

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nika VOLMAJER

**RAZŠIRJENOST PODTIPOV OTOKA PATOGENOSTI  
USP PRI UROPATOGENIH SEVIH BAKTERIJE  
*Escherichia coli***

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nika VOLMAJER

**RAZŠIRJENOST PODTIPOV OTOKA PATOGENOSTI USP PRI  
UROPATHOGENIH SEVIH BAKTERIJE *Escherichia coli***

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**PREVALENCE OF USP PATHOGENICITY ISLAND SUBTYPES  
AMONG UROPATHOGENIC STRAINS OF BACTERIA *Escherichia coli***

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes – Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologije 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.

Po sklepu Študijske komisije 1. in 2. stopnje je bila za mentorico magistrskega dela imenovana prof. dr. Darja Žgur Bertok in za recenzentko izr. prof. dr. Manica Mueller Premru.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Mateja ERDANI KREFT

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Članica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Manica MUELLER-PREMRU

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

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

Nika Volmajer

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Du2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| DK | UDK 579(043.2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| KG | Mikrobiologija/ <i>Escherichia coli</i> /uropatogeni specifičen protein/ <i>usp/tcpC</i> /otok patogenosti <i>usp</i> /podtipi <i>usp</i> /otok patogenosti <i>pks</i> /uropatogeni sevi <i>E. coli</i> /virulentni dejavniki/policistronska mRNK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| AV | VOLMAJER, Nika, dipl. mikrobiol. (UN)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| SA | ŽGUR-BERTOK, Darja (mentorica)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| LI | 2015                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| IN | RAZŠIRJENOST PODTIPOV OTOKA PATOGENOSTI USP PRI UROPATOGENIH SEVIH BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| TD | Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| OP | XI, 71 str., 34 pregl., 42 sl., 5 pril., 46 vir.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| JI | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| AB | Okužbe urinarnega trakta so najbolj pogosta oblika zunajčrevesne okužbe, ki jo v večini primerov povzroča bakterija <i>E. coli</i> . Je zelo variabilna vrsta bakterije, okužbe pa povzročajo tisti sevi, ki so pridobili zapise za virulentne dejavnike. Eden takšnih je PAI <i>usp</i> , ki so ga odkrili leta 2000 in kodira protein Usp z endonukleazno aktivnostjo. Poleg gena <i>usp</i> se na otoku nahajajo še 3 odprti bralni okvirji, ki kodirajo proteine imunosti ( <i>imu1-3</i> ), le-ti pa varujejo bakterijo pred lastnim proteinom Usp. PAI <i>usp</i> povezujejo z uropatogenimi sevi <i>E. coli</i> . Obstajajo podtipi PAI <i>usp</i> , ki se razlikujejo po razporeditvi genov imunosti in nukleotidnem zaporedju gena <i>usp</i> . V tej raziskavi smo želeli pojasniti, kako nastajajo podtipi, kateri prevladujejo in kako so povezani z virulentnima dejavnikoma <i>tcpC</i> ter otokom patogenosti <i>pks</i> . Z izolacijo RNK smo preverili, kako se gen <i>usp</i> prepisuje. Ugotovili smo da se najpogosteje pojavlja podtip Ia (50 %), sledita mu IIa (25 %) ter Ib (22 %). Podtip IIb smo dokazali samo pri enem testiranem sevu. Gen <i>tcpC</i> se je pojavljal pri 17 % sevov iz zbirke in se pogosto pojavlja z genom <i>usp</i> , predvsem pri podtipu Ia. Otok patogenosti <i>pks</i> smo dokazali pri 28 % sevov in se je pogosto pojavljal pri podtipih Ia ter Ib. Izolacija celokupne RNK je pokazala, da se vsi geni v otoku patogenosti prepisujejo skupaj v policistronsko mRNK. Z analizo nukleotidnega zaporedja PAI <i>usp</i> smo prikazali mozaično strukturo genov in intergenskih regij, ki so podvržene rekombinacijam. Zaporedje genov imunosti se je ob tem spremenilo, nastali pa so različni podtipi. Nekaterim celo manjkajo geni imunosti, kar je najverjetneje posledica delecij. Spremembam je podvržen tudi 3' konec gena <i>usp</i> . Na tem delu gena se je skupaj z genom <i>imu2</i> vstavila intergenska regija in s tem povzročila 2 različici gena <i>usp</i> . |

## KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DN | Du2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| DC | UDK 579(043.2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| CX | Microbiology/ <i>Escherichia coli</i> /uropathogenic-specific protein/ <i>usp/tcpC/usp</i> pathogenicity island/ <i>usp</i> subtypes/ <i>pks</i> pathogenicity island/uropathogenic <i>E. coli</i> /virulence factors/polycistronic mRNA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| AU | VOLMAJER, Nika                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| AA | ŽGUR-BERTOK, Darja (supervisor)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| PP | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| PB | University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| PY | 2015                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| TI | PREVALENCE OF USP PATHOGENICITY ISLAND SUBTYPES AMONG UROPATHOGENIC STRAINS OF BACTERIA <i>Escherichia coli</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| DT | M. Sc. Thesis (Master Study Programmes – Microbiology)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| NO | XI, 71 p., 34 tab., 42 fig., 5 ann., 46 ref.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| LA | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| AL | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| AB | <i>Escherichia coli</i> is a commensal organism in the gut but pathogenic strains that produce virulence factors can cause a variety of intestinal and extraintestinal infections, urinary tract infections being the most common. The <i>usp</i> gene is encoded on a small pathogenicity island together with 3 downstream open reading frames <i>imu1-3</i> . Homology research revealed that <i>usp</i> exhibits homology with nuclease-type bacteriocins, which possess a H-N-H nuclease motif. The three small open reading frames exhibit similarity with immunity proteins protecting colicin producers. The regions downstream of <i>usp</i> in PAI <sub>usp</sub> have mosaic structures, and due to different arrangements of <i>imu</i> genes PAI <sub>usp</sub> variants can be classified into four subtypes: Ia, IIa, Ib and IIb. In our research we tried to explain how these subtypes are formed, which subtype is the most prevalent and how they are associated with virulence factors <i>tcpC</i> and the pathogenicity island <i>pks</i> . To explain how the genes in PAI <sub>usp</sub> are transcribed, we isolated RNA and used reverse transcription and PCR to determine polycistronic mRNA. Our research showed that 34 % of the studied strains encoded <i>usp</i> and that the most common PAI <sub>usp</sub> subtype was Ia (50 %), followed by IIa (25 %) and Ib (22 %). Subtype IIb appeared in only one strain. Seventeen percent of the strains harbored <i>tcpC</i> sequence and among these 41% harbored PAI <sub>usp</sub> of the Ia and Ib subtypes. The <i>pks</i> pathogenicity island was detected in 28 % of the strains and among these 75 % harbored PAI <sub>usp</sub> of the Ia and Ib subtypes. With RNA isolation we detected polycistronic mRNA, which indicates that genes of the PAI <sub>usp</sub> are transcribed into one long mRNA and are subsequently separated in the process of translation. By analyzing the sequence of PAI <sub>usp</sub> we visualized the mosaic structure of the genes and intergenetic regions in PAI, indicating that the subtypes could have been formed by recombination. Arrangement of the immunity genes depends on the subtype, with some subtypes without individual immunity genes that could have been lost by deletion. The 3' end of <i>usp</i> gene is also variable and is found in 2 alleles. |

## KAZALO VSEBINE

|                                                                         | str.        |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)</b>                        | <b>III</b>  |
| <b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)</b>                                    | <b>IV</b>   |
| <b>KAZALO VSEBINE</b>                                                   | <b>V</b>    |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC</b>                                                | <b>VIII</b> |
| <b>KAZALO SLIK</b>                                                      | <b>IX</b>   |
| <b>KAZALO PRILOG</b>                                                    | <b>X</b>    |
| <b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>                                             | <b>XI</b>   |
| <br>                                                                    |             |
| <b>1 UVOD</b>                                                           | <b>1</b>    |
| 1.1 NAMEN DELA                                                          | 2           |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b>                                                  | <b>3</b>    |
| 2.1 FILOGENETSKE SKUPINE                                                | 4           |
| 2.2 SEROTIPI                                                            | 4           |
| 2.3 OKUŽBE URINARNEGA TRAKTA                                            | 5           |
| <b>2.3.1 Patogeni urinarnega trakta</b>                                 | <b>6</b>    |
| 2.4 VIRULENTNI DEJAVNIKI                                                | 6           |
| <b>2.4.1 Adhezini</b>                                                   | <b>6</b>    |
| 2.4.1.1 Fimbrije tipa 1                                                 | 7           |
| 2.4.1.2 Fimbrije tipa P                                                 | 7           |
| 2.4.1.3 Fimbrije tipa S in fimbrije tipa F1C                            | 8           |
| 2.4.1.4 Afa/Dr                                                          | 9           |
| <b>2.4.2 Toksini</b>                                                    | <b>9</b>    |
| 2.4.2.1 Alfa-hemolizin                                                  | 9           |
| 2.4.2.2 Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik                           | 10          |
| 2.4.2.3 Uropatogeni specifični protein                                  | 10          |
| 2.4.2.4 Otok patogenosti poliketid sintaza ( <i>pks</i> ) in kolibaktin | 13          |
| <b>2.4.3 Izogibanje imunskemu sistemu</b>                               | <b>15</b>   |
| 2.4.3.1 Kapsule                                                         | 15          |
| 2.4.3.2 TraT                                                            | 16          |
| 2.4.3.3 TcpC                                                            | 16          |
| 2.5 MOLEKULA RNK                                                        | 18          |
| <b>2.5.1 Policistronska mRNK</b>                                        | <b>18</b>   |
| <b>3 MATERIALI IN METODE</b>                                            | <b>20</b>   |
| 3.1 MATERIALI                                                           | 20          |
| <b>3.1.1 Mikroorganizmi</b>                                             | <b>20</b>   |
| <b>3.1.2 Mikrobna gojišča</b>                                           | <b>20</b>   |
| 3.1.2.1 Priprava trdnih gojišč LB                                       | 20          |
| 3.1.2.2 Priprava trdnih gojišč LB z dodanim antibiotikom                | 20          |
| 3.1.2.3 Priprava tekočih gojišč LB                                      | 20          |
| <b>3.1.3 Kemikalije</b>                                                 | <b>21</b>   |
| <b>3.1.4 Oprema</b>                                                     | <b>22</b>   |
| <b>3.1.5 Kompleti</b>                                                   | <b>22</b>   |
| <b>3.1.6 Encimi</b>                                                     | <b>23</b>   |
| <b>3.1.7 Začetni oligonukletotidi</b>                                   | <b>23</b>   |

|                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.1.8 Računalniški programi</b>                                                             | <b>24</b> |
| <b>3.2 METODE</b>                                                                              | <b>24</b> |
| <b>3.2.1 Priprava lizatov</b>                                                                  | <b>24</b> |
| <b>3.2.2 Določanje gena <i>tcpC</i></b>                                                        | <b>24</b> |
| <b>3.2.3 Določanje otoka patogenosti <i>pkS</i></b>                                            | <b>25</b> |
| <b>3.2.4 Subtipizacija otoka patogenosti PAI<i>usp</i></b>                                     | <b>26</b> |
| <b>3.2.5 Določanje genov imunosti <i>imu1</i> in <i>imu2</i> v genomu sevov <i>E. coli</i></b> | <b>27</b> |
| <b>3.2.6 Pomnoževanje otoka patogenosti PAI<i>usp</i> za kloniranje</b>                        | <b>27</b> |
| <b>3.2.7 Agarozna gelska elektroforeza</b>                                                     | <b>28</b> |
| <b>3.2.8 Izolacija DNK</b>                                                                     | <b>28</b> |
| <b>3.2.9 Čiščenje produktov PCR iz gela s kompletom GeneJET Gel Extraction</b>                 | <b>29</b> |
| <b>3.2.10 Kloniranje s kompletom CLONE JET PCR cloning: Sticky end protocol</b>                | <b>29</b> |
| <b>3.2.11 Transformacija plasmida s kompletom TransformAid Bacterial Transformation</b>        | <b>30</b> |
| <b>3.2.12 Izolacija plazmida s komercialnim kompletom GeneJET Plasmid Miniprep</b>             | <b>30</b> |
| <b>3.2.13 Restrikcija plazmida</b>                                                             | <b>31</b> |
| <b>3.2.14 Shranjevanje bakterijske kulture</b>                                                 | <b>31</b> |
| <b>3.2.15 Rastna krivulja</b>                                                                  | <b>31</b> |
| <b>3.3 IZOLACIJA RNK S KOMPLETOM QIAGEN RNEASY MINI KIT</b>                                    | <b>32</b> |
| <b>3.3.1 Prepis RNK v cDNK s kompletom High Capacity cDNA Reverse Transcription</b>            | <b>32</b> |
| <b>3.4 STATISTIČNE METODE</b>                                                                  | <b>36</b> |
| <b>4 REZULTATI</b>                                                                             | <b>37</b> |
| <b>4.1 RAZŠIRJENOST PODTIPOV OTOKA PATOGENOSTI <i>USP</i></b>                                  | <b>37</b> |
| <b>4.2 RAZŠIRJENOST GENA <i>TCPC</i></b>                                                       | <b>41</b> |
| <b>4.3 RAZŠIRJENOST OTOKA PATOGENOSTI <i>PKS</i></b>                                           | <b>41</b> |
| <b>4.4 POVEZAVA VIRULENTNIH DEJAVNIKOV <i>USP</i>, <i>TCPC</i> TER <i>PKS</i></b>              | <b>41</b> |
| <b>4.5 IZOLACIJA RNK</b>                                                                       | <b>43</b> |
| <b>4.6 ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ</b>                                                      | <b>48</b> |
| <b>4.6.1 Primerjava nukleotidnih zaporedij</b>                                                 | <b>50</b> |
| <b>4.6.2 Mozaična struktura otoka patogenosti <i>usp</i></b>                                   | <b>56</b> |
| <b>5 RAZPRAVA</b>                                                                              | <b>60</b> |
| <b>6 SKLEPI</b>                                                                                | <b>64</b> |
| <b>7 POVZETEK</b>                                                                              | <b>65</b> |
| <b>8 VIRI</b>                                                                                  | <b>66</b> |

## ZAHVALA

## PRILOGE

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                     | str. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Preglednica 1:</b> Kemikalije uporabljene v raziskavi in njihov proizvajalec.....                                                                | 21   |
| <b>Preglednica 2:</b> Oprema uporabljena pri raziskavi in proizvajalec. ....                                                                        | 22   |
| <b>Preglednica 3:</b> Komercialno dostopni kompleti, ki smo jih uporabljali v raziskavi. ....                                                       | 22   |
| <b>Preglednica 4:</b> Encimi uporabljeni v raziskavi in proizvajalec. ....                                                                          | 23   |
| <b>Preglednica 5:</b> Začetni oligonukleotidi uporabljeni v reakcijah z verižno polimerazo. ....                                                    | 23   |
| <b>Preglednica 6:</b> Računalniški programi, ki smo jih uporabili pri analizi in predstavljanju nukleotidnih zaporedij. ....                        | 24   |
| <b>Preglednica 7:</b> Reakcijska mešanica za določanje gena <i>tcpC</i> . ....                                                                      | 24   |
| <b>Preglednica 8:</b> Program PCR za preverjanje prisotnosti gena <i>tcpC</i> .....                                                                 | 25   |
| <b>Preglednica 9:</b> Reakcijska mešanica za določanje genov <i>clbA</i> in <i>clbQ</i> . ....                                                      | 25   |
| <b>Preglednica 10:</b> Program PCR za preverjanje prisotnosti genov <i>clbA</i> in <i>clbQ</i> . ....                                               | 25   |
| <b>Preglednica 11:</b> Reakcijska mešanica za subtipizacijo PA <i>Iusp</i> . ....                                                                   | 26   |
| <b>Preglednica 12:</b> PCR program za subtipizacijo PA <i>Iusp</i> .....                                                                            | 26   |
| <b>Preglednica 13:</b> Reakcijska mešanica za preverjanje prisotnosti gena <i>imu1</i> . ....                                                       | 27   |
| <b>Preglednica 14:</b> Reakcijska mešanica za preverjanje prisotnosti gena <i>imu2</i> . ....                                                       | 27   |
| <b>Preglednica 15:</b> Program PCR za preverjanje prisotnosti genov imunosti <i>imu1</i> in <i>imu2</i> . ....                                      | 27   |
| <b>Preglednica 16:</b> Reakcijska mešanica za pomnoževanje celotnega PA <i>Iusp</i> . ....                                                          | 27   |
| <b>Preglednica 17:</b> Program PCR za pomnoževanje celotnega PA <i>Iusp</i> za kloniranje. ....                                                     | 28   |
| <b>Preglednica 18:</b> Restriksijska mešanica uporabljena za kloniranje PA <i>Iusp</i> v plazmid pJET 1.2/blunt. ....                               | 29   |
| <b>Preglednica 19:</b> Restriksijska mešanica za preverjanje uspešnosti kloniranja ....                                                             | 31   |
| <b>Preglednica 20:</b> Reakcijska mešanica za prepis celokupne RNK v cDNK.....                                                                      | 33   |
| <b>Preglednica 21:</b> Program za transkripcijo celokupne RNK v cDNK. ....                                                                          | 33   |
| <b>Preglednica 22:</b> Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri ugotavljanju policistranske mRNK.....                                                | 34   |
| <b>Preglednica 23:</b> Reakcijska mešanica za določanje policistranske mRNK. ....                                                                   | 34   |
| <b>Preglednica 24:</b> Program za dodatne analize PCR.....                                                                                          | 35   |
| <b>Preglednica 25:</b> Reakcijska mešanica za podtip Ia, sev H24. ....                                                                              | 35   |
| <b>Preglednica 26:</b> Reakcijska mešanica za podtip IIa, sev HS2.....                                                                              | 36   |
| <b>Preglednica 27:</b> Razširjenost podtipov PA <i>Iusp</i> .....                                                                                   | 37   |
| <b>Preglednica 28:</b> Razširjenost sevov, ki so <i>tcpC</i> <sup>+</sup> in razporejenost le-teh med filogenetske skupine.....                     | 41   |
| <b>Preglednica 29:</b> Razširjenost <i>pks</i> sevov v zbirki <i>E. coli</i> . ....                                                                 | 41   |
| <b>Preglednica 30:</b> Sopotavljanje virulentnih dejavnikov <i>usp</i> , <i>pks</i> ter <i>tcpC</i> .....                                           | 42   |
| <b>Preglednica 31:</b> Pogostost pojavljanja virulentnih dejavnikov <i>pks</i> ter <i>tcpC</i> pri podtipih PA <i>Iusp</i> . ....                   | 42   |
| <b>Preglednica 32:</b> Koncentracije in kvaliteta izolirane celokupne RNK, izmerjene s pomočjo NanaDropa.....                                       | 45   |
| <b>Preglednica 33:</b> Sevi iz podatkovnih baz, ki imajo otok patogenosti <i>usp</i> in smo jih vključili v raziskavo ter jim določili podtip. .... | 50   |
| <b>Preglednica 34:</b> Podobnosti med intergenskimi regijami v odstotkih.....                                                                       | 56   |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                                                                                              | str. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Slika 1:</b> Shematski prikaz otoka patogenosti <i>pks</i> (Homburg, 2007).....                                                                                                                                           | 14   |
| <b>Slika 2:</b> Grafičen prikaz otoka patogenosti podtipa Ia ter sevi, ki pripadajo temu tipu.....                                                                                                                           | 38   |
| <b>Slika 3:</b> Grafičen prikaz otoka patogenosti podtipa IIa ter sevi, ki pripadajo temu tipu. ...                                                                                                                          | 38   |
| <b>Slika 4:</b> Grafičen prikaz otoka patogenosti podtipa Ib ter sevi, ki pripadajo temu tipu. ....                                                                                                                          | 39   |
| <b>Slika 5:</b> Grafičen prikaz otoka patogenosti podtipa IIb ter sevi, ki pripadajo temu tipu. ...                                                                                                                          | 39   |
| <b>Slika 6:</b> Manjkajoča gena imunosti <i>imu1</i> in <i>imu2</i> se ne pojavljata izven PAI <i>usp</i> . ....                                                                                                             | 40   |
| <b>Slika 7:</b> Rastna krivulja sevov MG1655 pH24 in MG1655 pHS2. RNK smo izolirali v 360 minuti, kar je na sliki označeno z rumeno barvo. ....                                                                              | 43   |
| <b>Slika 8:</b> Integriteta celokupne RNK izolirane pri 1. poizkusu. ....                                                                                                                                                    | 44   |
| <b>Slika 9:</b> Integriteta celokupne RNK izolirane pri 2. poizkusu. ....                                                                                                                                                    | 44   |
| <b>Slika 10:</b> Subtipizacija cDNK seva MG1655 pH24. ....                                                                                                                                                                   | 45   |
| <b>Slika 11:</b> Subtipizacija cDNK seva MG1655 pH24. ....                                                                                                                                                                   | 46   |
| <b>Slika 12:</b> Pomnoževanje regij znotraj otoka patogenosti zaradi neoptimalnih rezultatov pri subtipizaciji cDNK sevov MG1655 pH24 in MG1655 pHS2. ....                                                                   | 47   |
| <b>Slika 13:</b> Grafični prikaz PAI <i>usp</i> izoliranega iz seva <i>E. coli</i> H24.....                                                                                                                                  | 48   |
| <b>Slika 14:</b> Grafični prikaz PAI <i>usp</i> izoliranega iz seva <i>E. coli</i> H6.....                                                                                                                                   | 48   |
| <b>Slika 15:</b> Grafični prikaz PAI <i>usp</i> izoliranega iz seva <i>E. coli</i> H28.....                                                                                                                                  | 48   |
| <b>Slika 16:</b> Grafični prikaz PAI <i>usp</i> izoliranega iz seva <i>E. coli</i> H33.....                                                                                                                                  | 48   |
| <b>Slika 17:</b> Grafični prikaz PAI <i>usp</i> izoliranega iz seva <i>E. coli</i> H35.....                                                                                                                                  | 48   |
| <b>Slika 18:</b> Grafični prikaz PAI <i>usp</i> izoliranega iz seva <i>E. coli</i> H38.....                                                                                                                                  | 48   |
| <b>Slika 19:</b> Grafični prikaz PAI <i>usp</i> izoliranega iz seva <i>E. coli</i> H41.....                                                                                                                                  | 49   |
| <b>Slika 20:</b> Grafični prikaz PAI <i>usp</i> izoliranega iz seva <i>E. coli</i> H61.....                                                                                                                                  | 49   |
| <b>Slika 21:</b> Grafični prikaz PAI <i>usp</i> izoliranega iz seva <i>E. coli</i> HS2.....                                                                                                                                  | 49   |
| <b>Slika 22:</b> Grafični prikaz PAI <i>usp</i> izoliranega iz seva <i>E. coli</i> HS27.....                                                                                                                                 | 49   |
| <b>Slika 23:</b> Mesto vezave ribosoma (RBS) in promotorski mesti -10 ter -35 gena <i>usp</i> .....                                                                                                                          | 50   |
| <b>Slika 24:</b> Prekrivanje genov <i>uspI</i> in <i>imu1</i> pri podtipu Ia in Ib.....                                                                                                                                      | 51   |
| <b>Slika 25:</b> Pri podtipu IIa in IIb ni prekrivanja genov <i>uspII</i> in <i>imu2</i> .....                                                                                                                               | 51   |
| <b>Slika 26:</b> Poravnava AK zaporedja proteinov Usp iz sevov Z42, H6 in H24.....                                                                                                                                           | 52   |
| <b>Slika 27:</b> Protein Usp, seva Z42 ima ohranjene regije znotraj proteina. Na C-terminalnem delu se nahaja H-N-H endonukleazna domena, ki je pomembna pri aktivnosti bakteriocinov. ....                                  | 52   |
| <b>Slika 28:</b> Protein Usp, seva H24 ima zaradi spremenjenega bralnega okvirja drugačno AK zaporedje. Na sliki je vidno, da mu manjka H-N-H endonukleazna domena. ....                                                     | 52   |
| <b>Slika 29:</b> Poravnava nukleotidnih zaporedij sevov podtipa Ia. V okvirju sta označena dodana timina seva H24, ki močno spremenita bralni okvir in s tem AK zaporedje proteina Usp.....                                  | 53   |
| <b>Slika 30:</b> Poravnava AK zaporedja proteina UspII.....                                                                                                                                                                  | 54   |
| <b>Slika 31:</b> Usp seva Z13 ima zaradi spremenjenega bralnega okvirja drugačno AK zaporedje kot ostali proteini istega podtipa. Primankuje mu H-N-H endonukleazna domena, manjka pa tudi domena z DNazno aktivnostjo. .... | 54   |
| <b>Slika 32:</b> Usp seva HS2 ima ohranjene regije znotraj proteina. Na C-terminalnem delu se nahaja H-N-H endonukleazna domena, ki je pomembna pri aktivnosti bakteriocinov.....                                            | 54   |
| <b>Slika 33:</b> Poravnava AK zaporedja proteinov UspI in UspII.....                                                                                                                                                         | 55   |
| <b>Slika 34:</b> PAI <i>usp</i> , razdeljen na genske in intergenske regije. ....                                                                                                                                            | 56   |

