

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Aleksandra ŠAKANOVIC

**OPTIMIZACIJA IZOLACIJE PROTEINA USP
(UROPATHOGENI SPECIFIČNI PROTEIN)
BAKTERIJE *Escherichia coli* IN PREVERJANJE
NJEVOVE AKTIVNOSTI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Aleksandra ŠAKANOVIC

**OPTIMIZACIJA IZOLACIJE PROTEINA USP (UROPATOGENI
SPECIFIČNI PROTEIN) BAKTERIJE *Escherichia coli* IN
PREVERJANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**OPTIMIZATION OF THE ISOLATION OF THE *Escherichia coli*
PROTEIN USP (UROPATHOGENIC SPECIFIC PROTEIN) AND
INVESTIGATION OF ITS ACTIVITY**

M.SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Darjo Žgur Bertok, za somentorja asist. dr. Miha Črnigoja in za recenzenta prof. dr. Jure Stojana.

Mentorica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Somentor: asist. dr. Miha ČRNIGOJ

Recenzent: prof. dr. Jure STOJAN

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Katja SEME
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: asist. dr. Miha ČRNIGOJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Jure STOJAN
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastega 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.

Aleksandra ŠAKANOVIĆ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 579.22+579.25:577.1/.2 (043)=163.6
KG	<i>Escherichia coli</i> /uropatogeni specifični protein/genotoksin/izolacija proteina/Imu3/Usp-GFP/ Δ Hcp-Usp/celične linije
AV	ŠAKANOVIC, Aleksandra, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica)/ČRNIGOJ, Miha (somentor)/STOJAN, Jure (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2015
IN	OPTIMIZACIJA IZOLACIJE PROTEINA USP (UROPATHOGENI SPECIFIČNI PROTEIN) BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i> IN PREVERJANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XI, 69 str., 12 pregl., 36 sl., 82 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Bakterija <i>Escherichia coli</i> je del normalne črevesne mikrobiote, vendar patogeni sevi lahko povzročajo različne črevesne in izvenčrevesne okužbe. Uropatogeni sevi bakterije <i>E. coli</i> so najpogostejši povzročitelji urinarnih okužb in pogosto imajo zapis za uropatogeni specifični protein (Usp). Gen <i>usp</i> je kodiran na majhnem otoku patogenosti in je tesno povezan z geni <i>imu</i> , ki ščitijo producenta pred toksičnim delovanjem proteina Usp. Protein Usp je bakteriocinom podoben genotoksin, ki je aktiven proti humanim celičnim linijam HUVEC in HEK293. Cilj magistrske naloge je bil optimizirati izolacijo proteina Usp in ugotoviti njegov učinek na različne humane celične linije. Pripravili smo različne ekspresijske sisteme in z NaDS poliakrilamidno elektroforezo ugotavljali uspešnost čiščenja proteina Usp po Ni-NTA afinitetni in gelski kromatografiji. Poleg tega smo, za nadaljnje študije, pripravili proteinske izolate proteinov Usp-GFP, Imu3, Δ Hcp-Usp. Ugotovili smo, da med gojenjem laboratorijskega seva MG1655 <i>usp</i> ⁺ ne pride do izločanja proteina Usp v bakterijsko gojišče kakor tudi, da omenjeni sev po infekciji humanih celičnih linij ne povzroča dvojnih prelomov DNA. Z uporabo fluorescentne mikroskopije smo pokazali, da je izražanje gena <i>usp</i> heterogeno saj se izraža v le majhnem odstotku genetsko identičnih bakterijskih celic.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
DC UDC 579.22+579.25:577.1/.2 (043)=163.6
CX *Escherichia coli*/uropathogenic specific protein/genotoxin/protein
isolation/Imu3/Usp-GFP/ Δ Hcp-Usp/cell lines
AU ŠAKANOVIĆ, Aleksandra
AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/ČRNIGOJ, Miha (co-supervisor)/STOJAN,
Jure (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2015
TI OPTIMIZATION OF THE ISOLATION OF THE *Escherichia coli* PROTEIN USP
(UROPATHOGENIC SPECIFIC PROTEIN) AND INVESTIGATION OF ITS
ACTIVITY
DT M.Sc. Thesis (Master Study Programmes – Field Microbiology)
NO XI, 69 p., 12 tab., 36 fig., 82 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Escherichia coli* belongs to the normal gut microbiota, however pathogenic strains
can cause a variety of intestinal and extraintestinal infections. Uropathogenic *E. coli*
are the most common bacterial pathogens that cause urinary tract infections and
those strains frequently possess the gene for the uropathogenic specific protein
(Usp). The Usp protein is encoded on a small pathogenicity island and is closely
associated with the *imu* genes that provide immunity to the producer. Usp is a
bacteriocin- like genotoxin which is active against human cell lines HUVEC and
HEK293. The aim of this thesis was to optimize the isolation of the Usp protein and
to investigate its effect on various human cell lines. We prepared a variety of
expression systems and using SDS PAGE determined the effect of protein
purification using Ni-NTA affinity and gel chromatography. Furthermore, we
prepared proteins Usp-GFP, Δ Hcp-Usp and Imu3 for further studies. Our data show
that the Usp protein is not secreted from laboratory strain MG1655 *usp*⁺ and that the
same strain is not able to provoke DNA double strand breaks. We have shown that
expression of the *usp* gene is heterogeneous and that in a genetically identical
bacterial population only small percentage of bacterial cells express the *usp* gene.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i>	3
2.2 FILOGENETSKE SKUPINE BAKTERIJE <i>E. coli</i>	4
2.3 ZNAČILNOSTI KOMENZALNIH SEVOV BAKTERIJE <i>E. coli</i>	5
2.4 DIAREAGENI SEVI BAKTERIJE <i>E. coli</i>	6
2.5 ZUNAJČREVESNI PATOGENI SEVI BAKTERIJE <i>E. coli</i>	7
2.5.1 Uropatogeni sevi bakterije <i>E. coli</i> (UPEC)	7
2.6 OTOK PATOGENOSTI PAI _{usp}	8
2.6.1 Odkritje PAI _{usp} in njegova prevalenca	8
2.6.2 Značilnosti PAI _{usp}	10
2.6.3 Napovedovanje značilnosti proteinov PAI _{usp} z uporabo bioinformacijskih orodij	11
2.6.4 Delovanje proteinov PAI _{usp}	12
2.7 ODGOVOR CELICE NA POŠKODBE DNA	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Kemikalije	15
3.1.2 Raztopine in pufri	17
3.1.3 Laboratorijska oprema	19
3.1.4 Bakterijski sevi	20
3.1.5 Celične kulture	21
3.1.6 Plazmidi in začetni oligonukleotidi	22
3.1.7 Encimi in kompleti	24
3.1.8 DNA lestvica in proteinski standard	25
3.2 METODE	25
3.2.1 Priprava plazmidov s kloniranimi geni otoka patogenosti PAI _{usp}	25
3.2.1.1 Priprava plazmida pUSP4_BI	25
3.2.1.2 Priprava plazmida pTUTG	26
3.2.1.3 Priprava plazmida pΔHcpUsp_imu	27
3.2.2 Priprava kompetentnih bakterijskih celic in transformacija	29
3.2.2.1 Transformacija protoplastov seva <i>Bacillus megaterium</i> MS941 (<i>B. megaterium</i>)	29

3.2.2.2 Priprava kompetentnih celic različnih sevov vrste <i>E. coli</i> in transformacija	29
3.2.2.2.1 Priprava kemijsko kompetentnih celic	29
3.2.2.2.2 Transformacija kemijsko kompetentnih celic različnih sevov vrste <i>E. coli</i>	29
3.2.3 Izražanje genov za rekombinantne proteine v različnih ekspresijskih sistemih	30
3.2.3.1 Izražanje gena <i>usp</i> v sevu <i>Bacillus megaterium</i> MS941.....	30
3.2.3.1.1 Priprava vzorca za ugotavljanje prisotnosti proteina Usp v zunajcelični frakciji kulture <i>B. megaterium</i> MS941 pT7-RNAP pPT7-SPlipA- <i>usp</i> z NaDs-PAGE	30
3.2.3.1.2 Priprava vzorca za določanje proteina Usp v znotrajcelični frakciji kulture <i>B. megaterium</i> MS941 pT7-RNAP pPT7-SPlipA- <i>usp</i> z NaDs-PAGE.....	30
3.2.3.2 Izražanje gena <i>usp</i> v sevu <i>E. coli</i> Keio <i>minC</i> pLysE	31
3.2.3.3 Izražanje genov <i>usp</i> , <i>usp-gfp</i> in Δhcp - <i>usp</i> v ekspresijskih sistemih <i>E. coli</i> MG1655 (DE3), BL21 (DE3) in BL21 (DE3) pLysE.....	31
3.2.4 Metode izolacije, čiščenja in zaznavanja rekombinantnih proteinov	31
3.2.4.1 Ni- NTA afinitetna kromatografija	31
3.2.4.1.1 Priprava in ekstrakcija netopne frakcije (inkluzijska telesca).....	32
3.2.4.1.2 Priprava in ekstrakcija topne frakcije	32
3.2.4.1.3 Čiščenje proteinov z uporabo Ni-NTA kromatografije	32
3.2.4.2 Dializa izoliranih proteinov	33
3.2.4.3 Gelska kromatografija	33
3.2.4.4 NaDS- PAGE	33
3.2.4.5 Prenos proteinov po Westernu	34
3.2.5 DNazni test	34
3.2.6 Preverjanje izločanja nativnega proteina Usp v bakterijsko gojišče.....	35
3.2.6.1 Obarjanje proteinov iz izrabljenega gojišča z amonijevim sulfatom	35
3.2.6.2 Obarjanje proteinov iz izrabljenega gojišča s TCA	35
3.2.7 Testiranje vpliva proteina Usp na celične linije humanega izvora	35
3.2.7.1 Gojenje celične linije MM6 in ugotavljanje preživelosti po tretiranju z izoliranim proteinom Usp.....	36
3.2.7.2 Gojenje celičnih linij HUVEC, HEK293 in HeLa in ugotavljanje genotoksične aktivnosti proteina Usp po infekciji ali tretiranju z bakterijskim lizatom.....	36
3.2.7.2.1 Gojenje celičnih linij in priprava za izvedbo poizkusa	36
3.2.7.2.2 Infekcija celičnih linij	37
3.2.7.2.3 Priprava bakterijskega lizata	37
3.2.7.2.4 Ugotavljanje genotoksične aktivnosti proteina Usp.....	38
3.2.8 Ugotavljanje izražanje gena <i>usp</i> na nivoju posamezne bakterijske celice v populaciji genetsko identičnih bakterijskih celic.....	38
3.2.8.1 Vzorčenje in priprava mikroskopskih preparatov	38
3.2.8.2 Priprava mikroskopskega preparata in mikroskopiranje	38
4 REZULTATI	40
4.1 LASTNOSTI AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ IZOLIRANIH PROTEINOV	40

4.2 PRODUKCIJA, IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTEINOV Usp, Usp -GFP, ΔHcp-Usp in Imu3	40
4.2.1 Izražanje gena <i>usp</i> v sevu <i>Bacillus megaterium</i> MS941	40
4.2.2 Čiščenje proteinov Usp, Usp-GFP, ΔHcp-Usp in Imu3 z Ni-NTA kromatografijo po izražanju v različnih ekspresijskih sistemih bakterije <i>E. coli</i>.....	43
4.3 REZULTATI UGOTAVLJANJA AKTIVNOSTI PROTEINA Usp IN Usp-GFP IZOLIRANIH IZ INKLUZIJSKIH TEDESC	46
4.4 REZULTATI UGOTAVLJANJA IZLOČANJA NATIVNEGA PROTEINA Usp V BAKTERIJSKO GOJIŠČE.....	47
4.5 REZULTATI POSKUSOV PREVERJANJA UČINKA PROTEINA Usp NA CELIČNE LINIJE.....	49
4.5.1 Učinek izoliranega proteina Usp na celično linijo MM6.....	49
4.5.2 Genotoksično delovanje proteina Usp na celične linije HUVEC, HEK293 in HeLa po okužbi ali tretiranju z bakterijskim lizatom	50
4.6 IZRAŽANJE GENA <i>usp</i> V POPULACIJI GENETSKO IDENTIČNIH BAKTERIJSKIH CELIC	53
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	56
5.1 RAZPRAVA	56
5.2 SKLEPI.....	60
6 POVZETEK.....	61
7 VIRI	63

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kemikalije uporabljene pri magistrskem delu	15
Preglednica 2: Raztopine in pufri uporabljeni pri magistrskem delu	17
Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema	19
Preglednica 4: Uporabljeni bakterijski sevi pri magistrskem delu, njihov genotip in osnovne značilnosti.....	20
Preglednica 5: Uporabljene celične kulture pri magistrskem delu in njihove osnovne značilnosti.....	21
Preglednica 6: Plazmidi uporabljeni pri magistrskem delu.....	22
Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabljali v magistrskem delu.....	24
Preglednica 8: Encimi, uporabljeni v magistrskem delu.....	24
Preglednica 9: Kompleti, uporabljeni v magistrskem delu	24
Preglednica 10: Osnovni podatki o proteinih Usp, Δ Hcp-Usp, Usp-GFP in Imu3.....	40
Preglednica 11: Odstotek preživelosti celic MM6 24 ur po dodatku proteina Usp ali pufra za elucijo (kontrola)	50
Preglednica 12: Delež bakterij, ki v populaciji genetsko identičnih bakterij izražajo gen <i>usp</i>	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Drevo za razvrščanje sevov bakterije <i>E. coli</i> v filogenetske skupine (povzeto po Clermont in sod., 2000).....	4
Slika 2: Primerjava nukleotidnega zaporedja medgenske regije <i>aroP-pdhR</i> med sevoma <i>E. coli</i> Z42 in K12 (povzeto po Nakano in sod., 2001)	10
Slika 3: Podtipi PAI _{usp} in razporeditev genov <i>imu</i> , pri posameznih podtipih (povzeto po Kanamaru in sod., 2006)	11
Slika 4: Shematski prikaz organizacije funkcionalnih domen proteina Usp in proteinov Imu po rezultatih primerjave nukleotidnih zaporedij (povzeto po Parret in Mot, 2002).....	12
Slika 5: DNA lestvica λ /PstI (levo) in proteinski standard »PageRuler™ Prestained Protein Ladder«, ThermoFisher Scientific (desno).....	25
Slika 6: Shematski prikaz priprave plazmida pUSP4_BI.....	26
Slika 7: Shema poteka priprave plazmida pTUTG	27
Slika 8: Shema poteka priprave plazmida pΔHcpUsp_ <i>imu</i>	28
Slika 9: NaDS elektroforeza vzorcev zunajcelične frakcije seva <i>Bacillus megaterium</i> MS941 pPT-SP-lipA- <i>usp</i> po obarjanju z 80 % amonijevim sulfatom.....	41
Slika 10: NaDS elektroforeza vzorcev zunajcelične frakcije seva <i>Bacillus megaterium</i> MS941 pPT-SP-lipA- <i>usp</i> po dodatku 0,5 % ksiloze pri različnih vrednostih OD ₆₀₀	41
Slika 11: NaDS elektroforeza znotrajcelične in zunajcelične frakcije seva <i>Bacillus megaterium</i> MS941 pPT-SP-lipA- <i>usp</i> po indukciji sinteze proteina Usp z 0,5 % ksilozo pri OD ₆₀₀ 0,5.	42
Slika 12: Določanje proteina Usp v zunajcelični in znotrajcelični frakciji seva <i>Bacillus megaterium</i> MS941 pPT-SP-lipA- <i>usp</i> po barvanju proteinov s »Comassie brilliant blue« (levo) in specifičnimi protitelesi proti proteinu Usp (desno).....	42
Slika 13: Čiščenje proteina Usp z Ni-NTA afinitetno kromatografijo po sintezi v bakterijskih celicah <i>E. coli</i> Keio <i>minC</i> pLysE.	43
Slika 14: Frakcije proteina Usp med čiščenjem z Ni-NTA afinitetno kromatografijo po raztapljanju proteina iz inkluzijskih teles.	44
Slika 15: Proteina Usp in Usp-GFP po izolaciji iz inkluzijskih teles in čiščenju z Ni-NTA afinitetno kromatografijo.....	44
Slika 16: Proteina ΔHcp-Usp in Usp po prekomernem izražanju v sevu BL21 (DE3) in čiščenju z Ni-NTA afinitetno kromatografijo.	45
Slika 17: Proteina ΔHcp-Usp in Usp po čiščenju z Ni-NTA kromatografijo pred dializo in po dializi.	45
Slika 18: Primerjava koncentracij z Ni-NTA kromatografijo očiščenih proteinov Usp in Imu3 z rastopino BSA znane koncentracije.....	45
Slika 19: Kromatogram proteina Usp na koloni Superdex 200.....	46
Slika 20: NaDS-PAGE elektroforeza frakcij gelske kromatografije med čiščenjem proteina Usp.	46
Slika 21: DNazna aktivnost proteinov Usp in Usp_GFP izoliranih iz inkluzijskih teles.	47
Slika 22: Zunajcelične frakcije sevov MG1655, ki imajo zapis za protein Usp in različne kombinacije zapisov za proteine imunosti.	48

Slika 23: Zunajcelične frakcije sevov MG1655, ki imajo zapis za protein Usp in različne kombinacije zapisov za proteine imunosti po gojenju v gojišču LB ali M9, obarjanju z amonijevim sulfatom in ponovnem suspendiranju v urei ali PBS	48
Slika 24: Zunajcelične frakcije seva MG1655, MG1655 <i>usp</i> ⁺ in MG1655 <i>usp</i> ⁺ , <i>imu1</i> , 2, 3+ po gojenju v gojišču LB ali M9 in obarjanju s TCA.	49
Slika 25: Ugotavljanje prisotnosti proteina Usp v zunajceličnih frakcijah sevov MG1655, ki imajo različne kombinacije zapisov za protene imunosti, z uporabo protiteles proti proteinu Usp.	49
Slika 26: Primer PVDF membrane po detekciji aktina (levo) in γ H2AX (desno) v vzorcih biomase celične linije HeLa po infekciji z izbranimi sevi.	50
Slika 27: Kvantifikacija dvojnih prelomov DNA v inficiranih celicah HeLa pri multipliciteti infekcije 200.	51
Slika 28: Kvantifikacija dvojnih prelomov DNA v celicah HeLa po tretiranju s 100 μ l bakterijskega lizata.	51
Slika 29: Kvantifikacija dvojnih prelomov DNA v inficiranih celicah HUVEC pri multipliciteti infekcije 200.	52
Slika 30: Kvantifikacija dvojnih prelomov DNA v celicah HUVEC po tretiranju s 500 μ l bakterijskega lizata.	52
Slika 31: Kvantifikacija dvojnih prelomov DNA v inficiranih celicah HEK293 pri multipliciteti infekcije 500.	53
Slika 32: Kvantifikacija dvojnih prelomov DNA v celicah HUVEC po tretiranju s 500 μ l bakterijskega lizata.	53
Slika 33: Celice seva MG1655 (DE3) s fuzijo <i>usp-gfp</i> , ki je pod kontrolo z IPTG inducibilnega promotorja posnete s svetlobno (levo) in fluorescentno mikroskopijo (desno) (pozitivna kontrola)	54
Slika 34: Celice seva MG1655 (DE3) posnete s svetlobno (levo) in fluorescentno mikroskopijo (desno) (negativna kontrola)	54
Slika 35: Celice seva MG1655 s fuzijo <i>usp-gfp</i> , ki je pod kontrolo nativnega promotorja gena <i>usp</i> po gojenju v tekočem gojišču	55
Slika 36: Celice seva MG1655 s fuzijo <i>usp-gfp</i> , ki je pod kontrolo nativnega promotorja gena <i>usp</i>) po gojenju na trdnem gojišču	55

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>B. megaterium</i>	bakterija <i>Bacillus megaterium</i>
BAC	umetni bakterijski kromosom (ang. » <u>b</u> acterial <u>a</u> rtificial <u>c</u> hromosome«)
BSA	goveji serumski albumin (ang. » <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin«)
bp	bazni par
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
CDT	ang. » <u>c</u> ytolethal <u>d</u> istending <u>t</u> oxin«
CFU	ang. » <u>c</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nits«
cGMP	ciklični gvanozin monofosfat
CNF1	<u>c</u> itotoksični <u>n</u> ekrozirajoči <u>f</u> aktor 1
Da	dalton
DEC	<u>d</u> iarejagena <i>Escherichia coli</i>
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. » <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid«)
DSB	dvojni prelomi DNA (ang. » <u>d</u> ouble <u>s</u> trand <u>b</u> reaks«)
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
ECOR	zbirka referenčnih sevov bakterije <i>Escherichia coli</i> (ang. » <u>E</u> . <u>c</u> oli <u>r</u> eference«)
EHEC	enterohemoragični sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. » <u>e</u> ntero <u>h</u> aemorrhagic <u>E</u> . <u>c</u> oli«)
EIEC	enteroinvazivni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. » <u>e</u> ntero <u>i</u> nvasive <u>E</u> . <u>c</u> oli«)
EPEC	enteropatogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. » <u>e</u> ntero <u>p</u> athogenic <u>E</u> . <u>c</u> oli«)
ETEC	enterotoksigeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. » <u>e</u> ntero <u>t</u> oxigenic <u>E</u> . <u>c</u> oli«)
ExPEC	zunajčrevesni patogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. » <u>e</u> xtraintestinal <u>p</u> athogenic <u>E</u> . <u>c</u> oli«)
FBS	fetalni goveji serum (ang. » <u>f</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum«)
FPLC	tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov (ang. » <u>f</u> ast <u>p</u> rotein <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography«)
GFP	zeleni fluorescentni protein (ang. » <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein«)
HBSS	ang. » <u>H</u> ank's <u>b</u> alanced <u>s</u> alt <u>s</u> olution«
Hcp	ang. » <u>h</u> aemolysin- <u>c</u> oregulated <u>p</u> rotein«
HUS	<u>h</u> emoragični <u>u</u> remični <u>s</u> indrom
HUVEC	celice endotelija krvnih žil (ang. » <u>h</u> uman <u>u</u> mbilical <u>v</u> ein <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells«)
IMAC	afinitetna kromatografija z imobiliziranimi kovinskimi ioni (ang. » <u>i</u> mmobilized <u>m</u> etal- <u>a</u> ffinity <u>c</u> hromatography«)
IPEC	<u>i</u> ntestinalni (črevesni) patogeni sevi bakterije <i>Escherichia coli</i>
IPTG	izopropil- β -D-1- <u>t</u> iogalaktopiranozid
kb	kilobaza
kDa	kilodalton
LB	gojišče <u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
MIX	označevalec za efektorske molekule sistema za izločanje tipa VI
MLEE	<u>m</u> ulti <u>l</u> okusna <u>e</u> ncimska <u>e</u> lektroforeza
MLST	ang. » <u>m</u> ulti- <u>l</u> ocus <u>s</u> equencing <u>t</u> yping«

MOI	multipliciteta infekcije (ang. » <u>m</u> ultiplicity <u>o</u> f <u>i</u> nfection«)
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NMEC	sevi bakterije <i>Escherichia coli</i> , ki povzročajo neonatalni meningitis (ang. » <u>n</u> eonatal <u>m</u> eningitis <u>E. coli</u> «)
NTA	nitrilotriocetna kislina (ang. » <u>n</u> itrilo <u>t</u> riacetic <u>a</u> cid«)
OD	optična gostota (ang. » <u>o</u> ptical <u>d</u> ensity«)
OFR	odprti bralni okvir (ang. » <u>o</u> pen <u>r</u> eadin <u>g</u> <u>f</u> ra <u>m</u> e«)
PAI	otok patogenosti (ang. » <u>p</u> athogenicity <u>i</u> sland«)
PAI _{usp}	otok patogenosti na katerem je kodiran gen <i>usp</i>
PARP	poli-(<u>A</u> DP- <u>r</u> iboza) polimeraza
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza (ang. » <u>p</u> oly <u>a</u> cridamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis«)
PBS	fosfatni pufer (ang. » <u>p</u> hosphate <u>s</u> aline <u>b</u> uffer«)
PEG	polietilenglikol
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. » <u>p</u> olymerase <u>c</u> hane <u>r</u> ea <u>t</u> ion«)
PVDF	poli <u>v</u> inili <u>d</u> <u>f</u> luorid
RNA	ribonukleinska kislina (ang. » <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid«)
SEPEC	sevi bakterije <i>Escherichia coli</i> , ki povzročajo sepso (ang. » <u>s</u> epsis- causing <u>p</u> athogenic <u>E. coli</u> «)
<i>S. dysenteriae</i>	bakterija <i>Shigella dysenteriae</i>
TCA	trikloroocetna kislina (ang. » <u>t</u> ri <u>ch</u> loro <u>a</u> cetic acid«)
TL	<u>t</u> emperaturno <u>l</u> abilni toksin enterotoksigenih sevov bakterije <i>Escherichia coli</i>
TS	<u>t</u> emperaturno <u>s</u> tabilni toksin enterotoksigenih sevov bakterije <i>Escherichia coli</i>
T6SS	sistem izločanja tipa VI (ang. » <u>t</u> ype <u>6</u> <u>s</u> ecretion <u>s</u> istem«)
UPEC	<u>u</u> ropatogeni sevi bakterije <i>Escherichia coli</i> «
Usp	<u>u</u> ropatogeni <u>s</u> pecifični protein
Zot	ang. » <u>z</u> onula <u>o</u> ccludens <u>t</u> oxin«

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je komenzal prebavnega trakta, vendar patogeni sevi, ki producirajo virulentne dejavnike povzročajo črevesne in izvenčrevesne okužbe. Raziskave virulentnih dejavnikov patogenih sevov bakterije *E. coli* so pokazale, da sevi izolirani iz bolnikov s pielonefritisom, prostatitisom, urosepso in ulcerativnim kolitisom pogosteje kodirajo gen *usp* (za uropatogeni specifični protein). Gen *usp* (1,8 kb) je kodiran na majhnem otoku patogenosti (PAI_{usp}) in je povezan z dodatnimi tremi geni, in sicer geni *imu1-3*. Proteini Imu ščitijo producenta pred toksičnim delovanjem proteina Usp. N terminalni del proteina Usp je podoben proteinom Hcp (ang. »*haemolysin-coregulated protein*«), medtem ko je C terminalni del podoben DNazni domeni kolicinov. Zaradi podobnosti C terminalne domene proteina Usp z nekaterimi kolicini so domnevali, da deluje kot bakteriocin, ki nudi producentu kompetitivno prednost. Kljub temu je dokazano, da so tarče proteina Usp celice sesalcev, da deluje kot genotoksin in inducira apoptozo. Številne študije se osredotočajo na raziskovanje zastopanosti gena *usp* med različnimi izolati bakterije *E. coli*, vendar o aktivnosti in mehanizmu delovanja proteina Usp vemo razmeroma malo. Za nadaljnje raziskave je potrebno metodo njegove izolacije in čiščenja optimizirati in preučiti njegov učinek na celicah imunskega odziva.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V magistrskem delu smo želeli optimizirati izolacijo proteina Usp z izražanjem gena *usp* v sevu bakterije *Bacillus megaterium* kakor tudi v različnih ekspresijskih sistemih bakterije *E. coli* ter preučiti aktivnost očiščenega proteina na humanih monocitih. Poleg tega smo želeli pripraviti proteinske izolate proteinov Usp-GFP, ΔHcp-Usp in Imu3 zadovoljive čistosti in kvalitete za nadaljnje študije njihove aktivnosti.

Zanimalo nas je ali med gojenjem seva MG1655 PAI_{usp}⁺ pride do izločanja proteina Usp v bakterijsko gojišče kakor tudi, če po infekciji humanih celičnih linij z omenjenim sevom pride do nastanka dvojnih prelomov DNA. Želeli smo ugotoviti ali je izražanje gena *usp* v populaciji genetsko identičnih bakterij heterogeno.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Izolacija proteina Usp bo bolj učinkovita ob uporabi seva bakterije *Bacillus megaterium*, ki protein izloča
- Izoliran protein Usp deluje na celice imunskega sistema
- Z uporabo ekspresijskih sistemov bakterije *E. coli* lahko pridobimo proteinske izolate proteinov Usp-GFP, ΔHcp-Usp in Imu3 zadovoljive čistosti in koncentracije

- Sev MG1655 PA usp^+ po okužbi humanih celičnih linij inducira nastanek dvojnih prelomov DNA
- Izražanje gena *usp* v populaciji genetsko identičnih bakterij je heterogeno

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Escherichia coli*

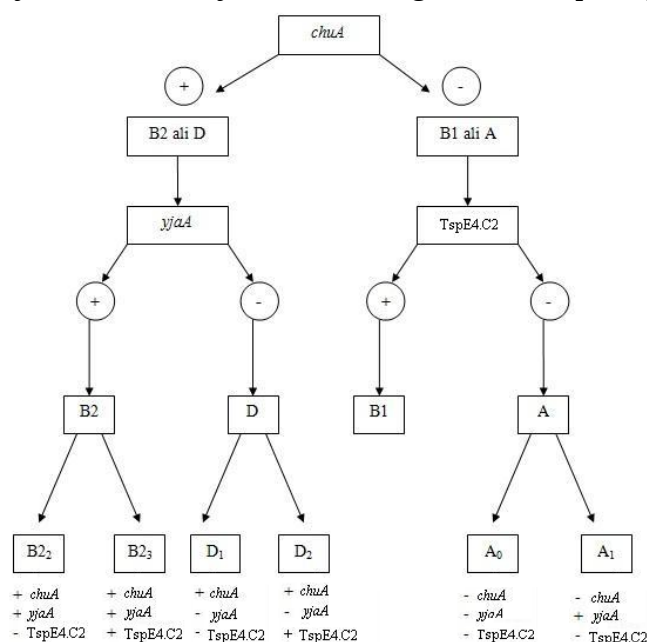
Prve domneve o obstoju človeškemu očesu skritega sveta mikroorganizmov se pojavljajo v 6. st. p. n. št. Pripadniki stare indijske religije Džainizem so verjeli v obstoj »živih klic«. Na prvi dokaz o obstoju mikroorganizmov je človeštvo čakalo več kot dva tisoč let, ko je Antony Leeuwenhoek leta 1675 s svojim primitivnim mikroskopom prvič videl in opisal, po njegovih besedah, »majhne živali«. V zgodovino mikrobiologije pa je z zlatimi črkami zapisano ime francoskega kemika in mikrobiologa Louisa Pausterja, saj je v šestdesetih letih devetnajstega stoletja dokončno ovrgel teorijo o spontani generaciji in si s tem upravičeno prislužil ime »oče mikrobiologije«. Sodobnik Pasteurja, nemški zdravnik, bakteriolog in Nobelov nagrajenec Robert Koch je desetletje pozneje dokazal, da je bakterija *Bacillus anthracis* povzročiteljica antraksa, kar je bil prvi znanstveni dokaz, da mikroorganizmi povzročajo bolezen. Z odkritji Pausterja in Kocha se je tako začelo novo obdobje v zgodovini medicine, prve korake pa je naredila tudi nova znanstvena veda - mikrobiologija.

