imunosti disociira. Na kakšen način se to izvrši, ni znano. V primeru kolicina E3 do disociacije verjetno pride med vstopom v občutljivo celico, in sicer ob predvidenem razvijanju kolicina. Interakcija kolicina s pripadajočim proteinom imunosti je med najtesnejšimi protein-protein interakcijami, poleg tega je med interakcijo 83 % površine proteina imunosti zakopane v kolicin E3. Zato se predpostavlja, da kompleks ne more disociirati, če ne pride do denaturacije (Soelaiman in sod., 2001). Nekateri domnevajo, da je potrebna proteolitična cepitev kolicina E3, posledica katere je vstop zgolj domene C (katalitična podenota) kolicina v citoplazmo (de Zamaroczy in Buckingham, 2002).

2.3.3 ZAŠČITA PRED KOLICINOM

Stopnja občutljivosti celic na delovanje kolicina je odvisna od povprečnega števila receptorjev na celico. Občutljivost je torej kvantitativna lastnost. Vnos kolicinov v celico pa ni omejen zgolj s številom receptorjev na celico, pač pa predvsem s številom receptorjev na celico, ki so povezani s translokacijskim kompleksom (Douche in sod., 1995; Šmarda in Šmajs, 1998). Vezava kolicinske molekule na specifični receptor se ne nadaljuje nujno s prenosom kolicina preko celične ovojnice.

Kot kaže, receptorji za kolicin in njihovi translokacijski sistemi niso naključno razporejeni po celični obojnici, pač pa se lokalizirajo v regijah, kjer prihaja do stika med zunanjo in notranjo membrano. Poskus s kolicinom A je pokazal, da se tovrstna lokalizacija poveča ob predhodni izpostavitvi kolicinu (Guihard in sod., 1994).

Sevi, ki imajo zapis za sintezo kolicina, so vedno imuni proti sintetiziranemu kolicinu, niso pa vsi sevi, ki nimajo zapisa za dani kolicin, nanj občutljivi. Neobčutljivost na kolicin je lahko posledica

- odpornosti. V tem primeru celica nima funkcionalnega kolicinskega receptorja.
- tolerance. Celica preživi, ker nima funkcionalnega translokacijskega sistema, preko katerega kolicin vstopa v celico.
- imunosti. Celica, ki je imuna na dani kolicin, ima funkcionalen receptor in tudi funkcionalen translokacijski sistem, preko katerega kolicin vstopa. Ima pa tudi zapis za protein imunosti, ki interagira s kolicinom in prepreči njegovo letalno delovanje (Šmarda in Šmajš, 1998).

2.4 KOLICIN E1

2.4.1 SPLOŠNI OPIS

Kolicin E1 spada med porotvorne kolicine. Uvrščamo ga v skupino A, čeprav se po načinu translokacije razlikuje od ostalih kolicinov te skupine. Prepozna in veže se na vitamin B₁₂-vezavni receptor oz. BtuB, kot sekundarni receptor pa mu služi TolC. Za prenos v celico je potreben Tol proteinski sistem. Je relativno bazičen protein z izoelektrično točko pI 9,05 (Schwartz in Helinski, 1971; Chan in sod., 1985).

Plazmid pColE1, ki kodira gen za kolicin E1, spada v skupino I. Ima 6646 baznih parov in njegovo nukleotidno zaporedje je poznano. Strukturni gen za kolicin je dolg 1566 bp in njegov prevedeni protein je po številu amino kislin največji protein, zapisan na plazmidu. Sestavlja ga 522 amino kislinskih ostankov in ima molekulsko maso dobrih 57 kDa. Protein imunosti sestavlja 113 amino kislinskih ostankov, BRP pa 45 amino kislinskih ostankov (Yamada in sod., 1982; Chan in sod., 1985).

2.4.2 VNOS KOLICINA E1 PREKO ZUNANJE MEMBRANE IN PERIPLAZME

Vnos kolicina E1 poteka po dvoreceptorskem modelu. Receptor vitamina B₁₂, BtuB, sodeluje pri začetni prepoznavi in vezavi, TolC pa je sekundarni receptor. Domena R kolicina prepozna in se veže na receptor BtuB, medtem ko se vezavno mesto za sekundarni receptor TolC nahaja na N-terminalni tretjini kolicina, na domeni T (Zakharow in Cramer, 2002).

BtuB receptor ima dve vlogi:

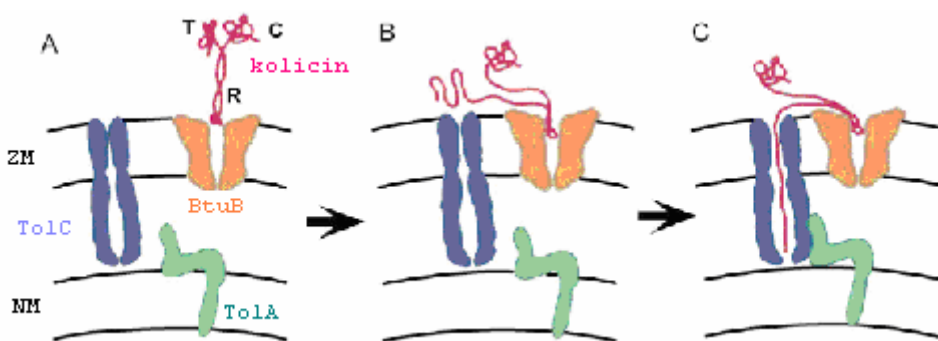
- služi kot prepoznavno in vezavno mesto za domeno R kolicina E1
- domena R kolicina se veže nanj v super zviti obliki, ki pa ni nujno potrebna za visokoafinitetno vezavo na BtuB. Po vezavi se domena R začne odvijati. Na ta način sproži odvijanje domen T in C ter njuno vezavo in vstop v bližnji sekundarni receptor - TolC (Griko in sod., 2000).

TolC je protein, umeščen v zunanjo bakterijsko membrano. Oblikuje 35 Å širok kanal, ki se razteza preko približno 100 Å dolžine – prečka torej večino periplazmatskega prostora.

Kanal se proti periplazemskemu prostoru zoži v ozko odprtino, ki ne bi mogla prepuščati velikih molekul. Ker pa je TolC udeležen pri iznosu velikih proteinov (okoli 170 kDa) pri sekrecijskem sistemu tipa I, se najverjetneje zožen konec odpre in omogoči prehod vsaj delno razvite proteinske molekule (Koronakis in sod., 2000; Koronakis in sod., 2001).

Raziskave kažejo, da je kolicin E1 poseben med kolicini tipa A. V translokacijo preko celične ovojnice namreč ni vpleten protein TolB, pač pa je nujno potreben protein TolC, ki ne sodeluje pri vnosu preostalih kolicinov te skupine. Od preostalih kolicinov tipa A se razlikuje še po tem, da ostane citotoksično aktiven tudi po deleciji 234 amino kislinskih ostankov iz sicer 421 amino kislin dolgega, v citoplazemsko membrano usidranega proteina TolA (Schendel in sod., 1997). Za vnos kolicina E1 torej ni potrebno raztezanje proteina TolA preko periplazmatskega prostora, ki je predpogoj pri prenosu ostalih kolicinov tipa A. Po prečkanju TolC se nadaljnja translokacija odvija pod vplivom delovanja TolA, ki pa še ni pojasnjeno.

Po vezavi kolicina na receptor in odvijanju domen se preko zunanje membrane najprej prenese domena T kolicina ter nato domena C, translokacija pa poteka v večinsko razvitem stanju. Domena C v nadaljevanju interagira s translokacijskima proteinoma citoplazemske membrane, TolQ in TolR. Domena R ostane ves čas na zunanji strani, vezana na receptor (slika 3). Predpostavlja se, da je aktivna vloga domene R zadrževanje odprtega TolC kanala (Zakharow in Cramer, 2002).



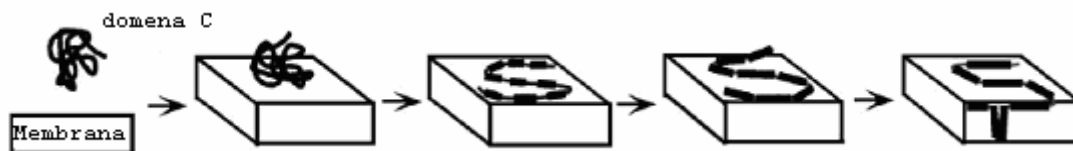
Slika 3: Model vezave kolicina E1 na receptor: A) začetna prepoznavna domene R s strani BtuB receptorja, B) odvijanje super zvite domene R, posledično se zmanjšajo interakcije med domenami, delno se odvijje domena T ter se veže na receptor TolC, C) translokacija razvite domene T preko TolC v periplazmo, pri čemer posreduje TolA. ZM- zunanja celična membrana, NM – notranja celična membrana (Zakharow in Cramer, 2002).

2.4.3 USIDRANJE KOLICINA E1 V CITOPLAZEMSKO MEMBRANO

Kolicin E1 je zelo dobro topen v vodni raztopini, citotoksično pa deluje tako, da s C-terminalno porotvorno domeno tvori v notranji (citoplazemski) membrani kanalček, ki prepušča ione. Pri tem ne poškoduje lipidnega dvosloja (Dankert in sod., 1982; Zakharow in sod., 1998).

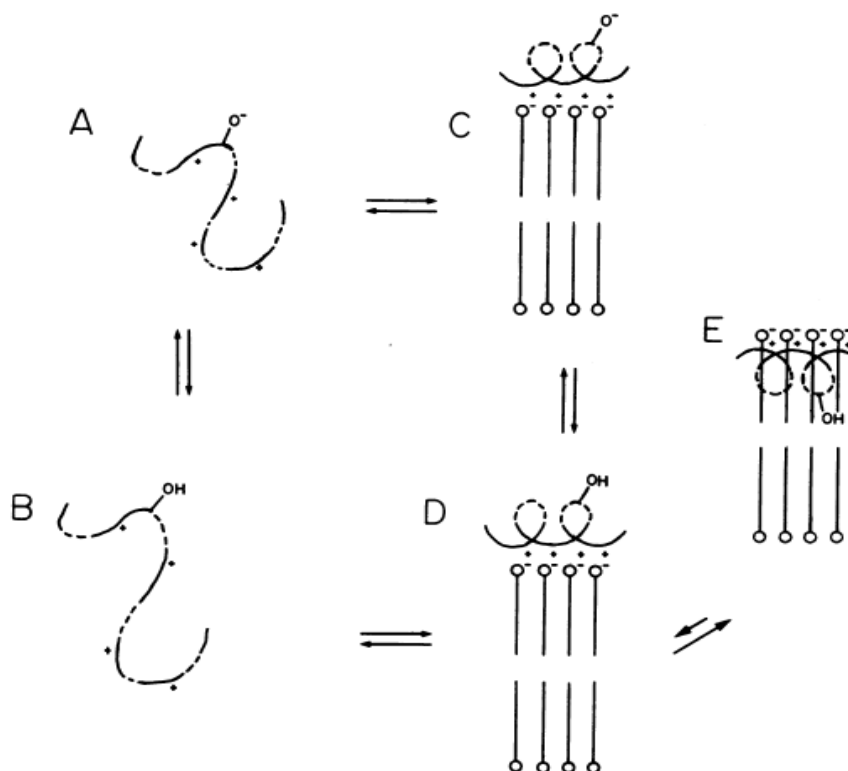
Nastanek kanala poteka v 4 stopnjah (slika 4, Zakharov in Cramer, 2002):

- vezava domene C kolicina na citoplazemsko membrano,
- odvijanje domene,
- raztegovanje heliksa,
- vstavitev hidrofobnih enot v notranjo membrano in tvorba kanala.



Slika 4: Shematski potek nastanka kolicinskega kanala. Prikazana je le domena C kolicina (Zakharov in Cramer, 2002).

Začetna interakcija med pozitivno nabito citotoksično domeno C in negativno nabito citoplazemsko membrano je verjetno elektrostatična, saj je za *in vitro* vezavo potreben kisel pH (okoli 4). Kisel pH naj bi poleg vzpostavitve elektrostatične interakcije omogočal razvijanje proteina na površini membrane, potreben pa je tudi za aktivnost kolicina. To nakazuje, da mora biti en ali več amino kislinskih ostankov v protonirani obliki za učinkovito vezavo in vgradnjo kolicina v membrano (slika 5, Davidson in sod. 1985; Zakharow in Cramer, 2002).



Slika 5: Shematski model predpostavke, da je vstavev porotvorne domene kolicina E1 v membrano *in vitro* odvisna od pH. Za vstavev v membrano je potrebna protonacija vsaj enega specifičnega karboksilnega ostanka. A in B predstavljata nespecifični konformaciji proteina z nakazanim karboksilnim ostankom v protonirani ter deprotonirani obliki. Polarni in nepolarni amino kislinski ostanki kolicina so nakazani z neprekinjenimi in prekinjenimi črtami. Uredijo se v amfipatično konformacijo in reagirajo s fosfolipidno membrano (C in D). Če je specifičen karboksilni ostanek protoniran (D), se bo zaradi energetsko ugodnejšega stanja kanalska domena kolicina vstavila v membrano. Polarni del kolicina ostane v stiku s fosfolipidnimi glavicami, nepolarni del kolicina pa je v stiku s hidrofobnimi acilnimi skupinami – repi (Davidson in sod. 1985).

C-terminalno regijo kolicina E1 sestavlja sveženj osmih amfipatičnih heliksov, ki skrivajo dva hidrofobna heliksa. Njihova povprečna dolžina znaša 13 amino kislinskih ostankov, za prečkanje membrane pa zadostuje šele 17-20 amino kislinskih ostankov. Ob vezavi domene C kolicina na membrano se poveča vsebnost α -heliksov s 60-64 % na 80-90 % s hkratnim porastom povprečne dolžine na 17 amino kislinskih ostankov. Hidrofobna heliksa prečkata membrano, ostalih 8 pa tvori mrežo na zunanji površini citoplazemske membrane. V nadaljevanju je s premikom nekaterih amfipatičnih heliksov omogočen nastanek odprtega kanala (Zakharow in Cramer, 2002).

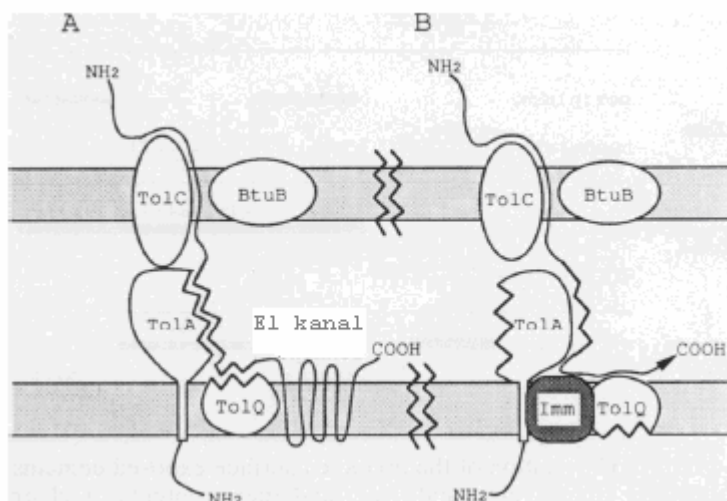
2.4.4 BRP – BAKTERIOCIN SPROSTITVENI PROTEIN

BRP kolicina E1 je acetiliran, 3 kDa velik in 28 amino kislinskih ostankov dolg lipopeptid. Njegova sinteza je hitra, prav tako pa tudi procesiranje. Za razliko od ostalih kolicinov se signalni peptid takoj po procesiranju razgradi (Cavard, 1991). Predlagani model sproščanja kolicinov v ekstracelularni prostor ob posredovanju signalnega peptida, ki nastane ob

cepitvi preproteina BRP, torej v primeru kolicina E1 ne pride v poštev. Predpostavlja se, da z BRP aktivirana fosfolipaza povzroči spremembe v lipidni kompoziciji zunanje membrane, kar omogoči prepuščanje kolicina in drugih proteinov iz celice. Vloga BRP pri tem je posredovanje pri prenosu kolicina preko notranje membrane ter aktivacija fosfolipaze A (Pugsley in Schwartz, 1984).

2.4.5 PROTEIN IMUNOSTI

Protein imunosti za kolicin E1 tvorijo 3 transmembranski α -heliksi, z N-terminalnim koncem v citoplazmi in C-terminalnim koncem v periplazemskem prostoru. Specifičnost proteina imunosti za kolicin E1 se verjetno nahaja v perifernih segmentih na površini notranje membrane. Ti naj bi specifično interagirali s translokacijskim sistemom (s proteinoma TolA in/ali TolQ) in tudi s kanalsko (C) domeno kolicina E1 (Song in Cramer, 1991). Interakcije onemogočijo izgradnjo kanalčka (slika 6).



Slika 6: Model translokacije kolicina E1 preko celične ovojnice v odsotnosti proteina imunosti (A) ter v prisotnosti proteina imunosti (B) (Song in Cramer, 1991).

2.5 KOLICIN E4

2.5.1 SPLOŠNI OPIS

Kolicin E4 je po mehanizmu delovanja endonukleaza. Glede na mehanizem delovanja endonukleaze ločimo na DNaze in RNaze, slednje pa še nadalje na rRNA endonukleaze in tRNA endonukleaze. Kolicin E4 je po mehanizmu delovanja 16S rRNA endonukleaza. Najbolje proučen kolicin s tovrstnim mehanizmom delovanja je kolicin E3. Vsi kolicini, ki so po mehanizmu delovanja 16S rRNaze, selektivno odrežejo 49 nukleotidov s 3' konca 16S rRNA. Posledično je onemogočena translacija na prizadetih ribosomih (Bowman in sod., 1971; Boon, 1972; Šmarda in Šmajš, 1998; Tomita in sod., 2000; James in sod., 2002).

Prepoznavni in vezavni receptor za kolicin E4 je vitamin B₁₂-vezavni receptor oz. BtuB, kot sekundarni receptor pa mu služi OmpF. Za prenos v celico je potreben Tol proteinski sistem (Šmarda in Šmajš, 1998).

Proizvajalske celice se pred sintetiziranim kolicinom zaščitijo tako, da tvorijo protein imunosti, ki se v razmerju 1:1 veže na katalitično domeno sintetiziranega kolicina in ga na ta način inaktivirajo (Sidikaro in Nomura, 1974; de Zamaroczy in Buckingham, 2002).

2.5.2 VSTOP V CELICO

Kolicin E4 prečka celično ovojnico preko translokacijskega sistema Tol, ki je opisan v nadaljevanju (pri kolicinu K). Od kolicinov E1 in K se razlikuje po tem, da mora prečkati tudi notranjo celično membrano (James in sod., 2002). Mehanizem vstopa v citoplazmo celice ni poznan.

2.6 KOLICIN K

2.6.1 SPLOŠNI OPIS

Tako kot kolicin E1 tudi kolicin K spada med porotvorne kolicine. Uvrščamo ga med kolicine tipa A. Receptor, katerega prepozna in se nanj veže, je nukleozidni porin Tsx, kot sekundarni receptor pa mu služita porina OmpF,A. Za prenos v celico je potreben Tol proteinski sistem (Pilsel in Braun, 1995).

Plazmid pColK, ki kodira gen za kolicin K, spada v skupino I. Ima 7 kilobaznih parov in njegovo nukleotidno zaporedje je poznano.

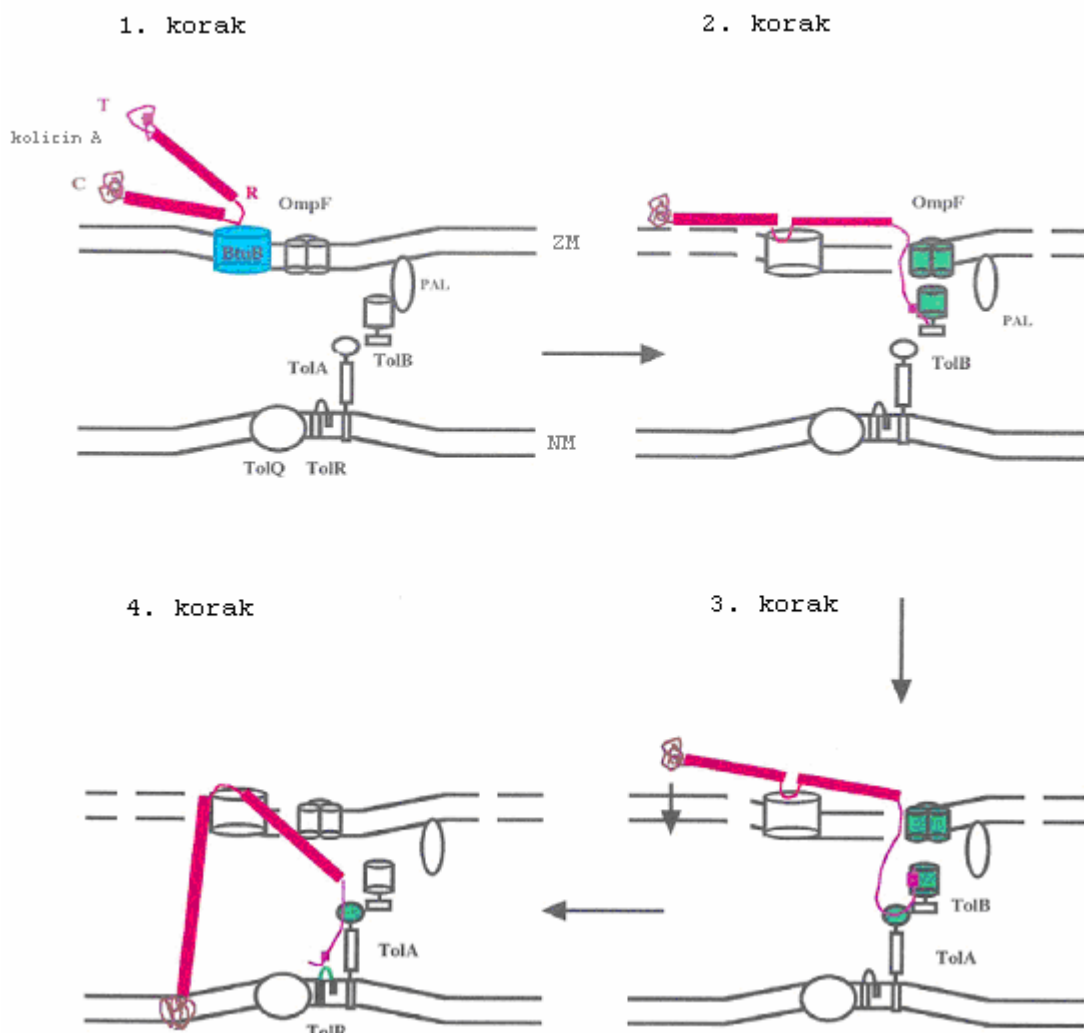
Kolicin K sestavlja 548 amino kislinskih ostankov in ima molekulska masa slabih 60 kDa. Protein imunosti sestavlja 96 amino kislinskih ostankov, BRP pa 43 amino kislinskih ostankov (Pilsel in Braun, 1995).

2.6.2 VSTOP V CELICO

Kolicin K vstopa v celico preko Tol sistema. Potek translokacije na sliki 7 je predstavljen za kolicin A, ki uporablja isti transportni mehanizem. Razlika je le v receptorjih; namesto BtuB kolicin K kot primarni receptor uporablja Tsx, kot sekundarni receptor pa poleg OmpF potrebuje tudi OmpA. Mehanizem prenosa domene C kolicina do notranje membrane ni poznan.

Vezava kolicina na receptor povzroči odvijanje proteinske molekule. N-terminalna domena prečka zunanjo membrano preko sekundarnih receptorjev ali pa v njihovi bližini. Pal protein je ugnedzen v zunanji membrani, z njim pa interagira periplazemski TolB, zato se slednji nahaja blizu zunanje membrane. Z njim interagira vstopajoči kolicin, posledica vezave kolicina na TolB pa je prekinitve interakcije med TolB in Pal. Občutljivost zunanje membrane se zaradi prekinitve te interakcije poveča, kar olajša nadaljnji prehod kolicina v

periplazmo. Sledi interakcija s proteinom TolA, nato pa še s TolR. Mehanizem vstopa domene C je večinoma nepoznan (Lazzaroni in sod., 2002).



Slika 7: Mehanizem vstopa kolicina A v občutljivo celico (Lazzaroni in sod., 2002).

2.7 UČINEK KOLICINOV NA EVKARIOTSKE CELICE

Študije v zvezi z delovanjem kolicinov na evkariotske celice potekajo od 70-ih let prejšnjega stoletja. Raziskave kažejo, da so zdrave celice manj občutljive na kolicine kot tumorsko transformirane, tumorske linije pa se po občutljivosti med seboj razlikujejo. Maligne živalske celice so na delovanje kolicinov bolj občutljive kot človeške (Šmarda in sod., 1978; Šmarda in Keprtova, 1987; Šmarda in Šmajš, 1998; Cursino in sod., 2002).