|                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Slika 35:</b> Otok patogenosti <i>usp</i> razdeljen na genske in intergenske regije. ....                                   | 57 |
| <b>Slika 36:</b> Grafičen prikaz podobnosti IR A in gena <i>uspII</i> . ....                                                   | 57 |
| <b>Slika 37:</b> Grafičen prikaz podobnosti IR A in gena <i>uspI</i> . ....                                                    | 57 |
| <b>Slika 38:</b> Prikaz mozaične strukture PAI <i>usp</i> in razporejenosti IR ter genov imunosti pri različnih podtipih. .... | 58 |
| <b>Slika 39:</b> Grafičen prikaz podobnosti IR D in gena <i>uspII</i> . ....                                                   | 58 |
| <b>Slika 40:</b> Grafičen prikaz podobnosti IR D in gena <i>uspI</i> . ....                                                    | 58 |
| <b>Slika 41:</b> Grafičen prikaz podobnosti IR B in gena <i>uspII</i> . ....                                                   | 59 |
| <b>Slika 42:</b> Grafičen prikaz podobnosti IR B in gena <i>uspI</i> . ....                                                    | 59 |

## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Rezultati pomnoževanja gena *tcpC* z verižno reakcijo s polimerazo.

**Priloga B:** Rezultati pomnoževanja gena *clbA* in *clbQ* z verižno reakcijo s polimerazo.

**Priloga C:** Rezultati subtipizacije PAI*usp* z verižno reakcijo s polimerazo.

**Priloga D:** Nukleotidno zaporedje PAI*usp*.

Priloga D1: Nukleotidno zaporedje PAI*usp*, izoliranega iz seva *E. coli* H6.

Priloga D2: Nukleotidno zaporedje PAI*usp*, izoliranega iz seva *E. coli* H24.

Priloga D3: Nukleotidno zaporedje PAI*usp*, izoliranega iz seva *E. coli* H41.

Priloga D4: Nukleotidno zaporedje PAI*usp*, izoliranega iz seva *E. coli* H61.

Priloga D5: Nukleotidno zaporedje PAI*usp*, izoliranega iz seva *E. coli* HS2.

Priloga D6: Nukleotidno zaporedje PAI*usp*, izoliranega iz seva *E. coli* H28.

Priloga D7: Nukleotidno zaporedje PAI*usp*, izoliranega iz seva *E. coli* H33.

Priloga D8: Nukleotidno zaporedje PAI*usp*, izoliranega iz seva *E. coli* H35.

Priloga D9: Nukleotidno zaporedje PAI*usp*, izoliranega iz seva *E. coli* H38.

Priloga D10: Nukleotidno zaporedje PAI*usp*, izoliranega iz seva *E. coli* HS27.

**Priloge E:** Poravnave nukleotidnih zaporedij PAI*usp*.

Priloga E1: Poravnava nukleotidnih zaporedij genov *usp* podtipa IIa.

Priloga E2: Poravnava nukleotidnih zaporedij genov *usp* podtipa Ib.

Priloga E3: Poravnava nukleotidnih zaporedij genov *usp* podtipa IIb.

Priloga E4: Poravnava nukleotidnih zaporedij genov *uspI* in *uspII*.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|                |                                                                     |
|----------------|---------------------------------------------------------------------|
| AK             | aminokisline                                                        |
| Amp            | antibiotik ampicilin                                                |
| cDNK           | komplementarna deoksiribonukleinska kislina                         |
| CFU            | kolonijsko število (ang. »colony-forming unit«)                     |
| CNF-1          | citotoksični nekrotizirajoči dejavnik tipa 1                        |
| DAEC           | difuzivno adherentni sevi <i>E. coli</i>                            |
| DNK            | deoksiribonukleinska kislina                                        |
| <i>E. coli</i> | bakterija <i>Escherichia coli</i>                                   |
| EAEC           | enteroagregativni sevi <i>E. coli</i>                               |
| EIEC           | enteroinvazivni sevi <i>E. coli</i>                                 |
| EPEC           | enteropatogeni sevi <i>E. coli</i>                                  |
| ETEC           | enterotoksigeni sevi <i>E. coli</i>                                 |
| IFN            | interferoni                                                         |
| <i>imu1-3</i>  | geni imunosti 1-3                                                   |
| IR             | intergenska regija                                                  |
| LB             | gojišče Luria-Bertani                                               |
| LPS            | lipopolisaharid                                                     |
| NRPS           | neribosomalna peptid megasintaza                                    |
| <i>orfU1-3</i> | odprt bralni okvir 1-3 (ang. »open reading frame«)                  |
| PAI            | otok patogenosti (ang. »pathogenicity island«)                      |
| PCR            | verižna reakcija s polimerazo (ang. »polymerase chain reaction«)    |
| PKS            | poliketid sintaza                                                   |
| RBS            | mesto za vezavo ribosoma (ang. »ribosom binding site«)              |
| RNK            | ribonukleinska kislina                                              |
| SD             | Shine-Dalgarno nukleotidno zaporedje                                |
| STEC/EHEC      | enterohemoragični sevi <i>E. coli</i> , ki proizvajajo Shiga toksin |

|      |                                     |
|------|-------------------------------------|
| TIR  | toll/interlevkin receptorske domene |
| TLR  | tollu podobni receptorji            |
| TNF  | tumor nekrotični dejavnik           |
| UPEC | uropatogeni sevi <i>E. coli</i>     |
| Usp  | uropatogeni specifični protein      |

## 1 UVOD

*Escherichia coli* (*E. coli*) je fakultativno anaerobna, po Gramu negativna bakterija in je del normalne flore v prebavilih, saj prebiva v delu debelega črevesa in je običajno neškodljiv komenzal. Za uspešnost bakterije je pomembna sposobnost širjenja v nova okolja, kjer se lahko izogne tekmovanju s strani drugih bakterijskih vrst. Virulenca je sposobnost organizma, da lahko povzroča bolezni v svojem gostitelju. Pri *E. coli* virulenco povzročajo eden ali pa skupek virulentnih dejavnikov, prisotnost le-teh pa določa ali je bakterija popolnoma neškodljiva ali pa je potencialni patogen. Okužba urinarnega trakta je najbolj pogosta oblika zunajčrevesne okužbe, ki jo v večini primerov povzroča *E. coli*. (Johnson, 1991).

Nedavno so odkrili otok patogenosti PAI*usp* (angl. »pathogenicity island«), ki je pogost v uropatogenih sevih *E. coli*. V otoku se nahaja gen, ki kodira protein imenovan uropatogeni specifični protein (Usp) in kodira polipeptid s 346 aminokislinami (AK). Poleg gena *usp* ima še 3 odprte bralne okvirje, ki jih označujejo kot *orfU1-3* (*imu1-3*) in kodirajo proteine z 98, 97 in 96 AK. Otok se večinoma pojavlja pri uropatogenih izolatih *E. coli*, medtem ko je redek v sevih izoliranih iz zdravih posameznikov. PAI*usp* je vstavljen v regijo intergenske DNK seva *E. coli* K12 med genoma *aroP* in *pdhR*. Intergensko nukleotidno zaporedje med genoma *usp* in *aroP* se sklada z nukleotidnim zaporedjem družine transpozonov Tn3, kar nakazuje, da je otok najverjetneje DNK tujega izvora (Yamamoto in sod., 2001).

V magistrski nalogi smo se osredotočili predvsem na gen *usp* in pripadajoče t.i. gene imunosti (*orfU1-3*), katerih naloga še ni popolnoma jasna. Znano je, da geni imunosti v otoku sledijo genu *usp*, vendar je to zaporedje v različnih sevih drugačno. Da bi razjasnili, vzrok in njihov vpliv na samo patogenezo, smo se odločili, da z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) določimo razširjenost podtipov PAI*usp*, medtem ko s kloniranjem in določitvijo nukleotidnega zaporedja poskušamo razjasniti mehanizem njihovega nastajanja.

## 1.1 NAMEN DELA

Z magistrsko nalogo smo želeli ugotoviti razširjenost posameznih podtipov PAI*usp* v zbirki komenzalnih sevov *E. coli*, Katedre za Molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. S kloniranjem tega virulentnega otoka v vektor pJET1.2/blunt smo lahko ugotovili nukleotidno zaporedje posameznih podtipov in jih med seboj primerjali. Nukleotidno zaporedje nam omogoča analizo mehanizma nastajanja podtipov in razlago, zakaj do podtipov sploh prihaja. Dodatno smo z izolacijo celokupne RNK poskušali prikazati, kako se geni otoka patogenosti *usp* prepisujejo.

Cilji naloge:

- Preučitev razširjenosti štirih podtipov otoka patogenosti *usp* z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) v zbirki uropatogenih sevov *E. coli*.
- Kloniranje vseh štirih podtipov PAI*usp*, analiza njihovega nukleotidnega zaporedja in poskus razjasnitve mehanizma nastajanja podtipov na podlagi analize.
- Izolacija celokupne RNK iz sevov *E. coli* različnih *usp* podtipov, prepis v cDNK in ugotavljanje transkripcijske enote genov *usp* in *imu1-3* s pomočjo PCR.

## 2 PREGLED OBJAV

Danes je *Escherichia coli* nedvomno najbolj poznana bakterijska vrsta in eden najbolj pogostih izolatov v kliničnih mikrobioloških laboratorijih. Seve *E. coli* ločimo na podlagi genetskih in kliničnih kriterijev in jih uvrščamo v 3 večje skupine: komezalni sevi, črevesni patogeni sevi in zunajčrevesni patogeni sevi. Komezalni sevi so del mikrobiote zdravih ljudi, sesalcev in ptic. Prilagojeni so na bivanje v gostitelju in ne povzročajo bolezni v njegovem črevesju. Večina človeških komezalnih sevov spada v filogenetsko skupino A in običajno nimajo virulentnih dejavnikov, ki so značilni za črevesne in zunajčrevesne patogene (Russo in Johnson, 2000).

Črevesni patogeni *E. coli* so v črevesni flori zdravih posameznikov redki in so obvezni patogeni. V primeru zaužitja zadostnega števila bakterij povzročajo gastroenteritis ali kolitis. Delimo jih v 6 kategorij: enterotoksigene (ETEC), enterohemoragične, ki proizvajajo Shiga toksin (STEC/EHEC), enteropatogene (EPEC), enteroinvazivne (EIEC), enteroagregativne (EAEC) in difuzivno adherentne (DAEC). Različni patotipi so si lahko podobni, vendar so za posamezno skupino značilne določene kombinacije virulentnih lastnosti, ki povzročajo specifični mehanizem patogeneze. Znotraj patotipov obstaja filogenetska raznolikost, člani pa lahko izvirajo iz filogenetskih skupin A, B1, D ali drugih skupin. Znotraj patotipa ni pomemben skupen filogenetski prednik, ampak značilna kombinacija virulentnih lastnosti, ki jo sev pridobi s horizontalnimi prenosi (plasmidi ali lizogeni fagi). Kljub temu da povzročajo bolezni črevesja, ti sevi, v večini, niso sposobni povzročati bolezni zunaj prebavnega trakta (Russo in Johnson, 2000).

Zunajčrevesne okužbe, ki jih povzroča *E. coli*, so pogoste v vseh starostnih skupinah in lahko prizadenejo katerikoli organ ali anatomsko mesto. Pogoste so okužbe urinarnega trakta, meningitis (predvsem pri novorojenčkih in po operacijah živčevja), pljučnice, osteomielitis in okužbe mehkega tkiva. Okužbam na teh mestih pogosto sledi bakteriemija. *E. coli* postaja najbolj pogost po Gramu negativen bacil, ki povzroča bolnišnične okužbe in ga pogosto izolirajo tudi v drugih zdravstvenih ustanovah. Bakterija lahko povzroča hude bolezni, ki lahko vodijo v smrt, tudi pri zdravih osebah, čeprav so zapleti pogostejši pri posameznikih z oslabljenim imunskim sistemom (Russo in Johnson, 2000).

Zunajčrevesne *E. coli* so kot skupina epidemiološko in filogenetsko drugačne od komenzalov in sevov, ki povzročajo črevesne okužbe. Ne povzročajo enteričnih bolezni, lahko pa stabilno kolonizirajo gostiteljevo črevesje in celo predstavljajo dominanten sev, v svojem gostitelju. Ti sevi lahko okužbo povzročijo tam, kjer lahko tvorijo virulentne dejavnike (npr. v urinarnem traktu). Za razliko od večine komenzalnih sevov *E. coli* so zunajčrevesni patogeni iz filogenetske skupine B2 in D tisti, ki vsebujejo gene za različne kombinacije adhezinov (P in S-fimbrije), sisteme za privzem železa, mehanizme za izogibanje obrambnemu sistemu (kapsule ali O-specifičen antigen) in toksine (hemolizin). Vse to so zunajčrevesni virulentni dejavniki. Geni za te dejavnike se pogosto nahajajo skupaj na večjih enotah kromosomske DNK in jih imenujemo otoki patogenosti (PAI) (Russo in Johnson, 2000).

## 2.1 FILOGENETSKE SKUPINE

Na podlagi filogenetskih analiz lahko seve *E. coli* razdelimo v 4 glavne filogenetske skupine: A, B1, B2 in D. Večina komenzalnih sevov pripada skupini A, medtem ko virulentni zunajčrevesni sevi spadajo v skupino B2 ali nekoliko redkeje v skupino D. Razvrščanje je mogoče na podlagi prisotnosti ali odsotnosti določenih genov ali fragmentov DNK v sevih in so zato filogenetski markerji. Z metodo triplex-PCR lahko tako hitro določimo prisotnost gena *chuA*, gena *yjaA* in fragmenta TSPE4.C2, ki je nekodirajoča regija genoma. Na podlagi kombinacije prisotnosti ali odsotnosti teh markerjev uvrščamo seve *E. coli* v eno od 4. filogenetskih skupin (Clermont in sod., 2000).

## 2.2 SEROTIPI

Serotipizacija je metoda, ki jo pogosto uporabljajo za razlikovanje med patogenimi in komenzalnimi sevi *E. coli*. Metoda temelji na določanju antigenov in je zelo kompleksna, saj poznamo 173 O-antigenov (oligosaharidi), 80 K-antigenov (kapsula) in 56 H-antigenov (biček). Antigeni se pojavljajo v različnih kombinacijah, zato obstaja zelo veliko število serotipov. Kljub temu je število patogenih serotipov omejeno, razdelimo pa jih na (i) tiste, ki povzročajo bolezni prebavil in (ii) tiste, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe (Orskov in Orskov, 1992).

## 2.3 OKUŽBE URINARNEGA TRAKTA

Okužba urinarnega trakta sproži vnetni odziv urotelija, ki se izrazi s prisotnostjo bakterij v urinu. Takšno stanje imenujemo bakteriurija. Urin je običajno brez bakterij in je zato dober pokazatelj bakterijske kolonizacije ali okužbe urinarnega trakta. Piurija pomeni, da so v urinu prisotne bele krvničke, kar nakazuje na okužbo in je vnetni odgovor urotelija na bakterije (Schaeffer in Schaeffer, 2007).

Cistitis je vnetje sečnega mehurja, pri katerem sluznica sečnega mehurja zaradi hudega vnetja močno oteče in pordeči. Pojavi se disurija, kar pomeni, da posameznik urinira pekoče ali ovirano (Schaeffer in Schaeffer, 2007).

Akutni pielonefritis je vnetje ledvičnega meha in ledvičnega parenhima. Bolezen spremljajo sledeči simptomi: vročina, bolečine v ledvenem predelu, bakteriurija in piurija, vse to pa je značilno za akutno bakterijsko infekcijo ledvic. Slednja lahko na ledvicah pusti brazgotine, kar povzroča atrofičen pielonefritis in tanjšanje renalnega korteksa (Schaeffer in Schaeffer, 2007).

Okužbe urinarnega trakta so pogoste in prizadenejo tako moške kot ženske v vseh starostnih skupinah. So vzrok obolenja in se lahko končajo s smrtnih izidom. Čeprav je urinarni trakt običajno brez naseljenih bakterij, lahko bakterije pridejo iz črevesja in povzročajo okužbo. Ko se poveča virulenca bakterij ali pa se zmanjša odpornost gostitelja, lahko pride do kolonizacije in okužbe urinarnega trakta. V večini primerov se ta okužba pozdravi, seveda pa je za to potrebna pravilna diagnoza in ustrezno zdravljenje. Pogosto je kolonizacija mehurja asimptomatska, lahko pa se pojavijo resni simptomi kot so vročina, mrzlica in bolečina v ledvenem predelu. Okužba lahko vodi do bakterimije, seapse in smrti (Schaeffer in Schaeffer, 2007).

Okužbe urinarnega trakta so rezultat interakcije med uropatogenom in njegovim gostiteljem. Uspešna okužba je odvisna od virulentnih dejavnikov bakterije, velikosti inokuluma in delovanja gostiteljevega obrambnega sistema. Okužba je možna po različnih poteh. Večina bakterij vstopi v urinarni trakt iz črevesnega rezervoarja preko sečnice do mehurja. Pri tem je izredno pomembna sposobnost adhezije. Ta pot je še posebej pogosta pri pacientih s katetri in ženskah, ki uporabljajo spermicide. Infekcija lahko doseže ledvice

in pride do pielonefritisa. Zaradi refluksa urina se lahko bakterije vzpenjajo iz mehurja do ledvic (Schaeffer in Schaeffer, 2007).