V 80-ih letih devetnajstega stoletja je bil nemški pediater in bakteriolog Theodor Escherich, zgrožen nad porazno statistiko o visoki smrtnosti novorojenčkov in dojenčkov zaradi diareje. Intenzivno je raziskoval črevesne bakterije novorojenčkov in dojenčkov. V znanstveni monografiji objavljeni leta 1885, Escherich ugotavlja povezavo med črevesnimi bakterijami in fiziologijo prebave dojenčkov ter prvič omenja bakterijo *Bacillus communis coli*. Pri tem ugotavlja, da število bakterij vrste *Bacillus communis coli* ni odvisno od načina prehrane dojenčkov in domneva, da je omenjena bakterija, v odsotnosti patoloških sprememb v črevesju, popolnoma neškodljiva (Escherich, prevod v angleški jezik, 1989). Po smrti Theodora Eschericha, enega vodilnih bakteriologov tistega časa, so bakterijsko vrsto *Bacillus communis coli* njemu v čast preimenovali v *Escherichia coli* (*E. coli*).

Danes je bakterija *E. coli* eden izmed najpomembnejših modelnih organizmov kakor tudi najbolj preučen mikroorganizem. Z uporabo referenčnega seva *E. coli* K-12 in derivatov tega so znanstveniki prišli do prelomnih dosežkov in odkritij na področju genetike, molekularne biologije, mikrobne fiziologije in biokemije. Poleg tega je vrsta *E. coli* del mikrobiote prebavnega trakta ljudi in toplokrvnih živali kakor tudi vsestranski patogen, ki lahko povzroči najrazličnejše okužbe. Razpon sevov bakterije *E. coli* se giblje od popolnoma neškodljivih in celo koristnih, do patogenih sevov, ki letno terjajo več kot dva milijona človeških življenj (Tenaillon in sod., 2010). Tak razpon je možen zaradi horizontalnih genskih prenosov, izgube ali pridobitve mobilnih genetskih elementov in zaradi različnih mutacij. Sevi vrste *E. coli* imajo v povprečju okrog 4800 genov. Pri tem je stalni del genoma iz približno 2000 genov, medtem ko pan genom vrste preseže 10 000 genov (Alteri in Mobley, 2012). To kaže na veliko genetsko variabilnost sevov in posledično zelo različne fenotipske manifestacije - govorimo o komenzalnih in patogenih sevih v eni sami bakterijski vrsti.

2.2 FILOGENETSKE SKUPINE BAKTERIJE *E. coli*

Znanstveniki so domnevali da, kljub veliki raznolikosti, obstaja genetska strukturiranost sevov vrste *E. coli*. Kvantitativne študije populacijske genetike sevov vrste *E. coli* so se začele v sedemdesetih letih dvajsetega stoletja. Pričetnik tovrstnih raziskav je bil Ameriški znanstvenik Roger Milkman (1973), ki je z metodo elektroforetske mobilnosti encimov ugotavljal variabilnost med sevi bakterije *E. coli*, izoliranih iz različnih, geografsko nepovezanih naravnih virov. Metoda ugotavljanja elektroforetske mobilnosti encimov oz. multilokusna encimska elektroforeza (MLEE) je, po objavi izsledkov Milkmanove študije, postala ključna metoda za raziskovanje raznolikosti bakterijskih sevov. V začetku osemdesetih let dvajsetega stoletja se vrstijo objave z rezultati MLEE analize različnih sevov bakterije *E. coli* kar je privedlo do ustanovitve ECOR (ang. »*E. coli* reference«) zbirke, ki je vsebovala 72 humanih sevov in 16 sevov izoliranih iz drugih sesalcev (Chaudhuri in Henderson, 2012). Leta 1990 so Hezer in sodelavci objavili rezultate študije variabilnosti sevov zbirke ECOR. Uporabljali so takrat že ustaljeno metodo MLEE, pri čemer so ugotavljali razlike v elektroforetski mobilnosti 20-ih encimov. Na podlagi dobljenih rezultatov, so seve bakterije *E. coli* razvrstili v štiri filogenetske skupine: A, B₁, B₂ in D. Deset let kasneje Clermont in sodelavci (2000) domnevajo, da so nekateri geni ali fragmenti genov lahko specifični za določene filogenetske skupine. S preučevanjem treh potencialnih genskih označevalcev, in sicer gena *chuA*, ki je potreben za transport hema pri sevu *E. coli* O157:H7, gena *yjaA*, katerega funkcija ni znana in fragmenta TSPE4.C2, so ugotovili, da je z metodo tripleks-PCR možno razvrščanje sevov bakterije *E. coli* v štiri prej omenjene filogenetske skupine. Na podlagi ugotavljanja prisotnosti ali odsotnosti omenjenih genskih označevalcev so razvili hitro, cenovno ugodno in enostavno metodo ter pripravili drevo odločanja za razvrščanje sevov bakterije *E. coli* v filogenetske skupine (slika 1).



Slika 1: Drevo za razvrščanje sevov bakterije *E. coli* v filogenetske skupine (povzeto po Clermont in sod., 2000)

Danes je dostopnih nekaj različnih tehnik za ugotavljanje filogenetskih skupin, pri čemer je MLST analiza (ang. »multilocus sequences type«) zlati standard (Derakhshandeh in sod., 2013). Prav rezultati filogenetske tipizacije sevov *E. coli* na podlagi analize MLST so razkrili, da je razvrščanje sevov v filogenetske skupine z metodo tripleks-PCR do 85 % natančno (Iranpour in sod., 2015). Širjenje podatkovne baze analiz MLST in sekvenciranih genomov različnih sevov bakterije *E. coli* je dopolnilo razumevanje njihove filogenetske strukture. Clermont in sodelavci so leta 2013, z uporabo novih podatkov o genomih sevov bakterije *E. coli*, dopolnili metodo tripleks-PCR. Pri tem so prepoznali dodatni genski označevalec, in sicer gen *arpA* ter razvili metodo multipleks-PCR za razvrščanje sevov v filogenetske skupine. Na podlagi prisotnosti ali odsotnosti štirih genskih označevalcev so izolate bakterije *E. coli* uvrstili v naslednje filogenetske skupine: A, B₁, B₂, C, D, E, F in skupino I. Po validaciji na novo opisane metode so ugotovili, da je njena natančnost 95 % (Clermont in sod., 2013).

Uvrščanje izolatov bakterije *E. coli* v filogenetske skupine ima velik klinični in epidemiološki pomen. Številne študije kažejo na povezanost filogenetske uvrstitve in genotipskih ter fenotipskih značilnosti sevov kar je posledično povezano tudi s kliničnimi manifestacijami (Johnson in Russo, 2002, 2005; Alteri in Mobley, 2012; Derakhshandeh in sod., 2013; Clermont in sod., 2013). Sevi bakterije *E. coli*, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe, večinoma sodijo v filogenetsko skupino B₂ ali, redkeje v skupino D, medtem ko večina komezalnih sevov sodi v skupino A ali B₁ (Derakhshandeh in sod., 2013; Clermont in sod., 2013; Iranpour in sod., 2015). Večina sevov odpornih proti antibiotikom sodi v skupino A ali B₁, vendar izsledki več študij kažejo na naraščanje odpornosti proti antibiotikom tudi med sevi skupine B₂, kakor tudi da sevi iz filogenetske skupine B₂ kažejo vse večjo prevalenco med izolati iz črevesja zdravih ljudi (Nowrouzian in sod., 2005; Bukh in sod., 2009; Tenaillon in sod., 2010; Mukherjee, 2013; Iranpour in sod., 2015). Prevlada sevov iz filogenetske skupine B₂ ali, kot jo nekateri znanstveniki imenujejo, filogenetske skupine patogenih sevov bakterije *E. coli*, je lahko tudi zaskrbljujoča. Ob tem se postavlja vprašanje ali horizontalno pridobljene genske determinante vodijo v nastanek vedno bolj patogenih sevov kakor tudi kaj so potencialni vzroki takšnega trenda med bakterijami črevesne mikrobiote.

2.3 ZNAČILNOSTI KOMENZALNIH SEVOV BAKTERIJE *E. coli*

Seve bakterije *E. coli* na podlagi genetskih in kliničnih kriterijev razvrščamo med komezalne seve, črevesne patogene seve ali zunajčrevesne patogene seve (Russo in Johnson, 2000). *E. coli* je ena izmed prvih bakterijskih vrst, ki kolonizira prebavni trakt novorojenčkov. Pri odraslih je v debelemu črevesju, predvsem v slepem črevesju in kolonu, prisotna v koncentraciji okrog 10⁸ cfu/g (ang. »colony forming units«) fecesa kar predstavlja približno 0,1 % črevesne mikrobiote človeka (Tenaillon in sod., 2010; Gao in sod., 2014). Nahaja se predvsem v sluzi črevesja, medtem ko v lumen preide z razgradnjo komponent sluzi in je nato izločena s fecesom. Vzajemnost v odnosu med bakterijo *E. coli* in človekom se kaže v tem, da človek kot gostitelj bakteriji predstavlja vir hranil, ji nudi stabilno okolje in zaščito pred zunanjimi stresnimi dejavniki ter omogoča prenos in širjenje (Tenaillon in sod., 2010). Na

drugi strani so sevi vrste *E. coli* kot del normalne črevesne mikrobiote prilagojeni na sobivanje z gostiteljem in s tem preprečujejo kolonizacijo gostitelja z enteropatogenimi mikroorganizmi, pomagajo pri oblikovanju homeostaze epitelijskih celic ter spodbujajo razvoj imunskega sistema (Russo in Johnson, 2000; Hudault in sod., 2001). Gre torej za odnos od katerega imata oba koristi.

Gao in sodelavci (2014) so ugotovili, da se sestava združbe komenzalnih sevov bakterije *E. coli* spreminja v odvisnosti od načina prehrane in je odvisna od zdravstvenega stanja osebe. Prebavni trakt je zelo kompleksna ekološka niša kjer interakcije med gostiteljem in njegovo črevesno mikrobioto, oblikujejo raznolikost mikrobne združbe. Seleksijski pritiski v takšnem okolju lahko spodbudijo širjenje virulentnih dejavnikov in genov za rezistenco proti antibiotikom, s tem pa lahko komenzalni sevi bakterije *E. coli* postanejo tudi vir genov virulence in rezistence (Tenaillon in sod., 2010). To kaže, da odnos med bakterijo in gostiteljem lahko niha od mutualizma in komenzalizma, do nastanka oportunističnih ali celo striktnih patogenov.

2.4 DIAREAGENI SEVI BAKTERIJE *E. coli*

Črevesni patogeni sevi vrste *E. coli* so za razliko od komenzalnih sevov, redko izolirani iz fecesa zdravih ljudi kar pomeni, da so striktni patogeni in, v kolikor so prisotni v zadostni infektivni dozi, povzročajo gastroenteritise ali kolitise. Kljub zmožnosti, da povzročijo patološke spremembe v črevesju, diareageni sevi bakterije *E. coli* večinoma niso sposobni povzročiti bolezni izven prebavnega trakta (Russo in Johnson, 2000). Poznamo vsaj šest patotipov diarejagenih (DEC) ali intestinalnih patogenih sevov vrste *E. coli* (IPEC), in sicer enteropatogeni sevi *E. coli* (EPEC), enterotoksigeni (ETEC), enterohemoragični (EHEC), enteroinvazivni (EIEC) in enteroagregativni sevi *E. coli* (EAEC) (Köhler in Dobrindt, 2011). Kljub določenemu prekrivanju nekaterih lastnosti različnih patotipov, ima vsak patotip edinstveno kombinacijo virulentnih dejavnikov kar privede do različnih mehanizmov patogeneze.

EPEC so povzročitelji enteritisov. Pri tem se tesno pritrdijo na mikroviluse enterocitov in povzročijo spremembe v citoskeletu kar privede do nastanka podstavku podobne strukture. Porušena struktura enterocitov pomeni njihov propad pri čemer so uničeni tesni stiki med njimi. Sprememba v vsebnosti ionov v črevesju se nato klinično manifestira kot diareja (Nataro in Kaper, 1998; Andlovic, 2002; Chaudhuri in Henderson, 2012). V državah v razvoju so EPEC najpogostejši povzročitelji diareje pri dojenčkih (Andlovic, 2002).

ETEC so, v državah v razvoju, vodilni vzrok diareje pri otrocih. Poleg tega so najpogostejši povzročitelji potovalne diareje (Andlovic, 2002; Chaudhuri in Henderson, 2012). Enterotoksigeni sevi izločajo dva toksina, in sicer temperaturno stabilni (TS) in temperaturno labilni toksin (TL). Toksina v enterocitih povzročata povečanje ravni molekul cikličnega adenozin monofosfata (cAMP) in cikličnega gvanozin monofosfata (cGMP) kar ima za posledico spremenjeno dejavnost ionskih črpalk v membrani enterocitov. Zaradi porušenega

fiziološkega delovanja ionskih črpalk pride do zaviranja vstopa ionov Cl^- in Na^+ v enterocite in obenem povečanega izstopa ionov Cl^- in HCO_3^- iz enterocitov (Koren, 2002). Ker voda iz enterocitov in v enterocite prehaja po zakonih difuzije in ker je, zaradi porušenega delovanje ionskih črpalk, koncentracija ionov višja v lumnu črevesja, se okužba manifestira kot obsežna vodena diareja.

Za enterohemoragične seve bakterije *E. coli* je značilno, da izločajo toksin, ki je strukturno in funkcionalno podoben Šigovim toksinom bakterije *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*). Povzročajo hemoragični kolitis, ki je predvsem pri majhnih otrocih in starejših osebah, povezan z nevarnimi zapleti kot je hemoragični uremični sindrom (HUS) z ledvično odpovedjo in nevrološkimi težavami (Andlovic, 2002). Najbolj znan serotip iz te skupine DEC je *E. coli* O157:H7, ki je v preteklosti povzročil nekaj izbruhov širom sveta.

Klinična manifestacija okužbe z EIEC je zelo podobna okužbi z bakterijo *S. dysenteriae*, vendar simptomatsko blažja. EIEC vdirajo v epitelijske celice debelega črevesja, in se lahko širijo lateralno, vendar ne proizvajajo toksinov (Chaudhuri in Henderson, 2012). Za razliko od EIEC, enteroagregativni sevi bakterije *E. coli* sintetizirajo toksine podobne temperaturno stabilnim toksinom ETEC in hemolizinu ter imajo značilen vzorec vezave na površino enterocitov (Chaudhuri in Henderson, 2012).

2.5 ZUNAJČREVESNI PATOGENI SEVI BAKTERIJE *E. coli*

V skupino zunajčrevesnih patotipov vrste *E. coli* (ExPEC, ang. »extraintestinal pathogenic *E. coli*«) sodijo vsi sevi, ki lahko povzročijo zunajčrevesne okužbe. Kljub temu so zunajčrevesni patotipi v črevesju popolnoma neškodljivi in so s človekom primarno povezani v komenzalnem odnosu. V primeru, ko lahko zapustijo primarno ekološko nišo pa delujejo kot patogeni. Russo in Johnson (2000) navajata, da zunajčrevesni patotipi predstavljajo približno 20 % vseh fekalnih sevov bakterije *E. coli*. Med vsemi patotipi bakterije *E. coli*, imajo ExPEC na splošno največje število otkov patogenosti in horizontalno pridobljenih genov. Plastičnost genoma bakterije *E. coli* omogoča prilagoditev bakterije na različne ekološke niše.

Med klinično najpomembnejše skupine ExPEC sodijo uropatogeni sevi (UPEC, ang. »uropathogenic *E. coli*«), nato sevi, ki lahko povzročijo sepsa (SEPEC, ang. »sepsis- causing pathogenic *E. coli*«) kakor tudi sevi, ki povzročajo neonatalni meningitis (NMEC, ang. »neonatal meningitis- associated *E. coli*«). SEPEC so najpogostejši vzrok nehospitalne bakteriemije in sepse, medtem ko so NMEC vodilni vzrok neonatalnega meningitisa in neonatalne sepse, ki pogosto vodi v resne posledice ali celo smrt (Johnson in Russo, 2005; Rijavec in sod., 2008; Wang in sod., 2012).

2.5.1 Uropatogeni sevi bakterije *E. coli* (UPEC)

Najpogostejša oblika zunajčrevesne okužbe z bakterijo *E. coli* je okužba urinarnega trakta (Johnson, 1991). Sevi UPEC povzročajo večino akutnih in velik del kroničnih okužb sečil (Andlovic, 2002). Epidemiološki podatki kažejo, da UPEC letno povzročijo okrog 150

milijonov urinarnih okužb kar predstavlja 70-90 % vseh urinarnih okužb (Brzuszkiewicz in sod., 2006). Ker je okužba sečil z bakterijo *E. coli* lahko tudi asimptomatska, je dejansko število okuženih verjetno še večje.

UPEC so genotipsko in fenotipsko heterogena skupina izolatov, ki kažejo edinstveno sposobnost, da komenzalni odnos, v s hranili bogati ekološki niši kot je črevesje, spremenijo v patogenega v, s hranili siromašnem okolju, kot je urinarni trakt. Njihova heterogenost se kaže v prisotnosti različnih virulentnih dejavnikov, ki bakteriji omogočajo kolonizacijo, vdor v gostitelja kakor tudi ohranjanje v urinarnem traktu (Wang in sod., 2009). Pri patogenezi uropatogenih sevov *E. coli* gre za sinergistično delovanje več virulentnih dejavnikov (Yamamoto, 2007). Sevi UPEC imajo večinoma vsaj en sistem adhezije, ki omogoča pritrditev na uroepiteljske celice. Najznačilnejši med virulentnimi dejavniki so pilusi imenovani fimbrije P, ki so povezane s pielonefritisom (Andlovic, 2002). Poleg fimbrij P, imajo sevi UPEC pogosto fimbrije tipa 1, fimbrije S in F kakor tudi afimbrijske adhezine (Tiba in sod., 2008). Vsi naštetni dejavniki so pomembni v začetnih fazah okužbe kjer omogočajo stabilno pritrditev bakterije kar prepreči odplakovanje s tokom urina. Pogosti dejavniki, ki omogočajo preživetje in rast v gostitelju so sistemi za privzem železa (primer aerobaktin), sistemi za zaščito proti serumu in antigen K1. Poleg tega, citotoksini kot sta hemolizin in citotoksični nekrotizirajoči faktor (CNF) povzročajo direktne poškodbe tkiv gostitelja (Yamamoto in sod., 2001). Poleg že prej opisanih in definiranih virulentnih dejavnikov, Kurazono in sodelavci leta 1999 poročajo o novem domnevnem otoku patogenosti PAI_{usp} sevov UPEC, ki ima zapis za uropatogeni specifični protein (Usp) in tri dodatne majhne odprte bralne okvirje.

Kljub heterogenosti so sevi UPEC večinoma omejeni na relativno nizko število O seroloških skupin. Pomembne seroskupine so O1, O2, O4, O6, O18 in O75 (Petrovska, 2002). Pri tem sta dva seva iz skupine O6, in sicer sev 536 in sev CFT073 splošno sprejeta modelna organizma UPEC. Sekvenciranje genoma seva CFT073 je razkrilo prisotnost velikega števila horizontalno pridobljenih genov pri čemer je kar 1623 (21,2 %) genov specifičnih samo za omenjeni sev (Brzuszkiewicz in sod., 2006). Ima celo 13 otokov patogenosti in, s 5388 predvidenimi geni, največji genom med sekvenciranimi genomi sevov bakterije *E. coli* (Touchon in sod., 2009). Sev *E. coli* 536 (O6:K15) ima 4 otoke patogenosti velikosti med 70 in 190 kb (Dobrindt in sod., 2002; Hacker in sod., 1997).

2.6 OTOK PATOGENOSTI PAI_{usp}

2.6.1 Odkritje PAI_{usp} in njegova prevalenca

Med preučevanjem dejavnikov patogenosti diareagenih sevov bakterije *Vibrio cholerae*, so Fasano in sodelavci (1991) pokazali, da ima toksin Zot (ang. »zonula occludens toxin«), z vplivom na strukturo medceličnih tesnih stikov, pomembno vlogo pri povečanju prepustnosti črevesnega epitelijskega. Domnevali so, da je omenjeni toksin lahko predstavnik nove družine bakterijskih toksinov in da so njegovi homologi lahko prisotni tudi pri drugih enteropatogenih in uropatogenih bakterijah. Med iskanjem homologov gena *zot* v uropatogenih sevih bakterije

E. coli so Kurazono in sodelavci (1999), pri UPEC sevu Z42 izoliranem iz bolnika s prostatitisom, po naključju odkrili novi odprti bralni okvir (ORF, ang. »open reading frame«). Ugotovili so, da ima 84,9 % analiziranih sevov UPEC novoodkriti gen in samo 24 % sevov *E. coli* izoliranih iz fecesa zdravih ljudi. Zaradi velike zastopanosti novoodkritega gena v sevih UPEC, so ga poimenovali *usp* (ang. »uropathogenic specific protein«).

Tudi kasnejše molekularno epidemiološke študije so pokazale visoko prevalenco gena *usp* med sevi ExPEC. V Sloveniji in Braziliji so zaznali statistično značilno povezanost gena *usp* s sevi bakterije *E. coli*, ki so bili izolirani iz krvi bolnikov s sepsom (Ananias in Yano, 2008; Rijavec in sod., 2008). 34 % do 36 % sevov izoliranih iz krvi bolnikov je bilo *usp* pozitivnih, pri čemer je bila večja zastopanost gena *usp* opazna pri izolatih iz imunokompetentnih bolnikov. Park in sodelavci (2009) so gen *usp* dokazali pri 79 % izolatov bakterije *E. coli* iz urina bolnikov z diagnosticirano okužbo urinarnega trakta, kar 55 % izolatov pa iz urina zdravih ljudi. Skupina Japonskih raziskovalcev je pokazala, da imajo gen *usp* pogostejše sevi *E. coli*, izolirani iz bolnikov s pielonefritisom (93 %) kot pa sevi izolirani iz bolnikov s cistitisom (79,4 %) (Kanamaru in sod., 2006). Do podobnih ugotovitev so prišli Bauer in sodelavci (2002), ki prav tako ugotavljajo visoko prevalenco gena *usp* med sevi iz bolnikov s pielonefritisom. Ugotavljali so tudi prisotnost gena *usp* med izolati bakterije *E. coli* iz bolnikov z okužbo urinarnega trakta v ZDA in Izraelu, kakor tudi med sevi iz otrok s pielonefritisom na Finskem. Tudi te raziskave so pokazale največ *usp*-pozitivnih sevov v zbirki sevov iz bolnikov s pielonefritisom (82,4 %), medtem ko je bila povprečna zastopanost gena *usp* med izolati vseh treh zbirk uropatogenih sevov 63,7 % (Bauer in sod., 2002). Na drugi strani so raziskovalci iz Brazilije ugotovili, da je zastopanost gena *usp* pri izolatih iz bolnikov s cistitisom presenetljivo nizka (22,2 %). Razlike v zastopanosti gena *usp* med izolati iz različnih delov sveta so razložili s predpostavko, da so bakterijski kloni v svetovnem merilu različno porazdeljeni (Tiba in sod., 2008). Gen *usp* je pogosto v sekvenčnem tipu bakterije *E. coli* ST131. Omenjeni sekvenčni tip je zelo razširjen v različnih delih sveta, zajema večinoma patogene in pogosto proti antibiotikom odporne seve ter sodi v filogenetsko skupino B₂ (Van der Bij in sod., 2012).

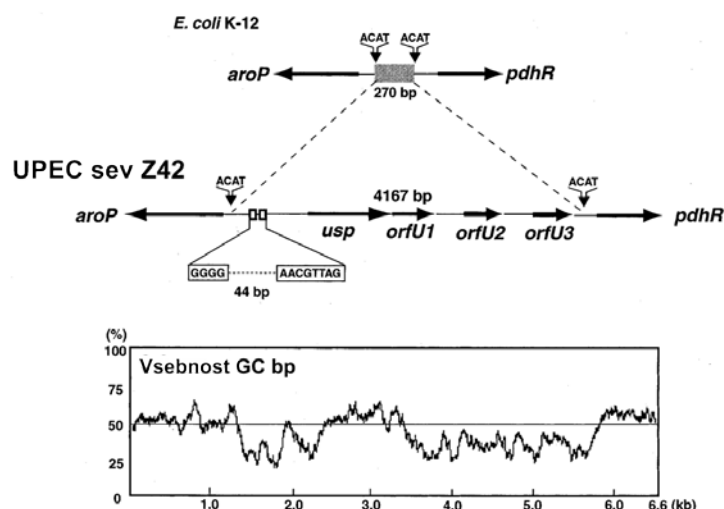
Izsledki več študij kažejo na tesno povezanost gena *usp* in filogenetske skupine B₂. Kanamaru in sodelavci (2006) so ugotovili, da se 94,9 % *usp*-pozitivnih sevov uvrsti v filogenetsko skupino B₂, kakor tudi, da ima 96 % sevov iz skupine B₂ zapis za Usp. Gen *usp* je tesno povezan z geni za druge virulentne dejavnike sevov UPEC npr., z genom *kpsMT* (kapsula skupine II) in *ompT* (gen za proteazo T zunanje membrane). Prisotnost genov *iroN* (kateholatni sideroforni receptor), *kpsMT*, *ompT* in *usp* pozitivno korelira z drugimi pogostimi virulentnimi dejavniki sevov UPEC, kot so *pap* (P fimbrije), *sfa/foc* (S-/F1C fimbrije), *hly* (hemolizin) in *cnf1* (citotoksični nekrotizirajoči faktor 1) (Kanmaru in sod., 2003).

V modelu ugotavljanja smrtnosti miši po okužbi z različnimi sevi bakterije *E. coli*, je bil gen *usp*, skupaj z geni *malX* (označevalec otokov patogenosti), *pap* in *fyuA* (sistem jersinijabaktina) statistično značilno povezan s tako imenovanimi ubijalskimi sevi (Johnson in

sod., 2006). Johnson in sodelavci so kot ubijalske seve definirali tiste seve, ki so sedem dni po subkutani aplikaciji povzročili več kot 90 % smrtnost miši.

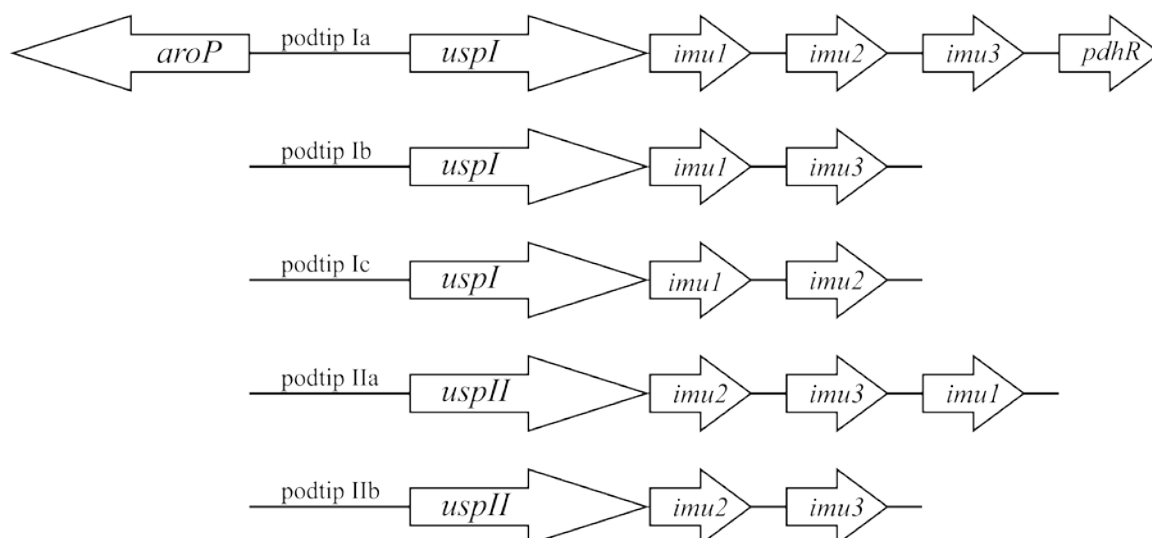
2.6.2 Značilnosti PAI_{usp}

Gen *usp* (1,8 kb) je kodiran na majhnem otoku patogenosti (PAI_{usp}) in je povezan z dodatnimi tremi geni, in sicer geni *imu1-3*. Geni *imu* so bili prvotno označeni kot *orfU1-3*, vendar ker proteini Imu ščitijo producenta pred toksičnim delovanjem proteina Usp, so Nipič in sodelavci predlagali preimenovanje v *imu1-3*. Primerjava genomske sekvence sevov *E. coli* Z42 in K12 je razkrila, da je PAI_{usp} dolg 4167 bp in, da se nahaja v intergenski regiji med gospodinjskima genoma *aroP* in *pdhR* (slika 2). Drugačna vsebnost GC baznih parov kakor tudi prisotnost motiva GGGG-ACGTTAAG, ki je značilen za družino transpozonov Tn3, kaže da je PAI_{usp} pridobljen s horizontalnimi genskimi prenosi (Nakano in sod., 2001). Poleg tega sta v medgenski regiji *aroP*-*pdhR* pri obeh sevih direktni ponovitvi nukleotidov ACAT, kar spominja na tarčno mesto duplikacije, ki nastane pri vstavljanju insercijskih sekvenc.



Slika 2: Primerjava nukleotidnega zaporedja medgenske regije *aroP*-*pdhR* med sevoma *E. coli* Z42 in K12 (povzeto po Nakano in sod., 2001)

Primerjalne študije sevov UPEC so pokazale variabilnost gena *usp* kakor tudi strukture otoka patogenosti PAI_{usp}. Razlike med različicami gena *usp* so predvsem na 3' koncu gena, ki kodira DNazno domeno proteina Usp. Pri tem ločimo dve skupini, ki sta označeni *uspI* in *uspII*. Poleg tega je struktura PAI_{usp}, navzdol od gena *usp*, mozaična in se kaže v različni razporeditvi genov *imu*, pri čemer je eden izmed genov *imu* lahko tudi odsoten (Nakano in sod., 2001). Pri genski različici *uspI* je gen *imu1* navzdol od gena *usp*, medtem ko je pri *uspII*, *imu2* navzdol od *usp*. Na podlagi opisanih razlik, so Kanamaru in sodelavci leta 2006 variante PAI_{usp} uvrstili v štiri podtipe, in sicer Ia, Ib, IIa in IIb. Na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani so odkrili še podtip PAI_{usp} Ic (slika 3). To je edini podtip PAI_{usp} pri katerem je odsoten gen *imu3*.