Chumchalova in Šmarda (2003) sta proučevala aktivnost kolicinov A, E1, E3 in U proti celični liniji humanih fibroblastov MRC5 ter proti 11 tumorskim humanim linijam. Kolicina E3 in U nista izkazala posebnega inhibitornega vpliva na nobeno izmed celičnih

linij, medtem ko je kolicin A zavrl rast vseh linij ter kolicin E1 skoraj vseh, razen ene. Kolicin E1 je inhibiral rast tumorskih linij za 17-40 % ter rast fibroblastov za 11 %. Kolicin A je proti tumorskim linijam izkazal 16-56 % učinkovitost, proti fibroblastom pa kar 36 %.

2.8 UPORABA KOLICINOV IN BAKTERIOCINOV

Možnost uporabe bakteriocinov v zdravstvu bi predstavljala zelo pomemben napredek. Ker imajo bakteriocini relativno ozek spekter delovanja, bi jih lahko usmerili proti specifičnim humanim patogenom. Poleg tega, da z njimi uspešno zatremo bakterijske patogene, odporne proti več antibiotikom, predstavljajo manjšo nevarnost za komenzalne mikroorganizme (Riley in Wertz, 2002). Predlagana je uporaba kolicinov pri zdravljenju hemoragičnega kolitisa in hemolitičnega uremičnega sindroma (Gillor in sod., 2005) pa tudi pri preprečevanju kolonizacije katetrov s strani uropatogenih sevov *E. coli* (Trautner in sod., 2005). V prihodnosti bomo morda kolicine lahko uporabili tudi pri zdravljenju nekaterih tipov tumorjev, na primer raka dojk ter različnih tumorjev debelega črevesa (Cursino in sod., 2002).

Zelo razširjena in proučevana je ideja o uporabi kolicinov v živilski industriji. V eni od raziskav so ugotovili, da vsakodnevno dodajanje kolicin E7-sintetizirajočih celic krmi lahko zmanjša fekalno razširjanje *E. coli* serotip O157:H7 med govedom (Schamberger in sod., 2004). Sev O157:H7 je pri živini še posebno problematičen, saj so številne študije pokazale, da antibiotске terapije celo povečajo količino sproščenega šiga toksina (Gillor in sod., 2004). Nadomeščanje antibiotikov s kolicini bi torej pomembno doprineslo k zdravljenju goveda. Študije potekajo tudi na uporabi bakteriocinov pri perutnini in prašičih (Wooley in sod., 1999; Stahl in sod., 2004).

Predlagana je uporaba bakteriocinov pri nadzoru rastlinskih bolezni, ki jih povzročajo bakterije (Cursino in sod., 2002). Zaenkrat bakteriocini, ki bi bili učinkoviti proti patogenom rastlin, še niso dobro poznani. Malo so poznani njihova struktura, citotoksična aktivnost, sistemi uravnave ter spekter delovanja. Med najboljše opisanimi so bakteriocini vrst *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Serratia plymthicum* in *Xanthomonas campestris* (Gillor in sod., 2005).

Edini bakteriocini, ki se trenutno uporabljajo pri ohranjanju kakovosti hrane, so bakteriocini mlečnokislinskih bakterij. Uporabljajo se v proizvodnji fermentirane hrane. Primer takega bakteriocina je nizin. Tvori ga *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, ki ima GRAS status in se ga zato sme uporabljati v prehranski industriji. Čeprav imajo bakteriocini mlečnokislinskih bakterij v primerjavi s kolicini relativno širok spekter delovanja, pa ne zavirajo rasti številnih po Gramu negativnih bakterij (Jack in sod., 1995). Zato bi bila vpeljava kolicinov in drugih bakteriocinov po Gramu negativnih bakterij v področje ohranjanja kakovosti hrane zelo dobrodošla.

Nadalje se predlaga uporaba bakteriocinov v remediaciji kontaminirane vode. Študija na primeru ruralne pitne vode v Čilu kaže, da so bakteriocin-sintetizirajoče bakterije, izolirane iz vodnih virov, inhibirale rast kontaminant vrst *Salmonella* in nekaterih sevov *E. coli*. Ugotovitve odpirajo možnost uporabe bakteriocinogenih sevov v dekontaminaciji in nadzoru patogenov (Padilla in sod., 1990).

3 MATERIALI IN METODE

Do končnih rezultatov smo v procesu raziskovanja prišli šele po izvedbi dveh različnih pristopov k problemu. Pri prvem pristopu smo naleteli na številne nepredvidene nevšečnosti, zato smo uvedli alternativno pot. Ker pa smo prvemu pristopu namenili precej časa in izvedli kar nekaj ponovitev, variacij ter preizkusili več različnih metod, bomo kljub neuspehu opisali tudi te metode in v nadaljevanju pojasnili, kje in kako so nastajali problemi.

3.1 MATERIAL

3.1.1 BAKTERIJSKI SEVI

3.1.1.1 Laboratorijski sevi *E. coli*

Uporabljeni laboratorijski sevi *E. coli* izvirajo iz zbirke sevov Katedre za molekularno genetiko Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Preglednica 1: Laboratorijski sevi *E. coli*.

sev	genotip	vir
DH5 α	Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endA1 recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen, Carlsbad, California, ZDA
BL21 (DE 3)	B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS gal1</i> (DE3)	G. Anderluh, Katedra za biokemijo oddelka za biologijo Biotehniške fakultete

3.1.1.2 Kolicinogeni sevi iz Pugsleyeve zbirke

Izvorna seva, iz katerih smo želeli pridobiti gena za sintezo kolicinov E1 ter E4, izhajata iz Pugsleyeve zbirke sevov.

Preglednica 2: Kolicinogena seva iz Pugsleyeve zbirke.

kolicin	sev	vir
E1	BZB2104	A. Pugsley, Institut Pasteur, Pariz, Francija
E4	BZB2107	

3.1.1.3 Klinični izolati uroseptičnih sevov *E. coli* (zbirke sevov H, HS, CH, CHS)

Iz krvi bolnikov z infekcijo urinarnega trakta so na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani izolirali uropatogene *E. coli* in jih identificirali s hemokulturo in metodo po Sanfordu (kvantitativna urinokultura za dokazovanje bakterij). Zbirka vsebuje 105 uropatogenih sevov *E. coli*, od tega je 60 sevov H, 35 sevov HS, 8 sevov CH in 2 seva CHS. Sevi H so bili identificirani s hemokulturo, sevi HS s hemokulturo in metodo po Sanfordu, sevi CH so sevi, izolirani iz otrok,

identificirani s hemokulturo, sevi CHS pa so sevi, izolirani iz otrok, identificirani s hemokulturo in metodo po Sanfordu.

3.1.2 PLAZMIDI

3.1.2.1 pET8c

pET8c je majhen plazmid (velikost okoli 2,5 kb), ki ima gen za β -laktamazo (odpornost proti ampicilinu) ter promotor za T7 RNA-polimerazo. Za promotorjem se nahaja zapis za N-terminalni del rekombinantnih proteinov, ki ima šest histidinov (6 His) in dva serina (2 Ser). Protein, ki nastane, ima na N-terminalnem delu dodan tako imenovani histidinski repek (His-tag). Ta omogoča izolacijo rekombinantnega proteina z uporabo nikljeve afinitetne kromatografije.

Gena za T7 RNA-polimerazo ni v plazmidu, pač pa se nahaja na profagu DE3 v bakterijskem kromosomu seva *E. coli* BL21 (DE3).

Plazmid je namenjen izražanju različnih proteinov. Izražanje uravnavamo z izopropil-beta-D-tiogalaktopiranozidom (IPTG).

3.1.2.2 pColK

pColK je različica plazmida pET8c z vstavljenim zaporedjem gena *cka* v poliklonsko mesto.

3.1.3 GOJIŠČA

3.1.3.1 Tekoče gojišče LB (Luria-Bertani)

Tekoče gojišče LB vsebuje 25 g LB (10g tripton, 10 g NaCl, 5 g kvasni ekstrakt) v 1 L destilirane vode. Gojišče smo pripravili v čašah in ga odpipetirali v epruvete (5 mL ali 10 mL) ali pa smo ga pripravili neposredno v erlenmajericah (20 mL, 50 mL, 500 mL). Sterilizirali smo z avtoklaviranjem pri 121 °C, 15 min.

3.1.3.2 Tekoče gojišče LB z antibiotiki

Tekoče gojišče LB z antibiotikom je pripravljeno na enak način kot tekoče gojišče LB (Luria-Bertani), le da po avtoklaviranju v epruvete dodamo še ustrezno količino antibiotika.

Preglednica 3: Koncentracije antibiotikov v gojišču LB.

Antibiotik	koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)
Ampicilin (Ap)	100
nalidiksična kislina (Nal)	25
Rifampicin (Rif)	100

3.1.3.3 Trdo gojišče LB

Trdo gojišče LB poleg sestavin, ki jih vsebuje tekoče gojišče LB (v enakih koncentracijah), vsebuje še agar, in sicer 15 g agarja v 1 L destilirane vode. Pripravi gojišča sledi avtoklaviranje pri 121 °C, 15 min, ko se gojišče ohladi na 55 °C pa še aseptično razlivanje v sterilne plastične petrijevke.

3.1.3.4 Trdo gojišče LB z antibiotiki

Postopek priprave plošč je enak postopku priprave trdega gojišča LB brez antibiotika, le da po avtoklaviranju in pred razlivanjem plošč v ohlajeno gojišče dodamo ustrezno koncentracijo antibiotika.

3.1.3.5 Mehki agar

Mehki agar vsebuje LB v koncentraciji 25 g/L in agar v koncentraciji 7,5 g/L. Mešanico smo segreti v mikrovalovni pečici, da smo raztopili agar, nato pa med mešanjem odpipetirali v male epruvete po 4 mL gojišča. Avtoklavirali smo pri 121 °C, 15 min.

3.1.4 KEMIKALIJE

BIOMERIEUX, Charbonnieres les Bains, Francija

- Kvasni ekstrakt

BIOLABS, New England, ZDA

- dNTP mix (deoksiribonukleozid trifosfat – mešanica)
- pufer za Vent polimerazo

BIOLIFE, Milano, Italija

- tripton

BIO-RAD, Hercules, Kalifornija, ZDA

- NaDS

BMA, Rockland, ME, ZDA

- agarosa

FERMENTAS, Vilna, Litva

- MgCl₂ (25mM)
- pufer za *Taq* DNA-polimerazo z (NH₄)₂SO₄
- pufer za T4 ligazo
- pufer R (pufer za *Mlu*I in *Xho*I)
- lestvica 1 kb

MERCK, Darmstadt, Nemčija

- 96 % etanol
- NaCl
- NaOH
- MgCl₂

PIERCE, Rockford, Illinois, ZDA

Komplet »BCA Protein Assay Kit« za določanje koncentracije proteinov v vzorcu

- BCA reagent A
- BCA reagent B
- albuminski standard

PLIVA, Zagreb, Hrvaška

- Ampicilin

PROMEGA Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA

- Komplet »Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System« za izolacijo plazmidne DNA
 - resuspenzijska raztopina
 - raztopina za celično lizo
 - raztopina alkalne proteaze
 - nevtralizacijska raztopina
 - raztopina z etanolom
 - voda z odstranjenimi nukleazami

QIAGEN, Hamburg, Nemčija

- komplet »QIAQuick« za čiščenje fragmentov DNA iz elektroforeznega gela
 - kolone za mikrocentrifugirko
 - pufer PB
 - pufer PE
 - pufer EB

ROTH, Karlsruhe; Nemčija

- LB
- Agar
- IPTG

SIGMA Chemicals, St. Louis, Missouri, ZDA

- LB
- EtBr
- baza TRIS
- TRIS-HCl
- EDTA
- agaroz
- Mitomicin C
- Nalidiksična kislina
- rifampicin

3.1.5 ENCIMI

BIOLABS, New England, ZDA

- Vent polimeraza

FERMENTAS, Vilna, Litva

- *Taq* DNA-polimeraza
- restriktaza *MluI*
- restriktaza *XhoI*
- T4 ligaza

3.1.6 ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI

MWG-Biotech AG, Nemčija

- *colE1*-f, *colE1*-r
- *colE4*-f, *colE4*-r

3.1.7 PUFRI IN REAGENTI

Agarozna gelska elektroforeza

- 5× TBE (0,45 mM Tris-borat; 10 mM EDTA), hranjen pri sobni temperaturi
- elektroforezni agarozni gel, ki smo ga pripravili tako, da smo agarozo (0,3 g ali 0,4 g) dodali v 30 mL oz. 40 mL pufru 0,5× TBE, segreli, da se je agarozna raztopila, ohladili ter nato v gel dodali 1,3 µL EtBr (10 mg/mL)
- nanašalni elektroforezni pufer (0,25 % bromfenol modro; 0,25 % ksilen cianol; 40 % saharoza).

NaDS-poliakrilamidna gelska elektroforeza

- elektroforezni ločitveni gel (12 %), ki smo ga pripravili tako, da smo v erlenmajerici zmešali 3,75 mL 40 % raztopine akrilamida (vsebuje akrilamid in N,N-metil-bisakrilamid), 4,8 mL destilirane vode, 1,25 mL 3 M Tris-HCl, pH 8,8, 100 µL 10 % NaDS, 100 µL APS in 6,25 µL reagenta TEMED. Raztopino smo dobro premešali ter vlili med pokončni stekleni ploščici.
- koncentracijski gel (3 %) smo pripravili tako, da smo zmešali 2,645 mL destilirane vode, 0,375 µL 40 % raztopine akrilamida, 0,63 mL 1 M Tris-HCl, pH 6,8 in 50 µL 10 % NaDS. Dodali smo še 50 µL APS in 4 µL reagenta TEMED.
- elektroforezni pufer – 3g/L Tris, 14,4 g/L glicin, 1g/L NaDS, pH 8,3
- vzorce smo pred nanosom na gel zmešali z 2-kratnim pufrom NaDS in 1 M DTT v razmerju 2:3:1 ter inkubirali 5 min v vreli vodi.
- raztopina barvila Commasie Brilliant Blue, ki smo jo pripravili v 0,1 % CuSO₄, 30 % metanolu in 10 % očetni kislini. S to raztopino barvamo proteine po končani elektroforezi
- razbarvalna raztopina, ki jo tvorita 30 % metanol ter 10 % očetna kislina.

Ultrafiltracija

- 10 mM Tris/HCl, pH 8

Hitra proteinska tekočinska kromatografija (FPLC)

- 10 mM Tris/HCl, pH 8, ki smo ga filtrirali preko 0,45 µm filtra
- 10 mM Tris/HCl, pH 8 + 1 M NaCl, ki smo ga filtrirali preko 0,45 µm filtra

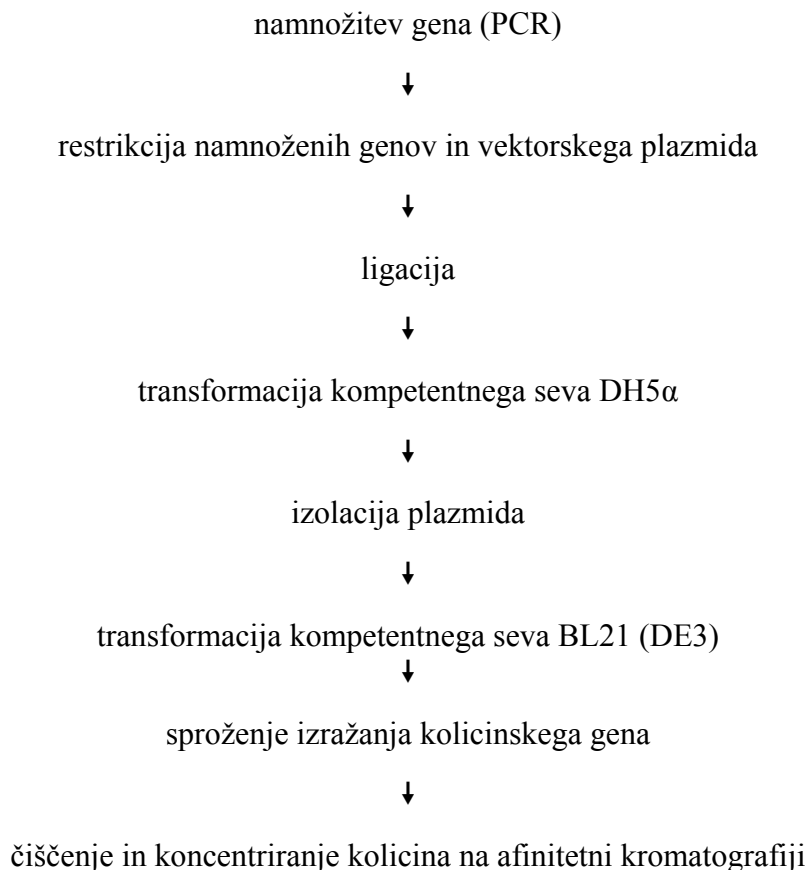
3.1.8 OPREMA

Pri delu smo uporabljali naslednjo opremo:

- stresalnik (Infors HT, Bottmingen, Švica)
- stresalna kopel (Stoval Life Science, Norton Shores, Michigan, ZDA)
- aparatura za PCR:
 - GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Ontario, Kanada)
 - Biometra UNO II (Biometra, Göttingen, Nemčija)
- Namizna centrifuga (Eppendorf centrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- centrifuga (BECKMAN J2-21MIE Centrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, Kalifornija, ZDA)
- centrifuga Rotanta 460R (Hettich AG, Bäch, Švica)
- avtomatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- termoblok Constantemp (Technilab, Los Angeles, Kalifornija, ZDA)
- elektroforeza 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma, Stockholm, Švedska)
- UV luč 2011 Macrovue (LKB Bromma, Stockholm, Švedska)
- vroča kopel LKB – »Multi temp II« (Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, ZDA)
- FPLC
 - kolona Mono S HR 5/5 (Pharmacia, Upsalla, Švedska)
 - FPLC aparatura Äcta FPLC (Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, New Jersey, ZDA)
- dializne vrečke Dialysis tubing, Cellulose membrane (SIGMA, St. Louis, Missouri, ZDA)
- sekvenator ALFexpress (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, ZDA)
- spektrofotometer
 - UV/VIS Spectrometer (Perkin Elmer, Ontario, Kanada)
 - Shimadzu UV-2101 PC UV/VIS Scanning Spectrometer (SHIMADZU, Kyoto, Japonska)
- vibracijski stresalnik Lab dancer (IKA-WERKE, Stanfen, Nemčija)
- vibracijski stresalnik EV 100 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- kopel-stresalnik za razbarvanje gelov The Belly Dancer (Stovall, Life Science, inc., Greensboro, NC, ZDA)
- mikrotitrski čitalec Spectra MR™ scanning spectrophotometer (DYNEX Technologies, Berlin, Nemčija)
- ultrazvočni razbijalec VCX 130 (Sonics & Materials, Newtown, Connecticut, ZDA)

3.2 METODE

3.2.1 IZOLACIJA TER PRIDOBIVANJE USTREZNIH KOLIČIN KOLICINA - PRISTOP 1



Za sev DH5α je značilen visok donos plazmidov, za sev BL21 (DE3) pa visok nivo izražanja rekombinantnih proteinov.

V predhodnih raziskavah so po navedenem postopku uspešno izolirali kolicin K (Rijavec in sod., 2007). V našem primeru pa so se na stopnji restrikcije (kolicin E1) ter na stopnji sproženja izražanja kolicinskega gena (kolicina E1 in E4) pojavile velike težave. Zaradi neaktivnosti prevedenih kolicinov zadnjega koraka nismo niti skušali izvesti. Pridobivanja ustreznih količin kolicina E1 smo se naknadno lotili po drugačnem pristopu.

3.2.1.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

3.2.1.1.1 Priprava celičnega lizata/supernatanta za PCR

V 5 mL tekočega gojišča LB smo nacepili eno kolonijo bakterijskega seva in inkubirali preko noči na stresalniku (250 obr./min) pri 37 °C. Naslednji dan smo s pomočjo vibracijskega stresalnika gojišče s celicami premešali in nato odpipetirali 1 mL prekonočne kulture v mikrocentrifugirko. Pri najvišjih obratih (17900×g) smo centrifugirali 1 minuto,

da so se celice usedle. Oborino smo resuspendirali v 200 µL sterilne destilirane vode ter inkubirali 10 minut pri 100 °C. Po inkubaciji smo mikrocentrifugirko ponovno centrifugirali pri 17900×g, tokrat 10 minut. 150 µL supernatanta, ki predstavlja celični lizat za PCR, smo prenesli v novo, sterilno mikrocentrifugirko. Do uporabe smo lizat shranili pri –80 °C.

3.2.1.1.2 PCR reakcija

Z metodo PCR smo namnožili gen z zapisom za kolicin E1 oziroma E4 (iz predhodno pripravljenega celičnega lizata). Nemoten potek PCR reakcije smo dokazali s pozitivno kontrolo – izoliranim plazmidom, ki je imel gen *colE1* oz. *colE4*. Da namnožen produkt nastane le, če je v vzorcu prisotna ustrežna matrica, smo potrdili z dodatkom vode namesto lizata v reakcijsko mešanico (negativna kontrola). Rezultate namnoževanja smo odčitali z agaroznega gela.

PCR metodo smo uporabili za:

- začetno namnoževanje fragmenta (gena *colE1* oz. *colE4*),
- preverjanje, ali imajo transformante, rastoče na selekcijskem gojišču, kolicinski gen,
- preverjanje, kateri kolicinogeni uroseptični sevi imajo gen za kolicin E1.

Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo gena *colE1*.

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5'-3'	Dolžina pomnožka (bp)
ColE1-vodilni	TCACTCGAGCATGGAAACCGCGGTAGCGTACTATAA <i>XhoI</i>	1569
ColE1-povratni	CCACGCGTTTAAATCCCTAACACCTCATTTATAG <i>MluI</i>	

Preglednica 5: Začetni nukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo gena *colE4*.

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5'-3'	Dolžina pomnožka (bp)
ColE4-vodilni	TCACTCGAGCATGAGCGGTGGCGATGGACGCGGCCA <i>XhoI</i>	513
ColE4-povratni	CCACGCGTTTAAAGATATTTTTTAATATTTTCGCC <i>MluI</i>	

Preglednica 6: Standardna PCR mešanica.

začetni oligonukleotid colE1- vodilni (20 pmol/ μL)	1 μL
začetni oligonukleotid colE1- povratni (20 pmol/ μL)	1 μL
dNTP (10mM)	1 μL
10 \times pufer za <i>Taq</i> DNA-polimeraza	5 μL
MgCl ₂ (25mM)	5 μL
<i>Taq</i> DNA-polimeraza	0,25 μL
celični lizat	10 μL
destilirana voda	26,75 μL

Preglednica 7: »High Fidelity PCR Enzyme mix« - PCR mešanica.

začetni oligonukleotid colE1- vodilni (20 pmol/ μL)	1 μL
začetni oligonukleotid colE1- povratni (20 pmol/ μL)	1 μL
dNTP (10mM)	1 μL
10 \times »High Fidelity« pufer	5 μL
MgCl ₂ (25mM)	5 μL
<i>Taq</i> DNA-polimeraza	0,25 μL
celični lizat	10 μL
destilirana voda	26,75 μL

Preglednica 8: »Vent« PCR mešanica.

začetni oligonukleotid colE1- vodilni (20 pmol/ μL)	1 μL
začetni oligonukleotid colE1- povratni (20 pmol/ μL)	1 μL
dNTP (10mM)	1 μL
10 \times »High Fidelity« pufer	5 μL
MgSO ₄ (50mM)	5 μL
Vent DNA-polimeraza	0,5 μL
celični lizat	10 μL
destilirana voda	26,5 μL

Preglednica 9: PCR mešanica za potrjevanje transformacije ter ugotavljanje razširjenosti gena za kolicin E1 med kolicinogenimi sevi iz uroseptične zbirke.

začetni oligonukleotid colE1- vodilni (20 pmol/ μL)	1 μL
začetni oligonukleotid colE1- povratni (20 pmol/ μL)	1 μL
dNTP (10mM)	0,5 μL
10 \times pufer za <i>Taq</i> DNA-polimeraza	2,5 μL
MgCl ₂ (25mM)	2,5 μL
<i>Taq</i> DNA-polimeraza	0,125 μL
celični lizat	5 μL
destilirana voda	12,38 μL

PCR program:

94 °C	4 min	1 \times
94 °C	1 min	
50 °C	1 min	30 \times
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	1 \times
4 °C	30 min	1 \times

3.2.1.2 Agarozna gelska elektroforeza

Prisotnost in ustreznost velikosti fragmentov, namnoženih v verižni reakciji s polimerazo, smo najprej preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Pripravili smo 30 mL 1 % agaroznega gela in mu dodali etidijev bromid. Ko se je gel strdil, smo ga vstavili v elektroforezno banjico ter prelili z $0,5\times$ TBE. Sledil je nanos 5 μ L 1-kilobazne lestvice, ki omogoča razpoznavanje približne velikosti namnoženih fragmentov. Pred nanosom vzorcev (namnoženih fragmentov) smo le-te zmešali z modrilom v razmerju 1:5. Modrilo zagotovi, da se vzorec usede na dno jamice v gelu, poleg tega pa omogoča tudi sledenje fronte tekom elektroforeze. Napetost med elektrodama je znašala 110 V/cm.