Hematogena pot je nepogosta pri zdravih osebah. Pojavi se lahko pri pacientih z bakteremijo, ki jo povzroča *Staphylococcus aureus* v ustni votlini, ali pri okužbah s *Candida fungemio* (Schaeffer in Schaeffer, 2007).

Limfatična pot se pojavi v nenavadnih primerih, ko pride do resnega vnetja črevesja ali abscesov (Schaeffer in Schaeffer, 2007).

### **2.3.1 Patogeni urinarnega trakta**

Večino okužb povzročajo fakultativni anaerobi, ki običajno izvirajo iz črevesne flore. Bakterije in glive, kot so *Staphylococcus epidermidis* in *Candida albicans* izvirajo iz vaginalne flore ali kože in lahko povzročajo okužbe urinarnega trakta (Kennedy in sod., 1965).

*E. coli* (UPEC) je najbolj pogosta povzročiteljica okužb urinarnega trakta in sicer pri 85 % okužb iz zunajbolnišničnih okolij in pri 50 % bolnišnično pridobljenih okužbah. Za večino preostalih okužb urinarnega trakta so odgovorne druge po Gramu negativne enterobakterije npr: *Proteus* spp. in *Klebsiella* spp. ter po Gramu pozitivne *E. faecalis* in *Staphylococcus saprophyticus*. Bolnišnične okužbe povzročajo *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia* spp., *E. faecalis* in *S. epidermidis* (Kennedy in sod, 1965).

## **2.4 VIRULENTNI DEJAVNIKI**

### **2.4.1 Adhezini**

Sposobnost pritrditve na čvrste površine je lastnost mnogih patogenih mikroorganizmov (po Gramu negativne in pozitivne bakterije, glive, protozoji in virusi). S pritrditvijo na gostiteljeve strukture bakterije preprečijo, da bi jih odnesle telesne tekočine (kri, urin, vsebina črevesja), ki zapuščajo telo. Tako je pritrditev prvi in nujno potreben korak za kolonizacijo gostiteljevih sluzničnih površin in je pogosto zato tudi začetek okužbe (Johnson, 1991).

Glede na pogostost pojavljanja adhezinov v sevih UPEC lahko fimbrije tipa 1 uvrstimo na prvo mesto, saj je nukleotidno zaporedje gena *fimH* prisotno pri 97 % sevov. Tudi fimbrije tipa P so pogoste, *papC* gen je prisoten pri 49 %. Fimbrije S se pojavljajo redkeje in sicer pri 24 % sevov. Glede na porazdeljenost v filogenetskih skupinah so fimbrije tipa 1 prisotne v vseh skupinah enako, *papC* zaporedja so prav tako prisotna v vseh skupinah, vendar so bolj pogoste v skupini B2. Podobno je tudi pri fimbrijah tipa S (Starčič Erjavec in Žgur Bertok, 2011).

#### 2.4.1.1 Fimbrije tipa 1

Fimbrije tipa 1 imajo premer 7 nm in dolžino 0,5-2  $\mu$ m. Sestavljajo jih ponavljajoče se podenote, ki se povezujejo v vijačnico s 3 in 1/8 podenote na obrat (Johnson, 1991). Geni, ki kodirajo proteine za proizvodnjo fimbrij tipa 1 imenujemo geni *fim*. Ti niso prisotni samo pri sevih, ki povzročajo urinarne okužbe, ampak so del genoma pri skoraj vseh sevih *E. coli* (Marrs in sod., 2005). Izražanje genov *fim* je uravnano na nivoju transkripcije. Promotor za prepis strukturne podenote *fimA* in drugih genov potrebnih za nastanek fimbrij, se nahaja na delu genoma, ki se lahko obrača. V odvisnosti od orientacije elementa je prepis genov vklopljen (ON) ali izklopljen (OFF). Pri orientaciji ON je promotor usmerjen tako, da omogoča prepis genov, medtem ko je pri orientaciji OFF promotor obrnjen v drugo smer in zato izražanje genov ni možno. Obračanje promotorja omogočata rekombinazi FimB in FimE. Gunther in sod. so opazili, da bakterije *E. coli* med okužbo urinarnega trakta spreminjajo svojo površino, tako da v določenem trenutku imajo fimbrije oz. jih nimajo. Zato so predlagali, da je sposobnost spremembe orientacije elementa, že samo po sebi virulentni dejavnik (Gunther in sod., 2002). FimH je kritični faktor pri kolonizaciji mehurja in ohranjanju bakterije v urinarnem traktu. Vezava bakterije s FimH vodi v aktivacijo obrambe gostitelja in luščenje epitelijskih celic, kar aktivira vnetni odziv. *E. coli* se lahko temu odzivu izogne tako, da se umakne v epitelij. To je proces, ki ga prav tako omogoča FimH (Hung in sod., 2002).

#### 2.4.1.2 Fimbrije tipa P

Fimbrije tipa P so eden najboljše poznanih virulentnih dejavnikov in omogočajo pritrditev na antigene P krvne skupine uroepitelnih celic (Marrs in sod., 2005). Fimbrije so široke 6,8 nm in jih sestavljajo podenote PapA, ki tvorijo cilinder. Podenota PapH deluje kot

sidro in veže fimbrijo v zunanjo membrano. Na konici fimbrije, ki je široka 2 nm, se nahaja adhezin PapG v stiku s drugimi podenotami PapE, PapF in PapK. PapG prepozna glikolipidne receptorje, ki se nahajajo na eritrocitih in ledvičnih gostiteljskih celicah. Zato so fimbrije tipa P in še posebej adhezin PapG pomembni virulentni dejavniki in jih povezujejo z nastankom pielonefritisa. PapG se lahko veže tudi na surfaktantom podobne delce, ki jih izločamo ljudje. Ta sposobnost naj bi sevom UPEC omogočila, da vzpostavijo rezervoar znotraj črevesne sluznice. To bi lahko bil mehanizem perzistence uropatogenov v črevesju in hkrati vzrok za ponavljajoče se okužbe. Glikolipidni receptor za adhezin PapG se imenuje globotriazilceramid (GbO3) in ga sestavlja digalaktozidno jedro, ki je preko beta-glukoze povezano na ceramidno skupino. Slednja zasidra receptor v membrano. Spremembe v digalaktozidnem jedru z dodajanjem N-acetilgalaktozamina tvori receptor GbO4 in GbO5. Tako poznamo tri različne različice PapG, ki jih imenujemo GI, GII in GIII, ki prepoznajo GbO3, GbO4 in GbO5. PapGII je po homologiji podoben FimH (Mulvey, 2002).

Pri iskanju receptorjev na uroepitelnih celicah, na katere se vežejo sevi UPEC, so odkrili, da večina sevov z adherenco aglutinira človeške eritrocite tako, da se vežejo na antigene krvne skupine P. Po tem so fimbrije tudi dobile ime. Antigeni krvne skupine P so družina oligosaharidov, ki so prisotni na določenih celicah sesalcev (Johnson, 1991).

#### 2.4.1.3 Fimbrije tipa S in fimbrije tipa F1C

Fimbrije S in fimbrije F1C so sorodne adhezinske molekule, ki jih tvorijo nekateri sevi, ki povzročajo okužbe urinarnega trakta. Ime fimbrij tipa S izvira iz specifičnosti vezave terminalnih sialil-galaktoznih ostankov. Za izražanje fimbrij S je značilna fazna variacija. Njihova vezavna mesta so na epiteljskih celicah v proksimalnih in distalnih tubulih, na renalnem intersticiju in na renalnem vaskularnem endoteliju. V številnih živalskih modelih so fimbrije S povezane z virulenco in povzročajo okužbe urinarnega trakta. Pri človeku pa so jih bolj povezovali z meningitisom in bakteriemijo (Johnson, 1991).

Fimbrije S se vežejo na sialil galaktozidne enote glikoproteinov na celični površini. Tako kot drugi dejavniki za adherenco, se tudi S fimbrije ne izražajo konstantno in so močno regulirane z okoljskimi signali kot so temperatura, ozmolarnost in pogoji za rast. Fimbrije

S in F1C so na genetskem nivoju močno sorodne, saj so njihova nukleotidna zaporedja homologna (Sokolowska in sod., 1997).

#### 2.4.1.4 Afa/Dr

Družino adhezinov Afa/Dr sestavlja 13 adhezinov, ki so lahko fimbriálni ali nefimbriálni. Vezavo in vdor bakterije *E. coli* v epitelne celice omogočata virulentna dejavnika Dra/AfaE in Dra/AfaD. Receptor za adhezin je beljakovina DAF (ang. »decay accelerating factor«), ki ščiti tkivo gostitelja pred komplementom in njegovo citotoksično aktivnostjo. Dra/AfaE se veže na DAF in lahko preide v epiteljsko celico. Dra/AfaD se veže na  $\beta 1$  integrin (Wroblewska-Seniuk in sod., 2005).

### 2.4.2 Toksini

Toksini so pomembni virulentni dejavniki pri številnih boleznih, ki jih povzroča *E. coli*. Proizvodnja toksinov pri kolonizaciji *E. coli* lahko povzroči vnetni odziv, kar povzroča simptome značilne za bolezen. Najpomembnejši virulentni dejavnik, ki ga *E. coli* izloča v okolje in povzroča uropatogene spremembe je lipoprotein alfa-hemolizin. Povezujemo ga z pielonefritisom (Johnson 1991).

#### 2.4.2.1 Alfa-hemolizin

Približno 50 % sevov *E. coli*, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe pri ljudeh, izloča citolizin imenovan hemolizin. Ta na krvnem agarju povzroča beta-hemolizo, kakor imenujemo značilno cono razgradnje eritrocitov okoli bakterijskih kolonij (Eberspächer in sod., 1989). Hemolizin je toksin, ki pri gostiteljevih celicah povzroča pore in spada v skupino toksinov, ki so pogosti pri po Gramu negativnih patogenih. Glede na njegovo koncentracijo ima različne učinke. Pri večjih količinah lahko lizira eritrocite in gostiteljeve celice, kar patogenu omogoča prehod preko sluznice in obrambo pred imunskimi celicami, hkrati pa poškodba celic zagotavlja dostop do gostiteljevih hranil in železa. Pri nizkih koncentracijah lahko hemolizin inducira apoptozo tarčnih gostiteljevih celic, kot so nevtrofilci in limfociti T pa tudi ledvičnih celic. Toksin prav tako inducira nihanje kalcijevih ionov v ledvičnem epiteliju, kar poveča proizvodnjo interleukinov IL-6 in IL-8. Hemolizin naj bi v veliki meri povzročal brazgotinjenje ledvic neodvisno od vezavnih sposobnosti bakterije (Bien in sod., 2011).

#### 2.4.2.2 Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik

Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik tipa 1 (CNF-1) je toksin, ki ga proizvaja 1/3 vseh sevov, ki povzročajo pielonefritis. Velik je 115 kDa in sodi v skupino A-B toksinov s katalitično domeno A, ki se nahaja na C-terminalnem delu, in vezavno domeno B na N-terminalnem delu. CNF-1 deluje na epitelijske ali endotelijske celice in monocite/makrofage preko aktivacije treh proteinov iz družine Rho majhnih gvanozin 5-trifosfat (GTP)-vezavnih proteinov: RhoA, Rac1 in Cdc42 (Kouokam in sod., 2006). Slednji vplivajo na celično obliko preko regulacije aktinskega-miozinskega citoskeleta, kar vodi v nastanek velikih večjedrnih celic (Hofman in sod., 2000).

#### 2.4.2.3 Uropatogeni specifični protein

Leta 2000 so Kurazono in sodelavci objavili raziskavo, kjer so opisali otok patogenosti *PAI<sub>usp</sub>*, ki je pogost pri sevih UPEC. V otoku se nahaja gen, ki je dolg 1038 bp in kodira 346 AK dolg protein. Poimenovali so ga uropatogeni specifični protein (*Usp*). Prisotni so še dodatni odprti bralni okvirji *orfU1-3*, ki kodirajo proteine dolge 98, 97 in 96 AK. Nadalje jih označujemo kot *imu1-3*. *PAI<sub>usp</sub>* je prisoten v izolatih *E. coli*, ki povzročajo okužbe urinarnega trakta (Kurazono in sod., 2000). Veliko je virulentnih dejavnikov, ki so povezani z urinarnimi okužbami, vendar so Yamamoto in sodelavci ugotovili, da je *Usp* med uropatogenimi izolati bolj pogost kot drugi virulentni dejavniki in da je specifičen za uropatogene serotipe skupin O1, O6, O16, O18 in O75, ki so prisotni tudi v fecesu zdravih posameznikov. Tako lahko sklepamo, da je človekova črevesna flora rezervoar za uropatogene seve *E. coli* (Yamamoto in sod., 2001).

Analize DNK so pokazale, da je *PAI<sub>usp</sub>* del 4167 bp velikega fragmenta, ki je vstavljen v intergensko DNK seva K12 med genoma *aroP* in *pdhR*. Slednja gena sta potrebna za normalno delovanje celice. Analiza sestave baz nakazuje, da je otok horizontalno prenešana DNK tujega izvora. Nukleotidno zaporedje med genoma *aroP* in *usp* ima motiv GGGG – ACGTTAAG, ki je prisoten tudi pri transpozonih iz družine Tn3. Pri slednjih je med GGGG in ACGTTAAG običajno 26 nukleotidov, kjer se nahaja ohranjeno zaporedje ACGAAAA. Pri otoku patogenosti to zaporedje ni ohranjeno, motiv pa prekinja 44 nukleotidov. Na vsaki strani *PAI<sub>usp</sub>* se nahaja ponovitev ACAT, kar nakazuje da gre za ponovitev nastalo ob vstavitvi fragmenta. Te lastnosti nakazujejo, da je otok patogenosti

mobilni element podoben transpozonom, četudi na otoku ni zapisa za protein, ki bi bil podoben transpozazu. Otok so UPEC sevi pridobili nedavno, saj je G+C vsebnost nižja kot v ostalih delih genoma (Nakano in sod., 2001). Pred genom je zaporedje nukleotidov, ki ustreza Shine-Dalgarno (SD) zaporedju in je pomembno za učinkovit začetek translacije pri prokariontih (AGAAGC). Prav tako sta prisotni mesti -10 in -35, ki sta promotorja. Nahajata se 274 bp pred začetkom kodirajoče regije. Tudi dodatni odprti bralni okvirji *imu1-3* imajo pripadajoče neodvisne SD sekvence (Kurazono in sod., 2000).

Navzdol od gena *usp* so 3 majhni odprti bralni okvirji *imu1*, *imu2* in *imu3*. Prepisujejo se v isti smeri kot *usp*. Ne kodirajo znanih proteinov, vendar so si zaporedja med seboj podobna. AK zaporedja na C-terminalnem koncu omenjenih treh proteinov so identična. Nekateri sevi nimajo vseh treh genov imunosti zato je *PAI<sub>usp</sub>* krajši. Na tem območju torej pogosto pride do preurejanja, temu je podvržen tudi 3'-konec gena *usp* (Nakano in sod., 2001).

Primerjava nukleotidnih zaporedij gena *usp* z nukleotidnim zaporedjem endonukleaznih bakteriocinov je razkrila domeno podobno DNazi. S primerjavo teh domen lahko *usp* ločimo v 2 skupini in sicer *uspI* in *uspII* (Parret in De Mot, 2002). *UspI* je povezan z *imu1*, *uspII* pa je v neposredni bližini *imu2*. Lahko namreč sklepamo, da je Imu1 imunski protein UPEC sevov, ki proizvajajo UspI bakteriocine, medtem ko Imu2 varuje celico pred bakteriocini UspII. Na podlagi raznolikosti gena *usp* in mozaične strukture samega otoka patogenosti, so Kanamaru in sodelavci razdelili *usp<sup>+</sup>* seve v podskupine: Ia, Ib, IIa in IIb (Kanamaru in sod., 2006).

Primerjava AK zaporedja proteina Usp z zaporedji poznanih bakteriocinov z endonukleazno aktivnostjo je pokazala 40–45 % podobnost C-terminalne domene z DNazno domeno S-pyocina AP41 (Perret in De Mot, 2002). Piocini so velika in heterogena skupina proteinov, poznani tudi pod imenom bakteriocini. Proizvajajo jih sevi *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteriocini so ribosomalno sintetizirane protimikrobne molekule, ki jih bakterije izločajo zato, da uničijo seve iste ali sorodne bakterijske vrste. Piocini tipa S so kromosomsko kodirani bakteriocini in so po funkciji in strukturi podobni bakteriocinom, ki jih proizvaja *E. coli* – nukleazni kolicini. Oboji nastajajo kot proteinski kompleksi, sestavljeni iz proteina z nukleazno aktivnostjo in proteina imunosti. Zapis za

slednjega se običajno nahaja blizu bakteriocinskega gena, protein pa zaščiti producenta pred lastnim bakteriocinom. Protein imunosti se neposredno veže na bakteriocin in oblikuje trden kompleks, ki ostane stabilen tudi po tem, ko se izloči iz celice v okolje. Pri piocinih tipa S je N-terminalni del vpleten v prepoznavanje receptorja, sledita mu translokacijska domena in DNazna domena, ki je hkrati tudi vezavna domena za imunski protein (Riley, 1998).

Z analizo AK zaporedja so zasledili tudi endonukleazni motiv H-N-H v C-terminalni regiji. Takšen motiv je prisoten tudi pri C-terminalni domeni DNaznih kolicinov in piocinov tipa S. Pred DNazno domeno je potencialna translokacijska domena, ki je v 35 % podobna enaki domeni S-piocinov. N-terminalna regija proteina Usp ni homologna nobenemu znanemu proteinu. Nukleotidno zaporedje navzgor od gena *usp* nakazuje N-terminalni podaljšek proteina, ki ima motiv podoben proteinom Hcp. Primer je s hemolizinom koreguliran protein *Vibrio cholerae*, ki ga bakterija izloča v okolje (Perret in De Mot, 2002).

Proteini, ki jih kodirajo geni *imu1-3*, imajo ohranjeno regijo podobno imunskim proteinom nukleaznih bakteriocinov. Podobnost med sekvencami je 40–50 % (Perret in De Mot, 2002).

Thura Zaw in sodelavci so potrdili, da ima Usp nukleazno aktivnost in povzroča nespecifično razgradnjo DNK. Usp je torej nukleaza, podobna drugim bakteriocinom. Hkrati so pokazali, da ima kompleks Usp proteina in imunskega proteina Imu1 nižjo nukleazno aktivnost. To nakazuje na možnost, da je Imu1 dejansko protein imunosti in varuje celico pred toksičnim proteinom UspI. Tako je velika verjetnost, da za imunost proteina Imu2 in Imu3 nista pomembna, vsaj ne v primeru UspI proteina. Za njegovo nukleazno aktivnost je pomemben H-N-H motiv, vendar Usp nima regije, ki bi bila podobna domeni za prepoznavanje bakterijskega receptorja. Ta je nujna za vezavo proteina na specifičen receptor na membrani tarčne bakterijske celice. Te specifične interakcije med prepoznavno domeno in receptorjem so pomembne za ozek spekter vpliva bakteriocinov. Znotraj skupine bakteriocinov z nukleazno aktivnostjo imajo slednji različno aktivnost proti RNK. Nekateri jo razgrajujejo, medtem ko drugi nimajo aktivnosti. Prost protein Usp ne vpliva na ssRNK (Thura Zaw in sod., 2013).

Nipič in sodelavci so pokazali, da so tarča proteina Usp celice sesalcev, saj vpliva na njihovo viabilnost in metabolizem. Očiščen protein povzroča morfološke spremembe, celice postanejo okrogle, membrana pa nabrekne. Takšen rezultat je še posebej očiten pri izpostavljanju Usp in proteinu Imu3. Tudi kombinacije Usp z drugimi proteini Imu so povzročili genotoksične okvare in prerazporeditve aktina v sesalskih celicah HUVEC ter HEK293. DNazna aktivnost Usp vodi v proces apoptoze. Predpostavljajo, da Imu3 služi za vezavo na DNK in je nujen za optimalno toksičnost Usp, medtem ko Imu1 in Imu2 ščitita bakterije producentke. Otok patogenosti *PAI<sub>usp</sub>* torej kodira novo vrsto genotoksina, ki se pogosto pojavlja pri uropatogenih sevih *E. coli* in sevih, ki pozročajo ulcerativni kolitis (Nipič in sod., 2013).

