

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Jernej KOROŠEC

**POMEN EGEROLIZINA RahU ZA TVORBO
BIOFILMA BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Jernej KOROŠEC

**POMEN EGEROLIZINA RahU ZA TVORBO
BIOFILMA BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

IMPORTANCE OF AEGEROLYSIN RahU IN *Pseudomonas aeruginosa* BIOFILM DEVELOPMENT

M. Sc. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za biokemijo, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Kristino Sepčić, za somentorja doc. dr. Mateja Butala, za recenzentko prof. dr. Barbko Jeršek.

Mentorica: prof. dr. Kristina SEPČIĆ

Somentor: doc. dr. Matej BUTALA

Recenzentka: prof. dr. Barbka JERŠEK

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehnična fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Matej BUTALA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Barbka JERŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

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

Jernej Korošec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 577.122:579.25/.26:577.2.088(043)=163.6 proteini/egerolizin/RahU/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> /zaznavanje celične
KG	gostote/tvorba biofilma/molekularne tehnike/plazmidi/RahU-mCherry/epifluorescenčna mikroskopija/eGFP-RhlR/topnost proteina
AV	KOROŠEC, Jernej, dipl. mikrobiol (UN)
SA	SEPČIĆ, Kristina (mentorica)/ BUTALA, Matej (somentor)/ JERŠEK, Barbka (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2015
IN	POMEN EGEROLIZINA RahU ZA TVORBO BIOFILMA BAKTERIJE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XV, 71 str., 6 pregl, 31 sl., 6 pril., 85 vir.
IJ	SL
JI	sl/en
AI	Egerolizini so majhni (~15 kDa) proteini, ki jih najdemo pri rastlinah, glivah, virusih in bakterijah. Imajo afiniteto do lipidnih molekul, a njihov biološki pomen še ni pojasnjen. Analizirali smo vpliv proteina RahU, egerolizina bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na tvorbo biofilma, kjer smo pričakovali, da bo odsotnost ali prisotnost RahU zvečala oziroma zmanjšala količino nastalega biofilma. Biofilm smo rasli v statičnem sistemu in določili maso biofilma z metodo barvanja s kristal vijoličnim in spektroskopsko analizo pri OD ₅₅₀ . Mutacija v genu <i>rahU</i> ni povzročila razlike ali zvečanja količine biofilma, medtem ko je dodatek RahU k biofilmu povzročil značilno zmanjšanje količine nastalega biofilma seva <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1. Promotorsko področje in kodirajoče področje gena za protein RahU smo spojili s poročevalskim genom za rdeči fluorescenčni protein mCherry brez lastnega promotorja na plazmidu, ki je v celici v nizkem številu kopij. S fluorescenčno mikroskopijo smo potrdili, da je izražanje <i>rahU</i> pod kontrolo sistema zaznavanja celične gostote in dokazali, da se <i>rahU</i> izraža enakomerno po celotnem biofilmu. Z namenom dokaza direktne vezave ključnega transkripcijskega faktorja sistema zaznavanja celične gostote, proteina RhlR, smo izboljšali topnost inkluzijskih teles RhlR, kar je usmeritev za nadaljnje poskuse za pridobitev višjih koncentracij čistega proteina RhlR. Nadalje smo dokazali, da v nasprotju s fluorescenčnim fuzijskim egerolizinom užitne gobe <i>Pleurotus ostreatus</i> (OlyA-mCherry), RahU-mCherry ne interagira z membranami govejih eritrocitov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 577.122:579.25/.26:577.2.088(043)=163.6
proteins/aegerolysin/RahU/*Pseudomonas aeruginosa*/quorum sensing/biofilm
CX formation/molecular techniques/plasmids/RahU-mCherry/epifluorescence
microscopy/eGFP-RhlR/protein solubility
AU KOROŠEC, Jernej
AA SEPČIĆ, Kristina (supervisor)/ BUTALA, Matej (co-advisor)/ JERŠEK,
Barbka (reviewer)
PP SI 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2015
TI IMPORTANCE OF AEGEROLYSIN RahU IN *Pseudomonas aeruginosa*
BIOFILM DEVELOPMENT
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XV, 71 p., 6 tab, 31 fig., 6 ann., 85 ref.
LA SL
AL sl/en

The aegerolysin protein family contains over 300 members of small (~15 kDa) proteins found in fungi, plants, viruses and bacteria. Aegerolysins show affinity toward lipids, but their exact biological function remains elusive. We analyzed the effects of aegerolysin RahU of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* on its biofilm development, where based on current information, it was expected that the presence or absence of RahU would respectively decrease or increase the amount of biofilm formed. Through culturing biofilms in a static system and measuring biofilm mass with the crystal violet staining method, we showed that a mutation in the gene *rahU* did not cause a significant effect or increase in biofilm mass, whereas external application of RahU into the growth media did significantly decrease the amount of biofilm formed by the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain. By fusing the RahU promoter and coding region to a red fluorescent reporter protein (mCherry) in a plasmid construct with low copy number, we monitored its expression and synthesis. The fluorescence correlated with high cell density in the stationary phase of growth, confirming that *rahU* gene is controlled by the quorum sensing system. Furthermore, we showed that *rahU* is uniformly expressed in the cells that form the biofilm. To confirm the binding of RhlR, the key transcriptional factor of this system, to the promoter region of *rahU*, we optimized the conditions to obtain higher yields of soluble RhlR. This now enables further studies to show direct RhlR-*rahU* control. In addition, we show that unlike the fluorescently fused aegerolysin OlyA from *Pleurotus ostreatus* (OlyA-mCherry), RahU-mCherry does not interact with bovine erythrocyte membranes.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN DELA	1
1.3 CILJI	2
1.4 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZAZNAVANJE CELIČNE GOSTOTE POPULACIJE	3
2.1.1 Uvod v zaznavanje celične gostote	3
2.1.2 Mehanizem zaznavanja celične gostote pri po gramu negativnih bakterijah...3	3
2.1.3 Sistem zaznavanja celične gostote bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.1.4 Čas uravnavanja genov QS s sistemoma Las in Rhl	5
2.1.5 Promotorski elementi, specifični za vezavo transkripcijskih faktorjev LasR in RhlR.....	5
2.1.6 Plastičnost sistemov Las in Rhl vpetih v kompleksen regulon QS.....	7
2.1.7 Težavna sinteza transkripcijskih faktorjev tipa LuxR za študije uravnavanja genov QS	8
2.1.8 Struktura transkripcijskih faktorjev tipa LuxR	9
2.2 BIOFILM	10
2.2.1 Biofilm bakterije <i>P. aeruginosa</i> in faze njegovega nastanka	10
2.2.2 Matriks biofilma, njegova heterogenost in subpopulacije celic, ujete v njem	11
2.2.3 Povezava tvorbe biofilma s sistemi QS	14

2.2.4 Problematika analize biofilmov.....	14
2.3 EGEROLIZIN	15
2.3.1 Proteinska družina egerolizini.....	15
2.3.2 Struktura in lastnosti egerolizinov.....	16
2.3.3 Biološka vloga egerolizinov v glivah in bakterijah.....	17
2.3.4 RahU (PA0122), egerolizin bakterije <i>P. aeruginosa</i>.....	19
2.3.5 Izločanje egerolizina RahU v izvencelično okolje.....	19
2.3.6 Uravnavanje izražanja gena <i>rahU</i> in uravnavanje sinteze proteina RahU	20
2.3.7 Izražanje gena <i>rahU</i> in sinteza RahU v odvisnosti od faze rasti bakterije <i>P. aeruginosa</i>	21
2.3.8 Vloga proteina RahU pri bakteriji <i>P. aeruginosa</i>, vezava z lipidi.....	22
2.3.9 Vloga proteina RahU pri bakteriji <i>P. aeruginosa</i>, vpliv na tvorbo biofilma...	23
2.3.10 Vloga proteina RahU pri bakteriji <i>P. aeruginosa</i>, vpliv na celice gostitelja .	24
3 MATERIALI IN METODE	25
3.1 KEMIKALIJE IN DROBNA OPREMA.....	25
3.2 GOJIŠČA.....	27
3.3 RAZTOPINE IN PUFRI	27
3.4 BAKTERIJSKI SEVI, PLAZMIDI IN ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI.....	30
3.5 PODROBNEJŠI OPIS SEVOV PAO1 <i>rahUI</i> ⁻ in PAO1 <i>rahU2</i> ⁻	30
3.6 SHEMA EKSPERIMENTA.....	32
3.7 MERJENJE KOLIČINE BIOFILMA	33
3.8 PRIPRAVA PLAZMIDNIH KONSTRUKTOV	33
3.8.1 Izolacija DNA	33
3.8.2 Agarozna gelska elektroforeza	34
3.8.3 Priprava vključka DNA	34
3.8.4 Priprava plazmidnega vektorja.....	34
3.8.5 Restrikcija DNA.....	35
3.8.6 Defosforilacija DNA	36
3.8.7 Ligacija vključka DNA v plazmidni vektor	36
3.8.8 Priprava kompetentnih celic sevov <i>E. coli</i> (DH5α) in <i>P. aeruginosa</i> (PAO1, MW1).....	36
3.8.9 Transformacija kompetentnih celi <i>E. coli</i> in <i>P. aeruginosa</i>.....	36

3.8.10 Preverjanje plazmidnih konstruktov - rekombinatnih plazmidov	37
3.8.11 Pregledni opis nastanka plazmidnega konstrukta pLP170-rahU-mCherry ..	37
3.8.12 Pregledni opis nastanka plazmidnega konstrukta pLP170-paProm-mCherry ..	39
3.9 EPIFLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA.....	40
3.9.1 Epifluorescenčna mikroskopija planktonsko raslih bakterijskih celic	40
3.9.2 Epifluorescenčna mikroskopija bakterijskih celic v biofilmu.....	40
3.9.3 Epifluorescenčna mikroskopija eritrocitov, inkubiranih z RahU-mCherry v grobem celičnem ekstraktu <i>P. aeruginosa</i>	41
3.9.4 Epifluorescenčna mikroskopija, podrobnosti mikroskopa in obdelave podatkov.....	42
3.10 PRODOBIVANJE TOPNEGA OČIŠČENEGA eGFP-RhlR	42
3.10.1 Priprava celic za produkcijo proteina eGFP-RhlR	42
3.10.2 Ekstrakcija in čiščenje proteina eGFP-RhlR s kitom za afinitetno kromatografijo (Ni-NTA Spin Kit (Qiagen)).....	43
3.10.3 Ekstrakcija eGFP-RhlR pri nativnih ali denaturirajočih razmerah ter čiščenje z Ni-NTA kromatografijo (HIS-Select Nickel Affinity Gel (Qiagen))... ..	43
3.10.4 Vpliv razmer gojenja in indukcije z IPTG na topnost eGFP-RhlR.....	45
3.11 PRIDOBIVANJE TOPNEGA OČIŠČENEGA RhlR	45
3.11.1 Dvostopenjski denaturacijski in renaturacijski postopek (2DR)	45
4 REZULTATI.....	47
4.1 VPLIV RahU NA KOLIČINO NASTALEGA BIOFILMA BAKTERIJE <i>P. aeruginosa</i>	47
4.1.1 Mutacija gena rahU ne vpliva na količino nastalega biofilma bakterije <i>P. aeruginosa</i>	47
4.1.2 Dodatek RahU vpliva na količino nastalega biofilma bakterije <i>P. aeruginosa</i>	48
4.2 IZRAŽANJE, SINTEZA IN LOKALIZACIJA RahU V BIOFILMU.....	48
4.2.1 Plazmidni konstrukti pLP170-rahU-mCherry in pLP170-paProm-mCherry potrjujejo odvisnost izražanja rahU od faze rasti ozziroma celične gostote	49
4.2.2 Vpliv mikroskopske tehnike na dobljene rezultate	50

4.2.3 Odvisnost izražanja <i>rahU</i> od Las in Rhl sistema.....	51
4.2.4 Izražanje <i>rahU</i> in sinteza RahU v biofilmu.....	52
4.2.5 Vpliv sinteze RahU-mCherry, prisotnega povsod v biofilmu, na količino nastalega biofilma	53
4.3 PREVERJANJE VEZAVE RahU-mCherry Z ERITROCITI	54
4.4 PRIDOBIVANJE TOPNEGA OČIŠČENEGA eGFP-RhlR.....	55
4.4.1 Pridobivanje topnega očiščenega eGFP-RhlR s kitom Ni-NTA Spin Kit in Ni- NTA kromatografijo	55
4.4.2 Vpliv razmer gojenja in indukcije z IPTG na topnost eGFP-RhlR.....	56
4.5 PRIDOBIVANJE TOPNEGA OČIŠČENEGA RhlR	57
4.5.1 Pridobivanje topnega očiščenega proteina RhlR z 2DR in Ni-NTA kromatografijo.....	57
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	58
5.1 RAZPRAVA.....	58
5.2 SKLEPI.....	60
6 POVZETEK.....	61
7 VIRI	62
ZAHVALE	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: V raziskavi uporabljeni bakterijski sevi in plazmidi	30
Preglednica 2: V raziskavi uporabljeni začetni oligonukleotidi.....	31
Preglednica 3: Prikaz zmesi PCR in razmer PCR. Tarčna DNA: A) kromosomska DNA PA01; B) pETCABC- <i>olygoA-mCherry</i> ; C) pLP170- <i>rah</i> ; D) pLP170- <i>rahU-mCherry</i> , pLP170- <i>paProm-mCherry</i>	35
Preglednica 4: Sestava restriktičnih zmesi.....	35
Preglednica 5: Opis transformant, sevov <i>P. aeruginosa</i> in njihovih gojišč.	40
Preglednica 6: Prikaz števila in odstotka fluorescirajočih celic <i>P. aeruginosa</i> PAO1 M (mCherry), PAO1 AM (RahU-mCherry) gojenih planktonsko v odvisnosti od faze rasti.....	50

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Mehanizem delovanja sistemov Las in Rhl (Pesci in sod., 1997; Schuster in Greenberg, 2007).....	5
Slika 2: Prikaz vezave transkripcijskih faktorjev LasR in RhIR na vezavno mesto v DNA (Soberón-Chávez in sod., 2005).	6
Slika 3: Dejavniki, ki so vključeni v uravnavanje delovanja sistema Las in Rhl, vključenih v kompleksen regulon QS (Schuster in Greenberg, 2006).....	8
Slika 4: Prikaz analize NADS-PAGE celokupne celične (ang. whole cell; WC) in topne (soluble; S) frakcije ektrakta LasR in RhIR produkcijskega seva <i>E. coli</i> (O'Loughlin in sod., 2013).....	9
Slika 5: Kristalna struktura transkripcijskih faktorjev tipa LuxR (Chugani in Greenberg, 2014; Churchill in Chen, 2011; Bottomley in sod., 2007).....	10
Slika 6: Mikroskopske slike vrstične konfokalne laserske mikroskopije biofilmov <i>P. aeruginosa</i> gojenih v prisotnosti različnih hrani (Klausen in sod., 2003).....	11
Slika 7: Nastanek in razpad biofilma <i>P. aeruginosa</i> razčlenjen v 5 delov oziroma faz (Wagner in Iglewski, 2008).....	11
Slika 8: Mikroskopske slike vrstične konfokalne laserske mikroskopije, ki prikazujejo heterogenost razporeditve EPS in subpopulacij celic v gobastem biofilmu <i>P. aeruginosa</i> (Yang in sod., 2007; Harmsen in sod., 2010; Lequette in Greenberg, 2005).	13
Slika 9: Prikaz razširjenosti egerolizinov med organizmi (povzeto po Finn in sod., 2014)	15
Slika 10: Elektronske mikroskopske slike pore PlyA+PlyB na membranski frakciji eritrocitov in oligomerne pore OlyA+PlyB na membranah lipidnih veziklov (Tomita in sod., 2004; Ota in sod., 2014).	17
Slika 11: Promotorsko področje gena <i>rahU</i> z elementi za uravnavanje transkripcije, potranskripcijskega nivoja in translacije RahU (Wagner in sod., 2003; Wurtzel in sod., 2012; Kulkarni in sod., 2014).....	21
Slika 12: Izražanje gena <i>rahU</i> in sinteza proteina RahU med planktonsko rastjo <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (Rao in sod., 2011a).	21

Slika 13: Prikaz nekaterih vnetnih fosfolipidov (povzeto po Avanti Polar Lipids, 2014)	22
Slika 14: Vpliv produkta gena <i>rahU</i> na količino nastalega biofilma seva <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (Rao in sod., 2011a).	23
Slika 15: Mesto vstavitve transpozonov ISlacZ/hah v sevu <i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>rahUI</i> ⁻ in ISphoA/hah v sevu <i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>rahU2</i> ⁻ (povzeto po UW Genome Sciences, 2015).	31
Slika 16: Podrobnejši prikaz vstavitve transpozonov ISphoA/hah in ISlacZ/hah in sklopljenih proteinskih produktov (povzeto po UW Genome Sciences, 2015).	32
Slika 17: Shema eksperimenta.....	32
Slika 18: Mapa plazmidnega konstrukta pLP170- <i>rahU-mCherry</i> .	38
Slika 19: Mapa plazmidnega konstrukta pLP170- <i>paProm-mCherry</i>	39
Slika 20: Prikaz gojenja biofilmov v 50 mL falkonkah in postavitev mikroskopskega preparata za mikroskopiranje biofilmov na krovnih stekelcih.....	41
Slika 21: Razmere gojenja sevov za testiranje sinteze eGFP-RhlR.	45
Slika 22 : Količina nastalega biofilma različnih sevov <i>P. aeruginosa</i> , gojenih pri 30 °C za 1 dan.	47
Slika 23: Količina nastalega biofilma sevov <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in PAO1 <i>rahUI</i> ⁻ ob dodatku proteina RahU, gojenih pri 30 °C za 1 dan.	48
Slika 24: Prikaz rastne krivulje planktonsko gojenega seva <i>P. aeruginosa</i> PAO1 in njegovih transformant PAO1 M in PAO1 AM ter pojav rdeče fluorescence (AF546) zaradi sinteze poročevalskega proteina mCherry (PAO1 M) ali RahU-mCherry (PAO1 AM) v odvisnosti od faze rasti oziroma celične gostote, mikroskopska slika (400-kratna povečava).....	49
Slika 25: Odvisnost rezultatov mikroskopije od mikroskopske tehnike, prikazana s porazdelitvijo relativne gostote fluorescence (AF546) PAO1 M (mCherry), PAO1 AM (RahU-mCherry).....	51
Slika 26: Pojav poročevalskega proteina mCherry v odvisnosti od dodatka 3-O-C12-HSL in C4-HSL k planktonsko gojeni transformanti MW1 M (mCherry), mikroskopska slika (400-kratna povečava).....	51

Slika 27: Aktivnost promotorja <i>rahU</i> (<i>paProm</i>), izražena kot sinteza poročevalskega proteina mCherry (PAO1 M) in RahU-mCherry (PAO1 AM) v biofilmu, mikroskopska slika (400-kratna povečava).....	52
Slika 28: Količina nastalega biofilma transformant <i>P. aeruginosa</i> PAO1 M (mCherry) in PAO1 AM (RahU-mCherry), gojenih pri 30 °C za 1 dan.....	53
Slika 29: Prikaz vezave egerolizinov RahU-mCherry in OlyA-mCherry z eritrociti, mikroskopska slika (400- kratna povečava).	54
Slika 30: Čiščenje eGFP-RhlR s kitom Ni-NTA Spin Kit pri različnih razmerah gojenja in čiščenja.....	55
Slika 31: NaDS-PAGE, prikaz topnosti proteina RhlR, pridobljenega iz inkluzijskih teles z 2DR..	57

KAZALO PRILOG

Priloga A: Plazmidna mapa pLP170 z opisi elementov plazmida

Priloga B: Opis nastanka plazmidne mape pPLP170

Priloga C: Prikaz nukleotidnega zaporedja plazmidnega konstrukta pLP170-*rahU-mCherry*

Priloga D: Prikaz nukleotidnega zaporedja plazmidnega konstrukta pLP170- *paProm-mCherry*

Priloga E: Rezultati zadnjega preverjanjega transformant *E. coli* DH5α iz koraka 8
(pLP170-*rahU-mCherry*) in koraka 4 (pLP170-*paProm-mCherry*)

Priloga F: Rezultati sekvenciranja plazmidnih konstruktov pLP170-*rahU-mCherry* in
pLP170-*paProm-mCherry*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

3-oxo-C12-HSL /	3-okso-dodekanoil-homoserinlakton (acil homoserinlakton)
3-O-C12-HSL	
AHL	acil homoserinlakton (homoserin lakton z vezano acilno verigo)
AK	aminokislinski ostanek v peptidu/proteinu
bp	bazni par v dvoverižni vijačnici nukleinske kisline
C4-HSL	butanoil-homoserinlakton (acil homoserinlakton)
CDC	od holesterola odvisen citolizin (angl.: cholesterol-dependent cytolysins), skupina bakterijskih toksinov
CDS	kodirajoče zaporedje DNA (angl.: coding DNA sequence), zaporedje, ki se prepiše v protein ali strukturno nukleinsko kislino
DBD	DNA vezavna domena (angl.: DNA binding domain), pri luxR tipu transkripcijskih faktorjev veže tarčno zaporedje na DNA
DIC	diferencialni interferenčni kontrast (angl.: differential interference contrast), oblika mikroskopije
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl.: deoxyribonucleic acid)
eDNA	zunajcelična DNA (angl.: extracellular DNA)
EPS	zunajcelične polimerne substance (angl.: extracellular polymeric substance)
HSL	homoserinlakton
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopyranozid
kDa	kilodalton
LB	Luria Bretani, gojišče
LBD	ligand-vezavna domena (angl.: ligand binding domain), pri luxR tipu transkriacijskih faktorjev domena za vezavo HSL (AHL)
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (angl.: liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
LDL	nizkomolekularni plazemski lipoprotein (angl.: low density lipoprotein)
lizo-PC	lizofosfatidilholinom

MALDI-TOF	ionizacija v matriksu z desorpcijo z laserjem in masnim analizatorjem časa preleta ionov (angl.: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight)
MPPA	1-palmitoil-2-hidroxi- <i>sn</i> -glicero-3-fosfat, fosfolipid
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata
Ni-NTA	nikelj nitrilotriocetna kislina (angl.: nickel nitrilotriacetic acid)
OD	optična gostota (angl.: optical density). Pri OD _X , X označuje valovno dolžino svetlobe, pri kateri je izmerjena optična gostota
oksi-LDL	oksidiran nizkomolekularni plazemski lipoprotein
OlyA	ostreolizin A
PAPC	1-palmitoil-2-arahidonoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin, fosfolipid
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl.: polymerase chain reaction)
PlyA/PlyB	pleurotolizin A/pleurotolizin B
QS	zaznavanje celične gostote (angl.: quorum sensing)
RBS	ribosomalno vezavno mesto (angl.: ribosome binding site)
rcf	relativna centrifugalna sila (angl.: relative centrifugal force)
RNK/RNA	ribonukleinska kislina/(angl.: ribonucleic acid)
rpm	število obratov na minuto (angl.: rotations per minute)
TSS	mesto začetka prepisa gena (angl.: transcription start site), z RNA polimerazo

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Proteine iz družine egerolizinov najdemo v glivah, rastlinah, virusih in nekaterih bakterijah. Kljub temu, da so egerolizini široko razširjeni, je njihova vloga v teh organizmih slabo poznana. Določenim, predvsem glivnim egerolizinom, je pripisano tvorjenje por v membranah ob tvorbi dvokomponentnih proteinskih kompleksov, spet drugim, kot je Asp-hemnolizin iz plesni *Aspergillus fumigatus*, vezava z vnetnimi fosfolipidi (Berne in sod., 2009). Slednje je bilo zabeleženo tudi pri egerolizinu bakterije *P. aeruginosa*, PAO122, pozneje imenovanem RahU, odkritem leta 2008, katerega izražanje je odvisno od zaznavanja celične gostote. Protein RahU ima zabeležen vpliv na biofilm bakterije *P. aeruginosa*, ki s tvorjenjem odpornih biofilmov povzroča težave ob odstranitvi z imunskim sistemom gostitelja (Rao in sod., 2011a). Razen vpliva na biofilm so zabeležene tudi druge lastnosti tega egerolizina, vendar je tako kot pri drugih bakterijah in njihovih egerolizinih njegova dejanska biološka vloga v bakteriji *P. aeruginosa* nerazjasnjena (Rao in sod., 2011b).

1.2 NAMEN DELA

Namen dela je bil:

- izboljšati razumevanje pomena egerolizina RahU pri bakteriji *P. aeruginosa*;
- podrobnejše preveriti opisan vpliv RahU na tvorbo biofilma *P. aeruginosa*;
- potrditi prisotnost proteina RahU v biofilmu *P. aeruginosa*, ter opisati njegovo lokalizacijo v biofilmu;
- testirati, ali protein RahU interagira z membranami eritrocitov, kar je lastnost nekaterih egerolizinskih homologov;
- pridobiti open transkripcijski faktor RhlR, da bi preverili njegov vpliv na izražanje gena *rahU*.

1.3 CILJI

Cilji naloge so bili:

- analizirati vpliv proteina RahU na količino nastalega biofilma, ob uporabi mutant *rahU* in dodatku čistega RahU pri gojenju biofilmov *P. aeruginosa* v statičnih kulturah;
- pripraviti plazmidni konstrukt za sintezo proteina RahU spojenega z rdečim fluorescenčnim proteinom za sledenje sinteze proteina RahU v biofilmu *P. aeruginosa*, kjer bi heterogenost v lokaciji v biofilmu lahko podala dodatno informacijo o vlogi tega proteina pri tvorbi biofilma;
- zgoraj omenjeni protein izkoristiti za sledenje vezave na eritrocite;
- izboljšati topnost proteina RhlR z različnimi metodami čiščenja in s spojtvijo z zelenim fluorescenčnim proteinom, s ciljem boljšega enoznačnega razumevanja izražanja gena *rahU* v *P. aeruginosa*.

1.4 HIPOTEZE

- Egerolizin RahU značilno vpliva na količino nastalega biofilma bakterije *P. aeruginosa*.
- V *P. aeruginosa* lahko s proteinom RahU, spojenim z rdečim fluorescenčnim proteinom mCherry, sledimo lokalizaciji njegovega izražanja v biofilmu.
- Protein RahU, spojen z rdečim fluorescenčnim proteinom mCherry, interagira z membranami eritrocitov.
- Topnost proteina RhlR lahko izboljšamo s sklopitvijo z zelenim fluorescenčnim proteinom eGFP ali izboljšanim postopkom čiščenja proteina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZAZNAVANJE CELIČNE GOSTOTE POPULACIJE

2.1.1 Uvod v zaznavanje celične gostote

Medsebojna komunikacija in sodelovanje med posameznimi celicami omogočita obstoj večceličnih organizmov in sta nujna za njihovo delovanje. Pri enoceličnih organizmih, ki lahko delujejo samostojno na nivoju ene celice, je vloga oziroma obstoj te komunikacije bolj vprašljiva. Fenotipske spremembe, opažene pri visokih celičnih gostotah bakterij, so tako dolgo bile pripisane le prilagoditvam bakterij na spremembe v okolju in ne komunikaciji med bakterijami. Posledično se je pri nekaterih vrstah bakterij začela intenzivno raziskovati šele v zadnjih dveh desetletjih (Sifri in sod., 2008). Danes je znano, da bakterije direktno zaznajo prisotnost druge druge s sintezo, izločanjem in odzivanjem na specifične kemične signalne molekule (Jayaraman in Wood, 2008; Sifri in sod., 2008). Te signale lahko delimo na tiste, ki so vezani na gostoto populacije oziroma koncentracijo celic, t. i. mehanizem zaznavanja celične gostote (angl.: Quorum sensing, QS) in ostale, bolj odvisne od drugih faktorjev (Jayaraman in Wood, 2008). Z medsebojno komunikacijo bakterije delujejo na ravni populacije kot skupina, s tem pa pridobijo prednosti, vezane na populacijo, in posledično razvijejo različne oblike socialnega obnašanja (West in sod., 2012; Li in Nair, 2012).

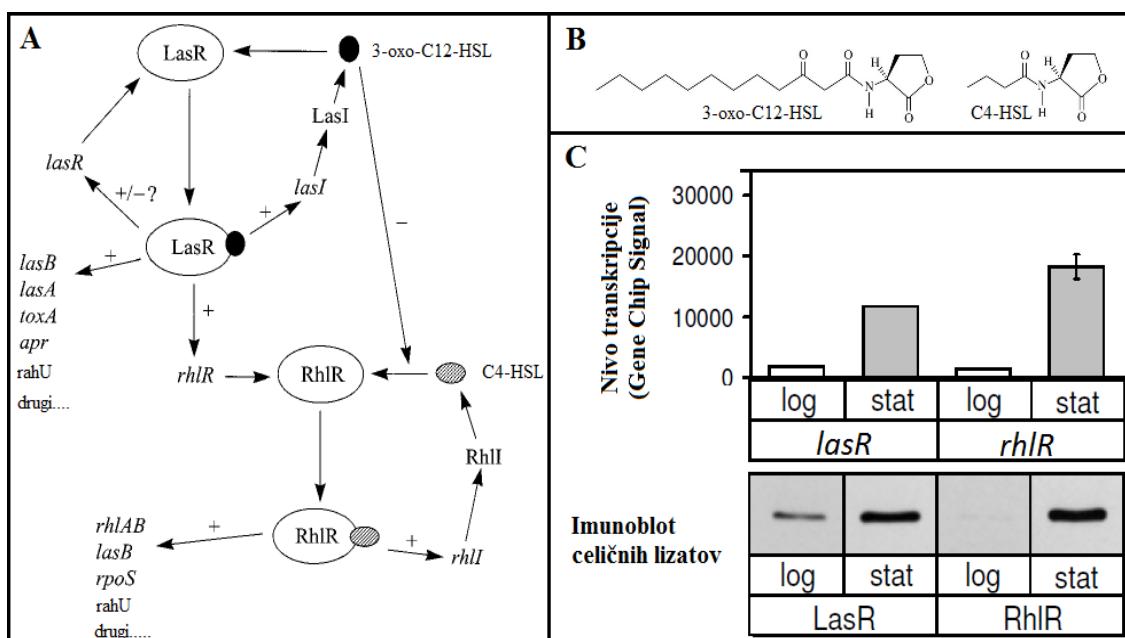
2.1.2 Mehanizem zaznavanja celične gostote pri po gramu negativnih bakterijah

Mehanizem zaznavanja celične gostote je različen pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah. Modelni mehanizem zaznavanja celične gostote pri po Gramu negativnih bakterijah je dvokomponentni sistem LuxI/R bakterije *Vibrio fischeri* (Jayaraman in Wood, 2008). Prva komponenta predstavlja sintetazo za sintezo signala, N-acil homoserinlaktona (AHL), ki prosto prehaja skozi celično membrano v okolje in nazaj v celico. Koncentracija signala v okolini in znotraj celice je prenosorazmerna z gostoto bakterij. Ob višji celični gostoti koncentracija signala preseže določen prag in signal se veže na specifičen transkripcijski faktor, drugo komponento sistema, ki v kompleksu s signalom vpliva na prepis tarčnih genov, uravnnavanih s QS (geni QS) (Li

in Nair, 2012). Signali AHL so vrstno specifični, in ker stimulirajo tudi lastno sintezo, se zanje uporablja oznaka avtoinduktorji (Jayaraman in Wood, 2008). Njihova koncentracija v okolini celice pa ni odvisna samo od koncentracije celic, ki ga proizvajajo. Ker je pomikanje signalov vstran in k celici odvisno od difuzibilnosti okolja, ta prav tako vpliva na koncentracijo signala v neposredni bližini oziroma okolini celice. Opisani sistem lahko torej označimo tudi kot sistem za zaznavanje difuzibilnosti okolja, s katerim bakterija pridobi informacijo, ki vpliva tako na samo celico kot na ostale produkte, ki jih izloča. Slednji pogled na pomen opisanega sistema ne izključuje nujno prvotnega in sinteza obeh pogledov je po vsej verjetnosti najbolj pravilen pristop (West in sod., 2012).