Poleg ustreznosti fragmentov, namnoženih z metodo PCR, smo agarozno gelsko elektroforezo uporabili tudi za

- preverjanje, če sta restriktazi v procesu restrikcije svoje delo opravili. V primeru uspešne restrikcije plazmida so na gelu vidne 3 lise različnih velikosti – najvišje na gelu je necepljen plazmid, nižje odprt cepljen plazmid ter najnižje tisti del plazmida, ki sta ga restriktazi od plazmida odcepili. V primeru restrikcije fragmentov učinkovitosti restriktaz na gelu ni mogoče ugotavljati, saj encima odrežeta premajhen del zapisa, da bi bila razlika na gelu vidna. Se pa jasno vidi, če se znotraj gena nahaja nepredvideno restrikcijsko mesto za katero od uporabljenih restriktaz, kar se je zgodilo v primeru kolicina E1 – namesto ene jasne lise na višini okoli 1600 bp je bila na tej višini vidna le tanka lisa (necepljen fragment), dve izrazitejši lisi pa sta bili pri manjših velikostih, katerih seštevek znese približno 1600 bp,
- ugotavljanje, koliko cepljenega plazmida in cepljenega fragmenta je potrebno dodati ligacijski mešanici, da končno razmerje znaša približno 1:3,
- preverjanje, ali transformante, rastoče na selekcijskih gojiščih, imajo plazmid z vstavljenim popolnim kolicinskim genom. Ker smo v postopku PCR uporabili iste začetne oligonukleotide kot za namnoževanje fragmenta, smo na gelu iskali lise, ki so se nahajale na višini okoli 1600 bp (*colE1*) oziroma okoli 500 bp (*colE4*),
- preverjanje, ali smo iz transformiranih celic DH5 α uspešno izolirali plazmid z vstavljenim kolicinskim genom. Na gel smo nanесли le manjšo količino vzorca in preverili, ali se lisa vidi in če se nahaja na ustrezni višini.

3.2.1.3 Ekstrakcija DNA iz agaroznega gela s kompletom »QIAQuick« (Qiagen, Hamburg, Nemčija)

Najprej smo stehali prazne mikrocentrifugirke. Nato smo vanje položili izrezane koščke gela z vključeno DNA. Ponovno smo stehali mikrocentrifugirke in izračunali maso gela z DNA. Dodali smo 3-kratni volumen pufru QG na volumen gela (upoštevaje poenostavitev, da je 100 mg enako 100 μ L). 10 min smo inkubirali pri 50 °C ter po potrebi premešali na vibracijskem mešalniku. Nato smo vzorec prenesli na kolono ter centrifugirali pri najvišjih obratih 1 min. Dodali smo 500 μ L pufru QG ter centrifugirali nadaljnjo 1 min. Kolono smo spirali s 750 μ L pufru PE. Puffer smo nanесли, pustili 2 min na sobni temperaturi in nato centrifugirali 1 min. Iztok smo zavrgli ter ponovili 1-minutno centrifugiranje. Nato smo

kolono prenesli v sterilno mikrocentrifugirko ter DNA s kolone sprali z nanosom 30 μL destilirane vode ter centrifugiranjem 1 min. Do uporabe smo vzorec shranili pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.1.4 Izolacija plazmidne DNA s kompletom »Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System« (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA)

Iz celic, ki so imele plazmid z genom za sintezo kolicina, smo želeli plazmid izolirati za nadaljnjo uporabo. Kolonijo celic smo nacepili v 10 mL LB ter preko noči inkubirali na 250 obr./min pri $37\text{ }^\circ\text{C}$. Naslednji dan smo gojišče centrifugirali 5 min pri 8000 obr./min, da so se celice usedle na dno. Po odstranitvi supernatanta smo usedlino resuspendirali v 250 μL resuspenzijske raztopine. Nato smo dodali 250 μL raztopine za celično lizo in mikrocentrifugirko 4 \times obrnili. Sledil je dodatek 10 μL raztopine alkalne proteaze, ki inaktivira endonukleazo I in zmanjša splošno vsebnost proteinov v vzorcu. Ponovno smo premešali vsebino s 4 \times obračanjem mikrocentrifugirke ter inkubirali 5 min na sobni temperaturi. Nato smo dodali 350 μL nevtralizacijske raztopine in ponovno premešali. Mikrocentrifugirke smo centrifugirali 10 min pri najvišjih obratih. Supernatant s plazmidom smo shranili, oborino (razbite celice) pa smo zavrgli.

Vzeli smo kolono, jo vstavili v novo mikrocentrifugirko in jo napolnili z lizatoma. Centrifugirali smo 1 min pri najvišjih obratih ter zavrgli iztok. Plazmidna DNA ter številne nečistoče so se v tem postopku vezale na kolono. Zato je sledilo čiščenje z raztopino, ki vsebuje etanol. Najprej smo na kolono nanесли 750 μL raztopine in centrifugirali pri najvišjih obratih 1 min. Iztok smo zavrgli. Nato smo čiščenje z raztopino ponovili; tokrat smo je dodali 250 μL . Ponovno smo iztok zavrgli. Nazadnje smo centrifugirali še pri najvišjih obratih, 2 min.

V nadaljevanju smo eluirali DNA, vezano na kolono. Kolono smo prestavili v sterilno mikrocentrifugirko, nanесли 100 μL vode z odstranjenimi nukleazami ter 1 min centrifugirali pri najvišjih obratih. Do uporabe smo shranili pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Po enakem postopku smo izvedli tudi izolacijo plazmidne DNA, ki smo jo nato uporabili kot vektor za prenos fragmentov v kompetentne celice. Celice z vektorskim plazmidom smo preko noči inkubirali v 5 mL LB Ap, pri $37\text{ }^\circ\text{C}$ in 250 obr./min in drugi dan izvedli izolacijo plazmida.

3.2.1.5 Restrikcija z restriktorskima endonukleazama *MluI* in *XhoI*

S PCR namnožene fragmente smo želeli vstaviti v plazmid. Fragmente in vektorski plazmid smo cepili z istima restriktazama: *MluI* in *XhoI*. Predpogoj za uspešno restrikcijo je, da imata tako fragment kot plazmid ustrezni restriktijski mesti. Uporaba dveh različnih restriktaz poveča učinkovitost ligacije, saj se cepljeni konci plazmida ne zlepijo med seboj, poleg tega je na ta način zagotovljena pravilna orientiranost fragmenta.

Restrikcijo smo uporabili tudi kot tehniko preverjanja, če celice DH5 α , ki so po transformaciji zrasle na selekcijskem gojišču, imajo plazmid s popolnim genom za sintezo kolicina. Restriktijski volumen je v tem primeru znašal 10 μL .

Preglednica 10: Restrikcija plazmida z restriktorskima endonukleazama *MluI* in *XhoI*.

plazmidna DNA	43 μ L
10 \times Pufer R	5 μ L
<i>MluI</i>	1 μ L
<i>XhoI</i>	1 μ L

Inkubacija pri 37 $^{\circ}$ C, 2-3 ure. Inaktivacija restriktaz: 65 $^{\circ}$ C, 20 min.

Preglednica 11: Restrikcija fragmenta (kolicinskega gena) z restriktorskima endonukleazama *MluI* in *XhoI*

fragment DNA	15 μ L
10 \times Pufer R	5 μ L
<i>MluI</i>	1 μ L
<i>XhoI</i>	1 μ L
destilirana voda	28 μ L

Inkubacija pri 37 $^{\circ}$ C, 2-3 ure. Inaktivacija restriktaz: 65 $^{\circ}$ C, 20 min.

3.2.1.6 Ligacija cepljenega fragmenta s cepljenim plazmidom

Preglednica 12: Ligacija cepljenega fragmenta (gena) s cepljenim plazmidom.

cepljena plazmidna DNA	2 μ L
cepljeni fragment DNA	6 μ L
encim ligaza	1 μ L
10 \times ligacijski pufer	1 μ L

Inkubacija pri 16 $^{\circ}$ C, preko noči. Inaktivacija ligaze: 65 $^{\circ}$ C, 15 min.

3.2.1.7 Transformacija

3.2.1.7.1 Priprava kompetentnih celic DH5 α in BL21 (DE3)

V 5 mL LB smo nacepili kolonijo izbranega seva. Preko noči smo pustili na stresalniku (250 obr./min) pri temperaturi 37 $^{\circ}$ C.

Naslednji dan smo z 1 mL namnoženih celic inokulirali 50 mL LB. Inokulirano gojišče smo stresali pri 37 $^{\circ}$ C na 250 obr./min in vsako uro merili optično gostoto (OD₆₀₀). Ko je OD₆₀₀ narasla do vrednosti med 0,3 in 0,4, smo 34 mL gojišča odpipetirali v ohlajene centrifugirke ter inkubirali 10 minut na ledu. Nato smo centrifugirali 10 min pri 4000 obr./min in 4 $^{\circ}$ C. V procesu centrifugiranja so se celice usedle na dno centrifugirke. Supernatant smo odstranili in ponovno centrifugirali pri 4000 obr./min in 4 $^{\circ}$ C; tokrat 1 min. Odstranili smo še preostanek supernatanta ter oborino resuspendirali v 7 mL ledeno hladnega 0,1 M CaCl₂. Ponovno smo po 10-minutni inkubaciji na ledu centrifugirali 10 min pri 4000 obr./min na 4 $^{\circ}$ C, odstranili ves supernatant ter ponovno centrifugirali pri istih pogojih 1 min. Po odstranitvi preostalega supernatanta smo usedlino resuspendirali v 1,4 mL ledeno hladnega CaCl₂. Dobljeno suspenzijo smo razdelili v mikrocentrifugirke, in

sicer v vsako po 100 μ L. Dodali smo tudi po 23 μ L 87% glicerola, ki služi kot krioprotektant. Do uporabe smo pripravljene kompetentne celice hranili pri -80 °C.

Preden smo celice uporabili v procesu transformacije s plazmidom, ki bi imel kolicinski gen, smo morali preveriti, ali so bile kompetentne celice dovolj dobro pripravljene. Celice smo transformirali s plazmidom pUC19. Neštrevne plošče so pomenile dobro pripravljene kompetentne celice.

3.2.1.7.2 Transformacija kompetentnih celic

100 μ L kompetentnih celic smo zmešali z 10 μ L ligacijske mešanice. Mešanico smo 30 min inkubirali na ledu, nato pa za 90 s izpostavili temperaturi 42 °C. Sledila je ponovna inkubacija na ledu za 2-3 min. Nato smo mešanici dodali 400 μ L LB ter inkubirali na stresalniku pri 37 °C. Po 1 h smo transformante razmazali na plošče LB Ap (100 μ L smo odpipetirali iz mikrocentrifugirke ter s hokejko razmazali po celotni površini plošče; preostanek smo centrifugirali, odlili supernatant ter usedlino resuspendirali v 100 μ L LB. Celotno vsebino mikrocentrifugirke smo s hokejko razmazali po drugi plošči). Preko noči smo inkubirali pri 37 °C. Naslednji dan smo prešteli število zraslih kolonij ter preverili ustreznost transformacije kolonij s PCR in agarozno gelsko elektroforezo.

3.2.1.8 Etanolna precipitacija DNA

Raztopini DNA, ki smo jo želeli skoncentrirati, smo dodali 10 M amonijev acetat do končne koncentracije 2-2,5 M ter premešali. Dodali smo še 2 volumna ohlajenega 96 % etanola in ponovno premešali. 10 min smo inkubirali pri -80 °C, nato pa 10 min centrifugirali pri 4 °C in 14000 obr./min. Odstranili smo ves supernatant, dodali 750 μ L 80% etanola ter centrifugirali pri 14000 obr./min še 2 min. S pipeto smo odstranili ves preostali supernatant ter DNA posušili na 37 °C. Nazadnje smo DNA raztopili v poljubni količini destilirane vode.

3.2.1.9 Določanje sposobnosti tvorbe kolicina

Na plošče gojišča LB Ap smo s sterilnimi zobotrebcami prepikirali tiste kolonije, za katere smo želeli preveriti, če v plazmidu, pridobljenem v postopku transformacije, imajo aktiven gen za sintezo kolicina. Dodali smo še pozitivno kontrolo – sev *E. coli*, ki proizvaja kolicin K ter negativno kontrolo – sev, ki ne proizvaja kolicinov.

V 5 mL gojišča LB smo cepili kolonijo seva DH5 α pBR322 (Ap^r Tc^r), ki je občutljiv na kolicin E1 in tudi na kolicin K.

Prepikirane plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C ter pod enakimi pogoji stresali nacepljeno gojišče pri 250 obr./min.

Naslednji dan smo preko sterilnega žameta kolonije odtisnili na plošče LB Ap in LB Ap IPTG (0,1 mM). Odtisnjene plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Kolonije, odtisnjene na ploščo z IPTG, smo lizirali z izpostavljanjem hlapom kloroforma za 15 min. Nadaljnih 15 min smo pustili lizirane bakterije v digestoriju, da je kloroform izhlapel. Nato smo raztopili 4 mL mehkega agarja, ga ohladili na 46 °C v termobloku ter mu dodali 200

μL prekončne kulture DH5 α pBR322. Mehki agar s kulturo smo prelili preko liziranih in prezračenih kolonij ter inkubirali preko noči na 37 °C.

Kolonije, odtisnjene na ploščo LB Ap, so služile kot vir celic, ki inhibirajo rast indikatorskega seva.

3.2.1.10 Razbijanje celic z ultrazvokom

Kolonijo seva smo nacepili v tekoče gojišče LB ter preko noči inkubirali na stresalniku (250 obr./min) pri 37 °C. Naslednji dan smo 1 mL kulture prenesli v mikrocentrifugirko ter celice razbijali z ultrazvočnim razbijalcem 1 min. Nato smo jih postavili na led ter prenesli v centrifugo. 2 min smo centrifugirali pri najvišjih obratih; tako smo zagotovili, da so se celice usedle na dno, kolicin pa je ostal v supernatantu.

3.2.1.11 Preverjanje aktivnosti kolicinov E1 in E4 – ustreznosti transformant BL21 (DE3) s pET8c – sprožitev izražanja kolicina

V 10 mL gojišča LB Ap smo nacepili eno kolonijo transformante, ki smo jo želeli pretestirati, ter inkubirali 37 °C na stresalniku pri 250 obr./min do OD₆₀₀ 0,4 – 1 (približno 3 h).

Nato smo dodali IPTG do končne koncentracije 0,8 mM ter gojili še 2-3 ure. Po tem času smo erlenmajerico postavili na led.

Preverili smo aktivnost frakcij intaktne kulture ter ultrazvočno obdelane kulture.

Mehki agar (4 mL) smo raztopili s segrevanjem, inkubirali 10 min pri 46 °C v termobloku ter vanj odmerili 200 μL namnožene kulture DH5 α , ki je služila kot indikatorski sev. Vsebino epruvete smo prelili preko plošče LB ter počakali, da se poltrdi agar strdi. Nato smo na ploščo nakapljali 10 μL ustrezne frakcije ter inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo pregledali cone lize ter ovrednotili aktivnost.

3.2.1.12 Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja gena *colE4*

Kolonijo seva z genom *colE4* smo nacepili v 5 mL LB, stresali preko noči pri 250 obr./min in 37 °C ter nato po protokolu izolirali plazmidno DNA z zapisom za kolicin E4.

4 mikrocentrifugirke smo označili z A, C, G in T ter v vsako odpipetirali reagente, kot prikazuje preglednica 13.

Preglednica 13: Mešanica za določanje nukleotidnega zaporedja izbranega dela DNA.

	mešanica A	mešanica C	mešanica G	mešanica T
1,1 mM dNTP	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
Cy5-ddNTP	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
deionizirana voda	16 μL	16 μL	16 μL	16 μL
Skupni volumen	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL

Pripravljene mešanice smo premešali na vibracijskem stresalniku in na kratko centrifugirali, da se je vsa vsebina mikrocentrifugirke zbrala na dnu. Do uporabe smo shranili na ledu.

Vzeli smo nove mikrocentrifugirke, jih ponovno označili z A, C, G in T ter postavili na led. Iz mikrocentrifugirk z mešanicami (preglednica 13) smo po 2 μL vsebine prenesli v novo mikrocentrifugirko z enako nukleotidno oznako. Nato smo pripravili v novi mikrocentrifugirki naslednji »master mix«:

matrična DNA (izoliran plazmid s <i>colE4</i> genom)	5 μL
začetni oligonukleotid	2 μL
reakcijski pufer	3,5 μL
termo sekvenaza I DNA polimeraza (10 U/ μL)	1 μL
destilirana voda	15,5 μL
celotni volumen	<u>27 μL</u>

Pripravljeno mešanico smo previdno premešali na vibracijskem stresalniku ter na kratko centrifugirali. Po 6 μL »master mixa« smo razdelili po mikrocentrifugirkah, vsebujočih 2 μL posameznih mešanic A, C, G in T. Ponovno smo premešali in po potrebi centrifugirali, mikrocentrifugirke vstavili v PCR aparaturo ter zagnali program.

PCR program:

95 °C	120 s	1×
95 °C	30 s	
60 °C	30 s	30×
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	1×
4 °C	30 min	1×

Po končani PCR reakciji smo mikrocentrifugirke na kratko centrifugirali in postavili na led.

V nadaljevanju smo morali iz vzorcev odstraniti nevgrajene ddNTP. V mikrocentrifugirke smo zato dodali po 2 μL 7,5 M amonijevega acetata, 2 μL raztopine glikogena in 30 μL ohlajenega 100 % etanola. Vsebinsko smo dobro premešali in preko noči inkubirali pri -20 °C, da se je DNA usedla.

Naslednji dan smo mikrocentrifugirke 30 min centrifugirali pri največjih obratih na sobni temperaturi. Nato smo odstranili supernatant in usedlino sprali z 200 μL ohlajenega 70 % etanola. Sledilo je 5-minutno centrifugiranje, odstranitev supernatanta ter sušenje usedline. Pri tem je bilo potrebno paziti, da usedline nismo preveč posušili, saj bi sicer imeli težave pri resuspendiranju.

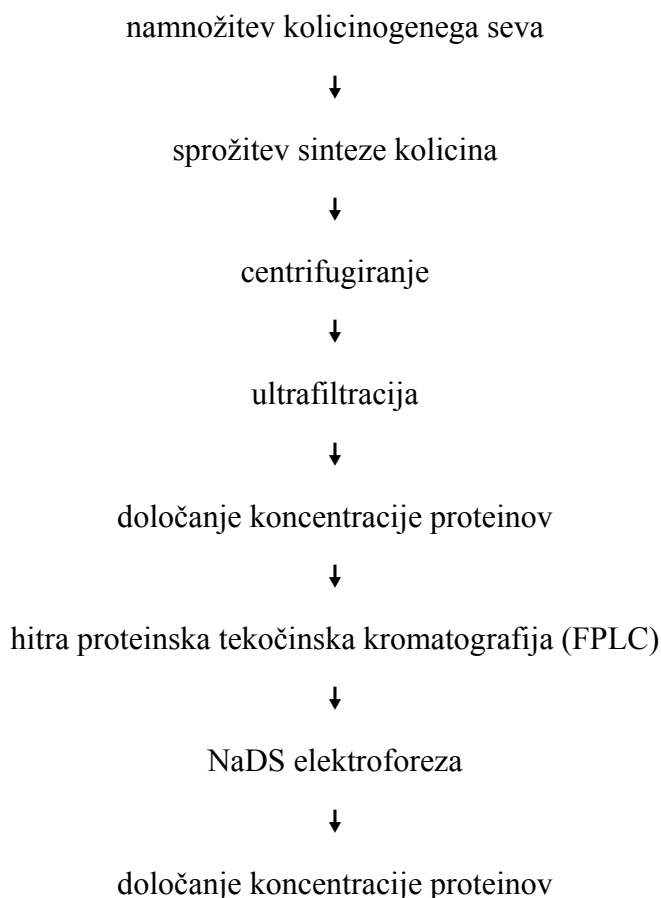
Usedlino smo resuspendirali v 6 μL formamida z barvilom in dobro premešali, da bi zagotovili dobro resuspenzijo usedline, nato pa na kratko centrifugirali, da se je celotna vsebina mikrocentrifugirke zbrala na dnu.

Tik pred nanosom vzorcev na gel smo mikrocentrifugirke inkubirali 2-3 min pri 70 °C ter takoj ohladili na ledu. Sledil je nanos na elektroforezni gel za sekvenciranje ter po koncu postopka odčitavanje rezultata.

3.2.2 IZOLACIJA TER PRIDOBIVANJE USTREZNIH KOLIČIN KOLICINA E1 - PRISTOP 2

Zaradi prevelikih težav s prvim pristopom smo se odločili, da bomo poskusili ustrezno količino kolicina pridobiti po drugi poti. Stahl je s sodelavci (2004) kolicina E1 in N izoliral po spodaj opisanem postopku. Zaradi zahtevnejšega mehanizma delovanja kolicina E4 smo se odločili, da raziskave v zvezi z njim opustimo in se osredotočimo na kolicin E1.

Potek postopka:



3.2.2.1 Ugotavljanje ravni sproženja izražanja kolicina E1

Sev BZB2104 (Pugsleyeva zbirka) smo nacepili v 5 mL LB in preko noči stresali pri 250 obr./min na 37 °C. Drugi dan smo prekonočno kulturo nacepili v 2 × 20 mL LB do OD₆₀₀ približno 0,1 (~200 µL) ter inkubirali na 37°C, pri 250 obr./min. Ko je vrednost OD₆₀₀ narasla na približno 0,9, smo v eno gojišče dodali mitomicin C do končne koncentracije 0,5 µg/mL kulture. S tem smo sprožili sintezo kolicina. Drugo gojišče smo pustili neinducirano. Celice smo gojili še približno 5,5 h, nato pa odpipetirali po 1 mL gojišča v mikrocentrifugirko in centrifugirali 10 min pri 5000-7000 obr./min na 4 °C. Celice so se

usedle na dno, proizvedeni kolicin pa je ostal v supernatantu. Preostalo gojišče z namnoženimi celicami smo shranili na 4 °C.

LB ploščo smo prelili z mehkim agarjem, v katerega smo nacepili 200 µL indikatorskega seva - celic DH5α. Nato smo na ploščo nakapljali po 5 µL različnih redčitev supernatanta. Nanesli smo neredčen supernatant ter 5×, 10×, 50×, 100×, 500×, 1000×, 5000× redčen. Na ta način smo preverjali aktivnost različnih koncentracij v primerjavi z neinduciranim vzorcem. Redčitve smo pripravljali v pufru Tris-Cl. Plošče smo preko noči inkubirali na 37 °C.

3.2.2.2 Sproženje izražanja kolicina E1

Sev BZB2104 (Pugsleyeva zbirka) smo nacepili v 50 mL LB ter preko noči inkubirali na stresalniku (250 obr./min) pri 37 °C. Naslednji dan smo prekonočno kulturo nacepili v 2 L LB (4× 500 mL) do OD₆₀₀ približno 0,1 (~10 mL v vsako erlenmajerico) ter stresali pri 37 °C na 220 obr./min. Ko je vrednost OD₆₀₀ narasla do približno 0,9, smo sprožili sintezo kolicina z dodatkom mitomicina C (končna koncentracija 0,5 µg/mL kulture). Celice smo gojili še približno 5,5 h, nato pa centrifugirali 30 min pri 4600 obr./min in 4 °C.

Pred ultrafiltracijo smo vzorce centrifugirali še pri 11000 obr./min (50 mL centrifugirka), 4 °C, 20 min.

3.2.2.3 Ultrafiltracija

Ultrafiltracijo smo uporabili za koncentriranje proteinskih vzorcev in za zamenjavo pufrov. Vzorec smo filtrirali z ultrafiltracijsko aparaturo (150 mL). Uporabili smo membrano YM-30, ki prepušča molekule, manjše od 30 kDa. Nadtlak dušika je znašal 400 kPa. Ultrafiltracijo smo pospešili z mešanjem na magnetnem mešalu, hkrati pa smo se s tem učinkovito izognili mašenju membrane. Med potekom procesa ultrafiltracije smo nekajkrat preverili kolicinsko aktivnost v iztoku in ultrafiltracijski aparaturi. Poleg tega smo vsakih nekaj dni filter očistili (0,1mM NaOH, 1h, nato dH₂O preko noči) in tako poskrbeli za boljše pogoje ultrafiltriranja. Na koncu smo zamenjali pufer. Vzorec smo najprej skoncitrirali na približno 10 mL, zatem pa 2× ponovili koncentriranje z dodajanjem ustreznega pufru (150mL, 10 mM Tris/HCl, pH 8) za naslednjo analizo (FPLC). Končni volumen vzorca (10 mL) smo pred nanosom na FPLC centrifugirali 10 min pri 14000 ×g in 4 °C. S tem smo se znebili vsega, kar bi se lahko oborilo ter posledično motilo FPLC. Za slučaj, da bi se nam usedel tudi kolicin E1, smo oborino shranili. Nazadnje smo določili skupno koncentracijo proteinov z BCA Protein Assay Kit. Zaradi kapacitete FPLC kolone koncentracija proteinov ne sme presegati 50 mg/10 mL.