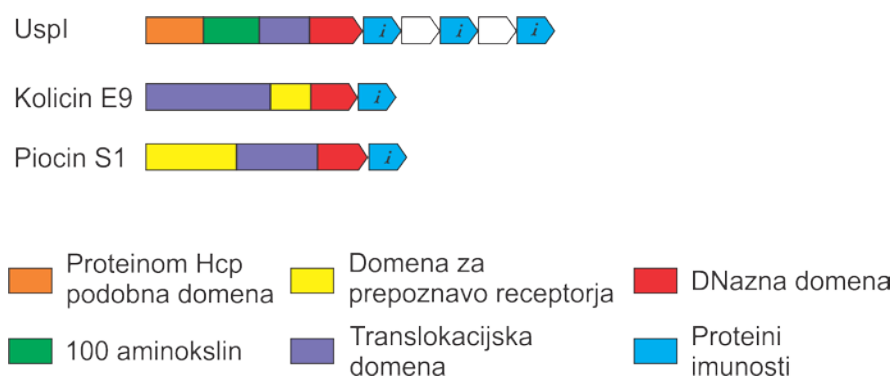
Slika 3: Podtipi PAIusp in razporeditev genov *imu*, pri posameznih podtipih (povzeto po Kanamaru in sod., 2006)

Molekularno epidemiološki podatki kažejo, da je najpogostejši podtip PAIusp IIa (prisoten pri 42,4 % analiziranih sevov UPEC), nato sledi podtip Ia (28,4 % analiziranih sevov UPEC). Podtip Ib (prisoten v 9,8 % analiziranih sevov UPEC) in podtip IIb (prisoten v 2,7 % analiziranih sevov UPEC) sta precej redka. PAIusp podtip Ia je pogostejši v izolatih iz bolnikov s prostatitisom, nato cistitisom in pielonefritisom, medtem ko preostali podtipi ne kažejo razlik v porazdelitvi med sevi UPEC, izoliranih iz različnih okužb. Različni podtipi PAIusp kažejo drugačno zastopanost v seroloških skupinah, ki so specifične za seve UPEC. Tako je podtip Ia najpogostejši v seroloških skupinah O4, O22 in O25, Ib je najpogostejši v serološki skupini O75, medtem ko je podtip IIa najpogostejši v seroloških skupinah O1, O6, O16 in O18. Za razliko od preostalih podtipov PAIusp, je podtip IIb edini izjemno redko povezan s pogostimi serološkimi skupinami sevov UPEC, kakor tudi z drugimi pogostimi virulentnimi dejavniki. Tesna korelacija podtipov PAIusp Ia in IIa, ki imata vse tri gene *imu* in drugih pogostih virulentnih dejavnikov sevov UPEC kakor tudi pripadnost filogenetski skupini B₂ nakazuje, da so vsi trije geni *imu* lahko pomembni pri patogenezi urinarnih okužb (Kanamaru in sod., 2006).

2.6.3 Napovedovanje značilnosti proteinov PAIusp z uporabo bioinformacijskih orodij

Orodja v bioinformatiki so omogočila prvi vpogled v domnevno aktivnost in mehanizem delovanja proteinov PAIusp. Poravnava in primerjava nukleotidnega zaporedja PAIusp z nukleotidnimi zaporedji v podatkovnih bazah je razkrila podobnost proteina Usp s kolicini nukleaznega tipa in S piocini (Parret in De Mot, 2002). Skupna značilnost nukleaznih kolicinov in S piocinov je toksično delovanje usmerjeno proti sorodnim vrstam ali sevom iste vrste z razgradnjo DNA tarčnih celic. Nukleotidno zaporedje za C- terminalno domeno proteina Usp (138 aminokislin) kaže 40-45 % podobnost nukleotidnemu zaporedju DNazne domene S piocinov. Poleg tega je v C-terminalni regiji možno prepoznati motiv endonukleaz HNH (Parret in De Mot, 2002). Motiv HNH je pogost modul za vezavo in cepitev nukleinskih kislin. Črke HNH označujejo najbolj ohranjene aminokislinske ostanke, in sicer dva

histidinska (H) in asparginski ostanek (N). Motiv HNH večinoma vsebuje 30 do 40 aminokislinskih ostankov in vezan divalentni kation (najpogosteje Zn^{2+}). Znanih je že več kot 1000 proteinov z motivom HNH pri organizmih vseh kraljestev (Huang in Yuan, 2007). V veliko družino HNH endonukleaz sodijo tudi S piocini in kolicini DNaznega tipa (Ku in sod., 2002). Geni *imu* kažejo 40-50 % podobnost genom imunosti DNaznih kolicinov in S piocinov. Na podlagi podobnosti nukleotidne sekvence proteina Usp s kolicini in S piocini, kakor tudi podobnosti genov *imu* z geni za proteine imunosti kolicinov in S piocinov, sta Parret in De Mot (2002) domnevala, da je Usp bakteriocin z nukleazno aktivnostjo. Vendar, za razliko od genov, ki imajo zapis za kolicine in S piocine, je gen *usp* na 5' koncu podaljšan in ta del gena ima motiv, ki je pogost v družini proteinov Hcp. Proteini Hcp (ang. »haemolysin-coregulated protein«) so opisani kot proteini bakterije *Vibrio cholerae*, ki se izločajo s hemolizinom in so del sistema za izločanja tip VI (Filloux in sod., 2008). Proteine podobne proteinom Hcp najdemo v genomih nekaterih patogenov človeka (Kapitein in Mogk, 2013). V genu za protein Usp, se pred delom gena, ki kodira DNazno domeno nahaja domnevna translokacijska domena. Slednja je za okrog 35 % podobna translokacijski domeni S piocinov in kolicinov (slika 4)(Parret in De Mot, 2002).



Slika 4: Shematski prikaz organizacije funkcionalnih domen proteina Usp in proteinov Imu po rezultatih primerjave nukleotidnih zaporedij (povzeto po Parret in Mot, 2002)

2.6.4 Delovanje proteinov PAI_{usp}

Nedolgo po odkritju otoka patogenosti PAI_{usp}, so Yamamoto in sodelavci (2001) v mišjem modelu ascendentne okužbe mehurja pokazali, da gen *usp* poveča infektivnost laboratorijskega seva *E. coli* JM109, vendar ne vpliva na smrtnost modelnega organizma. K infektivnosti rahlo prispevajo tudi geni *imu1-3*. Patološke spremembe in značilni znaki vnetja ledvic po infekciji mišk s sevoma *E. coli* JM109 *usp*⁺ in *E. coli* JM109 *usp imu1-3*⁺ kažejo, da je *usp* pomemben virulentni dejavnik sevov UPEC. Ker ne vpliva na smrtnost, Yamamoto in sodelavci (2001) domnevajo, da za razliko od hemolizina ali CNF, ne deluje citotoksično.

Zaw in sodelavci (2013) so prvi objavili metodo izolacije proteina Usp, vendar so v svojih raziskavah uporabljali krajšo različico proteina. V izbrani ekspresijski vektor so vstavili različico gena *usp* z zapisom za DNazno domeno in domnevno translokacijsko domeno brez dela gena, ki ima zapis za domnevno domeno podobno proteinom Hcp. Vir gena *usp* je bil prototipski sev Z42 (podtip Ia). Velikost krajše različice proteina Usp je 37 kDa. Med

izolacijo proteina Usp so ugotovili, da pride do nastanka kompleksa med proteinoma Usp in Imu kar spominja na komplekse bakteriocinov in njihovih proteinov imunosti. Poleg tega so pokazali, da izolirani protein Usp, v *in vitro* sistemu na linearizirani plazmidni DNA, kaže DNazno aktivnost in da je pri DNazni aktivnosti pomemben HNH motiv (Zaw in sod., 2013).

Kot je že omenjeno, so rezultati sekvenčnih poravnav pokazali, da je protein Usp podoben S piocinom in kolicinom nukleaznega tipa. Iz tega razloga so znanstveniki domnevali, da je protein Usp bakteriocin. Kljub temu bakteriocidna aktivnost izoliranega proteina Usp ni bila potrjena (Zaw in sod., 2013; Nipič in sod., 2013). Prav iz tega razloga so Nipič in sodelavci (2013) domnevali, da so tarča proteina Usp lahko humane celice. V poskusih infekcije so pokazali, da bakterija *E. coli* MG1655 *usp*⁺*imu1-3*⁺ zniža preživelost celic HUVEC (ang. »human umbilical vein endothelial cells«) za okrog 15 % (preživelost celic HUVEC po infekciji je bila 73,1±6 %, medtem ko je preživelost neinficiranih celic HUVEC bila 94,8±4,2 %). Poleg tega *E. coli* MG1655 *usp*⁺*imu1-3*⁺ v celicah HUVEC po infekciji povzroči preureditev citoskeleta in, z aktivacijo kaspaze 3, sproži apoptozo. Nipič in sodelavci (2013) so prvi analizirali vpliv izoliranega celotnega proteina Usp (67 kDa) in pri tem pokazali, da na celice HUVEC deluje genotoksično pri čemer povzroči tudi morfološke spremembe tretiranih celic, ki so karakterizirane z zaokroževanjem citoplazemskih komponent in celične membrane. Z uporabo kometnega testa so ugotovili, da je genotoksična aktivnost proteina Usp optimalna v kolikor je apliciran v kombinaciji s proteinom Imu3. Genotoksične aktivnosti proteinov Imu1, Imu2 kakor tudi njune kombinacije s proteinoma Usp in Imu3, niso zaznali. Pozitiven signal pri kometnem testu so zaznali tudi v primeru analize delovanja proteina Imu3, vendar to pripisujejo drugačnemu mehanizmu, pri čemer domnevajo, da lahko gre za vezavo proteina na DNA.

Črnigoj in sodelavci (2014) so pokazali, da ima protein Imu3 ključno vlogo pri zaščiti producentskih bakterijskih celic pred toksičnim delovanjem proteina Usp kakor tudi, kljub veliki podobnosti s proteinoma Imu1 in Imu2, drugačno sposobnost vezave na nukleinske kisline. Imu3 se veže na linearizirano in krožno DNA, kakor tudi na RNA, pri čemer je minimalna dolžina molekule DNA za vezavo Imu3 11 bp. Kljub prisotnosti dveh ohranjenih histidinskih ostankov, ki v družini DNaznih proteinov imunosti predstavljajo pogost motiv za inaktivacijo nukleaz, kompleks med proteinoma Usp in Imu3 ni bil zaznan. Črnigoj in sodelavci (2014) domnevajo, da protein Imu3, v Usp-producirajočih celicah, z nespecifično vezavo na DNA prepreči genotoksično aktivnost proteina Usp.

Usp kot novoodkriti genotoksin, lahko ob kronični izpostavljenosti, povzroči poškodbe DNA ter s tem genomsko nestabilnost in povečano tveganje za razvoj tumorja. Skrb vzbujajoči podatek je zelo visoka prevalenca gena *usp*, predvsem med izolati ExPEC, vendar tudi pri sevih bakterije *E. coli*, ki so izolirani iz fecesa zdravih ljudi. Iz tega lahko domnevamo, da je v splošnem, izpostavljenost genotoksinu Usp precej visoka. V zadnjih desetletjih epidemiološki podatki povezujejo kronične bakterijske okužbe z razvojem tumorjev. Pri tem bakterije in njihovi produkti lahko povečajo frekvenco mutacij in s tem omogočijo prehod premaligne tvorbe v maligno (Guerra in sod., 2011b).

2.7 ODGOVOR CELICE NA POŠKODBE DNA

Z namenom zaščite lastne DNA pred endogeno ali eksogeno povzročenimi poškodbami, celice aktivirajo cel niz kompleksnih mehanizmov katerih funkcija je popravljanje nastalih poškodb, kakor tudi znižanje možnosti nastanka letalne ali trajne poškodbe genoma (Guerra in sod., 2011a). Poškodbe DNA so lahko poškodbe dušikove baze, poškodbe sladkornih komponent, enojni prelomi DNA ali dvojni prelomi DNA (Kuo in Yang, 2008). Dvojni prelomi DNA (DSB, ang. »double strand breaks«) so najbolj nevarna poškodba DNA. Prisotnost DBS aktivira poli-(ADP-riboza) polimerazi (PARP1 in PARP2), ki katalizirata reakcijo poli(ADP)-ribozilacije hisonov in drugih jedrnih proteinov (Žgur-Bertok, 2013). Posledično na mestu poškodbe DNA pride do nastanka tako imenovanega kompleksa MRN, ki je sestavljen iz proteinov MRE11, RAD50 in NSB1. Kompleks MRN ima zelo pomembno vlogo pri zaznavanju poškodb DNA kakor tudi pri popravljanju poškodb z mehanizmi nehomolognega združevanja koncev (NHEJ, ang. »non-homologous end joining«) in homologne rekombinacije (Lamarche in sod., 2010). Ključno vlogo pri aktivaciji nadaljnjih mehanizmov popravljanja poškodb DNA imajo tri kinaze iz družine fosfatdilositol 3 kinaz, in sicer ATM (ang. »ataxia telangiectasia mutated«), ATR (ang. »ATM related«) in PK-DNA (ang. »DNA-dependent protein kinase«) (Kuo in Yang, 2008). Kompleks MRN sproži autofosforilacijo kinaze ATM, ki nato fosforilira histon H₂AX na mestu serin 139 (Žgur-Bertok, 2013). Samo nekaj minut po nastanku DSB je fosforiliranih na stotine ali tisoče molekul histona H₂AX. Iz tega razloga je fosforilirani histon H₂AX (γ H₂AX) lahko specifični označevalec prisotnosti DBS v celici in močno orodje pri študijah genotoksičnosti različnih agensov (Kuo in Yang, 2008). Poleg fosforilacije H₂AX, kinaza ATM aktivira transkripcijski faktor p53. Protein p53 je imenovan tudi čuvaj genoma, ker v primeru poškodbe DNA prepreči napredovanje celičnega cikla in, v kolikor poškodba ni popravljena, lahko sproži apoptozo.

Kompleksnost interakcij med gostiteljem in bakterijami lahko otežuje eksperimentalno delo na področju preučevanja vpliva bakterij oz. njihovih genotoksinov na genomsko nestabilnost in nastanek raka (Guerra in sod., 2011b). Vse več študij jasno kaže na velik pomen bakterijskih patogenov pri nastanku raka, vendarle ostaja še veliko neodgovorjenih vprašanj.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 1: Kemikalije uporabljene pri magistrskem delu

Proizvajalec	Kemikalije
Biorad, ZDA	• 30 % Akrilamid
Carl Roth GmbH, Nemčija	• Tris baza • Tris- HCl • NaDS
Difco laboratories, ZDA	• AB3 (Antibiotic Medium 3)
Fluka ag., Švica	• MOPS • Urea
Formedium, Velika Britanija	• gojišče LB • agar
Honeywell Riedel-de Haen®, Nemčija	• borova kislin
Kemika, Hrvaška	• EDTA • Glukoza • Glicerol • CaCl₂
Macrogen, Koreja	• začetni oligonukleotidi
Merck, Nemčija	• APS • 96-odstotni etanol • Glicin • DTT • K₂HPO₄ • KH₂PO₄ • K₂SO₄ • NaCl • NaH₂PO₄ • MgCl₂ x 6 H₂O • Saharoza • Ksilaza • Metanol
Roth, Nemčija	• Agar • Agaroza • Borova kislina • Gojišče SOB • Tris baza

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 1: Kemikalije uporabljene pri magistrskem delu

Proizvajalec	Kemikalije
SIGMA Life Science, ZDA	• Ampicilin • Bromfenol modro • BSA • Etidijev bromid • Imidazol • IPTG • Maleinska kislina • DMEM • FBS • PBS • HBSS • Poli-L-lizin • Maleinska kislina • NaOH • PEG-6000 • L- prolin • Kazamino kisline • OPI dodatek k celičnemu mediju • Tween 20 • TEMED • β- merkaptotetanol • 4-Cl-1- naftol
ThermoFisher Scientific, ZDA	• RPMI • Penicilin • Streptomycin • Neesencialne aminokisline

3.1.2 Raztopine in pufri

Preglednica 2: Raztopine in pufri uporabljeni pri magistrskem delu

Uporaba	Pufer ali raztopina	Sestava
Raztopine za agarozno gelsko elektroforezo	Pufer TBE	10,8 g/L Tris- baza 5,5 g/l borove kisline <u>4 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)</u> dH ₂ O do 1 l
	6x nanašalni pufer za agarozno gelsko elektroforezo	0,25 % bromfenol modro (m/v), 30 % glicerol, 0,25 % ksilencianol v dH ₂ O
Raztopine za pripravo in shranjevanje kemijsko kompetentnih celic bakterijske vrste <i>Escherichia coli</i>	MgCl ₂ 20-CaCl ₂	20 mM CaCl ₂ 80 mM MgCl ₂
	Pufer za shranjevanje kompetentnih celic	10 mM Tris-HCl, pH 7 50 mM CaCl ₂ 10% glicerol
Raztopine uporabljene pri transformaciji celic seva <i>Bacillus megaterium</i>	2x SMM	1,16 g maleinske kisline (40 mM) 0,8 mg NaOH (80 mM) 2,03 g MgCl ₂ x 6H ₂ O (40 mM) <u>85,58 g saharoze (1M)</u> dH ₂ O do 250 ml
	2x AB3 (ang. »Antibiotic Medium 3«, DIFCO)	7g AB3 v 200 ml dH ₂ O
	SMMP	2x AB3 in 2 x SMM v razmerju 1:1
	PEG-P	20 g PEG-6000 raztopljeno v 1 x SMM v skupnem volumnu 50 ml
	Medij CR5-top	Za 2,5 ml: 1,25 ml raztopina A 288 µl soli CR5 125 µl 12 % prolin 125 µl 20 % glukoza 713 µl raztopine B
	Raztopina A	51,5 g saharoza 3,25 g MOPS <u>300 mg NaOH</u> dH ₂ O do 250 ml, pH7,3
	Raztopina B	2 g agar 100 mg kazamino kisline <u>5 g kvasni ekstrakt</u> dH ₂ O do 142,5 ml
	8 x soli CR5	1,25 g K ₂ SO ₄ 50 g MgCl ₂ x 6H ₂ O 250 g KH ₂ PO ₄ <u>11 g CaCl₂</u> dH ₂ O do 625 ml

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 2: Raztopine in pufri uporabljeni pri magistrskem delu

Uporaba	Pufer ali raztopina	Sestava
Pufri in raztopine za NaDS poliakrilamidno elektroforezo	10x pufer z NaDS	30,3 g Tris baza 144 g glicin <u>10 g SDS</u> dH ₂ O do 1 L
	4 x NuPAGE nanašalno barvilo	
	Raztopina za barvanje NaDS PAGE gelov	»PageBlue Protein Staining Solution«, 24620F, ThermoScientific, ZDA
Pufri za prenos proteinov po Westernu	Pufer WB za prenos	100 ml 10x pufer z NaDS 200 ml metanola dH ₂ O
	20x pufer WB za spiranje	24,22 g Tris (200 mM) 58,44 NaCl (1M) <u>20 ml Tween 20 (2 %)</u> dH ₂ O do 1 L, pH 7,4
	Pufer za razvijanje	3 g Tris 8 g NaCl <u>0,1 g Na₂HPO₄</u> dH ₂ O do 1 L
	Peroksidazni substrat pri imunobarvanju	15 mg 4-Cl-1- naftol v 5 ml metanola 25 ml pufra za razvijanje 50 µl H ₂ O ₂
Pufri za Ni-NTA afinitetno kromatografijo* *v vse pufre smo pred uporabo dodali 20 mM β-merkaptotetanol	Pufer za lizo	6,90 g NaH ₂ PO ₄ (50 mM) 17,54 g NaCl (300 mM) <u>0,68 g imidazol (10 mM)</u> dH ₂ O do 1 L, pH 8,0
	Pufer za spiranje	6,90 g NaH ₂ PO ₄ 17,54 g NaCl <u>1,36 g imidazol (20 mM)</u> dH ₂ O do 1 L, pH 8,0
	Pufer za elucijo	6,90 g NaH ₂ PO ₄ 17,54 g NaCl <u>17,00 g imidazol (250 mM)</u> dH ₂ O do 1 L, pH 8,0
Pufri za izolacijo proteinov iz inkluzijskih telesc	Pufer I	2M urea 20 mM tris-HCl 0,5 M NaCl 2 % Triton X-100, pH 8
	Pufer za razvijanje	20 mM Tris-HCl 0,5 M NaCl 5 mM imidazol 8M urea 5mM β- merkaptotetanol, pH 8
	Pufer za zvijanje	20 mM Tris-HCl 0,5 M NaCl 5 mM imidazol 5mM β- merkaptotetanol, pH 8
Pufer za gelsko kromatografijo		50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 5 mM DTT, pH 7,4

3.1.3 Laboratorijska oprema

Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema

Proizvajalec	Laboratorijska oprema in pribor
Amersham Biosciences, Velika Britanija	• Kadičke za elektroforezo »Hoefer™-HE33«
Beckman, ZDA	• Ultracentrifuga L8-M
Bio-rad, ZDA	• Kadička za NaDS elektroforezo • Ciklični termostat »MyCycler™ thermal cycler« • Črpalka »Econo pump and gradient former«
Biostea, Golias labor tehnika, Slovenija	• Cepilne zanke za enkratno uporabo (1 µl, 10 µl), plastične Petrijeve posode
Carl Zeiss, Nemčija	• Mikroskop »Zeiss Axio Vert A1« • Mikroskop »Zeiss Axio Observer.Z1«
Biostep, Nemčija	• Transiluminator »BIOView UV light UXDT-20ML-15R«
Consort, Belgija	• Aparatura »Electrophoresis power supply consort« (300 V - 500 mA) E835
Eppendorf, Nemčija	• Avtomatske pipete in nastavki • Centrifuge: 5415R, 5424, 5810 R • Mikrocentrifugirke
Gorenje, Slovenija	• Mikrovalovna pečica
Hettich, Anglija	• Centrifuga ROTANTA 460R
Huber, Nemčija	• Vodna kopel »MiniSTAT 125/W«
IKA, Kitajska	• Magnetno mešalo IKA® RCT Standard
Kambič, Slovenija	• Avtoklav
KernPFB, Nemčija;	• Tehnica
New brunswick scientific, ZDA	• Stresalnik »Platform shaker innova™ 2300«
Sartorius AG, Nemčija	• Filter »CA-MEMBRANE 0,20µm« • Analitska tehnica MC210 P
Shimadzu Corporation, Japonska	• Spektrofotometer UV/VIS UV-1800
Sonics & Materials Inc, ZDA	• Sonikator VCX 500
St John's innovation centre, Anglija	• Transiluminator »UVItec Limited 230V – 50/60 Hz UV radiation«
Tehnica Železniki, Slovenija	• Tehnica • Centrifuga Centric 322B
ThermoFisher Scientific, ZDA	• Vodna kopel »Isotemp 215«
Tlos, Hrvaška	• Plinski gorilnik

3.1.4 Bakterijski sevi

Pri delu smo uporabljali različne bakterijske seve. Genotip in osnovne značilnosti uporabljenih sevov so navedene v preglednici 4.

Preglednica 4: Uporabljeni bakterijski sevi pri magistrskem delu, njihov genotip in osnovne značilnosti

Sev	Genotip	Značilnosti
<i>Bacillus megaterium</i> MS941 (pT7-RNAP)	$\Delta nprM$	Odsotnost alkalnih proteaz in stabilno podvajanje DNA ter s tem povezano vzdrževanje plazmidov sta dve osnovni prednosti uporabe vrste <i>Bacillus megaterium</i> za prekomerno izražanje in izolacijo rekombinantnih proteinov (Malten in sod., 2006). Sev MS941 je pripravljen z delecijo kromosomskega gena za zunajcelično nevtralno proteazo (<i>nprM</i>) v sevu DSM319 (Wittchen in sod., 1995). Sev MS941 je transformiran s plazmidom pT7-RNAP, ki ima gen za RNA polimerazo bakteriofaga T7 pod kontrolo ksiloznega promotorja (P_{xylA}) (Mobitec GmbH, 2012).
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F $^-$ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK $^-$, mK $^+$) <i>phoA supE44</i> λ^- <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Učinkovitost transformacije je zelo visoka zaradi mutacij seva.
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F $^-$ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B $^-$ m _B $^-$) <i>gal dcm</i> (DE3)	Najpogosteje uporabljeni sev za prekomerno izražanje in izolacijo rekombinantnih proteinov. Glavna prednost seva je, da ima mutaciji v genih za proteazi OmpT in LonI kar omogoča pridobivanje intaktnih rekombinantnih proteinov. Profag DE3 je derivat bakteriofaga λ in ima zapis za represor LacI ter, pod kontrolo promotorja <i>lacUV5</i> , gen za T7 RNA polimerazo (Kesik-Brodacka in sod., 2012). Pri tem je DNA fragment z omenjenimi geni vstavljen v gen <i>int</i> (integraza) bakteriofaga λ kar prepreči procese integracije in ekscizije profaga.
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysE	F $^-$ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B $^-$ m _B $^-$) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysE	V sevu BL21 (DE3), ki je transformiran s plazmidom pLysE je znižana osnovna raven izražanja preučevanega gena pred indukcijo, ker se na plazmidu nahaja zapis za lizocim bakteriofaga T7, ki je inhibitor T7 RNA polimeraze. Iz tega razloga je primeren za izražanje genov, katerih produkti so toksični za producenta.

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 4: Uporabljeni bakterijski sevi pri magistrskem delu, njihov genotip in osnovne značilnosti

Sev	Genotip	Značilnosti
<i>Escherichia coli</i> MG1655 (DE3)	F ⁻ , λ^{-} , <i>rph-1</i> lvG- <i>rfb</i> -50	Mutacija v genu <i>rph</i> ima za posledico znižano ekspresijo gena <i>pyrE</i> , kar privede do za 10 do 15 % počasnejše rasti seva v odsotnosti pirimidina. Zaradi mutacije v genu <i>rfb</i> -50 ne pride do nastanka O antigena. Mutacije prisotne v genotipu seva MG1655 so prisotne v večini sevov K-12 in so verjetno nastale zelo zgodaj med razvojem laboratorijskih sevov. MG1655 je reprezentativni sev za preučevanje značilnosti divjega tipa seva K12 (Jensen, 1993).
<i>Escherichia coli</i> KEIO <i>minC</i> (DE3) pLysE	<i>rrnB3</i> Δ <i>lacZ</i> 4787 <i>hsdR</i> 514 Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ (<i>rhaBAD</i>)568 <i>rph</i> -1 DE3	Sev ima mutacijo v genu <i>minC</i> . Funkcija proteina MinC je inhibicija asimetrične delitve bakterijskih celic (Sen in Rothfield, 1998). Posledica mutacije v genu <i>minC</i> je nastanek minicelic, ki nimajo kromosomske DNA. V kromosom je vstavljen profag DE3 in sev je transformiran s plazmidom pLysE. Profaga DE3 in plazmid pLysE omogočata prekomerno izražanje rekombinantnih proteinov v ekspresijskih sistemih, ki temeljijo na prisotnosti RNA polimeraze bakteriofaga T7.

3.1.5 Celične kulture

Preglednica 5: Uporabljene celične kulture pri magistrskem delu in njihove osnovne značilnosti

Celična kultura	Značilnosti
MM6 (Mono Mac 6)	Celice MM6 so človeški monociti izolirani iz periferne krvi bolnika z akutno monocitno levkemijo. Celice so suspenzijske in konstitutivno izražajo fenotipske in funkcionalne značilnosti zrelih monocitov (Ziegler-Heitbrock in sod., 1988).
HUVEC (ang. »human umbilical vein endothelial cells«)	HUVEC je primarna celična linija pridobljena iz endotelija umbilikalne žile. Celice imajo visok proliferativni potencial, vendar število pasaž, ki jih lahko preživijo, brez morfoloških in fizioloških sprememb, je omejeno. Celična linija se pogosto uporablja kot model za študij fiziologije in patologije endotelija.
HEK293 (ang. »human embryonic kidney cells«)	HEK293 je trajna celična linija pridobljena s transformacijo ledvičnih celic človeškega zarodka.
HeLa	Celična linija HeLa je najstarejša in v znanstvenih raziskavah najpogosteje uporabljena celična linija. Pridobljena je iz rakastih celic materničnega vratu.

3.1.6 Plazmidi in začetni oligonukleotidi

Preglednica 6: Plazmidi uporabljeni pri magistrskem delu

Plazmidi	Način priprave plazmida	Pomembni geni, ki so kodirani na plazmidu	Uporaba v magistrskem delu
pcDNA3-eGFP	komercialno dostopen plazmid z zapisom za eGFP (Addgene)		pomnoževanje gena za zeleni fluorescentni protein
pPT7-SlipA- <i>usp</i>	Gen <i>usp</i> , ki je spojen s signalno sekvenco za izločanje zunajcelične esteraze LipA je vstavljen v plazmidni vektor pPT7 (Mobitec GmbH).	<i>usp</i> z dodano signalno sekvenco esteraze LipA pod kontrolo promotorja T7	prekomerno izražanje gena <i>usp</i> v ekspresijskem sistemu <i>B. megaterium</i>
pUSP4	Geni otoka patogenosti PAI <i>usp</i> iz seva TA211 so vstavljeni v plazmid pAG2.1 (Anderluh in sod., 1996) po odstranjevanju gena za evkinotoksin.	<i>usp</i> , <i>imm2</i> , <i>imm3</i> , <i>imm1</i> pod kontrolo promotorja T7	prekomerno izražanje gena <i>usp</i> v ekspresijskem sistemu <i>E. coli</i> BL21(DE3) in BL21(DE3) pLysE
pUSP4_BI	Plazmid je pripravljen iz plazmida pUSP4 z odstranjevanjem genov <i>imu</i> .	<i>usp</i> pod kontrolo promotorja T7	prekomerno izražanje gena <i>usp</i> v ekspresijskem sistemu <i>E. coli</i> Keio <i>minC</i> in MG1655 (DE3)
pTUTG	Plazmid je pripravljen iz plazmida pUSP4_BI s fuzijo gena <i>gfp</i> z genom <i>usp</i> .	genska fuzija <i>usp-gfp</i> pod kontrolo promotorja T7	prekomerno izražanje fuzijskega proteina Usp-GFP v ekspresijskem sistemu MG1655 (DE3)
pTUTG_imu	Plazmid je pripravljen iz plazmida pUSP4 z zamenjavo promotorja T7 z naravnim promotorjem gena <i>usp</i> in nato fuzijo gena <i>usp</i> z genom <i>gfp</i> .	<i>usp-gfp</i> , <i>imu2,3,1</i> pod kontrolo naravnega promotorja gena <i>usp</i>	preučevanje izražanja gena <i>usp</i> , ki je fuziran z genom <i>gfp</i> pod kontrolo naravnega promotorja gena <i>usp</i>
pΔHcpUsp_imm	Plazmid je pripravljen iz plazmida pUSP4 z odstranjevanjem dela gena <i>usp</i> , ki kodira proteinom Hcp podobno domeno.	Δ <i>hcp-usp</i> pod kontrolo promotorja T7	prekomerno izražanje krajše različice gena <i>usp</i> (Δ <i>hcp-usp</i>) brez dela, ki kodira domeno podobno proteinom Hcp

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 6: Plazmidi uporabljeni pri magistrskem delu

Plazmidi	Način priprave plazmida	Pomembni geni, ki so kodirani na plazmidu	Uporaba v magistrskem delu
pUSP4RL	Plazmid je pripravljen iz plazmida pUSP4 z zamenjavo promotorja T7 z naravnim promotorjem gena <i>usp</i> .	<i>usp</i> , <i>imm2</i> , <i>imm3</i> , <i>imm1</i> pod kontrolo naravnega promotorja gena <i>usp</i>	ugotavljanje vpliva proteina na celične linije po infekciji ali tretiranju s celičnim lizatom
pUSP4RL_BI	Plazmid je pripravljen iz plazmida pUSP4RL z odstranjevanjem vseh genov <i>imu</i> .	<i>usp</i> pod kontrolo lastnega promotorja	ugotavljanje vpliva proteina na celične linije po infekciji ali tretiranju s celičnim lizatom
pΔUSP_imm	Plazmid je pripravljen iz plazmida pUSP4RL z odstranjevanjem večjega dela (1,2 od 1,8 kb) gena <i>usp</i> , vključno z DNazno domeno.	manjši del gena <i>usp</i> pod kontrolo promotorja gena <i>usp</i>	kontrola pri poskusih ugotavljanja vpliva proteina na celične linije po infekciji ali tretiranju s celičnim lizatom
pHS27	Plazmid je pripravljen z vstavljanjem otoka patogenosti PAI _{usp} (podtip IIb) iz seva HS27 v komercialno dostopen plazmid pJet1.2.	<i>usp</i> , <i>imm2</i> in <i>imm3</i> pod kontrolo naravnega promotorja gena <i>usp</i>	ugotavljanje vpliva proteina Usp na celične linije v odsotnosti vseh treh genov za proteine imunosti
pSP15	Plazmid je pripravljen z vstavljanjem otoka patogenosti PAI _{usp} iz seva SP15 v komercialno dostopen plazmid pJet1.2.	<i>usp</i> , <i>imm2</i> , <i>imm3</i> , <i>imm1</i> pod kontrolo naravnega promotorja gena <i>usp</i>	ugotavljanje vpliva proteina Usp na celične linije po infekciji ali tretiranju s celičnim lizatom
pBAC <i>pk</i> ⁺	V umetni bakterijski kromosom (BAC, ang. <i>bacterial artificial chromosome</i>) je vstavljen otok patogenosti <i>pk</i> s z vsemi geni, ki so potrebni za nastanek kolibaktina.		pozitivna kontrola pri poskusih infekcije celičnih linij
pBAC <i>clbA</i> ⁻	V umetni bakterijski kromosom (BAC) je kolniran otok patogenosti <i>pk</i> s z mutiranim genom <i>clbA</i> .		negativna kontrola v poskusih infekcije celičnih linij
pHisTag_Imm3	Gen <i>imm3</i> je vstavljen v plazmid pAG2.1 (Anderluh in sod., 1996) po odstranjevanju gena za evkinotoksin.	<i>imm3</i> pod kontrolo promotorja T7	prekomerno izražanje gena <i>imm3</i> v ekspresijskem sistemu <i>E. coli</i> BL21 (DE3)

Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabljali v magistrskem delu.