2.1.3 Sistem zaznavanja celične gostote bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

QS v po gramu negativni bakteriji *P. aeruginosa* uravnavata vsaj dva dvokomponentna sistema (Pesci in sod., 1997; Jimenez in sod., 2012). Ta najbolj preučena sistema, Las in Rhl, sta podobna modelnemu sistemu LuxI/R. Uravnavata ju sintetazi signala AHL (LasI, RhII) in receptorja za signal, transkripcijska faktorja LasR in RhIR. LasI sintetizira 3-okso-dodecanoil-homoserinlakton (3-O-C12-HSL/C12-HSL), RhII sintetizira butanoil-homoserinlakton (C4-HSL), medtem ko je LasR receptor za 3-O-C12-HSL in RhIR receptor za C4-HSL (Jimenez in sod., 2012). Sistema Las in Rhl sta med seboj povezana na hierarhični način (Latifi in sod., 1996; Pesci in sod., 1997; Jimenez in sod., 2012). Najprej se aktivira sistem Las, ki nato aktivira sistem Rhl in številne druge gene QS (Slika 1) (Jimenez in sod., 2012). V osnovi je hierarhična povezava med opisanima sistemoma ostala nespremenjena, vendar obstajajo izjeme, ki nakazujejo plastičnost te povezave (Dekimpe in Deziel, 2009). Kot prikazuje Slika 1, se pri gojenju *P. aeruginosa* v gojišču Luria Bretani (LB) receptorja sintetizirata pri prehodu iz logaritemske v stacionarno fazo. Prav tako je takrat tudi največ signala AHL za oba receptorja (Schuster in Greenberg, 2007).



Slika 1: Mehanizem delovanja sistemov Las in Rhl (Pesci in sod., 1997; Schuster in Greenberg, 2007). A) Predstavljena hierarhična povezava med sistemom Las in Rhl. Negativno uravnavanje označeno z -, pozitivno pa s +; B) Prikaz strukture AHL; C) Realni čas transkripti RNA in imunobloti opravljeni iz celic vzetih v zgodnji logaritemski ($OD_{600}=0,2$) in zgodnji stacionarni fazni rasti ($OD_{600}=2$).

2.1.4 Čas uravnavanja genov QS s sistemoma Las in Rhl

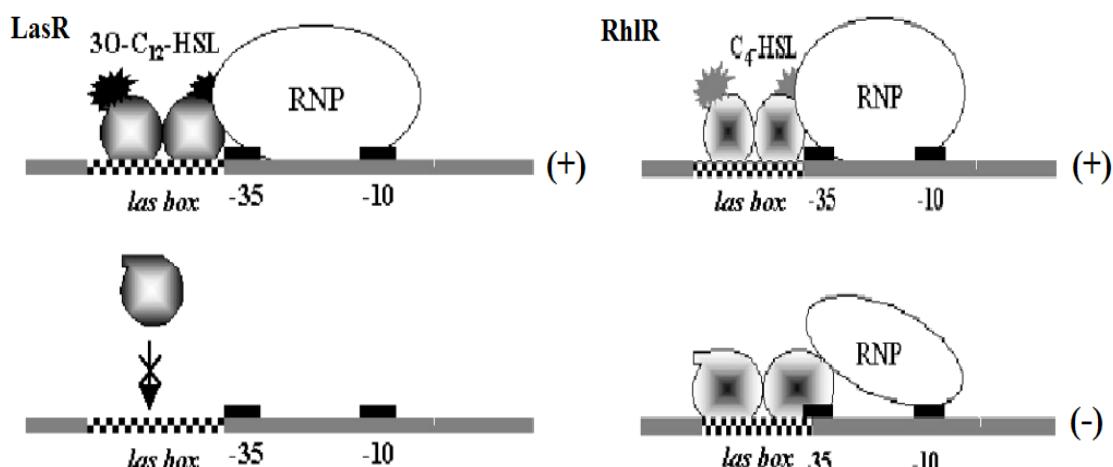
Sodeč po zgodnjih transkriptomskih raziskavah Schuster in sodelavcev (2003), ter Wagner in sodelavcev (2003) sistema Las in Rhl uravnavata vsaj 6 % genoma bakterije *P. aeruginosa* PA01. V obeh transkriptomskih študijah so vpliv na izražanje ugotovljali s sevi, mutiranimi v genu *lasI* in *rhlI* gojenimi z AHL ali brez njih (Wagner in sod., 2003). Pod uravnavanje sistema Las ali Rhl so uvrstili 226 genov, izražanje katerih uravnavata v srednji logaritemski fazni rasti celic, 450 genov uravnavanih v zgodnji stacionarni fazni rasti, ter 350 genov, ki jih uravnavata v stacionarni fazni rasti (Schuster in sod., 2003). Razen pozitivnega uravnavanja sta obe raziskavi odkrili tudi določene gene QS, utišane preko teh dveh sistemov (Wagner in sod., 2003).

2.1.5 Promotorski elementi, specifični za vezavo transkripcijskih faktorjev LasR in RhlR

Predlagani konzenzni tarčni zaporedji DNA za vezavo transkripcijskih faktorjev LasR in RhlR, kjer N označuje kateri kolikor štirih nukleotidov, sta (Whiteley in sod., 1999; Wagner in sod., 2003):

- Vezavno mesto Las (*las box*): NNCTN₁₂AGNN ali NNCTN₁₁AGNN
- Vezavno mesto Las-Rhl (*las-rhl box*) : NNCTN₃AN₄TN₃AGNN

Vezavno mesto Las se nahaja v promotorskih področjih genov, uravnnavanih z LasR, medtem ko je mesto Las-Rhl pogostejše pri genih, uravnnavanih z LasR in RhlR. Pri slednjem ni znano, ali se faktorja lahko vežeta hkrati na to tarčno zaporedje DNA. Ta zaporedja se večinoma, vendar ne izključno, nahajajo okrog 40 baznih parov (bp) pred začetkom prepisa gena (TSS) (Whiteley in sod., 2001; Wagner in sod., 2003). Slika 2 prikazuje način vezave transkripcijskih faktorjev LasR in RhlR na opisana tarčna zaporedja (Soberón-Chávez in sod., 2005).



Slika 2: Prikaz vezave transkripcijskih faktorjev LasR in RhlR na vezavno mesto v DNA (Soberón-Chávez in sod., 2005). Negativno uravnnavanje označeno z (-), pozitivno s (+)

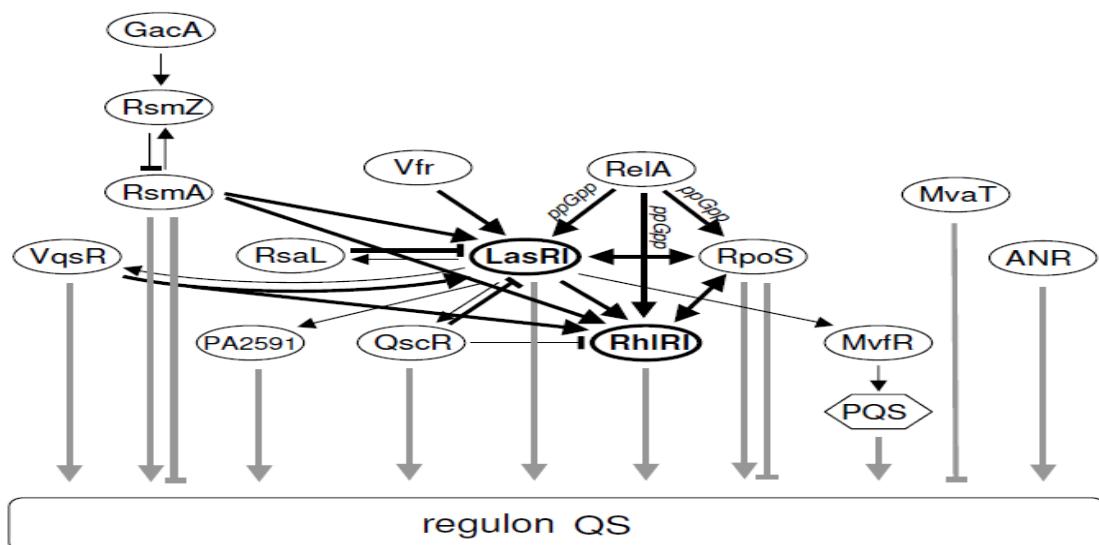
Kot je razvidno iz Slike 2 se LasR brez signala nahaja v monomerni obliki in se šele ob dodatku signala (na vsak monomer ena signalna molekula AHL) spremeni v dimerno obliko, ki se lahko veže na tarčno zaporedje. V nasprotju z njim se RhlR tudi brez signala nahaja v dimerni obliki in se pri določenih genih QS kljub odsotnosti signala AHL veže na tarčno zaporedje ter deluje kot represor (Ventre in sod., 2003; Soberón-Chávez in sod., 2005). Tak primer je pri operonu *rmlBDAC*, ki sintetizira komponento biosurfaktanta, rammolipida. Vsebuje vezavno zaporedje za RhlR, ki je specifično le za RhlR (Aguirre-Ramírez in sod., 2012):

- Vezavno mesto Rhl (*rhl box*): ACCTACCAGATCTGGGGTGG
ozioroma N2CTN4GN12

Prisotnost opisanih zaporedij DNA pred geni QS, uravnavanimi s temo transkripcijskima faktorjem ni univerzalna. Vezavno mesto Las napram vezavnemu mestu Las-Rhl in Rhl, kaže slabo ohranjenost (Schuster in sod., 2004; Schuster in Greenberg, 2007). Z metodo kromatinske imunoprecipitacije so Gilbert in sodelavci (2009) prisotnost vezavnega mesta Las potrdili samo pri 24 % promotorjev genov QS, uravnavanih z LasR. Dodatno ni jasno, kako prisotnost določenega nukleotida na določenem mestu v teh zaporedjih vpliva na vezavo enega ali drugega transkripcijskega faktorja. Vezava transkripcijskega faktorja pa tudi ne vodi nujno v aktivacijo genov QS in je odvisna od mnogih dodatnih faktorjev (González-Valdez in sod., 2014).

2.1.6 Plastičnost sistemov Las in Rhl vpetih v kompleksen regulon QS

Geni QS so vpeti v regulon QS, ki poleg Las in Rhl vključuje vsaj še en sistem QS. Slednji temelji na transkripcijskem faktorju MvfR in kinolonskih signalih 4-hidroksi-2-alkilkinolon in 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon. Tako kot sistem Rhl je ta kinolonski sistem odvisen od aktivacije sistema Las in deluje kot dodatna povezava med tema sistemoma (Laverty in sod., 2014). Lahko deluje neodvisno od celične gostote in tako deluje tudi kot netipičen sistem QS (McKnight in sod., 2000). Razen teh signalov najdemo v nizkih koncentracijah dodatne AHL. Funkcija le-teh je neznana in ni pojasnjeno, ali je njihov nastanek posledica nepravilnega delovanja opisanih sintetaz AHL ali obstoja dodatne sintaze AHL in dodatnega sistema QS (Jimenez in sod., 2012). Opisani sistemi QS in njihovi geni QS so dodatno uravnavani še s številnimi drugimi regulatorji in signali, ki delujejo tako na potranskripcijskem kot na potranslacijskem nivoju. Značilen primer prvega sta VqsR in RsmA, primer drugega pa QsrR. (Schuster in Greenberg, 2006; Kulkarni in sod., 2014; Laverty in sod., 2014). Osnovni pregled nad regulonom QS v bakteriji *P. aeruginosa* prikazuje Slika 3.



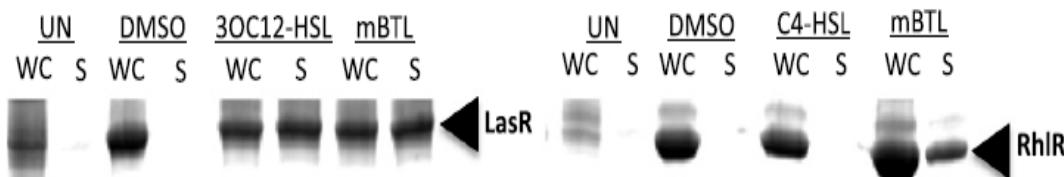
Slika 3: Dejavniki vključeni v uravnavanje delovanja sistema Las in Rhl, vključenih v kompleksen regulon QS (Schuster in Greenberg, 2006). Puščica označuje aktivacijo, prečna črta inhibicijo

Kompleksna arhitektura regulona QS dovoljuje integracijo številnih signalov (tudi ne striktno povezanih z zaznavanjem celične gostote) in omogoča bakteriji, da se lahko optimalno odzove tako na spremembe v gostoti populacije kot tudi na razmere v njenem okolju (Schuster in Greenberg, 2007). Posledično ima okolje tudi močan vpliv na delovanje opisanih sistemov QS in izražanja genov QS (Wagner in sod., 2003). Duan in Surette (2007) sta z gojenjem *P. aeruginosa* v različnih tipih gojišča prikazala variacijo v moči in času izražanja vseh štirih genov sistema Las in Rhl, ter genov QS, ki jih uravnavata. Na primer, določeni geni QS, ki se v gojišču Luria Brettani (LB) aktivirajo v stacionarni fazi rasti, so se v minimalnem mediju M9 aktivirali v zgodnji logaritemski fazi rasti. V določenih primerih pa izražanje genov QS postane neodvisno od celične gostote. Plastičnost sistemov QS pa je moč opaziti tudi v kliničnih izolatih iz pljuč pacientov s cistično fibrozo, kjer se pojavljajo mutante v sistemu Las, ki lahko proizvajajo virulenčne dejavnike, ki so sodeč po omenjenih transkriptomskih analizah odvisni od delovanja tega sistema QS (Dekimpe in Deziel, 2009).

2.1.7 Težavna sinteza transkripcijskih faktorjev tipa LuxR za študije uravnavanja genov QS

Študije na transkripcijskih faktorjih tipa LuxR so bile zaradi slabe stabilnosti in topnosti ob odsotnosti singala AHL dolgo omejene in šele prepoznava njegovega vpliva na

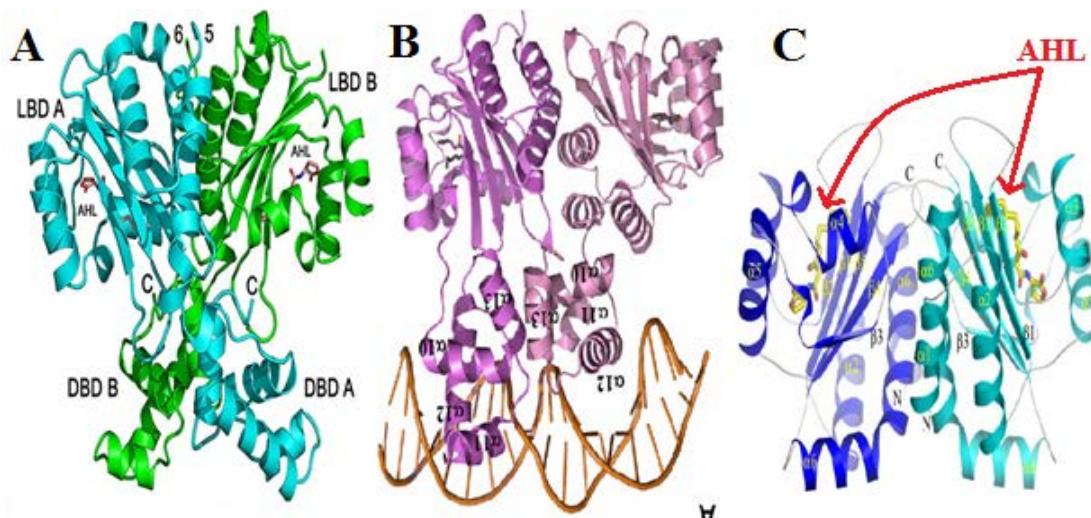
stabilnost in topnost teh proteinov je omogočila vpogled v strukturo in podrobnejši način delovanja teh transkripcijskih faktorjev (Churchill in Chen, 2011). Tudi proteina LasR in RhlR se ob odsotnosti signala AHL nahajata v netopnih agregiranih skupkih, oziroma inkluzijskih telescih. Napram drugim transkripcijskim faktorjem tipa LuxR pa prisotnost signala AHL slabo izboljša topnost teh dveh proteinov, zato se za analize večinoma uporablajo celični ekstrakti in ne očiščena proteina LasR in RhlR (Sappington in sod., 2011). Schuster in sod. (2004) so sicer uspeli izboljšati topnost LasR z gojenjem produkcijskega seva *Escherichia coli* ob nižji temperaturi in dodatku 3-O-C12-HSL in podobno je ob dodatku 5 µM 3-O-C12-HSL uspelo tudi O'Loughlin in sodelavcem (2013) (Slika 4), a topne aktivne oblike proteina RhlR do zdaj še ni bilo mogoče pridobiti. Sodeč po raziskavi Ventre in sodelavcev (2003) pa na topnost RhlR vplivajo drugi nanj sklopljeni proteini, kot je bilo opisano za zvečano topnost okrog 55 kilodaltonov (kDa) velikega kompleksa eGFP-RhlR (Ventre in sod., 2003). Velikost RhlR brez sklopljenega eGFP je okrog 28 kDa (Lamb in sod., 2003).



Slika 4: Prikaz analize NADS-PAGE celokupne celične (ang. whole cell; WC) in topne (soluble; S) frakcije ektrakta LasR in RhlR produkcijskega seva *E. coli* (O'Loughlin in sod., 2013). Gojenje brez (UN) dodatkov in ob prisotnosti; DMSO (DMSO); 100 µM 3OC12–HSL (3OC12–HSL); 100 µM C4–HSL (C4–HSL); 100 µM meta-bromo-thiolaktona – inhibitorja RhlR in LasR (mBTL). Tudi ob dodatu C4–HSL protein RhlR ostaja netopen.

2.1.8 Struktura transkripcijskih faktorjev tipa LuxR

Proteine transkripcijskih faktorjev tipa LuxR gradita dve globularni domeni. To sta aminoterminalna, AHL-vezavna domena (LBD) in karboksiterminalna, DNA-vezavna domena (DBD), ki sta med seboj povezani preko fleksibilnega linkerja. Nazornejši prikaz je na Sliki 5, kjer je prikazana kristalna struktura proteinov TraR (Churchill in Chen, 2011), QscR (Chugani in Greenberg, 2014), ter N-terminalni del LasR (Bottomley in sod., 2007).



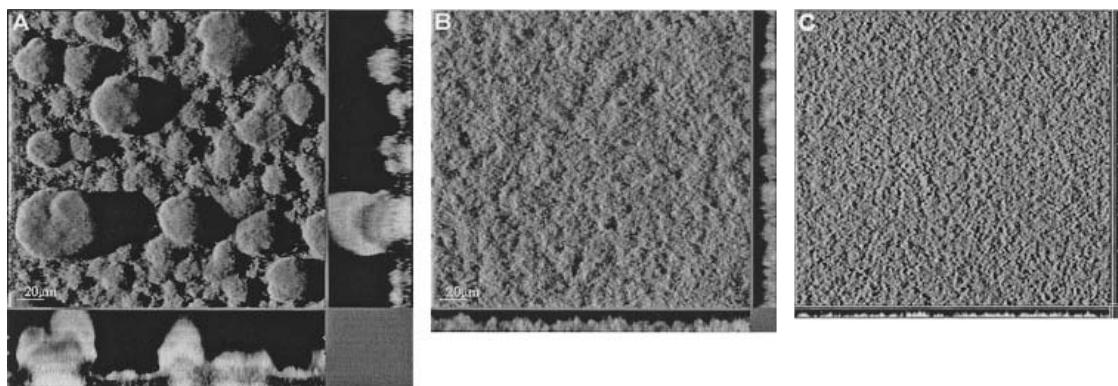
Slika 5: Kristalna struktura transkripcijskih faktorjev tipa LuxR (Chugani in Greenberg, 2014; Churchill in Chen, 2011; Bottomley in sod., 2007). Oznake: A) QscR; B) TraR vezan na DNA; C) N-terminalna domena LasR z usidranim AHL.

Kot prikazuje Slika 5 je signal AHL tesno zasidran v strukturo transkripcijskega faktorja, pri čemer je tesnost vezave pogojena z dolžino acilne verige AHL. Na podlagi tega, ter že omenjenega vpliva AHL na topnost in stabilnost določenih proteinov te skupine se sklepa, da naj bi AHL služili kot ogrodje za pravilno zvitje teh proteinov (Sappington in sod., 2011).

2.2 BIOFILM

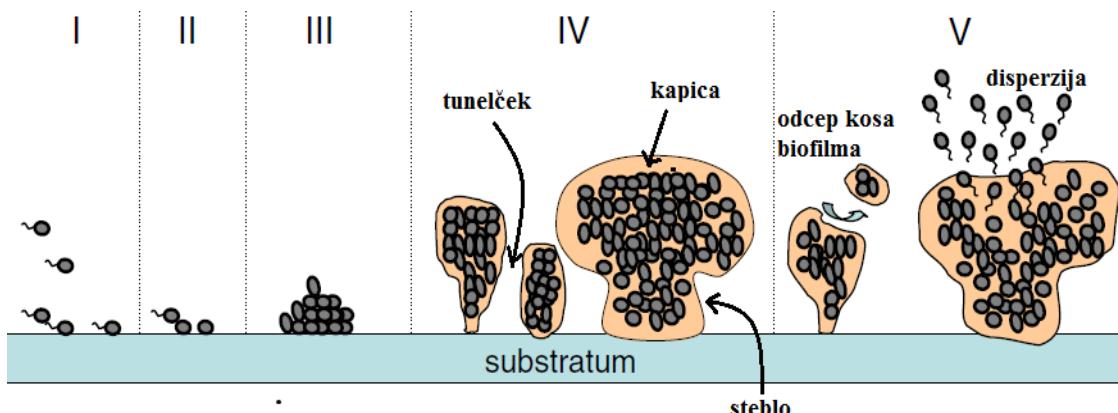
2.2.1 Biofilm bakterije *P. aeruginosa* in faze njegovega nastanka

Biofilm je heterogena večcelična združba bakterij, ovitih z heterogenim zunajceličnim polimernim matriksom, ki se tvori na različnih abiotiskih in biotskih površinah (Flemming in Wingender, 2010). Heterogenost je pogojena z omejeno difuzijo hrani in odpadnih snovi skozi biofilm. Napram planktonski kulturi je namreč vsaka plast celic oziroma skoraj vsaka celica glede na pozicijo v biofilmu izpostavljena drugačnemu okolju. Posledično se glede na pozicijo izoblikujejo fenotipsko različne subpopulacije celic z različnimi vlogami v biofilmu (Harmsen in sod., 2010). Kot prikazuje Slika 6, v odvisnosti od okolja nastanejo različni biofilmi: debelejši, bolj strukturirani (gobasti) ali tanjši, manj strukturirani (uniformni) (Klausen in sod., 2003; Karatan in Watnick, 2009)



Slika 6: Mikroskopske slike vrstične konfokalne laserske mikroskopije biofilmov *P. aeruginosa* gojenih v prisotnosti različnih hranil (Klausen in sod., 2003). Oznake: A) Minimalni glukozni medij (bolj strukturiran biofilm); B) Minimalni citratni medij (manj strukturiran biofilm); C) Minimalni kasaminokislinski medij (manj strukturiran biofilm).

Nastanek in razpad biofilma lahko delimo na različne faze, kot prikazano na Sliki 7. Ta delitev pa z obzirom na vpliv številnih faktorjev okolja in intrinzičnih lastnosti sevov bakterije *P. aeruginosa*, nikakor ni univerzalna (Wagner in Iglewski, 2008).



Slika 7: Nastanek in razpad biofilma *P. aeruginosa* razčlenjen v 5 delov oziroma faz (Wagner in Iglewski, 2008). Faze: I.) Reverzibilna vezava bakterijskih celic na podlago; II.) Irreverzibilna vezava bakterijskih celic na podlago; III.) Razmnoževanje pritrjenih bakterijskih celic, nastanek mikrokolonij ter začetek izločanja polimernih molekul oziroma zunajceličnih polimernih substanc (EPS); VI.) Izločanje EPS in nastanek strukturiranega 3D biofilma s stebli, kapicami in tunelčki; V.) Faza razkroja biofilma: a) z odcepom celega kosa biofilma, zaradi strižnih sil, b) s programirano lokalno hidrolizo matriksa biofilma in disperzijo pretvorjene planktonske subpopulacije celic.

2.2.2 Matriks biofilma, njegova heterogenost in subpopulacije celic, ujete v njem

Večino matriksa biofilma predstavlja voda z ioni (okrog 90 %). Drugi, trdni del predstavljajo zunajcelične polimerne substance (EPS). To so eksopolisaharidi, zunajcelična DNA (eDNA) in strukturni proteini. EPS se včasih označuje kot črna materija biofilma. S tem se opozarja na težavnost identifikacije posameznih komponent

iz zmesi številnih molekul in na samo variacijo v deležih teh komponent EPS, v odvisnosti od različnih ekstrinzičnih in intrinzičnih razmer. Vloge tako niso jasno določene in je velikokrat moč opaziti sinergističen učinek komponent na opaženo lastnost v biofilmu (Flemming in Wingender, 2010).

Glavni trije eksopolisharadi so Pls, Pel in alginat (Flemming in Wingender, 2010). Slednji je odgovoren za mukozni tip biofilma, ki povzroča trajne okužbe pri bolnikih z cistično fibrozo. Napram nemukoznim tipom so ti biofilmi debelejši in bolj strukturirani (Hentzer in sod., 2001; Flemming in Wingender, 2010). Prav tako so odporenejši na delovanje antibiotikov (Hentzer in sod., 2001; Alkawash in sod., 2006) in imunskega sistema gostitelja (Hentzer in sod., 2001; Leid in sod., 2005). Pls je pomemben pri začetni vezavi celic na substrat, zamreženju celic v mikrokolonijah ter v zrelih gobastih biofilmih, kjer ga najdemo predvsem v kapicah, in skrbi za njihovo integriteto. Podobno je polisaharid Pel pomemben za nastanek debelih strukturiranih biofilmov in integriteto starejših biofilmov (Flemming in Wingender, 2010; Ghafoor in sod., 2011).

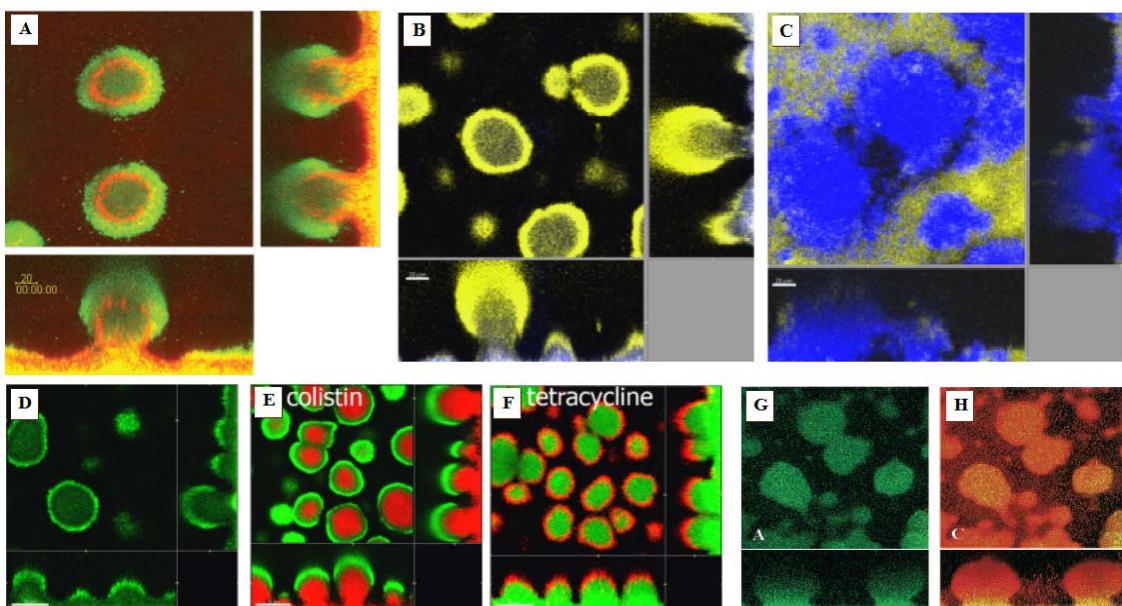
Zunajcelična DNA (eDNA) ima v biofilmu več vlog. Pomen eDNA kot strukturne snovi v biofilmih prikazuje dodatek deoksirubonukleaze, ki povzroči razpad mladih biofilmov in spremembo arhitekture v starejših, zrelih biofilmih (ne povzroči razpada zaradi večje vsebnosti eksopilsaharidov napram mlajšim biofilmom) (Flemming in Wingender, 2010). Kot prikazuje Slika 8A, je eDNA večinsko lokalizirana na substratu in zunanjih delih pecljev gobastih biofilmov. To nakazuje na dodatno vlogo pri pritrjevanju na podlago ter nastanku značilne gobaste arhitekture (Yang in sod., 2007). Domnevna vloga eDNA pri slednjem je, da služi kot pot in ogrodje za migracijo celic, kjer naj bi se migrirajoča subpopulacija celic premikala preko eDNA (vezava pilov tipa 4 gibljivih celic z eDNA v pecljih) v skupke, iz katerih pozneje nastanejo kapice, značilne za gobaste biofilme. Kot prikazano na Sliki 8B je gibljiva subpopulacija lokalizirana v kapicah gobastega biofilma, kar dodatno potrjuje ta način tvorbe gobastih biofilmov (Barken in sod., 2008; Karatan in Watnick, 2009).