3.2.2.4 Določanje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov v vzorcu smo določali z BCA kompletom za določanje koncentracije proteinov (»BCA Protein Assay Kit«, Pierce, Rockford, Illinois, ZDA). V razmerju 1:50 smo zmešali raztopini B in A. V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 1 mL mešanice, dodali 50 µL vzorca ter dobro premešali. Namesto vzorca smo v eni ponovitvi

dodali 50 μ L destilirane vode. Pripravljene mešanice smo inkubirali 30 min pri 37 °C. Izmerili smo OD vrednost pri valovni dolžini 562 nm (spektrofotometer smo umerili z destilirano vodo). Iz umeritvene krivulje smo razbrali koncentracijo proteina pri dobljeni OD₅₆₂ vrednosti.

3.2.2.5 Hitra proteinska tekočinska kromatografija (FPLC)

Za izvedbo FPLC smo uporabili kolono dimenzij 5 mm \times 50 mm, napolnjeno z močnim kationskim izmenjevalcem. Kapaciteta nanosa na to kolono je v območju med 20-50 mg proteina/10 mL vzorca.

Pred nanosom vzorca na kolono smo le-to uravnotežili z začetnim pufrom z nizko ionsko jakostjo (pufer A, 10 mM Tris/HCl, pH 8). Nato smo injicirali 1 mL vzorca v pufru A. Nevezane molekule primesi smo eluirali s konstantnim pretokom pufru A (1 mL/min), vezane proteine pa smo zatem eluirali z linearnim gradientom pufru B, ki vsebuje visoko koncentracijo soli (1 M NaCl v pufru A). Eluirane proteine smo zaznali z UV-detektorjem pri 280 nm ter s kolektorjem lovili posamezne vrhove (frakcije).

S katero frakcijo se je s kolone spral iskani protein (kolicin E1), smo določili na podlagi preverjanja kolicinske aktivnosti ter z NaDS.

Ker se je izkazalo, da pri pH 8 ločevanje ni najboljše (največjo kolicinsko aktivnost je izkazala frakcija, ki izteče iz kolone še pred izpiranjem z NaCl), smo pH vzorca in pufru znižali na pH 6 in postopek ločevanja ponovili (1 mL). Kromatogram je pokazal večje število vrhov (boljše ločevanje različnih molekul). Zato smo se odločili, da bomo kromatografijo celotnega vzorca izvedli pri pH 6.

3.2.2.6 Dializa

Po FPLC smo frakcijam, ki so vsebovale kolicin E1 v večjih koncentracijah in hkrati v relativno čisti obliki, ponovno dvignili pH s 6 na 8. To smo izvedli z dializo. Odrezali smo ustrezno dolžino (10-15 cm) dializne vrečke (uporaba rokavic, da ne bi poškodovali vrečke) ter jo 1 h namakali v destilirani vodi ob hkratnem mešanju. Na enem koncu smo vrečko zatesnili s stiščkom in na drugem vnesli vzorec. Nato smo zatesnili še drugo stran ter zaprto dializno vrečko položili v posodo z 1 L 10 mM Tris/HCl, pH 8, jo prenesli na 4 °C ter zagotovili enakomerno mešanje. Po 4 urah smo pufer odlili, ga nadomestili s svežim ter pustili, da se proces dialize pod enakimi pogoji nadaljuje preko noči. Naslednji dan smo zopet zamenjali pufer in po še 4 urah dialize pod enakimi pogoji vzorec vzeli iz dializne vrečke ter ga centrifugirali pri 11000 obr./min, 4 °C, 30 min. Oborino smo shranili za slučaj, če bi se usedel tudi kolicin.

3.2.2.7 NaDS-poliakrilamidna gelska elektroforeza

Vzorce smo pripravili tako, da smo zmešali proteinski vzorec, 2-kratni pufer NaDS in 1 M DTT v volumskem razmerju 2:3:1 in inkubirali 5 min v vreli vodi.

Najprej smo pripravili ločitveni gel (12%). V čaši smo zmešali 3,75 ml 40 % (m/v) raztopine akrilamida (vsebuje akrilamid in N,N'-metil-bisakrilamid), 4,8 mL dH₂O, 1,25

mL 3 M Tris-HCl, pH 8,8 in 100 μ L 10 % (m/v) NaDS. Raztopino smo odzračili in sprožili polimerizacijo z dodatkom 100 μ L APS in 6,25 μ L reagenta TEMED. Raztopino smo dobro premešali ter s pipeto vlili med pokončni stekleni ploščici, razmaknjeni za 1 mm. Zatem smo nad gel nalili približno 1 cm debelo plast dH₂O, da bi se površina gela lepo zravnala. Počakali smo približno 30 min, da se je gel popolnoma strdil, nakar smo odlili dH₂O (odvečne kapljice popivnomo s papirnato brisačo) in med ploščici vstavili glavniček, tako da je bil spodnji rob žepkov približno 0,5 cm nad ločitvenim gelom. Zatem smo zmešali komponente 3 % koncentracijskega gela: 2,645 mL dH₂O, 0,375 mL 40 % raztopine akrilamida, 0,63 mL 1 M Tris-HCl, pH 6,8 in 50 μ L 10 % (m/v) NaDS. Pred ulitjem na separacijski gel smo dodali 50 μ L APS in 4 μ L reagenta TEMED. Po strditvi gela smo vpeli ploščici v aparaturo za elektroforezo, ulili elektroforezni pufer (3 g/L Tris, 14,4 g/L glicin, 1 g/L NaDS, pH 8,3), odstranili glavniček in v žepke dodali 15-30 μ L pripravljenega vzorca. Elektroforeza je potekala 1 h pri 200 V, 26 mA. Po končani elektroforezi smo proteine barvali z 0,2 % (m/v) raztopino barvila Commasie Brilliant Blue v 0,1 % (m/v) CuSO₄, 30 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) etanol in nato razbarvali v raztopini 30 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) etanol.

3.2.3 PREVERJANJE (NE)OBČUTLJIVOSTI RAZLIČNIH UROSEPTIČNIH SEVOV NA RAZLIČNE KONCENTRACIJE KOLICINA E1

3.2.3.1 Metoda nakapljanje plošče

V 5 mL gojišča LB smo nacepili eno kolonijo seva, ki smo ga želeli pretestirati, ter inkubirali preko noči na stresalniku pri 250 obr./min in 37 °C. Naslednji dan smo mehki agar raztopili in ohladili na 46 °C v termobloku. Nato smo mu dodali 200 μ L prekončne kulture izbranega seva, premešali ter razlili na LB ploščo. Počakali smo, da se je mehki agar strdil, nato pa smo nakapljali po 5 μ L ustrezne koncentracije kolicina E1 (redčitev v 10 mM Tris, pH 8) in dodali kontrolo (10 mM Tris, pH 8) ter inkubirali preko noči na 37 °C.

koncentracija kolicina

1000 μ g/mL
500 μ g/mL
100 μ g/mL
10 μ g/mL
1 μ g/mL
0,1 μ g/mL
0,01 μ g/mL

+ kontrola (0 μ g/mL)

Naslednji dan smo plošče pregledali ter na podlagi prisotnosti in značilnosti (bistra/motna) con lize ovrednotili (ne)občutljivost.

3.2.3.2 Metoda izpostavitve v tekočem gojišču

V 5 mL gojišča LB smo nacepili eno kolonijo seva, ki smo ga želeli pretestirati, ter inkubirali preko noči na stresalniku pri 250 obr./min in 37 °C.

Naslednji dan smo v 5 mL LB dodali poljubne koncentracije kolicina E1 in toliko pufra Tris pH 8, da je dodani volumen znašal 200 µL. Kot kontrolo smo uporabili gojišče LB, ki smo mu dodali 200 µL pufra Tris, pH 8. Nato smo dodali še 50 µL prekonočne kulture (začetna OD₆₀₀ vrednost je tako znašala približno 0,05) ter inkubirali na 37 °C pri 250 obr./min. 6 ur smo vsako uro spremljali rast celic s spektrofotometrom.

koncentracija kolicina

100 µg/mL

10 µg/mL

1 µg/mL

0,1 µg/mL

0,01 µg/mL

+ kontrola (0 µg/mL)

Naslednji dan smo še 1× pomerili OD₆₀₀ z namenom ugotoviti, ali so celice razvile odpornost.

3.2.3.3 Metoda mikrotitrskih plošč

V 5 mL gojišča LB smo nacepili eno kolonijo seva, ki smo ga želeli pretestirati, ter inkubirali preko noči na stresalniku pri 250 obr./min in 37 °C.

Naslednji dan smo v jamice na mikrotitrski plošči vnesli po 25 µL ustrezne koncentracije kolicina. Kot kontrolo smo v eno jamico namesto kolicinske raztopine vnesli pufre Tris. Nato smo prekonočno kulturo premešali na vibracijskem stresalniku ter po 175 µL vnesli v jamice s prej dodanim kolicinom oziroma pufrom Tris (kontrolna ponovitev). V eno jamico smo dodali še 200 µL gojišča LB. Pripravljeno mikrotitrsko ploščo smo pri 37 °C blago stresali, da se vsebine jamic niso pomešale. V enournih intervalih smo 6 ur merili OD₆₀₀ z mikrotitrskim čitalcem.

Metoda se je izkazala za neponovljivo in nezanesljivo. Do neodpravljenih napak prihaja pri odčitavanju rezultatov. Mikrotitrski čitalec zaprtih plošč ne more odčitati, zato je vsakič potrebno dvigniti pokrov, s tem pa tvegamo kontaminacijo. Poleg tega zaradi nezadostnega stresanja vsebina jamic ni homogeno premešana, kar se odraža v netočno odčitanih rezultatih. Zaradi navedenih pomanjkljivosti smo se odločili metodo določanja aktivnosti kolicina z mikrotitrskimi ploščami opustiti.

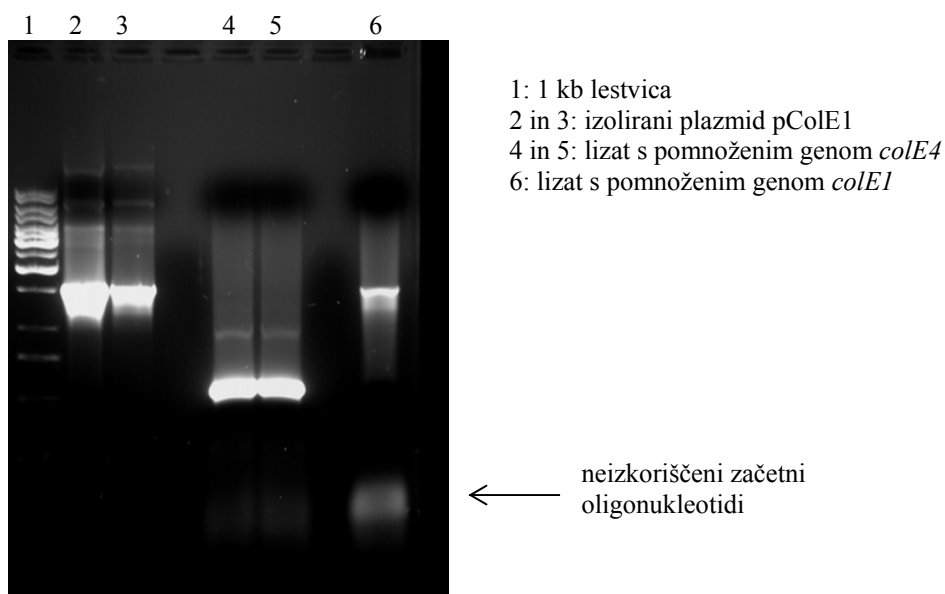
4 REZULTATI

Kljub temu, da s prvim pristopom nismo prišli do želenih rezultatov, smo se odločili predstaviti vmesne rezultate ter točke, kjer se je zataknilo pri izvedbi načrtovanega protokola.

4.1 IZOLACIJA TER PRIDOBIVANJE USTREZNIH KOLIČIN KOLICINA - PRISTOP 1

4.1.1 POMNOŽEVANJE FRAGMENTOV Z METODO PCR

Kot vir gena *colE1* smo iz Pugsleyeve zbirke izbrali sev BZB2104, kot vir gena *colE4* pa sev BZB2107. Z metodo PCR smo oba gena namnožili ter na agarozni gelski elektroforezi preverili, ali je pomnoževanje uspelo (slika 8).

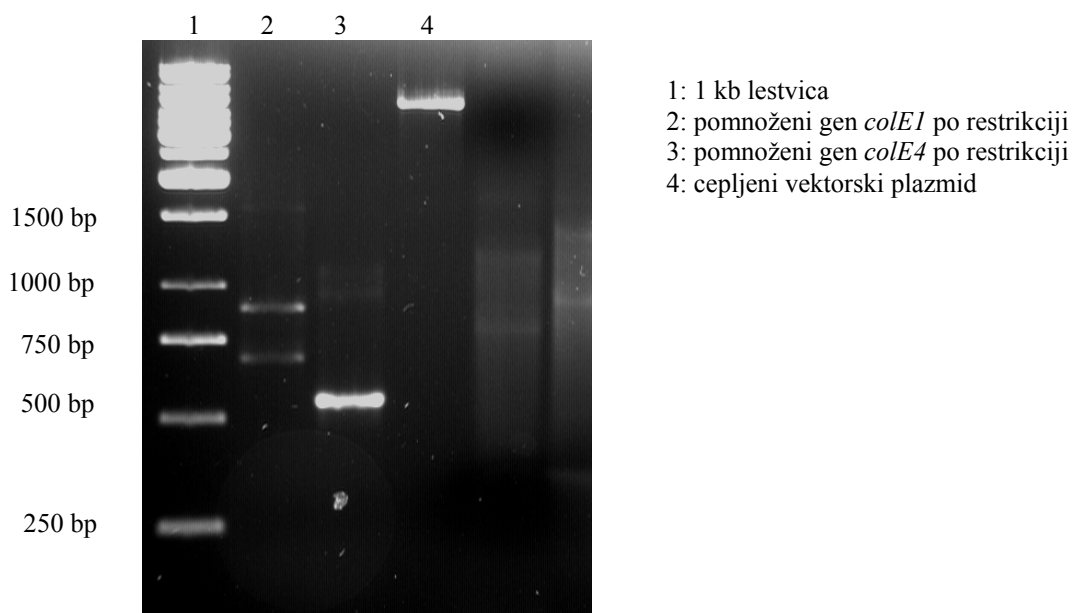


Slika 8: PCR pomnožek genov *colE1* in *colE4* pred restrikcijo.

S slike 8 je razvidno, da je pomnoževanje uspešno poteklo. Lestvica znanih velikosti je potrdila, da se je namnožil želeni del DNA, saj sta se pomnožka nahajala na pričakovanih višinah. Namnoževanje gena *colE1* je precej boljše, če je plazmid predhodno izoliran, kot če PCR izvedemo na lizatu. Nečistoče očitno zelo vplivajo na učinkovitost poteka reakcije.

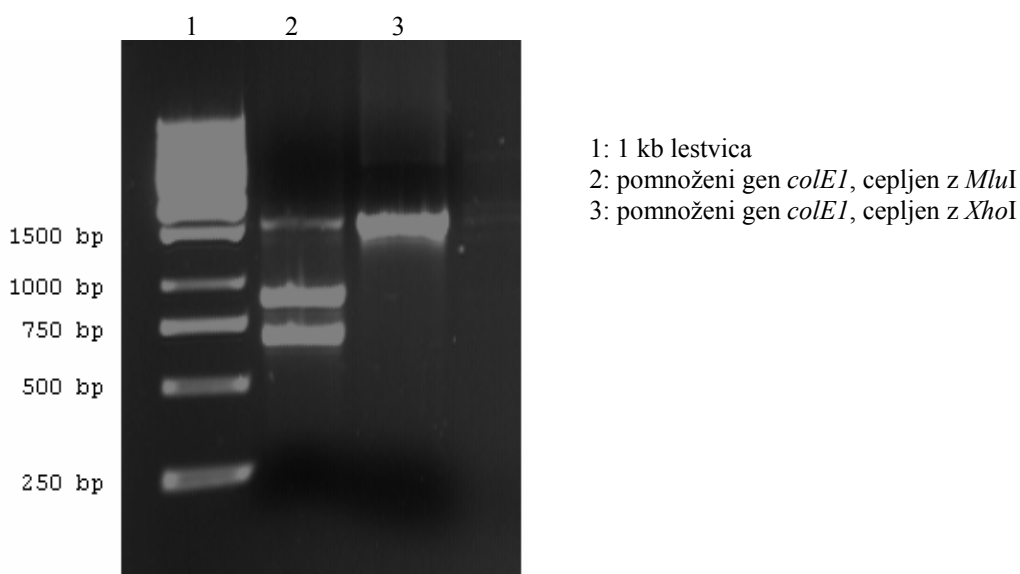
4.1.2 RESTRIKCIJA FRAGMENTOV IN VEKTORSKEGA PLAZMIDA

Po restrikciji, ki bi ji sledila ligacija namnoženih genov v transformacijski plazmid, se je izkazalo, da se je znotraj strukturnega gena za kolicin E1 nahajalo nepredvideno restrikcijsko mesto; na gelu sta bili namesto lise okoli velikosti 1,6 kb dve manjši lisi (slika 9). Gen *colE4* je ostal nedotaknjen.



Slika 9: Gena *colE1* in *colE4* po cepitvi z restriktazama *MluI* in *XhoI*.

Da bi ugotovili, kateremu encimu je pripadalo nenadejano restrikcijsko mesto, smo gen *colE1* cepili z vsako restriktazo posebej. Izkazalo se je, da se je znotraj gena nahajalo restrikcijsko mesto encima *MluI* (slika 10).

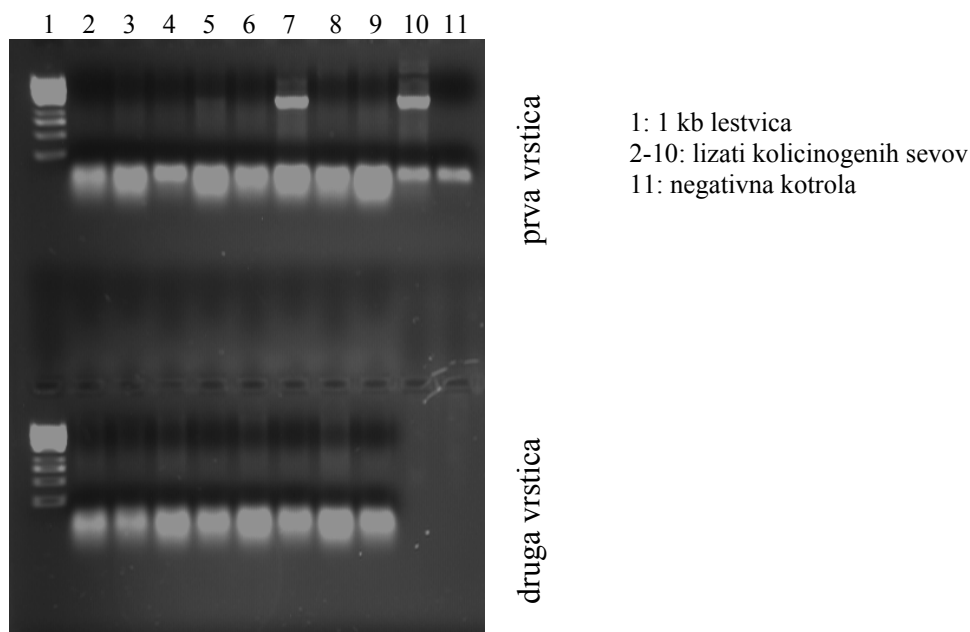


Slika 10: Rezultat cepitve gena *colE1* z vsako restriktazo (*MluI* in *XhoI*) posebej.

4.1.3 UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI GENA *colE1* MED KOLICINOGENIMI SEVI ZBIRKE UROSEPTIČNIH SEVOV

Zaradi težav pri cepljenju gena *colE1* smo se odločili, da bomo med kliničnimi izolati skušali poiskati sev s toliko spremenjenim zapisom za kolicin E1, da ga restriktaze ne bodo cepile. Iz predhodnih raziskav (Nipič, 2005) je znano, kateri sevi iz zbirke uroseptičnih sevov (H, HS, CH, CHS) so kolicinogeni, mi pa smo preverili, kateri izmed njih imajo zapis za kolicin E1.

Najprej smo pripravili lizate in z metodo PCR namnožili morebitno prisotni gen *colE1*. Na agarozni gelski elektroforezi smo pregledali, pri katerih vzorcih je bila vidna lisa. S pomočjo lestvice smo preverili, da se je namnoženi fragment nahajal na ustrezni višini (slika 11).



Slika 11: Ugotavljanje razširjenosti kolicina E1 med kolicinogenimi sevi. 6. in 9. vzorec v prvi vrstici imata gen *colE1*.

Tako smo ugotovili, kateri kolicinogeni sevi imajo gen za sintezo kolicina E1. Rezultat je prikazan v preglednici 14.

Preglednica 14: Kolicinogeni sevi iz uroseptične zbirke sevov, ki imajo zapis za tvorbo kolicina E1.

Oznaka seva	<i>colE1</i>
H3	-
H5	-
H8	-
H11	+
H13	-
H20	-
H21	-
H27	-
H29	-
H30	-
H32	+
H35	+
H41	-
H44	-
H45	-
H46	-
H48	-
H52	-
H54	+
H58	-
H59	-
H61	-
H68	-
HS2	-
HS3	-
HS4	-
HS8	-
HS13	-
HS16	-
HS23	-
HS27	-
HS30	+
HS31	-
HS36	-
HS68	-
HS42	-
HS45	-
HS46	+
HS49	-
CH2	-
CH4	-
CH9	-
CH15	+
CHS2	-
CHS3	-

16 % kolicinogenih sevov iz zbirke uroseptičnih sevov (H, HS, CH, CHS) ima iskani gen *colE1*.

4.1.3.1 Restrikcija genov *colE1* iz kliničnih izolatov

Izvedli smo še restrikcijo in po nanosu vzorcev na gel ugotovili, da noben od zapisov ni imel restriksijskega mesta za *MluI* ali *XhoI*. Vsi zapisi so bili primerni za nadaljnjo uporabo po predvidenem postopku.

4.1.4 PREVERJANJE KOLICINSKE AKTIVNOSTI

Cepljena fragmenta *colE1* in *colE4* smo vstavili (ligirali) v plazmid pET8c ter transformirali sev DH5 α . Preverili smo, ali so zrasle transformante imele kolicinski gen vstavljen v plazmid, in v primeru potrditve plazmid izolirali ter z njim transformirali kompetentne celice BL21 (DE3). Zrasle kolonije bi morale biti sposobne tvorbe aktivnega kolicina. Po dodatku IPTG, soniciranju proizvajalk kolicina in prelivanju z občutljivim sevom pa se kolicinska aktivnost ni pokazala niti v primeru kolicina E1 niti v primeru kolicina E4. Genu *colE4* smo določili nukleotidno zaporedje in ugotovili, da je prišlo do mutacije v zapisu za strukturni gen, zaradi katere je prevedeni protein očitno izgubil svojo funkcijo. Genu *colE1* nukleotidnega zaporedja nismo določili.

4.2 IZOLACIJA TER PRIDOBIVANJE USTREZNIH KOLIČIN KOLICINA E1 - PRISTOP 2

V drugem pristopu smo se posvetili proučevanju kolicina E1.

4.2.1 SPROŽITEV IZRAŽANJA KOLICINA E1

Najprej smo preverili, ali sev Pugsleyeve zbirke proizvaja aktiven kolicin in v kolikšni meri mitomicin C sproži njegovo izražanje.