Podčrtana so prepoznavna zaporedja restrikcijskih endonukleaz.

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje 5'-3'	Pogoji uporabljeni pri izvedbi reakcije PCR
USP_Xho_GFP_F (vodilni)	<u>TTC TCG AGC</u> GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TT	95 °C, 5:00 min x1 95 °C, 00:30 min
USP_Xho_GFP_R (povratni)	<u>AAC TCG AGG</u> ACT TGT ACA GCT CGT CCA TGC CGA	55 °C, 00:30 min x30 <u>72 °C, 01:00 min</u> <u>72 °C, 05:00 min</u> x1

3.1.7 Encimi in kompleti

Preglednica 8: Encimi, uporabljeni v magistrskem delu

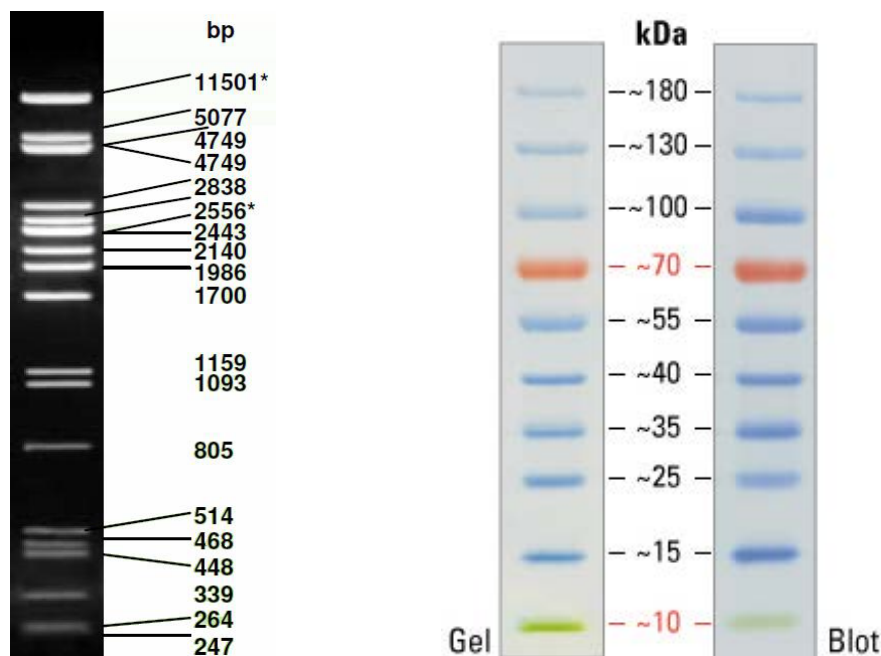
Encim	Proizvajalec
Alkalna fosfataza SAP (ang. »shrimp alkaline phosphatase«)	ThermoFisher Scientific, ZDA
Restrikcijski encimi: <i>XhoI</i> , <i>HincII</i> , <i>ScaI</i> , <i>EcoRI</i>	ThermoFisher Scientific, ZDA
Lizocim	Fluka ag., Švica
RNaza I	ThermoFisher Scientific, ZDA
DNA polimeraza <i>Taq</i>	ThermoFisher Scientific, ZDA
Tripsin EDTA	Sigma, ZDA

Preglednica 9: Kompleti, uporabljeni v magistrskem delu

Komplet	Kataloška številka	Proizvajalec
Komplet za ekstrakcijo DNA iz agaroznega gela »GeneJet Extraction Kit«	K0692	ThermoFisher Scientific, ZDA
Komplet za razsoljevanje produktov reakcije PCR »GeneJet™ PCR purification Kit«	K0702	ThermoFisher Scientific, ZDA
Komplet za izolacijo plazmidne DNA »GeneJet™ Plasmid MiniPrep Kit«	K0502	ThermoFisher Scientific, ZDA
Komplet za ligacijo »Rapid DNA ligation Kit«	K1422	ThermoFisher Scientific, ZDA
Komplet za afinitetno kromatografijo »The Qia Expresionist«	1018244	QiaGen, Nizozemska
Komplet za reakcijo PCR »2x PCR Master Mix«	K0171	ThermoFisher Scientific, ZDA
Komplet inhibitorjev proteaz »Complete EDTA free protease inhibitor cocktail tablets«	04693	Roche, Švica

3.1.8 DNA lestvica in proteinski standard

DNA lestvica in proteinski standard (označevalec velikosti), ki smo ju uporabljali pri magistrskem delu sta prikazana na sliki 5.



Slika 5: DNA lestvica λ /PstI (levo) in proteinski standard »PageRuler™ Prestained Protein Ladder«, ThermoFisher Scientific (desno)

3.2 METODE

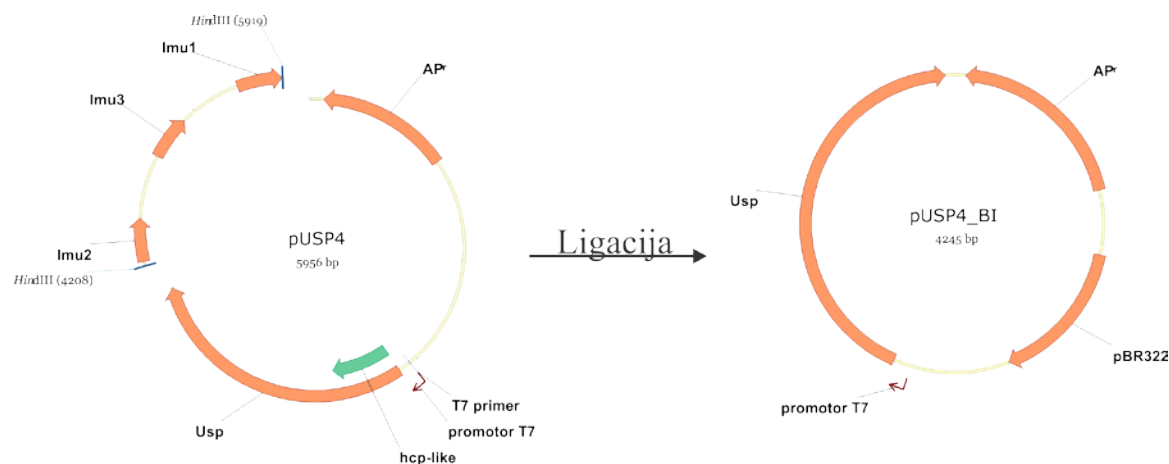
3.2.1 Priprava plazmidov s kloniranimi geni otoka patogenosti PAI_{usp}

V okvirju magistrske naloge smo pripravili naslednje plazmide: pUSP4_BI, pTUTG in pΔHcpUsp_imu. Vir genskega skupka PAI_{usp} je bil uropatogeni sev *E. coli* TA211, ki je bil izoliran na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Podtip PAI_{usp} pri omenjenem sevu je IIa.

3.2.1.1 Priprava plazmida pUSP4_BI

Za pripravo plazmida pUSP4_BI (BI- brez zapisov za proteine imunosti) smo v prvem koraku plazmid pUSP4 rezali z restrikcijskim encimom *Hind*III. Nastale restrikcijske fragmente (3677 bp in 2279 bp) smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo in nato fragment velikosti 3677 bp očistili iz agaroznega gela z uporabo kompleta za ekstrakcijo DNA. Očiščen fragment smo ligirali z uporabo kompleta, ki vsebuje T4 DNA ligazo. Shema priprave vektorja pUSP4_BI je prikazana na sliki 6.

Kompetentne celice seva *Escherichia coli* DH5α smo transformirali z ligacijsko mešanico. Uspešnost ligacije smo potrdili z rezanjem novonastalega plazmida z različnimi restrikcijskimi endonukleazami.



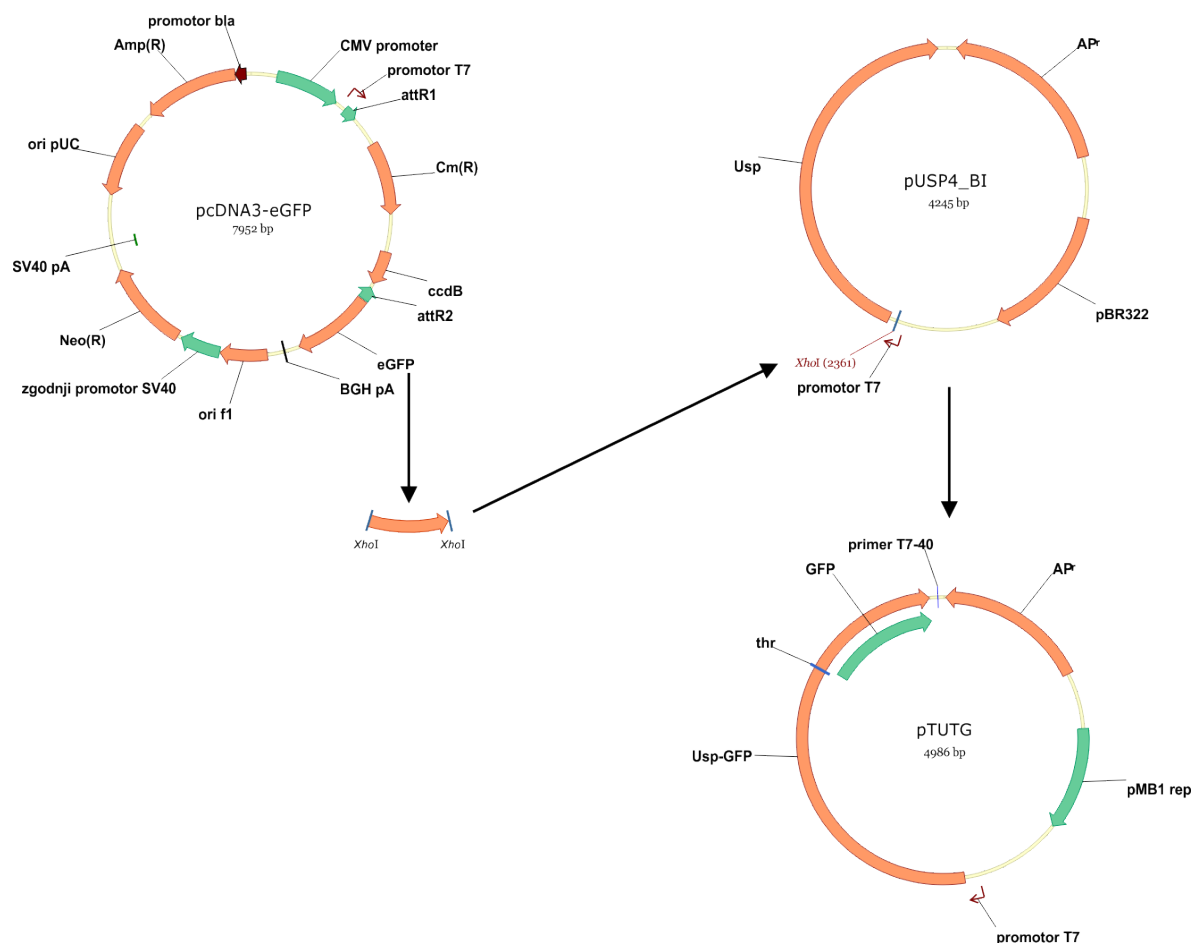
Slika 6: Shematski prikaz priprave plazmida pUSP4_BI

3.2.1.2 Priprava plazmida pTUTG

Z verižno reakcijo s polimerazo (ang. »PCR, polymerase chain reaction) in uporabo plazmida pcDNA3-eGFP (Addgene, ZDA) kot matrične DNA smo pomnožili gen za zeleni fluorescentni protein (GFP, ang. »green fluorescent protein«). Za pomnoževanje smo uporabili začetna oligonukleotida GFP_Xho_F in GFP_Xho_R, ki imata na 5' koncu prepoznavno zaporedje za restrikcijsko endonukleazo *XhoI* (preglednica 7). Pomnožen produkt smo nanesti na 0,8 % agarozni gel in nato pomnožek velikosti 700 bp izrezali iz gela ter očistili z uporabo kompleta za ekstrakcijo DNA po navodilih proizvajalca. Očiščen produkt smo nato rezali z restrikcijskim encimom *XhoI*. Po končani restrikciji smo rezani fragment očistili z uporabo kompleta »GeneJetTM PCR purification Kit« po navodilih proizvajalca.

Plazmid pUSP4_BI smo linealizirali z restrikcijskim encimom *XhoI*. Z encimom alkalna fosfataza SAP (ang. »shrimp alkaline phosphatase«, ThermoFischer Scientific) smo plazmid defosforilirali. Na opisani način pripravljeni plazmid in produkt reakcije PCR smo ligirali z uporabo kompleta, ki vsebuje T4 DNA ligazo. Shema poteka priprave plazmida je prikazana na sliki 7.

Kompetentne celice seva *Escherichia coli* DH5a smo transformirali z ligacijsko mešanico. Uspešnost ligacije smo potrdili z izolacijo novonastalega plazmida pTUTG z uporabo kompleta »GeneJetTM Plasmid MiniPrep Kit« in restrikcijo le tega z različnimi restrikcijskimi encimi.

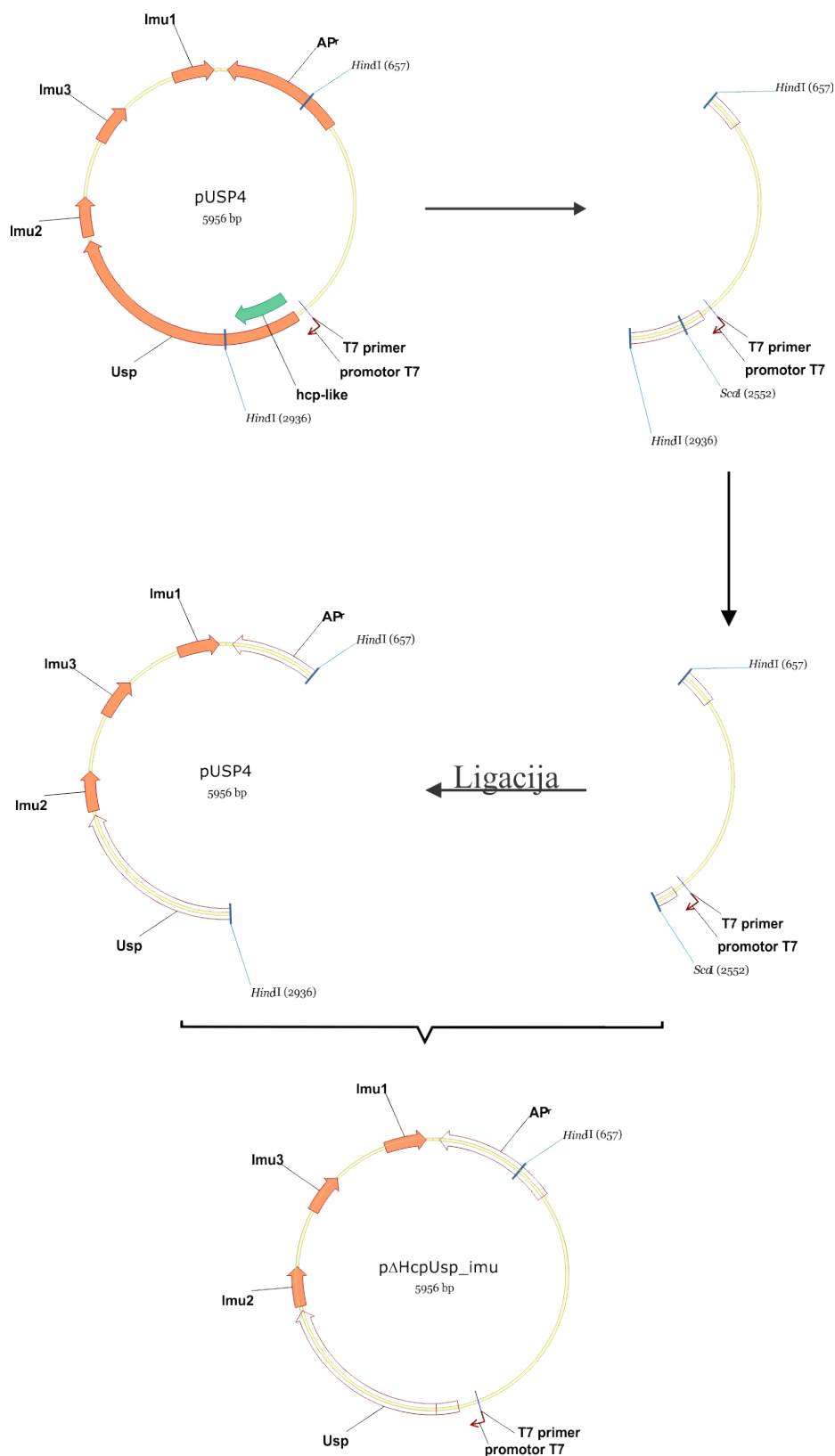


Slika 7: Shema poteka priprave plazmida pTUTG

3.2.1.3 Priprava plazmida pΔHcpUsp_imu

Plazmid pΔHcpUsp_imu smo pripravili iz plazmida pUSP4. Pri tem smo pUSP4 najprej rezali z restrikcijsko endonukleazo *HincII*, ki ima v pUSP4 dve prepoznavni zaporedji. Eno se nahaja na 3' koncu zaporedja, ki kodira domeno podobno proteinom Hcp v genu *usp*, drugo je v genu za β-laktamazo. Dobljene restrikcijske fragmente velikosti 3677 bp in 2279 bp smo, po ločevanju na 0,8 % agaroznem gelu, očistili iz gela z uporabo kompleta za ekstrakcijo DNA iz agaroznega gela. Očiščen fragment velikosti 2279 bp smo rezali z restrikcijsko endonukleazo *ScaI*. Nastale fragmente velikosti 1895 bp in 384 bp smo ločili na 1 % agaroznem gelu in nato fragment velikosti 1895 bp očistili iz agaroznega gela s pomočjo kompleta za ekstrakcijo DNA.

Na opisani način pripravljene fragmente velikosti 3677 bp in 1895 bp smo ligirali z uporabo T4 DNA ligaze in z ligacijsko mešanico transformirali kompetentne celice seva *E. coli* DH5α. Shema poteka priprave plazmida pΔHcpUsp_imu je prikazana na sliki 8.



Slika 8: Shema poteka priprave plazmida pΔHcpUsp_imu

3.2.2 Priprava kompetentnih bakterijskih celic in transformacija

3.2.2.1 Transformacija protoplastov seva *Bacillus megaterium* MS941 (*B. megaterium*)

Pri transformaciji bakterijskih celic seva MS941 smo uporabljali komercialno dostopne protoplaste (Mobitec GmbH) in metodo s polietilenglikolom (PEG) sprožene transformacije. Pri tem smo v 500 μL suspenzije protoplastov dodali 5 μg plazmidne DNA pPT7-SPlipA-*usp*. Po dodatku 1,5 ml PEG-P smo protoplaste z dodano plazmidno DNA, inkubirali 2 minuti pri sobni temperaturi in nato dodali 5 ml medija SMMP. Bakterijske celice smo nato zbrali s centrifugiranjem 10 minut pri 2000g in sobni temperaturi. Ko smo supernatant odstranili, smo dobljeno bakterijsko usedlino ponovno suspendirali v 500 μL medija SMMP in nato inkubirali 90 minut s stresanjem (100 obr/min) pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo 50 do 200 μL transformiranih celic prenesli v 2,5 ml na 43 °C segretega medija CR5-top, nežno premešali in prelili segreto ploščo gojišča LB z dodanima antibiotikoma kloramfenikol (v končni koncentraciji 4,5 $\mu\text{g/ml}$) in tetraciklin (v končni koncentraciji 10 $\mu\text{g/ml}$).

3.2.2.2 Priprava kompetentnih celic različnih sevov vrste *E. coli* in transformacija

3.2.2.2.1 Priprava kemijsko kompetentnih celic

Za pripravo kompetentnih celic različnih sevov vrste *E. coli* smo uporabljali metodo spiranja z ioni Ca^{2+} in Mg^{2+} . Pri tem smo prekonočno kulturo 100x redčili v gojišču LB in nato gojili na stresalniku (180 obr/min) pri 37 °C. Med gojenjem smo merili optično gostoto kulture pri valovni dolžini 600 nm (OD_{600}). Ko je optična gostota dosegla vrednost $\sim 0,5$, smo kulturo ohladili na ledu in nato 50 ml prenesli v ohlajeno centrifugirko. Zatam smo celice centrifugirali 10 minut pri 2700g in 4 °C. Po odstranjevanju supernatanta smo dobljeno bakterijsko usedlino spirali s 30 ml ledeno mrzle raztopine 80 mM MgCl_2 in 20 mM CaCl_2 . Centrifugirali smo 10 minut pri 2700g in 4 °C. Supernatant smo odstranili in bakterijsko biomaso ponovno suspendirali v 2 mL pufru za shranjevanje kompetentnih celic. Po 100 μL na opisan način pripravljenih kompetentnih celic smo zamrznili v tekočem dušiku in do uporabe shranili pri temperaturi -80 °C.

3.2.2.2.2 Transformacija kemijsko kompetentnih celic različnih sevov vrste *E. coli*

Za transformacijo kemijsko kompetentnih celic smo uporabljali metodo s toplotnim šokom sproženega privzema plazmidne DNA. Pri tem smo 100 μL kemijsko kompetentnih celic (shranjene na -80 °C) otajali na sobni temperaturi, nato po dodatku 1 μL plazmidne DNA ali 5 μL ligacijske mešanice, inkubirali 15 minut na ledu. Toplotni šok smo sprožili z izpostavljanjem mešanice kompetentnih bakterij in dodane DNA temperaturi 42 °C za 90 s. Po 90 s smo mešanico vrnili na led za 2 do 3 minute in nato dodali 400 μL gojišča SOB ter inkubirali s stresanjem (180 obr/min) pri temperaturi 37 °C. Po 45 minutah smo transformirane bakterijske celice razmazali na plošče LB z dodanim ustreznim antibiotikom.

3.2.3 Izražanje genov za rekombinantne proteine v različnih ekspresijskih sistemih

3.2.3.1 Izražanje gena *usp* v sevu *Bacillus megaterium* MS941

Sev MS941, ki ima plazmid pT7-RNAP smo transformirali s plazmidom pPT7-SPlipA-*usp*. Na plazmidu pPT7-SPlipA-*usp* se, pod kontrolo promotorja bakteriofaga T7, nahaja N-terminalna fuzija gena *usp* z zaporedjem za signalni peptid zunajcelične esteraze LipA. Posledica omenjene translacijske fuzije je izločanje proteina Usp s pomočjo sistema SEC, pri čemer je signalno zaporedje fuzijskega proteina med izločanjem odcepljeno.

Prekonočno kulturo transformiranega seva smo 100x redčili v svežem gojišču LB z dodanima antibiotikoma kloramfenikol (v končni koncentraciji 4,5 µg/ml) in tetraciklin (v končni koncentraciji 10 µg/ml). Kulturo smo gojili pri temperaturi 37 °C do optične gostote izmerjene pri valovni dolžini 600 nm (OD₆₀₀) med 0,3 in 0,5. Nato smo v gojišče dodali 0,5 % ksiloze, ki sproži izražanje gena za RNA polimerazo bakteriofaga T7 in posledično gena *usp*, ki je pod kontrolo promotorja bakteriofaga T7. Po dodatku ksiloze smo ob različnem času kulturo vzorčili in z NaDS- PAGE analizirali prisotnost proteina Usp v zunajcelični ali znotrajcelični frakciji.

3.2.3.1.1 Priprava vzorca za ugotavljanje prisotnosti proteina Usp v zunajcelični frakciji kulture *B. megaterium* MS941 pT7-RNAP pPT7-SPlipA-*usp* z NaDs-PAGE

Ko je kultura dosegla želeno vrednost optične gostote (OD₆₀₀ med 0,3 in 0,5) smo pred dodatkom ksiloze odpipetirali 2 ml kulture. Vzorec bakterijske kulture smo centrifugirali 10 minut pri 14000g in 1,5 ml supernatanta prenesli v novo mikrocentrifugirko. Proteine iz dobljenega supernatanta smo obarjali z dodatkom 80 % amonijevega sulfata (v 1,5 ml supernatanta smo dodali 0,57 g amonijevega sulfata). Po obarjanju proteinov preko noči pri 4 °C, smo vzorec centrifugirali 15 minut pri 16000g in 4 °C. Po odstranjevanju supernatanta smo proteinsko usedlino ponovno suspendirali v 20 µl 50mM pufru Tris-HCl (pH 8) z dodano 8 M ureo. Na ta način pripravljenemu vzorcu smo dodali 6 µl 4x Nu-PAGE nanašalnega pufru, inkubirali 10 minut pri 100 °C in nato nanesli na NaDS-PAGE gel. Na enak način smo pripravili vzorce vzete po različno dolgem času inkubacije po dodatku ksiloze.

3.2.3.1.2 Priprava vzorca za določanje proteina Usp v znotrajcelični frakciji kulture *B. megaterium* MS941 pT7-RNAP pPT7-SPlipA-*usp* z NaDs-PAGE

Za analizo prisotnosti proteina Usp v znotrajcelični frakciji smo, 4 ure po dodatku ksiloze, odpipetirali ustrezen volumen bakterijske kulture na način, da je končna koncentracija bakterijskih celic bila 0,01 OD₆₀₀/ml kulture. Bakterijsko usedlino po centrifugiranju (10 minut pri 14000g) smo ponovno suspendirali v pufru za lizo in nato sonicirali 10x po 20 s z dvajset sekundnimi premori. Po sonikaciji smo v 20 µl vzorca bakterijskega lizata dodali 6 µl 4x Nu-PAGE nanašalnega pufru, inkubirali 10 minut pri 100 °C in nato nanesli na NaDS-PAGE gel.

3.2.3.2 Izražanje gena *usp* v sevu *E. coli* Keio *minC* pLysE

Sev *E. coli* Keio *minC* pLysE smo transformirali s plazmidom pUSP4_BI. Sveže transformante smo ponovno suspendirali v 100 µl gojišča LB in konfluentno razmazali na plošče LB z dodanima antibiotikoma ampicilin (110 µg/ml) in kloramfenikol (25 µg/ml) ter inkubirali preko noči pri temperaturi 37 °C. Naslednji dan smo iz 50 inokuliranih plošč LB postrgali bakterijsko biomaso, jo ponovno suspendirali v 50 ml gojišča LB ter dodali v 1 l svežega gojišča LB z dodanima antibiotikoma ampicilin (110 µg/ml) in kloramfenikol (25 µg/ml). Po 1 h gojenja kulture s stresanjem (180 obr/min) pri temperaturi 37 °C smo, z dodatkom izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG) v končni koncentraciji 0,8 mM, sprožili izražanje gena *usp*. Bakterijsko kulturo smo, po dodatku IPTG, gojili še nadaljnji 2 uri. Bakterijsko biomaso smo zbrali s centrifugiranjem pri 4000g, 15 minut. Po odstranjevanju gojišča smo bakterijsko usedlino do uporabe shranili pri temperaturi -20 °C.

3.2.3.3 Izražanje genov *usp*, *usp-gfp* in Δhcp -*usp* v ekspresijskih sistemih *E. coli* MG1655 (DE3), BL21 (DE3) in BL21 (DE3) pLysE

Ustrezne plazmide smo s transformacijo vnesli v različne ekspresijske sisteme bakterije *E. coli*. Prekonočne kulture transformiranih sevov smo 100x redčili v gojišču LB z dodanim ampicilinom (v končni koncentraciji 110 µg/ml) ali, v primeru seva BL21 (DE3) pLysE, z dodanim ampicilinom in kloramfenikolom (v končni koncentraciji 25 µg/ml). Nacepljene kulture smo gojili s stresanjem (180 obr/min) pri temperaturi 37 °C. Rast bakterij smo spremljali z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 600 nm (OD₆₀₀). Ko je optična gostota kulture (OD₆₀₀) dosegla vrednost ~0,5 smo z dodatkom IPTG do končne koncentracije 0,8 mM, sprožili izražanje gena za RNA polimerazo bakteriofaga T7 in posledično tudi genov rekombinantnih proteinov, ki so pod kontrolo T7 promotorja. Inducirano kulturo smo gojili pri temperaturi 37 °C, s stresanjem (180 obr/min) še nadaljnje 4 ure. Celice smo nato ločili od gojišča s centrifugiranjem 15 minut pri 4000g. Po odstranjevanju gojišča smo bakterijsko usedlino do uporabe shranili pri temperaturi -20 °C.

3.2.4 Metode izolacije, čiščenja in zaznavanja rekombinantnih proteinov

3.2.4.1 Ni-NTA afinitetna kromatografija

Vsem genom preučevanih proteinov smo na 3' koncu dodali zapis za šest histidinov. Nastali polihistidinski repek omogoči izolacijo proteina z Ni-NTA afinitetno kromatografijo. Princip ločevanja Ni-NTA kromatografije temelji na afiniteti histidinskih ostankov do ionov niklja (Ni²⁺), ki so vezani na nosilec v koloni. Nosilec je v tem primeru agaroz (Sefarose CL-6B), na katero je vezana nitrilotriocetna kislina (NTA, ang. »nitrilotriacetic acid«). NTA kot kelator zasede štiri od šestih vezavnih mest liganda (Ni²⁺). Preostali dve vezavni mesti Ni²⁺ služita za vezavo sosednjih histidinskih ostankov v polihistidinskem repku (Qiagen, 2003).

Pufri, ki smo jih uporabljali pri Ni-NTA kromatografiji vsebujejo imidazol, ki s proteini tekmuje za vezavna mesta na ligand. Z uporabo različnih koncentracij imidazola smo

preprečili nespecifično vezavo proteinov (pufer za lizo), odstranili šibko vezane proteine (pufer za spiranje) ali proteine s polihistidinskim repkom sprali iz kolone (pufer za elucijo). Postopek čiščenja in izolacije proteinov je potekal v dveh fazah. V prvi fazi smo pripravili celični lizat in topno ali netopno frakcijo. V drugi fazi smo protein čistili z uporabo Ni-NTA afinitetne kromatografije. Odvisno od uporabljenega ekspresijskega sistema in/ali plazmida, želeni proteini so bili v bakterijskih celicah prisotni v topni obliki ali v netopni obliki (inkluzijska telesca, IT).