Proteine v biofilmu delimo na strukturne in nestruktурne. Med strukturnimi proteini so pomembni lektini (LecA in LecB), ki povezujejo EPS med seboj in s celicami ter tako zamrežijo biofilm. Podobno vlogo imajo tudi pili tipa 4. Med nestruktурne proteine pa

uvrščamo encime, ki skrbijo za razgradnjo in modifikacijo polimerov v biofilmu, s tem pa omogočijo spremembo biofilma v odvisnosti od spremembe razmer v okolju ali celicah biofilma (Flemming in Wingender, 2010).

Biofilm gradijo tudi lipidi, predvsem ramnolipidi. Kot biosurfaktanti z vplivom na površinsko napetost olajšajo migracijo celic in s tem vplivajo na tvorbo biofilma (Flemming in Wingender, 2010). Ramnolipide sintetizirajo celice v peclju biofilma (Slika 8G in Slika8H) (Lequette in Greenberg, 2005), kar omogoči gibljivi migrirajoči subpopulaciji potovanje po peclju v bodočo kapico. Dodatno so od njih odvisni kanalčki, ki omogočajo snovni transport v biofilmih, in mutante v sintezi ramnolipidov niso zmožne vzdrževati pretočnih kanalčkov v gobastih biofilmih (Davey in sod., 2003).

Slika 8D, Slika8E in SlikaF dodatno prikazujejo heterogenost oziroma različno fiziološko stanje celic glede na njihovo pozicijo v biofilmu.



Slika 8: Mikroskopske slike vrstične konfokalne laserske mikroskopije, ki prikazujejo heterogenost razporeditve EPS in subpopulacij celic v gobastem biofilmu *P. aeruginosa* (Yang in sod., 2007; Harmsen in sod., 2010; Lequette in Greenberg, 2005). Oznake: A) Z 7-hidroksi-9H-1,3-dikloro-9,9-dimetilakridin-2-en rdeče obravvana dvostransna DNA in z zelenim fluorescenčnim proteinom (eGFP) označene celice. DNA se večinoma nahaja na substratu in v pecljih; B) Prikaz mešanega biofilma gibljivega divjega tipa, označen z Yfp (rumeni fluorescenčni protein) in mutant pilA (negibljivih) označenih s Cfp (modri fluorescencirajoči protein); C) Prikaz mešanega biofilma mutant pvd označenih s Cfp (ciano fluorescenčni protein) in mutant pilA označenih z Yfp; D) Z eGFP označene celice, kjer metabolno aktivna subpopulacija proizvede več eGFP; E in F) Žive z eGFP označene in mrtve, z rdečim barvilm obarvane, subpopulacije pri izpostavitvi z E) kolistinu in F) tetraciklinu; G in H) Z eGFP označeno izražanje gena rhlA (gen za sintezo rhamnolipidov) in rdeče obarvanih celic.

2.2.3 Povezava tvorbe biofilma s sistemi QS

Vloga QS pri tvorbi biofilma je opazna pri mutantah *P. aeruginosa* z izbrisanim genoma *lasI* in *rhlI*, ki sicer lahko tvorijo biofilme, vendar so ti tanki, nestrukturirani in uniformni v primerjavi z biofilmom divjega tipa, ki ob istih razmerah tvori značilen debelejši gobasti biofilm (Davies in sod., 1998). Prav tako tanjši, vendar strukturirani gobasti biofilmi nastanejo pri mutantah z izbrisanim genom *rhlR* (O'Loughlin in sod., 2013). Pomen sistemov QS pri tvorbi biofilma dodatno potrjuje raziskava Favre-Bonte in sodelavcev (2003), kjer masa nastalega biofilma, ugotovljena z barvanjem s kristal vijoličnim in s spektroskopijo pri 520 nm, prikazuje, da mutante *rhlI* tvorijo manjše količine biofilma kot divji tip PAO1.

Povezava med sistemoma QS (Las in Rhl) in tvorbo biofilma je posledica produktov genov, pomembnih za tvorbo biofilma, ki jih uravnavata njuna transkripcijska faktorja. Uravnavata namreč izražanje genov za sintezo rammolipidov (*rhlA*), lektinov (*lecA* in *lecB*), polisaharidov EPS (*pel* in *pls*), sistemov za izločanje eDNA, ter trzajoče gibanje s pili tipa 4 (angl.: twitching motility) (Patriquin in sod., 2008; Harmsen in sod., 2010).

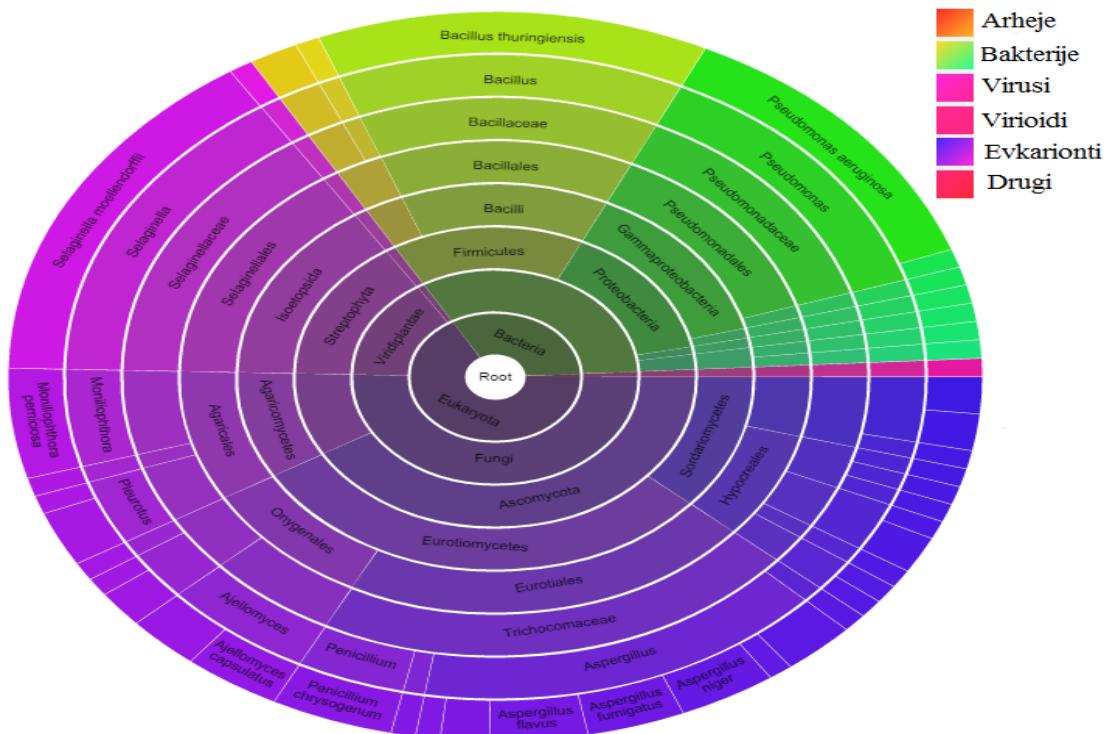
2.2.4 Problematika analize biofilmov

Študije biofilmov so kompleksne iz več razlogov. Kot omenjeno, lastnosti in videz biofilma zelo variirajo glede na okolje. Poleg tega veliko študij preučuje zrele gobaste biofilme, ki pa niso vedno prisotni zunaj laboratorija, v naravnih okoljih. Prav tako so le-ti redko sestavljeni iz enega seva, kot je to običajna praksa gojenja biofilmov v laboratoriju (Karatan in Watnick, 2009). Dodaten problem predstavlja heterogenost biofilma. Pri analizi izražanja genov se večinoma uporablajo transkriptomske tehnike, ki zaradi povprečenja več celic iz različnih subpopulacij v biofilmu izničijo raznolikost oziroma heterogenost. V tem pogledu imajo tehnike sklopitve s poročevalskimi geni prednost, saj ob uporabi mikroskopskih tehnik vidimo razlike v izražanju direktno v biofilmu (Kjellberg in Givskov, 2007).

2.3 EGEROLIZIN

2.3.1 Proteinska družina egerolizini

Proteini, ki jih uvrščamo v družino egerolizinov (Pfam06355), so prisotni pri glivah, bakterijah, rastlinah in virusih (Slika 9) (Berne in sod., 2009). V podatkovni zbirki nukleotidnih zaporedij obstaja že preko 350 vnosov homologov te družine (Ota in sod., 2014). Kljub temu, da so široko razširjeni med organizmi, njihove lastnosti niso enake, njihova vloga pa je slabo poznana. Razlog za nastanek te družine je bila visoka stopnja podobnosti aminokislinskega zaporedja med najbolje raziskanim proteinom te družine ostreolizinom A (OlyA), iz užitne gobe *Pleurotus ostreatus* (Berne in sod., 2002; Ota in sod., 2013; Schlumberger in sod., 2014), ki je del bikomponentnega citolitičnega kompleksa (Ota in sod., 2013), egerolizinom iz užitne gobe *Agrocybe aegerita*, hemolitičnim Asp-hemolizinom iz plesni *A. fumigatus*, (prvim izoliranim proteinom z določenim aminokislinskim zaporedjem te novo nastale družine) in egerolizinoma P16 in P18 iz bakterije *Clostridium bifermentas* (Berne in sod., 2002; Berne in sod., 2009; Ota in sod., 2014).



Slika 9: Prikaz razširjenosti egerolizinov med organizmi (povzeto po Finn in sod., 2014).

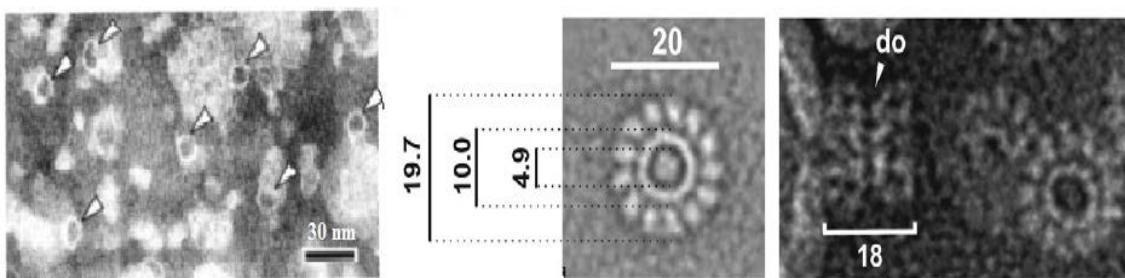
2.3.2 Struktura in lastnosti egerolizinov

Do danes so bile okarakterizirane lastnosti le peščice egerolizinov (Ota in sod., 2014). Proteini te družine so veliki od 15 do 20 kDa. Bioinformatske analize in predikcije nakazujejo večinsko sekundarno strukturo beta lista (Berne in sod., 2009). To potrjuje tudi spektroskopska analiza cirkularnega dikroizma (CD) teh proteinov, kar so dognali Berne in sodelavci (2005) za ostreolizin in Nayak in sodelavci (2011) za terelizin iz devteromicetne glive *Aspergillus terreus*. Kot so dodatno dognali Berne in sodelavci (2005) za ostreolizin in Nayak in sodelavci (2011) za terelizin, se struktura teh proteinov spreminja s pH in beta list struktura se ohranja vse do minimalne vrednosti pH 3. Pod to pH-vrednostjo se glede na CD spektroskopsko analizo proteina večinsko nahajata alfa vijačnični strukturi, kar vodi v izgubo aktivnosti. S tem je torej aktivnost odvisna od strukture beta lista oziroma pH. PH optimumom ostreolizina za hemolizo je med pH 7-8. Enako kot egerolizni tudi dobro proučeni, tako imenovani od holesterola odvisni bakterijski citolitični toksini (CDC), niso aktivni oziroma citolitični ob izgubi strukture beta lista, kar dodatno nakazuje na pomembnost beta list strukture za delovanje egerolizinov(Tweten, 2005).

Iz aminokislinske sestave vidimo, da imajo egerolizini približno 10 % aromatskih aminokislin in 20–24 % nabitih aminokilsin. Predvsem glivni egerolizini vsebujejo skupke negativno nabitih aminokislin, podobno kot to najdemo pri proteinu ApoB, človeškemu receptorju za nizkomolekularne lipoproteine (LDL) (Berne in sod., 2009). Tako je pri Asp-hemoliznu, ki ima te značilne skupke, bila določena vezava z oksidiranimi nizkomolekularnimi plazemskimi lipoproteini (oksi-LDL) in lizofosfatidilholinom (lizo-PC) (Kudo in sod., 2002). Take vezave ni možno zaslediti pri tereliznu, pri čemer se sklepa, da je to ravno posledica pomanjkanja teh značilnih področij s številnimi negativno nabitimi aminokislinami na tem proteinu (Nayak in sod., 2013). Bakterijski egerolizini so napram glivnim slabše preučeni. Nakazana je bila vezava egerolizina PA0122 (RahU) bakterije *P. aeruginosa* (Rao in sod., 2008) z oksi-LDL in lizo-PC. Kljub veliki aminokislinski podobnosti z Asp-hemolizinom pa do danes ni bila dokazana hemolitična aktivnost tega bakterijskega egerolizina (Ota in sod., 2014). Razen vezave z oksi-LDL in lizo-PC so pri glivnih egerolizinih (ostreolizin A,

pleurotolizin A) določili vezavo z membranskimi domenami, bogatimi s holesterolom in sfingomielinom, oz. s, t. i. membranskimi rafti (Sepčić in sod., 2004; Tomita in sod., 2004; Ota in sod., 2013; Skočaj in sod., 2014). Pri vezavi slednjih se navaja vloga področij s skupki aromatskih aminokislinskih ostankov, ki naj bi bili prav tako ključni za delovanje proteinov CDC (Tweten, 2005; Berne in sod., 2009).

Vezava ostreolizina A (OlyA) in pleurotolizina A (PlyA), ki v kombinaciji s svojim proteinskim partnerjem tvorita bikomponentne citotolitične komplekse, je specifično vezana na lipidne membrane, bogate s holesterolom in sfingomielinom (Sepčić in sod., 2004; Tomita in sod., 2004). Egerolizinska komponenta prepozna specifična področja membrane, a sama ne povzroči permeabilizacije in citolize (Tomita in sod., 2004; Ota in sod., 2013). To se zgodi le ob prisotnosti druge komponente, npr. pleurotolizina B (PlyB) (Tomita in sod., 2004). Slika 10 prikazuje tvorbo pore ostreolizina A in pleurotolizina A ob prisotnosti 59 kDa pleurotolizina B (Ota in sod., 2013). Dodatni dokaz in aplikativnost specifičnosti proteina OlyA za vezavo z lipidnimi rafti se izkaže tudi ob sklopitevi tega proteina s poročevalskim fluorescenčnim proteinom (mCherry) v OlyA-mCherry, s katerim je možno opazovati membranske rafte in spremljati njihovo dinamiko (Skočaj in sod., 2014).



Slika 10: Elektronske mikroskopske slike pore PlyA+PlyB na membranski frakciji eritrocitov in oligomerne pore OlyA+PlyB na membranah lipidnih veziklov (Tomita in sod., 2004; Ota in sod., 2014).

2.3.3 Biološka vloga egerolizinov v glivah in bakterijah

Biološka vloga vezave glivnih egerolizinov na lipidne membrane, tvorba pore in hemoliza so nerazjasnjeni (Nayak in sod., 2013). Obe gobi, *P. ostreatus* in *A. aegerita*, sta užitni, ko sta termično obdelani. Le redko pride, pri zaužitju velikih količin surove *P. ostreatus*, do intoksikacije (Al-Deen in sod., 1987). V primerjavi s tem se Asp-hemolizin nahaja v patogeni glivi *A. fumigatus*, ki je znana povzročiteljica bolezni pri

imunokomprimiranih osebah, in bi egerolizin Asp-hemolizin, ki je tudi hemolitičen, lahko deloval kot virulenčni dejavnik (Hohl in Feldmesser, 2007). Temu nasprotuje raziskava Wartenberg in sodelavcev (2011), kjer je bilo ugotovljeno, da *A. fumigatus* izloča Asp-hemolizin tudi takrat, ko je plesen v neinfektivnem stanju. Poleg tega delecija gena za Asp-hemolizin ni pokazala upada hemolize ali citotoksičnosti pri *A. fumigatus* ter tudi ni zmanjšala virulence take mutante v opazovanem mišjem modelu za invazivno pulmonarno aspergilizo.

Prisotnost egerolizinov pri nepatogenih, užitnih in saprofitnih glivah kaže na drugo vlogo teh proteinov. Saprofitne glive bi lahko uporabljale te proteine pri pridobivanju hrani preko tvorbe por v odpadlem organskem materialu, s čimer bi bil lažji dostop do celičnih vsebin razpadlega materiala (Nayak in sod., 2013).

V raziskavah Berne in sodelavcev (2002) in Vidic in sodelavcev (2005) so dokazali, da je izražanje OlyA v glivi *P. ostreatus* povezano in inducirano v rastočih primordijih, razvijajočih se sporokarpnih ter v bazidijih in bazidiosporah. Berne in sodelavci (2007) so z dodatkom OlyA h glivi *P. ostreatus* tudi uspeli inducirati nastanek primordijev. Izražanje egerolizinov, povezano z nastankom in rastjo plodnih teles, pa zasledimo pri glivah *Moniliophthora perniciosa*, *Flammulina velutipes* in ostalih, ki ustvarjajo opisane strukture. Dodatek egerolizinov k tem in drugim glivam pa povzroča tudi agregacijo hif, značilno pri tvorbi opisanih struktur (Lakkireddy in sod., 2011). Skupaj te raziskave nakazujejo vlogo glivnih egerolizinov pri razmnoževanju gliv.

Pri bakterijah je biološka vloga egerolizinov zaradi slabšega poznavanja njihovih lasntosti bolj nejasna, vendar obstajajo primeri, ki kažejo na določene biološke vloge. Homologa OlyA, egerolizina Cbm 17.1 in Cbm 17.2 bakterije *C. bifermentans* sta na primer izražena v poznih fazah sporulacije. Tako vloga egerolizinov pri nastajanju spor ni omejena samo na glivne egerolizine (Barloy in sod. 1998). Nadalje, egerolizin bakterije *Bacillus thuringiensis*, Cry34Ab1, interagira s proteinom Cry35Ab1 v bikomponentni insekticidni toksin, ki tvori pore v epitelnih celicah nekaterih insektov, in za katerega je vložena patentna prijava za uporabo kot insekticid (Li in sod., 2013). Ostali bakterijski egerolizini so slabo poznani (Ota in sod., 2014)

2.3.4 RahU (PA0122), egerolizin bakterije *P. aeruginosa*

Rao in sodelavci so leta 2008 prvič identificirali protein RahU, ki je bil do takrat poznan le na podlagi odprtega bralnega okvirja gena PA0122 bakterije *P. aeruginosa*. Tedanji rezultati transkriptomskih in proteomskega študija so nakazovali razliko v izražanju PA0122 ob primerjavi mukoznega (2192) in nemukoznega (383) seva *P. aeruginosa*, ki sta bila izolirana v dvodnevnu razmaku iz bolnika z cistično fibrozo (Firoved in Deretic, 2003; Hanna in sod., 2000). Rao in sodelavci (2008) so s transkriptomsko analizo in kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (PCR), izvedeno v realnem času, dokazali več kot 8-kratno zvečanje izražanja gena PA0122 v nemukoznem sevu napram mukoznemu sevu. Slednje so potrdili tudi z analizo prenosa western s protitelesi proti rekombinatnemu, 16 kDa proteinu RahU. To je bil prvi dokaz za nastanek proteina iz hipotetičnega gena PA0122.

2.3.5 Izločanje egerolizina RahU v izvencelično okolje

Rao in sodelavci (2008) so dognali, da se protein RahU nahaja izven celice bakterije *P. aeruginosa*. Po gojenju nemukoznega seva 383 do različnih celičnih gostot so bakterije ločili od gojišča s centrifugiranjem in filtriranjem s filtrom z velikostjo por 0,22 µm. Z acetonom precipitirane izvencelične proteine so ločili z elektroforezo in izvedli prenos western. Dobili so močno liso, ki je ponazarjala prisotnost proteina v izvenceličnem okolju. Prisotnost RahU izven celice so potrdili v drugih študijah, kjer so s proteomsko analizo MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight mass spectrometry) detektirali RahU v iztrošenem mediju M9 tako pri laboratorijskem sevu PAO1 kot v epidemičnem sevu AesR-1 (Scott in sod., 2013). Nadalje, izločanje RahU iz celice nakazujejo tudi proteomske analize matriksa biofilma seva PAO1 (Toyofuku in sod., 2012) in matriksa mešanega biofilma seva PAO1 s *Candida albicans* (Puschke, 2012), kjer so proteine identificirali s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Toyofuku in sodelavci (2012), so identificirane proteine v matriksu biofilma razdelili na proteine, ki so bili ali niso bili prisotni v izvenmembranskih veziklih (angl.: outer membrane vesicles). Protein RahU so pri tem označili kot izvencelični protein, ki ni povezan z izven membranskimi vezikli. Glede na

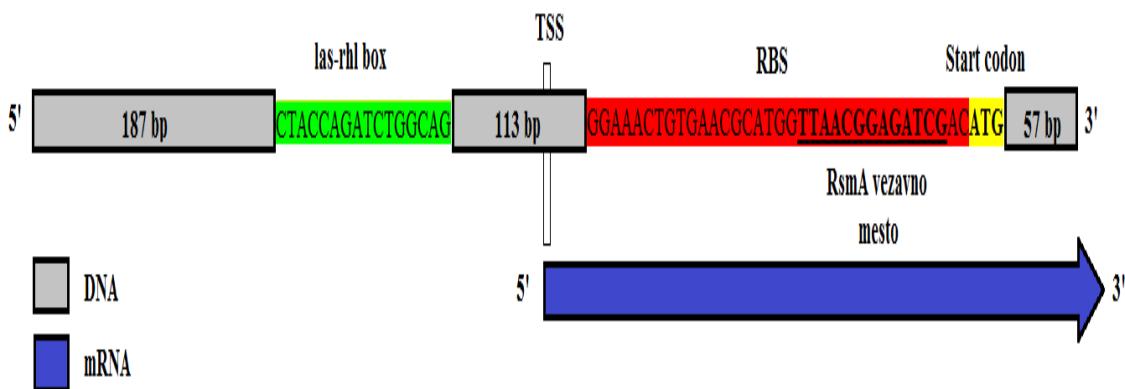
študijo Purschke in sodelavcev (2012) pa je RahU, najvišjo koncentracijo v matriksu biofilma dosegel v zgodnjih fazah rasti biofilma, in sicer med prvo in četrto uro rasti biofilma.

Poleg zunajcelične lokacije je RahU bil detektiran v citoplazmi in v notranji membrani celice ter v nizkih koncentracijah na zunanji membrani celice (Rao in sod., 2008).

2.3.6 Uravnavanje izražanja gena *rahU* in uravnavanje sinteze proteina RahU

Globalne analize prepisa genov, ki uporabljajo transkriptomiko, so pokazale, da sta transkripcijska faktorja LasR in RhlR potrebna za prepis gena *rahU* (Schuster in sod., 2003; Wagner in sod., 2003; Hentzer in sod., 2003). Izražanje gena *rahU* je tako odvisno od zaznavanja celične gostote, specifično od sistemov Las in Rhl. To potrjuje raziskava Schuster in Greenberg (2007), kjer so s predčasno aktivacijo sistema Las in Rhl uspeli predčasno izraziti gen *rahU*. Pri tem se domneva, da je to omogočeno z nadregulacijo teh dveh sistemov nad *rahU*, medtem ko pri genih, ko to ni možno, sistema Las in Rhl koregulirata izražanje genov z drugimi sistemi.

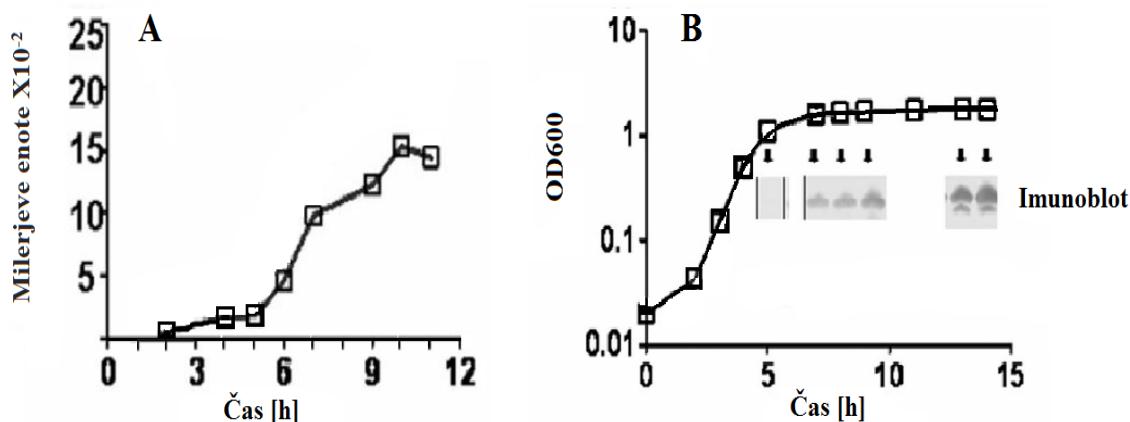
Vpliv transkripcijskega faktorja LasR je lahko direkten, z vezavo na promotorsko področje gena *rahU*, kar je bilo tudi nakazano kot morebiten način regulacije s prepoznavo šibke interakcije LasR z omenjenim odsekom DNA v genu *rahU* (Gilbert in sod., 2009), lahko pa LasR indirektno preko aktivacije RhlR vpliva na prepis *rahU*. V promotorskem področju *rahU* predvideno vezavno mesto za LasR in RhlR prikazuje Slika 11, pri čemer pa ni razjasnjeno, ali se LasR in RhlR na to zaporedje lahko vežeta hkrati. Nedavno so dokazali še dodaten mehanizem regulacije, kjer protein RsmA interagira z mRNA gena *rahU* in potranskripcijsko zmanjša stabilnost transkripta, tako je moč opaziti zvečan nivo mRNA *rahU* v mutanti gena *rsmA* v primerjavi z divjim tipom (Kulkarni in sod., 2014).



Slika 11: Promotorsko področje gena *rahU* z elementi za uravnavanje transkripcije, potranskripcijskega nivoja in translacije RahU (povzeto po Wagner in sod., 2003; Wurtzel in sod., 2012; Kulkarni in sod., 2014). Označke: *las-rhl box* mesto za vezavo LasR in RhlR; TSS) mesto začetka prepisa, ki je 111 bp pred ATG; RBS) ribosomalno vezavno mesto, (angl.: ribosome binding site); RsmA vezavno mesto vezavno mesto za protein RsmA, ki vpliva na potranskripcijsko uravnavanje transkripta *rahU*.

2.3.7 Izražanje gena *rahU* in sinteza RahU v odvisnosti od faze rasti bakterije *P. aeruginosa*

Izražanje gena *rahU* in sintezo proteina RahU med rastjo bakterije *P. aeruginosa* PAO1 prikazuje Slika 12. Protein RahU se kot tipičen gen QS aktivira pri prehodu iz logaritemsko v stacionarno fazo rasti, kar so zasledili tudi na nivoju proteina (Rao in sod., 2008, Rao in sod., 2011a).

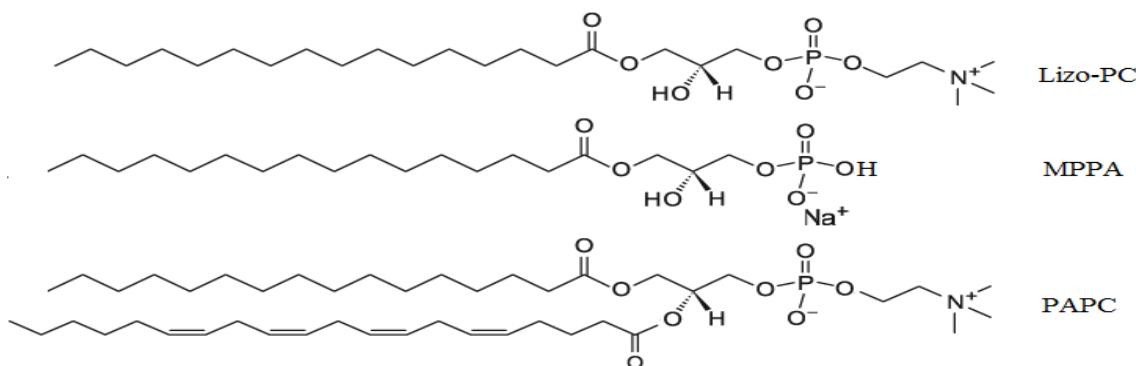


Slika 12: Izražanje gena *rahU* in sinteza proteina RahU med planktonsko rastjo *P. aeruginosa* PAO1 (Rao in sod., 2011a). Označke: A) Aktivnost promotorja gena *rahU* sklopljenega s poročevalskim genom *lacZ* brez lastnega promotorja. Aktivnost promotorja je izražena kot vrednost beta-galaktozidaze v milerjevih enotah; B) Rastna krivulja bakterij in imunoblot sinteze proteina RahU.

2.3.8 Vloga proteina RahU pri bakteriji *P. aeruginosa*, vezava z lipidi

Pri okužbi z mikroorganizmi začne imunski sistem človeka, predvsem neutrofili granulociti, proizvajati reaktivne oblike kisika, ki razen bakterij zaradi peroksidacije fosfolipidnih membran poškodujejo in spremenijo tudi gostiteljeve fosfolipide. To rezultira v pojavu oksidiranih fosfolipidov in oksidiranih maščobnih kislin v vnetem tkivu, apoptotičnih celicah in nizkomolekularnih lipoproteinih (LDL), transportiranih po krvi. Ti vnetni fosfolipidi so bioaktivni in vplivajo na delovanje imunskega sistema, s tem pa na potek okužbe. Primer delovanja je preprečitev aktivacije dendritičnih celic pri izpostavitvi z bakterijskim LPS (Bluml in sod., 2005).