Preglednica 15: Sinteza kolicina pod inducibilnimi ter neinducibilnimi pogoji.

	redčitev, pri kateri je še opazna cona lize
neinducirana kultura	10 \times
z mitomicinom C inducirana kultura	1000 \times

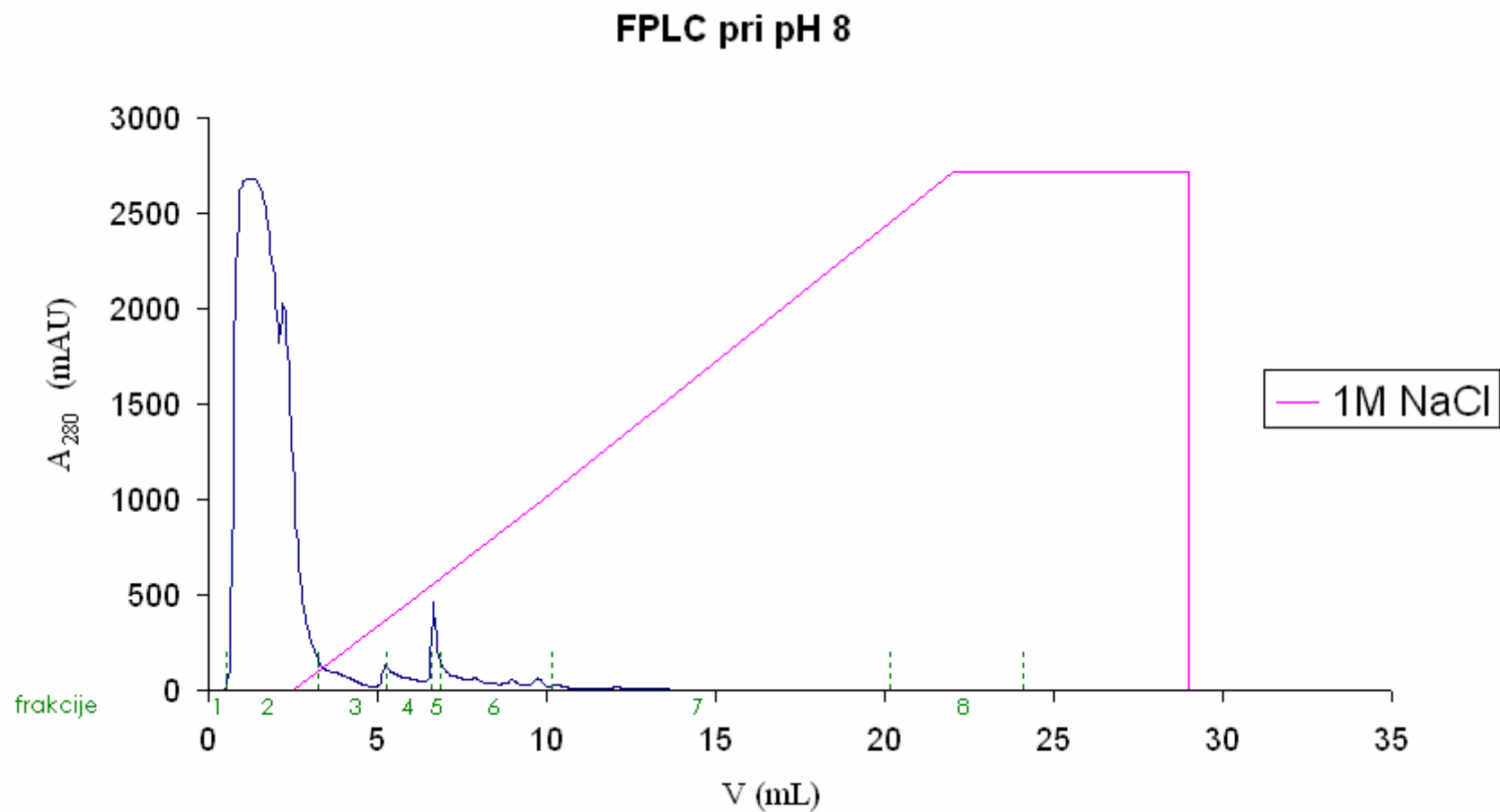
Kot je razvidno iz preglednice 15, dodatek mitomicina C v gojišče 100 \times poveča izražanje gena *colE1*.

Ker smo potrdili in ovrednotili inducibilno vlogo mitomicina C v produkciji kolicina E1 ter smiselnost njegove uporabe, smo sprožitev izražanja izvedli v večjem volumnu. Proizvedeni kolicin smo z ultrafiltracijo očistili in skoncentrirali ter zamenjali pufer. Tekom ultrafiltracije smo nekajkrat preverili kolicinsko aktivnost v iztoku in v ultrafiltracijski aparaturi in potrdili, da nam kolicin ne uhaja iz aparature hkrati z gojiščem in drugimi nečistočami. Protein smo iz 2 L skoncentrirali na 10 mL. Določili smo skupno koncentracijo proteinov; znašala je 3 mg proteina/mL (oz. 30 mg/10 mL). V naslednjem

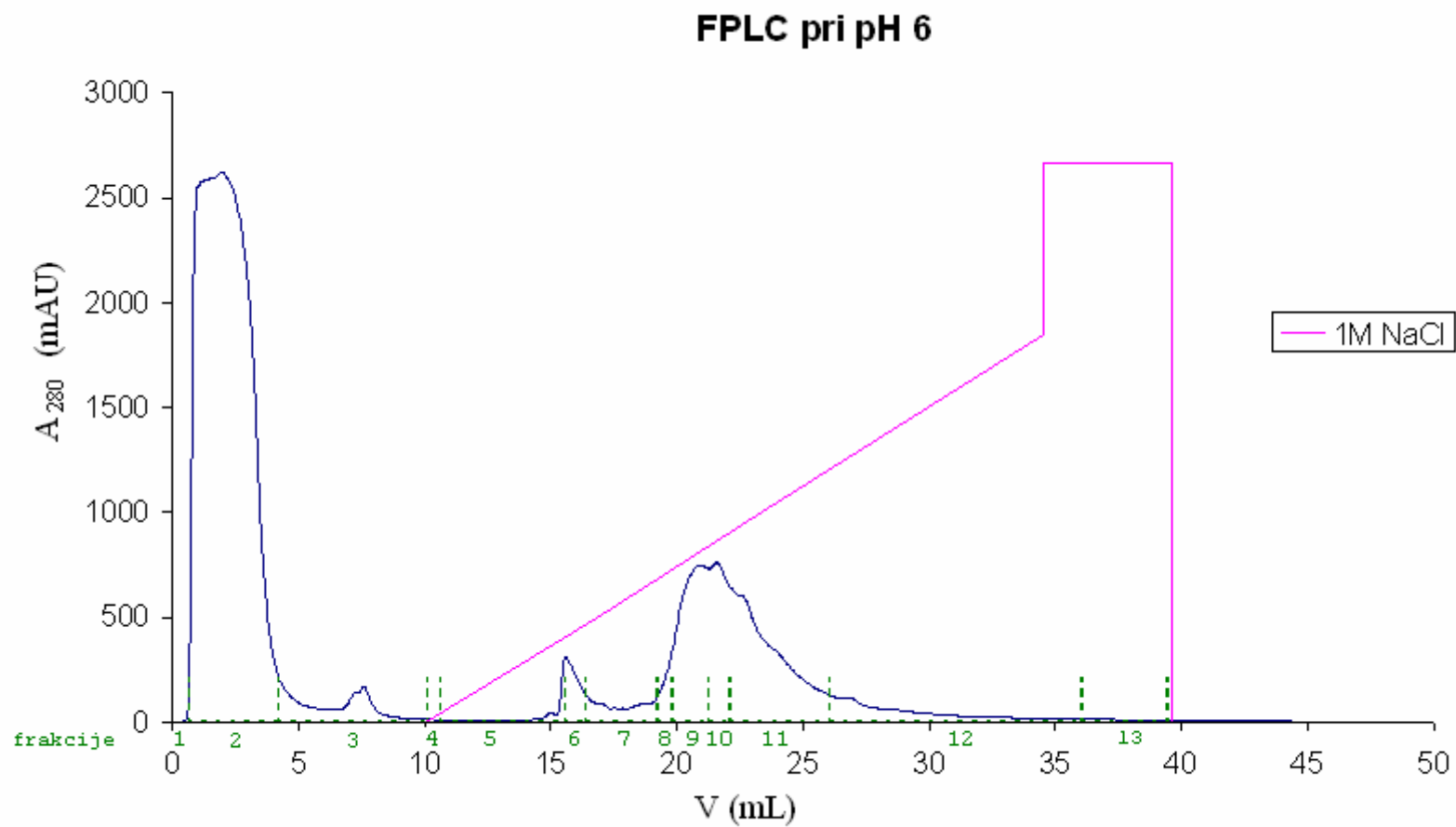
koraku smo izvedli hitro proteinsko tekočinsko kromatografijo (FPLC), za katero koncentracija proteina v vzorcu ne sme presegati 50 mg/10 mL.

4.2.2 HITRA PROTEINSKA TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA (FPLC)

FPLC metodo smo izvedli najprej pri pH 8 in nato pri pH 6. Kromatograma sta prikazana na slikah 12 in 13.



Slika 12: Kromatogram FPLC, izveden pri pH 8. Vrhovi so slabo ločeni in večina vzorca se spere s kolone še pred dodajanjem NaCl.



Slika 13: Kromatogram FPLC, izveden pri pH 6. Vrhovi so bolj ločeni.

Kot je razvidno s slik 12 in 13, sta se kromatograma pufrov Tris-Cl pH 8 in Tris-Cl pH 6 precej razlikovala. Na kromatogramu pri pH 8 se je izrisalo manjše število vrhov, kar kaže na slabše ločevanje molekul v vzorcu.

4.2.2.1 Ugotavljanje aktivnosti različnih frakcij FPLC v pufru Tris-Cl pH 8

Po nanosu vzorca na FPLC kolono pri pH 8 smo izrisanim vrhovom oziroma pripadajočim frakcijam določili kolicinsko aktivnost, da bi na ta način ugotovili, kateri vrh je predstavljal naš iskani protein – kolicin E1. Plošče gojišča LB smo prelili z DH5 α - indikatorskim sevom, občutljivim na kolicin, ter nakapljali različne koncentracije kolicina. Rezultati so predstavljeni v preglednici 16.

Preglednica 16: Ugotavljanje kolicinske aktivnosti posameznih frakcij FPLC pri pH 8.

frakcija	redčitve frakcij, pri katerih se še pojavi cona lize		
	1000 \times	10 000 \times	100 000 \times
2	+	+	+
3	+	-	-
4	+	-	-
5	+	+	-
6	+	-	-

Največjo kolicinsko aktivnost je izkazala frakcija 2, ki se je sprala s kolone še pred dodajanjem 1 M NaCl. Frakcija je bila izrazito nečista, kar je potrdila analiza NaDS gela. Zadostno kolicinsko aktivnost je izkazala še frakcija 5, ki pa je je bilo volumsko gledano premalo za izvedbo nadaljnjih poskusov.

4.2.2.2 Ugotavljanje aktivnosti različnih frakcij FPLC v pufru Tris-Cl pH 6

Preglednica 17: Ugotavljanje kolicinske aktivnosti posameznih frakcij FPLC pri pH 6.

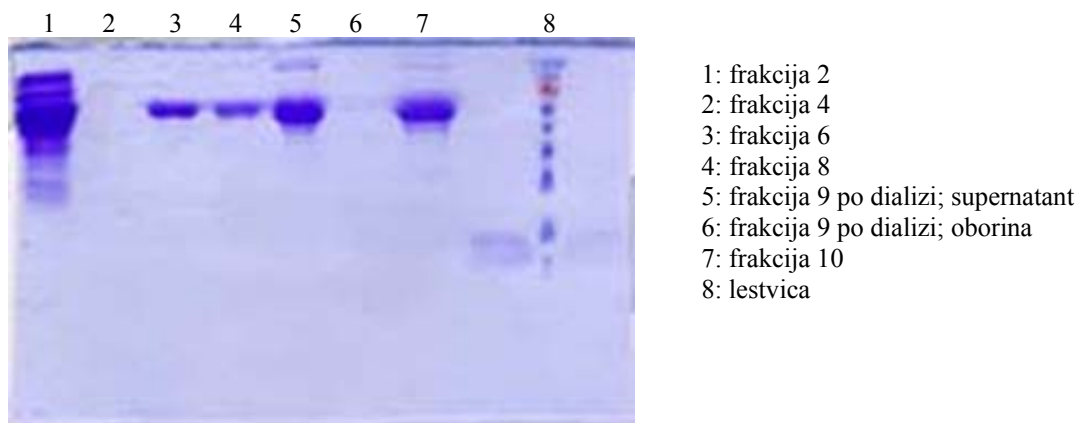
frakcija	redčitve frakcij, pri katerih se še pojavi cona lize			
	100 \times	1000 \times	10 000 \times	100 000 \times
2	+	+	+	+
4	+	-	-	-
6	+	+	+	-
8	+	+	+	-
9 (pH 6)	+	+	+	-
9 (pH 8)	+	+	+	-
10 (pH 6)	+	+	+	-
10 (pH 8)	+	+	+	-

Največjo kolicinsko aktivnost je tudi pri pH 6 izkazala frakcija 2, vendar pa se je kolicin očitno nahajal v vseh testiranih frakcijah (preglednica 17). Frakcijo 4 smo testirali kot kontrolo in po pričakovanjih je bila kolicinska aktivnost v njej najmanjša. Frakcij, ki v preglednici niso navedene, nismo testirali.

Frakcijama 9 in 10 smo z dializo pH naknadno dvignili na pH 8 in preverili, če se je kolicinska aktivnost ohranila. Ker je bil rezultat pozitiven, smo nadaljnje analize zaradi boljšega ujemanja z drugimi materiali izvajali pri višjem pH (pH 8).

4.2.2.2.1 Ugotavljanje čistosti frakcij FPLC v pufru TRIS-Cl pH 6

Čistost frakcij smo preverili z NaDS elektroforezo. Rezultat je prikazan na sliki 14.



Slika 14: NaDS gelska elektroforeza frakcij, pridobljenih s FPLC pri pH 6. Frakcija 9 je nanešena po dializi (pH vzorca je bil 8).

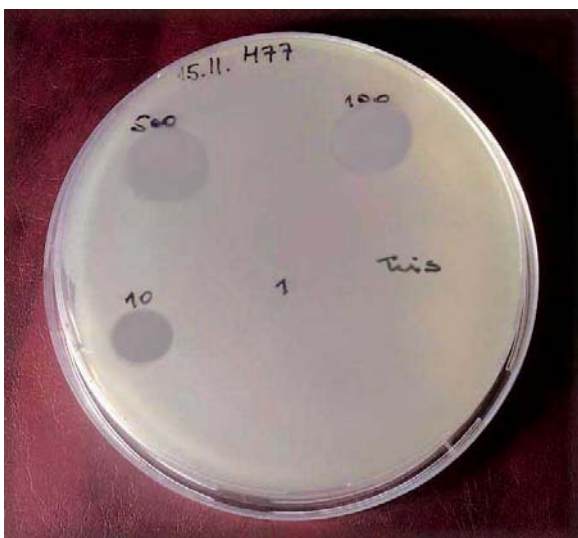
Frakcija 2 je bila izjemno nečista in kot taka neprimerna za nadaljnjo uporabo. Frakciji 6 in 8 sta bili zelo čisti, vendar volumsko nezadostni. Frakcija 9 je izkazala ustrezno čistost in tudi volumsko ustreznost. Frakcija 10 je bila nekoliko manj čista, zato smo se za nadaljnje raziskave odločili uporabiti frakcijo 9. Frakcije 2, 6, 8 in 10 smo shranili.

Frakcija 4 je vsebovala tako malo kolicina, da ga na NaDS elektroforezi nismo zaznali. V procesu dialize frakcije 9 je nastala bela oborina, ki pa očitno ni vsebovala kolicina E1.

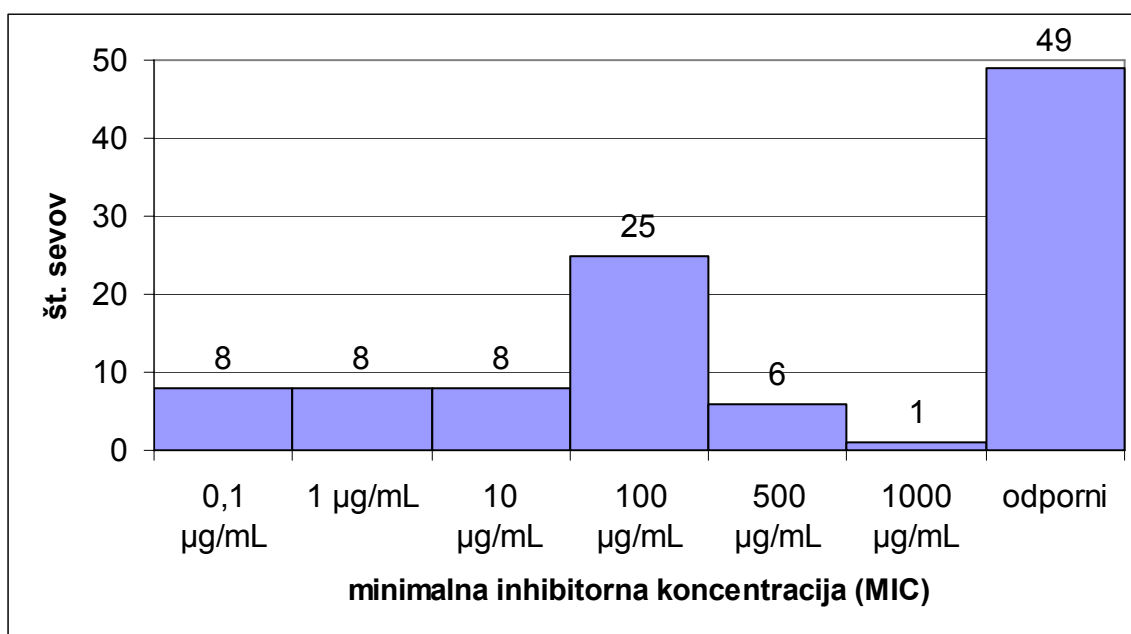
4.2.3 PREVERJANJE (NE)OBČUTLJIVOSTI UROSEPTIČNIH SEVOV NA RAZLIČNE KONCENTRACIJE KOLICINA E1

4.2.3.1 Metoda razlivanja na plošče LB

Uroseptične seve smo vmešali v mehki agar in razlili na plošče, nato pa nakapljali po 5 μ L različnih koncentracij kolicina E1 (1000 μ g/mL, 500 μ g/mL, 100 μ g/mL, 10 μ g/mL, 1 μ g/mL, 0,1 μ g/mL, 0,01 μ g/mL). Kot kontrolo smo dodali kapljico pufru Tris brez kolicina (slika 15).

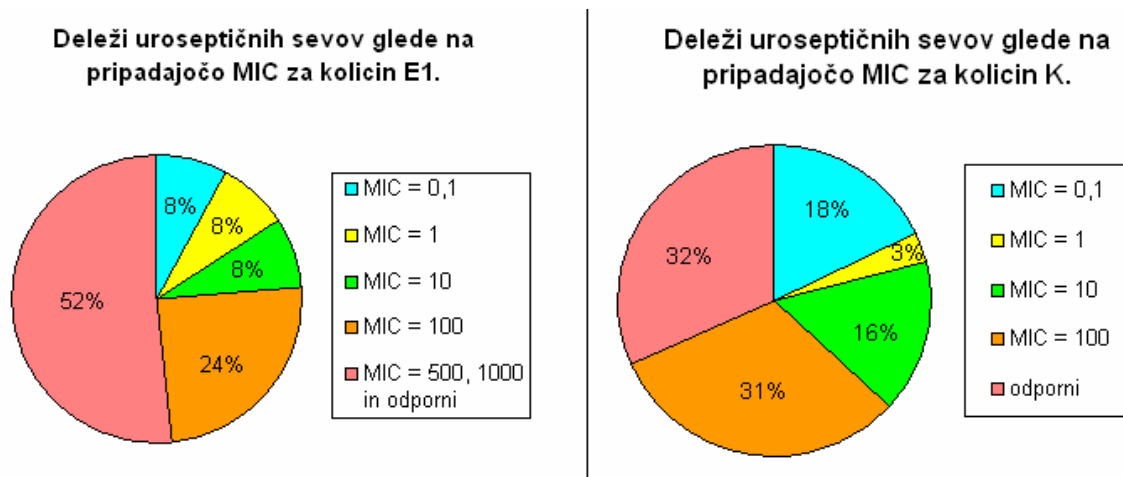


Slika 15: MIC seva, dobljena z metodo nakapljanje plošče. MIC prikazanega seva znaša 10 µg/mL.



Slika 16: Število uroseptičnih sevov *E. coli* s pripadajočo minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC); rezultati so bili pridobljeni z metodo razlivanja sevov na plošče in nakapljanjem različnih koncentracij kolicina E1.

Kot je razvidno s slike 16, je bila skoraj polovica (47 %) testiranih uroseptičnih sevov proti kolicinu E1 odporna, več kot polovico občutljivih sevov (52 %) pa je inhibirala koncentracija kolicina, višja od 100 µg/mL. Koncentracije kolicina, nižje od 0,1 µg/mL, niso inhibirale nobenega izmed testiranih uroseptičnih sevov, so pa inhibirale rast laboratorijskega seva DH5α (MIC = 0,01 µg/mL).

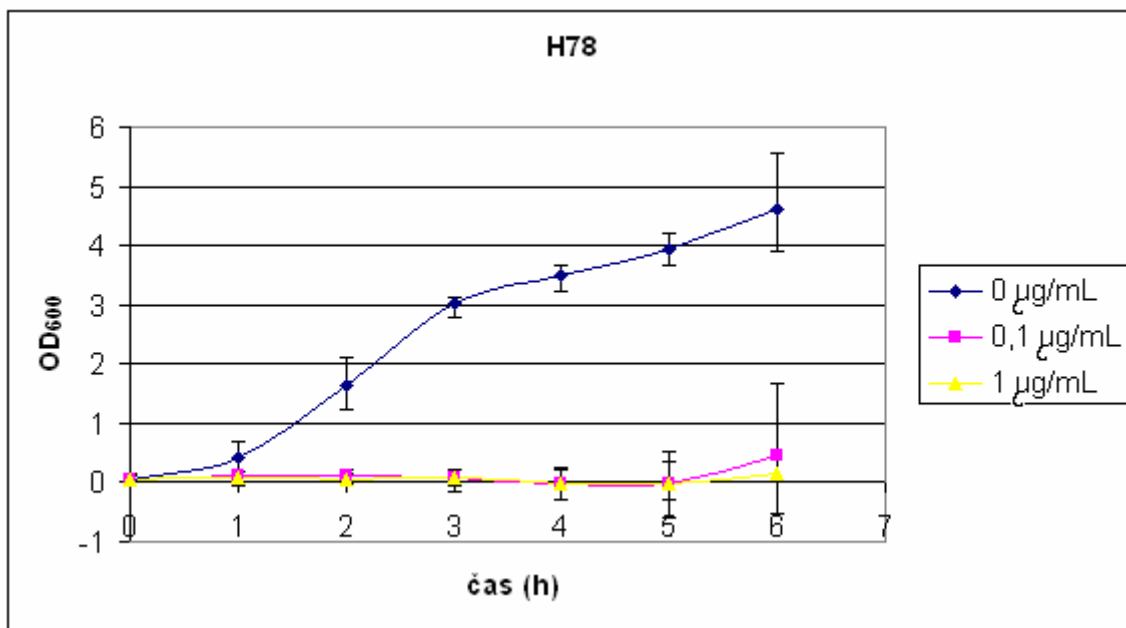


Slika 17: Primerjava občutljivosti sevov *E. coli* na kolicin E1 in kolicin K. Rezultati so bili pridobljeni z metodo nakapljanje plošče. Grafikon za kolicin K je izdelan glede na podatke iz predhodnih raziskav (Rijavec in sod., 2007). Vrednosti MIC so podane v $\mu\text{g/mL}$.