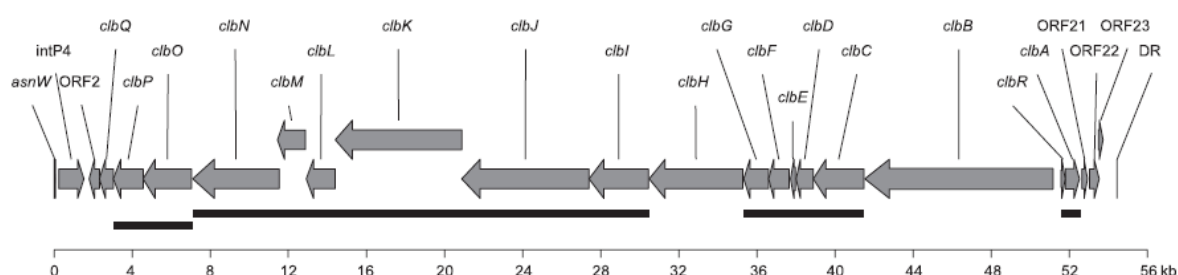
Proteini imunosti imajo dvohistidinsko regijo, ki bi lahko inaktivirala DNazno aktivnost proteina Usp. Ker pa obstajajo tudi sevi, kjer v otoku patogenosti ni vseh imunskih proteinov, sklepamo, da vsi niso nujni za varovanje celice producentke. Torej je mehanizem, ki varuje bakterijo, drugačen od tistega pri kolicinih. Črnigoj in sodelavci so pokazali, da se Imu1 veže na DNK in RNK, medtem ko se Imu2 in Imu3 ne vežeta. Tako bi lahko Imu1 z vezavo na DNK preprečil poškodbe genetskega materiala v celici producentki (Črnigoj in sod., 2014)

#### 2.4.2.4 Otok patogenosti poliketid sintaza (*pks*) in kolibaktin

Raznolikost virulentnih dejavnikov, ki jih lahko ima bakterija *E. coli*, pripomore k temu, da je kot patogen izredno vsestranska. Posebno pomembni dejavniki so tisti, ki vplivajo na osnovne funkcije v celicah gostitelja. Nougayrede in sodelavci so odkrili, da lahko določeni sevi *E. coli* povzročijo megalocitozo v kulturah evkariontskih celic. Celica in jedro se pri tem močno povečata, ne poteče pa mitotična delitev. Omenjeni citopatološki učinek so odkrili po okužbi različnih sesalskih celic (HeLa, CHO, A375 in IEC-6) s patogenimi sevi *E. coli*, ki so jih izolirali iz pacientov z meningitisom in okužbami urinarnega trakta. Prav tako so podobne posledice pustili določeni komenzalni sevi, medtem ko laboratorijski sev K-12, enterohemoragični in enteropatogeni sev *E. coli* niso imeli citopatološkega učinka. Slednji je odvisen od kontakta bakterije s celico in se ni pojavil, če so bila le-te ločene od kulture s prepustno membrano (Nougayrede in sod., 2006).

Ob analizi genoma *E. coli* so odkrili regijo, vstavljeno v *asnW tRNK* lokus, z lastnostmi genomskega otoka. Z analizo PCR so potrdili, da se omenjeni otok nahaja samo v sevih *E. coli* filogenetske skupine B2. 54-kb velik genski otok so poimenovali *pks* in kodira mehanizem za sintezo peptid-poliketid hibridnih snovi. Mehanizem sestavljajo tri neribosomalne peptid megasintaze (NRPS), tri poliketid megasintaze (PKS), dve hibridni NRPS/PKS megasintazi ter devet dodatnih urejevalnih encimov. NRPS in PKS so veliki multifunkcionalni encimi prisotni pri bakterijah in glivah, sintetizirajo pa veliko različnih peptidov in poliketidov, ki se razlikujejo tako strukturno, kot tudi glede na biološko aktivnost. S sistematičnimi mutacijami so dokazali, da so za citotoksičnost potrebni prav vsi encimi, saj kodirajo poliketid-peptidni hibridni citotoksin-kolibaktin, ki naj bi bil direktno odgovoren za citopatološki učinek, in povzroča poškodbe DNK. (Nougayrede in sod., 2006).

Za sintezo kolibaktina so potrebni vsi geni v otoku *pks*. Uspešna sinteza zahteva urejeno izražanje otoka patogenosti *pks*. Pri tem se nekateri geni prepišejo skupaj v policistronsko mRNK. Homburg in sodelavci so odkrili 7 transkripcijskih enot. Skupaj se v mRNK prepisujejo geni od *clbI* do *clbN* za NRPS, PKS, amidazo (ClbL) in ClbM (efflux črpalka). Drugi največji policistron vsebuje gene *clbC* do *clbG*. Ti geni dopolnjujejo PKS/NRPS proteinski sistem (ClbC in ClbE) ali pa so urejevalni encimi (ClbD in ClbF). Skupaj se prepisujeta tudi gena *clbO* in *clbP* ter *clbA* in *clbR*. Gen *clbA* kodira fosfopanteteinil transferazo in je regulatorni protein, ki po translaciji aktivira PKS in NRPS. Ostali geni (*clbQ*, *clbH*, *clbB*) se izražajo monocistronsko. Intergenske regije so kratke (Homburg in sod., 2007).



**Slika 1:** Shematski prikaz otoka patogenosti *pks* (Homburg, 2007).

Ob okužbi z *E. coli pks+* so se celice sesalcev prenehale deliti na prehodu iz faze G2 v M fazo. V fazi G2 se lahko delitev ustavi, če pride do poškodbe DNK. Aktivira se serin/treonin proteinska kinaza (ang. »ATM – Ataxia telangiectasia mutated protein«), ki je osrednji protein pri odgovoru na poškodovano DNK. Ob okužbi pride do fosforilacije histonov H2AX, ki je marker za prelom obeh vijačnic DNK (Nougayrede in sod., 2006).

Okužba z velikim številom bakterij *E. coli pks+* povzroči nepovraten zastoj celičnega cikla in vodi v apoptozo. Če pa so celice izpostavljene nižjemu številu bakterij, pride do zmernih poškodb DNK, ki jih celica lahko popravi, celični cikel pa se lahko nadaljuje. Kljub temu lahko nekatere poškodbe DNK ostanejo nepopravljene, kar čez čas sproži kronično nestabilnost kromosoma (Cuevas-Ramos in sod., 2010). Celice kažejo znake celične senescence. Postanejo velike in ploščate, hkrati pa se poveča izražanje  $\beta$ -galaktozidaze, ki je povezana s senescenco (Sal- $\beta$ -Gal). Aktivirajo se signali za poškodovano DNK, spremenjena pa je aktivnosti določenih kinaznih inhibitorjev, ekspresija citokinov, rastnih faktorjev ter proteaz. To vodi v preoblikovanje heterokromatina, kot je značilno za senescenco. Tak odgovor celice lahko nato hitro vodi v nastanek rakavih celic, vsekakor pa se pospeši njihovo staranje (Secher in sod., 2013).

### **2.4.3 Izogibanje imunskemu sistemu**

Patogeni mikrobi se izogibajo imunskemu sistemu gostitelja s pomočjo široke palete virulentnih dejavnikov. To so lahko polisaharidne kapsule, proteini za odpornost na serum in snovi, ki vplivajo na imunski sistem.

#### **2.4.3.1 Kapsula**

Kapsula je polisaharid, ki obdaja zunanost celice, bakteriji pa omogoča, da se izogne ali upira imunskemu sistemu. Patogen je tako zavarovan pred opsonizacijo in komplementom, s tem pa je preprečen propad bakterije. Kislinška kapsula celo varuje celico tako, da nevtralizira protimikrobne peptide. Skoraj vsi UPEC sevi imajo polisaharidno kapsulo tipa K. Večina UPEC sevov izraža kapsule skupine 2 ali 3 in antigene K tipa: K1, K5, K30 in K92 (Johnson, 1991).

#### 2.4.3.2 TraT

TraT je protein, pomemben pri prenosu plazmidov F in se nahaja na površini celice. Pripomore tudi k povečanju odpornosti na serum. Odkrili so, da je prisoten pri 57 % UPEC sevov (Starčič Erjavec in Žgur Bertok, 2011).

#### 2.4.3.3 TcpC

Patogeni mikroorganizmi povečajo svojo virulenco in možnost preživetja v gostitelju tako, da se upirajo mehanizmu obrambe gostitelja. Eden izmed teh mehanizmov je kapsulacija, ki prepreči protitelesom in komplementu, da bi uničili celico, s tem pa omogoča invazivno okužbo možganov in respiratornega trakta. Tudi antigenski premik je primer obrambe, ki so ga razvili mikroorganizmi, da bi lahko prešli obrambni mehanizem in tako preživeli v gostitelju. Prelisičenje imunskega odziva je izjemno pomembno za preživetje v prvi fazi okužbe, saj se lahko bakterije izognejo takojšnji odstranitvi in lahko vzpostavijo kritično populacijo za okužbo (Cirl in sod., 2008).

Tollu podobni receptorji (TLR) so ključni senzorji pri mikrobnem napadu in dirigirajo obrambni mehanizem proti napadalcem. Signaliziranje aktivira vnetni odziv, začnejo se izločati tumor nekrotični dejavnik (TNF), interferoni tipa I in II (IFN) in kemokini, ki privabljajo vnetne celice na mesto okužbe. Tako je TLR ključen tudi za obrambo pred uropatogenimi *E. coli* (Yadav in sod., 2010). Christine Cirl je s sodelavci prikazala, da patogeni inhibirajo TLR, tako da izločajo strukturne homologe človeške signalne domene TLR (Cirl in sod., 2008).

Pri človeku poznamo 10 TLR-jev in njihove ligande. Tako je npr. lipopolisaharid (LPS) prepoznan s strani TLR4, TLR2, TLR1 ali TLR6, ki prepoznajo še številne druge bakterijske komponente kot so peptidoglikan, lipopeptidi in lipoproteini. TLR3 prepozna dvo-verižno RNK, ki nastaja med pomnoževanjem virusov. Receptor TLR je sestavljen iz ponovitev bogatih z leucinom, ki se nahajajo zunaj celice in so odgovorni za prepoznavanje patogenov, ter transmembranske in citoplazemske Toll/interlevkin-1 receptorske (TIR) domene, ki je potrebna za prenos signala v celico. Vse signalne poti, ki potekajo preko TLR-jev, vodijo v aktivacijo jedrnega faktorja NF-KB in aktivacijskega proteina-1 (AP-1). NF-KB je dimeričen transkripcijski faktor. Pri nestimuliranih celicah se v neaktivni obliki nahaja v citoplazmi in je povezan z inhibitorjem IKB. Ob stimulaciji s

TLR ligandi so inhibitorji fosforilirani in s tem označeni za razgradnjo, kar sprosti NF-KB v jedro, kjer se lahko veže na KB vezavno mesto v DNK. Hkrati se aktivira signalna pot MAP kinaze, ki fosforilira in aktivira AP-1. NF-KB in AP-1 uravnavata vnetni odziv, saj aktivirata sintezo vnetnih mediatorjev – citokinov (Kawai in Akira, 2006).

Ker imajo TLR ključno vlogo pri obrambi gostitelja, imajo mikroorganizmi mehanizme za vmešavanje v TLR obrambni sistem. Bowie in sodelavci so leta 2000 odkrili, da proteina A46R in A52R iz virusa vakcinija interagirata z različnimi komponentami znotraj signalne poti, predvsem s kinazami (Bowie in sod., 2000). Prav tako so Newman in sodelavci odkrili TIR-podoben protein pri *Salmonelli enterici*, ki oslabi aktivacijo NF-KB s strani TLR in MyD88 ter s tem poveča znotraj celično akumulacijo bakterij (Newman in sod., 2006).

Cirl in sod. so leta 2008 pri pregledu genoma bakterije *E. coli* CF073, ki povzroča urinarne okužbe, odkrili gen, ki kodira protein homologen TIR domeni človeškega receptorja TLR1. Imenovali so ga *tcpC*. Z analizo AK zaporedja so ugotovili, da se TIR domena nahaja na C-terminalni polovici proteina. Znotraj te domene se nahaja motiv imenovan Box1 in je pomemben za signaliziranje. Z epidemiološko študijo so ugotovili, da je *TcpC* povezan s sevi *E. coli*, ki povzročajo človeške bolezni, prav tako pa *TcpC* poveča bakterijsko breme in s tem poškodbe tkiva v mišjem modelu. *TcpC* tudi poveča zmožnost bakterij za znotrajcelično akumulacijo. Vpliva na signalizacijo TLR, saj jo oslabi, s tem pa prepreči izločanje vnetnih citokinov. Interagira z MyD88, kar prepreči prenos signala in aktivacijo vnetnega odziva. To pomeni, da je *TcpC* samostojen virulentni dejavnik, ki ga bakterija izloča, gostiteljska celica pa prevzame. Protein je primer molekularne mimikrije in ena redkih molekul, ki vpliva na TLR signalizacijo in s tem na prirojeni imunski odziv gostitelja (Cirl in sod, 2008)

Da je *TcpC* klinično pomemben virulentni dejavnik, dokazuje dejstvo, da je prisoten v sevih *E. coli*, ki so jih izolirali iz otrok z akutnim pielonefritisom, medtem ko pri sevih izoliranih iz črevesne flore zdravih otrok skorajda ni prisoten. Prav tako je *TcpC* redek pri sevih, ki povzročajo blažje okužbe urinarnega trakta. Kako se *TcpC* izloča iz bakterijske celice, ni znano, vendar je velika verjetnost, da se to zgodi preko sistema izločanja tipa I. To pomeni, da *E. coli* vpliva na TLR signaliziranje že zunaj gostiteljske celice, saj

adherenca s fimbrijami ni nujna. Verjetno pa je, da fimbrije povečajo učinkovitost TcpC, ker je bakterija ob vezavi na celico bližje. Vsekakor je bakterija zmožna vplivati na gostiteljevo obrambo že preden pride v stik s sluznico. Na ta način pridobijo več časa za sintezo drugih virulentnih dejavnikov in si tako omogočijo preživetje (Cirl in sod., 2008).

## 2.5 MOLEKULA RNK

RNK je oznaka za ribonukleinsko kislino, ki se od DNK razlikuje v treh ključnih značilnostih: (i) RNK namesto deoksiriboze vsebuje ribozo, (ii) namesto timina vsebuje uracil, (iii) RNK ni dvoverižna, z izjemo pri nekaterih virusih. Poznamo tri glavne tipe RNK, ki so vpleteni v sintezo proteinov: nosilka informacije ang. »messenger RNA« (mRNK), prenašalna ang. »transfer RNA« (tRNK) in ribosomska RNK (rRNK). Obstajajo še številni drugi tipi, ki pa so večinoma vpleteni v uravnavanje izražanja genov. Vse te molekule nastanejo pri transkripciji DNK, kjer RNK polimeraza informacijo z gena prepiše v molekulo RNK. Slednje imajo različne naloge. Tako mRNK prenaša genetsko informacijo za sintezo proteina na ribosom, medtem ko je rRNK del strukture ribosoma, tRNK pa prenaša aminokisline za sintezo proteinov. Nekatere RNK molekule imajo encimsko aktivnost in jih imenujemo ribocimi. Življenjska doba RNK molekul je različna. V nekaj minutah celična ribonukleaza razgradi mRNK, medtem ko sta rRNK in tRNK bolj stabilni (Madigan in sod., 2012).

Sinteza molekule RNK je podobna sintezi DNK. Najprej mora RNK polimeraza prepoznati mesto za začetek transkripcije. Tega imenujemo promotor in ga prepoznajo sigma faktorji RNK polimeraze. Med podaljšanjem verige RNK se na 3'-OH konec riboze dodajajo ribonukleozid trifosfati. Molekula se podaljšuje v smeri 5'-3', za začetek transkripcije pa RNK polimeraza ne potrebuje začetnih oligonukleotidov (Madigan in sod., 2012).

### 2.5.1 Policistronska mRNK

Pri prokariotih so geni pogosto razporejeni v skupke-operone. RNK polimeraza gene operonov prepiše v eno, dolgo mRNK, ki jo imenujemo policistronska mRNK. Pri prevajanju v proteine na istem ribosomu nastanejo različni polipeptidi, saj ima mRNK več SD sekvenc, ki se nahajajo pred kodirajočim zaporedjem. Na ta način lahko ribosomi prevedejo več genov z iste mRNK (Madigan in sod., 2012).

Takšna mRNK zato kodira 2 ali več proteinov in se pojavlja izključno pri prokariontih in arhejah. Torej sama molekula vsebuje več odprtih bralnih okvirjev, vsak izmed teh pa se v procesu nastanka proteina prevede v en polipeptid. Policistronska mRNK ima določene značilnosti:

- 5'- vodilno sekvenco,
- kodirajoče regije, ki se vsaka začne z začetnim kodonom, kjer poteče translacija,
- včasih ima še 3'-terminalni rep,
- intercistronske regije: kodirajoče regije so lahko ločene z nekodirajočimi sekvencami.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Mikroorganizmi

Uporabili smo 105 izolatov *E. coli* iz bolnikov, ki so zboleli za bakteriemijo urinarnega trakta. Izolirani so bili na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete na Univerzi v Ljubljani. Bolniki so bili sprejeti na različnih oddelkih Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani med letoma 2000 in 2001. Sedaj so izolati del zbirke *E. coli*, Katedre za Molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Izmed 105. sevov smo za določanje podtipov PAI*usp* uporabili tiste, ki so jim že predhodno določili prisotnost gena *usp*. Takšnih sevov je bilo 36. Za vse seve v zbirki smo s PCR metodo določili še prisotnost gena *tcpC* in prisotnost otoka patogenosti *pks*.

##### 3.1.2 Mikrobna gojišča

###### 3.1.2.1 Priprava trdnih gojišč LB

Luria Bertanijevo gojišče je sestavljeno iz 0,5 % kvasnega ekstrakta, 1 % triptona in 1 % NaCl. Petindvajset g osnove za gojišče smo raztopili v 1 litru deionizirane vode ter dodali 15 g agarja. Mešanico smo sterilizirali v avtoklavu, 15 minut pri 121°C. Gojišče smo ohladili na 55 °C in ga razlili v plastične petrijevke.

###### 3.1.2.2 Priprava trdnih gojišč LB z dodanim antibiotikom

Petindvajset g osnove za gojišče smo raztopili v 1 litru deionizirane vode ter dodali 15 g agarja. Mešanico smo sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C. Gojišče smo ohladili na 55 °C nato sterilno dodali ampicilin (Amp) (100 mg/mL) in zmešali na mešalu. Gojišče smo nato razlili v plastične petrijevke in jih posušili v laminariju.

###### 3.1.2.3 Priprava tekočih gojišč LB

Petindvajset g osnove za gojišče LB smo raztopili v 1 litru deionizirane vode in raztopino razdelili v steklene epruvete po 5 mL ali prelili po 50 mL gojišča v 0,5 L erlenmajerice. Tako epruvete kot erlenmajerice smo avtoklavirali v avtoklavu, 15 minut pri 121 °C.

### 3.1.3 Kemikalije

**Preglednica 1:** Kemikalije uporabljene v raziskavi in njihov proizvajalec.

| Kemikalija                                                                                                                                                                               | Proizvajalec                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| LB (Luria-Broth medium)                                                                                                                                                                  | SIGMA Chemicals, St. Louis, Missouri, ZDA                    |
| Natrijev klorid                                                                                                                                                                          | Merck, Nemčija                                               |
| Agar                                                                                                                                                                                     | SIGMA Chemicals, St. Louis, Missouri, ZDA                    |
| Agaroza                                                                                                                                                                                  | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemčija                           |
| Etidijev bromid (10mg/mL)                                                                                                                                                                | SIGMA Chemicals, St. Louis, Missouri, ZDA                    |
| TBE                                                                                                                                                                                      | SIGMA Chemicals, St. Louis, Missouri, ZDA                    |
| Mastermix s <i>Taq</i> polimerazo                                                                                                                                                        | Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA               |
| Ampicilin                                                                                                                                                                                | Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA               |
| DNA-lestvica Lambda DNA PstI digest<br>(Velikost fragmentov v bp: 11501, 5077, 4749, 4507, 2838, 2556*, 2459, 2443, 2140, 1986, 1700, 1159 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 264, 247, ...) | Katedra za Molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov |
| Nanašalni elektroforezni pufer                                                                                                                                                           | Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA               |
| Glicerol                                                                                                                                                                                 | Polichimica, Bologna, Italija                                |
| Pufer TE                                                                                                                                                                                 | SIGMA Chemicals, St. Louis, Missouri, ZDA                    |
| Amonijev acetat                                                                                                                                                                          | Polichimica, Bologna, Italija                                |
| Kloroform/2-pentanol                                                                                                                                                                     | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemčija                           |
| Izopropanol                                                                                                                                                                              | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemčija                           |
| Etanol                                                                                                                                                                                   | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemčija                           |
| $\beta$ -merkaptetoetanol                                                                                                                                                                | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemčija                           |
| FastDigest™ Green reakcijski pufer                                                                                                                                                       | Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA               |

### 3.1.4 Oprema

**Preglednica 2:** Oprema uporabljena pri raziskavi in proizvajalec.

| Oprema                                | Proizvajalec                                              |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Aparat za PCR: My Cyler Thermal Cyler | Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, Kalifornija, ZDA     |
| Aparat za PCR: Biometra UNO II        | Biometra, Göttingen, Nemčija                              |
| Rotacijski stresalnik                 | Infors HT, Bottmingen, Švica                              |
| Avtomatske pipete                     | Eppendorf, Hamburg, Nemčija                               |
| Mikrocentrifugirke brez RNaz 1,5 mL   | Eppendorf, Hamburg, Nemčija                               |
| Tehtnica KERN PFB                     | Balingen-Frommern, Nemčija                                |
| Analitična digitalna tehtnica         | Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija                       |
| Namizna centrifuga Eppendorf 5424     | Eppendorf, Hamburg, Nemčija                               |
| Namizna centrifuga Eppendorf 5415R    | Eppendorf, Hamburg, Nemčija                               |
| Velika Centrifuga ROTINA 420          | Hettich AG, Bäch, Nemčija                                 |
| Laminarij                             |                                                           |
| UV luč 2011 Macrovue                  | LKB Bromma, Stockholm, Švedska                            |
| Elektroforeza 2301 Macrodrive 1       | LKB Bromma, Stockholm, Švedska                            |
| Vročna kopel Multi temp II            | Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, ZDA            |
| Ekonom lonec za avtoklaviranje        |                                                           |
| NanoDrop 1000                         | Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA |

### 3.1.5 Kompleti

**Preglednica 3:** Komercialno dostopni kompleti, ki smo jih uporabljali v raziskavi.

| Kompleti                                     | Proizvajalec                                              |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| CloneJET PCR Cloning Kit                     | Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, ZDA |
| TransformAid Bacterial Transformation Kit    | Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, ZDA |
| GeneJET Gel Extraction Kit                   | Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, ZDA |
| GeneJET Plasmid Miniprep Kit                 | Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, ZDA |
| QIAGEN RNeasy Mini Kit                       | QIAGEN, Venlo, Netherlands                                |
| High Capacity cDNA Reverse Transcription kit | Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA         |

### 3.1.6 Encimi

**Preglednica 4:** Encimi uporabljeni v raziskavi in proizvajalec.

| Encimi                                               | Proizvajalec                                              |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| DNaza                                                | Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, ZDA |
| RNaza                                                | Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, ZDA |
| Restriksijski encimi Fast Digest: EcoRI, PstI, HaeII | Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, ZDA |
| Proteinaza K                                         | Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, ZDA |
| Lizocim                                              | Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, ZDA |

### 3.1.7 Začetni oligonukletotidi

**Preglednica 5:** Začetni oligonukleotidi uporabljeni v reakcijah z verižno polimerazo.

| Začetni oligonukleotidi | Zaporedje (Proizvajalec : Macrogen, Amsterdam, Nizozemska) | Vir            |
|-------------------------|------------------------------------------------------------|----------------|
| USP81f                  | 5'-CGGCTCTTACATCGGTGCGTTG-3'                               | Kanamaru, 2006 |
| ORFU1r                  | 5'-TAGGATAGAAAATGAGATCTCC-3'                               | Kanamaru, 2006 |
| ORFU2r                  | 5'-CTCCTTGACTTTTAGGGTAGAA-3'                               | Kanamaru, 2006 |
| ORFU3r                  | 5'-TCTTTGCAGGATAGTAGATAAG-3'                               | Kanamaru, 2006 |
| Usp3f                   | 5'-GAAACCTCGTGTTGTGTTG-3'                                  | Volmajer, 2015 |
| IzvPI_R                 | 5'-TTTGTTACCCTTGTTTAAAGACTC-3'                             | Volmajer, 2015 |
| TcpC for                | 5'-GGCAACAATATGTATAATATCCT-3'                              | Cirl, 2008     |
| TcpR rev                | 5'-GCCCAGTCTATTTCTGCTAAAGA-3'                              | Cirl, 2008     |
| IHAPJPN42               | 5'-CAGATACACAGATACCATTC-3'                                 | Johnson, 2008  |
| IHAPJPN46               | 5'-CTAGATTATCCGTGGCGATTC-3'                                | Johnson, 2008  |
| IHAPJPN55               | 5'-TTATCCTGTTAGCTTTCGTTTC-3'                               | Johnson, 2008  |
| IHAPJPN56               | 5'-CTTGTATAGTTACACAACCTATTTTC-3'                           | Johnson, 2008  |
| Imm1f                   | 5'-<br>TTCTCGAGCTTTAAAGAAAAGCTCCAGGATTATAC-3'              | Volmajer, 2015 |
| Imm2f                   | 5'-<br>TTTCTGGAGCTATAATTTTAAAGATGAAATAG-3'                 | Volmajer, 2015 |
| Imm3f                   | 5'-<br>TTCTCGAGCTATATATGCATGATTTAAAATATAAAAT-3'            | Volmajer, 2015 |

### 3.1.8 Računalniški programi

**Preglednica 6:** Računalniški programi, ki smo jih uporabili pri analizi in predstavljanju nukleotidnih zaporedij.

| Računalniški programi     | Lastnik                              |
|---------------------------|--------------------------------------|
| Vector NTI Advance™ 11.0  | Invitrogen Corporation 2008          |
| Finch TV                  | Geospiza, Inc.                       |
| CLC Sequence Viewer 6.6.1 | CLC bio A/S, OIAGEN, Hilden, Nemčija |
| Clustal W                 | Conway Institute UCD Dublin          |

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprava lizatov

V epruvete s 5 mL gojišča LB smo nacepili seve *E. coli* iz zbirke in jih preko noči inkubirali na stresalniku. Mililiter prekonočne kulture smo odpipetirali v mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 minuto pri 15 000 obratih na minuto. Odstranili smo supernatant in s pipeto še preostalo gojišče. Pelet smo resuspendirali z 200 µL sterilne deionizirane vode. Mikrocentrifugirko smo prenesli v vročo kopel pri 100 °C za 10 minut in centrifugirali 10 minut pri 15 000 obratih na minuto. V svežo mikrocentrifugirko smo prenesli 150 µL supernatanta. Tako pripravljene lizate smo shranili na -20 °C in jih po potrebi uporabili za analize PCR.

### 3.2.2 Določanje gena *tcpC*

**Preglednica 7:** Reakcijska mešanica za določanje gena *tcpC*.

| Reakcijska mešanica                      | Volumen |
|------------------------------------------|---------|
| Začetni oligonukleotid 1 <i>tcpC</i> for | 0,2 µL  |
| Začetni oligonukleotid 2 <i>tcpC</i> rev | 0,2 µL  |
| PCR Master mix                           | 10 µL   |
| Destilirana voda                         | 10,6 µL |
| Celični lizat                            | 4 µL    |
| Skupaj                                   | 25 µL   |

**Preglednica 8:** Program PCR za preverjanje prisotnosti gena *tcpC*

|                      |       |         |     |
|----------------------|-------|---------|-----|
| Začetna denaturacija | 94 °C | 4,5 min | 1x  |
| Denaturacija         | 94 °C | 30 s    |     |
| Prileganje           | 60 °C | 30 s    | 25x |
| Pomnoževanje         | 72 °C | 1 min   |     |
| Končno pomnoževanje  | 72 °C | 5 min   | 1x  |

### 3.2.3 Določanje otoka patogenosti *pks*

**Preglednica 9:** Reakcijska mešanica za določanje genov *clbA* in *clbQ*.

| Reakcijska mešanica                | Volumen |
|------------------------------------|---------|
| Začetni oligonukleotid 1 IHAPJPN42 | 0,2 µL  |
| Začetni oligonukleotid 2 IHAPJPN46 | 0,2 µL  |
| Začetni oligonukleotid 1 IHAPJPN55 | 0,2 µL  |
| Začetni oligonukleotid 2 IHAPJPN56 | 0,2 µL  |
| PCR Master mix                     | 10 µL   |
| Destilirana voda                   | 10,2 µL |
| Celični lizat                      | 4 µL    |
| Skupaj                             | 25 µL   |

**Preglednica 10:** Program PCR za preverjanje prisotnosti genov *clbA* in *clbQ*.

|                      |       |         |     |
|----------------------|-------|---------|-----|
| Začetna denaturacija | 94 °C | 4,5 min | 1x  |
| Denaturacija         | 94 °C | 30 s    |     |
| Prileganje           | 57 °C | 30 s    | 30x |
| Pomnoževanje         | 72 °C | 1 min   |     |
| Končno pomnoževanje  | 72 °C | 10 min  | 1x  |

### 3.2.4 Subtipizacija PAI<sub>usp</sub>

**Preglednica 11:** Reakcijska mešanica za subtipizacijo PAI<sub>usp</sub>.

| Reakcijska mešanica 1                 |         | Reakcijska mešanica 2                 |         | Reakcijska mešanica 3                 |         |
|---------------------------------------|---------|---------------------------------------|---------|---------------------------------------|---------|
| Začetni<br>oligonukleotid<br>1 USP81f | 0,2 µL  | Začetni<br>oligonukleotid<br>1 USP81f | 0,2 µL  | Začetni<br>oligonukleotid<br>1 USP81f | 0,2 µL  |
| Začetni<br>oligonukleotid<br>2 ORFU1r | 0,2 µL  | Začetni<br>oligonukleotid<br>2 ORFU2r | 0,2 µL  | Začetni<br>oligonukleotid<br>2 ORFU3r | 0,2 µL  |
| PCR Master<br>mix                     | 10 µL   | PCR Master<br>mix                     | 10 µL   | PCR Master<br>mix                     | 10 µL   |
| Destilirana<br>voda                   | 10,6 µL | Destilirana<br>voda                   | 10,6 µL | Destilirana<br>voda                   | 10,6 µL |
| Celični lizat                         | 4 µL    | Celični lizat                         | 4 µL    | Celični lizat                         | 4 µL    |
| Skupaj                                | 25 µL   | Skupaj                                | 25 µL   | Skupaj                                | 25 µL   |

**Preglednica 12:** PCR program za subtipizacijo PAI<sub>usp</sub>.

|                      |       |        |     |
|----------------------|-------|--------|-----|
| Začetna denaturacija | 94 °C | 10 min | 1x  |
| Denaturacija         | 94 °C | 1 min  |     |
| Prileganje           | 55 °C | 1 min  | 5x  |
| Pomnoževanje         | 72 °C | 4 min  |     |
| Denaturacija         | 94 °C | 40 s   |     |
| Prileganje           | 60 °C | 40s    | 25x |
| Pomnoževanje         | 72 °C | 3 min  |     |
| Končno pomnoževanje  | 72 °C | 5 min  | 1x  |

### 3.2.5 Določanje genov imunosti *imu1* in *imu2* v genomu sevov *E. coli*

**Preglednica 13:** Reakcijska mešanica za preverjanje prisotnosti gena *imu1*.

| Reakcijska mešanica             | Volumen |
|---------------------------------|---------|
| Začetni oligonukleotid 1 Imm1f  | 0,2 µL  |
| Začetni oligonukleotid 2 ORFU2r | 0,2 µL  |
| PCR Master mix                  | 10 µL   |
| Destilirana voda                | 10,6 µL |
| Celični lizat                   | 4 µL    |
| Skupaj                          | 25 µL   |

**Preglednica 14:** Reakcijska mešanica za preverjanje prisotnosti gena *imu2*.

| Reakcijska mešanica             | Volumen |
|---------------------------------|---------|
| Začetni oligonukleotid 1 Imm3f  | 0,2 µL  |
| Začetni oligonukleotid 2 ORFU1r | 0,2 µL  |
| PCR Master mix                  | 10 µL   |
| Destilirana voda                | 10,6 µL |
| Celični lizat                   | 4 µL    |
| Skupaj                          | 25 µL   |

**Preglednica 15:** Program PCR za preverjanje prisotnosti genov imunosti *imu1* in *imu2*.

|                      |       |       |     |
|----------------------|-------|-------|-----|
| Začetna denaturacija | 94 °C | 5 min | 1x  |
| Denaturacija         | 94 °C | 30 s  |     |
| Prileganje           | 55 °C | 30 s  | 30x |
| Pomnoževanje         | 72 °C | 30 s  |     |
| Končno pomnoževanje  | 72 °C | 5 min | 1x  |

### 3.2.6 Pomnoževanje PAI<sub>usp</sub> za kloniranje

**Preglednica 16:** Reakcijska mešanica za pomnoževanje celotnega PAI<sub>usp</sub>.

| Reakcijska mešanica              | Volumen |
|----------------------------------|---------|
| Začetni oligonukleotid 1 Usp3f   | 0,3 µL  |
| Začetni oligonukleotid 2 IzvPI_R | 0,3 µL  |
| PCR Master mix                   | 25,8 µL |
| Destilirana voda                 | 25 µL   |
| DNK                              | 0,5 µL  |
| Skupaj                           | 50 uL   |

**Preglednica 17:** Program PCR za pomnoževanje celotnega PAI<sub>usp</sub> za kloniranje.

|                      |       |       |     |
|----------------------|-------|-------|-----|
| Začetna denaturacija | 94 °C | 5 min | 1x  |
| Denaturacija         | 94 °C | 30 s  |     |
| Prileganje           | 60 °C | 30 s  | 25x |
| Pomnoževanje         | 72 °C | 5 min |     |
| Končno pomnoževanje  | 72 °C | 5 min | 1x  |

### 3.2.7 Agarozna gelska elektroforeza

Uspešnost pomnoževanja in prisotnost željenih fragmentov smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Pripravili smo 0,8 % agarozni gel, za katerega smo v 30 mL 1x TBE raztopili 0,24 g agaroze. Mešanico smo raztopili v mikrovalovni pečici in rahlo ohladili na sobni temperaturi, nato pa smo dodali 2 µL etidijevega bromida (10mg/mL). Gel smo razlili na nosilec in počakali, da se strdi, nato smo ga dali v elektroforezno banjico in ga prelili z 1xTBE. V gel smo najprej nanесли lestvico, nato vzorce. Nanašalnega pufra ni bilo potrebno uporabiti, saj je ta že v PCR Master mixu. Elektroforeza je potekala pri napetosti 120 V.

Za velikostni standard smo uporabili lestvico Lambda DNA *PstI* digest. Rezultate smo preverili pod UV-svetlobo valovne dolžine 302 nm in jih tudi fotografirali.

### 3.2.8 Izolacija DNK

V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 100 µL TE pufra. V TE smo resuspendirali par kolonij seva. Nato smo dodali 500 µL GES reagenta in zmešali s pipeto. Na ledu smo ohladili amonijev acetat z založno koncentracijo 7,5 mol/L ter ga 250 µL dodali v mikrocentrifugirko in jo počasi mešali do motnosti. Mešanico smo inkubirali na ledu 10 minut. Dodali smo 500 µL mešanice kloroform/2-pentanol in dobro premešali z obračanjem, da je tekočina postala homogena. Nato smo 2 minuti centrifugirali. Iz mikrocentrifugirke smo odstranili zgornjo fazo in jo prenesli v novo mikrocentrifugirko, ostanek smo še enkrat centrifugirali, da smo pridobili čim več zgornje faze. Izmerili smo volumen zgornje faze v novi centrifugirki in počasi dodali 0,54 volumna izopropanola.

Mikrocentrifugirko smo nato počasi obračali, da se je DNK oborila. Izolat smo 5 krat sprali z 1 mL 80 % etanola, nato ves etanol odstranili in mikrocentrifugirko posušili na zraku. V 100 µL pufra TE smo razredčili 0,5 µL RNaze in jo dodali v mikrocentrifugirko z DNK. Inkubirali smo za 10 minut na 37 °C in izolirano DNK preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Izolat smo shranili na -20 °C.

### 3.2.9 Čiščenje produktov PCR iz gela s kompletom GeneJET Gel Extraction

Za čiščenje PCR produktov iz gela smo uporabili komercialno dostopen komplet GeneJET Gel extraction kit (PureExtreme Fermentas).

Svežo in prazno mikrocentrifugirko smo stekali in zabeležili težo. S skalpelom smo iz gela izrezali željen produkt in ga stekali v mikrocentrifugirki. Glede na težo gela smo dodali ustrezno količino »binding« pufra. Mešanico smo 10 min inkubirali na 55°C in jo obračali, dokler se gel ni raztopil. Osemsto µL te raztopine smo prenesli na kolono in 1 minuto centrifugirali. Tekočino v zbiralniku smo zavrgli in v kolono dodali 100 µL »binding« pufra in zopet centrifugirali 1 minuto. Tekočino smo ponovno zavrgli. Dodali smo 700 µL pufra Wash in centrifugirali 1 minuto, tekočino v zbiralniku smo nato ponovno odvrkli. Prazno kolono smo nato še enkrat centrifugirali in jo prenesli v prazno 1,5 mL mikrocentrifugirko. Dodali smo 30 µL elucijskega pufra in 2 minuti inkubirali na sobni temperaturi ter centrifugirali 2 minuti. Očiščen PCR produkt smo uporabili za kloniranje.

### 3.2.10 Kloniranje s kompletom CLONE JET PCR cloning: Sticky end protocol

**Preglednica 18:** Restrikcijaska mešanica uporabljena za kloniranje PAI<sub>usp</sub> v plazmid pJET 1.2/blunt.

| Reakcijska mešanica   | Volumen |
|-----------------------|---------|
| 2x reakcijski pufer   | 2,5 µL  |
| Produkt PCR           | 1,75 µL |
| DNK blunting encim    | 0,25 µL |
| Vektor pJET 1.2/blunt | 0,25 µL |
| DNA ligaza T4         | 0,25 µL |
| Skupaj                | 5 µL    |

Reakcijski pufer (2x), PCR produkt in DNA »blunting« encim smo zmešali v sveži mikrocentrifugirki. Mešanico smo vorteksirali in centrifugirali 3–5 sekund.

Mikrocentrifugirke smo oblepili s parafilmom in mešanico inkubirali na 70 °C 5 minut ter jo ohladili na ledu. Ohlajeni mešanici smo dodali pJET 1.2/blunt vektor in T4 DNA ligazo. Zopet smo vorteksirali in centrifugirali za 3–5 sekund ter mešanico inkubirali na 22 °C 30 minut. Mikrocentrifugirko smo shranili na 4 °C ali jo takoj uporabili za transformacijo.

### **3.2.11 Transformacija plazmida s kompletom TransformAid Bacterial**

#### **Transformation**

Za transformacijo smo uporabili sev *E. coli* DH5 $\alpha$ . Nacepili smo ga na svežo ploščo LB in jo inkubirali preko noči na 37 °C. V sterilno epruveto smo odmerili 2 mL sterilnega C-medija in vanj precepili 2 koloniji seva DH5 $\alpha$ . Za 2 uri smo epruveto inkubirali na 37 °C na stresalniku. LB plošče z Amp smo medtem segreli na 37 °C v topli sobi.

Raztopino A in B smo stalili na ledu, nato po 250  $\mu$ L vsake zmešali v novi mikrocentrifugirki ter mešanico inkubirali na ledu. Raztopino označujemo kot T-raztopina. C-medij smo po inkubaciji prenesli v mikrocentrifugirki in centrifugirali 1 min. Odstranili smo supernatant in pelet resuspendirali z 300  $\mu$ L T-raztopine. Inkubirali smo na ledu 5 min, centrifugirali in odlili supernatant. Pelet smo resuspendirali v 120  $\mu$ L T-raztopine in mešanico inkubirali 7 minut na ledu. Med inkubacijo na ledu smo iz hladilnika vzeli mešanico za kloniranje in jo inkubirali na ledu vsaj 2 minuti. Po inkubaciji smo 60  $\mu$ L celic dodali mešanici za kloniranje ter rahlo premešali ter 5 minut inkubirali na ledu. V topli sobi, na 37°C, smo 60  $\mu$ L celic hitro, s kroglicami, razmazali na segrete plošče in jih čez noč inkubirali na 37°C.

### **3.2.12 Izolacija plazmida s komercialnim kompletom GeneJET Plasmid Miniprep**

Bakterijske celice smo z ezo pobrali s plošče in jih resuspendirali v 250  $\mu$ L resuspenzijske raztopine. Dodali smo 250  $\mu$ L lizatske raztopine in mešali z obračanjem 4–6x. Dodali smo 350  $\mu$ L nevtralizacijske raztopine in mešali z obračanjem 4–8x. Centrifugirali smo 5 min. Supernatant smo prenesli na kolono in centrifugirali 1 min. Vsebinsko v zbiralniku smo zavrgli in v kolono dodali 500  $\mu$ L raztopine »wash«. Centrifugirali smo do 1 min in zavrgli tekočino v zbiralniku. Ponovili smo korak z raztopino »wash«. Prazno kolono smo centrifugirali 1 minuto, da smo odstranili ves etanol. Zbiralnik smo zavrgli, kolono pa prenesli v svežo epico. Dodali smo 50  $\mu$ L elucijske raztopine in kolono 2 min inkubirali na sobni temperaturi. Nato smo jo 2 min centrifugirali. Kolono smo zavrgli, velikost

izoliranega plazmida pa preverili z agarozno elektroforezo. Koncentracijo plazmida smo izmerili s pomočjo NanoDropa.

### 3.2.13 Restrikcija plazmida

**Preglednica 19:** Restriksijska mešanica za preverjanje uspešnosti kloniranja

| Reakcijska mešanica | Volumen |
|---------------------|---------|
| dH <sub>2</sub> O   | 7 µL    |
| DNK                 | 1 µL    |
| Fast Digest Pufra   | 1 µL    |
| EcoRI               | 0,5 µL  |
| PstI                | 0,5 µL  |
| Skupaj              | 10 µL   |

Restriksijsko mešanico smo inkubirali 15 minut na 37 °C. Nato smo restriksijski vzorec preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

### 3.2.14 Shranjevanje bakterijske kulture

Izolat smo precepili v sveže gojišče LB in ga preko noči inkubirali na stresalniku pri temperaturi 37 °C. V kriovialko smo nato zmešali 0,5 mL prekonočne kulture in 0,5 mL 30 % glicerola v tekočem gojišču LB. Vsebino smo premešali ter jo hitro zamrzili v tekočem dušiku in shranili na -80 °C.

### 3.2.15 Rastna krivulja

Transformirane seve MG1655 pH24 pJET1.2 in MG1655 pHS2 pJET1.2 smo precepili na LB Amp plošče do posamezne kolonije. Plošče smo inkubirali na 37 °C preko noči. Po eno kolonijo smo precepili v 50 mL LB Amp v 0,5 litrskih erlrmajericah in jih inkubirali na 37 °C na stresalniku preko noči. Iz prekonočne kulture smo 0,5 mL prenesli v 50 mL svežega gojišča LB Amp, ki smo ga segreli na 37 °C. Nato smo vsako uro merili OD. Po točno 6 urah inkubacije smo iz kulture odvzeli 100 µL in naredili redčitveno vrsto. Redčitve 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> in 10<sup>-7</sup> smo razmazali na LB Amp plošče ter jih inkubirali na 37 °C preko noči. Naslednji dan smo prešteli kolonije in izračunali CFU/mL kulture. Ta podatek je pomemben pri izolaciji celokupne RNK.