LDL je kompleksna micelarna struktura, sestavljena iz monosloja fosfolipidov in proteina ApoB100, s trigliceridi in holesterolom v jedru (Prassl in Laggner, 2012). Pri oksidaciji LDL nastane kompleksnejši, oksi-LDL, s spremenjenim proteinom ApoB100, oksidiranimi fosfolipidi in maščobnimi kislinami. Zaradi kompleksnosti oblik LDL in oksi-LDL težko razločujemo. Med oksidiranimi lipidi v oksi-LDL je pogost fosfolipid 1-palmitoil-2-hidroksi-*sn*-glicero-3-fosfoholin (lizofosfatidilholin; lizo-PC) (Parthasarathy in sod., 2010). Razen tega pa so pri akutni vnetni okužbi ali poškodbi pljuč prisotni oksidirani fosfolipidi s polinenasičenimi maščobnimi kislinami, npr. 1-palmitoil-2-hidroksi-*sn*-glicero-3-fosfat (MPPA) in 1-palmitoil-2-arachidonoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (PAPC). Slednji je prisoten tako v membrani človeških celic kot v LDL (Rao in sod., 2011a). Medtem ko imajo te molekule več učinkov predvsem na imunski sistem, je vpliv na bakterije, razen vpliva na okužbo preko modulacije imunskega sistema, slabše raziskan (Rao in sod., 2011a).

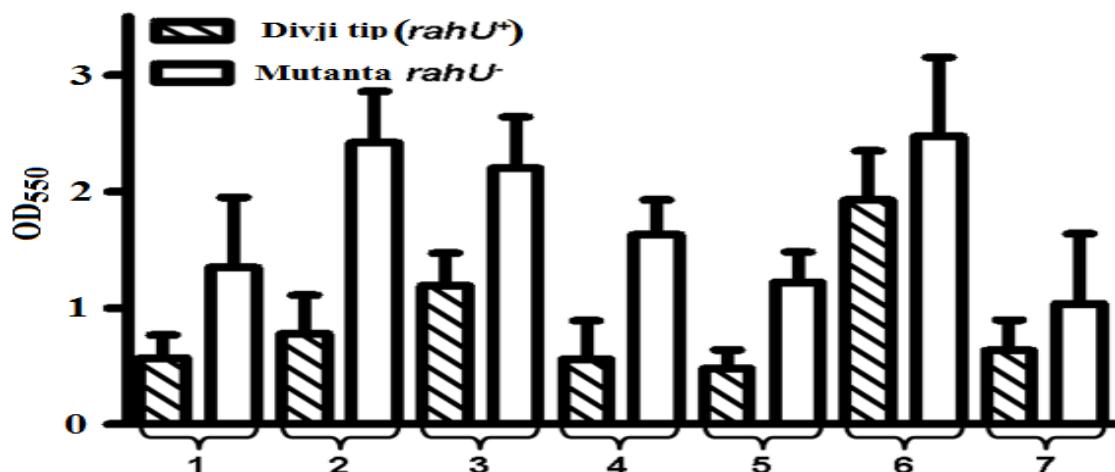


Slika 13: Prikaz nekaterih vnetnih fosfolipidov (povzeto po Avanti Polar Lipids, 2014)

Kot že omenjeno je bil protein RahU zaradi velike podobnosti z znanim oksi-LDL vezavnim Asp-hemolizinom testiran za vezavo vnetnih oksidiranih fosfolipidov. Ugotovili so, da rekombinantni RahU veže oksi-LDL s podobno afiniteto ($\text{v } \mu\text{M}$ območju) kot rekombinantni Asp-hemolizin. Podobno kot Asp-hemolizin pa veže RahU tudi lizo-PC (Rao in sod., 2008). Predhodne raziskave so pokazale, da sta ob interakciji bakterije *P. aeruginosa* PAO1 z MPPA inhibirana izražanje in akumulacija virulenčnih dejavnikov (alginat, pioverdin, elastaza) (Laux in sod., 2002). Zanimivo je, da dodatek lizo-PC k planktonsko gojenim celicam bakterije *P. aeruginosa* PAO1 tudi zveča izražanje gena *rahU*, dodatek PAPC, oziroma le arahidonske kisline, ki je del PAPC, pa naj bi znižal prepis gena *rahU* (Rao in sod., 2011a).

2.3.9 Vloga proteina RahU pri bakteriji *P. aeruginosa*, vpliv na tvorbo biofilma

Kot prikazano na Sliki 14, naj bi protein RahU zaviral nastanek biofilma. Mutane *rahU* namreč tvorijo več biofilma kot divji tip *P. aeruginosa* PAO1 (*rahU+*) (Rao in sod., 2011a).



Slika 14: Vpliv produkta gena *rahU* na količino nastalega biofilma seva *P. aeruginosa* PAO1 (Rao in sod., 2011a).

Dodatno bakterije divjega tipa PAO1 spreminjajo količino biofilma tudi glede na prisotnost vnetnih fosfolipidov. Na podlagi tega, in na podlagi že omenjene vezave oksidiranih fosfolipidov z RahU, vpliva določenih oksidiranih fosfolipidov na izražanje gena *rahU* ter omenjenih rezultatov v Sliki 14, so Rao in sodelavci (2011a) predpostavili model vloge in delovanja RahU v bakteriji *P. aeruginosa*. Deloval naj bi

kot senzor za vnetne fosfolipide (lizo-PC, PAPC, oksidiran PAPC, oksi-LDL), ki bi v odvisnosti od vezave s temi molekulami naj vplival na tvorbo biofilma.

2.3.10 Vloga proteina RahU pri bakteriji *P. aeruginosa*, vpliv na celice gostitelja

Z odkritjem novega proteina RahU in njegovo uvrstitevijo v družino egerolizinov, v kateri se nahajajo proteini, ki imajo zabeležene različne vplive na evkariotske celice, se pojavi vprašanje glede interakcije RahU s človeškimi gostiteljskimi celicami in vpliv na razvoj okužbe (Rao in sod., 2011b). Glede na proteomske študije sevi *P. aeruginosa*, izolirani iz pacientov, sintetizirajo zvečane koncentracije proteina RahU v primerjavi z laboratorijskimi nizkovirulenčnimi sevi (PAO1), kar kaže na vpliv proteina RahU pri okužbi (Hare in sod., 2012). Dodatno so Rao in sodelavci (2011b) ugotovili vpliv proteina RahU na 65 transkriptov v makrofagih linije RAW 264,7 in vpliv na kemotakso celic THP-1. Slednje so pripisali inhibiciji prepisa genov za sintezo citokinov (kar pogojuje kemotakso teh in nekaterih drugih celic imunskega odziva) in genov za sintezo dušikovega oksida. Z oslabitvijo delovanja makrofagov zaradi predvidenega delovanja RahU bi to lahko bakteriji omogočilo prednost predvsem v začetku kolonizacije gostitelja, kjer bi ta opisana lastnost zavirala nativni imunski sistem (Rao in sod., 2011b). Opisan vpliv proteina RahU na celice gostitelja zaenkrat ni dokončno potrjen.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 KEMIKALIJE IN DROBNA OPREMA

Pri delu smo uporabili naslednje kemikalije in drobno opremo:

10X FastDigest Green Buffer	MBI Fermentas, Litva
10X ThermoPol Reaction Buffer	New England Biolabs, ZDA
2X DreamTaq Green PCR Master Mix	Thermo Scientific, ZDA
3-O-C12-HSL	Sigma, ZDA
5X Rapid Ligation Buffer	MBI Fermentas, Litva
6X DNA Loading Dye	MBI Fermentas, Litva
AEBSF	Sigma, ZDA
Agar	Merck, Nemčija
Agaroza	Sigma, ZDA
Akrilamid/bisakrilamid	BioRad, ZDA
Amonijevpersulfat (APS)	Sigma, ZDA
Ampicilin	Sigma, ZDA
Benzamidin	Sigma, ZDA
C4-HSL	Santa Cruz Biotechnology, ZDA
CaCl ₂	Merck, Nemčija
Coomassie Brilliant Blue	Merck, Nemčija
dH ₂ O	Biotehniška Fakulteta, Slovenija
DNAza	Sigma, ZDA
Zmes dNTP	New England Biolabs, ZDA
DTT	Sigma, ZDA
Etidijev bromid	Merck, Nemčija
FD BamHI	MBI fermentas, Litva
FD EcoRI	MBI Fermentas, Litva
FD pufer	MBI Fermentas, Litva
GdnHCl	Sigma, ZDA
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, ZDA

GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Scientific, ZDA
GeneRuler 1kb DNA lestvica	MBI Fermentas, Litva
Genomic DNA Purification Kit	MBI Fermentas, Litva
Glicerol	Merck, Nemčija
Imidazol	Sigma, ZDA
Izopropil-b-D-tiogalaktopiranozid (IPTG)	Sigma, ZDA
Karbenicilin	Sigma, ZDA
Kazeinski hidrolizat	Sigma, ZDA
Kristal vijolično	Merck, Nemčija
Kvasni ekstrakt	Sigma, ZDA
Lizocim	Merck, Nemčija
Metanol	Sigma, ZDA
HIS-Select Nickel Affinity Gel	Qiagen, ZDA
Na ₂ HPO ₄	Sigma, ZDA
NaCl	Merck, Nemčija
NaDS	Sigma, ZDA
NaDS	Sigma, ZDA
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	Merck, Nemčija
Ni-NTA Spin Kit	Qiagen, ZDA
Objektna stekelca z 0.1 % (wt/vol) poli-l-lisinom	Sigma, ZDA
Ocetna kislina	Merck, Nemčija
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, ZDA
PMSF	Sigma, ZDA
Pufer SAP	MBI Fermentas, Litva
RahU (6xHis-tag RahU rezan s trombinom)	Biotehniška Fakulteta, Slovenija
RNAza (R4875 Ribonuclease A)	Sigma, ZDA
SAP	MBI Fermentas, Litva
T4 DNA ligaza	Thermo Scientific, ZDA
TEMED	Sigma, ZDA
TRIS	Sigma, ZDA
TRIS-HCL	Sigma, ZDA

Triton X-100	Sigma, ZDA
Urea	Merck, Nemčija
Polimeraza Vent R DNA	New England Biolabs, ZDA
β-merkaptetoanol	Merck, Nemčija

3.2 GOJIŠČA

Medij LB

10 g/L kazeinski hidrolizat, 5 g/L kvasni ekstrakt, 10 g/L NaCl

Po potrebi z antibiotiki v končni koncentraciji: 100 µg/mL ampicilin (LBAp); 300 µg/mL karbenicillin (LBCb300); 150 µg/mL karbenicillin (LBCb150).

Agarne plošče/trdo gojišče

Pred avtoklaviranjem dodamo 15 g agarja na liter medija LB. V zmerno ohlajen medij (50 °C). Po potrebi dodamo antibiotike in vlijemo v sterilne petrijevke.

3.3 RAZTOPINE IN PUFRI

10X Pufer TBE (pH 8,3)

89 mM Tris, 89 mM borne kisline, 2 mM EDTA

Pufri za poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (NaDS-PAGE):

Elektroforezni pufer za NaDS-PAGE (10X)

25 mM TRIS (pH 8,3), 1,92 M glicin, 35 mM NaDS

Nanašalni pufer za NaDS-PAGE (2X)

20 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 5 % NaDS (m/v), 2 mM EDTA, 10 % glicerol (v/v), 0,2 % Coomassie Brilliant Blue (m/v)

Raztopina za NaDS-PAGE V=6mL

1,8 mL akrilamid/bisakrilamid, 3,104 mL dH₂O, 0,75 mL 3 M TRIS, 40 µL 10 % NaDS, 300 µL 1,5 % APS, 6 µL TEMED

Raztopina za NaDS-PAGE nanašalni, V=5mL

0,5 mL akrilamid/bisakrilamid, 2,945 mL dH₂O, 1,25 mL 0,5 M TRIS, 50 µL 10 % NADS, 250 µL 1,5 % APS, 5 µL TEMED

Raztopina za barvanje NaDS-PAGE

10 % ocetna kislina (v/v), 40 % metanol (v/v), 0,5 % Comassie Brilliant Blue (m/v)

Raztopina za razbarvanje NaDS-PAGE

10 % ocetna kislina (v/v), 40 % metanol (v/v)

Pufri za pripravo kompetentnih bakterijskih celic

Pufer za pripravo kompetentnih celic *E. coli*

50 mM CaCl₂, 10 % (v/v) glicerol, 10 mM TRIS, dopolni z MQ do 50 mL , pH 7.5,

Pufri za pripravo kompetentnih celic *P. aeruginosa*

Pufer A (pH 7.5): 0,1 M MgCl₂ x 6H₂O

Pufer B (pH 7.5): 0,175 M CaCl₂ x 2H₂O, 10 % (v/v) glicerol, 10 mM TRIS-HCl

Pufri za proteinsko ekstrakcijo

Pufer za homogenizacijo bakterijskih celic

0,5 mg/mL lizocim, 10 µg/mL DNAza, 20 µg/mL RNAza, 0,5 mM AEBSF, 0,5 nM PMSF, 1 mM benzamidin

Pufri za proteinsko ekstrakcijo pod denaturajočimi razmerami

Pufer 1A (pH 8): pufer za spiranje celic: 20 mM TRIS-HCL

Pufer 1B (pH 8): pufer za grobo spiranje inkluzijski teles: 20 mM TRIS, 0,5 mM NaCl, 1 M urea, 2 % Triton X-100 (v/v)

Pufer 1C (pH 8): pufer za rahlo spiranje inkluzijskih teles: 20 mM TRIS, 0,5 NaCl, 2 % Triton X-100 (v/v)

Pufer za ravijanje (pH 8): 20 mM TRIS, 0,5 M NaCl, 6 M gvanidinijev hidroklorid, 1 mM β -merkaptoetanol

Pufri za Ni-NTA kromatografijo N

Pufer za lizo (pH 8): 50 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol

Pufer za spiranje (pH 8): 50 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O, 300 mM NaCl, 25 mM imiazol

Pufer za elucijo (pH 7,5): 50 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol

Pufri za Ni-NTA kromatografijo D

Pufer za lizo (pH 8): 20 mM TRIS, 0,5 M NaCl

Pufer za spiranje (pH 8): 20 mM TRIS, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol

Pufer za elucijo (pH 8): 20 mM TRIS, 0,5 M NaCl, 500 mM imidazol

Pufer za dializo:

20 mM TRIS, 140 mM NaCl

Pufri za dvojno denaturacijo in renaturacijo (2DR):

Pufer za spiranje 1 (pH 8): 20 mM TRIS

Pufer za spiranje 2 (pH 8): 50 mM TRIS, 50 mM NaCl, 2 % Triton X-100, 1.5 mM β -merkaptoetanol, 1,6 M urea

Pufer 50 TRIS (pH 8): 50 mM TRIS

Pufer za ekstrakcijo 1 (pH 8): 50 mM TRIS, 50 mM NaCl, 10 mM β -merkaptoetanol, 7 M gvanidinijev hidroklorid

Pufer za ekstrakcijo 2 (pH 8): 50 mM TRIS-HCL, 50 mM NaCl, 10 mM β -merkaptoetanol, 8 M Urea

Pufer za renaturacijo – β (pH 8): 20 mM TRIS, 50 mM NaCl, 10 μ M C4-HSL

Pufer za renaturacijo + β (pH 8): 20 mM TRIS, 50 mM NaCl, 1mM β -merkaptoetanol, 10 μ M C4-HSL

3.4 BAKTERIJSKI SEVI, PLAZMIDI IN ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI

Preglednica 1: V raziskavi uporabljeni bakterijski sevi in plazmidi.

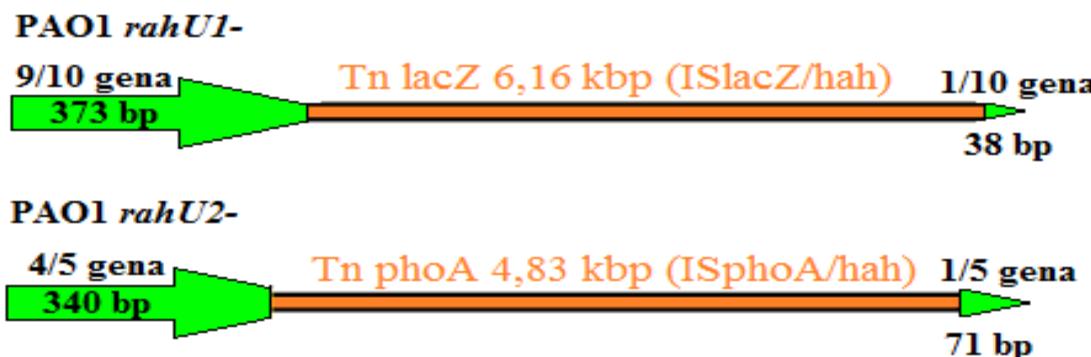
Bakterijski sev	Pomembne lastnosti	Referenca/vir
DH5α	F $^-$ $\Phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK $^-$, mK $^+$) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ^- <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	Novagen (Merck, USA)
BL21(DE3)	F $^-$ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-)</i> λ (DE3)	Novagen (Merck, USA)
PAO1	Divji tip	(Holloway in sod., 1980)
MW1	PAO1 derivat, <i>rhlI::Tn501 lasI::tetA</i>	(Rahim in sod., 2001)
PAO1 <i>rhlR</i>$^-$	<i>rhlR::Gm^R</i>	(Whiteley in sod., 1999)
PAO1 <i>rahUI</i>$^-$	<i>rahU::ISlacZ/hah</i>	(Jacobs in sod., 2003)
PAO1 <i>rahU2</i>$^-$	<i>rahU::ISphoA/hah</i>	(Jacobs in sod., 2003)
Pazmidi	Pomembne lastnosti	Referenca/vir
pLP170	Brez promotorja <i>lacZ</i> transkripcijskofuzijski vektor; Ap R Cb R ; zmožen pomnoževanja v <i>E. coli</i> in <i>P. aeruginosa</i>	(Preston in sod., 1997)
pLP170-<i>paPro</i>	pLP170 derivat; vsebuje promotor gena <i>rahU</i> ; Ap R Cb R	(Miklavič in sod., 2015)
pET8c	T7 ekspresijski vektor; Ap R	Novagen (Merck, USA)
pET8c-eGFP-<i>rhlR</i>	T7 ekspresijski vektor; Ap R	(Miklavič in sod., 2015)
pET8c-<i>rhlR</i>	T7 ekspresijski vektor; Ap R	(Miklavič in sod., 2015)
pET8c-<i>olygoAmCherry</i>	T7 ekspresijski vektor; Ap R	(Skočaj in sod., 2014)

Preglednica 2: V raziskavi uporabljeni začetni oligonukleotidi.

Oznaka	Nukleotidno zaporedje (5' proti 3')
P11	CCCCTCGAGGCCCTGCTCGATGCCCTGGA
P12	CCCGGATCCCACCGTGCCGATGGATTGGA
P17	CCCAAAGTTAAAATGCCGCGCCC
P35	CCCGGATCCGGAGAAGCGGCCGAGGGTCA
P64	CCCGGATCCGGCAGCGAAAGCAAAAGCAGCGGCAGCGCGTGA GCAAGGGCGAGGAGGATAAC
P47	GCGGGATCCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC

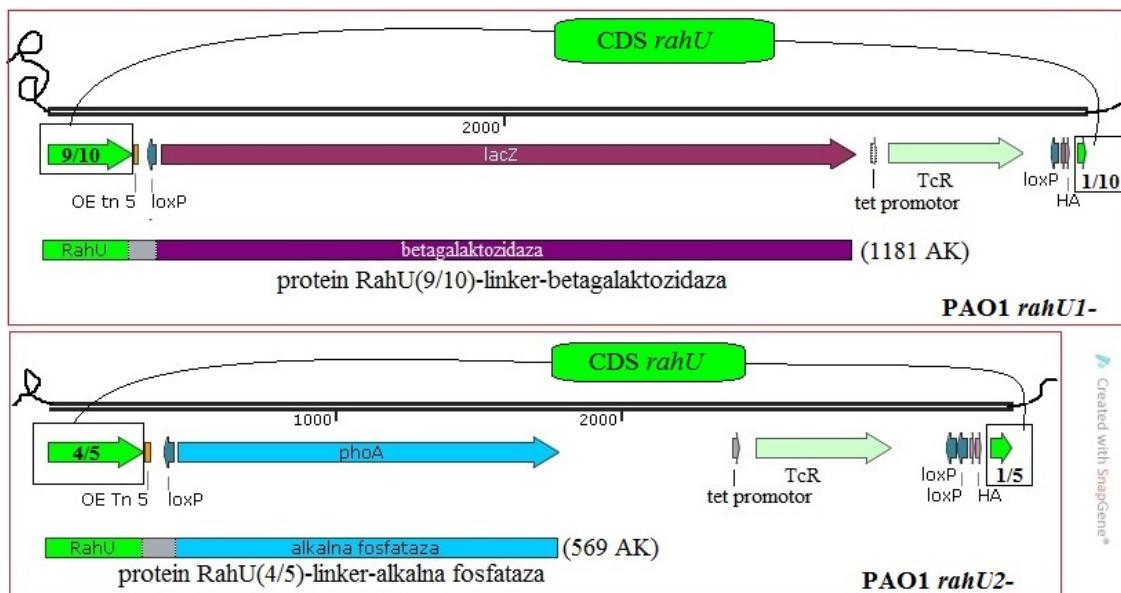
3.5 PODROBNEJŠI OPIS SEVOV PAO1 *rahU1* in PAO1 *rahU2*

Na spodnji sliki (Slika 15) je prikazana prekinitev gena *rahU*, pri sevih PAO1 *rahU1* in PAO1 *rahU2*.



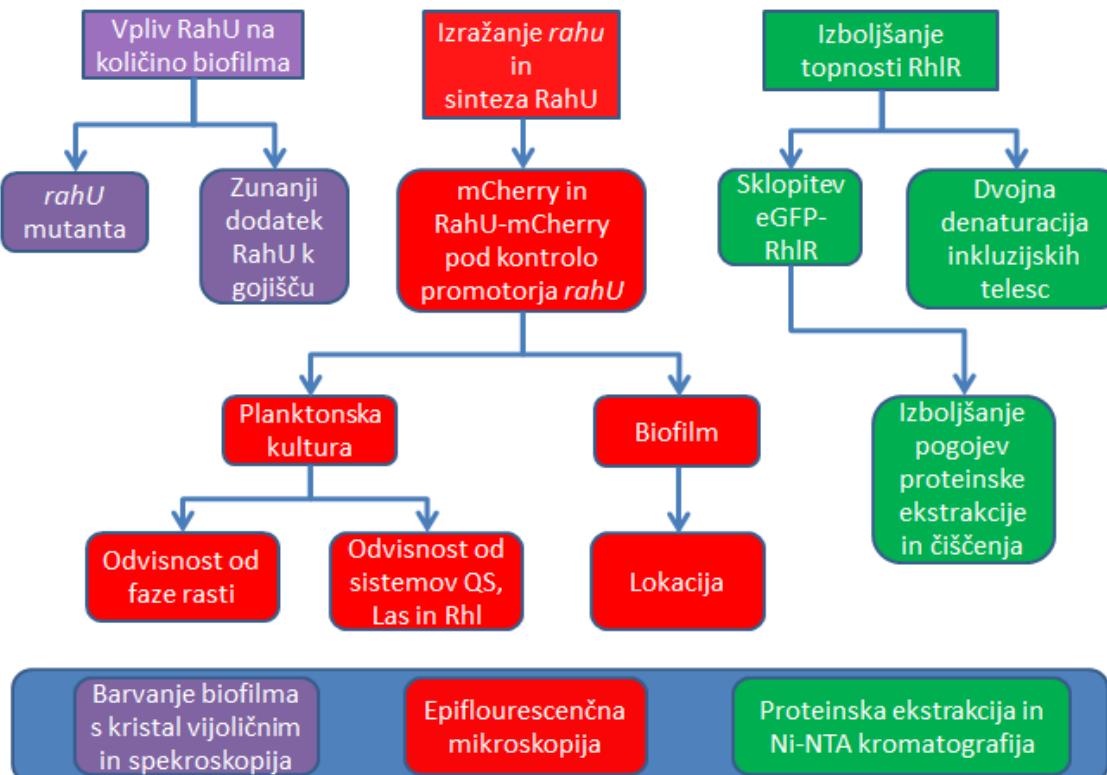
Slika 15: Mesto vstavite transpozonov ISlacZ/hah v sevu *P. aeruginosa* PAO1 *rahU1* in ISphoA/hah v sevu *P. aeruginosa* PAO1 *rahU2* (povzeto po UW Genome Sciences, 2015)

Na začetku obeh transpozonov se nahaja kodirajoče zaporedje DNA (CDS), ki ob vstaviti transpozona v bralni okvir (angl.: in frame), kot pri PAO1 *rahU1* in PAO1 *rahU2*, omogoči nastanek sklopljenega proteina iz prekinjenega gena in CDS vstavitevenega zaporedja (Bailey in Manoil, 2002; Jacobs in sod., 2003) To podrobneje prikazuje spodnja slika (Slika 16).



Slika 16: Podrobnejši prikaz vstavitev transpozonov ISphoA/hah in ISlacZ/hah in sklopljenih proteinskih produktov. (povzeto po UW Genome Sciences, 2015). Oznake: phoA) zapis za alkalno fosfatazo, lacZ) zapis za beta-galaktozidazo, OE Tn5) outside end IS50L Tn5, TcR) zapis za tetraciklinsko rezistenco, tet promotor) promotor TcR, loxP) rekombinacijsko mesto)

3.6 SHEMA EKSPERIMENTA



Slika 17: Shema eksperimenta.

3.7 MERJENJE KOLIČINE BIOFILMA

Količino nastalega biofilma smo merili v mikrotitrskih ploščah. Pri tem smo najprej ustrezne seve bakterije *P. aeruginosa* nacepili na ustrezne selekcijske LB plošče (razmaz do posamezne kolonije). Po 18-urni inkubaciji smo 3 kolonije vsakega seva (3 biološke ponovitve) precepili v 10 mL LB gojišča in kulture inkubirali čez noč pri 37 °C, s stresanjem (180 rpm). Prekonočne kulture smo v razmerju 1:100 (OD_{600} približno 0,1), precepili v mikrotitrske plošče s 100 μ L LB gojišča v vsaki jamici. Nacepljene mikrotitrskie plošče smo inkubirali 24 ur pri 30 °C brez stresanja. Po končani inkubaciji smo dekantirali porabljeno gojišče in sprali jamic s fiziološko raztopino. S pomočjo avtomatske multikanalne pipete smo napolnili jamic z 120 μ L fiziološke raztopine in nekajkrat stresli mikrotitrskie plošče. Potem smo obrnili mikrotitrsko ploščo navzdol, tako da je odtekla fiziološka raztopina in poteptali obrnjeno mikrotitrsko ploščo na papirnatih brisačih, da je odtekel še ostanek. To smo ponovili 2-krat. Potem smo jamic napolnili z 120 μ L 0,1 % kristal vijoličnega v vodi in mikrotitrskie plošče pustili na sobni temperaturi za 10 min. Kristal vijolično smo dekantirali in s tapkanjem na papirnato brisačo odstranili ostanek. Odprte mikrotitrskie plošče smo pustili 20 min na zraku, da so se posušile. Potem smo ponovili postopek spiranja s fiziološko raztopino 6-krat, s čimer smo odstranili morebitno kristal vijolično, ki je bilo vezano drugod kot v nastalem biofilmu. Biofilm z vezanim kristal vijoličnim smo resuspendirali s sten jamic z dodatkom 120 μ L 33 % led ocetne kisline. Sledila je kvantifikacija z merjenjem optične gostote pri OD_{550} in statistična obdelava podatkov (Rao in sod., 2011a; Merritt in sod., 2011) Pri statistični obdelavi podatkov smo vse jamic enega seva primerjali z vsemi jamicami drugega seva in naredili Studentov dvosmerni t. test (homogeneity of variance).

3.8 PRIPRAVA PLAZMIDNIH KONSTRUKTOV

3.8.1 Izolacija DNA

Plazmidno DNA smo izolirali s kitom GeneJET Plasmid Miniprep Kit po navodilih proizvajalca Thermo Scientific. Genomsko DNA smo izolirali s kitom Genomic DNA Purification Kit po navodilih proizvajalca MBI Fermentas.

3.8.2 Agarozna gelska elektroforeza

Za preverjanje velikosti in čistosti DNA vzorcev smo uporabljali agarozni gel, narejen iz agaroze, raztopljene v pufru 0,5X TBE, ki smo mu po segrevanju v mikrovalovni pečici dodali etidijev bromid v končni koncentraciji 0,5 µg/mL. Elektroforeza je potekala v pufru 0,5X TBE, pri napetosti 100V in toku od 30-70 mA. Za preverjanje velikosti smo nanesli na gel GeneRuler 1kb DNA lestvico. Pred nanašanjem želene DNA smo zmešali 4 µL vzorca DNA z 2 µL 6X DNA Loading Dye.

3.8.3 Priprava vključka DNA

Želeno DNA smo pomnožili s PCR. Uporabljene zmesi PCR in razmere PCR prikazuje Preglednica 3 (PCR pomnožitev DNA). Pomnožek PCR smo nato sčistili s kitom GeneJET PCR Purification Kit, po navodilih proizvajalca Thermo Scientific. Tako smo se znebili snovi, ki bi motile restrikcijo, ki smo jo izvajali v ustreznih restrikcijskih mešanicah (Preglednica 4). Po restrikciji smo rezan pomnožek PCR spet sčistili s kitom GeneJET PCR Purification Kit in se znebili snovi iz restrikcijske mešanice, ki bi lahko motile nadaljnji postopek ligacije.

3.8.4 Priprava plazmidnega vektorja

Izbran plazmid smo rezali v ustreznih restrikcijskih zmesih (Preglednica 4). Po restrikciji smo rezan plazmid očistili s kitom GeneJET PCR Purification Kit po navodilih proizvajalca Thermo Scientific z modifikacijo v zadnjem koraku, kjer smo namesto 50 µL elucijske raztopine uporabili 90 µL. S čiščenjem smo sčistili morebitne snovi iz restrikcijske mešanice, ki bi lahko motile nadaljnji proces defosforilacije. Defosforilacijo plazmidov smo izvedli zaradi preprečevanja samoligacije plazmidov in tako povečali možnost ligacije z izbranim vključkom DNA. Po končani defosforilaciji smo očistili defosforiliran plazmid s kitom GeneJET PCR Purification Kit po navodilih proizvajalca z modifikacijo v zadnjem koraku, kjer smo namesto 50 µL uporabili 30 µL elucijske raztopine. S čiščenjem smo se znebili morebitnih snovi iz defosforilacijske mešanice, ki bi lahko motile postopek ligacije.

Preglednica 3: Prikaz zmesi PCR in razmer PCR. Tarčna DNA: A) kromosomska DNA seva PAO1; B) pETCABC-*olygoA-mCherry*; C) pLP170-*rahU*; D) pLP170-*rahU-mCherry*; E) pLP170-*paProm-mCherry*.