3.2.4.1.1 Priprava in ekstrakcija netopne frakcije (inkluzijska telesca)

V primeru izražanja gena *usp* ali *usp-gfp* v sevu MG1655 (DE3) v odsotnosti proteinov imunosti pride do nastanka inkluzijskih telesc.

Zbrano bakterijsko biomaso smo ponovno suspendirali v pufru za lizo (2 ml pufru/g bakterijske biomase) in dodali lizocim (1 mg/ml), RNazo (10 µg/ml), 20 mM β-merkaptobenatol ter mešanico inhibitorjev proteaz (1 tableta/50 ml pufru). Vzorec smo nato inkubirali na ledu 30 minut in po tem sonicirali 10 minut (60 % jakost, 20 s pulz in 20 s premor). Po sonikaciji smo vzorec centrifugirali 20 minut pri 20000g in 4 °C. Supernatant smo odstranili, usedlino pa ponovno suspendirali v 10 ml pufru I. Sledil je še en cikel soniciranja (10 minut pri 60 % jakosti in dvajset sekund trajajočimi pulzi z dvajset sekundnimi premori) in centrifugiranja (20 minut pri 20000g in 4 °C). Supernatant smo ponovno odstranili in pelet, v katerem se nahajajo inkluzijska telesca, ponovno suspendirali v 5 ml pufru za razvijanje. Slednji vsebuje 8 M ureo, ki omogoča raztapljanje inkluzijskih telesc. Na opisan način pripravljeni vzorec vsebuje iz inkluzijskih telesc raztopljene proteine, katere smo inkubirali z Ni-NTA agarozo.

3.2.4.1.2 Priprava in ekstrakcija topne frakcije

V kolikor smo za sintezo Proteina Usp in ΔHcp-Usp sta bila v topni frakciji, v kolikor smo za sintezo uporabljali sev BL21 (DE3) ali BL21 (DE3) pLysE in plazmide na katerih so prisotni geni za proteine imunosti. Bakterijsko biomaso smo lizirali v pufru za lizo (2 ml pufru/g bakterijske biomase) z dodatkom lizocima (1 mg/ml), RNaze (10 µg/ml), 20 mM β-merkaptobenatola in mešanice inhibitorjev proteaz (1 tableta/50 ml pufru). Liza je potekala 1 uro pri temperaturi 4 °C s počasnim mešanjem. V nadaljevanju smo celice sonicirali 10 minut z 10 s trajajočim pulzom in 10 s premorom pri amplitudi 60 %. Topno frakcijo smo od netopne ločili s centrifugiranjem 20 minut pri 20000g in 4 °C. Supernatant smo še ultracentrifugirali 30 minut pri 100000g. Pridobljeni supernatant smo po ultracentrifugiranju inkubirali z Ni-NTA agarozo.

3.2.4.1.3 Čiščenje proteinov z uporabo Ni-NTA kromatografije

Čiščenje proteinov z Ni-NTA kromatografijo je potekalo v treh korakih. V prvem koraku smo zelene proteine iz topne ali raztopljene netopne frakcije vezali na Ni-NTA agarozo. Vezava je potekala 1 h pri temperaturi 4 °C s počasnim mešanjem. V drugem koraku smo kolono spirali

z 10 ml pufra za lizo in nato 20 ml pufra za spiranje. Na ta način smo odstranili nespecifično vezane proteine. V tretjem koraku smo zelene proteine sprali iz kolone z uporabo 3x 3 ml pufra za elucijo.

Pri izolaciji proteinov iz raztopljenih inkluzijskih telesc je bil potreben dodaten korak, in sicer odstranjevanje denaturanta (urea). Uporabili smo pristop zamenjave pufra po vezavi proteina na trdno površino (kolono). Medmolekulske interakcije, ki vodijo v nastanek proteinskih skupkom naj bi na ta način bile minimizirane (Clark, 2001). Ureo smo odstranjevali z uporabo črpalke za ustvarjanje gradienta (»BioRad Econo pump and gradient former«). Zamenjavo pufra smo dosegli po 30 minutah ob uporabi pretoka 2 ml/min. Prisotnost, koncentracijo in čistost izoliranih proteinov smo zasledovali z NaDS- PAGE.

3.2.4.2 Dializa izoliranih proteinov

Dializa je proces pri katerem majhne molekule prehajajo skozi polprepustno membrano v smeri koncentracijskega gradienta. To tehniko smo uporabljali za odstranjevanje imidazola iz raztopine proteinskega izolata. Uporabljali smo dializne kasete z membrano katere velikost por omogoča prehajanje molekul manjših od 3 kDa. Kot dializni pufer smo uporabljali 20 mM Tris-HCl, pH 8. Dializa je potekala preko noči pri 4 °C ob konstantnem mešanju. Naslednji dan smo dializni pufer zamenjali še 2x. Prvič po dveh urah in drugič po nadaljnji 1h.

3.2.4.3 Gelska kromatografija

Protein Usp smo želeli dodatno očistiti z uporabo gelske kromatografije, kot metode, ki omogoča porazdelitev molekul med stacionarno in mobilno fazo zaradi različne velikosti. Uporabljali smo kolono napolnjeno z gelom Superdex 200 10/30 GL, ki ima območje frakcioniranja molekul z molekulskimi masami med 10 in 600 kDa. Kolono smo najprej povezali na sistem tekočinske kromatografije za hitro ločevanje proteinov (FPLC, ang. »fast protein liquid chromatography«) in jo preko noči spirali z ultračisto in filtrirano vodo pri pretoku 0,1 ml/min. Pred nanosom proteinskega vzorca smo kolono ekvilibrirali s spiranjem s 50 ml (~ 2 volumna kolone) pufra za gelsko kromatografijo pri pretoku 2 ml/min. Hkrati smo proteinski vzorec centrifugirali 15 minut pri 14000g in 4 °C. Supernatant (0,5 ml) smo z injekcijsko brizgo nanесли na kolono in, ob vzdrževanju pretoka 0,5 ml/min, zbirali frakcije volumna 0,5 ml. Prisotnost in čistost proteinov v frakcijah z najvišjo absorbanco smo ugotavljali z NaDS poliakrilamidno elektroforezo.

3.2.4.4 NaDS- PAGE

Univerzalna metoda pri preučevanju proteinov je ločevanje glede na molekulsko maso z uporabo poliakrilamidne elektroforeze v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS-PAGE, ang. »polyacrilamide gel electrophoresis«) (Rath in sod., 2009). Natrijev dodecilsulfat (NaDS) je detergent, ki se veže na hidrofobne aminokislinske ostanke proteinov, jih denaturira in obda z negativnim nabojem. Posledično proteini v električnem polju potujejo proti anodi, pri čemer je hitrost potovanja obratno sorazmerna z njihovo velikostjo.

Proteinske vzorce smo pred nanosom na NaDS-PAGE obarvali in obtežili z uporabo 4x NuPAGE LDS nanašalnega pufra. Po dodatku nanašalnega pufra smo vzorce segrevali 5 minut pri temperaturi 100 °C in nato hitro ohladili na ledu. Nanesli smo jih v jamice pripravljenega tricin-NaDS ali glicin-NaDS poliakrilamidnega gela. Poleg proteinskih vzorcev, smo na gel nanesli tudi standard znanih molekulskih mas »Page Ruler Prestained Protein Ladder« (slika 5). Elektroforeza je potekala pri konstantni napetosti 180 V v 1x raztopni pufra MES ali MOPS. Po končanem ločevanju smo proteine zaznali z uporabo raztopine za barvanje (»Comassii brilliant blue«) po navodilih proizvajalca ali smo gel uporabili za prenos proteinov po Westernu in jih nato zaznali z uporabo specifičnih protiteles.

3.2.4.5 Prenos proteinov po Westernu

Prenos proteinov po Westernu (tudi imunoblot) je pomembna tehnika pri kateri proteine, po prenosu iz poliakrilamidnega gela na PVDF (polivinilid fluoridno) membrano, lahko zaznamo na podlagi specifične interakcije med antigenom (preučevani protein) in protitelesi.

Za zaznavanje proteinov smo uporabljali protitelesa proti polihistidinskemu repku ali specifična protitelesa proti proteinu Usp. Takoj po ločevanju proteinov z NaDS-PAGE smo poliakrilamidni gel uporabili za mokri prenos proteinov na PVDF membrano. Membrana je hidrofobna in smo jo zato najprej aktivirali z namakanjem v 100 % metanolu za 20 s. Za prenos proteinov z NaDS- PAGE gela na PVDF membrano smo uporabljali aparat Mini Trans- Blot. Pri prenosu, ki je potekal 90 minut pri konstantnem toku 150 mA, smo uporabljali pufer WB za prenos. Z namenom znižanja nespecifičnega ozadja smo membrano po prenosu najprej blokirali z uporabo 4 % raztopine govejega serumskega albumina (BSA, ang. »bovine serum albumin«) v pufru WB za spiranje. Membrano smo blokirali 2 h pri sobni temperaturi ali preko noči pri 4 °C. Po blokiranju smo membrano spirali 3x po 10 minut z uporabo pufra WB za spiranje. Sledila je inkubacija s primarnimi protitelesi (mišja protitelesa proti polihistidinskemu repku ali proti proteinu Usp) 2h pri sobni temperaturi ali preko noči pri 4 °C. Uporabljali smo 1000x redčitev protiteles v 4 % raztopini BSA v pufru WB za spiranje. Po vezavi primarnih protiteles smo membrano spirali (3x po 10 minut) v pufru WB za spiranje in nato 90 minut inkubirali z vrstno specifičnimi sekundarnimi protitelesi, ki se vežejo na primarna in so konjugirana s hrenovo preoksidazo (kozja protimišja protitelesa). Po končani vezavi sekundarnih protiteles na primarna, smo nevezana sekundarna protitelesa odstranili s spiranjem membrane 3x po 10 minut. Sledila je detekcija sekundarnih protiteles (in posredno preiskovanih proteinov) z uporabo raztopine 4-klor-1- naftola v pufru za razvijanje. Hrenova preoksidaza, v prisotnosti vodikovega peroksida, spremeni 4-klor-1-naftol v temno vijoličasto oborino, ki je vidna s prostim očesom.

3.2.5 DNazni test

Aktivnost proteinov Usp in Usp-GFP, izoliranih iz inkluzijskih telesc, smo preverjali z *in vitro* razgradnjo lineariziranega plazmida pUC19. Plazmid pUC19 smo najprej rezali z restrikcijskim encimom *EcoRI*. V reakcijsko mešanico za preverjanje nukleazne aktivnosti smo dodali 100 ng lineariziranega plazmida pUC19 in izolirane proteine v koncentraciji med

0,3 in 0,5 mg/ml v 1x pufru FDGB proizvajalca ThermoFisher Scientific (ang. »fast digest green buffer«). Pripravljene reakcijske mešanice smo inkubirali preko noči pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo reakcijske mešanice nanесли na 0,8 % agarozni gel in na ta način analizirali uspešnost razgradnje plazmida.

3.2.6 Preverjanje izločanja nativnega proteina Usp v bakterijsko gojišče

Želeli smo ugotoviti ali se protein Usp, ki je pod kontrolo naravnega promotorja kloniran v plazmide z različno kombinacijo zapisov za proteine imunosti, izloča v bakterijsko gojišče. Pri tem smo uporabljali naslednje plazmide: pUSP4RL, pUSP4RL_imu1,3, pUSP4RL_BI. Na plazmidu pUSP4RL so zapisi za protein Usp in vse tri proteine imunosti. Plazmid pUSP4RL_imu1,3 nima zapisa za protein Imu2, medtem ko na plazmidu pUSP4RL_BI ni zapisov za proteine imunosti. Plazmide smo s transformacijo vstavili v sev MG1655.

Prekonočno kulturo transformiranih sevov MG1655 smo 100x redčili v 25 ml svežega gojišča LB ali gojišča M9 z dodanim ampicilinom (110 µg/ml). Seve smo gojili 6 h ali preko noči pri temperaturi 37 °C s stresanjem (180 obr/min). Bakterijsko biomaso smo nato odstranili s centrifugiranjem (10 minut pri 6000g) in filtriranjem z uporabo filtra s porami premera 0,22 µm. Sledilo je obarjanje proteinov iz izrabljenega gojišča z uporabo 75 % amonijevega sulfata ali trikloroocetne kisline (TCA, ang. »trichloroacetic acid«).

3.2.6.1 Obarjanje proteinov iz izrabljenega gojišča z amonijevim sulfatom

V 25 ml izrabljenega in filtriranega gojišča LB ali M9 smo dodali 75 % amonijevega sulfata (12, 86 g) in proteine obarjali preko noči s počasnim mešanjem pri temperaturi 4 °C. Vzorce smo nato centrifugirali 30 minut pri 14000g in 4 °C. Po popolnem odstranjevanju supernatanta smo proteinsko oborino ponovno suspendirali v 20 µl pufru PBS ali v 20 µl 6M uree. Prisotnost proteinov smo ugotavljali z NaDS-PAGE ali metodo prenosa po Westernu po protokolu opisanem v točkah 3.2.4.4 in 3.2.4.5.

3.2.6.2 Obarjanje proteinov iz izrabljenega gojišča s TCA

Pripravljenim vzorcem izrabljenega gojišča smo dodali TCA do končne koncentracije 10 %. Vzorce smo inkubirali na ledu 10 minut in nato centrifugirali 15 minut pri 14000g in 4 °C. Po popolnem odstranjevanju supernatanta smo vzorcem dodali 1 ml ledeno mrzlega acetona, rahlo premešali in centrifugirali 10 minut pri 14000g in 4 °C. Po centrifugiranju smo supernatant odstranili, proteinsko oborino posušili in ponovno suspendirali v 20 µl pufru PBS ali v 20 µl 6M uree. Proteine smo analizirali z NaDS-PAGE in metodo prenosa po Westernu.

3.2.7 Testiranje vpliva proteina Usp na celične linije humanega izvora

Teste smo opravili na štirih različnih celičnih linijah. Na celični liniji humanih monocitov (MM6) smo ugotavljali preživelost po tretiranju z izoliranim proteinom Usp. Na celičnih

kulturah HeLa, HUVEC in HEK293 smo preverjali vpliv proteina Usp po okužbi ali tretiranju z bakterijskim lizatom.

3.2.7.1 Gojenje celične linije MM6 in ugotavljanje preživelosti po tretiranju z izoliranim proteinom Usp

Celice MM6 (Mono-Mac-6) smo gojili v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in atmosferi, ki vsebuje 5 % CO₂, v gojišču RPMI 1640 z dodanim 2 mM L-glutaminom, 1 % neesencialnimi aminokislinami, dodatkom OPI, 10 % fetalnim govejim serumom (FBS, ang. *fetal bovine serum*) ter antibiotikoma ampicilin in streptomycin. Ko celice dosegle koncentracijo približno 6×10^5 /ml, smo jih presadili v sveže gojišče. Pri tem smo celično suspenzijo centrifugirali 5 minut pri 100g in sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo izrabljeno gojišče odstranili, celice ponovno suspendirali in v novo gojitveno posodico prenesli v koncentraciji 2×10^5 /ml. Razmnoževali smo jih 2-krat na teden.

Za ugotavljanje vpliva izoliranega proteina Usp na preživelost celic MM6 smo uporabljali metodo barvanja s tripanskim modrilom. Barvilo lahko vstopa samo v celice s poškodovano membrano in jih obarva modro, medtem ko celice z intaktno membrano ostanejo neobarvane. Celice smo nasadili v posodice s šestimi jamicami v koncentraciji 2×10^5 /ml. Takoj po presaditvi smo v gojišče dodali izoliran protein Usp v končni koncentraciji 0,025 mg/ml (0,36 µM). Ker smo protein Usp uporabili takoj po čiščenju z Ni-NTA kromatografijo (brez dialize), smo pufer za elucijo iz kompleta za Ni-NTA uporabili kot negativno kontrolo. Po 24 urni izpostavljenosti proteinu Usp, smo vzorec tretiranih celic (25 µl) barvali s tripanskim modrilom v razmerju 1:1. Pri štetju barvanih in nepobarvanih celic smo uporabljali števno komoro Burker-Turk in invertni mikroskop Zeiss Axio Vert.A1. Dobljene rezultate smo statistično analizirali z uporabo Studentovega t- testa pri verjetnosti 0,05.

3.2.7.2 Gojenje celičnih linij HUVEC, HEK293 in HeLa in ugotavljanje genotoksične aktivnosti proteina Usp po infekciji ali tretiranju z bakterijskim lizatom

3.2.7.2.1 Gojenje celičnih linij in priprava za izvedbo poizkusa

Vse tri celične linije so adhezivne in se pri gojenju pritrdijo na površino gojitvene posodice. Omenjene celične linije smo gojili pri temperaturi 37 °C in 5 % CO₂, v gojišču DMEM z dodanim 10 % FBS in L- glutaminom. Ko so celice prerastle približno 90 % podlage, smo jih presadili v nove gojitvene posodice. Pri tem smo najprej odstranili izrabljeno gojišče, nato celice spirali s pufrom PBS (ang. *phosphate saline buffer*). Na ta način smo odstranili odmrle celice kakor tudi ostanke gojitvenega medija. Celice smo nato odlepili od podlage z uporabo tripsina. Ko so celice bile odlepljene od podlage, smo delovanje tripsina prekinili z dodatkom hranilnega medija v katerem se med drugim nahajajo inhibitorji serinskih proteaz. Ostanke tripsina smo odstranili s centrifugiranjem 5 minut pri 100g. Celično usedlino smo ponovno suspendirali in ustrezen volumen prenesli v novo gojitveno posodico (po navodilih proizvajalca) ali v posodico s šestimi jamicami.

Celice HUVEC smo nasadili v koncentraciji 25×10^4 celic/jamico, HeLa v koncentraciji 40×10^4 celic/jamico in HEK293 v koncentraciji 60×10^4 celic/jamico. Naslednji dan smo celicam zamenjali hranilni medij in jih okužili z izbranimi bakterijskimi sevi ali tretirali z bakterijskim lizatom.

3.2.7.2.2 Infekcija celičnih linij

Pri infekciji celičnih linij smo uporabljali sev MG1655, ki smo ga transformirali z naslednjimi plazmidi:

- pUSP4RL
- pΔUsp
- pSP15
- pHS27
- pBAC *pks*⁺ (pozitivna kontrola)
- pBAC *clbA*⁻

V plazmid pBAC *pks*⁺ je kloniran otok patogenosti *pks*⁺ s funkcionalnimi zapisi za gene, ki so potrebni za sintezo genotoksina kolibaktin. Sev MG1655 pBAC *pks*⁺ smo uporabljali kot pozitivno kontrolo. Kot negativne kontrole smo uporabljali naslednje seve: netransformiran sev MG1655, sev MG1655, ki je transformiran s plazmidom pBAC *clbA*⁻ in sev MG1655, ki je transformiran s plazmidom pΔUsp. Na plazmidu pBAC *clbA*⁻ je okvarjen zapis za encim fosfopanteteinil transferazo, ki je potreben za nastanek funkcionalnega kolibaktina, medtem ko je na plazmidu pΔUsp, gen *usp* skrajšan na račun DNazne domene. Na plazmidih pUSP4RL, pSP15 in pHS27 se nahaja otok patogenosti *usp*, ki je pomnožen iz treh različnih sevov *E. coli* z različnim številom in položajem genov za proteine imunosti (preglednica 6).

Prekonočne kulture zgoraj omenjenih sevov smo 100x redčili v svežem gojišču LB z dodanimi ustreznimi antibiotiki. Gojili smo jih pri temperaturi 37 °C s stresanjem do OD₆₀₀ 0,9. Odvisno od izbrane multiplicitete infekcije (MOI, ang. »multiplicity of infection«, -število bakterijskih celic/1 človeško celico) smo ustrezen volumen bakterijske kulture dodali pripravljenim človeškim celicam in inkubirali 4 h pri temperaturi 37 °C in 5 % CO₂. Bakterije smo nato odstranili, človeške celice vsaj 3x sprali s pufrom PBS in dodali hranilni celičnim medij z dodatkom gentamicina v končni koncentraciji 200 µg/ml. Nastanek dvojnih prelomov DNA v okuženi celični liniji smo ugotavljali takoj po okužbi, 4 h po okužbi ali 20 h po okužbi.

3.2.7.2.3 Priprava bakterijskega lizata

Prekonočne kulture bakterijskih sevov smo 100x redčili v 5 ml gojišča LB in gojili pri temperaturi 37 °C s stresanjem. Ko je OD₆₀₀ dosegla vrednost 0,9, smo bakterijske kulture centrifugirali, supernatant odstranili in bakterijsko usedlino ponovno suspendirali v 500 µL hranilnega celičnega medija z dodanimi zaviralci proteaz in gentamicinom (200 µg/ml). Bakterijske celice smo lizirali s soniciranjem in lizat filtrirali z uporabo filtra s porami premera 0,22 µm. Količino lizata različnih sevov smo normalizirali na podlagi rezultatov Bradfordovega testa (po navodilih proizvajalca). Pripravljeni celični liniji smo dodali 100 µl

ali 500 µl bakterijskega lizata. Nastanek dvojnih prelomov DNA smo analizirali po 24-urni izpostavljenosti celične linije bakterijskemu lizatu.

3.2.7.2.4 Ugotavljanje genotoksične aktivnosti proteina Usp

Okužene ali z bakterijskim lizatом tretirane celice smo najprej sprali z uporabo pufru HBSS (ang. Hank's balanced salt solution). Po odstranjevanju pufru smo celicam dodali 70 µl 2x NuPAGE nanašalnega pufru z dodanim β- merkaptotanolom. S pomočjo nastavka za pipeto smo celično biomaso postrgali, jo sonicerili za 5 s pri 25 % amplitudi in nato 20 µl nanесли na NaDS- PAGE gel. γ H2AX smo ugotavljali z uporabo metode prenosa proteinov po Westernu (kot je opisano v poglavju 3.2.4.5). Pri tem smo uporabljali mišja primarna protitelesa proti γ H2AX. Poleg tega smo z namenom normalizacije količine celične biomase v vsakem analiziranem vzorcu, isto PVDF membrano uporabili tudi za detekcijo aktina z uporabo mišjih primarnih protiteles proti aktinu. S tem smo preprečili morebitne napake pri interpretaciji rezultatov, ki so posledica razlik v številu celic med posameznimi jamicami gojitvene posodice. Signal, ki je nastal po dodatku sekundarnih protiteles smo kvantificirali s pomočjo računalniškega programa Quantity One. Normalizacijo signala pri vseh vzorcih smo izvedli z izračunom razmerja med intenziteto signala γ H2AX in intenziteto signala aktina.

3.2.8 Ugotavljanje izražanje gena *usp* na nivoju posamezne bakterijske celice v populaciji genetsko identičnih bakterijskih celic

Izražanje gena *usp*, ki je pod kontrolo naravnega promotorja, v populaciji genetsko identičnih bakterijskih celic smo ugotavljali s fuzijo gena *usp* in gena *gfp*, za zeleni fluorescentni protein, brez lastnega promotorja. V ta namen smo sev MG1655 transformirali s plazmidom pTUG_imu in gojili v tekočem ali na trdem gojišču LB pri temperaturi 37 °C.

3.2.8.1 Vzorčenje in priprava mikroskopskih preparatov

V primeru gojenja seva v tekočem gojišču smo kulturo vzorčili v stacionarni fazi rasti. Pri tem smo bakterijsko rast spremljali z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 600 nm. Volumen vzorca za pripravo mikroskopskih preparatov smo prilagodili glede na izmerjeno vrednost OD₆₀₀, in sicer na način, da je optična gostota vseh vzorcev bila 1. Vsem vzorcem smo dodali kloramfenikol v končni koncentraciji 100 µg/ml. S tem smo prekinili nadaljnjo sintezo proteinov. Vzorce smo shranili preko noči pri temperaturi 4 °C.

Pri gojenju seva na trdem gojišču LB smo, po prekonočni inkubaciji, nekaj kolonij ponovno suspendirali v fiziološki raztopini. OD₆₀₀ vzorca smo izenačili na 1. Na opisan način pridobljen vzorec smo uporabili za pripravo mikroskopskega preparata.

3.2.8.2 Priprava mikroskopskega preparata in mikroskopiranje

10 µl poli-L-lizina smo razmazali po površini objektnega stekelca. Ko se je poli-L-lizin posušil, smo na objektno stekelce nanесли 10 µl vzorca, prekrili s krovnim stekelcem in nato

mikroskopirali z uporabo invertnega fluorescentnega mikroskopa Zeiss Axio Observer.Z1 pri 600x povečavi. Na podlagi dobljenih mikroskopskih slik smo, po štetju vseh bakterijskih celic kakor tudi bakterijskih celic pri katerih je prišlo do izražanja gena *gfp*, izračunali odstotek fluorescirajočih bakterij.

4 REZULTATI

4.1 LASTNOSTI AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ IZOLIRANIH PROTEINOV

S pomočjo programa ProtParm, ki je dostopen na internetni strani ExPASy, smo analizirali lastnosti proteinov katere smo izolirali. Osnovi podatki so napisani v preglednici 10.

Preglednica 10: Osnovni podatki o proteinih Usp, Δ Hcp-Usp, Usp-GFP in Imu3

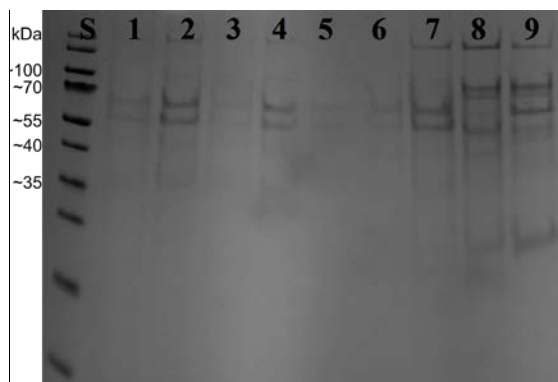
Protein (s polihistidinskim repkom)	M _w (kDa)	Dolžina (ak)	Teoretična vrednost pI	Število cisteinskih ostankov
Usp	66,7	601	5,78	9 (1,5 %)
Δ Hcp-Usp	49,9	453	5,83	5 (1,1 %)
Usp-GFP	94,4	848	5,76	11 (1,3 %)
Imu3	11,5	96	4,56	0 (0 %)

4.2 PRODUKCIJA, IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTEINOV Usp, Usp -GFP, Δ Hcp-Usp in Imu3

V poglavju, ki sledi so opisani rezultati, ki smo jih pridobili med postopki prekomernega izražanja, izolacije in čiščenja proteinov.

4.2.1 Izražanje gena *usp* v sevu *Bacillus megaterium* MS941

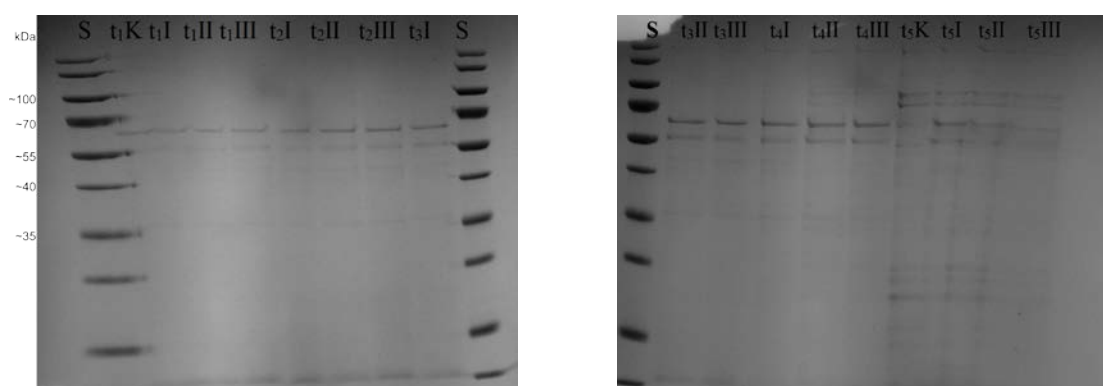
Z NaDS elektroforezo smo ugotavljali uspešnost sinteze in izločanja proteina Usp v ekspresijskem sistemu *Bacillus megaterium* MS941(pPT7-RNAP) (pPT7-SPlipA). Izražanje gena *usp* ali sinteza proteina v omenjenem ekspresijskem sistemu ni bila uspešna. Pri tem smo najprej preverjali morebitno prisotnost proteina v zunajcelični frakciji po obarjanju z 80 % amonijevim sulfatom. Kot kontrolo smo uporabljali na enak način pripravljen proteinski vzorec kulture v kateri nismo sprožili sinteze proteina. Protein ustrezne velikosti (~67 kDa) smo zaznali pri vseh analiziranih vzorcih, vendar razlik v koncentraciji proteina iz vzorcev inducirane in neinducirane kulture nismo opazili (slika 9).



Slika 9: NaDS elektroforeza vzorcev zunajcelične frakcije seva *Bacillus megaterium* MS941 pPT7-SP-lipA-usp po obarjanju z 80 % amonijevim sulfatom

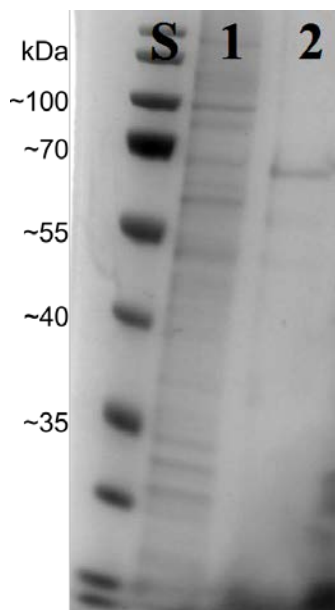
(sintezo proteinov smo sprožili z dodatkom 0,5 % ksiloze pri OD_{600} 0,5). Vzorce zunajcelične frakcije smo nanašali na NaDS poliakrilamidni gel v naslednjem vrstnem redu: S- proteinski standard, 1- vzorec neinducirane zunajcelične frakcije, 2- vzorec zunajcelične frakcije 30 min po dodatku ksiloze, 3- vzorec neinducirane frakcije, 4- vzorec zunajcelične frakcije 60 min po dodatku ksiloze, 5- vzorec zunajcelične frakcije 90 min po dodatku ksiloze, 6- vzorec neinducirane frakcije, 7- vzorec zunajcelične frakcije 120 min po dodatku ksiloze, 8- vzorec neinducirane frakcije po prekonočnem gojenju, 9- vzorec zunajcelične frakcije po prekonočnem gojenju kulture po dodatku ksiloze.

Ker smo sklepali, da ni prišlo do ustreznega izražanja gena *usp*, smo v nadaljevanju skušali optimizirati fazo celične rasti, pri kateri z dodatkom ksiloze sprožimo izražanje gena *usp*. S tem namenom smo v kulturo dodali 0,5 % ksilozo pri različnih vrednostih OD_{600} , in sicer pri 0,3, 0,4 in 0,5. Tudi v tem primeru, razlik med proteinskimi vzorci iz inducirane in neinducirane kulture, ne glede na vrednost OD_{600} pri kateri smo dodali ksilozo, nismo opazili (slika 10). Nato smo preverjali prisotnost proteina v znotrajcelični frakciji, vendar proteina ustrezne velikosti nismo zaznali (slika 11). Z metodo prenosa po Westernu in uporabo specifičnih protiteles proti proteinu Usp, proteina v nismo zaznali v zunajcelični niti v znotrajcelični frakciji (slika12).