### 3.3 IZOLACIJA RNK S KOMPLETOM QIAGEN RNEASY MINI KIT

Izolacija RNK je potekala v laminariju, ki smo ga najprej dobro očistili z etanolom in sredstvom RNaseZap, ki uniči morebitne RNaze. Tako smo očistili tudi pipete in ves pribor, ki se je uporabljal pri izolaciji RNK. Pri tem smo uporabljali mikrocentrifugirke, falkonke in pipetne nastavke, ki so brez RNaz, kar je potrjeno s strani proizvajalca.

Kulturi MG1655 pH24 pJET1.2 in MG1655 pH52 pJET1.2 smo 6 ur gojili na stresalniku pri 37 °C. Nato smo odvzeli 1 mL kulture in dodali 2x volumen reagenta RNAprotect Bacteria in vorteksirali 5 sekund. Nato smo vzorce inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Sledilo je 10 minut centrifugiranja na sobni temperaturi pri 5000 g. Vzorce smo nato prenesli v laminarij, kjer samo odstranili supernatant. Predhodno smo že pripravili pufer TE, ki vsebuje 10 µL proteinaze K in 200 µL lizocima. 210 µL TE smo dodali v falkonko s peletom in resuspendirali s pipetiranjem. Mešanico smo inkubirali na sobni temperaturi 15 min in vsaki 2 min vorteksirali za 10 sekund. Nato smo dodali 700 µL pufra RLT in zopet močno vorteksirali. Nato smo dodali 500 µL 96 % etanola in mešali s pipetiranjem. Na kolono, ki je v izolacijskem kompletu, smo nanесли 700 µL lizata in centrifugirali 15 sekund na 10000 g. Tekočino v zbiralniku smo odstranili in ga ponovno uporabili. V kolono smo dodali 350 µL pufra RW1 in zopet centrifugirali 15 sekund na 10000 g. Zbiralnik smo po praznjenju ponovno uporabili. Deset µL DNaze smo predhodno razredčili v pufru RDD in zmešali z nežnim obračanjem. Osemdeset µL te mešanice smo dali na kolono in inkubirali 15 min na sobni temperaturi. Ponovili smo korak s puffrom RW1. Uporabili smo nov zbiralnik in v kolono dodali 500 µL pufra RPE, centrifugirali 15 sekund in korak ponovili. Zbiralnik smo nato zavrgli in kolono prenesli v zbiralno mikrocentrifugirko, ki je priložena v kompletu. Dodali smo 50 µL vode brez RNaz in centrifugirali 1 min. Celokupna RNK se je tako izločila iz kolone.

Koncentracijo izolirane RNK smo izmerili s pomočjo NanoDropa. Za dokaz uspešnosti izolacije in prisotnosti 16S rRNK in 23S rRNK smo pripravili 1,2 % agarozni gel.

#### 3.3.1 Prepis RNK v cDNK s kompletom High Capacity cDNA Reverse Transcription

Prepis RNK v cDNK smo izvedli po postopku, opisanem v navodilih kompleta High Capacity cDNA Reverse Transcription. Vzorec RNK smo ustrezno redčili, da je bila koncentracija molekul RNK zadostna. Reagente iz kompleta smo odtajali na ledu. Nato

smo jih zmešali, da smo dobili reakcijsko mešanico. Podatki, navedeni v **Preglednici 20**, omogočajo 3 reakcije prepisa v cDNK. Opravili smo samo 2 prepisa.

**Preglednica 20:** Reakcijska mešanica za prepis celokupne RNK v cDNK.

| Reakcijska mešanica                | Volumen |
|------------------------------------|---------|
| 10X pufra RT                       | 2 µL    |
| 25X mešanica dNTP                  | 0,8 µL  |
| 10X naključni primerji             | 2 µL    |
| MultiScribe Reverzna transkriptaza | 1 µL    |
| dH <sub>2</sub> O                  | 4,2µL   |
| Celokupna RNK                      | 10 µL   |
| Skupaj                             | 20 µL   |

Po 10 µL reakcijske mešanice smo odpipetirali v mikrocentrifugirki za PCR (brez RNaz), in dodali 10 µL vzorca izolirane RNK. Premešali smo s pipetiranjem in centrifugirali, da smo odstranili mehurčke. Nato smo izvedli transkripcijo po programu navedenem v **Preglednici 21**.

**Preglednica 21:** Program za transkripcijo celokupne RNK v cDNK.

|             | Korak 1 | Korak 2 | Korak 3 | Korak 4 |
|-------------|---------|---------|---------|---------|
| Temperatura | 25 °C   | 37 °C   | 85 °C   | 4 °C    |
| Čas         | 10 min  | 120 min | 5 min   | ∞       |

Po reverzni transkripciji smo cDNK uporabili za PCR reakcije, da bi dokazali policistronsko mRNK. Pri tem smo uporabili začetne oligonukleotide navedene v **Preglednici 22**.

**Preglednica 22:** Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri ugotavljanju policistranske mRNK.

| Oznaka | Zaporedje začetnega oligonukleotida    | Vir            |
|--------|----------------------------------------|----------------|
| USP81f | CGGCTCTTACATCGGTGCGTTG                 | Kanamaru, 2006 |
| ORFU1r | TAGGATAGAAAATGAGATCTCC                 | Kanamaru, 2006 |
| ORFU2r | CTCCTTGACTTTTAGGGTAGAA                 | Kanamaru, 2006 |
| ORFU3r | TCTTTGCAGGATAGTAGATAAG                 | Kanamaru, 2006 |
| Imm1f  | TTTCTCGAGCTTTAAAGAAAAGCTCCAGGATTATAC   | Volmajer, 2014 |
| Imm2f  | TTTCTGGAGCTATAATTTTAAAGATGAAATAG       | Volmajer, 2014 |
| Imm3f  | TTTCTCGAGCTATATATGCATGATTTAAAATATAAAAT | Volmajer, 2014 |

Program PCR, ki smo ga pri tem uporabili, je naveden v **Preglednici 12**. Reakcijske mešanice so podobne, kot pri subtipizaciji PAI*usp* (**Preglednica 23**).

**Preglednica 23:** Reakcijska mešanica za določanje policistranske mRNK.

| Reakcijska mešanica 1           |        | Reakcijska mešanica 2           |        | Reakcijska mešanica 3           |        |
|---------------------------------|--------|---------------------------------|--------|---------------------------------|--------|
| Začetni oligonukleotid 1 USP81f | 0,1 µL | Začetni oligonukleotid 1 USP81f | 0,1 µL | Začetni oligonukleotid 1 USP81f | 0,1 µL |
| Začetni oligonukleotid 2 ORFU1r | 0,1 µL | Začetni oligonukleotid 2 ORFU2r | 0,1 µL | Začetni oligonukleotid 2 ORFU3r | 0,1 µL |
| PCR Master mix                  | 10 µL  | PCR Master mix                  | 10 µL  | PCR Master mix                  | 10 µL  |
| Destilirana voda                | 9,8 µL | Destilirana voda                | 9,8 µL | Destilirana voda                | 9,8 µL |
| cDNK                            | 5 µL   | cDNK                            | 5 µL   | cDNK                            | 5 µL   |
| Skupaj                          | 25 µL  | Skupaj                          | 25 µL  | Skupaj                          | 25 µL  |

Program PCR iz **Preglednice 12** ni optimalen, zato smo izvedli še dodatne analize PCR s katerimi bi dokazali policistronsko mRNK, pri tem pa smo uporabili program, ki je naveden v **Preglednici 24**.

**Preglednica 24:** Program za dodatne analize PCR.

|                      |       |       |     |
|----------------------|-------|-------|-----|
| Začetna denaturacija | 94 °C | 5 min | 1x  |
| Denaturacija         | 94 °C | 30 s  |     |
| Prileganje           | 55 °C | 30 s  | 30x |
| Pomnoževanje         | 72 °C | 1 min |     |
| Končno pomnoževanje  | 94 °C | 5 min | 1x  |

Produkt, ki smo ga pričakovali, je zajemal gena imunosti *imu2* ter *imu3*. Ker se zaporedje genov imunosti pri podtipu Ia razlikuje od zaporedja pri podtipu IIa, smo uporabili 2 različni reakcijski mešanici. Za podtip Ia smo pripravili mešanico, navedeno v **Preglednici 25**. Produkt, ki smo ga pri tem dobili, zajema nukleotidno zaporedje med genoma *imu2* ter *imu3*.

**Preglednica 25:** Reakcijska mešanica za podtip Ia, sev H24.

| Reakcijska mešanica           | Volumen |
|-------------------------------|---------|
| Začetni oligonukleotid Imm1f  | 0,1 µL  |
| Začetni oligonukleotid ORFU3r | 0,1 µL  |
| PCR Master mix                | 10 µL   |
| Destilirana voda              | 9,8 µL  |
| cDNK                          | 5 µL    |
| Skupaj                        | 25 µL   |

Podobna je tudi reakcijska mešanica za seve podtipa IIa, razlikuje se le po uporabljenih začetnih oligonukleotidih. V tem primeru se je s metodo PCR pomnožilo nukleotidno zaporednje, ki zajema gena imunosti *imu3* ter *imu1*. Uporabljene količine so navedene v **Preglednici 26**.

**Preglednica 26:** Reakcijska mešanica za podtip IIa, sev HS2.

| Reakcijska mešanica           | Volumen |
|-------------------------------|---------|
| Začetni oligonukleotid Imm2f  | 0,1 µL  |
| Začetni oligonukleotid ORFU1r | 0,1 µL  |
| PCR Master mix                | 10 µL   |
| Destilirana voda              | 9,8 µL  |
| cDNK                          | 5 µL    |
| Skupaj                        | 25 µL   |

### 3.4 STATISTIČNE METODE

Pri ugotavljanu sopojavljanja virulentnih dejavnikov *usp*, *tcpC* ter *pks* smo rezultate statistično obdelali s Fisherjevim eksaktnim testom. Kot statistično značilne podatke smo obravnavali tiste, katerih p vrednost je bila manjša od 0,05 (Langrud, 2004).

## 4 REZULTATI

### 4.1 RAZŠIRJENOST PODTIPOV OTOKA PATOGENOSTI USP

V zbirki 105 sevov smo preverjali razširjenost podtipov PAI<sub>usp</sub>. Iz prejšnjih raziskav je že bilo znano, kateri sevi imajo PAI<sub>usp</sub>. Izmed 105. sevov je bilo 36 takih, ki so *usp*<sup>+</sup> in smo jim lahko določili podtip *usp*. 34 % sevov torej vsebuje otok patogenosti *usp*.

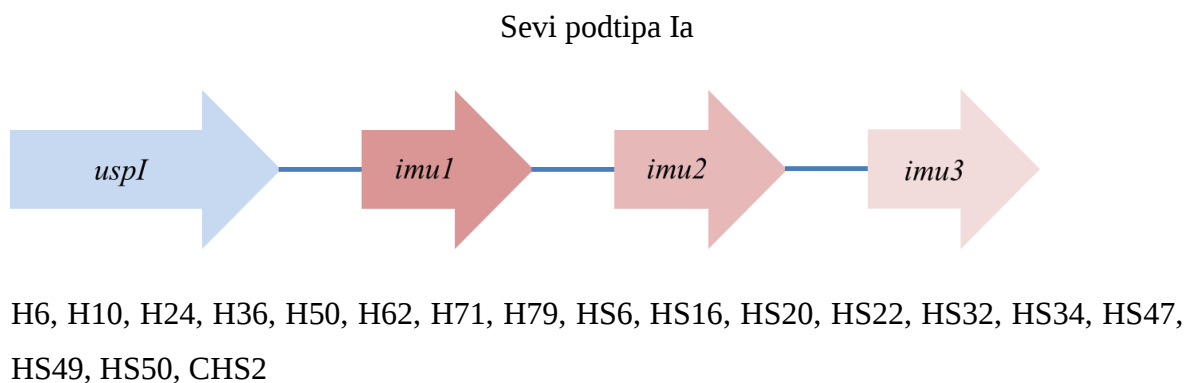
Izmed 36 sevov, ki smo jim določili podtip, se je najpogosteje pojavljal podtip Ia. Polovica sevov je namreč pripadala temu tipu. 9 sevov je pripadalo podtipu IIa, torej 25 %. Dvaindvajset odstotkov oz. 8 sevov je pripadalo podtipu Ib, medtem ko se je podtip IIb pojavil samo v 1 sevu.

**Preglednica 27:** Razširjenost podtipov PAI<sub>usp</sub>.

Število oz. prevalenca podtipov

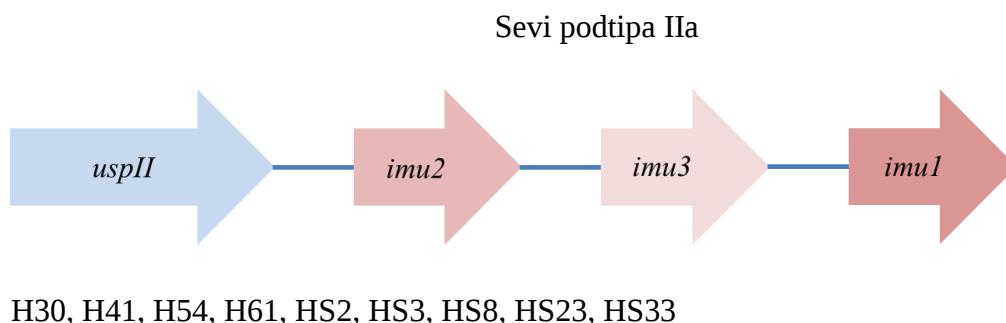
|                           | Podtip Ia | Podtip IIa | Podtip Ib | Podtip IIb |
|---------------------------|-----------|------------|-----------|------------|
| Število pozitivnih sevov  | 18        | 9          | 8         | 1          |
| Odstotek pozitivnih sevov | 50 %      | 25 %       | 22 %      | 3 %        |

Za podtip Ia je značilno, da poleg gena *usp* vsebuje tudi 3 gene imunosti. Gen *imu1* se nahaja takoj za genom *usp*, sledi mu *imu2*, konec otoka patogenosti pa označuje gen imunosti *imu3*. Vsi sevi, ki spadajo v ta podtip, imajo takšno zaporedje genov, prav tako je nukleotidno zaporedje samega gena *usp* značilno za ta podtip. Zato gen označujemo kot *uspI*. Ta je identičen genu *usp* pri podtipu Ib. PAI<sub>usp</sub> podtipa Ia je prikazan na **Sliki 2**.



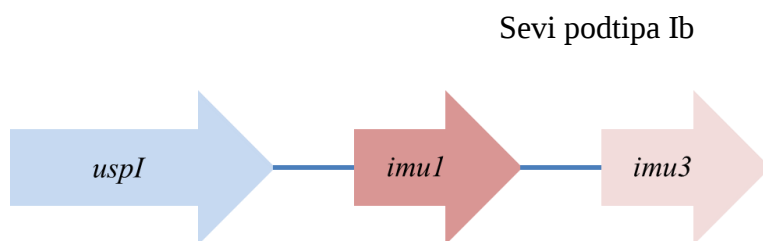
**Slika 2:** Grafičen prikaz otoka patogenosti podtipa Ia ter sevi, ki pripadajo temu tipu.

Podtip IIa prav tako zajema vse tri poznane gene imunosti, vendar je njihovo zaporedje drugačno kot pri podtipu Ia. Tako genu *usp* sledijo geni *imu2*, *imu3* in *imu1*. Tudi sam gen *usp* je drugačen kot pri Ia, zato ga označujemo kot *uspII*, njegovo nukleotidno zaporedje pa je identično podtipu IIb. PAI<sub>usp</sub> podtipa IIa je prikazan na **Sliki 3**.



**Slika 3:** Grafičen prikaz otoka patogenosti podtipa IIa ter sevi, ki pripadajo temu podtipu.

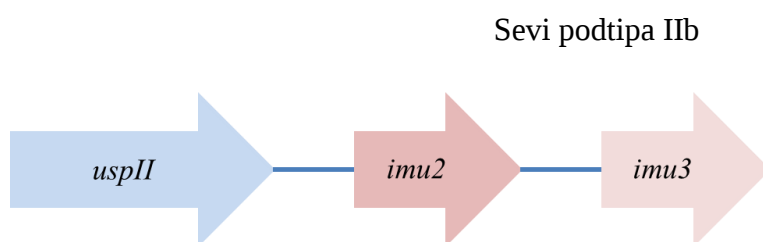
Za podtip Ib je značilno, da mu manjka gen imunosti *imu2*. Nukleotidno zaporedje gena *usp* je identična podtipu Ia in ga zato označujemo kot *uspI*. Otok patogenosti je zaradi manjkajočega gena krajši. Otok je prikazan na **Sliki 4**.



H28, H33, H35, H38, H74, HS11, HS15, HS24

**Slika 4:** Grafičen prikaz otoka patogenosti podtipa Ib ter sevi, ki pripadajo temu podtipu.

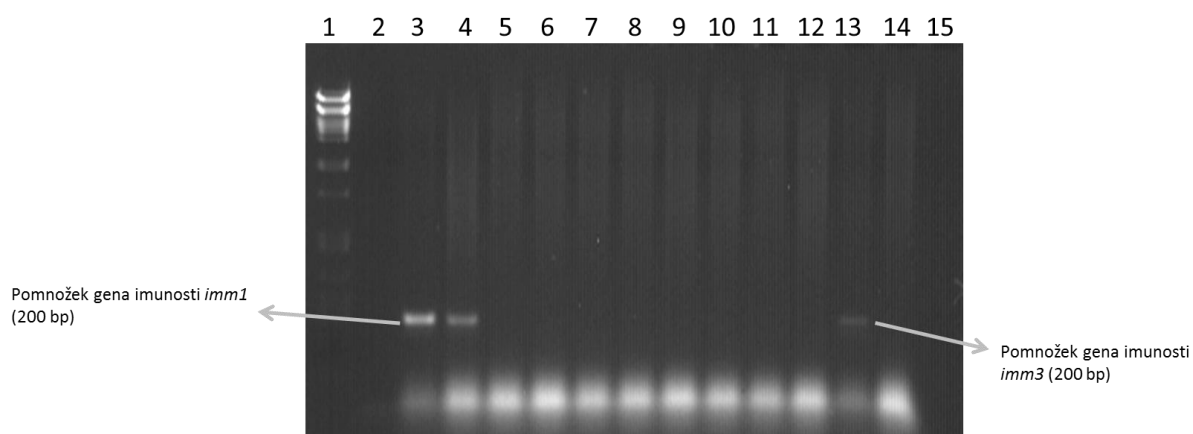
Za podtip IIb je značilno, da mu manjka gen imunosti *imu1*. Nukleotidno zaporedje gena *usp* je identično podtipu IIa in ga zato označujemo kot *uspII*. Otok patogenosti je zaradi manjkajočega gena krajši. Otok je prikazan na **Sliki 5**.



HS27

**Slika 5:** Grafičen prikaz otoka patogenosti podtipa IIb ter sevi, ki pripadajo temu podtipu.

Za podtipa Ib in IIb je značilno, da nimata gena imunosti *imu1* oziroma *imu2*. Zato smo preverili, če se slednja nahajata na drugem mestu v kromosomu in sta kljub dislokaciji pomembna za PAI<sub>usp</sub>. S PCR smo preverili prisotnost teh genov in ugotovili, da se ne nahajajo v kromosomu preiskovanih sevov. Rezultati reakcije PCR so prikazani na **Sliki 6**.



Legenda: 1- Lestvica, 2 – negativna kontrola, 3 – pozitivna kontrola, 4 – pozitivna kontrola H24, 5 – sev H28, 6- sev H33, 7- sev H35, 8 – sev H38, 9- sev H74, 10- sev HS11, 11- sev HS15, 12 - sev HS24, 13- pozitivna kontrola, 14- sev HS27

**Slika 6:** Manjkajoča gena imunosti *imu1* in *imu2* se ne pojavljata izven PAI<sub>usp</sub>.

#### 4.2 RAZŠIRJENOST GENA *tcpC*

V zbirki 105. sevov smo preverjali prisotnost gena *tcpC*, saj je slednji pomemben dejavnik pri bakterijskem izogibanju imunskemu sistemu gostitelja. Z metodo PCR smo pomnožili nukleotidno zaporedje znotraj gena *tcpC*, dolgo 386 bp, da bi dokazali prisotnost le-tega v genomu bakterije. Ugotovili smo, da je *tcpC* omejen le na filogenetsko skupino B2 in smo ga dokazali v 18 sevih (17 %).