	PCR pomnožitev DNA		Kontrolni PCR plazmidnih konstruktorov		
	rahU	mCherry	C	D	E
Tarčna DNA:	A	B	C	D	E
Tarčna DNA [μ L]	1	1	0,5	0,5	0,5
Začetni oligonukleotidi					
P11 [μ L]	1		0,5	0,5	0,5
P12 [μ L]					
P35 [μ L]	1		0,5		
P46 [μ L]		1			
P47 [μ L]		1		0,5	0,5
Raztopine in pufri za polimerazo TAQ DNA:					
2X DreamTaq Green PCR Master Mix [μ L]		25	12,5	12,5	12,5
Raztopine in pufri za polimerazo Vent R DNA					
Polimeraza Vent R DNA [μ L]	0,5				
10X ThermoPol Reaction Buffer [μ L]	5				
zmes dNTP [μ L]	2				
dH2O [μ L]	39,5	22	11	11	11
Celotni volumen zmesi PCR [μ L]	50	50	25	25	25
Razmere PCR	sek-(min)	sek-(min)	sek-(min)	sek-(min)	sek-(min)
94 °C	180 - (3)	180 - (3)	180 - (3)	180 - (3)	180 - (3)
94 °C	30 - (0,5)	30 - (0,5)	30 - (0,5)	30 - (0,5)	30 - (0,5)
55 °C	30 - (0,5)	30 - (0,5)	30 - (0,5)	30 - (0,5)	30 - (0,5)
72 °C	150 - (2,5)	45 - (0,75)	55 - (0,9)	80 - (1,3)	72 - (1,2)
72 °C	420 - (7)	420 - (7)	420 - (7)	420 - (7)	420 - (7)

3.8.5 Restrikcija DNA

Restrikcijo smo izvajali 15 min pri 37 °C z restrikcijskimi zmesmi, navedenimi v Preglednici 4.

Preglednica 4: Sestava restrikcijskih zmesi.

Zmes	16 μ L Tarčne DNA	FD XhoI [μ L]	FD BamHI [μ L]	FD pufer [μ L]	Volumen zmesi [μ L]	Razlog za restrikcijo
1	pLP170	0,5	0,5	2	19	plazmidni vektor
3	pLP170- <i>rahU</i>	/	1	2	19	plazmidni vektor
5	pLP170- <i>paProm</i>	/	1	2	19	plazmidni vektor
2	<i>rahU</i>	0,5	0,5	2	19	vključek DNA
4	<i>mCherry</i>	/	1	2	19	vključek DNA

3.8.6 Defosforilacija DNA

Defosforilacijo smo izvajali 30 min pri 37 °C z defosforilacijsko zmesjo naslednje sestave; 90 µL plazmidne DNA, 1 µL SAP, 10 µL pufra SAP.

3.8.7 Ligacija vključka DNA v plazmidni vektor

Ligacijo smo izvajali 15 min pri 22 °C z ligacijsko zmesjo naslednje sestave ustrezno rezanih DNA: 3,5 µL DNA vključka, 3,5 µL plazmidnega vektorja, 2 µL 5X Rapid Ligation Buffer, 1µL T4 DNA ligaze.

3.8.8 Priprava kompetentnih celic sevov *E. coli* (DH5α) in *P. aeruginosa* (PAO1, MW1)

Kompetentne celice bakterij *E. coli* in *P. aeruginosa* smo pripravili iz ene kolonije, ki smo jo nacepili v 10 mL gojišča LB in inkubirali 24 ur s stresanjem (180 rpm) pri 37 °C. Naslednji dan smo precepili toliko prekonočne kulture v 150 mL na 37 °C ogretega gojišča LB (1 L erlenmajerica), da je OD₆₀₀ znašala 0,05. Nadalje smo pod enakimi razmerami inkubacije celice gojili do OD₆₀₀ med 0,36 in 0,5. Kulturo smo prelili v sterilno 750 mL centrifugirko, jo inkubirali 10 minut na ledu (vse nadaljnje delo je potekalo na ledu). Po inkubaciji smo celice ločili od gojišča s centrifugiranjem (10 min, 4380 rcf, 4 °C) in usedlino celic resuspendirali z 10 mL ohlajenega 0,1 M CaCl₂ (za *P. aeruginosa* smo namesto tega uporabili 10 mL ohlajenega Pufra A). Po 10-minutni inkubaciji smo ponovili centrifugiranje (10 min, 4380 rcf, 4 °C). Usedlino celic smo tokrat resuspendirali v 3 mL pufra za kompetentne celice DH5α (za *P. aeruginosa* smo namesto tega uporabili 3 mL ohlajenega Pufra B). Pripravljeno suspenzijo celic smo razdelili po 100 µL v trideset 2 mL ohlajenih mikrocentrifugirk. Mikrocentrifugirke smo zamrznili s potopitvijo v tekoči dušik in jih shranili pri –80 °C.

3.8.9 Transformacija kompetentnih celi *E. coli* in *P. aeruginosa*

K 100 µL kompetentnih celic smo dodali 5 µL ligacijske mešanice ali 0,5 µL plazmidnega konstrukta. Zmes smo inkubirali 30 min (1 uro za *P. aeruginosa*) na ledu. Sledili sta 75-sekundna (60 sekund za *P. aeruginosa*) inkubacija pri 42 °C in 2-minutna

inkubacija na ledu. Po inkubaciji smo dodali 500 µL (1 mL za *P. aeruginosa*) na 37 °C ogretega gojišča LB (z ustreznim antibiotikom) in inkubirali za 50 min pri 37 °C s stresanjem (180 rpm). Po inkubaciji smo celice ločili od gojišča s centrifugiranjem (5 min, 6021 rcf), odpipetirali 500 µL supernatanta (1 mL pri *P. aeruginosa*) in z 100 µL ostanka supernatanta resuspendirali celice. Teh 100 µL smo razmazali na ustrezne selekcijske plošče LB in inkubirali 24 ur pri 37 °C (Sambrook in sod. 1989).

3.8.10 Preverjanje plazmidnih konstruktov - rekombinatnih plazmidov

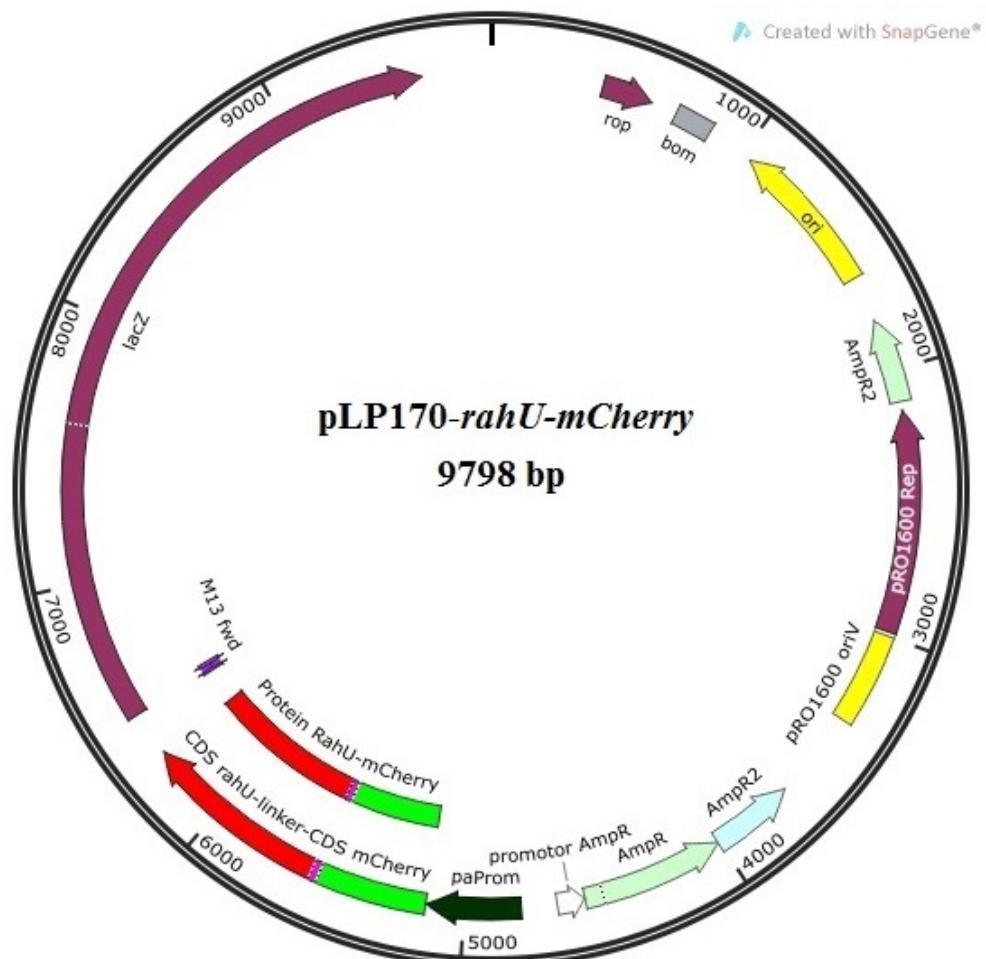
Nastale plazmide konstrukte iz ligacije plazmidnih vektorjev in vključkov DNA smo transformirali v kompetentne celice *E. coli* DH5α. Po 24-urni inkubaciji s stresanjem (180 rpm) pri 37 °C smo izbrane kolonije precepili v 10 mL tekočega selekcijskega gojišča LB Ap in po ponovni 24-urni inkubaciji izolirali namnoženo plazmidno DNA s kitom GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Po izolaciji smo pristnost ustrezne rekombinantne plazmidne DNA preverili s kontrolnim PCR (Preglednica 3), zaporedje končnih plazmidnih konstruktov pa je določilo podjetje Macrogen (Nizozemska).

3.8.11 Pregledni opis nastanka plazmidnega konstrukta pLP170-rahU-mCherry

Plazmidni konstrukt pLP170-rahU-mCherry smo pripravili po naslednjih korakih:

1. Priprava plazmidnega vektorja pLP170;
2. Priprava pomnožka PCR *rahU* (vključek DNA);
3. Priprava rekombinatnega plazmida pLP170-*rahU*, z ligacijo pripravljenega plazmidnega vektorja pLP170 in pomnožka PCR *rahU* (vključek DNA);
4. Preverjanje pripravljenega rekombinantnega plazmida pLP170-RahU s kontrolnim PCR;
5. Priprava plazmidnega vektorja pLP170-*rahU*;
6. Priprava pomnožka PCR *mCherry* (vključek DNA);
7. Priprava rekombinatnega plazmida pLP170-*rahU-mCherry* z ligacijo pripravljenega plazmidnega vektorja pLP170-*rahU* in pomnožka PCR *mCherry* (vključek DNA);
8. Preverjanje pripravljenega plazmidnega konstrukta pLP170-*rahU-mCherry*.

Na spodnji sliki (Slika 18) je prikazan plazmidni konstrukt pLP170-rahU-mCherry



Slika 18: Mapa plazmidnega konstrukta pLP170-*rahU-mCherry*. Oznake: CDS *rahU*) kodirajoče DNA zaporedje gena *rahU*; linker) kodirajoče DNA zaporedje linkerja; CDS mCherry) kodirajoče DNA zaporedje gena *mCherry*; paProm) promotor gena *rahU*.

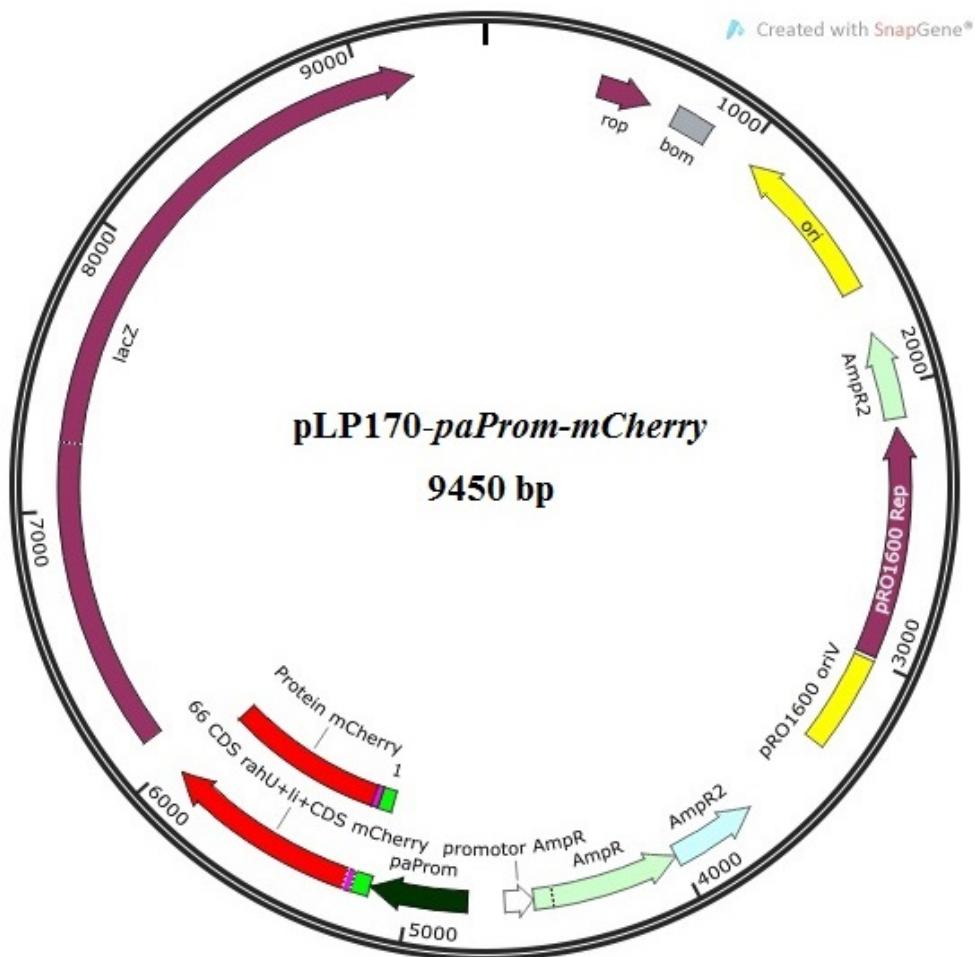
Prikaz nukleotidnega zaporedja pLP170-*rahU-mCherry* se nahaja v Prilogi C, plazmidna mapa z opisom plazmida pLP170 se nahaja v Prilogi A, prikaz konstrukcije plazmidne mape pL170 pa je v Prilogi B.

3.8.12 Pregledni opis nastanka plazmidnega konstrukta pLP170-paProm-mCherry

Plazmidni konstrukt pLP170-paProm-mCherry smo pripravili po naslednjih korakih:

1. Priprava plazmidnega vektorja pLP170-*paProm*;
 2. Priprava pomnožka PCR *mCherry* (vključek DNA);
 3. Priprava rekombinatnega plazmida pLP170-*paProm-mCherry* z ligacijo pripravljenega pLP170-*paProm* plazmidnega vektorja in pomnožka PCR *mCherry* (vključek DNA);
 4. Preverjanje pripravljenega plazmidnega konstrukta pLP170-*paProm-mCherry*.

Na spodnji sliki (Slika 19) je prikazan plazmidni konstrukt pLP170-*paProm-mCherry*.



Slika 19: Mapa plazmidnega konstrukta pLP170-*paProm-mCherry*. Oznake: 66 CDS *rahU*) 66 bp kodirajočega DNA zaporedja gena *rahU*; li) CDS zaporedje linkerja; CDS mCherry) kodirajoče DNA zaporedje gena *mCherry*; *paProm*) promotor gena *rahU*.

Prikaz nukleotidnega zaporedja pLP170-*paProm-mCherry* se nahaja v Prilogi D.

3.9 EPIFLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA

3.9.1 Epifluorescenčna mikroskopija planktonsko raslih bakterijskih celic

Transformante *P. aeruginosa*, prikazane v Preglednici 5, smo nacepili na trdno gojišče (razmaz do posamezne kolonije). Po 24-urni inkubaciji pri 37 °C smo jih precepili v 10 mL gojišča, tako da smo od vsake transformante naredili tri biološke ponovitve. Kulture rasle 24 ur s stresanjem (180 rpm), pri 37 °C smo nato precepili v 40 mL predgreta gojišča (500 mL erlenmajerica), z začetno OD₆₀₀ = 0,1 in nadaljevali z inkubacijo. Pri gojenju smo v dveurnih razmikih odvzemali 1,1 mL kulture v črne ohlajene epice, shranjene na ledu. 1 mL kulture smo porabili za spremeljanje OD₆₀₀, preostalom 100 µL kulture pa smo ustavili proteinsko sintezo z dodatkom kloramfenikola (500 µg/mL) in jih do mikroskopiranja pustili na ledu. Črne epice smo izbrali kot preventivni ukrep proti morebitnemu bledenju fluorescence poročevalskega proteina. Tukaj pred mikroskopiranjem smo pripravili mikroskopske preparate vzorcev. 10 µL suspenzije celic smo fiksirali na objektna stekelca, prekrita z 0,1-odstotnim (wt/vol) poli-l-lizinom in nanje položili krovna stekelca.

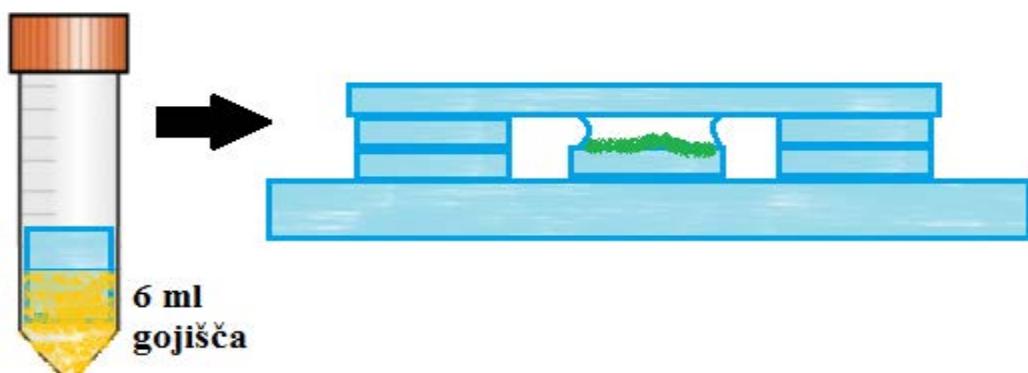
Preglednica 5: Opis transformant, sevov *P. aeruginosa* in njihovih gojišč.

Transformanta <i>P. aeruginosa</i>	Sev <i>P. aeruginosa</i>	Plazmidni konstrukt	Gojišče
/	PAO1	/	LB
PAO1 pLP170	PAO1	Plp170 (in njegovi nekončni derivati)	LB Cb300
PAO1 M	PAO1	pLP170-paprom-mCherry	LB Cb300
PAO1 AM	PAO1	pLP170-rahU-mCherry	LB Cb300
MW1 M	MW1	pLP170-paprom-mCherry	LB Cb300 +/- 3-O-C12-HSL, C4-HSL
MW1 AM	MW1	pLP170-rahU-mCherry	LB Cb300 +/- 3-O-C12-HSL, C4-HSL

3.9.2 Epifluorescenčna mikroskopija bakterijskih celic v biofilmu

Transformante *P. aeruginosa* PAO1 M, PAO1 AM in sev PAO1 smo nacepili na ustrezno trdo gojišče (Preglednica 5). Po 24 h inkubaciji pri 37 °C smo jih precepili v 10

mL tekočega gojišča v treh bioloških ponovitvah. Prekonočne kulture smo nato v razmerju 1:100 precepili v 6 mL gojišča ter vanj vstavili krovno stekelce, tako da je v 50 mL falkonki ležalo poševno (Slika 20). Tako pripravljeno kulturo smo gojili statično pri 37 °C, 1, 2 ali 3 dni. Biofilm je pri tem prerasel obe strani krovnega stekelca. Pri 2-dnevni in 3-dnevni inkubaciji smo kulturo s planktonskimi celicami dnevno dekantirali in zamenjali izrabljeno gojišče s svežim. Tik pred mikroskopiranjem smo krovno stekelce s preraslim biofilmom intenzivno sprali v banjici s fizološko raztopino. Sprano krovno stekelce z vzgojenim biofilmom smo nato pripravili za mikroskopiranje (Slika 20).



Slika 20: Prikaz gojenja biofilmov v 50 mL falkonkah in postavitev mikroskopskega preparata za mikroskopiranje biofilmov na krovnih stekelcih. Na objektno stekelce smo na vsako stran krovnega stekelca z vzgojenim biofilmom položili dve krovni stekelci. Potem smo na biofilm kanili par kapljic fiziološke raztopine in pokrili preparat s širokim krovnim stekelcem tako, da se ni dotikal biofilma in se je vmes ustvaril vodni film fiziološke raztopine.

3.9.3 Epifluorescenčna mikroskopija eritrocitov, inkubiranih z RahU-mCherry v grobem celičnem ekstraktu *P. aeruginosa*

Celice *P. aeruginosa* MW1 AM smo gojili z dodanimi AHL (C4-HSL in 3-O-C12-HSL) ali brez njih preko noči pri 37 °C, s stresanjem (180 rpm). Prekonočno kulturo smo izpostavili lizocimu (1 mg/mL) in rahlo sonicirali 30 s (40% amplituda). Po centrifugiraju (1 min, 20238 rcf, 4 °C) smo supernatant (grob celični lizat) s spranimi eritrociti inkubirali 30 min na ledu. Pri identičnih razmerah smo z eritrociti inkubirali tudi OlyA-mCherry. Po končani inkubaciji smo eritrocite ločili od suspenzije s centrifugiranjem (5 min, 13000 rcf, 4 °C) in usedlino eritrocitov resuspendirali v 20 µL eritrocitnega pufra. Do mikroskopiranja smo tako pripravljene eritrocite shranili na ledu.

3.9.4 Epifluorescenčna mikroskopija, podrobnosti mikroskopa in obdelave podatkov

Mikroskopirali smo z mikroskopom Zeiss AxioImager Z1, opremljenim z digitalno kamero Zeiss AxioCam HRc in rdečo fluorescenco detektirali ob uporabi filtra AF546 (ekscitacija 546/12 (band-pass), emisija 590 nm (long-pass)). Pri epifluorescenčni mikroskopiji planktonsko raslih bakterijskih celic smo s programom Image Pro 6.0 prešeli in določili gostoto fluorescence približno 6000 celic. Fluorescirajoče celice smo ločili od podlage z relativno mejo povprečne gostoto fluorescence 40. Pri opazovanju biofilma smo preverjali heterogenost intenzitete fluorescence celic v biofilmu.

3.10 PRODOBIVANJE TOPNEGA OČIŠČENEGA eGFP-RhlR

3.10.1 Priprava celic za produkcijo proteina eGFP-RhlR

- Gojenje in indukcija: Kolonijo ekspresijskega seva *E. coli* BL21 (DE3), ki nosi rekombinantni plazmid pET8c-eGFP-rhlR smo precepili v 10 mL gojišča LB Ap (250 mL erlenmajerica) in inkubirali 24 ur s stresanjem (180 rpm), pri 37 °C. Naslednji dan smo prekonočno kuturo precepili v 500 mL gojišča LB Ap (2 L erlenmajerica) tako, da je OD₆₀₀ znašala med 0,05 do 0,1 in inkubirali pri 22 °C ali 37 °C, s stresanjem (180 rpm) do OD₆₀₀ = 0,6 nakar smo izvedli indukcijo z 0,5 mM IPTG in nadaljevali z inkubacijo. Po 2-urni inkubaciji z IPTG smo kulturo ohladili na ledu.

Pri indukciji z IPTG smo istočasno dodali C4-HSL v končni koncentraciji 4 µM

Pred indukcijo in po njej smo za preverjanje indukcije na NaDS-PAGE odvzeli 1 mL kulture, obe ustrezno razredčili na OD₆₀₀ = 0,6 in primerjali indukcijo izražanja želenega proteina.

Protein eGFP-RhlR je bil na N-terminalnem koncu označen s (His6)-tag.

3.10.2 Ekstrakcija in čiščenje proteina eGFP-RhlR s kitom za afinitetno kromatografijo (Ni-NTA Spin Kit (Qiagen))

Vsi postopki, ki niso bili opravljeni v centrifugi, ohlajeni na 4 °C, so se izvajali na ledu.

Po indukciji smo ekstrakcijo in čiščenje proteinov iz manjših volumnov (do 40 mL kulture) izvedli s kitom Ni-NTA Spin Kit pri nativnimi ali denaturirajočih razmerah po protokolih Protein Purification under Native Conditions from *E. coli* Lysates in Protein Purification under Denaturing Conditions from *E. coli* Lysates proizvajalca Qiagen.

3.10.3 Ekstrakcija eGFP-RhlR pri nativnih ali denaturirajočih razmerah, ter čiščenje z Ni-NTA kromatografijo (HIS-Select Nickel Affinity Gel (Qiagen))

Vsi postopki, ki niso bili opravljeni v centrifugi, ohlajeni na 4 °C, so se izvajali na ledu.

- Centrifugiranje: Po indukciji smo kulturo prelili v 750 mL centrifugirke in celice ločili od gojišča s centrifugiranjem (15 min, 4380 rcf, 4 °C). Po centrifugiranju smo odlili supernatant, celični pelet resuspendirali v 20 mL ledeno hladne fiziološke raztopine, suspenzijo prelili v 50 mL centrifugirke in celice ponovno scentrifugirali (10 min, 8387 rcf, 4 °C). Po centrifugiranju smo odlili supernatant in celični pelet shranili pri -20 °C. Potem smo izvedli ekstrakcijo in čiščenje pri; a) nativne razmere, b) denaturirajoče ramzere.

a) Nativne razmere:

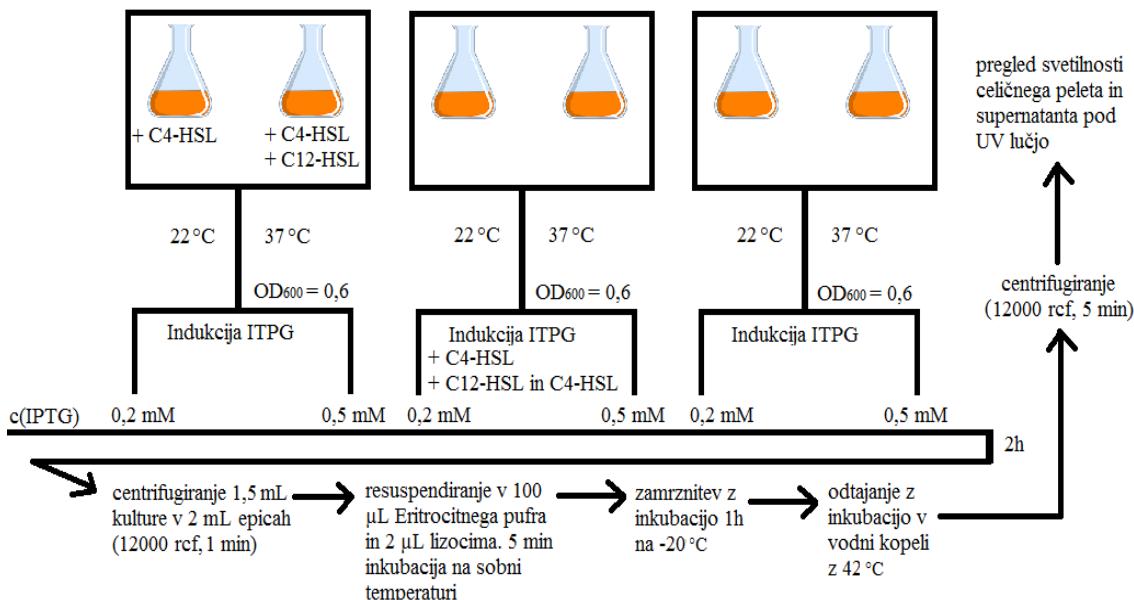
- Homogenizacija celic: odtaljen celični pelet smo resuspendirali v 10 mL Pufra za homogenizacijo in ga inkubirali 1 uro na ledu. Nadalje smo celice lizirali s sonikacijo (Pulz; 20 sek ON, 10 sek OFF, amplituda 40 %, 6-krat);
- Centrifugiranje: po homogenizaciji smo razbite celice (homogenat) centrifugirali dvakrat po 1,5 ure na 26323 rcf;
- Čiščenje: Protein smo očistili iz supernatanta homogenata z Ni-NTA kromatografijo po navodilih proizvajalca Quiagen s pufri za Ni-NTA kromatografijo N;
- Proteine smo pustili v Pufru za elucijo (pH 7,5) in jih shranili v prelubricirane epice na -4 °C.

b) Denaturirajoče razmere:

- Homogenizacija celic: odtaljen celični pelet smo resuspendirali v Pufru 1A (5 mL/g celic) in izvedli sonikacijo (Pulz; 20 sek ON, 40 s OFF, amplituda 40 %, 3-krat).
- Spiranje usedline inkluzijskih teles: razbite celice (homogenat) smo centrifugirali (20 min, 26323 rcf) in usedlino resuspendirali v Pufru 1B (3 mL/g usedline). Ponovili smo postopek sonikacije (Pulz; 20 sek ON, 40 s OFF, amplituda 40 %, 3-krat) in centrifugiranje (20 min, 26323 rcf). Usedlino smo ponovno resuspendirali v Pufru 1B (3 mL/g usedline). Potem smo namesto sonikacije dobro zvorteksirali suspenzijo in znova centrifugirali (20 min, 26323 rcf). Usedlino smo resuspendirali v Pufru 1C (3 mL/g usedline) in znova vorteksirali in centrifugirali (20 min, 26323 rcf);
- Raztpljanje usedline inkluzijskih teles: usedlino smo resuspendirali v Pufru za razvijanje (dodali toliko pufra, da se je usedlina raztopila);
- Čiščenje proteina: protein smo iz raztopine raztopljenih inkluzijskih teles očistili z Ni-NTA kromatografijo po navodilih proizvajalca Quiagen s pufri za Ni-NTA kromatografijo D;
- DIALIZA, za zvijanje razvitega proteina po čiščenju z Ni-NTA kromatografijo: dializno vrečko smo sprali v dH₂O. Potem smo noter nanesli elucijsko frakcijo (razvit protein) z Ni-NTA kromatografije, jo zaprli in postavili v čašo z dializnim pufrom. Po 2-dnevni dializi smo vsebino vrečke scentrifugirali (15 min, 16100 rcf). Supernatant smo pazljivo prenesli v prelubricirano epico in shranili na -4 °C. Usedlino inkluzijskih teles smo prenesli v navadno epico in jo shranili na -4 °C.

3.10.4 Vpliv razmer gojenja in indukcije z IPTG na topnost eGFP-RhlR

Ekspresijski sev *E. coli* BL21 (DE3) ki nosi plazmid pET8c-eGFP-rhlR smo gojili v 10 mL LbAp (100 mL erlenmajericah) na različne načine, kot prikazuje Slika 21.