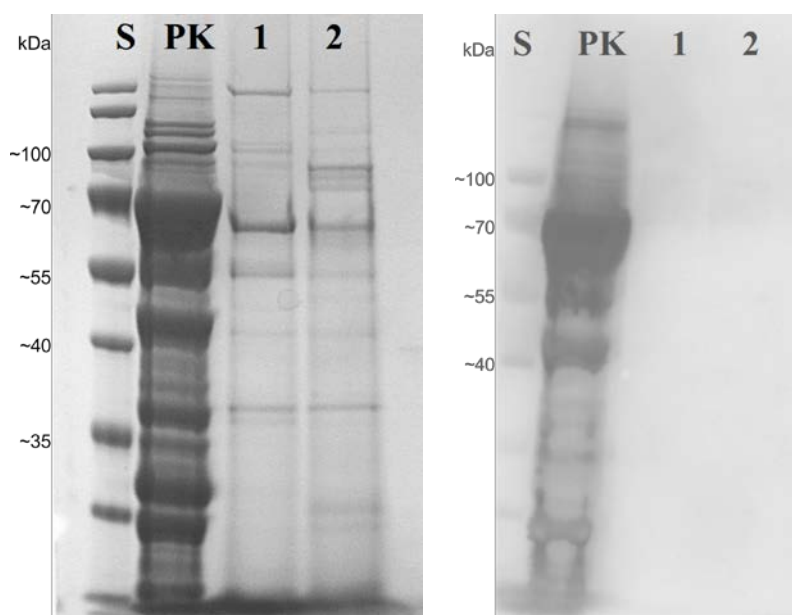


Slika 10: NaDS elektroforeza vzorcev zunajcelične frakcije seva *Bacillus megaterium* MS941 pPT7-SP-lipA-usp po dodatku 0,5 % ksiloze pri različnih vrednostih OD_{600} .

Legenda: S= proteinski standard, t_1 = 1 h po dodatku ksiloze, t_2 = 2 h po dodatku ksiloze, t_3 = 3 h po dodatku ksiloze, t_4 = 4 h po dodatku ksiloze, t_5 = 5 h po dodatku ksiloze, K= kontrola- vzorec zunajcelične frakcije brez dodatka ksiloze, I= dodatek ksiloze pri OD_{600} 0,3, II- dodatek ksiloze pri OD_{600} 0,4, III- dodatek ksiloze pri OD_{600} 0,5.



Slika 11: NaDS elektroforeza znotrajcelične in zunajcelične frakcije seva *Bacillus megaterium* MS941 pPT7-SP-lipA-usp po indukciji sinteze proteina Usp z 0,5 % ksiloza pri OD₆₀₀ 0,5.
Legenda: S= proteinski standard, 1- vzorec znotrajcelične frakcije, 2- vzorec zunajcelične frakcija po ponovnem suspendiranju proteinske usedline v 8M urei



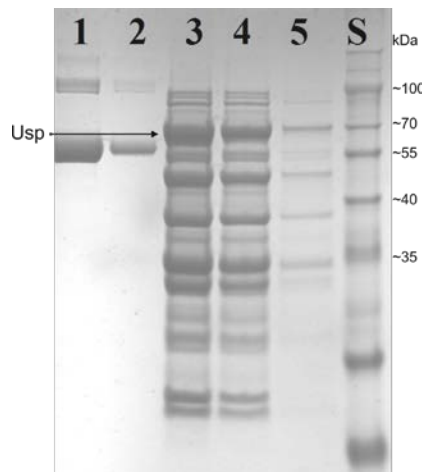
Slika 12: Določanje proteina Usp v zunajcelični in znotrajcelični frakciji seva *Bacillus megaterium* MS941 pPT7-SP-lipA-usp po barvanju proteinov s »Coomassie brilliant blue« (levo) in specifičnimi protitelesi proti proteinu Usp (desno).
Legenda: S- proteinski standard, PK- pozitivna kontrola (izoliran protein Usp), 1- zunajcelična proteinska frakcija, 2- znotrajcelična proteinska frakcija

4.2.2 Čiščenje proteinov Usp, Usp-GFP, Δ Hcp-Usp in Imu3 z Ni-NTA kromatografijo po izražanju v različnih ekspresijskih sistemih bakterije *E. coli*

Ker izražanje gena *usp* ali sinteza proteina ni bila uspešna z uporabo ekspresijskega sistema *B. megaterium*, smo v nadaljevanju gene za protein Usp, kakor tudi proteine Usp-GFP in Δ Hcp-Usp izražali v različnih ekspresijskih sistemih *E. coli*. Čistost in stabilnost izolatov po dializi smo preverjali z NaDS poliakrilamidno elektroforezo.

V kolikor je protein Usp prekomerno izražen v bakterijskih celicah, ki nimajo zapisov za proteine imunosti, deluje toksično na producerski sev (Nipič in sod., 2013). Ker smo domnevali, da je toksično delovanje proteina posledica poškodb kromosomske DNA producerskega seva, smo protein skušali pridobiti iz seva *E. coli* Keio *minC* pLysE. Sev ima mutacijo v genu *minC*, kar privede do nastanka majhnih celic, ki ne vsebujejo kromosomske DNA (Sen in Rothfield, 1998).

Po lizi bakterijskih celic in čiščenju z Ni-NTA afinitetno kromatografijo smo, v vzorcih po spiranju kolone s pufrom za elucijo, zaznali, poleg proteina Usp, tudi veliko drugih proteinskih nečistoč (slika 13). S primerjavo z znano koncentracijo govejega serumskega albumina (BSA, ang. *bovine serum albumin*) na NaDS-PAGE gelu smo ocenili, da je koncentracija proteina Usp v prvi sprani frakciji približno 0,3 mg/ml in v drugi približno 0,1 mg/ml (slika 13).

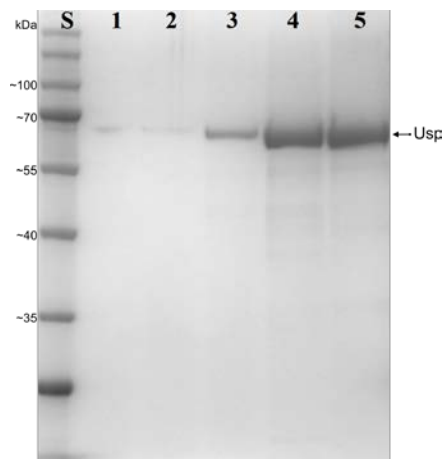


Slika 13: Čiščenje proteina Usp z Ni-NTA afinitetno kromatografijo po sintezi v bakterijskih celicah *E. coli* Keio *minC* pLysE.

Legenda: 1- BSA 0,5 mg/ml, 2- BSA 0,1 mg/ml, 3-5 frakcije po spiranju kolone s pufrom za elucijo: 3- prva frakcija, 4- druga frakcija, 5- tretja frakcija, S- proteinski standard

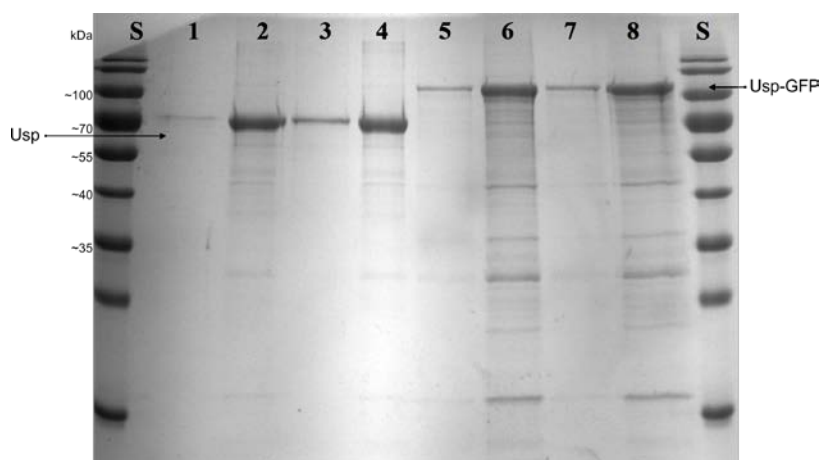
V nadaljevanju smo protein Usp prekomerno izražali v sevu MG1655 (DE3). Sev MG1655 je, med laboratorijskimi sevi, najbolj podoben divjemu tipu bakterije *E. coli*. Iz tega razloga smo domnevali, da omenjeni sev lahko, kljub toksičnosti proteina Usp, raste tudi v kolikor so geni *imu* odsotni. Pri prekomernemu izražanju gena *usp* v sevu MG1655 (DE3) smo uporabljali plazmid pUSP4-BI, ki nima zapisov za proteine imunosti. Ugotovili smo, da je protein v bakterijskih celicah prisoten v obliki inkluzijskih teles. Po čiščenju in ponovnem zvijanju

proteina, smo pridobili relativno čist proteinski izolat (slika 14). Na enak način smo izolirali tudi fuzijski protein Usp-GFP, vendar smo v tem primeru zaznali nekoliko več proteinskih kontaminant (slika 15).



Slika 14: Frakcije proteina Usp med čiščenjem z Ni-NTA afinitetno kromatografijo po raztapljanju proteina iz inkluzijskih telesc.

Legenda: S- proteinski standard, 1- na Ni-NTA kolono nevezana frakcija, 2- frakcija po spiranju kolone s pufrom za spiranje, 3-5 frakcije po spiranju kolone s pufrom za elucijo: 3- prva frakcija, 4- druga frakcija, 5- tretja frakcija.

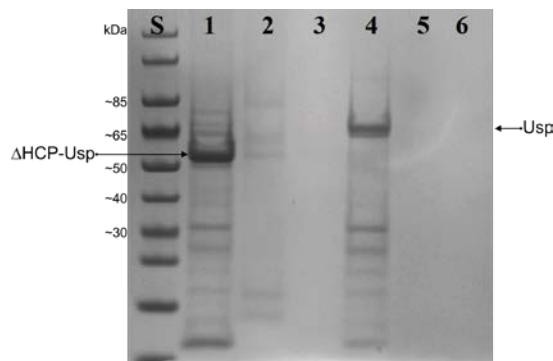


Slika 15: Proteina Usp in Usp-GFP po izolaciji iz inkluzijskih telesc in čiščenju z Ni-NTA afinitetno kromatografijo.

Legenda: S- proteinski standard, 1 in 2- protein Usp, prva frakcija po spiranju kolone s pufrom za elucijo: 1- 1 μ l, 2- 5 μ l; 3 in 4- protein Usp, druga frakcija po spiranju kolone s pufrom za elucijo: 3- 1 μ l, 4- 5 μ l; 5 in 6- protein Usp-GFP, prva frakcija po spiranju kolone s pufrom za elucijo: 5- 1 μ l, 6- 5 μ l; 7 in 8- protein Usp-GFP, druga frakcija po spiranju kolone s pufrom za elucijo: 7- 1 μ l, 8- 5 μ l.

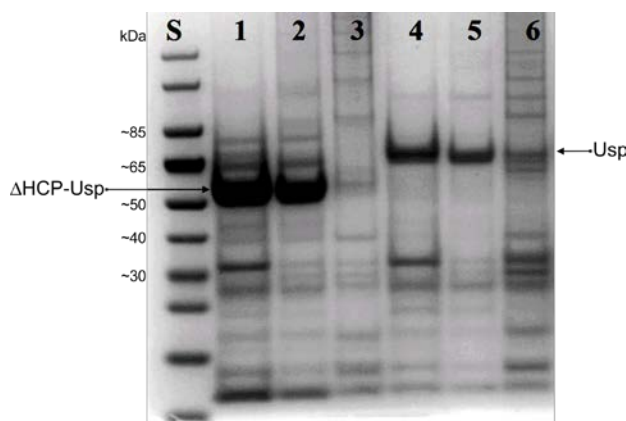
Proteine Usp, Δ Hcp-Usp in Imu3 smo prekomerno izražali v sevu BL21 (DE3). Z NaDS poliakrilamidno elektroforezo smo ugotovili, da se večina proteina spere z Ni-NTA kolone po uporabi 3 ml pufru za elucijo oz. v prvi frakciji po spiranju (slika 16). Po dializi in centrifugiranju z Ni-NTA afinitetno kromatografijo očiščenega proteinskega vzorca, z nanosom usedline kakor tudi supernatanta na NaDS- PAGE gel, smo ugotovili, da se proteina Usp in Δ Hcp-Usp ne oborita v pufru Tris-HCl (slika 17). S primerjavo z znano koncentracijo

proteina BSA na NaDS-PAGE gelu in uporabo računalniškega programa Quantity One smo ugotovili, da je bila koncentracija proteina Usp 2, 1 mg/ml (31,7 μ M), medtem ko je bila koncentracija proteina Imu3 1, 38 mg/ml oz. 125,45 μ M (slika 18).



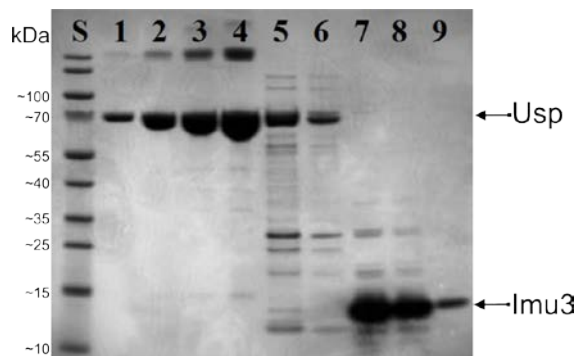
Slika 16: Proteina Δ Hcp-Usp in Usp po prekomernem izražanju v sevu BL21 (DE3) in čiščenju z Ni-NTA afinitetno kromatografijo.

Legenda: S- proteinski standard, 1, 2 in 3- protein Δ Hcp-Usp, frakcije po spiranju kolone s pufrom za elucijo, 1- prva frakcija, 2- druga frakcija, 3- tretja frakcija, 4, 5 in 6- protein Usp, frakcije po spiranju kolone s pufrom za elucijo, 4- prva frakcija, 5- druga frakcija, 6- tretja frakcija.



Slika 17: Proteina Δ Hcp-Usp in Usp po čiščenju z Ni-NTA kromatografijo pred dializo in po dializi.

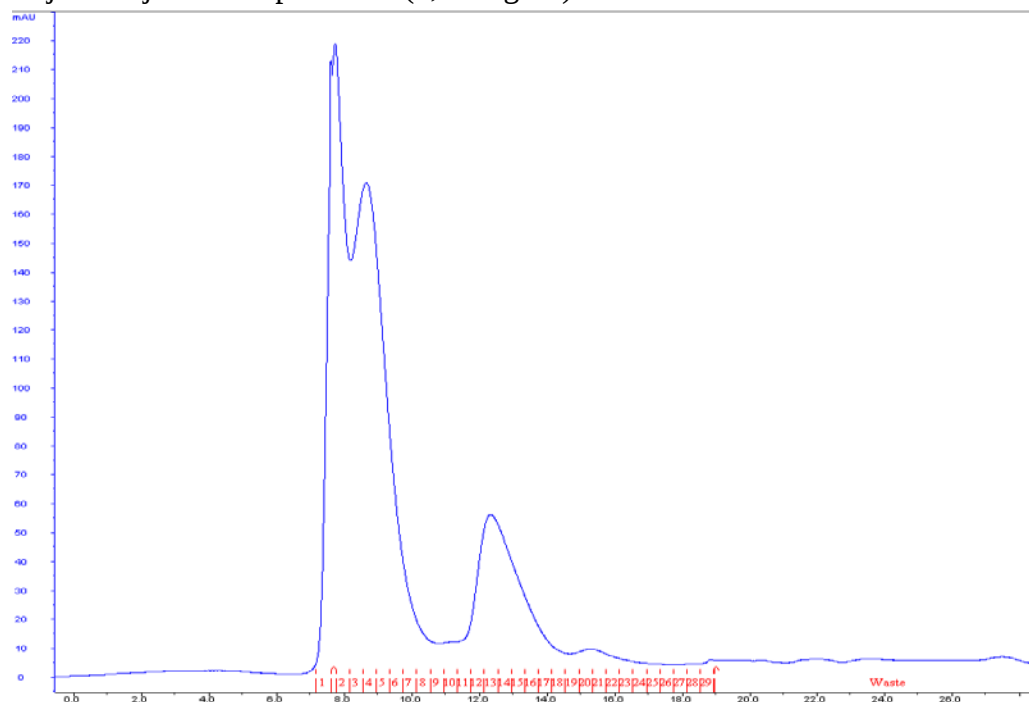
Legenda: S- proteinski standard, 1, 2 in 3- protein Δ Hcp-Usp: 1- pred dializo, 2- supernatant po dializi, 3- usedlina po dializi, 4, 5 in 6- protein Usp: 4- pred dializo, 5- supernatant po dializi, 6- usedlina po dializi.



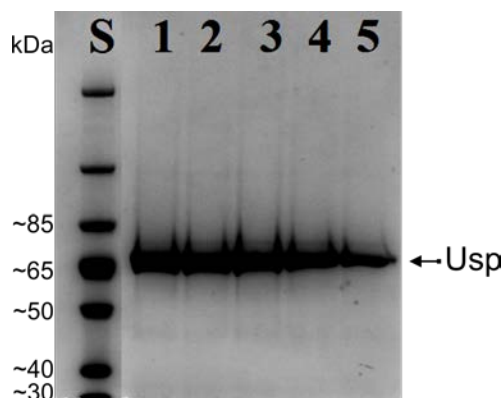
Slika 18: Primerjava koncentracij z Ni-NTA kromatografijo očiščenih proteinov Usp in Imu3 z rastopino BSA znane koncentracije.

Legenda: S- proteinski standard, jamice 1-4 BSA v naslednjih koncentracijah: 1-0,125 mg/ml, 2- 0,5 mg/ml, 3- 1 mg/ml, 4- 2 mg/ml, 5- Usp, 10 μ l, 6- Usp, 5 μ l, 7- 10 μ l Imu3, 8- 5 μ l Imu3, 9- 1 μ l Imu3.

Protein Usp smo dodatno čistili z uporabo gelske kromatografije, pri čemer smo ugotovili, da se večina proteina Usp spere iz kolone pri volumnu pufra med 7,5 in 10 ml (slika 19). Z NaDS poliakrilamidno elektroforezo proteinskih frakcij z najvišjo absorbanco smo ugotovili, da je izolat precej čist (slika 20). Z uporabo NanoDropa smo izmerili koncentracijo proteina po združevanju frakcij z najvišjo absorbanco. Koncentracija proteina v združenih frakcijah je bila skoraj 7x nižja od tiste po dializi (0,31 mg/ml).



Slika 19: Kromatogram proteina Usp na koloni Superdex 200.



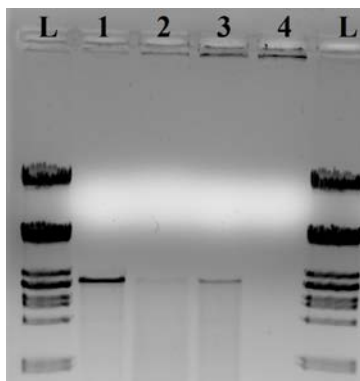
Slika 20: NaDS-PAGE elektroforeza frakcij gelske kromatografije med čiščenjem proteina Usp.

Legenda: S- proteinski standard, frakcije od 1- 7,5 ml do 8,0 ml, 2- 8,0 ml do 8,5 ml, 3- 8,5 ml do 9,0 ml, 4- 9,0 ml do 9,5 ml, 5- 9,5 ml do 10 ml.

4.3 REZULTATI UGOTAVLJANJA AKTIVNOSTI PROTEINA Usp in Usp-GFP IZOLIRANIH IZ INKLUZIJSKIH TELESC

Med izolacijo proteinov iz inkluzijskih telesc, je ponovno zvijanje proteina najbolj kritičen korak in pogosto je velik delež izoliranega proteina v biološko neaktivni obliki (Singh in Panda, 2005). Iz tega razloga smo aktivnost proteinov Usp in Usp-GFP, izoliranih iz

inkluzijskih telesc preverjali z DNaznim testom. Kot pozitivno kontrolo smo uporabljali izolirano DNazno domeno proteina Usp. Ker je v jamici agaroznega gela opazna lisa, domnevamo, da izolat proteina Usp le delno obori, ne pa tudi razgradi plazmidno DNA (slika 21). V primeru proteina Usp-GFP lahko opazimo, da je večina plazmidne DNA v jamici agaroznega gela in verjetno pride do obarjanja celotne plazmidne DNA (slika 21).



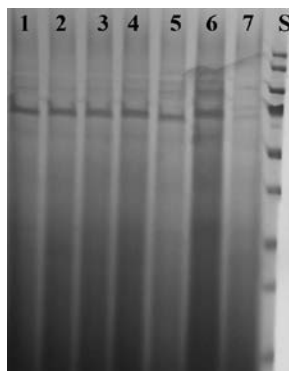
Slika 21: DNazna aktivnost proteinov Usp in Usp_GFP izoliranih iz inkluzijskih telesc.

Legenda: L- lestvica λ /*Pst*I, 1- linearna DNA plazmida pUC19; 2- z *Eco*RI odprt plazmid pUC19 izpostavljen delovanju očiščene DNazne domene proteina Usp (pozitivna kontrola); 3- z *Eco*RI odprt plazmid pUC19 izpostavljen delovanju proteina Usp; 4- z *Eco*RI odprt plazmid pUC19 izpostavljen delovanju proteina Usp-GFP.

4.4 REZULTATI UGOTAVLJANJA IZLOČANJA NATIVNEGA PROTEINA USP V BAKTERIJSKO GOJIŠČE

V poglavju, ki sledi so predstavljeni rezultati poskusov ugotavljanja ali se protein Usp, ki je pod kontrolo nativnega promotorja, med gojenjem seva MG1655 z genetskim zapisom za Usp izloča v bakterijsko gojišče. Zanimalo nas je ali obstajajo razlike v izločanju proteina Usp v prisotnosti vseh treh genov imunosti ali v odsotnosti vsaj enega izmed treh genov imunosti.

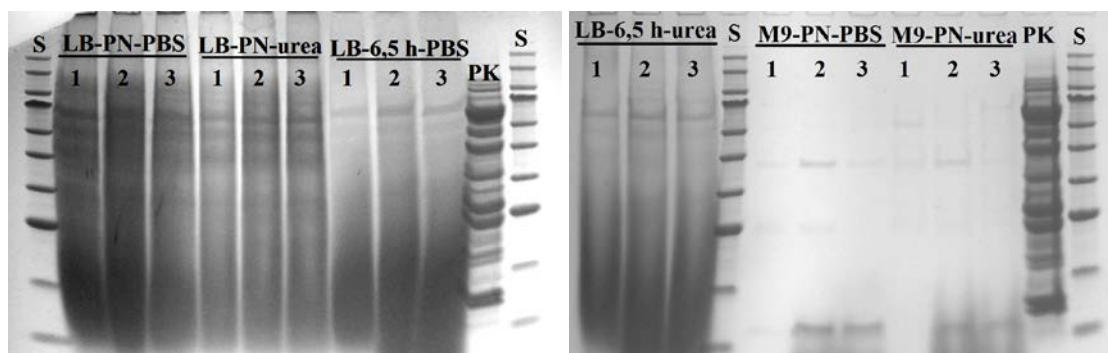
Pri vseh vzorcih zunajcelične frakcije sevov, ki smo jih gojili v gojišču LB, po obarjanju z amonijevim sulfatom in ponovnem suspendiranju proteinske usedline v pufru PBS, smo na NaDS poliakrilamidnem gelu opazili liso, ki po velikosti ustreza proteinu Usp. Šibkejšo liso smo prav tako zaznali tudi pri, na enak način pripravljenemu vzorcu zunajcelične frakcije kontrolnega seva MG1655, s plazmidom brez zapisa za protein Usp (slika 22).



Slika 22: Zunajcelične frakcije sevov MG1655, ki imajo zapis za protein Usp in različne kombinacije zapisov za proteine imunosti.

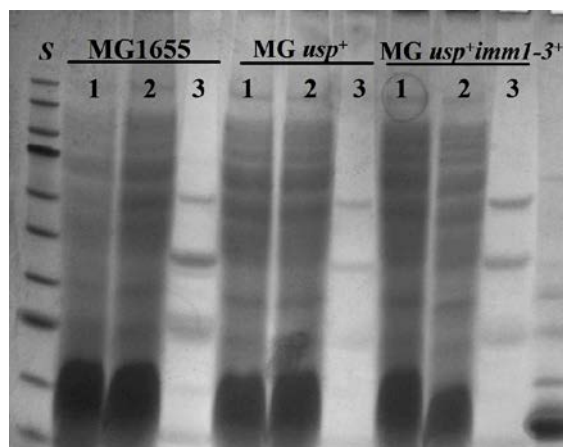
Legenda: zunajcelične frakcije naslednjih sevov: 1 in 2- MG1655 *usp*⁺; 3 in 4- MG1655 *usp*⁺ *imu* 1, 2, 3⁺; 5 in 6- MG1655 *usp*⁺ *imu* 2, 3, 1⁺; 7- MG1655 (negativna kontrola); S= proteinski standard.

Razlik med vzorci zunajcelične frakcije izbranih sevov po prekonočnem gojenju ali gojenju 6,5 ur v minimalnem gojišču ali gojišču LB nismo zaznali (slika 23). Tudi v primeru obarjanja proteinov iz zunajcelične frakcije s TCA, po gojenju sevov v gojišču LB in M9, razlik med testnimi in kontrolnim sevom nismo opazili (slika 24). Proteina Usp v zunajceličnih frakcijah analiziranih sevov nismo zaznali niti z metodo prenosa po Westernu in uporabo specifičnih protiteles proti proteinu Usp (slika 25).



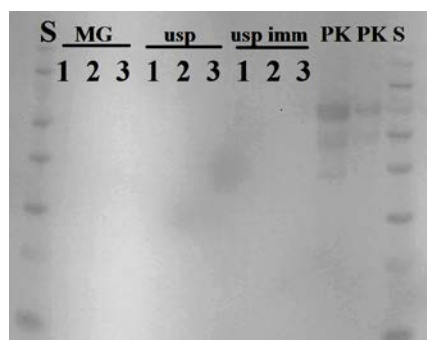
Slika 23: Zunajcelične frakcije sevov MG1655, ki imajo zapis za protein Usp in različne kombinacije zapisov za proteine imunosti po gojenju v gojišču LB ali M9, obarjanju z amonijevim sulfatom in ponovnem suspendiranju v urei ali PBS

Legenda: LB- sevi gojeni v gojišču LB; M9- sevi gojeni v gojišču M9; PN- sevi gojeni preko noči; 6,5 h- sevi gojeni 6,5 h; PBS- po obarjanju ponovno suspendirana proteinska usedlina v pufru PBS, urea- po obarjanju ponovno suspendirana proteinska usedlina v 6M urei, 1- zunajcelična frakcija seva MG1655 (negativna kontrola), 2- zunajcelična frakcija seva MG1655 *usp*⁺, 3- zunajcelična frakcija seva MG1655 *usp*⁺, *imu* 1, 2, 3⁺, S- proteinski standard, PK- pozitivna kontrola



Slika 24: Zunajcelične frakcije seva MG1655, MG1655 *usp*⁺ in MG1655 *usp*⁺, *imu1*, 2, 3⁺ po gojenju v gojišču LB ali M9 in obarjanju s TCA.

Legenda: 1 in 2- zunajcelična frakcija po gojenju seva v gojišču LB (dve neodvisni ponovitvi poskusa); 3- zunajcelična frakcija po gojenju seva v gojišču M9.



Slika 25: Ugotavljanje prisotnosti proteina Usp v zunajceličnih frakcijah sevov MG1655, ki imajo različne kombinacije zapisov za protene imunosti, z uporabo protiteles proti proteinu Usp.

Legenda: S- proteinski standard, MG- zunajcelična frakcija seva MG1655, *usp*- zunajcelična frakcija seva MG1655 *usp*⁺, *usp* *imu*- zunajcelična frakcija seva MG1655 *usp*⁺, *imu1*, 2, 3⁺, 1- proteinski vzorec po gojenju seva v gojišču LB, obarjanju izrabljenega gojišča z amonijevim sulfatom in ponovnem suspendiranju v PBS, 2- proteinski vzorec po gojenju seva v gojišču LB, obarjanju z amonijevim sulfatom in ponovnem suspendiranju v urei, 3- proteinski vzorec po gojenju seva v gojišču LB, obarjanju s TCA in ponovnem suspendiranju v urei, PK- pozitivna kontrola oz. izoliran protein Usp.

4.5 REZULTATI POSKUSOV PREVERJANJA UČINKA PROTEINA Usp NA CELIČNE LINIJE

4.5.1 Učinek izoliranega proteina Usp na celično linijo MM6

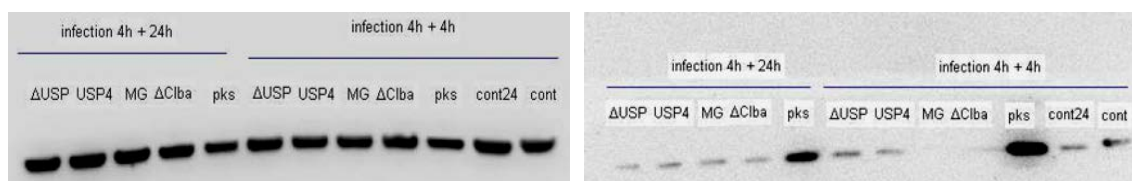
Učinek izoliranega proteina Usp na celice MM6 po 24 urni izpostavljenosti, smo ugotavljali z metodo barvanja s tripanskim modrilom. Izračunali smo odstotek preživelosti s proteinom Usp tretiranih in netretiranih celic po treh neodvisnih ponovitvah poskusa (preglednica 11). Z uporabo Studentovega t- testa smo ugotovili, da je razlika v odstotku preživelosti netretiranih in s proteinom Usp tretiranih celic statistično značilna, in sicer pri izbrani verjetnosti 0,05 je vrednost P 0,004.