**Preglednica 28:** Razširjenost sevov, ki so *tcpC*<sup>+</sup> in razporejenost le-teh med filogenetske skupine.

| Filogenetske skupine | Razširjenost (število (%) sevov) |                       |
|----------------------|----------------------------------|-----------------------|
|                      | <i>tcpC</i> pozitivni            | <i>tcpC</i> negativni |
|                      | 18 (17)                          | 87 (83)               |
| A                    | 0 (0)                            | 16 (19)               |
| B1                   | 0 (0)                            | 14 (16)               |
| B2                   | 18 (100)                         | 36 (41)               |
| D                    | 0 (0)                            | 21 (24)               |

#### 4.3 RAZŠIRJENOST OTOKA PATOGENOSTI *pks*

V isti zbirki sevov smo preverjali tudi prisotnost otoka patogenosti *pks*. V predhodni raziskavi so Nougayrede in sodelavci ugotovili, da se *pks* nahaja samo v sevih filogenetske skupine B2, kar smo potrdili v naši raziskavi. Od 105. sevov je bilo 29 *pks* pozitivnih, kar pomeni da se je otok patogenosti *pks* nahajal v 28 % preiskovanih sevov. Z metodo PCR smo pomnoževali gena *clbA* in *clbQ*, ki služita kot markerja za otok *pks*.

**Preglednica 29:** Razširjenost *pks* sevov v zbirki *E. coli*.

| Razširjenost <i>pks</i> sevov |    |
|-------------------------------|----|
| Število pozitivnih sevov      | 29 |
| Odstotek pozitivnih sevov     | 28 |

#### 4.4 POVEZAVA VIRULENTNIH DEJAVNIKOV *usp*, *tcpC* TER *pks*

Preverili smo medsebojno povezanost virulentnih dejavnikov, ki smo jih določili v raziskavi. Gen *tcpC* se je pojavil pri 41 % sevov *usp*<sup>+</sup> in pri 4,3 % *usp*<sup>-</sup> sevov. Povezava med virulentnima dejavnikoma je statistično značilna, saj je p vrednost manjša od 0,05. Podobna povezava je značilna tudi za *pks* in *usp*. V tem primeru je se je otok patogenosti

*pks* pojavljal pri 75 % sevov *usp*<sup>+</sup> in 3 % *usp*<sup>-</sup> sevov. Rezultati statistične analize so navedeni v **Preglednici 30**.

**Preglednica 30:** Sopojavljanje virulentnih dejavnikov *usp*, *pks* ter *tcpC*.

| Virulentni dejavnik | Št. sevov (%)            |                          | p vrednost           |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|
|                     | <i>usp</i> pozitivni (%) | <i>usp</i> negativni (%) |                      |
|                     | 36 (34)                  | 69 (66)                  |                      |
| <i>tcpC</i>         | 15 (41)                  | 3 (4,3)                  | 3,8xE <sup>-6</sup>  |
| <i>pks</i>          | 27 (75)                  | 2 (3)                    | 3,4xE <sup>-15</sup> |

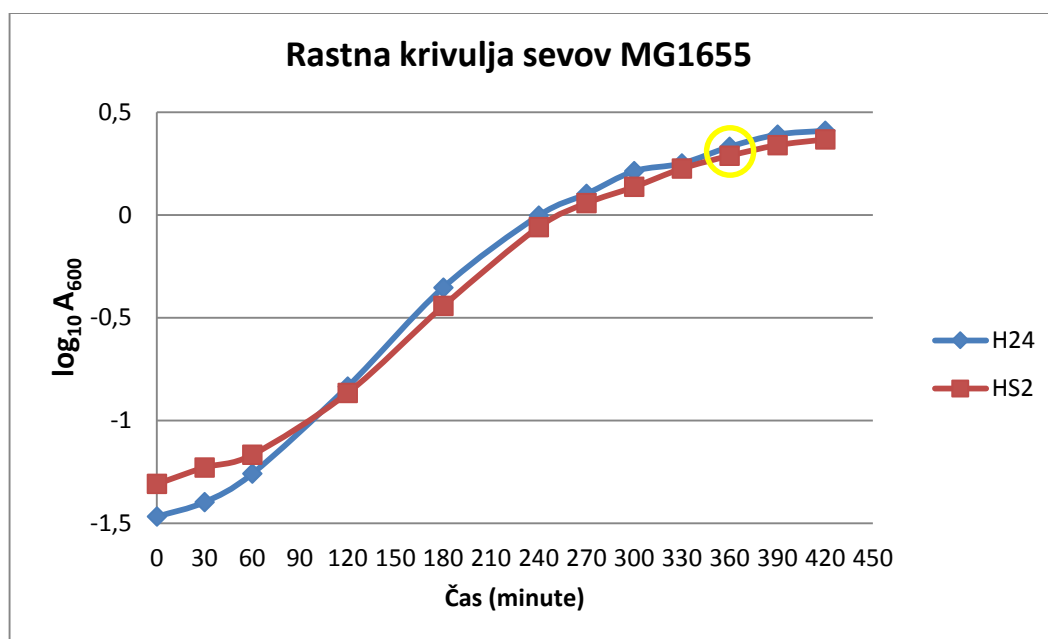
Zanimala nas je tudi povezanost virulentnih dejavnikov s posameznimi podtipi PAI*usp*. Ugotovili smo, da je gen *tcpC* povezan s podtipom Ia, saj se pojavlja v 72 %. Tudi *pks* je povezan s podtipom Ia, kjer je bil prisoten pri vseh preiskovanih sevih. Podtipa Ib ne moremo povezati z določenimi virulentnimi dejavniki, saj rezultat ni statistično značilen. Podobno je tudi pri podtipu IIb. Ker se je slednji pojavil samo enkrat, statistično ne moremo dokazati povezanosti z ostalimi geni. Lahko pa trdimo, da podtip IIa ni povezan s genom *tcpC* in otokom patogenosti *pks*, saj se skupaj pojavljajo samo pri enem sevu. Rezultati statistične analize so navedeni v **Preglednici 31**.

**Preglednica 31:** Pogostost pojavljanja virulentnih dejavnikov *pks* ter *tcpC* pri podtipih PAI*usp*.

| Virulentni dejavnik | <i>usp</i> <sup>+</sup> (N=36) |               |              |               |               |                   |              |               |
|---------------------|--------------------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|-------------------|--------------|---------------|
|                     | Ia<br>18 (50)                  | p<br>vrednost | Ib<br>8 (22) | p<br>vrednost | IIa<br>9 (25) | p<br>vrednost     | IIb<br>1 (3) | p<br>vrednost |
| <i>tcpC</i>         | 13 (72)                        | 0.0005        | 2 (25)       | 0.424         | 0 (0)         | 0.004             | 0 (0)        | 1             |
| <i>pks</i>          | 18 (100)                       | 0.001         | 8 (100)      | 0.424         | 1 (11)        | 3xE <sup>-6</sup> | 0 (0)        | 0.25          |

#### 4.5 IZOLACIJA RNK

Transformirane seve MG1655 pH24 pJET1.2 in MG1655 pH2S pJET1.2 smo 6 ur gojili na stresalniku pri 37 °C in vsako uro merili optično gostoto (OD). Po točno 6 urah inkubacije smo iz kulture odvzeli 100 µL in naredili redčitveno vrsto. Redčitve  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  in  $10^{-7}$  smo razmazali na LB Amp plošče ter jih preko noči inkubirali na 37 °C. Števna plošča je bila  $10^{-6}$ , kjer je zraslo 105 kolonij. To pomeni, da je kultura pri 6 urah dosegla  $1,05 \times 10^9$  celic na mL. Podatek je bil pomemben za optimalno izolacijo RNK.

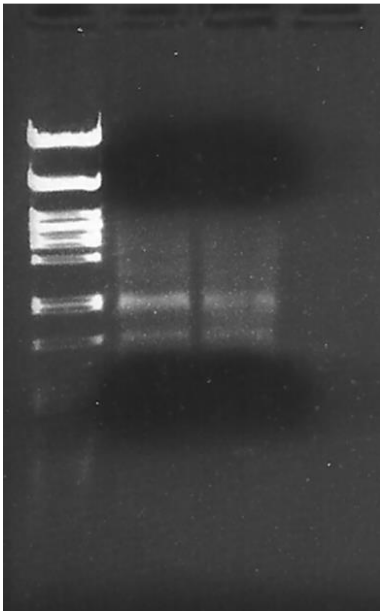
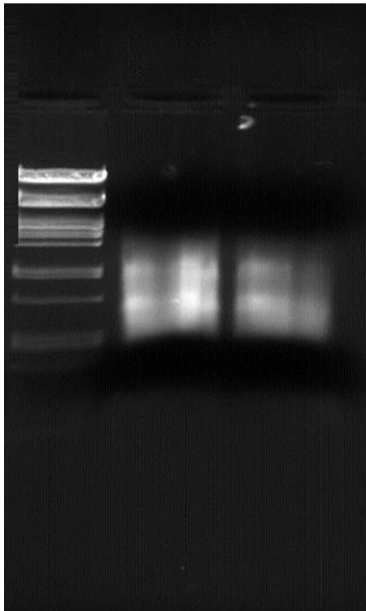


**Slika 7:** Rastna krivulja sevov MG1655 pH24 in MG1655 pH2S. RNK smo izolirali v 360 minuti, kar je na sliki označeno z rumeno barvo.

Namen izolacije RNK je bil, da ugotovimo, ali se gen *usp* prepisuje skupaj z geni imunosti. Pri prokariontih so geni pogosto razporejeni v skupke – operone, RNK polimeraza pa te gene prepiše v eno, dolgo mRNK, ki jo imenujemo policistronska mRNK. Pri prevajanju v proteine na istem ribosomu nastanejo različni polipeptidi, saj ima mRNK več SD nukleotidnih zaporedij, ki se nahajajo pred kodirajočim zaporedjem. Na ta način lahko ribosomi prevedejo več genov z iste mRNK (Madigan in sod., 2012). Kurazono in sodelavci so ugotovili, da imajo tudi geni imunosti pripadajoča, neodvisna SD zaporedja, ki omogočajo prevajanje proteinov na ribosomu. Zato smo preverili, ali se geni v *PAI<sub>usp</sub>* prepisujejo skupaj ali pa prihaja do prepisa posameznih genov. V ta namen smo izolirali

celokupno RNK seva MG1655, kamor smo klonirali plazmid pJET 1.2/blunt s vstavljenim PAI<sub>usp</sub>.

Uspešnost izolacije RNK smo dokazali s agarozno gelsko elektroforezo, s katero preverjamo integriteto izolirane RNK. Pri tem namreč vidimo izolirani ribosomalni 16S rRNK in 23S rRNK, ki ju prikazujeta **Sliki 8** in **9**. Koncentracijo RNK smo izmerili s pomočjo NanoDropa (vrednosti se nahajajo v **Preglednici 32**).

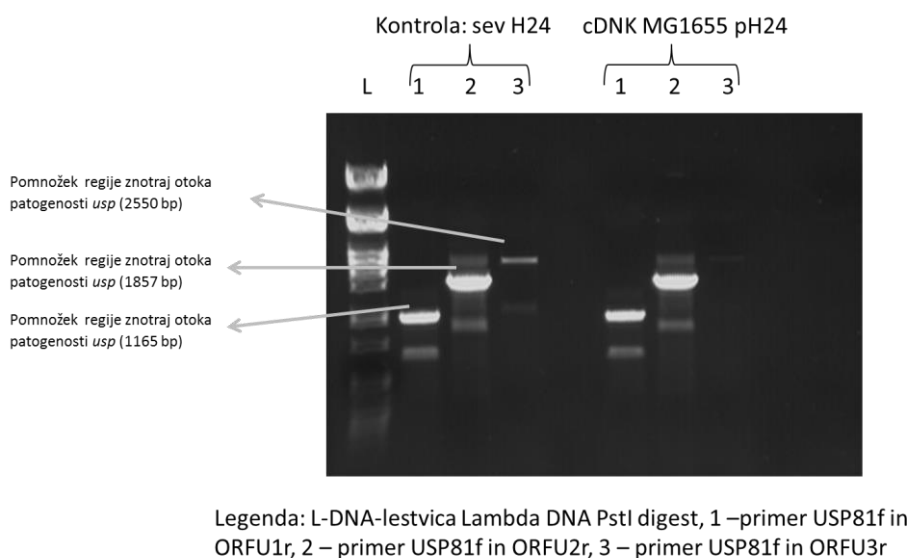
| 1. izolacija                                                                                                                                                                                              | 2. izolacija                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>L 2 3</p>                                                                                                            | <p>L 1 2</p>                                                                                                           |
| <p><b>Slika 8:</b> Integriteta celokupne RNK izolirane pri 1. poizkusu.</p> <p>Legenda: L-DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2-RNK iz seva MG1655 pH24 pJET1.2, 3- RNK iz seva MG1655 pHS2 pJET1.2</p> | <p><b>Slika 9:</b> Integriteta celokupne RNK izolirane pri 2. poizkusu.</p> <p>Legenda: L-DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2-RNK iz seva MG1655 pH24 pJET1.2, 3- RNK iz seva MG1655 pHS2 pJET1.2</p> |

**Preglednica 32:** Koncentracije in kvaliteta izolirane celokupne RNK, izmerjene s pomočjo NanaDropa.

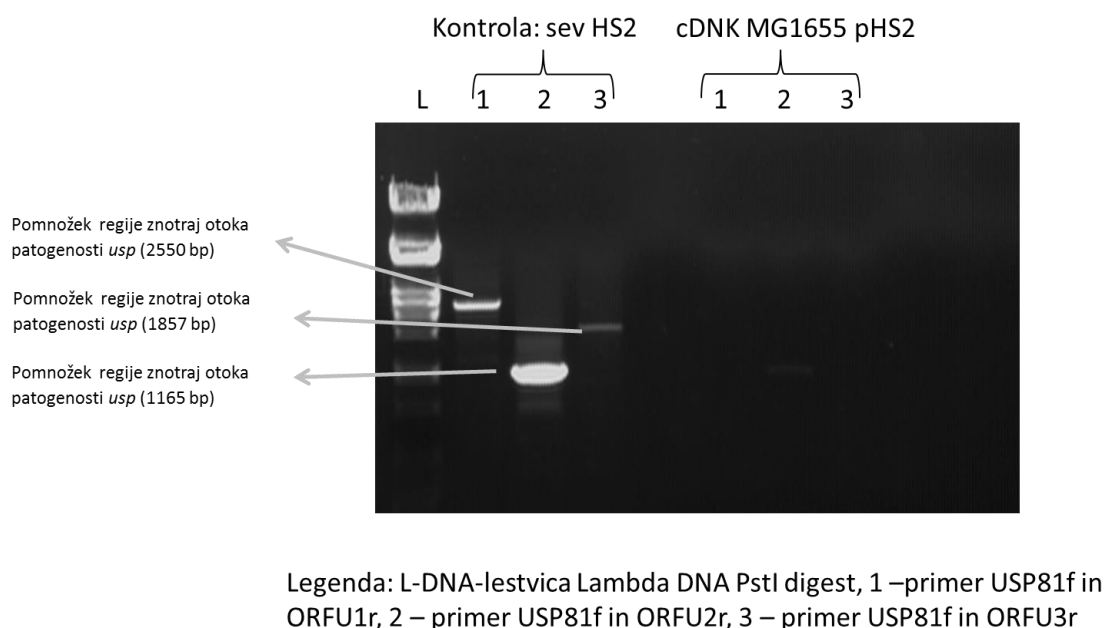
|              | Sev (MG1655) | Koncentracija ng/μl | A260/A280 |
|--------------|--------------|---------------------|-----------|
| 1. izolacija | pH24         | 68                  | 2,02      |
|              | pHS2         | 70                  | 2,11      |
| 2. izolacija | pH24         | 759,46              | 2,14      |
|              | pHS2         | 1188,98             | 2,12      |

Izolaciji je sledil prepis celokupne RNK v cDNK. Slednjo smo nato uporabili pri verižni reakciji s polimerazo, da bi pokazali, da je mRNK policistronka. Pri tem smo uporabili začetne oligonukleotide, ki smo jih uporabljali že za subtipizacijo PAI<sub>usp</sub> (**Preglednica 11**), prav tako smo cDNK pomnoževali z enakim programom (**Preglednica 12**).

Ugotovili smo, da se geni dejansko prepisujejo v policistronsko mRNK. Vzorec pomnoževanja cDNK je bil namreč enak kot pri subtipizaciji (**Sliki 10 in 11**).

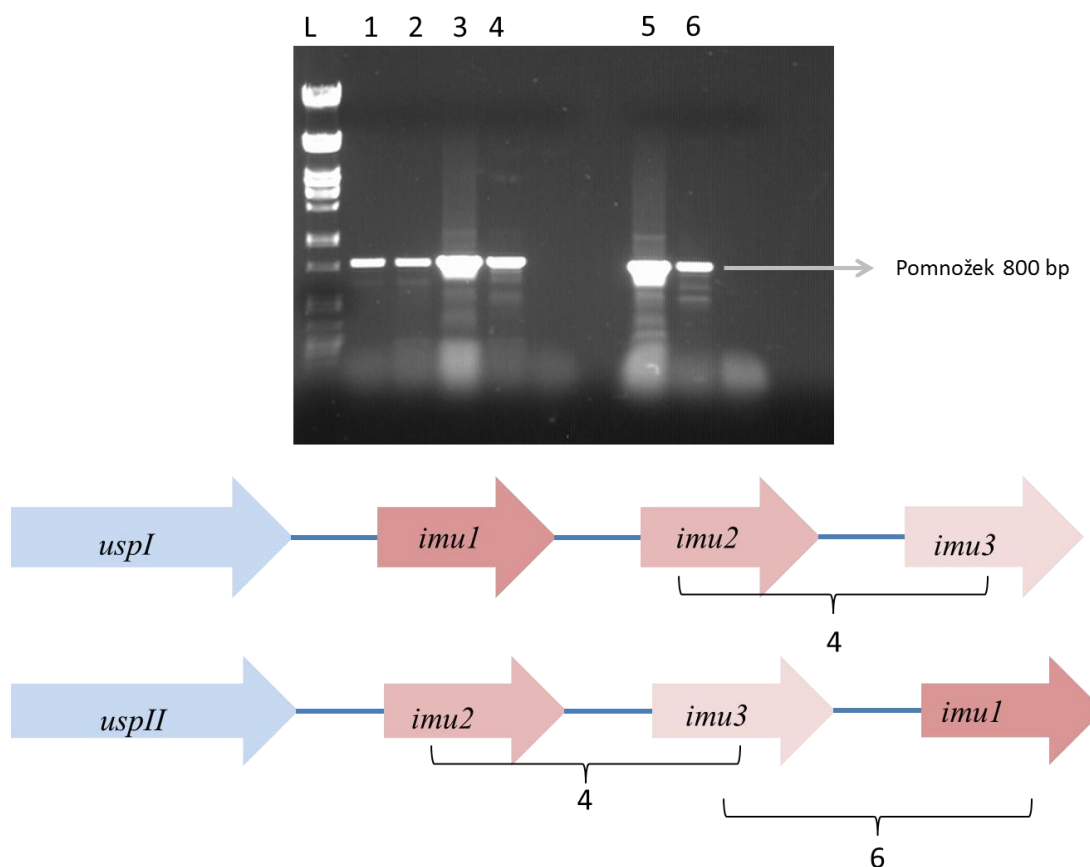


**Slika 10:** Subtipizacija cDNK seva MG1655 pH24.



**Slika 11:** Subtipizacija cDNK seva MG1655 pH24.

Ker program PCR, ki smo ga pri tem uporabili, ni najbolj optimalen, se je zgodilo, da nekateri pomnožki niso bili dobro vidni, koncentracija mRNK pa je bila zelo nizka. Zato smo naredili dodatne analize PCR in pomnoževali zaporedja znotraj otoka patogenosti. Rezultati so pokazali, da je mRNK zagotovo policistronska, saj smo pomnoževali območje, kjer ležita oba gena imunosti (**Slika 12**). Izvedli smo dve ponovitvi izolacije mRNK iz sevov MG1655 pH24 in MG1655 pH24. Rezultati so ponovljivi.



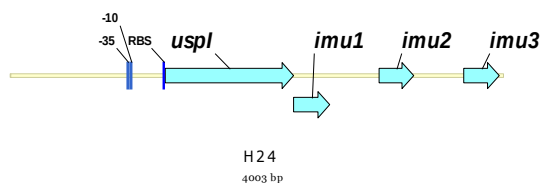
Legenda: L-DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 1-pozitivna kontrola H24, 2 – cDNK MG1655 pH24 (Imm1\_F/ORFU3r), 3- pozitivna kontrola HS2, 4 – cDNK MG1655 pH24 (Imm1\_F/ORFU3r), 5 – pozitivna kontrola HS2, 6 – cDNK MG1655 pH24 (Imm2\_F/ORFU1r)

**Slika 12:** Pomnoževanje regij znotraj otoka patogenosti zaradi neoptimalnih rezultatov pri subtipizaciji cDNK sevov MG1655 pH24 in MG1655 pH24.

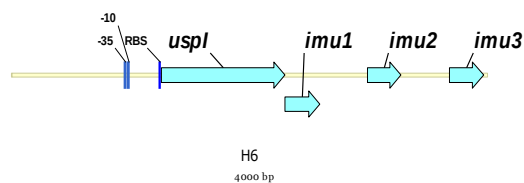
#### 4.6 ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ

Po opravljeni subtipizaciji otoka patogenosti *usp*, smo izbrali 10 sevov, klonirali PAI<sub>usp</sub> v plazmid pJET1.2/blunt in jih poslali na sekvenciranje. Tako smo pridobili nukleotidna zaporedja posameznih podtipov, kar nam omogoča primerjavo otoka med različnimi podtipi in primerjavo z že znanimi nukleotidnimi zaporedji gena *usp*, ki smo jih pridobili iz podatkovnih baz. Nukleotidnim zaporedjem smo določili gene *usp* in gene imunosti, prav tako smo določili mesto vezave ribosoma gena *usp* (RBS) in promotorski mesti -10 in -35. Vse lastnosti otoka so prikazane na **Slikah** od 13 do 22.