Slika 21: Razmere gojenja sevov za testiranje sinteze eGFP-RhlR.

Kot kontrolo smo vse te razmere izvajali še brez indukcije z IPTG. S pregledom, ali je kaj od svetilnosti celičnega peleta prešlo v supernatant, smo hoteli preveriti vpliv opisanih razmer na topnost eGFP-RhlR.

3.11 PRIDOBIVANJE TOPNEGA OČIŠČENEGA RhlR

3.11.1 Dvostopenjski denaturacijski in renaturacijski postopek (2DR)

RhlR smo sintetizirali enako kot opisano za eGFP-RhlR (Priprava celic za produkcijo proteinov eGFP-RhlR), z to razliko, da smo uporabili ekspresijski sev *E. coli* BL21 (DE3), ki nosi rekombinant plazmid pET8c-rhlR. Pri tem je bil protein RhlR na N-terminalnem koncu označen s (His6)-tag.

Vsi postopki, ki niso bili opravljeni v centrifugi ohlajeni na 4 °C, so se izvajali na ledu.

Ohlajeno kulturo smo prelili v 50 mL centrifugirke in celice s centrifugiranjem (15 min, 6000 rcf, 4 °C), ločili od gojišča, ter celični pelet sprali z Pufrom za spiranje 1 (150

mL). Po centrifugiranju (30 min, 15000 rcf, 4 °C) smo celični pelet resuspendirali v Pufru 1C (80 mL) in celice homogenizirali s sonikacijo (Pulz; 20 sek ON, 40 s OFF, amplituda 40 %, 3-krat). Homogenat smo centrifugirali (45 min, 15000 rcf, 4 °C) in usedlino dvakrat sprali z mešanjem (30 min z magnetnim mešalom) v Pufru za spiranje 2 (150 mL) in vmesnim centrifugiranjem (30 min, 15000 rcf, 4 °C). Za odstranitev detergenta Triton X-100 smo usedlino dodatno dvakrat spirali v Pufru za spiranje 1 (150 mL) in očiščena inkluzijska telesca shranili pri -20 °C (Yang in sod., 2011).

Usedlino (inkluzijskih telesc), smo raztopili v Pufru za ekstrakcijo 1 (5 mL) in scentrifugirali (30 min, 15000 rcf, 4 °C). Dobljen supernatant smo nato na hitro precipitirali z vmešanjem v dilucijski pufer (200 mL) za hitro precipitacijo proteina ter nastali precipitat usedli s centrifugiranjem (45 min, 15000 rcf, 4 °C). Usedlino smo raztopili v Pufru za ekstrakcijo 2 (5 mL) in del raztopine kapljali v Pufer za renaturacijo – β (nereducirajoče razmere) (40 mL), drugi del pa v Pufer za renaturacijo + β (reducirajoče razmere) (40 mL). Renaturacija je potekala na 4 °C 2 dni z mešanjem ali brez njega, z magnetnim mešalom (Yang in sod., 2011). Po dveh dnevih smo suspenzijo centrifugirali (15 min, 15000 rcf, 4 °C) in supernatant ter usedlino nanesli na NaDS-PAGE. Nadalje smo supernatant (z topnim RhlR) iz opisanega postopka očistili z Ni-NTA kromatografijo (pufri za Ni-NTA kromatografijo N).

4 REZULTATI

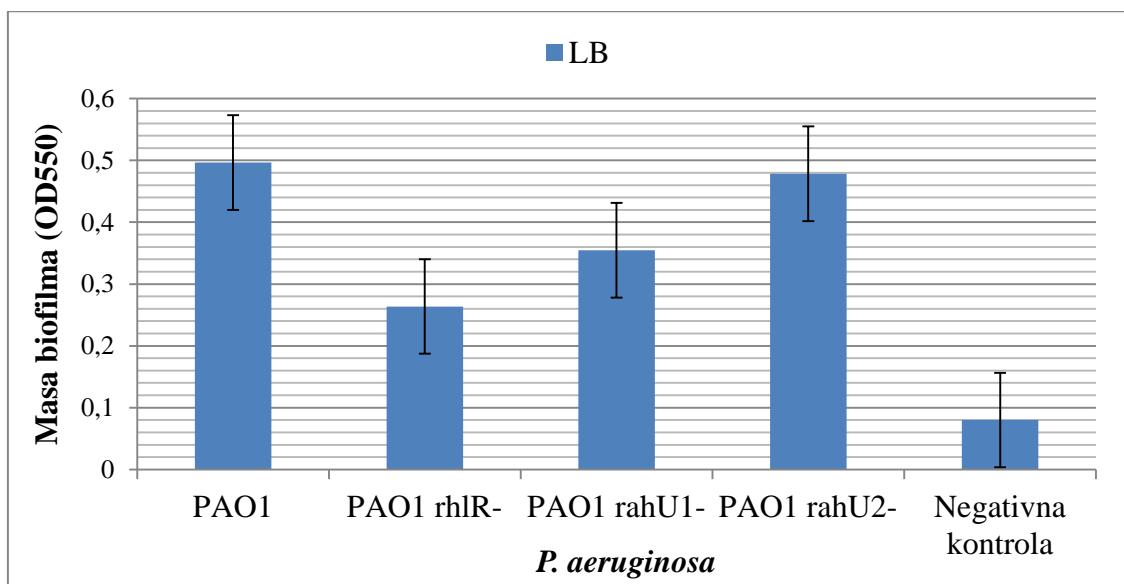
4.1 VPLIV RahU NA KOLIČINO NASTALEGA BIOFILMA BAKTERIJE

P. aeruginosa

4.1.1 Mutacija gena *rahU* ne vpliva na količino nastalega biofilma bakterije

P. aeruginosa

Pri meritvah in analizi razlik med biološkimi ponovitvami istega seva nismo zabeležili statistično značilne razlike ($P=0,5$) v nobenem od poskusov v mikrotitrskih ploščicah in smo jih zato povprečili skupaj (Slika 22).



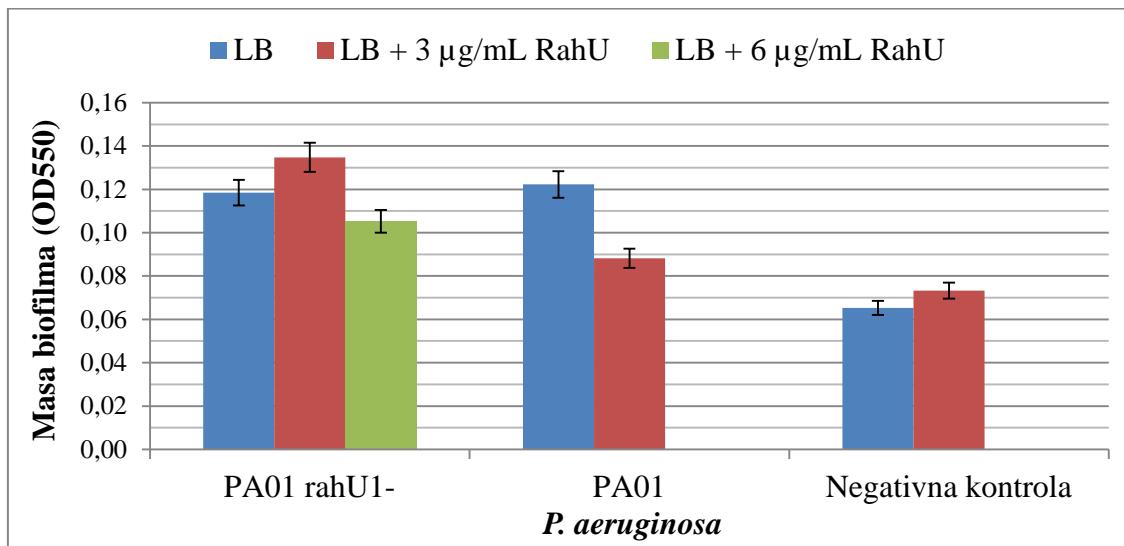
Slika 22 : Količina nastalega biofilma različnih sevov *P. aeruginosa*, gojenih pri 30 °C za 1 dan.

Rezultati Studentovega t.testa (dvosmerni, homogeny variance):

- Pri sevu PAO1 *rhlR* nastane statistično značilno manj biofilma, napram tvorbi biofilma v sevih PAO1, PAO1 *rahU1* in PAO1 *rahU2* ($P=0,005$).
- Izmerjena vrednost OD₅₅₀ negativne kontrole (nenacepljeno gojišče) je statistično značilno manjša od izmerjene vrednosti OD₅₅₀ gojišč z nacepljenimi sevi ($P=0,005$).
- Med količino nastalega biofilma seva PAO1 in mutantama *rahU* (PAO1 *rahU1*, PAO1 *rahU2*) ni statistično značilne razlike ($P=0,005$).

4.1.2 Dodatek RahU vpliva na količino nastalega biofilma bakterije *P. aeruginosa*

Ker nismo zabeležili vpliva prekinjenega gena *rahU*, smo dodajali protein RahU v gojišče in opazovali, ali pride do statistično značilne razlike v količini nastalega biofilma med sevi, ki smo jim dodali protein RahU, in tistimi ki jim ga nismo dodali (Slika 23).



Slika 23: Količina nastalega biofilma sevov *P. aeruginosa* PAO1 in PAO1 rahU1- ob dodatku proteina RahU, gojenih pri 30 °C za 1 dan.

Rezultati Studentovega t.testa (dvosmerni, homogeneity variance):

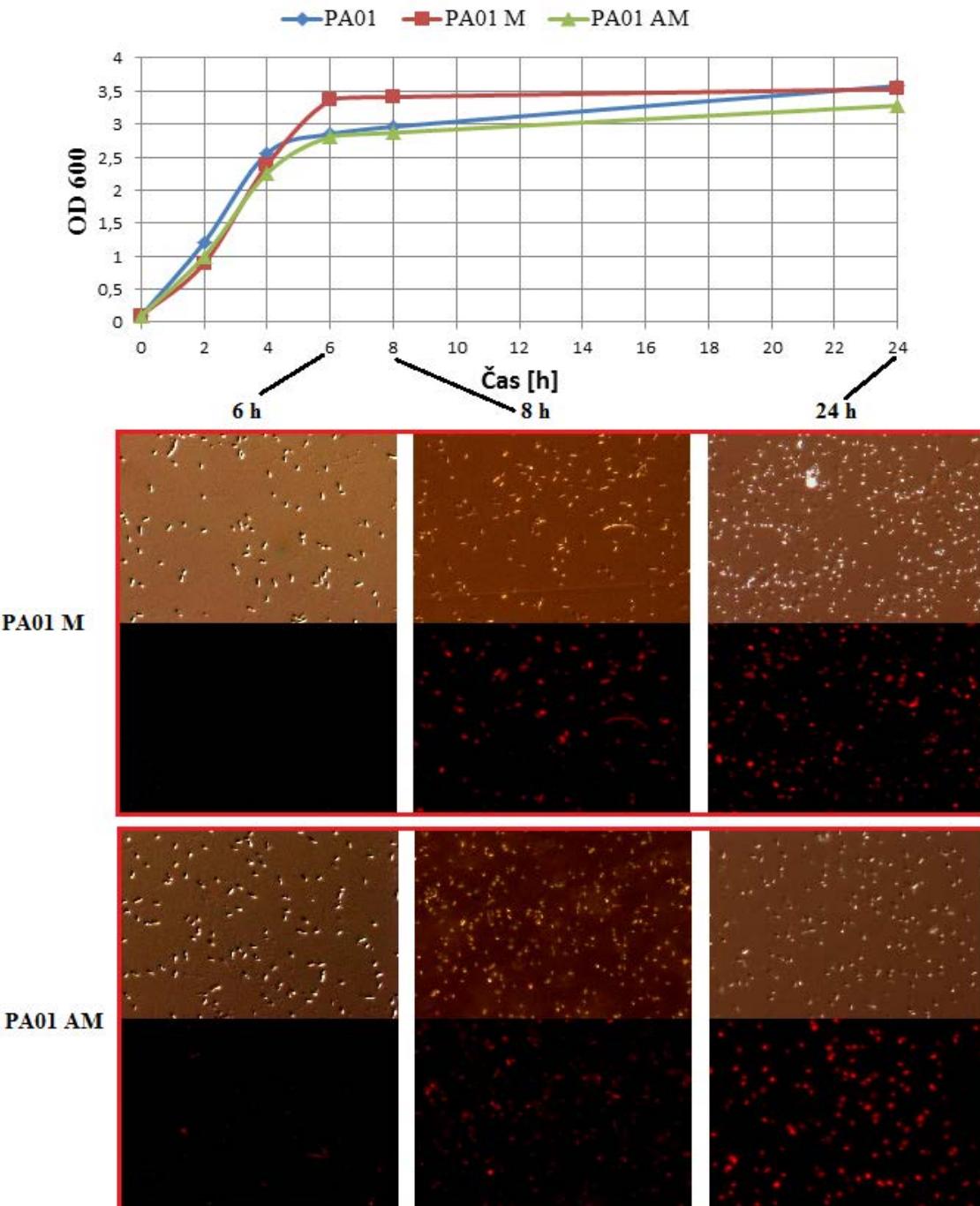
- Dodatek 3 µg/mL RahU k sevu PAO1 statistično značilno zmanjša količino nastalega biofilma ($P=0,005$).
- Dodatek 3 µg/mL RahU ali 6µg/mL RahU k sevu PAO1 *rahU1* statistično značilno ne zmanjša količine nastalega biofilma ($P=0,005$).
- Izmerjena vrednost OD₅₅₀ negativne kontrole (nenacepljeno gojišče) z dodatkom RahU ali brez njega je statistično značilno manjša od izmerjene vrednosti OD₅₅₀ gojišč z nacepljenimi sevi ($P=0,005$).

4.2 IZRAŽANJE, SINTEZA IN LOKALIZACIJA RahU V BIOFILMU

Nukleotidno zaporedje izdelanih plazmidnih konstruktorjev pLP170-*rahU-mCherry* in pLP170-*paProm-mCherry* ne vsebuje mutacij, ki bi spremenile delovanje teh dveh sistemov (Priloga F).

4.2.1 Plazmidni konstrukti pLP170-rahU-mCherry in pLP170-paProm-mCherry potrjujejo odvisnost izražanja rahU od faze rasti oziroma celične gostote

Aktivnost promotorja gena *rahU* (*paProm*) je odvisna od celične gostote (Slika 24).



Slika 24: Prikaz rastne krivulje planktonsko gojenega seva *P. aeruginosa* PAO1 in njegovih transformant PAO1 M in PAO1 AM ter pojav rdeče fluorescence (AF546) zaradi sinteze poročevalskega proteina mCherry (PAO1 M) ali RahU-mCherry (PAO1 AM) v odvisnosti od faze rasti oziroma celične gostote, mikroskopska slika (400-kratna povečava).

Opazimo:

- Odsotnost fluorescence seva PAO1 v vseh časih vzorčenja.
- Odsotnost fluorescence transformant PAO1 M in PAO1 AM pred stacionarno fazo rasti.
- Pojav rdeče fluorescence pri transformantah PAO1 M in PAO1 AM ob prehodu v stacionarno fazo rasti, ki se ohrani in ojači do zadnjega vzorčenja ob 24 h.

V Preglednici 6 je prikazano število in odstotek fluorescirajočih celic iz Slike 24 po času.

Preglednica 6: Prikaz števila in odstotek fluorescirajočih celic *P. aeruginosa* PAO1 M (mCherry), PAO1 AM (RahU-mCherry) gojenih planktonsko v odvisnosti od faze rasti.

Transformanta <i>P. aeruginosa</i>	Čas [h]	DIC [N]	Fluorescencija [N]	Fluorescencija [%]	Nefluorescencija [%]
PAO1 M	4	2884	0	0	100
	6	6523	0	0	100
	8	7877	5352	68	32
	24	7255	5104	70	30
PAO1 AM	4	3405	0	0	100
	6	5678	0	0	100
	8	7375	4305	58	42
	24	3909	3300	84	16

Opazimo:

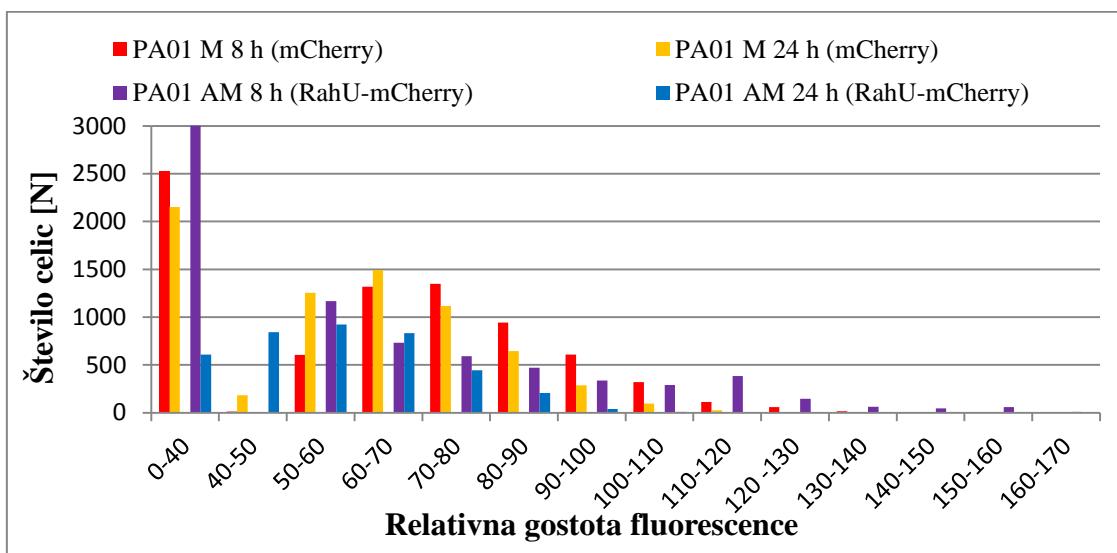
- V povprečju po 8 in 24 urah planktonske rasti (PAO1 M in PAO1 AM) sveti 70 % celic.

4.2.2 Vpliv mikroskopske tehnike na dobljene rezultate

Za ugotovitev neodvisnosti rezultatov različnih vzorcev pri mikroskopiranju smo primerjali razporeditev relativne intenzitete fluorescence med njimi (Slika 25).

Opazimo:

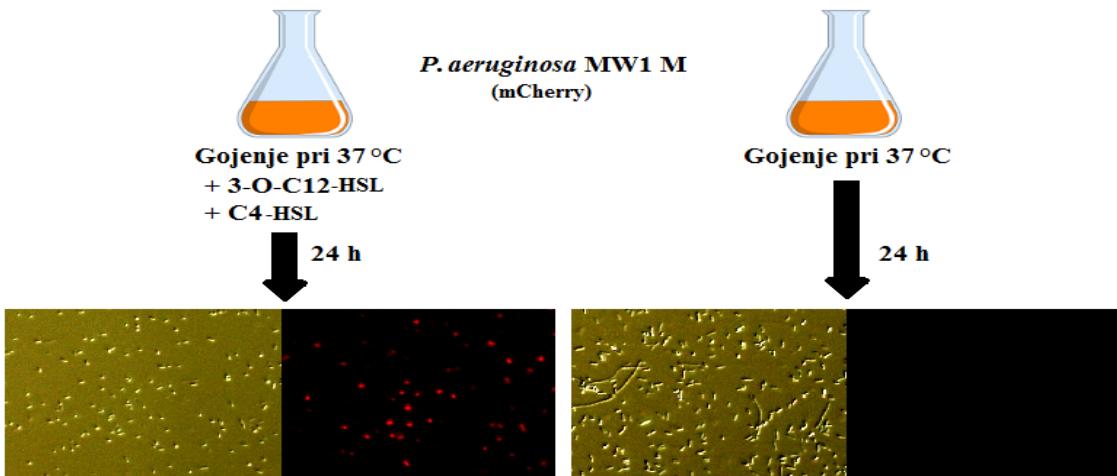
- Mikroskopiranje in priprava mikroskopskih preparatov ne vpliva na rezultate mikroskopiranja, saj je porazdelitev relativne intenzitete fluorescence podobna.



Slika 25: Odvisnost rezultatov mikroskopije od mikroskopske tehnike, prikazana s porazdelitvijo relativne gostote fluorescence (AF546) PAO1 M (mCherry), PAO1 AM (RahU-mCherry). Relativna gostota fluorescence pod 40 je šteta kot nefluorescencija (pod to mejo ni vidnih rdeče fluorescirajočih celic).

4.2.3 Odvisnost izražanja *rahU* od Las in Rhl sistema

Dodatek signalov AHL vpliva na aktivnost promotorja *rahU* (*paProm*) (Slika 26).



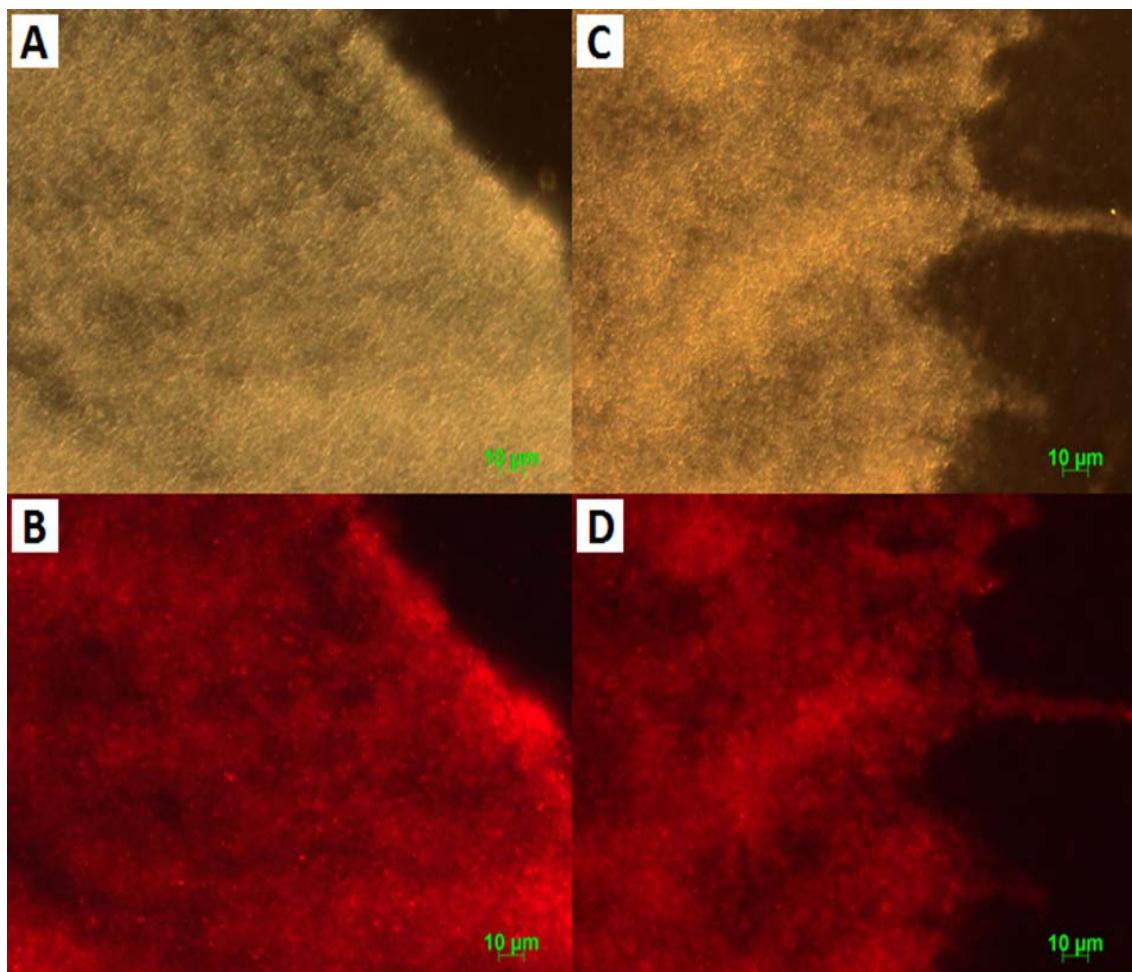
Slika 26: Pojav poročevalskega proteina mCherry v odvisnosti od dodatka 3-O-C12-HSL in C4-HSL k planktonsko gojeni transformanti MW1 M (mCherry), mikroskopska slika (400-kratna povečava).

Opazimo:

- Pojav rdeče fluorescence ob dodatku 3-O-C12-HSL in C4-HSL k plankotnsko gojeni transformanti MW1 M (enako zabeleženo pri transformanti MW1 AM)
- Odsotnost rdeče fluorescence pri planktonsko gojenji transformanti MW1 M, brez dodatka 3-O-C12-HSL in C4-HSL (enako zabeleženo pri transformanti MW1 AM).

4.2.4 Izražanje *rahU* in sinteza RahU v biofilmu

Na Sliki 27 so prikazane mikroskopske slike biofilma celic, v katerih smo spremajali aktivnost promotorja *rahU* (*paProm*) preko poročevalskega proteina mCherry in RahU sklopljenega z mCherry. Nismo opazili ralzike med biofilmi starih 1, 2 ali 3 dni.



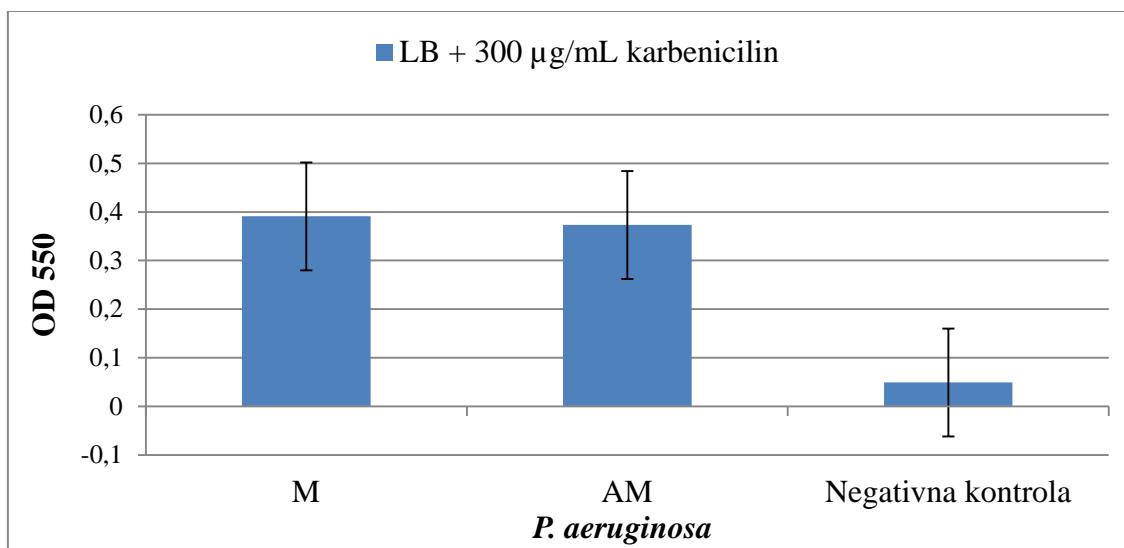
Slika 27: Aktivnost promotorja *rahU* (*paProm*), izražena kot sinteza poročevalskega proteina mCherry (PAO1 M) in RahU-mCherry (PAO1 AM) v biofilmu, mikroskopska slika (400-kratna povečava). A) DIC PAO1 M; B) AF546 PAO1 M; C) DIC PAO1 AM; D) AF546 PAO1 AM.

Opazimo:

- Po celotnem biofilmu je izražen promotor gena *rahU* (*paProm*) iz obeh plazmidnih konstruktov, saj je prisotna rdeča fluorescencija zaradi sinteze mCherry oziroma RahU-mCherry
- Ojačana je rdeča fluorescencija na lokacijah višje celične gostote.

4.2.5 Vpliv sinteze RahU-mCherry, prisotnega povsod v biofilmu, na količino nastalega biofilma

Zaradi prisotnosti RahU-mCherry povsod v biofilmu (Slika 26D) smo primerjali količino nastalega biofilma pri transformanti PAO1 M, pri kateri promotor gena *rahU* (*paProm*) vodi prepis poročevalskega gena ter pri transformanti PAO1 AM, pri kateri *rahU* (*paProm*) promotor nadzira prepis gena *rahU*, sklopljenega s poročevalskim genom za mCherry (Slika 28).



Slika 28: Količina nastalega biofilma transformant *P. aeruginosa* PAO1 M (mCherry) in PAO1 AM (RahU-mCherry), gojenih pri 30 °C za 1 dan.

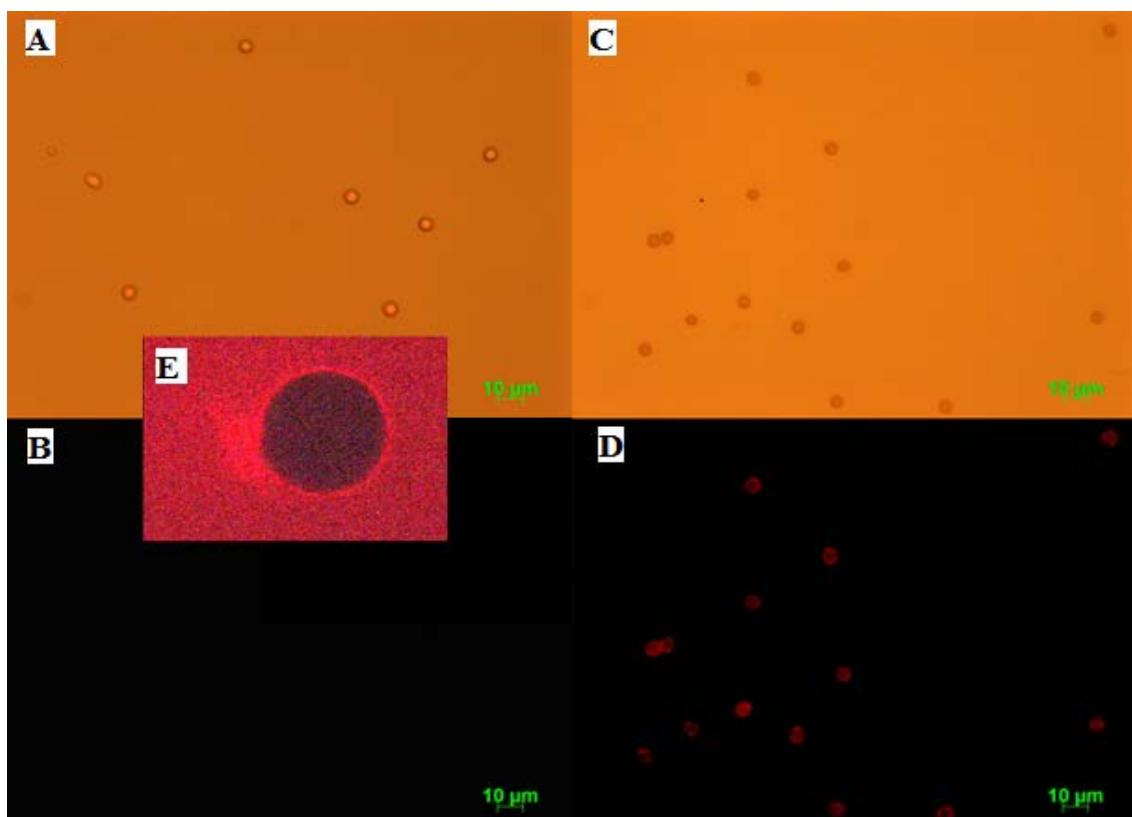
Rezultati Studentovega t.tesa (dvosmerni, homogeneity variance):

- Ni statistično značilne razlike v količini nastalega biofilma transformant PAO1 M in PAO1 AM ($P=0,005$).
- Izmerjena vrednost OD₅₅₀ negativne kontrole (nenacepljeno gojišče) je statistično značilno manjša od OD₅₅₀ vrednosti, izmerjene pri transformantah PAO1 M in PAO1 AM ($P=0,005$).