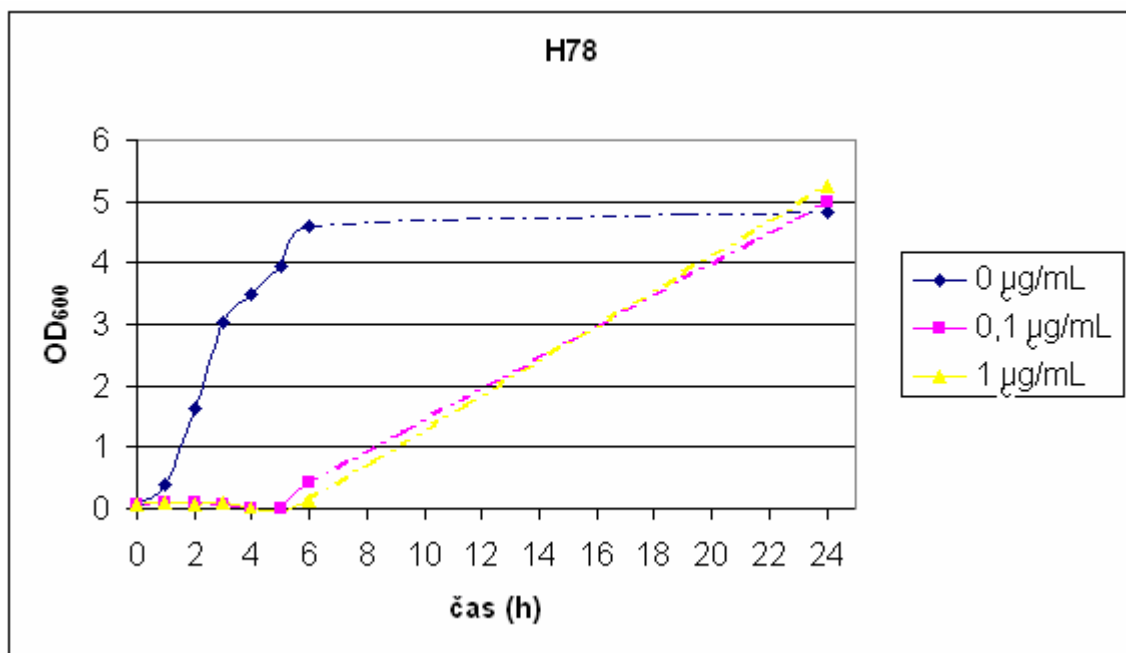
S slike 17 je razvidno, da je kolicin K citotoksično bolj učinkovit proti sevom bakterije *E. coli* kot kolicin E1. Proti kolicinu K je odpornih 32 % sevov, medtem ko je proti kolicinu E1 odpornih (oziroma je MIC večja od $500 \mu\text{g/mL}$) več kot polovica testiranih sevov (52 %). Koncentracija kolicina K $0,1 \mu\text{g/mL}$ inhibira rast 18 % sevov, medtem ko enaka koncentracija kolicina E1 inhibira 8 % sevov. Koncentracija $10 \mu\text{g/mL}$ ali manj kolicina K inhibira rast 37 % testiranih sevov, medtem ko kolicin E1 pri enakem kriteriju inhibira rast 24 % testiranih sevov. Testi s kolicinom K so bili opravljene na zbirki uropatogenih sevov, testiranja kolicina E1 pa na zbirki uroseptičnih sevov.

4.2.3.2 Metoda izpostavitve uroseptičnih sevov kolicinu v tekočem gojišču

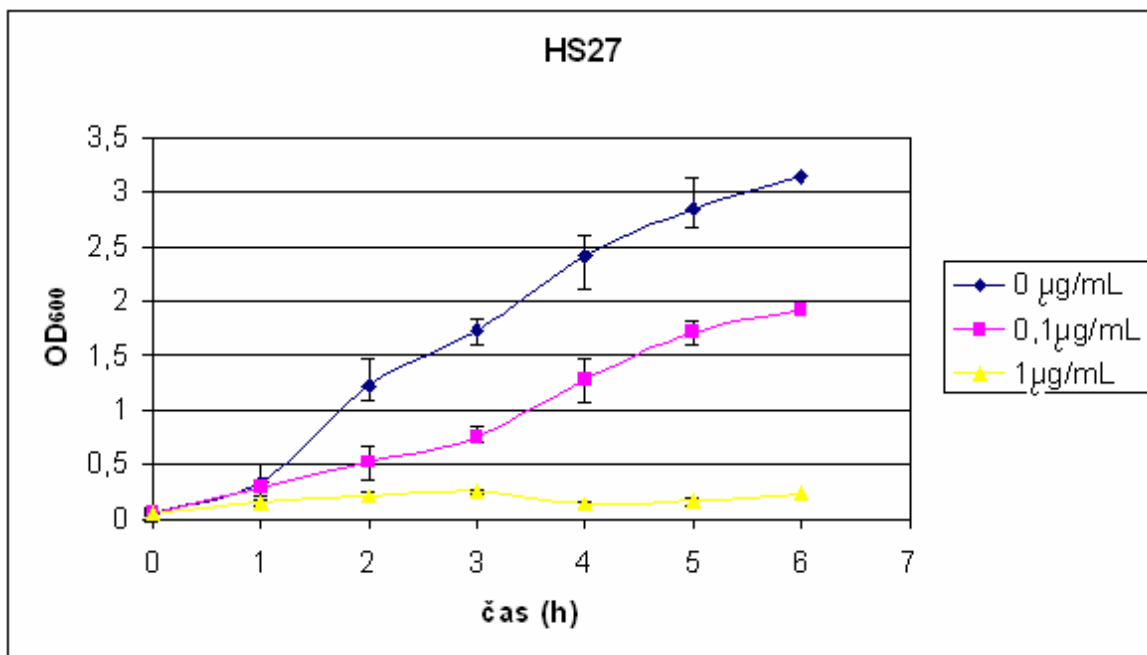
V nadaljevanju smo preverili, ali se rezultati preverjanja občutljivosti, dobljeni na trdih gojiščih, ujemajo z rezultati testiranja v tekočih gojiščih. V ta namen smo izbrali po en sev, ki je izkazal MIC vrednost pri $\text{MIC} = 0,1 \mu\text{g/mL}$, $\text{MIC} = 1 \mu\text{g/mL}$, $\text{MIC} = 10 \mu\text{g/mL}$, $\text{MIC} = 100 \mu\text{g/mL}$, in testirali občutljivost v tekočem gojišču (5 mL LB z dodanim kolicinom E1 do zelenih končnih koncentracij).



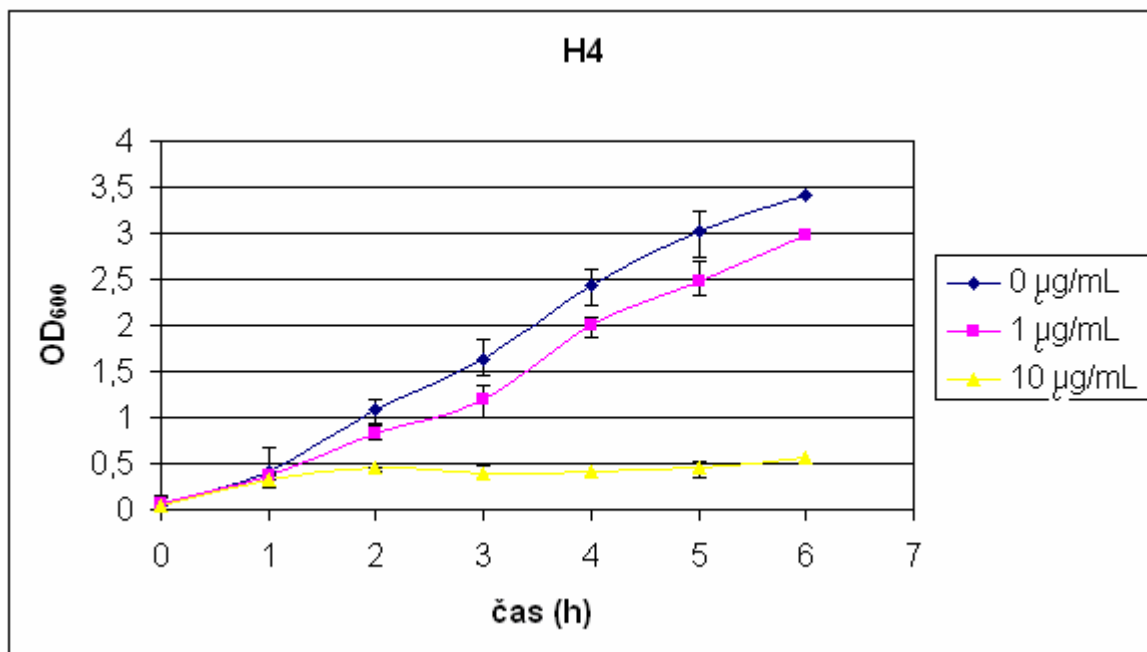
Slika 18: Rast uroseptičnega seva H78 v tekočem gojišču ob prisotnosti različnih koncentracij kolicina E1 v 6 urah.



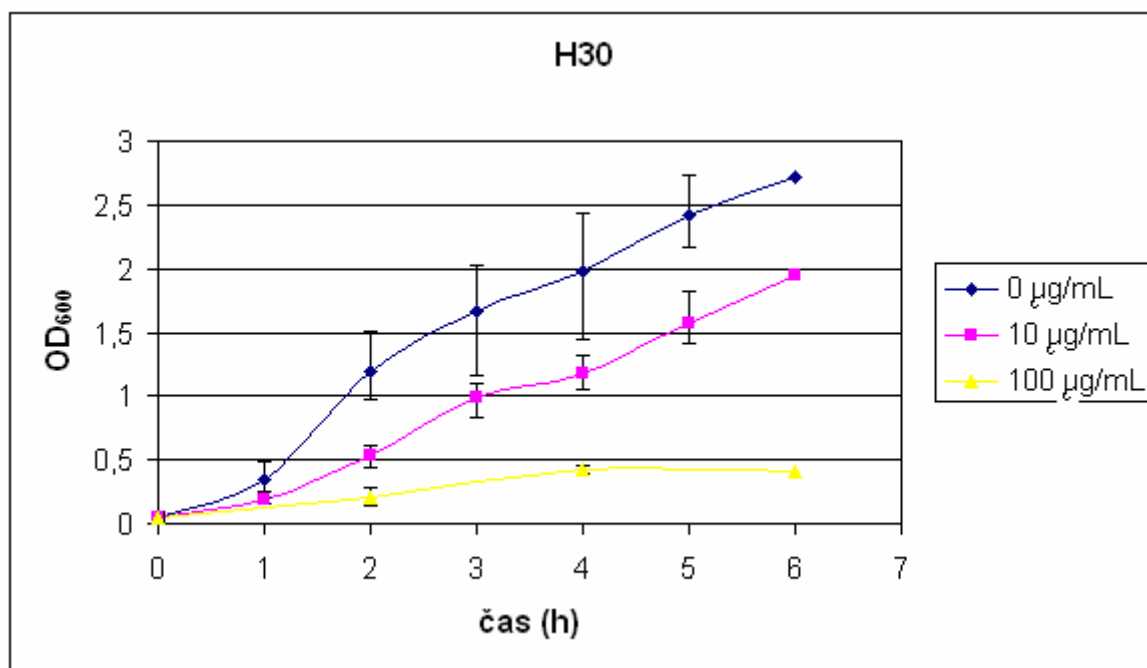
Slika 19: Rast uroseptičnega seva H78 v tekočem gojišču ob prisotnosti različnih koncentracij kolicina E1 v 24 urah.



Slika 20: Rast uroseptičnega seva HS27 v tekočem gojišču ob prisotnosti različnih koncentracij kolicina E1 v 6 urah.



Slika 21: Rast uroseptičnega seva H4 v tekočem gojišču ob prisotnosti različnih koncentracij kolicina E1 v 6 urah.

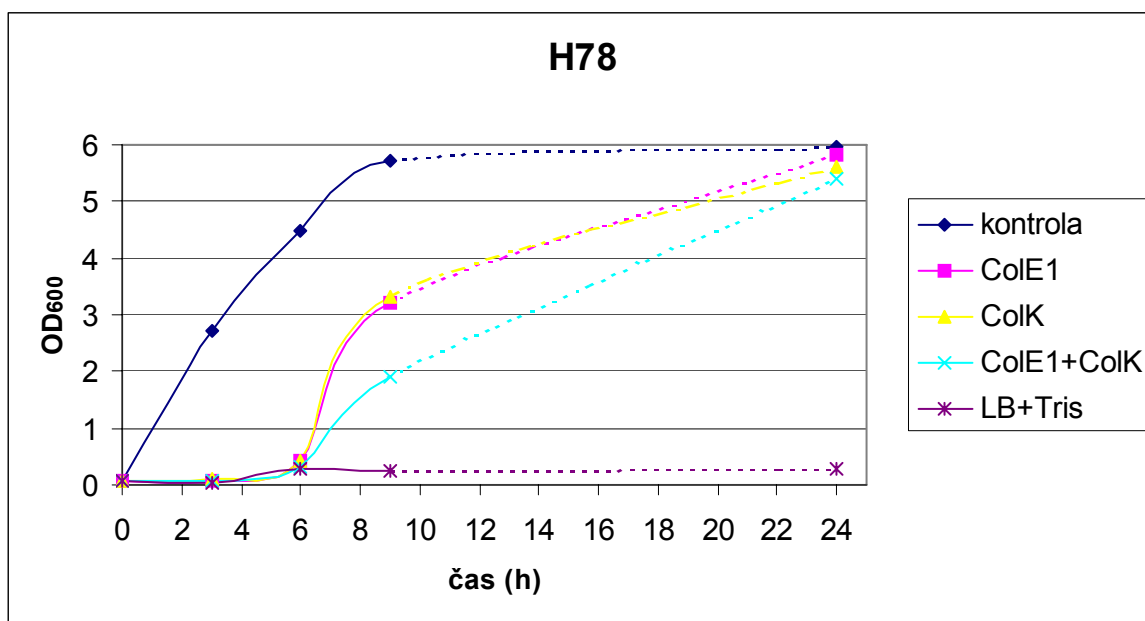


Slika 22: Rast uroseptičnega seva H30 v tekočem gojišču ob prisotnosti različnih koncentracij kolicina E1 v 6 urah.

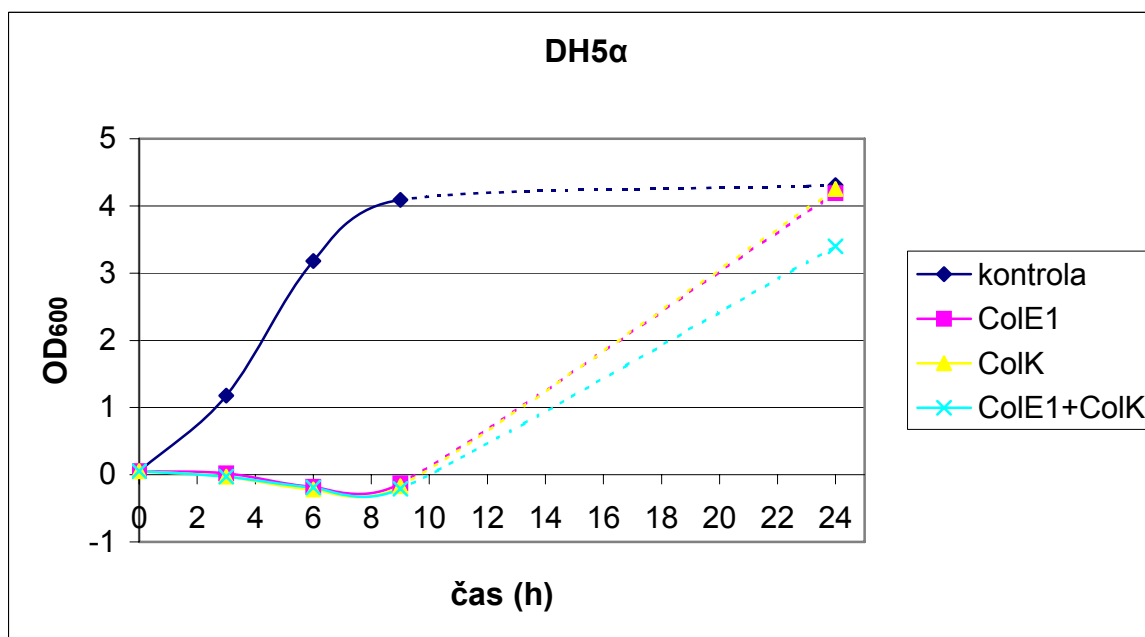
Meritve so bile opravljene v vsaj 3 ponovitvah. Zaradi precejšnje porabe kolicina in zamudne metode smo testirali le del uroseptičnih sevov. Slike 18-22 kažejo, da so različne seve v tekočem gojišču inhibirale različne koncentracije kolicina. MIC v tekočem in na trdem gojišču se mnogokrat niso ujemale. Sev HS27 je v tekočem gojišču inhibirala koncentracija 1 µg/mL kolicina E1, na trdem gojišču pa smo mu določili MIC 10 µg/mL. Preostali prikazani sevi so izkazali enako MIC na trdem in v tekočem gojišču.

4.2.4 UGOTAVLJANJE RAZVOJA ODPORNOSTI OB HKRATNI IZPOSTAVITVI CELIC DVEMA KOLICINOMA

Preverjanje občutljivosti uroseptičnih sevov in laboratorijskega seva DH5α na kolicin E1 v tekočem gojišču so pokazali, da se je odpornost po 24 urah razvila. V nadaljevanju smo želeli ugotoviti, ali bo rast ob hkratni izpostavitvi dvema različnima kolicinoma v enakem časovnem obdobju ostala inhibirana. Celice smo izpostavili delovanju kolicinov E1 in K. Oba sta bila gojišču dodana do končne koncentracije 1 µg/mL. Vse meritve so bile opravljene v enkratni ponovitvi.



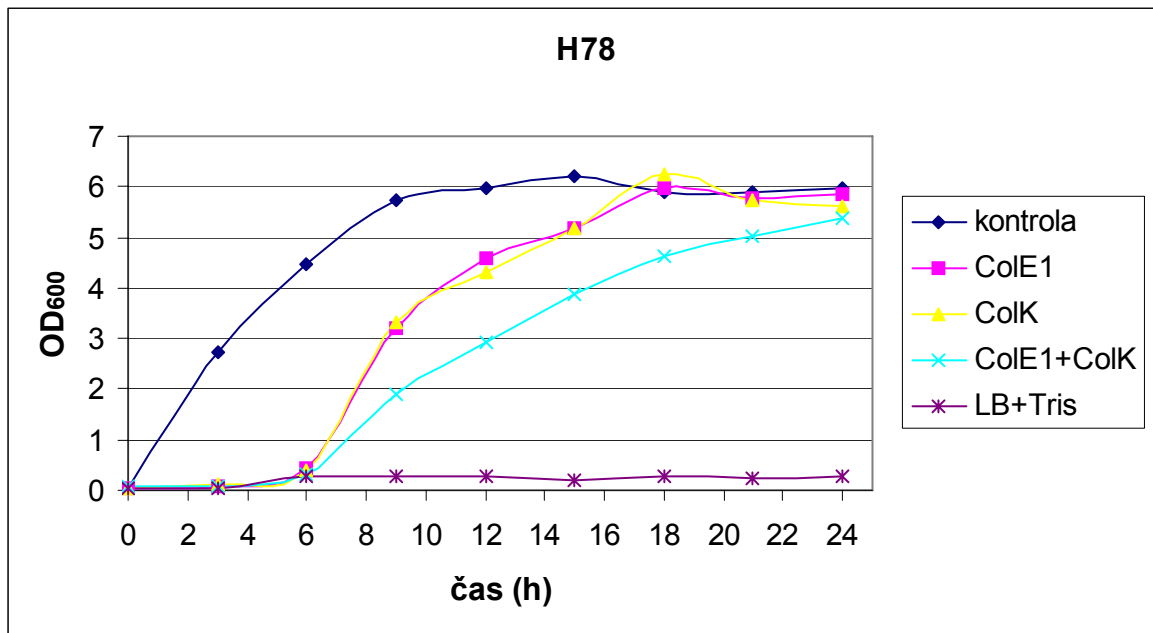
Slika 23: Rast uroseptičnega seva H78 v tekočem gojišču ob prisotnosti kolicina E1 in kolicina K ter ob prisotnosti obeh kolicinov hkrati. Meritve so bile opravljene po 3 h, 6 h, 9 h in 24 h. Oba kolicina sta se v gojiščih nahajala v koncentraciji 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ponovitev LB+Tris je služila kot kontrola sterilnosti.



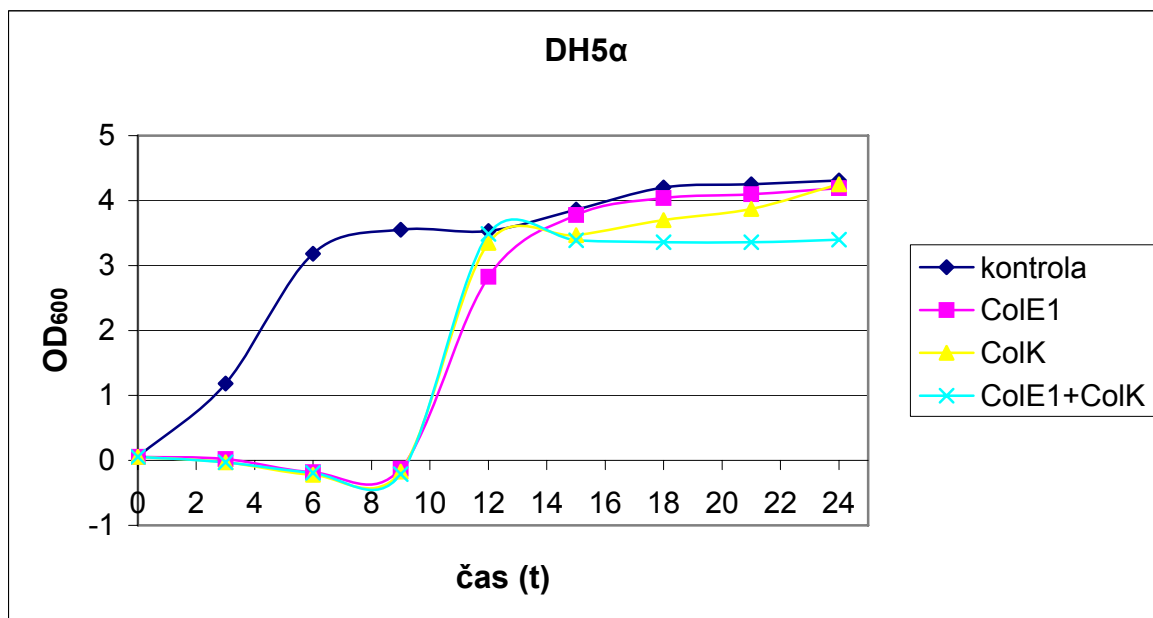
Slika 24: Rast laboratorijskega seva DH5 α v tekočem gojišču ob prisotnosti kolicina E1 in kolicina K ter ob prisotnosti obeh kolicinov hkrati. Meritve so bile opravljene po 3 h, 6 h, 9 h in 24 h. Oba kolicina sta se v gojiščih nahajala v koncentraciji 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Sliki 23 in 24 kažeta, da se je po 6. uri pojavila odpornost in da so do 24. ure celice obeh sevov dosegle le nekoliko nižjo OD₆₀₀ vrednost kot kontrolni ponovitvi. Celice seva DH5 α , izpostavljene dvema kolicinoma hkrati, so po 24 urah kazale malo večje odstopanje OD₆₀₀

vrednosti od preostalih meritev. Kdaj med 6. in 24. uro se je začel razvoj odpornosti, smo ugotavljali z meritvami, opravljenimi v 3-urnih intervalih.



Slika 25: Rast uroseptičnega seva H78 v tekočem gojišču ob prisotnosti kolicina E1 in kolicina K ter ob prisotnosti obeh kolicinov hkrati. Meritve so bile opravljene na vsake 3 h, 24 ur. Oba kolicina sta se v gojiščih nahajala v koncentraciji 1 $\mu\text{g/mL}$. Ponovitev LB+Tris je služila kot kontrola sterilnosti.

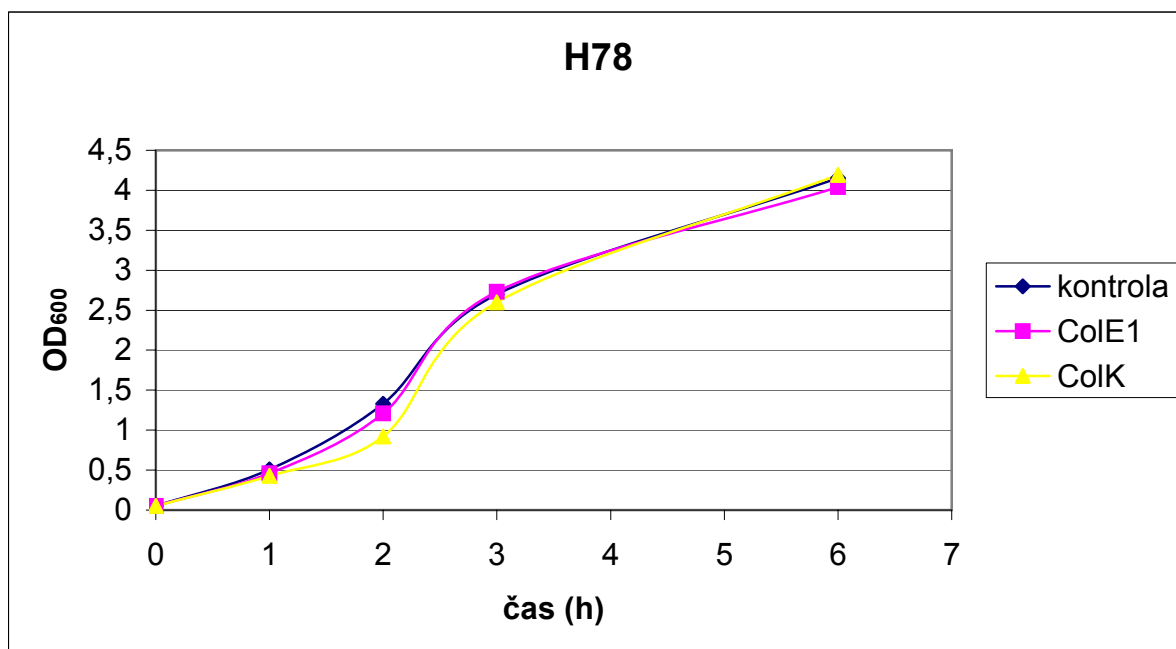


Slika 26: Rast laboratorijskega seva DH5 α v tekočem gojišču ob prisotnosti kolicina E1 in kolicina K ter ob prisotnosti obeh kolicinov hkrati. Meritve so bile opravljene na vsake 3 h, 24 ur. Oba kolicina sta se v gojiščih nahajala v koncentraciji 1 $\mu\text{g/mL}$.