Preglednica 11: Odstotek preživelosti celic MM6 24 ur po dodatku proteina Usp ali pufru za elucijo (kontrola)

Ponovitev	Preživelost [%]	
	Protein Usp	Pufer za elucijo
1.	75,4	90,7
2.	80,7	93,9
3.	75,5	91,8
Povprečje ± standardni odklon	77,2±3,0	92,4±1,3

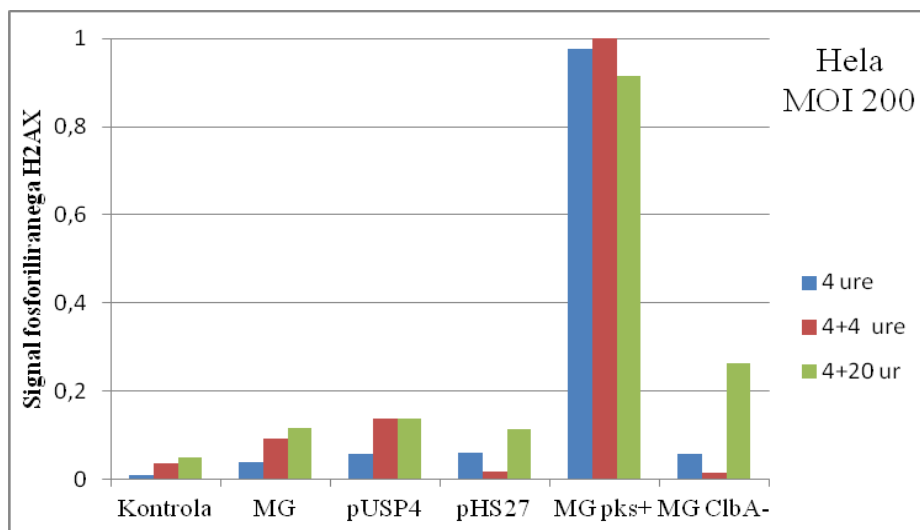
4.5.2 Genotoksično delovanje proteina Usp na celične linije HUVEC, HEK293 in HeLa po okužbi ali tretiranju z bakterijskim lizatom

V poglavju, ki sledi so prikazani rezultati dobljeni s testi ugotavljanja genotoksične aktivnosti proteina Usp na izbrane celične linije po infekciji ali tretiranju le teh z bakterijskim lizatom. Primer PVDF membrane po detekciji γ H2AX in aktina je prikazan na sliki 26. Na grafikonih so predstavljene dobljene intenzitete signala γ H2AX po normalizaciji z intenziteto signala aktina. Zaradi lažje primerjave rezultatov smo v predstavljenih grafih arbitrarno določili, da je vrednost signala γ H2AX (po normalizaciji) pri pozitivni kontroli enaka 1.



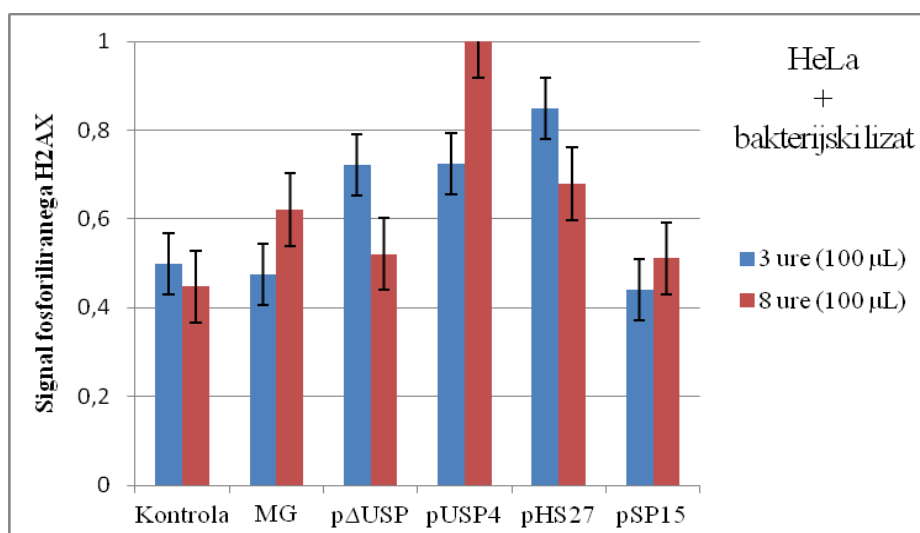
Slika 26: Primer PVDF membrane po detekciji aktina (levo) in γ H2AX (desno) v vzorcih biomase celične linije HeLa po infekciji z izbranimi sevi.

Po infekciji celične linije HeLa s sevi, ki na plazmidu imajo gen *usp* in gene *imu2,3,1*, pri multipliciteti infekcije 200, dvojnih prelomov DNA nismo zaznali ne glede na čas inkubacije okuženih celic, medtem ko smo močno pozitiven signal zaznali pri pozitivni kontroli (sev MG1655 pBAC *pks*⁺) (slika 27).



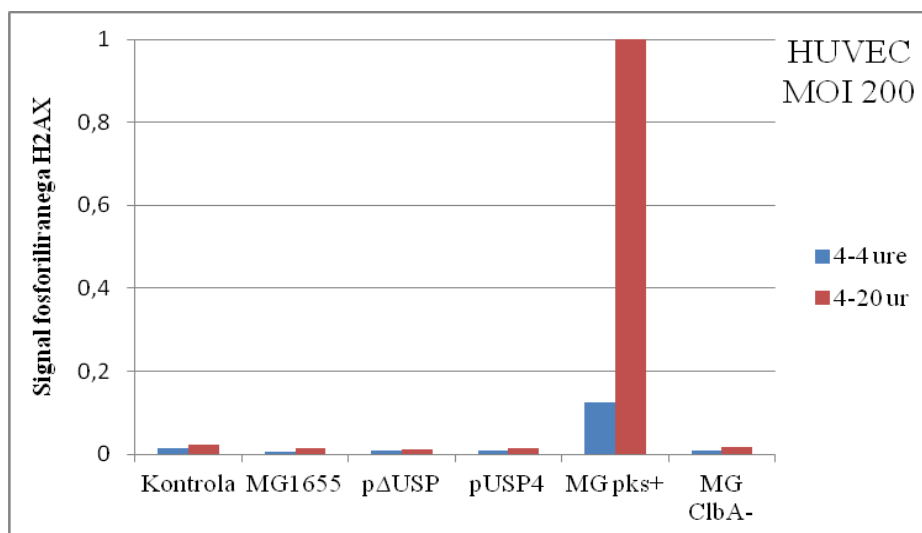
Slika 27: Kvantifikacija dvojnih prelomov DNA v inficiranih celicah HeLa pri multipliciteti infekcije 200
Legenda: Kontrola- samo celični medij, MG- infekcija s sevom MG1655 (negativna kontrola), pUSP4- infekcija s sevom MG1655 pUSP4, pHS27- infekcija s sevom MG1655 pHS27, MG *pks*⁺ infekcija s sevom MG1655 pBAC *pks*⁺ (pozitivna kontrola), MG *clbA*⁻ infekcija s sevom MG1655 pBAC *clbA*⁻; 4 ure- kvantifikacija dvojnih prelomov DNA takoj po 4 ure trajajoči infekciji, 4+4 ure- kvantifikacija dvojnih prelomov DNA 4 ure po infekciji, 4+20 ur- kvantifikacija dvojnih prelomov DNA 20 ur po infekciji.

Lizat seva MG1655 pUSP4R po 8 urni izpostavljenosti celične linije HeLa nakazuje tendenco za povzročitev dvojnih prelomov DNA (slika 28). Prav tako, v primeru tretiranja celične linije HeLa z lizatom seva MG1655 pHS27, po 3 urni izpostavljenosti smo zaznali rahlo povišan signal fosforilirane histona H₂AX (slika 28).

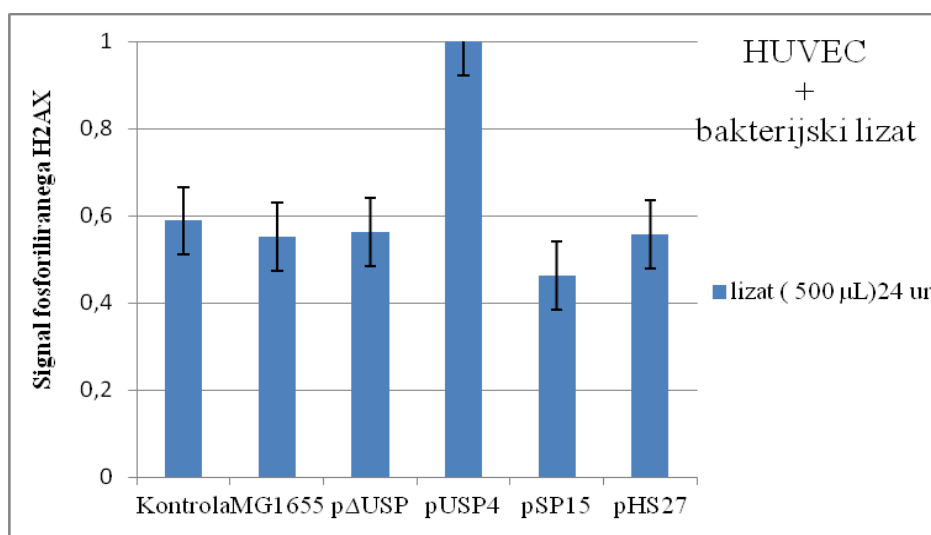


Slika 28: Kvantifikacija dvojnih prelomov DNA v celicah HeLa po tretiranju s 100 µl bakterijskega lizata.
Legenda: Kontrola- samo celični medij, MG- celični lizat seva MG1655 (negativna kontrola), pΔUsp- celični lizat seva MG1655 pΔUsp (pΔUSP- na plazmidu je gen *usp* skrajšan na račun DNazne domene), pUSP4- celični lizat seva MG1655 pUSP4, pHS27- celični lizat seva MG1655 pHS27, pSP15- celični lizat seva MG1655 pSP15; 3 ure, 8 ur- čas izpostavljenosti celične linije bakterijskemu lizatu.

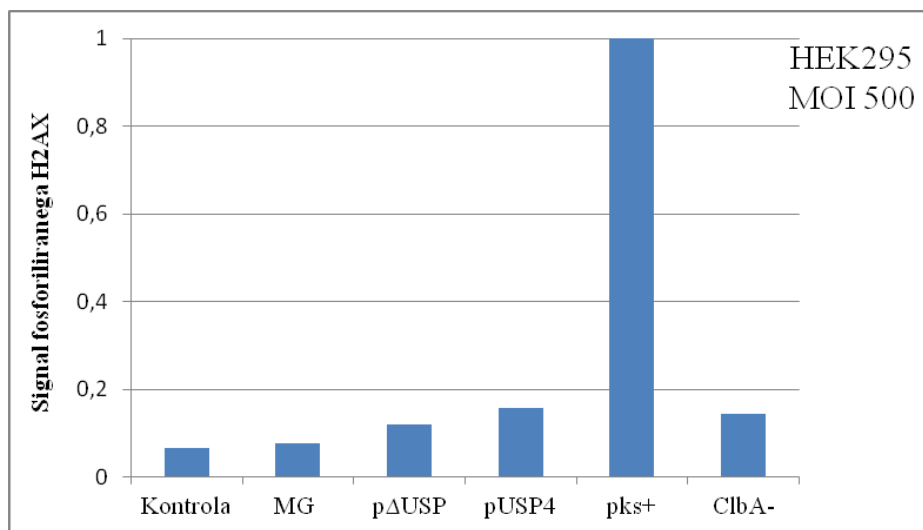
Dvojnih prelomov DNA nismo zaznali niti po infekciji celičnih linij HUVEC in HEK293 z *usp* pozitivnimi sevi (slika 29 in slika 31). Pri tem smo za infekcijo celične linije HEK293, uporabili zelo visoko multipliciteto infekcije (500). V primeru ugotavljanja genotoksičnosti bakterijskih lizatov, *usp* pozitivni sevi ponovno kažejo določen potencial za povzročitev dvojnih prelomov, vendar razlike med kontrolnimi in testnimi vzorci niso velike (slika 30 in slika 32).



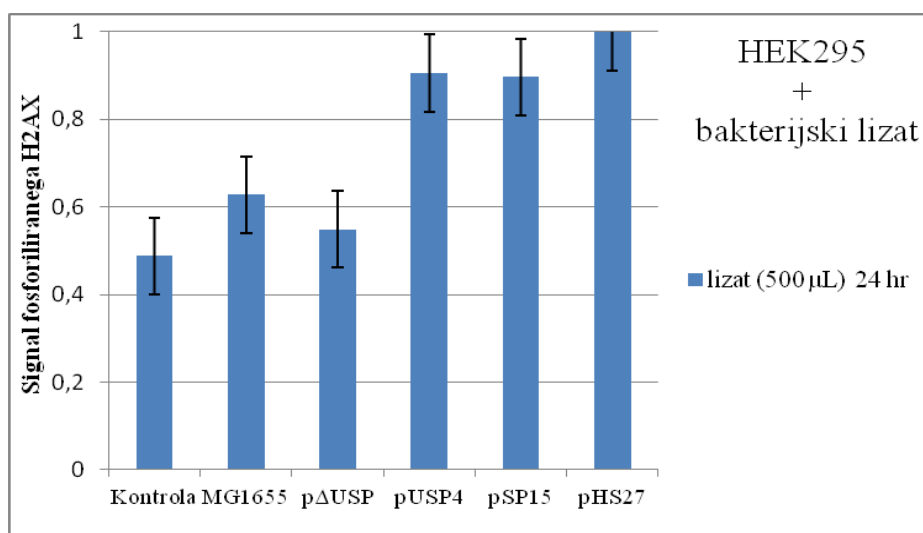
Slika 29: Kvantifikacija dvojnih prelomov DNA v inficiranih celicah HUVEC pri multipliciteti infekcije 200. Legenda: Kontrola- samo celični medij, MG- infekcija s sevom MG1655 (negativna kontrola), pUSP4- infekcija s sevom MG1655 pUSP4, pHS27- infekcija s sevom MG1655 pHS27, MG *pks*⁺ infekcija s sevom MG1655 pBAC *pks*⁺ (pozitivna kontrola), MG *clbA*⁻ infekcija s sevom MG1655 pBAC *clbA*⁻; 4 ure- kvantifikacija dvojnih prelomov DNA takoj po 4 ure trajajoči infekciji, 4+4 ure- kvantifikacija dvojnih prelomov DNA 4 ure po infekciji, 4+20 ur- kvantifikacija dvojnih prelomov DNA 20 ur po infekciji



Slika 30: Kvantifikacija dvojnih prelomov DNA v celicah HUVEC po tretiranju s 500 μl bakterijskega lizata. Legenda: Kontrola- samo celični medij, MG1655- celični lizat seva MG1655 (negativna kontrola), pΔUSP- celični lizat seva MG1655 pΔUSP, pUSP4- celični lizat seva MG1655 pUSP4, pSP15- celični lizat seva MG1655 pSP15, pHS27- celični lizat seva MG1655 pHS27; 24 ur- čas izpostavljenosti celične linije bakterijskemu lizatu.



Slika 31: Kvantifikacija dvojnih prelomov DNA v inficiranih celicah HEK293 pri multipliciteti infekcije 500. Legenda: Kontrola- samo celični medij, MG- infekcija s sevom MG1655, pΔUSP- infekcija s sevom MG1655 pΔUSP, pUSP4- infekcija s sevom MG1655 pUSP4, MG *pks*⁺ infekcija s sevom MG1655 pBAC *pks*⁺ (pozitivna kontrola), ClbA⁻ infekcija s sevom MG1655 pBAC *clbA*⁻

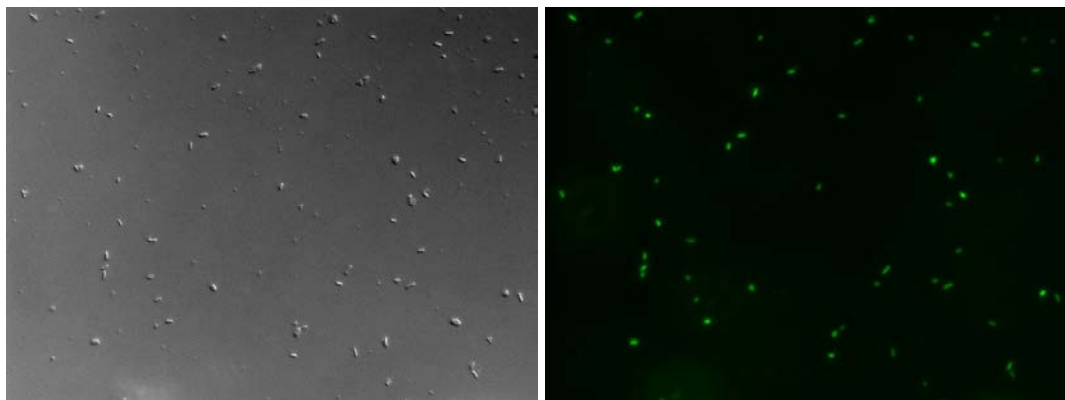


Slika 32: Kvantifikacija dvojnih prelomov DNA v celicah HUVEC po tretiranju s 500 μl bakterijskega lizata. Legenda: Kontrola- samo celični medij, MG1655- celični lizat seva MG1655 (negativna kontrola), pΔUSP- celični lizat seva MG1655 pΔUSP (pΔUSP- na plazmidu je gen *usp* skrajšan na račun DNazne domene), pUSP4- celični lizat seva MG1655 pUSP4, pSP15- celični lizat seva MG1655 pSP15, pHS27- celični lizat seva MG1655 pHS27; 24 ur- čas izpostavljenosti celične linije bakterijskemu lizatu.

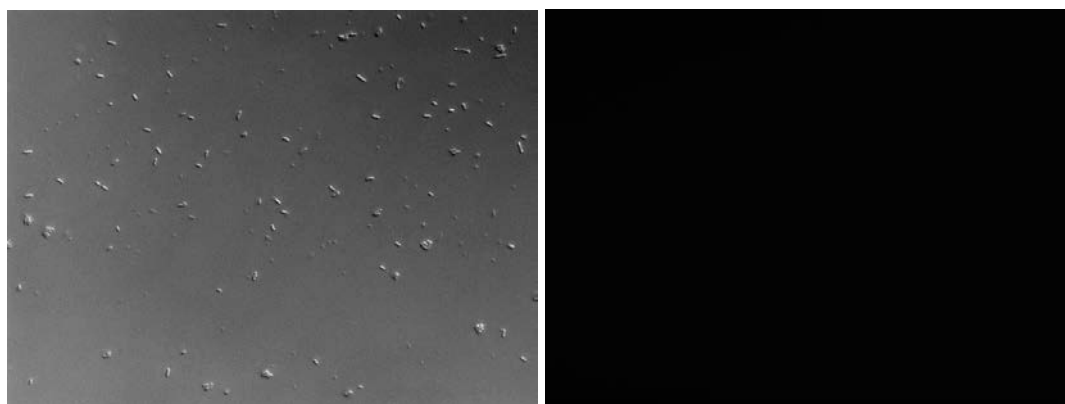
4.6 IZRAŽANJE GENA *USP* V POPULACIJI GENETSKO IDENTIČNIH BAKTERIJSKIH CELIC

Preko fuzije gena *usp* z genom, *gfp* brez lastnega promotorja, in z uporabo fluorescentne mikroskopije smo ugotavljali delež bakterij, ki v populaciji genetsko identičnih celic, izraža gen *usp*. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili sev MG1655 (DE3), ki je transformiran s plazmidom na katerem je genska fuzija *usp-gfp* pod kontrolo z IPTG inducibilnega promotorja, medtem ko smo kot negativno kontrolo uporabili isti sev brez plazmida z gensko fuzijo. Pojav zelene fluorescence pri testnem in kontrolnih sevih smo ugotavljali po gojenju v

tekočem gojišču ali na trdnem gojišču. Pričakovano, pri pozitivni kontroli, po dodatku IPTG v gojišče, zeleno fluorescenco po ekscitaciji pri valovni dolžini 395 nm, smo opazili pri vseh bakterijah (slika 33), medtem ko pri enakih pogojih fluorescence nismo opazili pri negativni kontroli (slika 34). Po večkratnih ponovitvah poskusa, izražanja gena *usp* na podlagi zelene fluorescence v sevu MG1655 *usp-gfp* iz tekoče kulture nismo opazili (slika 35), medtem ko smo pri sevu gojenem na trdnem gojišču LB dokazali, da majhen delež bakterij izraža gen *usp* (slika 36). Po štirih neodvisnih ponovitvah poskusa smo ugotovili, da je delež bakterij, ki v populaciji genetsko identičnih celic izraža gen *usp* $1,12 \pm 0,13$ % (preglednica 12).



Slika 33: Celice seva MG1655 (DE3) s fuzijo *usp-gfp*, ki je pod kontrolo z IPTG inducibilnega promotorja posnete s svetlobno (levo) in fluorescentno mikroskopijo (desno) (pozitivna kontrola)

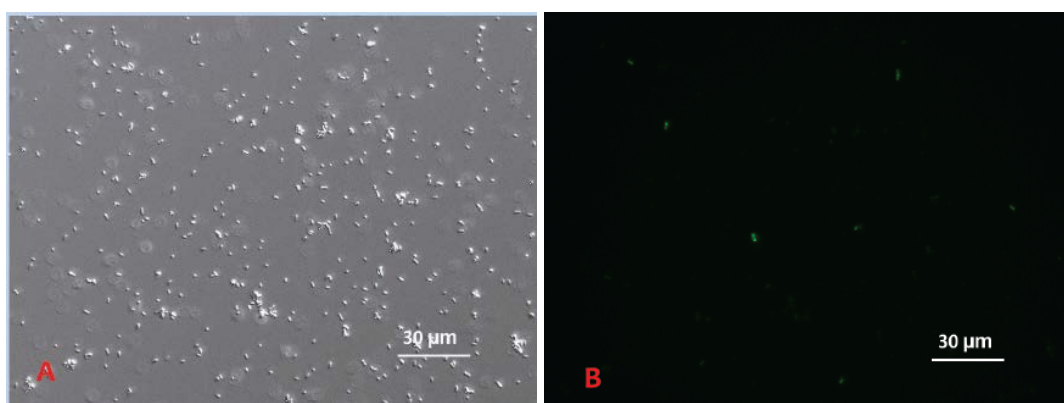


Slika 34: Celice seva MG1655 (DE3) posnete s svetlobno (levo) in fluorescentno mikroskopijo (desno) (negativna kontrola)



Slika 35: Celice seva MG1655 s fuzijo *usp-gfp*, ki je pod kontrolo nativnega promotorja gena *usp* po gojenju v tekočem gojišču

Levo- slika posneta s svetlobno mikroskopijo, desno- isto vidno polje posneto s fluorescentno mikroskopijo.



Slika 36: Celice seva MG1655 s fuzijo *usp-gfp*, ki je pod kontrolo nativnega promotorja gena *usp* po gojenju na trdnem gojišču

Levo - slika posneta s svetlobno mikroskopijo, desno- isto vidno polje posneto s fluorescentno mikroskopijo.

Preglednica 12: Delež bakterij, ki v populaciji genetsko identičnih bakterij izražajo gen *usp*

Število vseh bakterij	Št. fluorescentnih bakterij	Delež fluorescentnih bakterij [%]
1631	16	0,98
2986	31	1,04
2587	32	1,24
2364	29	1,23
Povprečen delež fluorescirajočih bakterij izračunan po 4-ih neodvisnih ponovitvah poskusa		1,12±0,13 %

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Protein Usp je statistično značilno povezan s skupino uropatogenih sevov bakterije *E. coli*, ki so najpogostejši povzročitelji okužb urinarnega trakta. Znano je, da *usp* v mišjem modelu urinarnega trakta poveča infektivnost laboratorijskega seva bakterije *E. coli* kakor tudi, da ima izoliran protein DNazno aktivnost ter, da *in vitro* na humanih celicah deluje genotoksično (Yamamoto in sod., 2001; Nipič in sod., 2013). Molekularno epidemiološki podatki razkrivajo zelo visoko prevalenco gena *usp* med izolati sevov UPEC, kakor tudi nezanemarljivo prisotnost v izolatih bakterije *E. coli* iz fecesa zdravih ljudi. Čeprav se številne študije osredotočajo na raziskovanje zastopanosti gena *usp* med različnimi izolati bakterije *E. coli*, je študij o aktivnosti in mehanizmu delovanja proteina Usp razmeroma malo. Visoka koncentracija in zadovoljiva čistost proteinskega izolata sta pogoja za natančno karakterizacijo določenega proteina.

V magistrskem delu smo želeli optimizirati postopek izolacije proteina Usp in s tem pripraviti proteinski izolat zadovoljive kvalitete za nadaljnje študije njegove aktivnosti. Zelo razširjena metoda čiščenja proteinov je afinitetna kromatografija z imobiliziranimi kovinskimi ioni (IMAC, ang. immobilized metal-affinity chromatography), pri čemer se kot strukturni ligandi najpogosteje uporabljajo kovinski kelatorji, ki so komplementarni polihistidinskemu repku (Pina in sod., 2014). Gen *usp* je bil v plazmidih za ekspresijo spojen z zapisom za polihistidinski repek kar je omogočilo čiščenje proteina z Ni-NTA afinitetno kromatografijo s katero lahko dosežemo do 95 % čistost proteinskega izolata. Gen *usp* smo prekomerno izražali v sevu *B. megaterium* MS941, kakor tudi v različnih ekspresijskih sistemih bakterije *E. coli*.

V ekspresijskem sistemu *B. megaterium* MS941 (pT7-RNAP)(pPT7-S_{lip}A-*usp*) naj bi, zaradi fuzije gena *usp* z zaporedjem za signalni peptid zunajcelične esteraze LipA, prišlo do izločanja proteina Usp v bakterijsko gojišče. Zaradi genotoksičnosti proteina Usp, smo z uporabo sistema, ki omogoča izločanje proteina v gojišče želeli toksično delovanje proteina na producerski sev znižati na najnižjo možno raven. Ker je poleg tega v zunajcelični frakciji prisotno veliko manj proteinskih kontaminant kot v znotrajcelični frakciji, so posledično postopki izolacije in čiščenja zunajceličnih proteinov lahko manj zapleteni (Yoon in sod., 2010). Kljub temu je bila izolacija proteina Usp z uporabo seva *B. megaterium* MS941 (pT7-RNAP)(pPT7-S_{lip}A-*usp*) neuspešna. Z uporabo protiteles proti proteinu Usp, proteina nismo zaznali ne v zunajcelični in ne v znotrajcelični frakciji (slika 12). Domnevamo, da je koncentracija nastalega proteina bila pod mejo detekcije metode.

Transformacija laboratorijskih sevov bakterije *E. coli* s plazmidom, ki ima le gen *usp* brez genov *imu* je, zaradi toksičnosti proteina Usp, velikokrat neuspešna (Zaw in sod., 2013; Nipič in sod., 2013). Toksičnosti proteina Usp za producerski sev smo se skušali izogniti s prekomernim izražanjem v sevu *E. coli* Keio *minC* pLysE. Protein MinC je inhibitor asimetrične celične delitve. Zaradi mutacije v genu *minC* pride do oblikovanja delitvenega

septuma na polih bakterijske celice kar privede do nastanka minicelic, ki nimajo kromosoma (Labie in sod., 1990). V takšnih bakterijskih celicah je genotoksičnost proteina Usp zanemarljiva. Po čiščenju z Ni-NTA kromatografijo, smo v proteinskih izolatih, poleg proteina Usp, zaznali veliko drugih proteinskih nečistoč (slika 13). Na nikljeve ione se lahko, poleg histidinskih ostankov, ki so del polihistidinskega repka proteina katerega želimo izolirati, vežejo tudi histidinski ostanki drugih proteinov kar zniža selektivnost metode (Pina in sod., 2014). V tem primeru je potrebna dodatna optimizacija postopka čiščenja želenega proteina.

V primeru prekomernega izražanja *usp*, brez genov *imu*, v sevu *E. coli* MG1655, smo ugotovili, da pride do nastanka inkluzijskih telesc. Z izolacijo proteina Usp iz inkluzijskih telesc smo že po čiščenju z Ni-NTA afinitetno kromatografijo pridobili proteinski izolat zadovoljive čistosti in koncentracije (slika 14 in slika 15). Pri izolaciji smo uporabljali pristop renaturacije proteina po vezavi na trdno površino (kolono). Na ta način so medmolekulske interakcije, ki omogočajo nastanek proteinskih agregatov najnižje (Clark, 2001). Kljub temu aktivnosti proteina z DNaznim testom nismo zaznali (slika 21). Domnevamo, da je vzrok neaktivnosti proteina njegovo neuspešno zvijanje med odstranjevanjem denaturanta.

Čiščenje z Ni-NTA afinitetno kromatografijo in nato z gelsko kromatografijo, je po prekomernem izražanju v sevu BL21(DE3) najbolj učinkovit postopek pridobivanja proteina Usp (slika 20). V tem primeru prekomerno izražanje gena *usp* poteka v prisotnosti genov *imu*.

Poleg izolacije proteina Usp, smo izolirali tudi proteine Usp-GFP, Δ Hcp-Usp in Imu3. Protein Usp-GFP smo izolirali iz inkluzijskih telesc (slika 15). Z DNaznim testom smo ugotovili, da proteinski izolat ne kaže DNazne aktivnosti (slika 21). V tem primeru se postavlja vprašanje ali je neaktivnost proteina posledica genske fuzije in prisotnosti proteina GFP ali pa neučinkovite renaturacije med postopkom čiščenja. Izolacija aktivnega fuzijskega proteina Usp-GFP je lahko močno orodje za nadaljnje študije proteina Usp. S pripravo aktivne fuzije Usp-GFP bi lahko bili korak bližje odgovorom na vprašanja o mehanizmu vstopa proteina Usp v tarčne celice kakor tudi načinu potovanja do jedra.

N-terminalni del proteina Usp je podoben proteinom Hcp (ang. *haemolysin-coregulated protein*), ki predstavljajo strukturno komponento bakterijskega sistema za izločanje tipa VI (T6SS, ang. *type 6 secretion system*) (Zoued in sod., 2014). T6SS je sestavljen iz najmanj 13 proteinov, ki so zapisani v genskih skupkih (Bingle in sod., 2008; Silverman in sod., 2012; Kapitein, in Mogk, 2013; Zoued in sod., 2014). Vloga proteinom Hcp podobne domene proteina Usp ni znana. V bližini *PAI_{usp}* ni genov homolognih genom sistemov izločanja tip VI. Efektorske molekule, ki se izločajo s pomočjo T6SS imajo na N-terminalnem koncu ohranjen motiv imenovan MIX (ang. »marker for type six effectors«) (Salomon in sod., 2014). Podobnega motiva v zapisu za protein Usp nismo identificirali. Na drugi strani, je predhodna raziskava pokazala protein Usp v celični frakciji celic HUVEC 4 ure po infekciji s sevom MG1655, z geni *usp* in *imu1-3* (Nipič in sod., 2013). V naši študiji proteina Usp v bakterijskem gojišču istega seva, kljub večkratnim ponovitvam in različnim analiziranim

pogojem nismo zaznali (slike 22-25). Morda je za izločanje proteina Usp iz bakterijske celice potreben kontakt s tarčno (sesalsko) celico. Združevanje strukturnih komponent T6SS in izločanje efektorskih molekul je odvisno od kontakta s tarčno celico. Mehanizem izločanja proteina Usp ni znan. Morda je proteinom Hcp podobna domena proteina Usp vpletena pri izločanju proteina in je v povezavi s T6SS. Kljub temu, je pri interpretaciji rezultatov potrebna previdnost. Možno je namreč, da je koncentracija nastalega in v bakterijsko gojišče izločenega proteina pod mejo detekcije uporabljene metode. V okvirju magistrske naloge smo pripravili plazmid p Δ Hcp-Usp_Imu in uspešno izolirali protein Δ Hcp-Usp (slika 16 in slika 17). Z analizo aktivnosti proteina Usp, ki nima domene Hcp bi lahko bili korak bližje razumevanju delovanja in načina izločanja proteina Usp. Zanimivo bo predvsem analizirati učinek izoliranega proteina Δ Hcp-Usp na humane celične linije ter preveriti, če protein Usp, ki nima domene Hcp lahko vstopi v tarčne celice.