4.3 PREVERJANJE VEZAVE RahU-mCherry Z ERITROCITI

Ker RahU uvrščamo med egerolizine, ki specifično interagirajo z lipidi (npr. OlyA z membranskimi rafti), smo testirali vezavo RahU (RahU-mCherry) na goveje eritrocite.

Pri tem smo kot produkcijsko bakterijo uporabili transformanto MW1 AM, za katero smo dokazali, da je produkcija RahU-mCherry sprožena z dodatkom AHL. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili očiščen rekombinantni egerolizin OlyA-mCherry iz glive *P. ostreatus* (Slika 29).



Slika 29: Prikaz vezave egerolizinov RahU-mCherry in OlyA-mCherry z eritrociti, mikroskopska slika (400-kratna povečava). A) DIC Eritrociti, inkubirani z RahU-mCherry; B) AF546 Eritrociti, inkubirani z RahU-mCherry; C) DIC Eritrociti, inkubirani z OlyA-mCherry; D) AF546 Eritrociti, inkubirani z OlyA-mCherry; E) Prikaz eritrocita v ekstraktu Rahu-MCherry (pred spiranjem).

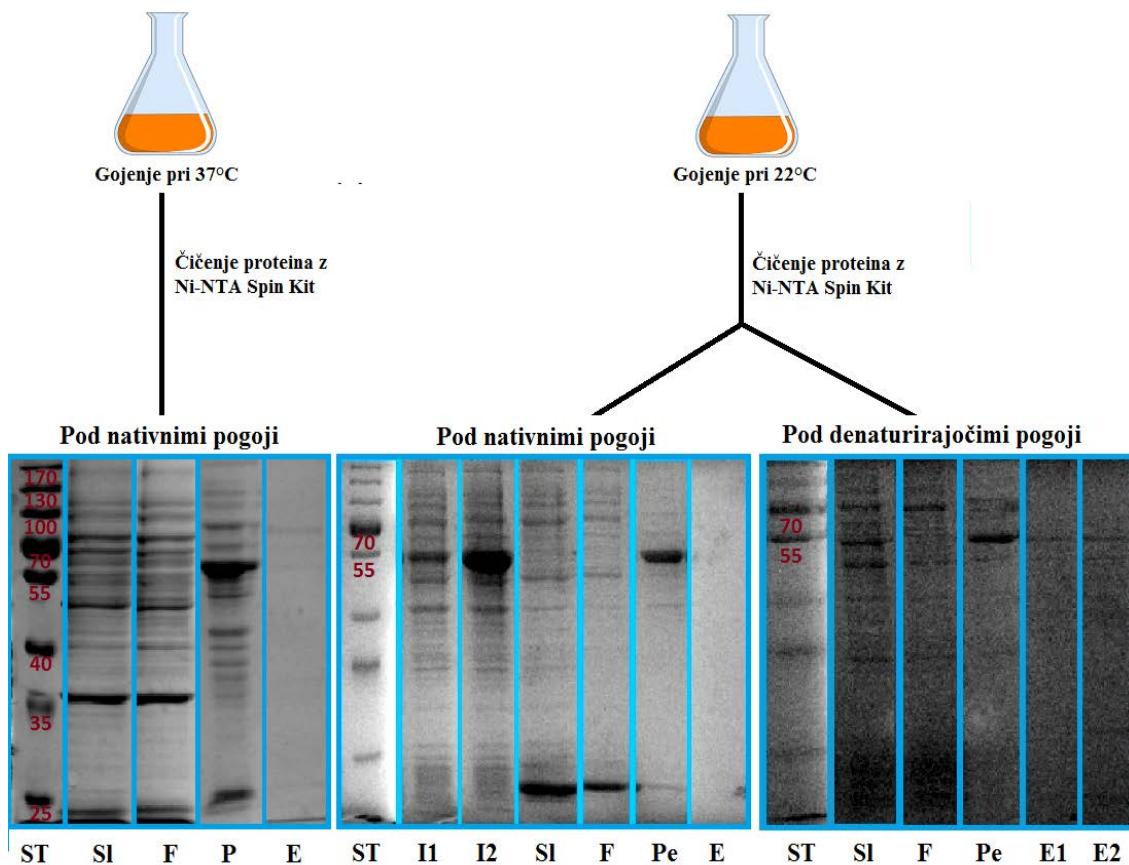
Opazimo:

- V nasprotju z OlyA-mCherry RahU-mCherry ne interagira z eritrociti.
- Proteina RahU-mCherry je za detekcijo pod epifluorescenčnim mikroskopom dovolj (rdeča fluorescensa okrog eritrocita (E)).

4.4 PRIDOBIVANJE TOPNEGA OČIŠČENEGA eGFP-RhlR

4.4.1 Pridobivanje topnega očiščenega eGFP-RhlR s kitom Ni-NTA Spin Kit in Ni-NTA kromatografijo

Rezultate čiščenja eGFP-RhlR s kitom Ni-NTA Spin Kit prikazuje Slika 30.



Slika 30: Čiščenje eGFP-RhlR s kitom Ni-NTA Spin Kit pri različnih razmerah gojenja in čiščenja. Oznake: ST) PageRuler Prestained Protein Ladder; SI) supernatant centrifugiranja celičnega lizata (3. korak v protokolu); F) pretok (angl.: flow trough) nanosa supernatanta celičnega lizata na kolono (5. korak v protokolu); Pe) celični pelet centrifugiranja celičnega lizata (3. korak v protokolu); E) elucijska frakcija (7. korak v protokolu za nativne razmere, 8. korak v protokolu za denaturirajoče razmere); I1) celični pelet pred indukcijo z IPTG; I2) celični pelet po indukciji z IPTG.

Opazimo:

- Z dodatkom IPTG smo uspeli inducirati izražanje in sintezo proteina eGFP-Rhl (v frakciji I2 debelejša lisa kot v frakciji I1, lisa je primerne velikosti med 70 in 55 kDa).
- Pri nativnih razmerah (37 °C in 22 °C) nismo uspeli pridobiti topnega proteina (lisne v frakcijah SI, F ali E).

- Pri denaturirajočih razmerah (22 °C) pridobimo topen denaturiran protein iz inkluzijskih teles (prisoten v frakciji S1).
- Pri denaturirajočih razmerah (22 °C) se je protein vezal na kolono (ni lise v frakciji F). Majhna količina očiščenega proteina se je sprala s kolone z elucijo (lisa prisotna v frakciji E1 in E2).

Sklepamo, da je količina proteina v elucijski frakciji pri denaturirajočih razmerah (22 °C) zaradi izgub pri potrebnem ponovnem pravilnem zvitju proteina v nativno obliko premajhna za nadaljnje analize. Poleg tega lahko zaključimo, da sklopljeni protein eGFP ne vpliva pomembno na topnost RhlR, saj so rezultati pridobivanja topnega čistega eGFP-RhlR s proteinsko ekstrakcijo pri nativnih in denaturirajočih razmerah in čiščenjem z Ni-NTA kromatografijo prav tako negativni, oziroma nismo uspeli dobiti proteina v elucijski frakciji pri nativnih razmerah. Pri denaturirajočih razmerah pa razvit protein ob renaturaciji oziroma ponovnem zvitju nazaj agregira v inkluzijska telesa.

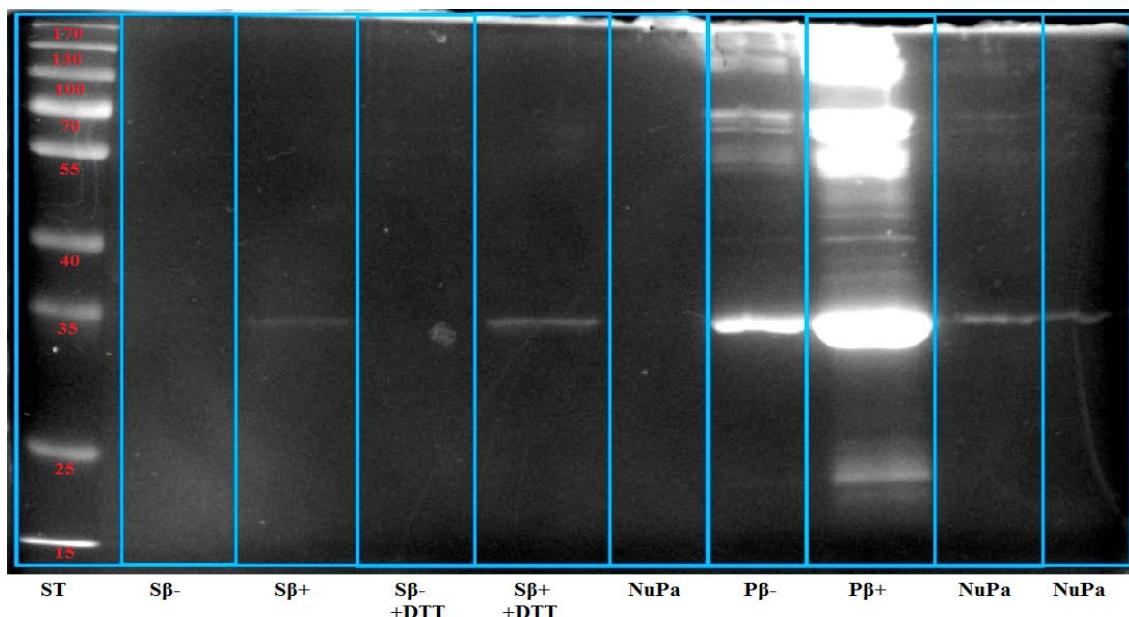
4.4.2 Vpliv razmer gojenja in indukcije z IPTG na topnost eGFP-RhlR

Noben od načinov sinteze proteina ni doprinesel supernatanta, ki bi svetil zaradi prisotnosti eGFP-RhlR, temveč je svetil (zeleno fluoresciral) le celični pelet.

4.5 PRIDOBIVANJE TOPNEGA OČIŠČENEGA RhlR

4.5.1 Pridobivanje topnega očiščenega proteina RhlR z 2DR in Ni-NTA kromatografijo

Zgoraj navedeni rezultati so nakazali na problem denaturacije inkluzijskih teles pri ekstrakciji in čiščenju proteina RhlR (eGFP-RhlR), zato smo posledično za čiščenje proteina RhlR uporabili dodatnen korak denaturacije inkluzijskih teles (Slika 31).



Slika 31: NaDS-PAGE, prikaz topnosti proteina RhlR, pridobljenega iz inkluzijskih teles z 2DR. Oznake: ST) PageRuler Prestained Protein Ladder; β -) brez β -merkaptoetanola; β +) z β -merkaptoetanolom; +DTT) dodatek DTT pri nalaganju na NaDS-PAGE; S) supernatant po končnem centrifugiraju; P) usedlina inkluzijskih teles po končnem centrifugiraju; NuPA) Nanašalni pufer za NaDS-PAGE (2x).

Opazimo:

- Pri renaturaciji v Pufru za renaturacijo + β (pH 8) dobimo topen protein RhlR (oznake S β + in S β + DTT+).

Pri čiščenju dobljenega topnega proteina RhlR iz 2DR postopka z Ni-NTA kromatografijo nismo dobili očiščenega RhlR v elucijski frakciji.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Kot je prikazano na Sliki 22, »nedelovanje« gena *rahU* v primerjavi z rezultati Rao in sodelavcev (2011a) (Slika 14) ne zveča količino nastalega biofilma. Treba je upoštevati, da uporabljeni metodi in mutante *rahU* niso enake. Napram poskusu Rao in sodelavcev (2011a) smo zaradi variabilnosti postavitev epruvet in s tem vpliva na površino zračno vodne interfaze, kjer zraste biofilm, biofilme gojili v mikrotitrskih ploščah, kjer pa je volumen gojišča manjši. Zmanjšan volumen ima lahko za posledico nerazločljivost majhnih razlik v količini nastalega biofilma, ki so bolje vidne na večjih skalah. Kot je razvidno iz Slike 22, z našim testom zaznamo statistično značilno spremembo v količini nastalega biofilma med sevom *P. aeruginosa* z okvarjenim sistemom Rhl (PAO1 *rhlR*), ki vpliva oziroma uravnava količino nastalega biofilma, in divjim tipom PAO1 ($p=0,005$). Naš test ima torej dovoljšno resolucijo, da zaznamo spremembe v količini biofilma. Drugi vidik so uporabljeni sevi, ki niso bili enaki kot sevi, uporabljeni v raziskavi Rao, DiGiandomenica in sodelavcev (2011). Mutante *rahU*, ki smo jih uporabili mi, podrobnejše obrazložene na Slikah 15 in 16, imajo vstavitev v genu *rahU*, ki povzroči sintezo spremenjenega, okrajšanega RahU z vključkom proti koncu polipeptidne verige. Slednje nakazuje, da bi protein lahko ohranil vsaj del svoje aktivnosti.

Kot omenjeno v pregledu objav, so protein RahU detektirali zunaj celice in v matriksu biofilma, s tem pa je nakazano njegovo delovanje zunaj celice. Kot prikazano na Sliki 23, smo z zunanjim dodatkom RahU zmanjšali količino biofilma pri PAO1, ne pa tudi pri PAO1 *rahU*⁻, tudi ob dvakrat večji koncentraciji proteina. Rezultati so torej dvoumni, vendar nakazujejo potencialno vlogo RahU pri količini nastalega biofilma. Treba je upoštevati, da ne poznamo razgradnje dodanega RahU v gojišču ali razgradnje z strani bakterije. Na podlagi opisanega ne moremo potrditi ali ovreči prve hipoteze.

Za sledenje izražanja, sinteze ter lokalizacije RahU v biofilmu bakterije *P. aeruginosa* je bilo treba preveriti, ali sta izražanje in sinteza mCherry in RahU-mCherry iz pripravljenih plazmidnih konstruktov (pLP170-*paProm-mCherry* in pLP170-*rahU*-

mCherry) v *P. aeruginosa* podobna kot za RahU v *P. aeruginosa*, oziroma, ali je obnašanje promotorja *paProm* v uporabljenih plazmidnih konstruktih podobno kot opisano za *paProm* PAO1 divjega tipa. S sledenjem fluorescence tako mCherry kot RahU-mCherry smo v raziskavo vključili konstrukt za testiranje uravnavanja izražanja *rahU* na transkripcijskem in potranskripcijskem nivoju. Kot razvidno iz Slike 24, je izražanje *rahU* iz plazmidnih konstruktov primerljivo z izražanjem *rahU* v PAO1 divjem tipu in se vklopi v stacionarni fazi rasti celic. Dodatno, kot prikazano na Sliki 26, je ta fluorescencija odvisna od dodatka 3-O-C12-HSL in C4-HSL k transformanti seva, ki ne more proizvajati teh signalov (MW1). Tako je specifično odvisna od sistemov Las in Rhl, za katera študije, omenjene v pregledu objav kažejo, da uravnavata gen *rahU*. Iz povedanega sledi, da so bili plazmidni konstrukti primerni za nadaljnjo analizo. Pri pregledu Slike 26 je razvidno, da so izražanje, sinteza in lokalizacija RahU-mCherry povezani z nastankom biofilma, kjer so prisotni povsod v biofilmu, ter niso omejeni samo na določene dele v biofilmu. S tem potrdimo drugo hipotezo.

Iz Slike 28 vidimo, da ni razlik v količini nastalega biofilma PAO1 M, ki izraža samo mCherry in PAO1 AM, ki izraža RahU-mCherry, kar dodatno nakazuje, da iz plazmida prekomerno sintetizirani RahU ne vpliva na količino nastalega biofilma. Treba je upoštevati, da ne vemo, ali RahU s sklopitvijo z mCherry ostane aktivен. Z dodatnim poskusom vezave RahU-mCherry na eritrocitne membrane smo preverili tudi možnost, da bi se kot določeni drugi egerolizini vezal na te membrane. Kot je razvidno iz Slike 29, se RahU-mCherry v nasprotju s pozitivno kontrolo ne veže na eritrocitne membrane. Zadostno količino sintetiziranega RahU-mCherry za analizo z uporabljenim epifluorescenčnim mikroskopom prikazuje Slika 28 (E), ki ponazarja okolico eritrocita, prežeto z RahU-mCherry. Na podlagi povedanega ovržemo tretjo hipotezo.

Kot je omenjeno v pregledu objav, so Ventre in sodelavci (2003) ob sklopitvi RhlR z eGFP pridobili topen protein, ki ob pregledu celičnih lizatov celic ne agregira v inkluzijska telesca v celicah *E. coli* BL21 (DE3). Podobno smo uporabili protein RhlR, ki ima na N-terminalnem koncu eGFP z histidinsko oznako, ga izrazili, a nismo uspeli pridobiti topnega eGFP-RhlR, kot prikazuje Slika 30 (Ni-NTA Spin Kit) in rezultati Ni-NTA kromatografije. Tako sklepamo, da fuzija eGFP z RhlR ne izboljša topnosti, ki bi bila primerna za izolacijo proteina. Na podlagi rezultatov, prikazanih na Sliki 31,

zaključimo, da je na topnost RhlR vplivala dvojna denaturacija inkluzijskih teles, saj smo s to metodo uspeli pridobiti topen protein RhlR v nizki koncentraciji. Slednje omogoča razvoj metode, ki bi omogočila izolacijo RhlR v višjih koncentracijah.

5.2 SKLEPI

- Nismo potrdili prve hipoteze, v kateri smo predpostavili, da RahU vpliva na količino nastalega biofilma bakterije *P.aeruginosa*, saj nismo opazili vpliva na količino nastalega biofilma pri uporabljenih *rahU* mutantah. Prav tako je nismo ovrgli, saj smo z dodatkom proteina RahU k sevu *P. aeruginosa* PAO1 vplivali na značilno zmanjšanje količine nastalega biofilma.
- V biofilmu rastoče bakterije *P. aeruginosa* uniformno izražajo gen *rahU* in sintetizirajo protein RahU.
- Protein RahU-mCherry ne interagira z membranami govejih eritrocitov.
- Topnost proteina RhlR se ne izboljša ob spojitvi proteina z eGFP na N-terminalnem koncu. Raziskave nakazujejo pomembnost večkratne denaturacije inkluzijskih teles za pridobitev zadostne koncentracije topnega in predvidoma aktivnega proteina RhlR.

6 POVZETEK

Protein RahU bakterije *P. aeruginosa* je bil odkrit v kliničnih izolatih leta 2008. Pri bakteriji ima zabeležen vpliv na količino nastalega biofilma, saj naj bi *rahU* mutante tvorile več biofilma. Ker je ta lastnost slabo raziskana, smo z namenom večje jasnosti podrobnejše analizirali vpliv proteina RahU na količino biofilma. Količino smo izmerili z barvanjem s kristal vijoličnim in merjenjem OD₅₅₀. Zaradi vprašljive ustreznosti uporabljenih sevov (*rahU* mutant) ne moremo potrditi predhodnih raziskav, a ugotovimo, da pri določenih sevih *P. aeruginosa* dodatek proteina RahU v gojišče značilno zmanjša tvorbo biofilma. Rezultati so torej dvoumni in ne moremo potrditi ali ovreči vpliva RahU na tvorbo biofilma. Nadalje z uporabo plazmidnih konstruktov z zapisom oziroma kodirajočim zaporedjem za protein mCherry in RahU-mCherry, pod kontrolo promotorja gena *rahU*, *paProm*, lahko spremljamo izražanje rahU in sintezo RahU z epifluorescenčnim mikroskopom. Pri tem dokažemo, da se protein uniformno sintetizira v biofilmu, na kar direktno vplivajo komponente sistema zaznavanja celične gostote. Prav tako pri inkubaciji govejih eritrocitov s celičnim ekstraktom bakterije *P. aeruginosa*, ki proizvaja RahU-mCherry, ne zaznamo fluorescence eritrocitov, ki bi naznanila vezavo RahU-mCherry, medtem ko je to možno zaslediti pri egerolizinu OlyA (OlyA-mCherry), za katerega je znano, da se veže na lipidne membrane. Pri pridobivanju topne oblike ključnega transkripcijskega faktorja RhlR sklopitev z zelenim fluorescenčnim proteinom eGFP ter uporaba proteinske ekstrakcije in Ni-NTA kromatografije ne izboljšata topnosti tega transkripcijskega faktorja. Pri nativnih razmerah ekstrakcije ga nismo pridobili iz celic oziroma inkluzijskih teles. Pri denaturirajočih razmerah ekstrakcije pa je slednje možno, vendar so količine premajhne in pri ponovnem zvitju protein agregira nazaj v inkluzijska telesca. Ugotovimo pa, da je z metodo dvojne denaturacije inkluzijskih teles RhlR možno izboljšati topnost. Študija tako omogoči usmeritev nadaljnjih raziskav za pridobitev višjih koncentracij topnega proteina RhlR za preučitev direktne interakcije RhlR s promotorskim področjem gena *rahU*.

7 VIRI

- Aguirre-Ramírez M., Medina G., González-Valdez A., Grossó-Becerra V., Soberón-Chávez G. 2012. The *Pseudomonas aeruginosa* rmlBDAC operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhlR and the alternative sigma factor σS. *Microbiology* (Reading, England), 158, 4: 908–916
- Al-Deen I.H., Twaij H.A., Al-Badr A.A., Istarabadi T.A. 1987. Toxicologic and histopathologic studies of *Pleurotus ostreatus* mushroom in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 21, 3: 297-305
- Alkawash M. A., Soothill J. S., Schiller N. L. 2006. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *APMIS: Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 114, 2: 131–138
- Avanti Polar Lipids. 2014. Products: Phospholipids. Alabaster, Avanti Polar Lipids, Inc: 1 str.
https://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=100&Itemid=108 (Jan, 2015)
- Barloy F., Lecadet M. M., Delécluse A. 1998. Cloning and sequencing of three new putative toxin genes from *Clostridium bifermentans* CH18. *Gene*, 211: 293–299
- Barken K. B., Pamp S. J., Yang L., Gjermansen M., Bertrand J. J., Klausen M., Givskov M., Whitchurch C. B., Engel J. N., Tolker-Nielsen T. 2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 10, 9: 2331–2343
- Bailey J., Manoil C. 2002. Genome-wide internal tagging of bacterial exported proteins. *Nature Biotechnology*, 20: 839-841
- Berne S., Križaj I., Pohleven F., Turk T., Maček P., Sepčić K. 2002. *Pleurotus* and *Agrocybe* hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1570, 3: 153–159
- Berne S., Lah L., Sepčić K. 2009. Aegerolysins: Structure, function, and putative biological role. *Protein Science*, 18, 4: 694–706

- Berne S., Pohleven J., Vidic I., Rebolj K., Pohleven F., Turk T., Sepčić K. 2007. Ostreolysin enhances fruiting initiation in the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Mycological Research*, 111, Pt 12: 1431–1436
- Bluml S., Kirchberger S., Bochkov V. N., Kronke G., Stuhlmeier K., Majdic O., Knapp W., Binder B. R., Stöckl J., Zlabinger G. J., Leitinger N. 2005. Oxidized phospholipids negatively regulate dendritic cell maturation induced by TLRs and CD40. *Journal of Immunology*, 175, 1: 501–508
- Bottomley M. J., Muraglia E., Bazzo R., Carfi A. 2007. Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 18: 13592–13600
- Chugani S., Greenberg E. P. 2014. An evolving perspective on the *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum sensing regulator QscR. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4: 152, doi: 10.3389/fcimb.2014.00152: 7 str.
- Churchill M. E. A., Chen L. 2011. Structural basis of acyl-homoserinelactone-dependent signaling. *Chemical Reviews*, 111, 1: 68–85
- Colmer J. A. 1997. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene, *ptxR*, which positively regulates exotoxin A production. A Dissertation in Medical Microbiology. Texas, Texas Tech University Health Sciences Center: 190 str.
- Davey M. E., Caiazza N. C., O'Toole G. A. 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 185, 3: 1027–1036
- Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglesias B. H., Costerton J. W., Greenberg E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280, 5361: 295–298
- Dekimpe V., Deziel E. 2009. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology*, 155, 3: 712–723
- Duan K., Surette, M. G. 2007. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *Journal of Bacteriology*, 189, 13: 4827–4836

- Favre-Bonte S., Köhler T., Delden C. V. 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 4: 598–604
- Finn R. D., Bateman A., Clements J., Coggill P., Eberhardt R. Y., Eddy S. R., Heger A., Hetherington K., Holm L., Mistry J., Sonnhammer E. L. L., Tate J., Punta M. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research*, 42, D1: D222–D230, doi: 10.1093/nar/gkt1223: 9 str.
- Firoved A. M., Deretic V. 2003. Microarray analysis of global gene expression in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 185, 3: 1071–1081
- Flemming H.-C., Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 623–633
- Ghafoor A., Hay I. D., Rehm B. H. A. 2011. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 15: 5238–5246
- Gilbert K. B., Kim T. H., Gupta R., Greenberg E. P., Schuster M. 2009. Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Molecular Microbiology*, 73, 6: 1072–1085
- Hanna S. L., Sherman N. E., Kinter M. T., Goldberg J. B. 2000. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microbiology (Reading, England)*, 146, Pt 10: 2495–2508
- Hare N. J., Solis N., Harmer C., Marzook N. B., Rose B., Harbour C., Crosset B., Manos J., Cordwell S. J. 2012. Proteomic profiling of *Pseudomonas aeruginosa* AES-1R, PAO1 and PA14 reveals potential virulence determinants associated with a transmissible cystic fibrosis-associated strain. *BMC Microbiology*, 12, 1: 16, doi:10.1186/1471-2180-12-16: 14 str.
- Harmsen M., Yang L., Pamp S. J., Tolker-Nielsen T. 2010. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal: *P. aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59, 3: 253–268

- Hentzer M., Teitzel G. M., Balzer G. J., Heydorn A., Molin S., Givskov M., Parsek M. R. 2001. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *Journal of Bacteriology*, 183, 18: 5395–5401
- Hohl T. M., Feldmesser M. 2007. *Aspergillus fumigatus*: Principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryotic Cell*, 6, 11: 1953–1963
- Jacobs M. A., Alwood A., Thaipisuttikul I., Spencer D., Haugen E., Ernst S., Will O., Kaul R., Raymond C., Levy R., Chun-Rong L., Guenthner D., Bovee D., Olson M. V., Manoil C. 2003. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 24: 14339–14344
- Jayaraman A., Wood T. K. 2008. Bacterial quorum sensing: Signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 10, 1: 145–167
- Karatan E., Watnick P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, 2: 310–347
- Kjelleberg S., Givskov M. 2007. The biofilm mode of life. V: The biofilm mode of life: Mechanisms and adaptations. Kjelleberg S., Givskov M. (eds.). 6th ed. Wymondham, Horizon Bioscience: 5–21
- Klausen M., Heydorn A., Ragas P., Lambertsen L., Aaes-Jørgensen A., Molin S., Tolker-Nielsen T. 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants: Roles of bacterial motility in the formation of the flat *P. aeruginosa* biofilm. *Molecular Microbiology*, 48, 6: 1511–1524
- Krishnapillai, V., Morgan, A. 1980. Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiological Reviews*, 43: 73–102
- Kudo Y., Ootani T., Kumagai T., Fukuchi Y., Ebin K., Yokota K. 2002. A novel oxidized low-density lipoprotein-binding protein, Asp-hemolysin, recognizes lysophosphatidylcholine. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25, 6: 787–790
- Kulkarni P. R., Jia T., Kuehne S. A., Kerkering T. M., Morris E. R., Searle, M. S., Heeb S., Rao J., Kulkarni R. V. 2014. A sequence-based approach for prediction of

- CsrA/RsmA targets in bacteria with experimental validation in *Pseudomonas aeruginosa*. Nucleic Acids Research, 42, 11: 6811–6825
- Lamb J. R., Patel H., Montminy T., Wagner V. E., Iglewski B. H. 2003. Functional domains of the RhlR transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology, 185, 24: 7129–7139
- Latifi A., Foglino M., Tanaka K., Williams P. Lazdunski A. 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. Molecular Microbiology, 21: 1137–1146
- Laux D. C., Corson J. M., Givskov M., Hentzer M., Møller A., Wosencroft K. A., Cohen P. S. 2002. Lysophosphatidic acid inhibition of the accumulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 alginate, pyoverdin, elastase and LasA. Microbiology, 148, 6: 1709–1723
- Laverty G., Gorman S., Gilmore B. 2014. Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. Pathogens, 3, 3: 596–632
- Lequette Y., Greenberg E. P. 2005. Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Journal of Bacteriology, 187, 1: 37–44
- Li H., Olson M., Lin G., Hey T., Tan S. Y., Narva K. E. 2013. *Bacillus thuringiensis* Cry34Ab1/Cry35Ab1 interactions with western corn rootworm midgut membrane binding sites. PLoS ONE, 8, 1: e53079, doi: 10.1371/journal.pone.0053079: 9 str.
- Li Z., Nair S. K. 2012. Quorum sensing: How bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? Protein Science, 21, 10: 1403–1417
- Merritt J. H., Kadouri D. E., O'Toole G. A. 2011. Growing and analyzing static biofilms. Current Protocols in Microbiology, 22:1B.1.1-1B.1.18
- Miklavič Š., Kogovšek P., Hodnik V., Korošec J., Kladnik A., Anderluh G., Gutierrez-Aguirre I., Maček P., Butala M. 2015. The *Pseudomonas aeruginosa* RhlR-controlled aegerolysin RahU is a low-affinity rhamnolipid-binding protein. FEMS Microbiology Letters (sprejeto v objavo): 17 str.