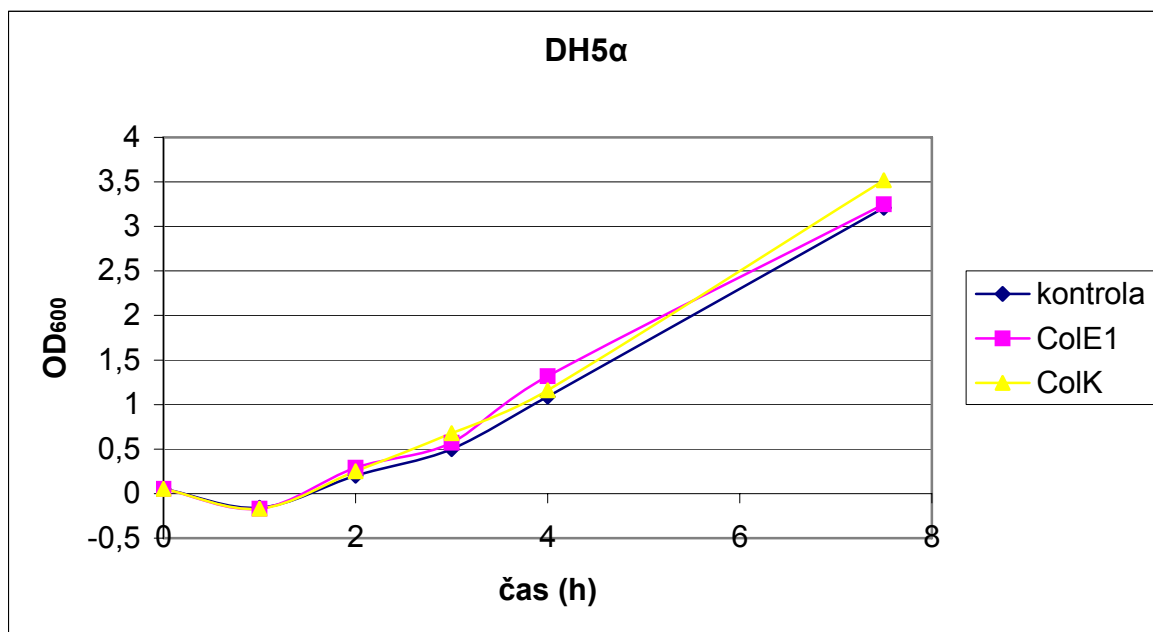
Sliki 25 in 26 sta združeni iz dveh različnih meritev. V prvi ponovitvi smo merili OD₆₀₀ vrednost od 0. do 12. ure, v drugi ponovitvi pa od 15. do 24. ure. Razvoj odpornosti se je pri sevu H78 začel po 6. uri, pri sevu DH5 α pa nekoliko kasneje; med 9. in 12. uro.

4.2.4.1 Preverjanje vzrokov za rast občutljivega seva v gojišču z dodanim kolicinom po 24 urah

Želeli smo potrditev, da rast celic obeh sevov po 24 urah ni bila posledica izgube aktivnosti kolicinov, pač pa posledica mutacij. Prekonočno kulturo sevov H78 in DH5 α iz gojišč z obema kolicinoma smo prenesli v sveži gojišči s svežima kolicinoma ter tudi v sveži gojišči brez kolicinov (kontrolni poskus) in spremljali rast.



Slika 27: Rast uroseptičnega seva H78, prenešenega iz gojišča s kolicinoma E1 in K po 24 urah. Rast je bila spremljana v tekočem gojišču ob prisotnosti kolicina E1, v tekočem gojišču ob prisotnosti kolicina K ter v tekočem gojišču brez dodanih kolicinov. Koncentracija kolicinov je znašala 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Slika 28: Rast laboratorijskega seva DH5 α , prenešenega iz gojišča z dodanima kolicinoma E1 in K po 24 urah. Rast je bila spremljana v tekočem gojišču ob prisotnosti kolicina E1, v tekočem gojišču ob prisotnosti kolicina K ter v tekočem gojišču brez dodanih kolicinov. Koncentracija kolicinov je znašala 1 $\mu\text{g/mL}$.

Iz obeh slik (27 in 28) je razvidno, da so kljub dodatku svežih kolicinov celice rasle enako hitro kot v gojišču, kjer kolicin ni bil dodan. Rast torej ni bila posledica izgube funkcije kolicina, pač pa posledica mutacij.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 PRIDOBIVANJE ZADOSTNIH KOLIČIN KOLICINA ZA NADALJNJE TESTIRANJE NJEGOVE UČINKOVITOSTI PROTI UROSEPTIČNIM SEVOM ZBIRK H, HS, CH, CHS

5.1.1 PRISTOP 1

5.1.1.1 Kolicin E1

Kot vir gena *colE1* smo izbrali sev BZB2104 iz Pugsleyeve zbirke. Po namnoževanju gena, restrikciji in nanosu cepljenega vzorca na agarozni gel se je izkazalo, da se znotraj strukturnega gena za kolicin E1 nahaja nepredvideno restrikcijsko mesto ene od uporabljenih restriktaz. Kasnejši poskus je pokazal, da gre za restrikcijsko mesto encima *MluI* (slika 10). Cepljenega gena nismo mogli popolnega vstaviti v plazmid; vstavil se je zgolj del zapisa, ali pa je bil plazmid prazen. Popoln fragment smo skušali vstaviti na več načinov, in sicer:

- naredili smo veliko ponovitev in upali, da se bo slednjič vstavil celoten, zgolj na koncih cepljen gen,
- poskušali smo s krajšanjem časa restrikcije,
- skušali smo najprej zlepiti oba dela gena za kolicin in ju nato zlepljena vstaviti (ligirati) v plazmid,
- po restrikciji smo vzorce nanесли na agarozni gel ter izrezali liso na višini okoli 1,6 kb. Predvidevali smo, da se v tej lisi nahajajo tudi fragmenti, ki so na obeh koncih cepljeni in se bodo lahko ligirali v plazmid.

Vsi pristopi so se izkazali za neuspešne; transformante niso zrasle, ali pa so bili plazmidi transformiranih kompetentnih celic prazni oz. so imeli le en del gena. Zato smo se odločili problem zaobiti.

Iz predhodnih raziskav (Nipič, 2005) je znano, kateri sevi iz zbirke uroseptičnih sevov H, HS, CH, CHS so kolicinogeni. Med njimi smo poiskali tiste, ki imajo plazmid z genom za kolicin E1. Rezultat je prikazan v preglednici 14. 16 % vseh kolicinogenih sevov iz zbirke ima plazmid s strukturnim genom za kolicin E1. Preverili smo, če restriktazi *MluI* ali *XhoI* v katerem izmed strukturnih genov prepoznata restrikcijsko mesto. Rezultat je bil spodbuden, saj je strukturni gen vseh 7 sevov po restrikciji ostal nedotaknjen. So pa nastale težave pri transformaciji:

1. v nekaterih primerih transformacija DH5 α ni uspela - na gojiščih s selektivnim antibiotikom ni zrasla nobena kolonija.
2. ko smo le uspeli pridobiti transformirane celice, ki so v plazmidu imele želeni gen, smo plazmid izolirali in z njim, kot je pokazala sledeča analiza, uspešno transformirali sev BL21 (DE3). Preverjanje aktivnosti kolicina in ustreznosti transformant BL21 (DE3) pa kolicinske aktivnosti ni pokazalo. Čeprav smo sprožili sintezo kolicina v transformiranih celicah BL21 (DE3), je sev DH5 α , ki je občutljiv na kolicin E1, konfluentno zrasel preko liziranih BL21 (DE3) kolonij.

Vzrokov za neuspešno transformacijo (točka 1) je lahko več. Po eni strani je možno, da celice niso bile optimalno kompetentne. Po drugi strani so morda celice plazmid z genom za kolicin E1 sicer sprejele, vendar je prevedeni protein deloval na proizvajalske celice. V procesu ligacije smo v plazmid namreč vstavili le gen *colE1*, ne pa tudi preostalih dveh genov kolicinskega operona, *cka* in *cia*. Transformirane celice tako niso imele zapisa za protein imunosti in torej niso bile zaščitene proti toksinu, ki so ga proizvajale. Ker smo predpostavljali, da je problem prav v tem, da celice DH5 α niso odporne proti kolicinu E1, smo z izpostavitvijo celic proučevanemu kolicinu po zaslugi naključnih mutacij pridobili odporno linijo. Iz nje smo pripravili kompetentne celice DH5 α , ki jih vstavljeni gen za kolicin ne bi pobil. Transformant nam tudi v tem primeru ni uspelo pridobiti.

Odgovor na vprašanje, zakaj je občutljivi sev rasel kljub sproženju sinteze kolicina v celicah BL21 (DE3) (točka 2), smo iskali drugje. Morda transformacija BL21 (DE3) s plazmidom, izoliranim iz DH5 α , ni bila uspešna, vendar pa so celice zrasle na selekcijskem gojišču z antibiotikom zaradi naključnih mutacij. Druga možnost, h kateri se tudi bolj nagibamo, je, da smo plazmid z genom uspešno vstavili, vendar je bil zapis mutiran in posledično prepisani protein ni imel kolicinske aktivnosti.

Zaradi mnogih nerazjasnenih problemov smo se odločili ta pristop opustiti in se problema lotiti z alternativnim pristopom, opisanim v nadaljevanju.

5.1.1.2 Kolicin E4

Kot vir gena *colE4* smo izbrali sev BZB2107 iz Pugsleyeve zbirke. Kolicin E4 je glede na mehanizem delovanja nukleaza in citotoksično deluje v citoplazmi občutljivih celic. Zato je precej težje doseči rast transformiranih DH5 α ter BL21 (DE3), če jim poleg strukturnega gena za kolicin ne vstavimo tudi gena z zapisom za protein imunosti. Seva nista odporna niti proti kolicinu E1 niti proti kolicinu E4, vendar je zaradi drugačnega mehanizma delovanja delo s kolicinom E4 zahtevnejše. Kolicin E1 je porotvoren kolicin, ki deluje lahko le z zunanje strani (Šmarda in Šmajs, 1998). Po izstopu se sicer lahko veže na receptorje proizvajalske celice in ponovno vstopi, ne more pa delovati nanjo neposredno po sintezi. Preživetje je zato v tem primeru verjetnejše kot v primeru vnosa gena za kolicin E4. Slednji namreč lahko takoj po sintezi napade 16S rRNA proizvajalske celice in jo cepi, če ni prisotnega ustreznega proteina imunosti, ki bi se na kolicin vezal in ga utišal (Sidikaro in Nomura, 1974; Šmarda in Šmajs, 1998; de Zamaroczy in Buckingham, 2002).

Nenavadno pri transformaciji kompetentnih celic DH5 α s plazmidom, ki naj bi imel vstavljen gen za kolicin E4 je bilo, da je bila transformacija že v prvem poskusu uspešna. Glede na to, da je obravnavani kolicin po načinu delovanja nukleaza, bi pričakovali precej več zapletov. Z metodo PCR in agarozno gelsko elektroforezo smo potrdili, da številne transformirane celice DH5 α imajo plazmid s fragmentom, ki se nahaja na ustrezni višini (cca. 500 bp). Po transformaciji BL21 (DE3) s plazmidom, izoliranim iz DH5 α , so testi ponovno pokazali, da transformirane celice imajo zapis velikosti, ki ustreza genu za kolicin E4.

Šele pri preverjanju aktivnosti kolicina se je izkazalo, zakaj je dotedanji postopek uspeval brez večjih problemov. Ultrazvočno obdelane celice BL21 (DE3) z zapisom za kolicin E4

niso inhibirale rasti občutljivega seva bakterij. Po večkratnih neuspešnih ponovitvah smo genu določili nukleotidno zaporedje. Izkazalo se je, da se v strukturnem genu nahajajo mutacije, ki očitno botrujejo izgubi kolicinske aktivnosti prevedenega proteina. Zato nam tudi transformacija kompetentnih celic DH5 α in BL21 (DE3) ni povzročala večjih težav. Po tem spoznanju smo namnožili gen *colE4* iz kliničnega izolata. Izolirani gen je aktivnost očitno imel ohranjeno, saj so problemi nastali že pri transformaciji kompetentnih celic DH5 α - plošče s selekcijskim markerjem (ampicilinom) so bile prazne. Zaradi zahtevnosti dela, ki je posledica mehanizma delovanja kolicina E4, smo se odločili opustiti proučevanje aktivnosti kolicina E4 in se osredotočiti na kolicin E1.

5.1.2 PRISTOP 2

Kot izvorni sev z zapisom za kolicin E1 smo uporabili sev BZB2104 iz Pugsleyeve zbirke, saj ta pristop ne vključuje encimatske cepitve DNA (Stahl in sod., 2004).

Po čiščenju kolicina E1 z metodo FPLC pri pH 8 se je pokazalo, da je bila ločba kolicina E1 od nečistoč slaba. V procesu dialize smo zato zamenjali pufer Tris-Cl pH 8 s Tris-Cl pH 6 in ponovili čiščenje s FPLC. Predpostavili smo boljšo ločitev kolicina od preostalih snovi v vzorcu, saj smo z znižanjem pH povečali razliko med izoelektrično točko (pI) kolicina E1, ki znaša 9,05 (Schwartz in Helinski, 1971) in pH pufera. Pri pH 6 se je na kromatogramu resnično izrisalo več vrhov, ki so bili hkrati tudi višji kot vrhovi pri pH 8 (sliki 12 in 13). Testiranje frakcij je pokazalo, da sta bili aktivnost ter čistost frakcij 6, 8, 9 in 10 ustrezni. Frakcija 6 je bila zelo čista, vendar volumsko neustrezna. Enako je veljalo za frakcijo 8, v kateri je bil zajet tisti del nanešenega vzorca, ki se je spral s kolone tik preden je bil dosežen najvišji vrh - frakcija 9. Frakcija 10 je bila nekoliko manj čista, vendar še zmeraj primerna za uporabo. Optimalna za nadaljnje poskuse je bila torej frakcija 9, saj je bila ustrezno aktivna, čista in volumsko zadostna.

Frakcije 2, 6, 8 in 10 smo shranili za primer, da bi pred zaključkom poskusov porabili celotno frakcijo 9. Frakcijo 2 bi bilo pred uporabo potrebno dodatno očistiti.

5.2 TESTIRANJE UČINKOVITOSTI KOLICINA E1 PROTI UROSEPTIČNIM SEVOM ZBIRK H, HS, CH, CHS

5.2.1 METODA NAKAPLJANE PLOŠČE

V predhodnih korakih smo pridobili ustrezno skoncentriran in očiščen kolicin E1. Sledilo je testiranje učinkovitosti kolicina. MIC kolicina E1 za 105 uroseptičnih sevov iz zbirke H, HS, CH in CHS smo pridobili z metodo razlivanja kultur na plošče in nakapljanja različnih koncentracij kolicina E1. Delali smo v treh ponovitvah. Kot negativno kontrolo smo dodali tudi kapljico Tris pufera brez kolicina, kjer se po pričakovanjih cona lize ni pojavila.

Rezultati so prikazani na sliki 16. Skoraj polovica (47 %) testiranih uroseptičnih sevov je bila proti kolicinu E1 odporna, več kot polovico občutljivih sevov (52 %) pa je inhibirala koncentracija, višja od 100 $\mu\text{g/mL}$. Koncentracije kolicina, nižje od 0,1 $\mu\text{g/mL}$, niso inhibirale nobenega izmed testiranih uroseptičnih sevov, so pa inhibirale rast laboratorijskega seva DH5 α (0,01 $\mu\text{g/mL}$).

Razlike v občutljivosti so lahko posledica različnega števila receptorskih molekul pri različnih sevih ter predvsem posledica učinkovitih povezav receptorjev s translokacijskim sistemom za prevzem kolicina (Douche in sod., 1995; Šmarda in Šmajš, 1998). Na zmanjšano občutljivost lahko vpliva tudi zakrivanje receptorjev s strani O-antigeneske verige lipopolisaharida (van der Ley in sod., 1986).

Predhodno so bile podobne raziskave opravljene s kolicinom K (Rijavec in sod., 2007). Testiranja so bila opravljena na zbirki uropatogenih sevov *E. coli*. Primerjava rezultatov kaže, da je kolicin K učinkovitejše protimikrobno sredstvo, saj večji delež občutljivih bakterij inhibira pri nižjih koncentracijah, poleg tega pa je tudi delež odpornih sevov znatno manjši (slika 17).

Razlog za boljše učinkovanje kolicina K je morda v uporabi drugačnih receptorjev. BtuB, receptor za kolicin E1, se nahaja v zunanji celični membrani v številu 200-300 receptorjev/celico (Heller in sod., 1985), kar je zelo malo. Podatka o številu receptorjev za kolicin K (receptor Tsx)/celico ni, vendar je glede na majhno število receptorjev BtuB zelo verjetno, da je receptorjev Tsx več. Poleg tega se OmpF (sekundarni receptor kolicina K) v zunanji membrani nahaja v približno 10^5 kopijah (Šmarda in Šmajš, 1998), medtem ko je proteinov TolC občutno manj - manj kot 1000 (Schendel in sod., 1997).

Boljšemu privzemu kolicina K lahko botrujejo tudi razlike v prenosu kolicinov preko Tol sistema, ki so podrobneje opisane v pregledu objav. Nenazadnje, predhodne raziskave (van der Ley in sod., 1986) so pokazale, da na občutljivost vpliva tudi zakrivanje receptorjev s strani O-antigena. Vzporedno so testirali občutljivost na sevih divjega tipa ter na izogenih derivatih z odsotnim O-antigenom. Celice z manjkajočim O-antigenom so bile bolj dovzetne za kolicinsko aktivnost. Poleg tega se je že tekom njihove raziskave izkazalo, da so testirani sevi divjega tipa (pa tudi njihovi derivati brez O-antigena) bolj občutljivi na kolicin K kot na kolicin E1.

5.2.2 METODA IZPOSTAVITVE KOLICINU V TEKOČEM LB

Glede na koncentracijo kolicina, potrebno za inhibicijo rasti na ploščah, smo testirane seve razvrstili v skupine. Ker je MIC definirana za tekoče gojišče, smo izbrali po en sev, ki je na trdem gojišču izkazal MIC 0,1 $\mu\text{g/mL}$ oz. 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ in 100 $\mu\text{g/mL}$, ter opazovali rast v tekočem gojišču. Sevov iz skupin 500 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$ ter odpornih sevov nismo nadalje testirali, saj bi bile potrebne koncentracije kolicina previsoke. Predpostavljali smo, da se bodo MIC vrednosti ujemale z rezultati s plošč, saj gre za podobne pogoje, poleg tega pa predhodni poskusi s kolicinom K kažejo, da se rezultati uporabljenih metod ujemajo (Rijavec in sod., 2007). Izkazalo se je, da pri izpostavitvi celic kolicinu E1 lahko prihaja do odstopanj. Sev HS27, ki smo ga glede na rezultat s plošče uvrstili v skupino MIC = 10 $\mu\text{g/mL}$, v tekočem gojišču ni rasel pri koncentraciji kolicina 1 $\mu\text{g/mL}$. Nasprotno pa je sev H4, ki smo ga po pregledu plošč uvrstili v skupino MIC = 10 $\mu\text{g/mL}$, v tej skupini ostal tudi po izpostavitvi kolicinu v tekočem gojišču.

Rezultat preseneča zlasti zato, ker rezultati, dobljeni z metodo razlivanja na plošče in metodo gojenja v tekočem gojišču, ne odstopajo pri vseh sevih enako. Pri nekaterih sevih je razlika v koncentraciji kolicina E1, ki zavira rast, očitna (HS27), medtem ko pri drugih sevih razlik ni (H4). Da nekateri sevi na trdem gojišču pri določeni koncentraciji kolicina ne tvorijo con lize, pri enaki ali celo nižji koncentraciji kolicina v tekočem gojišču pa ne

rastejo, bi se dalo razložiti z razliko v dostopnosti kolicina. V tekočem gojišču so celice enakomerno suspendirane v gojišču z dodanim kolicinom in so zato s celotno površino nenehno izpostavljene delovanju kolicina. Na plošči pa celotna bakterijska površina ni izpostavljena delovanju kolicina, saj se slednji v gojišče vpije; posledično vezava kolicina poteka lahko le preko celične površine, ki je v stiku z agarjem. Na ta način pa ne pojasnimo, zakaj pri nekaterih sevih odstopanj v dobljenih rezultatih ni. Možen vzrok ujemanj rezultatov v enih primerih in neujemanj v drugih je morda posledica dejstva, da smo mikrocentrifugirko s kolicinom nekajkrat odmrznili in ponovno zamrznili. Z večkratnim zamrzovanjem in tajanjem se stabilnost proteina slabša in funkcija izgublja. Učinek različnih koncentracij kolicina smo ugotavljali v redčinah, ki naraščajo za faktor 10. Z nekajkratnim odtajevanjem in zamrzovanjem smo morda povzročili, da se je dejanska koncentracija aktivnega proteina zmanjšala. Razlika v koncentraciji je za inhibicijo rasti pri enem sevu lahko odločilna, ne pa tudi pri drugem. Posledično se rezultati nekaterih sevov ujemajo, pri drugih pa prihaja do odstopanj. To hipotezo potrjujejo tudi opažanja, da se včasih prva in druga ponovitev inhibicije rasti v tekočem gojišču nista ujemale, ko pa smo v gojišče dodali kolicin, ki ni bil še nikoli odmrznjen, se je prvi rezultat ponovil. Kljub temu pri večini sevov, testiranih po obeh metodah, ne glede na število ponovitev nikoli nismo prišli do ujemajočih se rezultatov.

V raziskavah učinkovitosti antibiotikov številni raziskovalci poročajo o odstopanjih med rezultati, dobljenimi z različnimi metodami. Baltch je s sodelavci (1998) proučeval učinek antibiotikov na bakteriji *Enterococcus faecium*, odporni proti vankomicinu. Študija je pokazala precejšnje razlike med rezultati, dobljenimi z metodo gojenja v tekočem gojišču ter na agarški plošči, saj je MIC₉₀ v tekočem gojišču znašala 0,25 µg/ mL, MIC₉₀ na agarški plošči enakega gojišča pa kar 4 µg/mL. Razlike v občutljivosti so se pokazale tudi pri uporabi enake metode na različnih gojiščih.

O razlikah v rezultatih, dobljenih z različnimi metodami ter na različnih gojiščih, poročajo tudi številni drugi avtorji (Gombert in Aulicino, 1986; Doern in Tubert, 1987; Weiss in sod., 1996).

5.3 RAZVOJ ODPORNOSTI OBČUTLJIVIH SEVOV PROTI KOLICINU E1 TER V KOMBINACIJI DVEH KOLICINOV – KOLICINA E1 IN K

Po 6-urnih meritvah OD₆₀₀ smo tekoča gojišča pustili preko noči na stresalniku pri 37 °C ter naslednji dan pregledali epruvete. Vsa gojišča so bila že na pogled motna, meritve OD₆₀₀ pa so potrdile, da je gostota celic v gojišču z dodanim kolicinom po 24 urah praktično enaka kot v gojišču brez dodanega kolicina (slika 19). Celice smo izpostavili še dvema kolicinoma hkrati - kolicinoma E1 in K. Rezultati so prikazani na sliki 23. V prisotnosti dveh kolicinov je občutljivi sev rasel počasneje kot v prisotnosti enega kolicina, vendar se je v 24 urah vseeno razvila odpornost. Meritve OD₆₀₀ v triurnih presledkih (slika 25) so pokazale, da se je razvoj odpornosti kliničnega izolata začel med 6. in 9. uro in sicer ne glede na to, ali so bile celice izpostavljene enemu ali obema kolicinoma. Odpornost je hitreje naraščala v primeru izpostavitve enemu kolicinu, vendar po 24 urah izmerjena OD₆₀₀ vrednost ni pokazala večjih razlik v koncentraciji celic.