V okvirju magistrske naloge smo z uporabo Ni-NTA afinitetne kromatografije po prekomernem izražanju v sevu BL21 (DE3) uspešno izolirali protein Imu3 (slika 18). Izsledki kažejo, da Imu3 zaščiti producenta pred toksičnim delovanjem proteina Usp in, da *in vitro* zaščiti linearizirano plazmidno DNA pred razgradnjo z nukleaznim kolicinom E7, medtem ko v zunajceličnem okolju (*in vitro*) pripomore k genotoksični aktivnosti proteina Usp (Nipič in sod., 2013; Črnigoj in sod., 2014). Mehanizem, ki proteinu Imu3 omogoča dvojno vlogo ni znan. Vprašanje je, če bi protein Imu3, ob ekspresiji gena *imu3* v humanih celicah, lahko zaščitil njihov genom pred genotoksičnim delovanjem proteina Usp ali celo pred drugimi genotoksini. Morda v tem kontekstu kaže velik potencial. Protein Imu3 lahko obori DNA, pri čemer ta ostane nepoškodovana in zato kaže biotehnološko uporabnost. Zanimivo je, da vsi proteini Imu, ki so kodirani na otoku patogenosti PAI_{usp} kažejo medsebojno podobnost, kakor tudi podobnost s proteini imunosti kolicinov, vendar je samo pri proteinu Imu3 zaznana vezava na DNA (Parret in De Mot, 2002; Črnigoj in sod., 2014). Prisotnost treh medsebojno podobnih genov *imu* je nenavadno. V nasprotju z genomom človeka in drugih višjih evkariontov, so genomi bakterij prostorsko ekonomični, zgoščeni, saj približno 90 % bakterijskega genoma predstavljajo kodirajoča zaporedja (Lawrence in sod., 2001). Razlika v velikosti genoma človeka in kvasovk je približno tristokratna, medtem ko je razlika v številu genov le približno šestkratna (Mira in sod., 2001). Zaradi zgoščenosti genske informacije v bakterijskem svetu je razlika v velikosti genoma približno enaka razliki v številu genov. Zanimivo je vprašanje zakaj so se pri večini *usp*-pozitivnih sevov (> 70 %), kljub evlucijski usmerjenosti bakterijskega genoma v ekonomičnost, ohranili vsi geni *imu*, kakor tudi kakšna je njihova medsebojna vloga pri patogenezi ali pri zaščiti producenta.

Znano je, da izoliran protein Usp deluje genotoksično in zmanjša preživelost celic HUVEC, ki so modelne celice za študij endotelija krvnih žil kakor tudi, da je gen *usp* statistično značilno povezan z izolati bakterije *E. coli* iz krvi bolnikov s sepsa urinarnega izvora (Rijavec in sod., 2008; Nipič in sod., 2013). Poleg tega sev *E. coli* MG1655 *usp*⁺ *imu1-3*⁺ po infekciji, z aktivacijo kaspaze 3, sproži apoptozo celic HUVEC in HEK293 (Nipič in sod., 2013). V magistrski nalogi smo pokazali, da ima izoliran protein Usp statistično značilen učinek na preživelost celic MM6 (preglednica 11). Celice MM6 konstitutivno izražajo fenotipske in

funkcionalne značilnosti zrelih monocitov (Ziegler-Heitbrock in sod., 1988). Posledično lahko domnevamo, da protein Usp s toksičnim delovanjem na monocite bakterijam omogoča izogibanje imunskemu odzivu. Učinek proteina Usp na različne celične linije (HUVEC, HEK293 in MM6) kaže, da je membranski receptor na tarčnih celicah lahko nespecifičen in prisoten pri različnih tipih celic.

Kljub s kometnim testom pokazani genotoksični aktivnosti izoliranega proteina Usp na celice HUVEC (Nipič in sod., 2013), po infekciji celičnih linij HeLa, HUVEC in HEK293 s sevom *E. coli* MG1655 *usp*⁺ *imm1-3*⁺, dvojnih prelomov DNA nismo zaznali (slike 27, 29 in 31). Vendar pa bakterijski lizat istega seva kaže tendenco za povzročitev dvojnih prelomov DNA (slike 28, 30 in 32). Možno je, da sev MG1655 nima ustreznega sistema za izločanje proteina Usp in posledično ob infekciji celičnih linij večina sintetiziranega proteina ostane znotraj bakterijskih celic. Po drugi strani, smo s študijo ugotavljanja izražanja gena *usp*, ki je pod kontrolo naravnega promotorja gena *usp*, v populaciji genetsko identičnih bakterijskih celic pokazali, da le pri majhnem odstotku bakterij ($1,12 \pm 0,13$ %) pride do izražanja gena *usp* kakor tudi, da je izražanje odvisno od trdne podlage (slike 35 in 36, preglednica 12). Znano je, da je izražanje genov v genetsko identičnih populacijah heterogeno. Produkcija proteina Usp je lahko specializirana funkcija majhnega dela populacije sevov *E. coli* z geni *usp* *imu1-3*. Iz tega sledi, da je količina nastalega proteina med infekcijo celičnih linij zagotovo nizka. Verjetno je, da protein Usp v višjih koncentracijah lahko povzroči nastanek dvojnih prelomov DNA in s tem ustavitev napredovanja celičnega cikla. Analiza promotorja gena *usp* z uporabo dostopnih spletnih orodij je pokazala njegovo nespecifičnost in odsotnost značilnih ohranjenih promotorskih zaporedij. Vzrok je lahko evolucijska prilagoditev *usp*-pozitivnih sevov bakterije *E. coli* na gostitelja- človeka, saj so uspešni mikroorganizmi tisti, ki so sposobni preživetja v organizmu človeka brez kratkoročnega letalnega učinka. Na drugi strani morda, *in vivo*, v gostitelju, obstaja še neidentificiran induktor, ki v določenih pogojih sproži izražanje gena *usp*.

Z ugotovitvijo genotoksične aktivnosti je protein Usp postal najnovejši član družine bakterijskih genotoksinov. Poleg proteina Usp, sta bila identificirana še dva bakterijska genotoksina, in sicer CDT (ang. *cytolethal distending toxin*) in kolibaktin. Oba producirajo po Gramu negativne bakterije, prvi je A-B₂ toksin (A- ang. »*a*ctivity«, B- ang. »*b*inding«) (Guerra in sod., 2011a), medtem ko je kolibaktin hibridni neribosomalni peptid poliketid, ki je prvič identificiran pri bakteriji *E. coli* (Nougayrede, 2006).

V zadnjem času znanstveniki ugotavljajo, da čedalje več izolatov bakterije *E. coli* iz fecesa zdravih ljudi sodi v filogenetsko skupino B₂, obenem pa naraščajo dokazi, o pomenu mikrobiote za zdravje kakor tudi o globalnih spremembah mikrobiote zaradi spremenjenega življenjskega sloga ter prekomerne uporabe antibiotikov. Približno 18 % rakastih obolenj je namreč posledica delovanja infektivnih agensov (Schwabe in Jobin, 2013), kar daje raziskavam bakterijskih genotoksinov izreden pomen. O proteinu Usp, kot na novo odkritem genotoksinu je še veliko neznanega. Kakšen je mehanizem izločanja Usp iz bakterijskih celic, kako vstopa protein Usp v tarčne celice, način potovanja genotoksina po vstopu do jedra

tračnih celic, kdaj in pri katerih pogojih pride do nastanka genotoksina Usp ter kakšen je obseg poškodb DNA *in vivo*, kakšen je točen mehanizma delovanja proteinov Imu- to so samo nekatera še vedno neodgovorjena vprašanja. Nadaljnje raziskave proteina Usp bodo omogočile boljše razumevanje mehanizmov bakterijske genotoksičnosti, kakor tudi širši vpogled v interakcije med bakterijami in gostiteljem.

5.2 SKLEPI

- Najbolj učinkovit način izolacije proteina Usp je čiščenje z Ni-NTA afinitetno in nato še z gelsko kromatografijo po prekomernem izražanju gena *usp* v bakterijskem sevu *E. coli* BL21 (DE3) ob prisotnosti genov *imu*
- Tudi proteina ΔHcp -Usp in Imu3 lahko uspešno izoliramo z Ni-NTA afinitetno kromatografijo po prekomernem izražanju v sevu *E. coli* BL21 (DE3)
- Proteina Usp in Usp- GFP izolirana iz inkluzijskih telesc ne kažeta DNazne aktivnosti
- Protein Usp ni prisoten v izrabljenem gojišču seva MG1655 *usp*⁺ *imu1-3*⁺, pri čemer so geni *usp* in *imu1-3* pod kontrolo naravnega promotorja gena *usp*
- Izoliran protein Usp ima učinek na preživelost celic MM6
- Po infekciji celičnih linij HeLa, HUVEC in HEK293 s sevom MG1655, ki ima plazmid s kloniranim otokom patogenosti PAI*usp* ne nastanejo dvojni prelomi DNA
- Bakterijski lizat seva MG1655 PAI*usp*⁺ kaže tendenco za povzročitev dvojnih prelomov DNA v celicah HeLa, HUVEC in HEK293
- Delež bakterij, ki v populaciji genetsko identičnih celic izraža gen *usp*, je le 1,12±0,13 %

6 POVZETEK

Od Pausterjevega izpodbitja teorije spontane evolucije in Kochovih postulatov do današnje mikrobiologije je najbolj preučevan in znanosti najbolj poznan mikroorganizem bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*). *E. coli* je del normalne mikrobiote, vendar patogeni sevi lahko povzročijo črevesne in izvenčrevesne okužbe. Uropatogeni sevi bakterije *E. coli* so najpogostejši povzročitelji urinarnih okužb in večinoma sodijo v filogenetsko skupino B₂, redkeje D. Sevi izolirani iz bolnikov s pielonefritisom, prostatitisom, cistitisom in urosepso imajo pogosto gen *usp* (uropatogeni specifični protein). Protein Usp je kodiran na majhnem otoku patogenosti (PAI *usp*) skupaj s tremi geni *imu1-3*, katerih produkti omogočajo zaščito producenta pred toksičnim delovanjem proteina Usp. N- terminalna domena proteina Usp je podobna proteinom Hcp, nato sledi domnevna translokacijska domena, ki je podobna translokacijski domeni S piocinov in kolicinov. C- terminalna domena je podobna DNazni domeni S piocinov in kolicinov, ima ohranjen motiv HNH in *in vitro* razgradi linearizirano plazmidno DNA. Zaradi podobnosti proteina Usp s kolicini in S piocini so domnevali, da deluje kot bakteriocin, vendar so nadaljnje raziskave razkrile, da so tarča proteina Usp celice sesalcev in, da deluje kot genotoksin.

Ker je proteinski izolat zadovoljive koncentracije in čistosti pomemben za nadaljnje raziskave proteina Usp, smo v magistrskem delu z uporabo različnih ekspresijskih sistemov (*Bacillus megaterium* MS941(pPT7-RNAP) (pPT7-SPlipA), *E. coli* Keio *minC* (pLysE)(pUSP4-BI), *E. coli* MG1655 (DE3) (pUSP4-BI), *E. coli* BL21 (DE3) (pUSP4)) in Ni-NTA afinitetne kromatografije ter gelske kromatografije skušali optimizirati metodo izolacije in čiščenja proteina Usp. Izkazalo se je, da je najbolj učinkovit način izolacije proteina Usp čiščenje z Ni-NTA afinitetno in nato še z gelsko kromatografijo po prekomernem izražanju gena *usp* v bakterijskem sevu *E. coli* BL21 (DE3) ob prisotnosti genov *imu*. Poleg izolacije proteina Usp smo z uporabo ekspresijskega seva BL21 (DE3) in Ni-NTA afinitetne kromatografije uspešno izolirali proteina ΔHcp-Usp in Imu3. Po izolaciji proteinov Usp in Usp- GFP iz inkluzijskih telesc nismo zaznali DNazne aktivnosti pri čemer domnevamo, da ni prišlo do pravilnega zvijanja proteinov med postopkom renaturacije.

Z NaDS-PAGE in metodo prenosa proteinov po Westernu smo ugotavljali ali se protein Usp, ki je pod kontrolo nativnega promotorja, med gojenjem seva MG1655 z genetskim zapisom za Usp, izloča v bakterijsko gojišče. Proteina Usp v izrabljenem bakterijskem gojišču po obarjanju z amonijevim sulfatom ali TCA nismo zaznali. Domnevamo, da je koncentracija v bakterijsko gojišče izločenega proteina Usp pod mejo detekcije metode ali, da sev MG1655 nima ustreznega sistema za izločanje proteina Usp.

Znano je, da izoliran protein Usp ima učinek na celice HUVEC in HEK293. Z metodo barvanja s tripanskim modrilom in statistično obdelavo dobljenih rezultatov smo ugotovili, da izoliran protein Usp, po 24 urni izpostavljenosti, statistično značilno zniža preživelost celic MM6 (humani monociti). Ta pomembna ugotovitev kaže na možnost, da protein Usp

omogoča bakterijam izogibanje imunskemu odzivu gostitelja kakor tudi, da so receptorji za vezavo proteina Usp na tarčne celice nespecifični in prisotni v različnih celičnih tipih.

Predhodna študija je s kometnim testom pokazala, da izoliran protein Usp deluje genotoksično na celice HUVEC. V magistrskem delu smo, z ugotavljanjem prisotnosti γ H2AX s pomočjo metode prenosa proteinov po Westernu, želeli analizirati ali po infekciji celičnih linij HeLa, HEK293 in HUVEC s sevom MG1655 *usp*⁺ *imu1-3*⁺ pride do nastanka dvojnih prelomov DNA. V tem primeru so geni otoka patogenosti PAI*usp* bili pod kontrolo naravnega promotorja gena *usp*. Na opisan način dvojnih prelomov DNA nismo zaznali. Na enak način smo ugotavljali ali pride do nastanka dvojnih prelomov DNA po tretiranju celičnih linij HeLa, HEK293 in HUVEC z bakterijskim lizatom seva MG1655 *usp*⁺ *imu1-3*⁺. Zaznali smo rahlo povišan signal γ H2AX. Možno je, da sev MG1655 nima ustreznega sistema za izločanje proteina Usp kakor tudi, da je koncentracija med okužbo nastalega proteina Usp prenizka za povzročitev dvojnih prelomov DNA.

S pripravo genske fuzije gena *usp* z genom za zeleni fluorescentni protein (GFP) in uporabo fluorescentne mikroskopije smo ugotovili, da je delež bakterij, ki v populaciji genetsko identičnih celic izraža gen *usp* $1,12 \pm 0,13$ %. Lahko domnevamo, da gre za evolucijsko prilagoditev *usp*-pozitivnih sevov bakterije *E. coli* na gostitelja ali, da je v organizmu gostitelja prisoten neznani induktor, ki ob okužbi sproži izražanje gena *usp*.

Genotoksini so v zadnjih letih predmet intenzivnih raziskav saj agensi, ki poškodujejo DNA povzročajo nestabilnost genomov in povečajo tveganje za nastanek tumorjev. Poleg proteina Usp, sta identificirana še dva bakterijska genotoksina, in sicer CDT (ang. Cytolethal distending toxin) in kolibaktin. O proteinu Usp, kot novoodkritem genotoksinu je še veliko neznanega.

7 VIRI

- Alteri C. J., Mobley H. L. 2012. *Escherichia coli* physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments. *Current Opinion in Microbiology*, 15, 1: 3–9
- Ananias M., Yano T. 2008. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41, 10: 877–883
- Anderluh G., Pungerčar J., Štrukelj B., Maček P., Gubenšek F. 1996. Cloning, sequencing and expression of equinatoxin II. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 220, 2: 437–442
- Andlovic A. 2002. *Escherichia coli*. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 185–188
- Ammori B. J. 2003. Role of gut in the course of severe acute pancreatitis. *Pancreas*, 26: 122–129
- Bauer R. J., Zhang L., Foxman B., Siitonen A., Jantunen M. E., Saxen H., Marrs C. F. 2002. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection—*usp*, *iha*, and *iroNE*. *Journal of Infectious Diseases*, 185, 10: 1521–1524
- Bingle L. E., Bailey C. M., Pallen M. J. 2008. Type VI secretion: a beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 1: 3–8
- Brzuszkiewicz E., Brüggemann H., Liesegang H., Emmerth M., Ölschläger T., Nagy G., Albermann K., Wagner C., Buchrieser C., Hody L. 2006. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 34: 12879–12884
- Bukh A. S., Schonheyder H. C., Emmersen J. M. G., Sogaard M., Bastholm S., Roslev P. 2009. *Escherichia coli* phylogenetic groups are associated with site of infection and level of antibiotic resistance in community-acquired bacteraemia: a 10 year population-based study in Denmark. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 1: 163–168
- Chaudhuri R. R., Henderson I. R. 2012. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 2: 214–226
- Clark E. D. B. 2001. Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 2: 202–207
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 10: 4555–4558

- Clermont O., Christenson J. K., Denamur E., Gordon D. M. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups: A new *E. coli* phylo-typing method. *Environmental Microbiology Reports*, 5, 1: 58–65
- Črnigoj M., Podlesek Z., Budič M., Žgur-Bertok D. 2014. The *Escherichia coli* uropathogenic-specific-protein-associated immunity protein 3 (Imu3) has nucleic acid-binding activity. *BMC microbiology*, 14, 1: e2180, doi:10.1186/1471-2180-14-16: 8 str.
- Derakhshandeh A., Firouzi R., Moatamedifar M., Motamedi A., Bahadori M., Naziri Z. 2013. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from human samples. *Molecular Biology Research Communications*, 2, 4: 143–149
- Dobrindt U., Blum-Oehler G., Nagy G., Schneider G., Johann A., Gottschalk G., Hacker J. 2002. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I536 to PAI IV536) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infection and Immunity*, 70, 11: 6365–6372
- Escherich T. 1989. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. *Reviews of Infectious Diseases*, 11: 352–356
- Fasano A., Baudry B., Pumphlin D. W., Wasserman S. S., Tall B. D., Ketley J. M., Kaper J. B. 1991. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 12: 5242–5246
- Filloux A., Hachani A., Bleves S. 2008. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, 154, 6: 1570–1583
- Gao Y. D., Zhao Y., Huang J. 2014. Metabolic modeling of common *Escherichia coli* strains in human gut microbiome. *BioMed Research International*, 2014, 1: e 694967, doi: 10.1155/2014/694967: 11 str.
- Guerra L., Cortes-Bratti X., Guidi R., Frisan T. 2011a. The biology of the cytolethal distending toxins. *Toxins*, 3, 12: 172–190
- Guerra L., Guidi R., Frisan T. 2011b. Do bacterial genotoxins contribute to chronic inflammation, genomic instability and tumor progression?: Bacterial genotoxins and genomic instability. *FEBS Journal*, 278, 23: 4577–4588
- Huang H., Yuan H. S. 2007. The conserved asparagine in the HNH motif serves an important structural role in metal finger endonucleases. *Journal of Molecular Biology*, 368, 3: 812–821
- Herzer, P. J., Inouye S., Inouye M., Whittam T. S. 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172, 11: 6175–6181

- Hudault S., Guignot J., Servin A. L. 2001. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut*, 49, 1: 47–55
- Iranpour D., Hassanpour M., Ansari H., Tajbakhsh S., Khamisipour G., Najafi A. 2015. Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. *BioMed Research International*, 2015: e846219, doi: 10.1155/2015/846219: 7 str.
- Jensen K. F. 1993. The *Escherichia coli* K-12 “wild types” W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *Journal of Bacteriology*, 175, 11: 3401–3407
- Johnson J. R., Clermont O., Menard M., Kuskowski M. A., Picard B., Denamur E. 2006. Experimental mouse lethality of *Escherichia coli* isolates, in relation to accessory traits, phylogenetic group, and ecological source. *Journal of Infectious Diseases*, 194, 8: 1141–1150
- Johnson J. R., Russo T. A. 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* – “The other bad *E. coli*.” *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139, 3: 155–162
- Johnson J. R., Russo T. A. 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 6-7: 383–404
- Kanamaru S., Kurazono H., Ishitoya S., Terai A., Habuchi T., Nakano M., Ogawa O., Yamamoto S. 2003. Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors *iroN*, *iha*, *kpsMT*, *ompT* and *usp* in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. *Journal of Urology*, 170, 6: 2490–2493
- Kanamaru S., Kurazono H., Nakano M., Terai A., Ogawa O., Yamamoto S. 2006. Subtyping of uropathogenic *Escherichia coli* according to the pathogenicity island encoding uropathogenic-specific protein: comparison with phylogenetic groups. *International Journal of Urology*, 13, 6: 754–760
- Kapitein N., Mogk A. 2013. Deadly syringes: type VI secretion system activities in pathogenicity and interbacterial competition. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 1: 52–58
- Kesik-Brodacka M., Romanik A., Mikiewicz-Sygula D., Plucienniczak G., Plucienniczak A. 2012. A novel system for stable, high-level expression from the T7 promoter. *Microbial Cell Factories*, 11, 1: 1–7
- Koren S. 2002. Bakterijski toksini. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 75- 88
- Köhler C. D., Dobrindt U. 2011. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 8: 642–647

- Ku W., Liu Y., Hsu Y., Liao C., Liang P., Yuan H. S., Chak K. 2002. The zinc ion in the HNH motif of the endonuclease domain of colicin E7 is not required for DNA binding but is essential for DNA hydrolysis. *Nucleic Acids Research*, 30, 7: 1670-1678
- Kuo L. J., Yang L.-X. 2008. γ -H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*, 22, 3: 305–309
- Kurazono H., Yamamoto S., Nakano M., Nair G. B., Terai A., Chaicumpa W., Hayashi H. 2000. Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. *Microbial Pathogenesis*, 28, 3: 183–189
- Labie C., Bouché F., Bouché J. P. 1990. Minicell-forming mutants of *Escherichia coli*: suppression of both DicB-and MinD-dependent division inhibition by inactivation of the *minC* gene product. *Journal of Bacteriology*, 172, 10: 5852–5855
- Lamarche B. J., Orazio N. I., Weitzman M. D. 2010. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Letters*, 584, 17: 3682–3695
- Lawrence J. G., Hendrix R. W., Casjens S. 2001. Where are the pseudogenes in bacterial genomes? *Trends in Microbiology*, 9, 11: 535–540
- Malten M., Biedendieck R., Gamer M., Drews A.-C., Stammen S., Buchholz K., Dijkhuizen L., Jahn D. 2006. A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export, and one-step purification of affinity-tagged heterologous levansucrase from growth medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2: 1677–1679
- Mira A., Ochman H., Moran N. A. 2001. Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends in Genetics*, 17, 10: 589–596
- Milkman R. 1973. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. *Science*, 182, 4116: 1024-1026
- Mobitec GmbH. 2012. T7 RNA polymerase expression system for *Bacillus megaterium*. Mobitec GmbH, Gottingen: 18 str.
- Mukherjee M. 2013. Molecular characterization of uropathogenic *Escherichia coli* $\square$: nalidixic acid and ciprofloxacin resistance, virulent factors and phylogenetic background. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7, 12:2727-2731
- Nakano M., Yamamoto S., Terai A., Ogawa O., Makino S., Hayashi H., Nair G. B., Kurazono H. 2001. Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the Usp protein. *FEMS microbiology letters*, 205, 1: 71–76
- Nataro J. P., Kaper J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Microbiological Review*, 11:142-201

- Nipič D., Podlesek Z., Budič M., Črnigoj M., Žgur-Bertok D. 2013. *Escherichia coli* uropathogenic-specific protein, Usp, is a bacteriocin-like genotoxin. *Journal of Infectious Diseases*, 208, 10: 1545–1552
- Nougayrède J.-P., Taieb F., Rycke J. D., Oswald E. 2005. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends in Microbiology*, 13, 3: 103–110
- Nougayrède J.-P. 2006. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*, 313, 5788: 848–851
- Nowrouzian F. L., Wold A. E., Adlerberth I. 2005. *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *Journal of Infectious Diseases*, 191, 7: 1078–1083
- Park H. K., Jung Y. J., Chae H. C., Shin Y. J., Woo S. Y., Park H. S., Lee S. J. 2009. Comparison of *Escherichia coli* uropathogenic genes (*kps*, *usp* and *ireA*) and enteroaggregative genes (*aggR* and *aap*) via multiplex polymerase chain reaction from suprapubic urine specimens of young children with fever. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 43, 1: 51–57
- Parret A. H., De Mot R. 2002. *Escherichia coli*'s uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity? *Microbiology*, 148, 6: 1604–1606
- Petrovska M. 2002. Okužbe sečil. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 379–382
- Pina A. S., Lowe C. R., Roque A. C. A. 2014. Challenges and opportunities in the purification of recombinant tagged proteins. *Biotechnology Advances*, 32, 2: 366–381
- Putze J., Hennequin C., Nougayrède J.-P., Zhang W., Homburg S., Karch H., Bringer M.-A., Fayolle C., Carniel E., Rabsch W., Oelschlaeger T. A., Oswald E., Forestier C., Hacker J., Dobrindt U. 2009. Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family *Enterobacteriaceae*. *Infection and Immunity*, 77, 11: 4696–4703
- Qiagen. 2003. A handbook for high-level expression and purification of 6x his- tagged proteins. Qiagen, Valencia: 127 str
- Rath A., Glibowicka M., Nadeau V. G., Chen G., Deber C. M. 2009. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National of Sciences of the United States of America*, 106, 6: 1760–1765
- Rijavec M., Muller-Premru M., Zakotnik B., Žgur-Bertok D. 2008. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 11: 1329–1334
- Russo T. A., Johnson J. R. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases*, 181, 5: 1753–1754

- Salomon D., Kinch L. N., Trudgian D. C., Guo X., Klimko J. A., Grishin N. V., Mirzaei H., Orth K. 2014. Marker for type VI secretion system effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 25: 9271–9276
- Schwabe R. F., Jobin C. 2013. The microbiome and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13, 11: 800–812
- Sen M., Rothfield L. I. 1998. Stability of the *Escherichia coli* division inhibitor protein MinC requires determinants in the carboxy-terminal region of the protein. *Journal of Bacteriology*, 180, 1: 175–177
- Silverman J. M., Brunet Y. R., Cascales E., Mougous J. D. 2012. Structure and regulation of the type VI secretion system. *Annual Review of Microbiology*, 66, 1: 453–472
- Singh S. M., Panda A. K. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 4: 303–310
- Siqueira A. K., Ribeiro M. G., Leite D. da S., Tiba M. R., Moura C. de, Lopes M. D., Prestes N. C., Salerno T., da Silva A. V. 2009. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, 86, 2: 206–210
- Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 3: 207–217
- Tiba M. R., Yano T., Leite D. S. 2008. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 50, 5: 255–260
- Touchon M., Hoede C., Tenaillon O., Barbe V., Baeriswyl S., Bidet P., Bingen E., Bonacorsi S., Bouchier C., Bouvet O., Calteau A., Chiapello H., Clermont O., Cruveiller S., Danchin A., Diard M., Dossat C., Karoui M. E., Frapy E., Garry L., Ghigo J. M., Gilles A. M., Johnson J., Le Bouguénec C., Lescat M., Mangenot S., Martinez-Jéhanne V., Matic I., Nassif X., Oztas S., Petit M. A., Pichon C., Rouy Z., Ruf C. S., Schneider D., Tourret J., Vacherie B., Vallenet D., Médigue C., Rocha E. P. C., Denamur E. 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genetics*, 5, 1: e0344, doi: 10.1371/journal.pgen.1000344: 26 str.
- Van der Bij A. K., Peirano G., Pitondo-Silva A., Pitout J. D. D. 2012. The presence of genes encoding for different virulence factors in clonally related *Escherichia coli* that produce CTX-Ms. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 72, 4: 297–302
- Wang C., Mendonsa G. R., Symington J. W., Zhang Q., Cadwell K., Virgin H. W., Mysorekar I. U. 2012. Atg16L1 deficiency confers protection from uropathogenic *Escherichia coli* infection *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 27: 11008–11013

- Wang M. C., Tseng C. C., Wu A. B., Huang J. J., Sheu B. S., Wu J. J. 2009. Different roles of host and bacterial factors in *Escherichia coli* extra-intestinal infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 4: 372–379
- Wittchen K.D., Meinhard F. 1995. Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacment. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 42: 871-877
- Yamamoto S., Nakano M., Terai A., Yuri K., Nakata K., Nair G. B., Kurazono H., OGAWA O. 2001. The presence of the virulence island containing the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. *Journal of urology*, 165, 4: 1347–1351
- Yamamoto S. 2007. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 13, 2: 68–73
- Yoon S., Kim S., Kim J. 2010. Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Recent Patents on Biotechnology*, 4, 1: 23–29
- Zaw M. T., Yamasaki E., Yamamoto S., Nair G. B., Kawamoto K., Kurazono H. 2013. Uropathogenic specific protein gene, highly distributed in extraintestinal uropathogenic *Escherichia coli*, encodes a new member of HNH nuclease superfamily. *Gut Pathogens*, 5, 1: e4749, doi: 10.1186/1757-4749-5-13: 9 str.
- Ziegler- Heitbrock H. W., Thiel E., Futterer A., Herzog V., Wirtz A., Riethmuller G. 1988. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristic of mature monocytes. *International Journal of Cancer*, 3: 456-461
- Zoued A., Brunet Y. R., Durand E., Aschtgen M.-S., Logger L., Douzi B., Journet L., Cambillau C., Cascales E. 2014. Architecture and assembly of the type VI secretion system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843, 8: 1664–1673
- Žgur-Bertok D. 2013. DNA damage repair and bacterial pathogens. *PLoS Pathogens*, 9, 11: e1003711, doi: 10.1371/journal.ppat.1003711: 5 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Darji Žgur Bertok za odlično mentorstvo, za dostopnost, strokovno vodenje, pomoč, nasvete in temeljite odgovore, za veliko vloženega truda in časa, za veliko posluha ter razumevanja.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Jure Stojanu za zelo hitro in korektno recenzijo, kakor tudi predsednici komisije prof. dr. Katji Seme za strokovno sodelovanje.

Posebna zahvala za posredovanje izjemno bogatega strokovnega znanja gre dr. Zdravku Podlesku. Moč besede je premajhna, da bi lahko opisala hvaležnost za vse nasvete, za vso dobro voljo in pozitivno energijo. Bila mi je velika čast delati v laboratoriju izjemnega raziskovalca, čigar pristop, volja in energija za reševanje znanstvenih in tudi neznansstvenih vprašanj so mi za zgled pri nadaljnjem delu. Somentorju asist. dr. Mihi Črnigoju se zahvaljujem za potrpljenje, pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu. Gregorju Bajcu in Barbari Kastelic Bokal se zahvaljujem za vso pomoč in prijaznost, za ves pripravljen material, za posluh in veliko smeha, ko je to bilo najbolj potrebno.

Zaposlenim na Katedri za biokemijo, še posebej Nini Orehar, se iskreno zahvaljujem za pomoč in vse »ukradene« mikrolitre protiteles in encimov, mililitre pufrov in takšnih in drugačnih reagentov. Dr. Mateju Butali se zahvaljujem za strokovne pogovore in nasvete pri planiranju nekaterih poskusov. Za izposajo laboratorijske opreme in prostorov kakor tudi praktične nasvete se iskreno zahvaljujem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo in raziskovalcem skupine za nanobiologijo in nanotoksikologijo.

Daši, družini Skočaj, Davorju, Katji in vsem ostalim prijateljem in sošolcem - iskreno hvala za vso spodbudo, za odlično družbo, za dolge pogovore in premlevanje dobljenih rezultatov, za veliko smeha in še in še ...

Posebej se zahvaljujem Matevžu za spodbudo, za lepe besede kakor tudi konstruktivne kritike, za pomoč, razumevanje in potrpljenje. Iskrena hvala tudi moji družini za vso ljubezen in nesebično podporo v vseh pogledih.

Navsezadnje hvala vsem, ki so tako ali drugače bili del te izjemno lepe izkušnje.