- Jimenez N. P., Koch G., Thompson J. A., Xavier K. B., Cool R. H., Quax W. J. 2012. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76,1: 46–65
- Nayak A. P., Green B. J., Beezhold D. H. 2013. Fungal hemolysins. *Medical Mycology*, 51, 1: 1–16
- O'Loughlin C. T., Miller L. C., Siryaporn A., Drescher K., Semmelhack M. F., Bassler B. L. 2013. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 44: 17981–17986
- Ota K., Butala M., Viero G., Dalla S. M., Sepčić K., Maček P. 2014. Fungal MACPF-like proteins and aegerolysins: bi-component pore-forming proteins? *Subcellular Biochemistry*, 80: 271–291
- Ota K., Leonardi A., Mikelj M., Skočaj M., Wohlschlager T., Künzler M., Maček P. 2013. Membrane cholesterol and sphingomyelin, and ostreolysin A are obligatory for pore-formation by a MACPF/CDC-like pore-forming protein, pleurotolysin B. *Biochimie*, 95,10: 1855–1864
- Parthasarathy S., Raghavamenon A., Garelnabi M. O., Santanam N. 2010. Oxidized low-density lipoprotein. V: Free radicals and antioxidant protocols. Vol. 610. Uppu R. M., Murthy S. N., Pryor W. A., Parinandi N. L. (eds.). Totowa, Humana Press: 403-417
- Patriquin G. M., Banin E., Gilmour C., Tuchman R., Greenberg E. P., Poole K. 2008. Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 190, 2: 662–671
- Prassl R., Laggner P. 2012. Lipoprotein structure and dynamics: Low density lipoprotein viewed as a highly dynamic and flexible nanoparticle. V: Lipoproteins - role in health and diseases. Kostner G. (ed.). Rijeka, InTech: 3-21
- Preston M. J., Seed P. C., Toder D. S., Iglewski B. H., Ohman D. E., Gustin J. K., Goldberg J. B., Pier G. B. 1997. Contribution of proteases and LasR to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during corneal infections. *Infection and Immunity*, 65, 8: 3086–3090

- Purschke F. G. 2012. Phänotypische und molekularbiologische Untersuchungen der Interaktionen in gemischten Biofilmen. Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung. Stuttgart, Universität Stuttgart, Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik: 153 str.
- Rahim R., Ochsner U. A., Olvera C., Graninger M., Messner P., Lam J. S., Soberón-Chávez G. 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 40, 3: 708–718
- Rao J., DiGiandomenico A., Artamonov M., Leitinger N., Amin A. R., Goldberg, J. B. 2011a. Host derived inflammatory phospholipids regulate *rahU* (PA0122) gene, protein, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Cellular Immunology*, 270, 2: 95–102
- Rao J., DiGiandomenico A., Unger J., Bao Y., Polanowska-Grabowska R. K., Goldberg J. B. 2008. A novel oxidized low-density lipoprotein-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 154, 2: 654–665
- Rao J., Elliott M. R., Leitinger N., Jensen R. V., Goldberg J. B., Amin A. R. 2011b. RahU: An inducible and functionally pleiotropic protein in *Pseudomonas aeruginosa* modulates innate immunity and inflammation in host cells. *Cellular Immunology*, 270, 2: 103–113
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 4th ed. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 34 str.
- Sappington K. J., Dandekar A. A., Oinuma K.-I., Greenberg E. P. 2011. Reversible signal binding by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal receptor LasR. *mBio*, 2, 1: e00011–11, doi: 10.1128/mBio.00011-11: 6 str.
- Schuster M., Greenberg E. P. 2007. Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics*, 8, 1: 287, doi:10.1186/1471-2164-8-287: 11 str.
- Schuster M., Greenberg P. E. 2006. A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 2: 73–81

- Schuster M., Lostroh C. P., Ogi T., Greenberg E. P. 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: A transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*, 185,7: 2066–2079
- Schuster M., Urbanowski M. L., Greenberg E. P. 2004. Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 45: 15833–15839
- Scott N. E., Hare N. J., White M. Y., Manos J., Cordwell S. J. 2013. Secretome of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* AES-1R grown in a cystic fibrosis lung-like environment. *Journal of Proteome Research*, 12, 12: 5357–5369
- Sepčić K., Berne S., Rebolj K., Batista U., Plemenitaš A., Šentjurc M., Maček P. 2004. Ostreolysin, a pore-forming protein from the oyster mushroom, interacts specifically with membrane cholesterol-rich lipid domains. *FEBS Letters*, 575, 1-3: 81–85
- Sifri C. D. 2008. Healthcare epidemiology: Quorum sensing: Bacteria talk sense. *Clinical Infectious Diseases*, 47, 8: 1070–1076
- Skočaj M., Resnik N., Grundner M., Ota K., Rojko N., Hodnik V., Anderluh, G., Sobota A., Maček P., Veranič P., Sepčić K. 2014. Tracking cholesterol/sphingomyelin-rich membrane domains with the ostreolysin A-mCherry protein. *PloS One*, 9, 3: e92783, doi: 10.1371/journal.pone.0092783: 12 str.
- Soberón-Chávez G., Aguirre-Ramírez M., Ordóñez L. 2005. Is *Pseudomonas aeruginosa* only “sensing quorum”? *Critical Reviews in Microbiology*, 31, 3: 171–182
- Tomita T., Noguchi K., Mimuro H., Ukaji F., Ito K., Sugawara-Tomita N., Hashimoto Y. 2004. Pleurotolysin, a novel sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, assembles into a transmembrane pore complex. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 26: 26975–26982
- Toyofuku M., Roschitzki B., Riedel K., Eberl L. 2012. Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *Journal of Proteome Research*, 11, 10: 4906–4915

- Tweten R. K. 2005. Cholesterol-dependent cytolsins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infection and Immunity*, 73, 10: 6199–6209
- Ventre I., Ledgham F., Prima V., Lazdunski A., Foglino M., Sturgis J. N. 2003. Dimerization of the quorum sensing regulator RhlR: Development of a method using EGFP fluorescence anisotropy. *Molecular Microbiology*, 48, 1: 187–198
- UW Genome Sciences. 2015. *P. aeruginosa* mutant library: PA two-allele library. Seattle, University of Washington: 1 str.
<http://www.gs.washington.edu/labs/manoil/libraryindex.htm> (Jan, 2015)
- Vidic I., Berne S., Drobne D., Macek P., Frangez R., Turk T., Sepčić K. 2005. Temporal and spatial expression of ostreolysin during development of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Mycological Research*, 109, Pt 3: 377–382
- Wagner V. E., Bushnell D., Passador L., Brooks A. I., Iglewski B. H. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: Effects of growth phase and environment. *Journal of Bacteriology*, 185, 7: 2080–2095
- Wagner V. E., Iglewski B. H. 2008. *P. aeruginosa* biofilms in CF infection. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 35, 3: 124–134
- Wartenberg D., Lapp K., Jacobsen I. D., Dahse H.-M., Kniemeyer O., Heinekamp T., Brakhage A. A. 2011. Secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* reveals Asp-hemolysin as a major secreted protein. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 301, 7: 602–611
- West S. A. Winzer K., Gardner A., Diggle S. P. 2012. Quorum sensing and the confusion about diffusion. *Trends in Microbiology*, 20, 12: 586–594
- West S. E., Schweizer H. P., Dall C., Sample A. K., Runyen-Janecky L.J. 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 148: 81-86
- Whiteley M., Lee K. M., Greenberg E. P. 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 24: 13904–13909
- Yang L., Barken K. B., Skindersoe M. E., Christensen A. B., Givskov M., Tolker-Nielsen T. 2007. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153, 5: 1318–1328

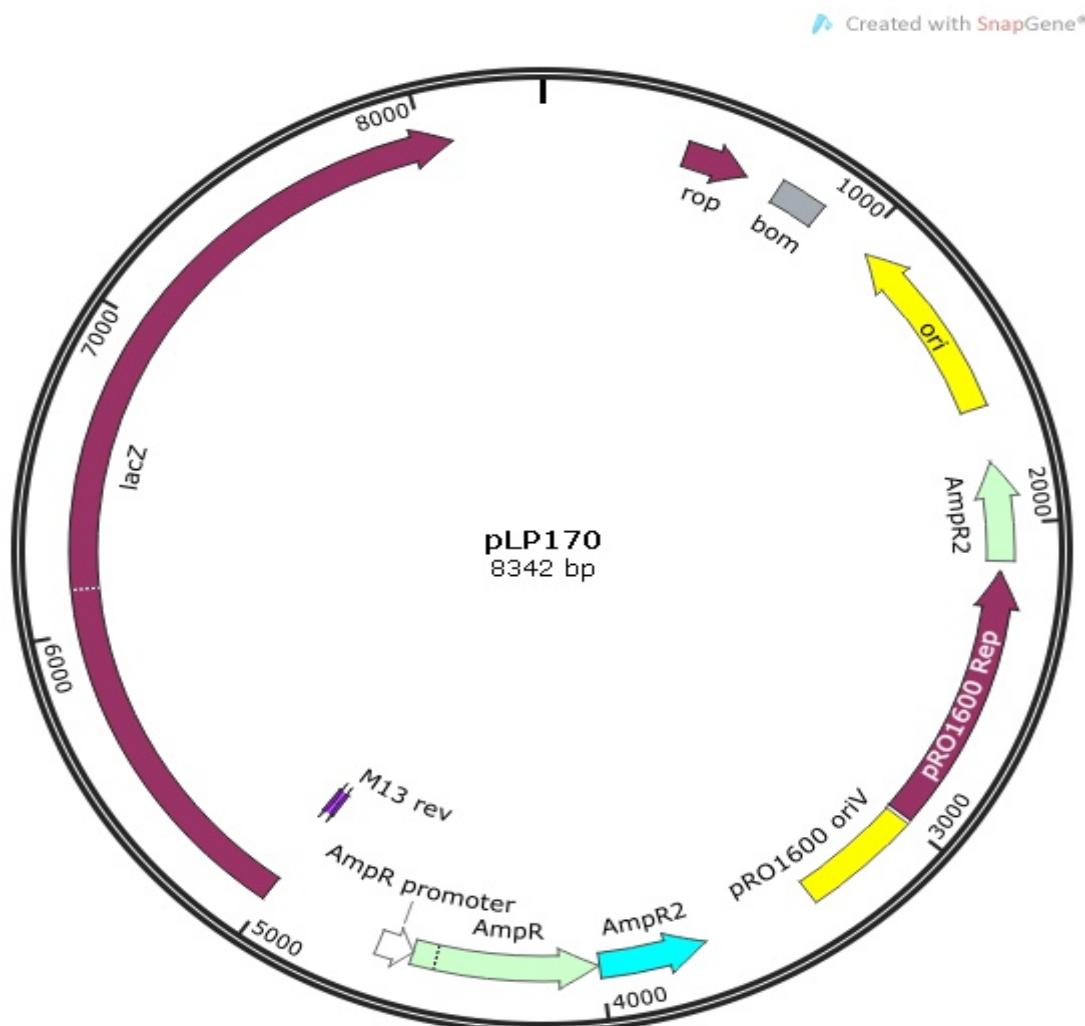
Yang Z., Zhang L., Zhang Y., Zhang T., Feng Y., Lu X., Wang X. 2011. Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. PLoS ONE, 6,7: e22981, doi 10.1371/journal.pone.0022981: 8 str.

ZAHVALE

- doc. dr. Mateju Butala za somentorstvo magistrskega dela in še posebej za hitro odzivnost pri težavah ter za pomoč in skrbnost, dogovarjanja za različne postopke, meritve in priskrbo laboratorijskega materiala.
- prof. dr. Kristini Sepčić za mentorstvo magistrskega dela in še posebej za hitro odzivnost pri težavah ter za pomoč in skrbnost.
- dipl. mikrobiol. Špeli Miklavič za priskrbo plazmidov in določenih plazmidnih konstruktorjev, ter informacije glede laboratorijskega dela z bakterijo *P. aeruginosa*.
- dr. Mateju Skočaju za priskrbo plazmidnega konstrukta pLP170-OlyA-mCherry.
- dr. Alešu Kladniku za uvodne ure fluorescenčne mikroskopije.
- Nini Orehar, prof. biol. in kem, za pomoč pri spektroskopiji in priskrbi laboratorijskega materiala.
- Svojim najbližnjim za vsesplošno podporo

PRILOGE

PRILOGA A: Plazmidna mapa pLP170 z opisi elementov plazmida

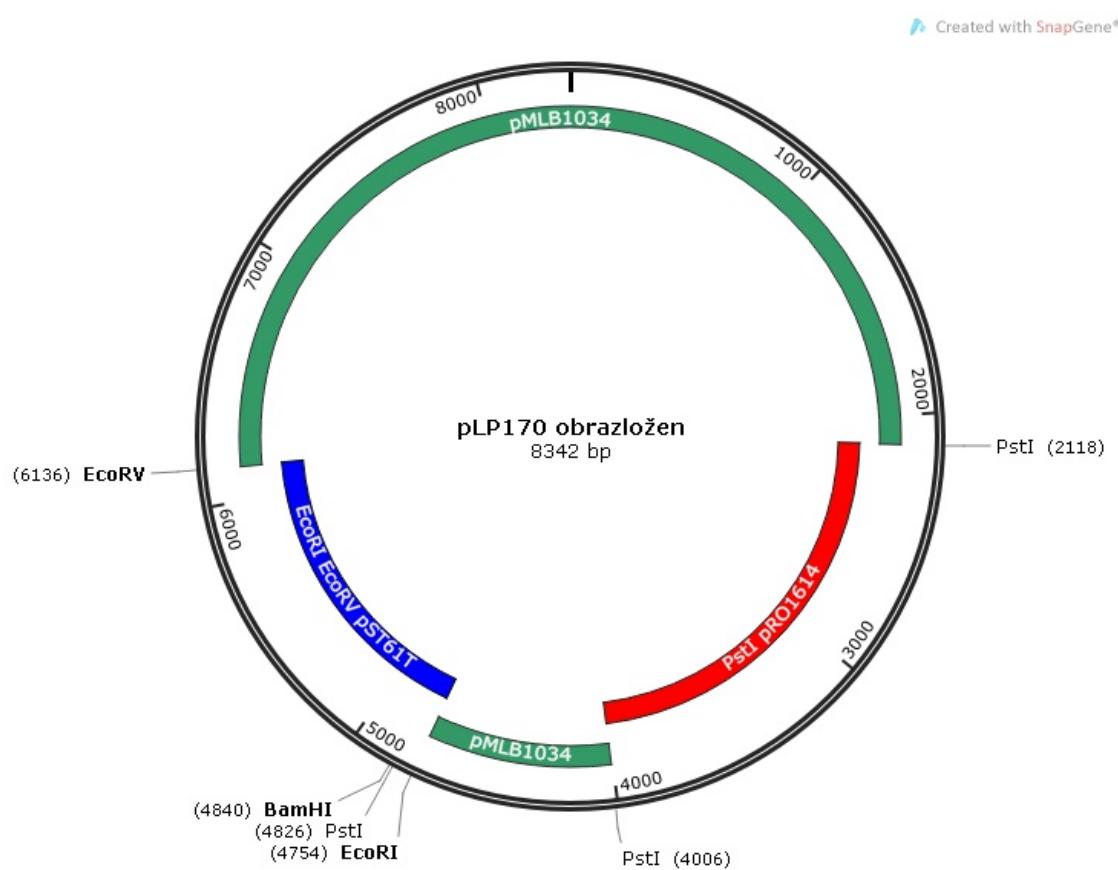


Plazmid pLP170 (geneSnap database). Oznake: pRO1600 oriV), mesto začetka podvajanja potrebno za podvajanje v *P. aeruginosa*; pRO1600 Rep), gen za protein pRO1600 Rep potreben za podvajanje z pRO1600 oriV mestom podvajanja; ori) mesto začetka podvajanja značilno za ColE1/pMB1/pRB322/pUC, odgovorno za podvajanje v *E. coli*; AmpR+AmpR2) gen za rezistenco proti ampicilinu, karbenicilinu; lacZ) gen za β-galaktozidazo; Bom) regija za mobilnost (angl.:basis of mobility region); Rop), zapis za Rop protein, ki uravnava število kopij plazmidov z ori mestom ColE1 plazmidov.

PRILOGA B: Opis nastanka plazmidne mape pPLP170

Plazmidna mapa je bila ustvarjena na podlagi naslednjih informacij:

- Plazmid pLP170 je pSW205 z vstavljenim fragmentom EcoRI/EcoRV od pST61T (Preston in sod., 1997)
- Plazmid pSW205 je pMLB1034, v katerega je vstavljen PstI fragment pRO1614 vektorja, ki nosi informacijo za stabilno podvajanje v *P. aeruginosa* (Colmer, 1997)
- PstI framgent vektorja pRO1614 nosi informacijo za stabilno podvajanje v *P. aeruginosa* (West in sod., 1994)



PRILOGA C: Prikaz nukleotidnega zaporedja plazmidnega konstrukta pLP170-rahU-mCherry

(8-10 kbp) -----

CTCGAOGCCCTGCTCGATGCCCTGGAGGACGGCGACAGCGCGGCCGGCTGCCTGATGGACGCTTACCTGCGAGG
CCTGTTGCCCGCATGCGCTTCCTGCCGCCACCCACCACGGACCTGCGCGAGGCATTGGCATGAAGGCCCTAGCG
GGGAAAAACGCCGGAGGGCTGACCTCCCCGGCCCTACCAGATCTGGCAGGCGGTGGCTGGCTGGCCAG
CCTATAGTGAAGCGGGTCAAGGGATGGCGCCGTGCTGGTCAAGTAGCCAAGGGTCCGTTGTGAGCGCCCGTCTGT
CCGTGACGCTTACAGGAAACTGTGAACGCATGGTTAACGGAGATCGACATG
CATACGCAGAATGGATCGCAGTGA
AGGTCTGGTATCCAATCCATGGCACGGTGGGCATCCGAACGCCACCTTGCATGGGCAGTTCCTACCGCTAC
ACCAACAAGGACGACGAGATTTCACCAGGAGGAAGTCA
CAGCATGAACGTGCAAGGCCAGCCCAGGGCAGCTGACTGCTACGACGGCAACCAAGATGGG
ACCTTCAGCTGGGATGACCCGTGGAATCCGGCGCCACCAACACCTGGAGCTTACGGCGGCATGGCGGACTATGG
TGGCATCACCAGTGGCGCAACGCTACGGGACGGACATGGCAGGTACCCGTACCCGTACCCCTGGCGCTTCTGG
GGAT
CGGGCAGCGAAGGCAAAGCAGCGGCAGCGCGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGCCATCATCAAGGAGT
TCATGCGCTTCAAGGTGACATGGAGGGCTCCGTGAACCGGCCACGAGTTGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCG
CCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGGCCCTTCGCCTGGGACATCCCTGT
CCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGGCTACGTGAAGCACCCGGCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCC
CCGAGGGCTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAAGCTCGAGGACGGCGGTGGTACCGTGACCCAGGACTCCCTCCCTG
CAGGACGGCGAGTTCATCAAGGTGAAGCTGCGCGCACCAACTTCCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAA
GACCATGGGCTGGGAGGCCTCCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGG
CTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAACGCCCCTGCAGCTGC
CCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATGTGAAACAGTACGAA
CGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGAAGGATCC-----

(8-10kbp)

Legenda barvnih oznak:

paProm, *las-rhl* box, **CDS mCherry**, 10 AK linker, start (ATG) in stop (TGA) kodon,
XbaI restriktijsko mesto, **BamHI** restriktijsko mesto

PRILOGA D: Prikaz nukleotidnega zaporedja plazmidnega konstrukta pLP170-*paProm-mCherry*

(8-10 kbp)-----

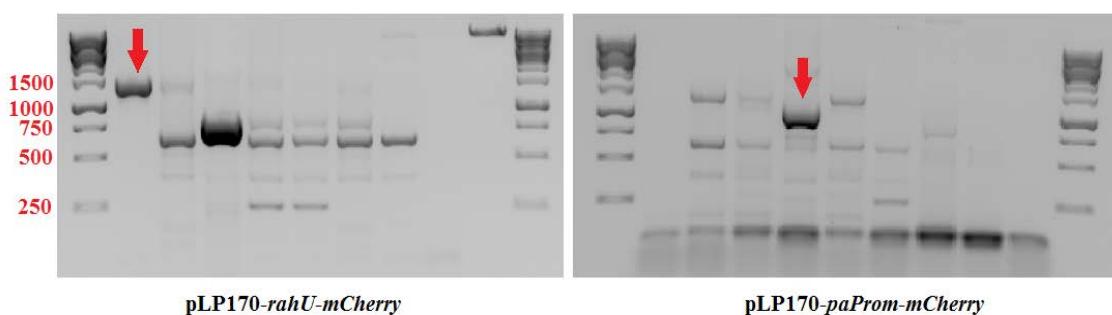
CTCGAGGCCCTGCTCGATGCCCTGGAGGACGGCGACAGCGCGGCCGGCTGCCTGATGGACGCTTACCTGCGAGG
CCTGTTGCCCGCATGCGCTTCCCTGCCACCCACCACGGACCTGCGGAGGCATTGCGCATGAAGGCCCTAGCG
GGGAAAAACGCCGGAGGGCCTGACCTCCCCGGCCGCTACCAGATCTGGCAGGCGGTGGCTGGCTGGCCAG
CCTATAGTGAAGCGGGTCAGGGATGGCGCCGTGCTGGTCAAGTAGCCAAGGGTCCGTTGAGCGCCGGTCTGT
CCGTGACGGTCTACAGGAAACTGTGAACGATGGTTAACGGAGATCGAC**ATG**CATACCGAGAAATGGATCGCAGTGA
AGGTCTGGTATCAAATCCATCGCACGGT**GGATCC**GGCAGCGAAGGCAAAGCAGCGCAGCGGCTGAGCAA
GGGCGAGGAGGATAAACATGGCCATCATCAAGGAGTTATGCGCTTAAGGTGACATGGAGGGCTCCGTGAACGGC
CACGAGTTGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCA
AGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCGCTGGGACATCCTGTCCCTCAGTTATGTACGGCTCCAAGGCTACGTGAAGCACC
CCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAAGCTGCTCTCCCCGAGGGCTTCAGTGGAGCGCGTGTGAACCTCGAGGAC
GGCGCGTGGTGAACCGTGAACCCAGGACTCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGCAC
CAACTTCCCCCTCGACGGCCCCGTAATGCAAGAAGACCATGGGAGGGCTCTCCAGAGCGGGATGTACCCCC
AGGACGGGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGCCACTACGACGCTGAGGTCAA
GACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCGTGAGCTGCCCCGCGCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCC
ACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACCGCGCAGGGCCACTCCACCGGGCATGGACGAGCT
GTACAAGTGA**GGATCC**----- (8-10 kbp)

Legenda barvnih oznak:

paProm, *las-rhl box*, **CDS mCherry**, 10 AK linker, starti (ATG) in stop (TGA) kodon,
XbaI restriktionsko mesto, **BamHI** restriktionsko mesto

PRILOGA E: Rezultati zadnjega preverjanjega transformant *E. coli* DH5 α iz koraka 8 (pLP170-rahU-mCherry) in koraka 4 (pLP170-paProm-mCherry)

Slika agaroznih gelov, na katere smo nanesli produkt PCR iz preverjanja transformant *E. coli* ki so prejeli plazmidni kontrukt pLP170-rahU-mCherry ali pLP170-paProm-mCherry: Z rdečo puščico je označen željen produkt PCR, z rdečimi številkami pa velikosti v bp, nanešene 1 kb DNA lestvice.



PRILOGA F: Rezultati sekvenciranja plazmidnih konstruktov pLP170-rahU-mCherry in Plp170-paProm-mCherry

Nukleotidno zaporedje pLP170-rahU-mCherry pridobljeno z začetnim oligonukleotidom P11 (začetni):

GCGACAGCGCGCGCGGCTGCCTGATGGACGCTTACCTGCAGGCCCTTCGCCGATGCCCTGCCGCCA
CCACCGACCTGCCGAGGATTGCCATGAAGGCCCTAGCGGGAAAACGCCGGAGGCCGACCTCCCC
GGCGCCGCCCTACCAAGATCTGGCAGGCCGGTGGCTGGCTGGCCAGCCTATACTGAAGCGGGTCAGGGATGGCGCC
TGCTGGTCAAGTAGCCAAGGGTCCGTCTGAGGCCAGTCAGTGAAGGTCGTTACAGGAAACTGTGAACGCA
TGGTAACCGGAGATGCACATGGCAGTCAGAATGGATCGCAGTGAAGGTCGTTACAGGAAACTGTGAACGCA
GGCATCGCAACGCCACCTGCAATGGGCAAGGTTCTACCGCTACCCAACAAGGACGAGATTTCCACCGAGG
AAGTCAGCAGCATGAACGTCAGGCCGGCAGCCGCAATGGATGCCCTCGCGACGGAGAACGCTTCGCG
ACCCAGGGCAGCTCGACTGCTACGACGGCAACCCAAGATGGCACCTCAGTGGATGACCCGTGAAATCCGG
CGCCACCAACACCTGGAGCTTCAGCCGGCATGGCGACTATGCTGGCATCACCAGTGGCGCAACGCTACGGCA
CGGACATCGCGAGGTACCCCTGACCGCTCGCCCTCGCCGGTCTCCGGATCGAGGAGGAAACGAGCGGAGCG
CGTGAGCAAGGGCAGGGAGGATAACATGGGCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAGGTGACATGGAGGGCTCC
GTGAAACGCCACGAAGTCGAGATCGAAGGCCAGGGCGAGGGCCCTACGAGGGCCCCAGACCGCAAGCTGAAGT
GACCAAGGGTGGCCCTTCGCTTCCCTGGACTCTGTCCCTCAGTCATGTGGCTCCAGGCCCTGTGAGCACCCGCGAC
CTCCGACACTTGAACTGCCTTCCCGAGGCTCAAGGGGACCCGGAGAACTCAAGACGGGCGTGTGACCTGACCAGAC
CTCTGCAAGCGGAAT

Nukleotidno zaporedje pLP170-rahU-mCherry z reverznim začetnim oligonukleotidom P17 (reverzni) (reverzni komplement originalnega zaporedja):

TTTCAAAATTCCCTTGGCCGGGGGGTTTCCGAAACGCCCTTGAAAGGGGGAAATTTCGGTTAC
CCCAAACAAGGGAGGGAGAAATTTCGGGGAAATTAGGAAGCAATAACGTCAGGCCGAAACCCGCAATGG
ATGCCCTCTGGGGACGGGAAAACGTTTGTCTCCGGCCCCCAGGGGAGGCTTGAATGCTAGGACGGCAACACCAG
ATGGGGCCCTTCAGTTGGATAACCGTGAATCCGGCCCCAACACCTGGAGTTACGCCGGCATGCCGGATTAG
CTGGCATACCAGTGGCGCAACGCTACGGGACATCGCGAGGTACCCCTGCCCTGGCGCTTCGGATCG
GGATCC
TCGGCAGCGAAGGCAAGGACGGCAGCGCGTGTAGCAAGGGCAGGGAGGATAACATGCCATCATCAAGGAG
TTCATGCCCTTCAGGTGACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACAGGTTGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGC
GCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTGCCCTGGACATCC
TCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCAAGGCTACGTGAAGCACCCGCCACATCCCAGACTACTTGAAGCTGTCTTC
CCCGAGGGCTTCAGTGGAGCGCGTGTGAACACTCGAGGACGGCGCTGGTACCGTGACCCAGGACTCC
GCAGGACGGCGAGTTCATACAAGGTGAAGCTGCGCCGACCAACTTCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGA
AGACCATGGCTGGAGGGCTCCCGAGGGATGTACCCAGGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAG
GCTGAAGTGAAGGACGGCGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGGACACCTACAAGGGCCAAGAAGGCCGTCAGCTG
CCCGCGCCTACAACGTCACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACACGAGGACTACACCATCGTGGACAGTACGA
ACGCGCCAGGGGCCACTCACCGCGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA
GGATCTAAGTACACTAGCGATCCG
ACTCACTATAGAGGGACAAACTCAAGGTATTGCAAGAGTGCCTTATGATTGACATTCTCGGGTTAACAGAT
CCAGGTAGTGAGTTCTAGGGGG

Plp170-paProm-mCherry začetnim oligonukleotid oligonukleotidni začetnikom P17 (reverzni komplement originalnega zaporedja):

CGGAAGGCCCTTGGCTGCCGCCGAAAGGGGGTTCCCTGGCCCCCACCACCAAGGGGACCTGGGGGGAA
GGCAATTGGCGAAAGAAGGCCCTAGCGGGGGAAAACGCCGGAGGGCTTGACCTTCCCAGGGCC
CGCCCTACCAAGATTGGCAGGGGGTGGTGGCTGGTGGCCAGCCTTATTAGTGAAGCGGGGTCAAGGGAA
TGGCGCCCGTGTGGTCAGAGTACGCCAAGGGTCCCGTTGTAGCGCCCGTCCCTGTCGGTGACGTCTACC
AGAAAATGTGAACCATGGTAACGGAGATCGCA
GGATCC
GGCAGCGAAGGCAAAGCAGCGCAGCGCGTGTAGCAAGGGGAGGAGGA
TAACATGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTCAAGGTGACATGGAGGGCTCCGTGAACGCCACGAGTTGAGA
TCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACGCCAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCT
GCCCTCCCTGGACATCCTGCCCCCTCAGTCATGTACGGCTCCAAGGGCTACGTGAAGGACCCGCCGACATCCC
CGACTACTGAAGCTGCTCTCCCGAGGGCTCAAGTGGAGCGCGTGTGAACCTCGAGGACGGCGCTGGTGA
CCGTGACCCAGGACTCTCCCTGGCAGAGCGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCCGGGACCAACTTCCC
GACGGCCCCGTAATGAGAAGACCATGGGCTGGAGGCCCTCCGAGCGGATGTACCCGAGGACGGCGCC
TGAAGGGGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCAACTACAA
GGCCAAGAAGGCCGTGCAGCTGCCGCCCTACAACGTCACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACACGAGGACT

ACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCACTCCACCGGCCATGGACGAGCTGTACAAGTGAGG
ATCCTAACTAACTAGCGATCCGACTCACTATAGAGGGACAAACTCAAGGTATTGCAAGAGTGGCCTTATGATT
GACCTTCTCCGAGTTAATACGACCAGGGATCGAGTCCAAGGGGG

LEGENDA BARVNIH OZNAK:

ZELENO: identičnost z zaporedjem *paProm* in CDS *rahU*,

RDEČE: identičnost z zaporedjem CDS *mCherry*,

VIJOLIČNO: identičnost z zaporedjem 10 AK dolgega linkerja,

GGATCC: identičnost z bamHI restrikcijskim mestom,

ATG: start kodon, **TGA:** stop kodon, **C:** mutacij.