Obstaja možnost, da do rasti testiranega občutljivega seva ne bi prišlo zaradi razvoja odpornosti, pač pa zaradi izgube funkcije kolicina. Teoretično bi namreč kolicin lahko po 6 urah začel izgubljati obstojnost in posledično funkcijo. Zato smo vzeli vzorec kulture, 24

ur izpostavljene delovanju obeh kolicinov, z njim inokulirali sveže LB gojišče s svežim kolicinom E1 ter sveže gojišče s svežim kolicinom K, in spremljali rast. Izvedli smo še kontrolno ponovitev, in sicer smo prekončno, obema kolicinoma izpostavljeno kulturo inokulirali v svež LB brez kolicina. Rezultat meritev je prikazan na sliki 27. Graf nazorno kaže, da so celice v vseh treh ponovitvah rasle enako hitro. Trdimo torej lahko, da je do razvoja odpornosti zagotovo prišlo ter da rast celic ni posledica izgube funkcije kolicinov.

5.4 SKLEPI

- Z metodo izolacije rekombinantnega kolicina z dodanim histidinskim repkom nismo uspešno izolirali kolicinov E1 in E4;
- zbirka 105 uroseptičnih sevov (H, HS, CH, CHS) ima 45 kolicinogenih sevov, med slednjimi pa ima 16 % sevov strukturni gen za kolicin E1. Vsi zapisi so primerni za pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi, ki imajo restrikcijski mesti za *MluI* in *XhoI*;
- dodatek mitomicina C v gojišče 100× poveča izražanje gena *colE1*;
- ločevanje kolicina E1 od nečistoč z metodo FPLC je boljše pri pH 6 kot pH 8;
- kolicin E1 po metodi nakapljane plošče inhibira 8 % sevov pri koncentraciji 0,1 µg/mL, 8 % sevov pri 1 µg/mL, 8 % sevov pri 10 µg/mL, 24 % sevov pri 100 µg/mL. 52 % sevov je proti kolicinu E1 odpornih oziroma jih inhibira koncentracija kolicina, višja od 100 µg/mL;
- kolicin E1 je manj učinkovito protimikrobno sredstvo kot kolicin K;
- MIC kolicina E1 za občutljive seve se pri različnih metodah gojenja lahko razlikujejo;
- rast občutljivega seva po 24 urah ni posledica izgube aktivnosti kolicinske molekule, pač pa je posledica mutacij;
- odpornost se pri občutljivem sevu razvije v 24 urah tudi ob hkratnemu delovanju kolicinov E1 in K.

6 POVZETEK

Infekcije urinarnega trakta so med najpogostejšimi okužbami, ki jih pri ljudeh povzročajo bakterije, najpogostejši povzročitelji pa so bakterijski sevi *E. coli*. Zaradi naraščajočega števila bakterij, odpornih proti antibiotikom, ter pojavljanja bakterijskih sevov, odpornih proti več antibiotikom, se kolicini v zadnjem času obravnavajo kot zanimiva alternativna protimikrobna sredstva.

Kolicini so citotoksični proteini, ki jih proizvajajo kolicinogeni sevi *E. coli* in nekatere sorodne vrste iz družine *Enterobacteriaceae*. Imajo ozek spekter delovanja, saj delujejo le na sorodne vrste. Kolicinsko molekulo sestavljajo 3 domene. N-terminalna domena, imenovana domena T, sodeluje pri translokaciji dela kolicinske molekule preko celične ovojnice. Osrednja domena, imenovana domena R, prepozna in se veže na specifični celični receptor. C-terminalna domena, imenovana domena C, pa opravi citotoksično delovanje.

Celice, ki rastejo kljub prisotnosti kolicina, so nanj imune (imajo zapis za sintezo proteina imunosti, ki prepreči delovanje domene C kolicina), tolerantne (imajo okvarjen translokacijski sistem, preko katerega domena T kolicina prečka celično ovojnico), ali pa odporne (imajo okvarjen receptor, katerega prepozna in se nanj veže domena R kolicina).

V diplomski nalogi smo izolirali kolicin E1 in proučevali njegovo učinkovitost proti 105 sevom *E. coli* uroseptične zbirke H, HS, CH in CHS. Proučevanje kolicina E4 smo po neuspešni izolaciji s prvim pristopom opustili. Kolicin E1 s tvorbo por v membrani tarčne celice uniči elektrokemijski potencial citoplazemske membrane, kolicin E4 pa cepi 16S rRNA.

V proučevani zbirki uroseptičnih sevov (H, HS, CH, CHS) je 45 sevov kolicinogenih in med njimi ima gen za sintezo kolicina E1 16 % sevov. Vsi ti sevi so na kolicin E1 tudi imuni. Izmed 105 testiranih sevov jih je 52 % na kolicin E1 neobčutljivih oziroma jih inhibirajo koncentracije, višje od 500 µg/mL. 24 % testiranih sevov inhibirajo koncentracije, nižje ali enake 10 µg/mL. Koncentracije kolicina E1, nižje od 0,1 µg/mL, ne inhibirajo testiranih kliničnih izolatov. Kolicin E1 je manj učinkovito protimikrobno sredstvo kot kolicin K, vzrok pa je verjetno uporaba različnih primarnih in sekundarnih receptorjev. Ti so za kolicin K v povprečju številčnejši v bakterijskih ovojnicah. Vzrok je morda tudi v variacijah translokacijskega sistema Tol.

Različne metode določanja MIC kolicina E1 dajo lahko različne rezultate. Rezultati metode izpostavitve testiranih sevov kolicinu E1 v tekočem gojišču se včasih razlikujejo od rezultatov, dobljenih z metodo nakapljanje plošče. Poleg tega se po 24 urah v tekočem gojišču vselej zasledi razvoj odpornosti, medtem ko cone lize na trdem gojišču po 24 urah ostanejo. Tudi hkratna izpostavitve sicer občutljivega seva kolicinoma E1 in K v tekočem gojišču po 24 urah ne onemogoči razvoja odpornosti. Rast celic ni posledica izgube funkcije kolicinov E1 in K, pač pa rezultat mutacij v testiranem bakterijskem sevu.

7 VIRI

- Ahmer B.M.M., Thomas M.G., Larsen R.A., Postle K. 1995. Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB and ExbD in TonB function and stability. *Journal of Bacteriology*, 177, 16: 4742-4747.
- Baltch A.L., Smith R.P., Ritz W.J., Bopp L.H. 1998. Comparison of inhibitory and bactericidal activities and postantibiotic effects of LY333328 and ampicillin used singly and in combination against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 10: 2564-2568.
- Baty D., Frenette M., Llobes R., Geli V., Howard S.P., Pattus F., Lazdunski C. 1988. Functional domains of colicin A. *Journal of Molecular Microbiology*, 2, 6: 807-811 (povzetek).
- Blattner F.R., Plunkett G.III, Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides N., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277, 5331: 1453-1462.
- Boon T. 1972. Inactivation of ribosomes in vitro by colicin E3 and its mechanism of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69, 3: 549-552.
- Bowman C.M., Dahlberg J.E., Ikemura T., Konisky J., Nomura M. 1971. Specific inactivation of 16S r RNA induced by colicin E3 *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68, 5: 964-968.
- Cascales E., Buchanan S.K., Duche D., Kleanthous C., Llobes R., Postle K., Riley M., Slatin S., Cavard D. 2007. Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 1: 158-229.
- Cavard D. 1991. Synthesis and functioning of the colicin E1 lysis protein: comparison with the colicin A lysis protein. *Journal of Bacteriology*, 173, 1: 191-196.
- Chan P.T., Ohmori H., Tomizawa J., Lebowitz J. 1985. Nucleotide sequence and gene organization of ColE1 DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 15: 8925-8935.
- Chumchalova J., Šmarda J. 2003. Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia Microbiologica*, 48, 1: 111-115.
- Cursino L., Šmarda J., Chartone-Souza E., Nascimento A.M.A. 2002. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 3: 185-195.
- Dankert J.R., Uratani Y., Grabau C., Cramer W.A., Hermodson M. 1982. On a domain structure of colicin E1. *Journal of Biological Chemistry*, 25, 7: 3857-3863.
- Davidson V.L., Brunden K.R., Cramer W.A. 1985. Acidic pH requirement for insertion of colicin E1 into artificial membrane vesicles: relevance to the mechanism of action of colicins and certain toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 5: 1386-1390.
- Di Masi D.R., White J.C., Schnaitman C.A., Bradbeer C. 1973. Transport of vitamin B₁₂ in *Escherichia coli*: common receptor sites for vitamin B₁₂ and the E colicins on the outer membrane of the cell envelope. *Journal of Bacteriology*, 115, 2: 506-513.
- Doern G.V., Tubert T.A. 1988. In vitro activities of 39 antimicrobial agents for *Branhamella catarrhalis* and comparison of results with different quantitative

- susceptibility test methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, 2: 259-261.
- Douche D., Letellier L., Gell V., Benedetti H., Baty D. 1995. Quantification of group A colicin import sites. *Journal of Bacteriology*, 177, 17: 4935-4939.
- Dowell S.F., Kupronis B.A., Zell E.R., Shay D.K. 2000. Mortality from pneumonia in children in the United States, 1939 through 1996. *New England Journal of Medicine*, 342, 19: 1399-1407.
- Ebina Y., Nakazawa A. 1983. Cyclic AMP-dependent initiation and ρ -dependent termination of colicin E1 gene transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 11: 7072-7078.
- Eraso J.M., Weinstock G.M. 1992. Anaerobic control of colicin E1 production. *Journal of Bacteriology*, 174, 15: 5101-5109.
- Gillor O., Kirkup B.C., Riley M.A. 2004. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Advances in Applied Microbiology*, 54: 129-146.
- Gillor O., Nigro L.M., Riley M.A. 2005. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*, 11, 8: 1067-1075.
- Gombert M.E., Aulicino T.M. 1986. Comparison of agar dilution, microtitre broth dilution and tube macrodilution susceptibility testing of ciprofloxacin against several pathogens at two different inocula. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 16, 6: 709-712.
- Griko Y.V., Zakharov S.D., Cramer W.A. 2000. Structural stability and domain organization of colicin E1. *Journal of Molecular Biology*, 302, 4: 941-953.
- Guihard G., Boulanger P., Benedetti H., Llobes R., Besnard M., Lettelier L. 1994. Colicin A and the Tol proteins involved in its translocation are preferentially located in the contact sites between the inner and outer membrane of *Escherichia coli* cells. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 8: 5874-5880.
- Hands S.L. 2004. Biophysical investigations of the mechanism of colicin translocation. Doctoral thesis. Nottingham, University of Nottingham, School of Pharmacy: 254 str.
- Heller K., Mann B.J., Kadner R.J. 1985. Cloning and expression of the gene for the vitamin B12 receptor protein in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 161, 3: 896-903.
- Jack R.W., Tagg J.R., Ray B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59, 2: 171-200.
- Jakes K.S., Model P. 1979. Mechanism of export of colicin E1 and colicin E3. *Journal of Bacteriology*, 138, 3: 770-778.
- James R., Penfold C.N., Moore G.R., Kleanthous C. 2002. Killing of *E. coli* cells by E group nuclease colicins. *Biochimie*, 84, 5: 381-389.
- Koronakis V., Sharff S., Koronakis E., Luisi B., Hughes C. 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 405, 6789: 914-919.
- Koronakis V., Andersen C., Hughes C. 2001. Channel-tunnels. *Current Opinion in Structural Biology*, 11, 4: 403-407.

- Kühlmann U.C., Pommer A.J., Moore G.R., James R., Kleanthous C. 2000. Specificity in protein-protein interactions: the structural basis for dual recognition in endonuclease colicin-immunity protein complexes. *Journal of Molecular Biology*, 301, 5: 1163-1178.
- Lazzaroni J.-C., Vianney A., Popot J.L., Benedetti H., Samatey F., Lazdunski C., Portalier R., Geli V. 1995. Transmembrane α -helix interactions are required for the functional assembly of the *Escherichia coli* Tol complex. *Journal of Molecular Biology*, 246, 1: 1-7.
- Lazzaroni J.-C., Dubuisson J.-F., Vianney A. 2002. The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the translocation of group A colicins. *Biochimie*, 84, 5: 391-397.
- Lewis R. 1995. The rise of antibiotic-resistant infections. *FDA Consumer Magazine*, 29, 7: 11-15.
- van der Ley P., de Graaff P., Tommassen J. 1986. Shielding of *Escherichia coli* outer membrane proteins as receptors for bacteriophages and colicins by O-antigenic chains of lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 168, 1: 449-451.
- Lotz W. 1978. Effect of guanosine tetraphosphate on in vitro protein synthesis directed by E1 and E3 colicinogenic factors. *Journal of Bacteriology*, 135, 2: 707-712.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock biology of microorganisms*. 10th ed. London, Prentice-Hall International: 991 str.
- Murinda S.E., Roberts R.F., Wilson R.A. 1996. Evaluation of colicins for inhibitory activity against diarrheagenic *Escherichia coli* strains, including serotype O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 9: 3196-3202.
- Nascimento G.G.F., Locatelli J., Freitas P.C., Silva G.L. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 4: 247-256.
- Nataro J.P., Kaper J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 1: 142-201.
- Nicolle L.N. 2002. Epidemiology of urinary tract infections. *Clinical Microbiology Newsletter*, 24, 18: 135-140.
- Nipič D. 2005. Toksini in sistemi prevzema železa uroseptičnih sevov bakterije *Escherichia coli*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 72 str.
- Padilla C., Brevis P., Said A., Molina R. 1990. Inhibition of the growth of Enteropathogenic bacilli by bacteriocins produced by micro-organisms from the sediment of wells. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 3: 289-295.
- Pilsel H., Braun V. 1995. Strong function-related homology between the pore-forming colicins K and 5. *Journal of Bacteriology*, 177, 23: 6973-6977.
- Pugsley A.P., Schwartz M. 1984. Colicin E2 release: lysis, leakage or secretion? Possible role of a phospholipase. *EMBO Journal*, 3, 10: 2393-2397.
- Reid G., Jass J., Sebulsky M.T., McCormick J.K. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 4: 658-672.
- Rijavec M., Budič M., Mrak P., Müller-Premru M., Podlesek Z., Žgur-Bertok D. 2007. Prevalence of the ColE1-like plasmids and colicin K production among uropathogenic *Escherichia coli* strains and quantification of inhibitory activity of colicin K. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3: 1029-1032.

- Riley M.A. 1993. Molecular mechanisms of colicin evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 6: 1380-1395.
- Riley M.A., Wertz J.E. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annual Review of Microbiology*, 56: 117-137.
- Salles B., Weisemann J.M., Weinstock G.M. 1987. Temporal control of colicin E1 induction. *Journal of Bacteriology*, 169, 11: 5028-5034.
- Schamberger G.P., Phillips R.L., Jacobs J.L., Diez-Gonzalez F. 2004. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 10: 6053-6060.
- Schendel S.L., Click E.M., Webster R.E., Cramer W.A. 1997. The TolA protein interacts with colicin E1 differently than with other group A colicins. *Journal of Bacteriology*, 179, 11: 3683-3690.
- Scheutz F., Strockbine N.A. 2005. Genus I. *Escherichia*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2: The proteobacteria. Part B: The gammaproteobacteria. 2nd ed. Brenner D.J., Krieg N.R., Noel R., Staley J.T., Garrity G.M. (eds.). New York, Springer: 607-624.
- Schwartz S.A., Helinski D.R. 1971. Purification and characterization of colicin E1. *Journal of Biological Chemistry*, 246, 20: 6318-6327.
- Sidikaro J., Nomura M. 1974. E3 Immunity Substance. A protein from E3-colicinogenic cells that accounts for their immunity to colicin E3. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 2: 445-453.
- Soelaiman S., Jakes K., Wu N., Li C., Shoham M. 2001. Crystal structure of colicin E3: implications for cell entry and ribosome inactivation. *Molecular Cell*, 8, 5: 1053-1062.
- Song H.Y., Cramer W.A. 1991. Membrane topography of ColE1 gene products: the immunity protein. *Journal of Bacteriology*, 173, 9: 2935-2943.
- Stahl C.H., Callaway T.R., Lincoln L.M., Lonergan S.M., Genovese K.J. 2004. Inhibitory activities of colicins against *Escherichia coli* strains responsible for postweaning diarrhea and edema disease in swine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 8: 3119-3121.
- Šmarda J., Obdržalek V., Taborsky I., Mach J. 1978. The cytotoxic and cytotoxic effect of colicin E3 on mammalian tissue cells. *Folia Microbiologica*, 23, 4: 272-277.
- Šmarda J., Keprtova J. 1987. Cytotoxic effects of colicins E1-E5 and K on hamster fibroblasts. *Folia Microbiologica*, 32, 2: 133-136.
- Šmarda J., Šmajs D. 1998. Colicins – Extracellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*, 43, 6: 563-582.
- Tomita K., Ogawa T., Uozumi T., Watanabe K., Masaki H. 2000. A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 15: 8278-8283.
- Trautner B.W., Hull R.A., Darouiche R.O. 2005. Colicins prevent colonization of urinary catheters. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 2: 413-415.
- van der Waal F. J., Luirink J., Oudega B. 1995. Bacteriocin release proteins: mode of action, structure and biotechnological application. *FEMS Microbiology Reviews*, 17: 381-399.

- Weber-Dabrowska B., Mulczyk M., Gorski A. 2003. Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplantation Proceedings*, 35, 4: 1385-1386.
- Weiss K., Laverdiere M., Rivest R. 1996. comparison of antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species by broth microdilution and disk diffusion methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 4: 930-933.
- Wooley R.E., Gibbs P.S., Shotts E.B. Jr. 1999. Inhibition of *Salmonella typhimurium* in the chicken intestinal tract by a transformed avirulent avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 43, 2: 245-250.
- Yamada M., Ebina Y., Miyata T., Nakazawa T., Nakazawa A. 1982. Nucleotide sequence of the structural gene for colicin E1 and predicted structure of the protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 9: 2827-2831.
- Zakharov S.D., Lindeberg M., Griko Y., Salamon Z., Tollin G., Prendergast F.G., Cramer W.A. 1998. Membrane-bound state of the colicin E1 channel domain as an extended two-dimensional helical array. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 8: 4282-4287.
- Zakharov S.D., Cramer W.A. 2002. Colicin crystal structures: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1565, 2: 333-346.
- de Zamaroczy M., Buckingham R.H. 2002. Importation of the nuclease colicins into *E. coli* cells: endoproteolytic cleavage and its prevention by the immunity protein. *Biochimie*, 84, 5-6: 423-432.

ZAHVALA

Najprej naj se zahvalim Matiju za veliko pomoč pri delu v laboratoriju. Hvala za jasne in praktične napotke, razumljive razlage, pomoč pri vseh težavah (ki jih resnično ni bilo malo) in potrpežljivost.

Hvala Andreju R. s katedre za biokemijo, ki je omogočil in pomagal pri izvedbi alternativnega pristopa izolacije kolicina.

Hvala Mateju za drobne nasvete in napotke, kadar Matije ravno ni bilo pri roki, ter za splošno pripravljenost priskočiti na pomoč.

Zahvaljujem se prof. dr. Darji Žgur Bertok za mentorstvo, nasvete in usmerjanje tako pri delu v laboratoriju, kot tudi pri pisanju diplomske naloge. Hvala recenzentki prof. dr. Ines Mandić Mulec za konstruktivno kritiko pisnega izdelka.

Hvala Žigu za optimizem, dobro voljo in zaupanje vame, za podporo v težkih trenutkih in prenašanje mojih muh (še posebno, ker so mu dozirane v največjih količinah).

Hvala bratu Juretu in njegovi Vesni za tehnično pomoč.

Hvala vsem prijateljem in kolegom za spodbudne besede in razumevanje. Špeli in Katarini hvala tudi za koristne nasvete pri oblikovanju diplomske naloge ter iskanju ustreznih izrazov.

Nenazadnje, velika zahvala gre mojima staršema, ki sta me tekom izobraževanja ves čas podpirala ter mi nudila optimalne pogoje za realizacijo zastavljenih ciljev.

PRILOGE

Priloga A: Cone lize uroseptičnih sevov *E. coli* iz zbirke H, HS, CH in CHS. Rezultati so pridobljeni z metodo nakapljanje plošče.

sev	1000 µg/mL	500 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	0,1 µg/mL
H1	M	M	M	X	X	X
H2	M	M	M	M	X	X
H3	✓	✓	M	X	X	X
H4	M	M	M	M	X	X
H5	M	M	X	X	X	X
H6	✓	✓	✓	✓	M	X
H8	X	X	X	X	X	X
H9	✓	✓	✓	✓	✓	M
H10	X	X	X	X	X	X
H11	X	X	X	X	X	X
H13	M	M	M	X	X	X
H15	X	X	X	X	X	X
H16	M	M	M	X	X	X
H17	X	X	X	X	X	X
H18	X	X	X	X	X	X
H19	M	M	M	X	X	X
H20	X	X	X	X	X	X
H21	X	X	X	X	X	X
H24	X	X	X	X	X	X
H27	✓	M	M	X	X	X
H28	X	X	X	X	X	X
H29	X	X	X	X	X	X
H30	✓	✓	M	X	X	X
H32	X	X	X	X	X	X
H33	X	X	X	X	X	X
H35	X	X	X	X	X	X
H36	✓	✓	✓	✓	✓	X
H38	X	X	X	X	X	X
H39	M	M	M	X	X	X
H41	X	X	X	X	X	X
H42	✓	✓	✓	✓	✓	X
H43	M	M	M	X	X	X
H44	✓	✓	✓	✓	✓	M
H45	✓	M	M	X	X	X
H46	X	X	X	X	X	X
H48	X	X	X	X	X	X
H49	M	M	M	X	X	X
H50	X	X	X	X	X	X
H51	✓	✓	✓	M	M	X

se nadaljuje

Priloga A: Cone lize uroseptičnih sevov *E. coli* iz zbirke H, HS, CH in CHS. Rezultati so pridobljeni z metodo nakapljanje plošče.

sev	1000 µg/mL	500 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	0,1 µg/mL
H52	M	M	X	X	X	X
H54	X	X	X	X	X	X
H55	X	X	X	X	X	X
H58	M	M	M	X	X	X
H59	X	X	X	X	X	X
H60	✓	✓	M	X	X	X
H61	M	M	X	X	X	X
H62	X	X	X	X	X	X
H63	✓	✓	✓	✓	M	X
H65	M	M	M	M	X	X
H67	X	X	X	X	X	X
H68	M	M	M	X	X	X
H71	✓	✓	✓	✓	M	X
H72	X	X	X	X	X	X
H74	X	X	X	X	X	X
H75	✓	M	M	M	X	X
H76	✓	✓	✓	M	X	X
H77	✓	✓	✓	✓	M	M
H78	✓	✓	✓	✓	M	M
H79	X	X	X	X	X	X
H80	✓	✓	✓	✓	M	M
HS1	M	M	M	X	X	X
HS2	X	X	X	X	X	X
HS3	M	M	M	X	X	X
HS4	X	X	X	X	X	X
HS6	X	X	X	X	X	X
HS7	✓	✓	✓	✓	M	M
HS8	M	M	M	X	X	X
HS11	✓	✓	✓	M	X	X
HS13	✓	✓	M	M	X	X
HS15	X	X	X	X	X	X
HS16	X	X	X	X	X	X
HS18	✓	✓	M	X	X	X
HS19	M	M	M	X	X	X
HS20	✓	✓	✓	M	M	X
HS22	X	X	X	X	X	X
HS23	✓	M	M	X	X	X
HS24	X	X	X	X	X	X
HS27	✓	✓	✓	M	X	X
HS30	X	X	X	X	X	X
HS31	M	M	M	X	X	X

se nadaljuje

Priloga A: Cone lize uroseptičnih sevov *E. coli* iz zbirke H, HS, CH in CHS. Rezultati so pridobljeni z metodo nakapljane plošče.

sev	1000 µg/mL	500 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	0,1 µg/mL
HS32	X	X	X	X	X	X
HS33	X	X	X	X	X	X
HS37	✓	✓	M	X	X	X
HS38	✓	✓	✓	✓	M	M
HS39	M	M	X	X	X	X
HS41	X	X	X	X	X	X
HS42	M	M	X	X	X	X
HS45	X	X	X	X	X	X
HS46	X	X	X	X	X	X
HS47	X	X	X	X	X	X
HS48	M	M	M	X	X	X
HS49	X	X	X	X	X	X
HS50	M	X	X	X	X	X
CH1	X	X	X	X	X	X
CH2	X	X	X	X	X	X
CH3	X	X	X	X	X	X
CH4	✓	✓	✓	✓	M	X
CH5	X	X	X	X	X	X
CH9	X	X	X	X	X	X
CH14	M	M	M	X	X	X
CH15	X	X	X	X	X	X
CHS2	M	M	X	X	X	X
CHS3	X	X	X	X	X	X

Legenda: ✓ bistra cona lize
 M motna cona lize
 X ni cone lize