##### Podtip Ia:

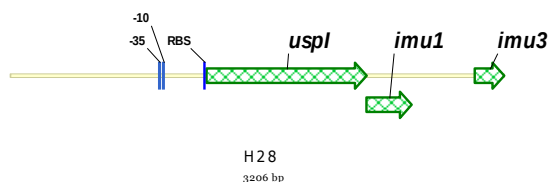


**Slika 13:** Grafični prikaz PAI<sub>usp</sub> izoliranega iz seva *E. coli* H24.

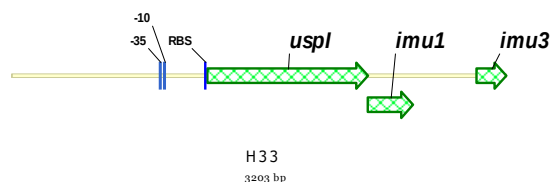


**Slika 14:** Grafični prikaz PAI<sub>usp</sub> izoliranega iz seva *E. coli* H6.

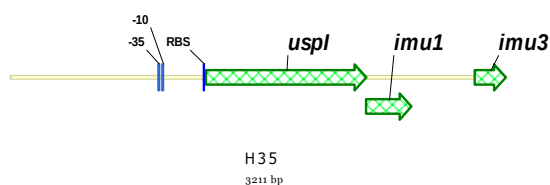
##### Podtip Ib:



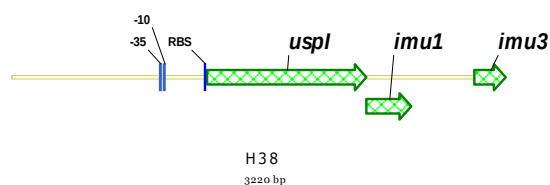
**Slika 15:** Grafični prikaz PAI<sub>usp</sub> izoliranega iz seva *E. coli* H28.



**Slika 16:** Grafični prikaz PAI<sub>usp</sub> izoliranega iz seva *E. coli* H33.

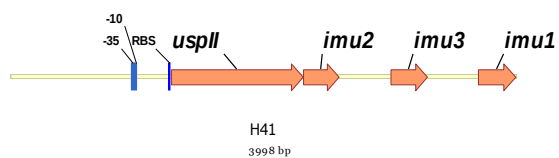


**Slika 17:** Grafični prikaz PAI<sub>usp</sub> izoliranega iz seva *E. coli* H35.

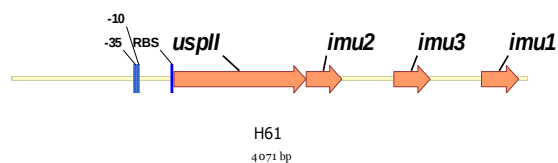


**Slika 18:** Grafični prikaz PAI<sub>usp</sub> izoliranega iz seva *E. coli* H38.

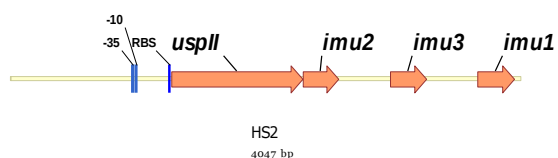
## Podtip IIa:



**Slika 19:** Grafični prikaz PAI<sub>usp</sub> izoliranega iz seva *E. coli* H41.

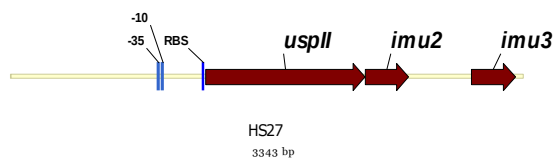


**Slika 20:** Grafični prikaz PAI<sub>usp</sub> izoliranega iz seva *E. coli* H61.



**Slika 21:** Grafični prikaz PAI<sub>usp</sub> izoliranega iz seva *E. coli* HS2.

## Podtip IIb:



**Slika 22:** Grafični prikaz PAI<sub>usp</sub> izoliranega iz seva *E. coli* HS27.

#### 4.6.1 Primerjava nukleotidnih zaporedij

Pridobljena nukleotidna zaporedja smo primerjali znotraj posameznih podtipov. Poleg naših nukleotidnih zaporedij smo v analizo vključili tudi zaporedja PAI<sub>usp</sub> iz spletnih podatkovnih baz DDBJ/GenBank/EMBL. Prav tako smo jih pridobili iz genomov sekvenciranih sevov *E. coli* (**Preglednica 33**). Vsem otokom smo določili podtip in ugotovili, da večina sevov spada med tip IIa, izjemoma v Ia.

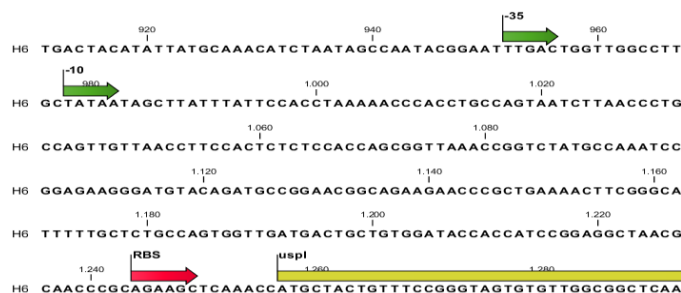
**Preglednica 33:** Sevi iz podatkovnih baz, ki imajo otok patogenosti *usp* in smo jih vključili v raziskavo ter jim določili podtip.

| Sev                | Vir         | Dostopna številka | Podtip |
|--------------------|-------------|-------------------|--------|
| <i>E. coli</i> Z13 | Nakano 2001 | AB056438          | IIa    |
| <i>E. coli</i> Z16 | Nakano 2001 | AB056439          | IIa    |
| <i>E. coli</i> Z25 | Nakano 2001 | AB056436          | Ib     |
| <i>E. coli</i> Z42 | Nakano 2001 | AB056434          | Ia     |
| <i>E. coli</i> C72 | Nakano 2001 | AB056440          | Ia     |
| <i>E. coli</i> P17 | Nakano 2001 | AB056437          | IIb    |
| <i>E. coli</i> E25 | Nakano 2001 | AB056435          | /      |

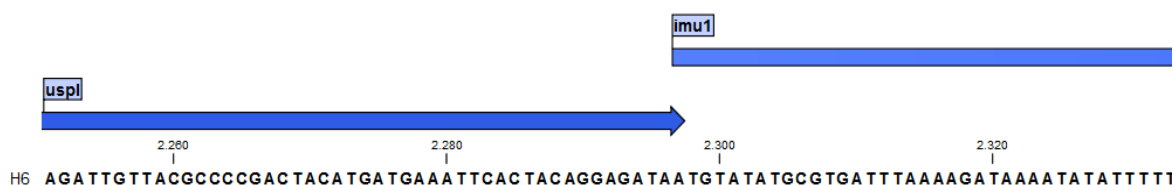
| Genomi                   |              |             |     |
|--------------------------|--------------|-------------|-----|
| <i>E. coli</i> IHE3034   | Moriel 2010  | NC_017628.1 | IIa |
| <i>E. coli</i> S88       | Touchon 2008 | NC_011742.1 | IIa |
| <i>E. coli</i> UTI89     | Chen 2006    | NC_007946.1 | IIa |
| <i>E. coli</i> klon Di14 | Reeves 2011  | NC_017652.1 | Ia  |
| <i>E. coli</i> klon Di2  | Reeves 2011  | NC_017651.1 | Ia  |
| <i>E. coli</i> UM146     | Krause 2010  | NC_017632.1 | IIa |

Promotorsko mesto -10 se pri vseh sevih nahaja 274 bp pred začetkom kodirajoče regije, ki jo nakazuje SD zaporedje, tukaj označeno kot RBS (ang. »ribosom binding sequence«). Slednja se nahaja 7 bp pred začetkom transkripcije (**Slika 23**).



**Slika 23:** Mesto vezave ribosoma (RBS) in promotorski mesti -10 ter -35 gena *usp*.

Kot so že omenili Nakano in sodelavci (Nakano, 2001) sam gen *usp* nima vedno istega nukleotidnega zaporedja. Tako so označeni tudi podtipi, saj se gen *usp* pri podtipu Ia razlikuje od gena *usp* pri podtipu IIa. Isto velja za podtip Ib in IIb. Označujemo jih kot *uspI* in *uspII*. Kar je vidno že iz grafičnega prikaza (**Slika 24**) je, da se gen *uspI* prekriva s genom imunosti *imu1*. Nukleotid, ki je del stop kodona gena *usp*, je hkrati že del start kodona gena *imu1*, medtem ko pri *uspII* ni prekrivanja (**Slika 25**).



**Slika 24:** Prekrivanje genov *uspI* in *imu1* pri podtipu Ia in Ib.



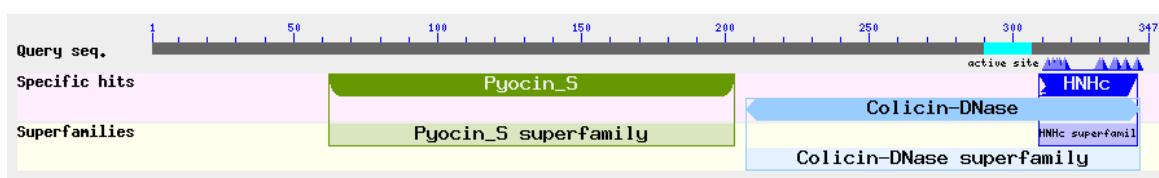
**Slika 25:** Pri podtipu IIa in IIb ni prekrivanja genov *uspII* in *imu2*.

Poravnava nukleotidnih zaporedij sevov podtipa Ia je pokazala, da med njimi ni bistvenih razlik. Na **Sliki 29** je prikazana primerjava genov *usp* vseh sevov podtipa Ia. *E. coli* Z42 je sev, s katerim so Kurazono in sodelavci (Kurazono, 2000) najprej karakterizirali otok patogenosti. H6 in H24 sta seva iz naše raziskave, ostali sevi so pridobljeni iz podatkovnih zbirk. Pri sevu H24 je vidno, da je v zadnjem delu gena na dveh mestih dodana baza timin, kar močno vpliva na bralni okvir in s tem AK zaporedje proteina (**Slika 26**). Ta se od ostalih proteinov Usp razlikuje na C-terminalnem delu in nima H-N-H endonukleaznega motiva (**Sliki 27 in 28**). Aktivnost tega proteina Usp bi lahko bila drugačna od ostalih Usp, kar bi bilo potrebno preveriti s testom virulence na celični kulturi.

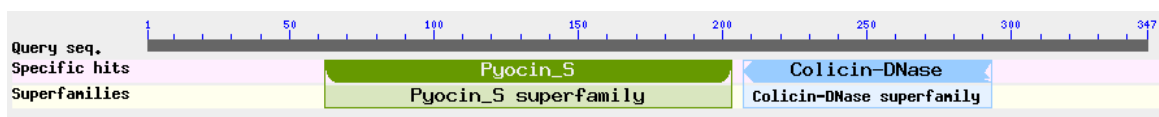
Znotraj podtipa so identična tako zaporedja genov imunosti kot tudi intergenske regije.

|                 |             |            |            |            |            |             |            |             |            |            |     |
|-----------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| E.coli Z42_UspI | MLLFPSSVLA  | TQIWGKWSLS | GVLSATRGSY | IGALASALYI | PSAGEGSARV | PGRDEFWYEE  | ELRQKALAGS | TATTTRVRFWF | GTDIHGKQPV | YGVHTGEGTP | 100 |
| H6_UspI         | .....G..... | A.....     | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       | S.....     | .....      | 100 |
| H24_UspI        | .....G..... | A.....     | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       | S.....     | .....      | 100 |
| E.coli Z42_UspI | YENVRVANMQ  | WNEQTQRYEF | TPAHVDVGPL | ITWTPENPEH | GNVPGHTGND | RPPLDQPTIL  | VTPIDPGTDT | YTTTFFPVDP  | PKEFNDYILV | FPAGSGIKPI | 200 |
| H6_UspI         | .....L..... | ER.....    | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       | .....      | .....      | 200 |
| H24_UspI        | .....L..... | ER.....    | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       | .....      | .....      | 200 |
| E.coli Z42_UspI | YVYLKEDPRK  | LPGVVTGRGV | PLSPGTRWLD | MSVSNNNGGA | PIPAHIADKL | RGRFETKTFDE | FREALWLEVS | KDSVLLAQFI  | KSNQNNVSQG | YSPYVPEEGY | 300 |
| H6_UspI         | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       | .....      | .....      | 300 |
| H24_UspI        | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       | .....      | .....      | 300 |
| E.coli Z42_UspI | YGGPNEIVKK  | FQIHHVVAIE | HGGGVYDIDN | F-RIVTPRLH | DEIHYRR*   | 347         |            |             |            |            |     |
| H6_UspI         | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       | .....      | .....      | 347 |
| H24_UspI        | LLRRTK*DS*E | IPDTSCSCYR | TWWWSV*Y** | .L.LLR.DYM | MKFT.TGD   | 347         |            |             |            |            |     |

**Slika 26:** Poravnava AK zaporedja proteinov Usp iz sevov Z42, H6 in H24.



**Slika 27:** Protein Usp, seva Z42 ima ohranjene regije znotraj proteina. Na C-terminalnem delu se nahaja H-N-H endonukleazna domena, ki je pomembna pri aktivnosti bakteriocinov.



**Slika 28:** Protein Usp, seva H24 ima zaradi spremenjenega bralnega okvirja drugačno AK zaporedje. Na sliki je vidno, da mu manjka H-N-H endonukleazna domena.

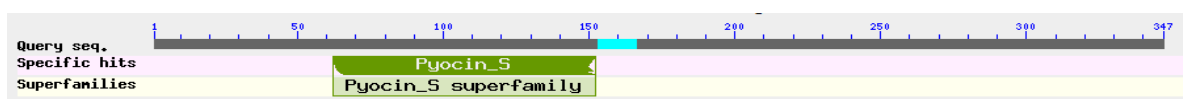
|                     |                                                                                                      |      |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| E.coli Z42_usp_PAI  | ATGCTACTGTTCCCGAGTAGTGTGTTGGCGACTCAAATATGGGGAAATGGTCGCTCAGTGGCGTACTCAGTGCAACCCGCGGGCTCTTACATCGGTGCGT | 100  |
| H6                  | .....T..G.....G.....A.....                                                                           | 100  |
| H24                 | .....T..G.....G.....A.....                                                                           | 100  |
| E.coli D114_usp PAI | .....T..G.....G.....A.....                                                                           | 100  |
| E.coli D12_usp_PAI  | .....T..G.....G.....A.....                                                                           | 100  |
| E.coli C72_usp_PAI  | .....T..G.....G.....A.....                                                                           | 100  |
| E.coli Z42_usp_PAI  | TGGCATCTGCTTTGTATATTCCCTCTGCGGGCGAGGGCAGTGCTCGCGTGCCCGGACGTGATGAGTTCTGGTATGAGGAAGAACTGCGGCAGAAAGCACT | 200  |
| H6                  | .....T.....T.....C.....G.....                                                                        | 200  |
| H24                 | .....T.....T.....C.....G.....                                                                        | 200  |
| E.coli D114_usp PAI | .....T.....T.....C.....G.....                                                                        | 200  |
| E.coli D12_usp_PAI  | .....T.....T.....C.....G.....                                                                        | 200  |
| E.coli C72_usp_PAI  | .....T.....T.....C.....G.....                                                                        | 200  |
| E.coli Z42_usp_PAI  | AGCAGGCAGTACCGCCACCACCCGGGTACGTTTTTTCTGGGGAAGTACATTACCGGCAAGCCTCAGGTGTATGGTGTTCATACGGGTGAAGGTACGCCG  | 300  |
| H6                  | T.....T.....G.....A.....C.....A.....                                                                 | 300  |
| H24                 | T.....T.....G.....A.....C.....A.....                                                                 | 300  |
| E.coli D114_usp PAI | T.....T.....G.....A.....C.....A.....                                                                 | 300  |
| E.coli D12_usp_PAI  | T.....T.....G.....A.....C.....A.....                                                                 | 300  |
| E.coli C72_usp_PAI  | T.....T.....G.....A.....C.....A.....                                                                 | 300  |
| E.coli Z42_usp_PAI  | TATGAAAACGTCCGCGTGGCGAACATGCAGTGAACGAGCAGCAGCGTTATGAATTACCCCGCTCAGCATGTCGATGGCCCCCTGATTACCTGGA       | 400  |
| H6                  | .....T.....G.....G.....                                                                              | 400  |
| H24                 | .....T.....G.....G.....                                                                              | 400  |
| E.coli D114_usp PAI | .....T.....G.....G.....                                                                              | 400  |
| E.coli D12_usp_PAI  | .....T.....G.....G.....                                                                              | 400  |
| E.coli C72_usp_PAI  | .....T.....G.....G.....                                                                              | 400  |
| E.coli Z42_usp_PAI  | CGCCGGAAAAATCCGGAACATGGGAATGTTCCGGGCCATACCGGTAACGACAGGCCGCCGCTGGATCAGCCACCATTCTGGTGACGCCGATTCGGGACGG | 500  |
| H6                  | .....                                                                                                | 500  |
| H24                 | .....                                                                                                | 500  |
| E.coli D114_usp PAI | .....                                                                                                | 500  |
| E.coli D12_usp_PAI  | .....                                                                                                | 500  |
| E.coli C72_usp_PAI  | .....                                                                                                | 500  |
| E.coli Z42_usp_PAI  | CACCGATACCTATACCACGCCGCCATTCCCGGTTCCTGATCCGAAAGAATTCAACGATTATATTCGGTTTTTCCGGCGGGATCCGGTATTAGCCCATC   | 600  |
| H6                  | .....                                                                                                | 600  |
| H24                 | .....                                                                                                | 600  |
| E.coli D114_usp PAI | .....                                                                                                | 600  |
| E.coli D12_usp_PAI  | .....                                                                                                | 600  |
| E.coli C72_usp_PAI  | .....                                                                                                | 600  |
| E.coli Z42_usp_PAI  | TATGTTTACCTGAAGGAGGATCCGCGAAAGCTGCCGGTGTGTGAACAGGGCGCGGCTCCCGCTTTACCAGGAACCTCGCTGGGTGGATATGTCGGTAT   | 700  |
| H6                  | .....T.....                                                                                          | 700  |
| H24                 | .....T.....                                                                                          | 700  |
| E.coli D114_usp PAI | .....T.....                                                                                          | 700  |
| E.coli D12_usp_PAI  | .....T.....                                                                                          | 700  |
| E.coli C72_usp_PAI  | .....T.....                                                                                          | 700  |
| E.coli Z42_usp_PAI  | CCAATAACGGCAACGGCGCACCAATCCCGGCATATTGCTGATAAATTGCGCGACGGGAGTTTAAACCTTTGATGAGTTTCGCGAGGCGCTGTGGCT     | 800  |
| H6                  | .....                                                                                                | 800  |
| H24                 | .....                                                                                                | 800  |
| E.coli D114_usp PAI | .....                                                                                                | 800  |
| E.coli D12_usp_PAI  | .....                                                                                                | 800  |
| E.coli C72_usp_PAI  | .....                                                                                                | 800  |
| E.coli Z42_usp_PAI  | GGAGGTGAGTAAAGACTCAGTGTTATTGGCGCAGTTTATAAAAAGTAATCAGAATAACGTTAGTCAAGGATATTCGCCCT-ATGTCCCAGGAGGGGTA   | 899  |
| H6                  | .....T.....                                                                                          | 899  |
| H24                 | .....T.....                                                                                          | 900  |
| E.coli D114_usp PAI | .....T.....                                                                                          | 899  |
| E.coli D12_usp_PAI  | .....T.....                                                                                          | 899  |
| E.coli C72_usp_PAI  | .....T.....                                                                                          | 899  |
| E.coli Z42_usp_PAI  | TTATTACGGACCAAAATGAGATAGTTAAGAAATTCAGATACATCATGTAGTTGCTATAGAACATGGTGGTGGAGTGTATGATATTGATAATTTT-AGGAT | 998  |
| H6                  | .....T.....                                                                                          | 998  |
| H24                 | .....T.....                                                                                          | 1000 |
| E.coli D114_usp PAI | .....T.....                                                                                          | 998  |
| E.coli D12_usp_PAI  | .....T.....                                                                                          | 998  |
| E.coli C72_usp_PAI  | .....T.....                                                                                          | 998  |
| E.coli Z42_usp_PAI  | TGTTACGCCCGGACTACATGATGAAATTCACCTACAGGAGATAA                                                         | 1041 |
| H6                  | .....                                                                                                | 1041 |
| H24                 | .....                                                                                                | 1043 |
| E.coli D114_usp PAI | .....                                                                                                | 1041 |
| E.coli D12_usp_PAI  | .....                                                                                                | 1041 |
| E.coli C72_usp_PAI  | .....                                                                                                | 1041 |

**Slika 29:** Poravnava nukleotidnih zaporedij sevov podtipa Ia. V okvirju sta označena dodana timina seva H24, ki močno spremenita bralni okvir in s tem AK zaporedje proteina Usp.

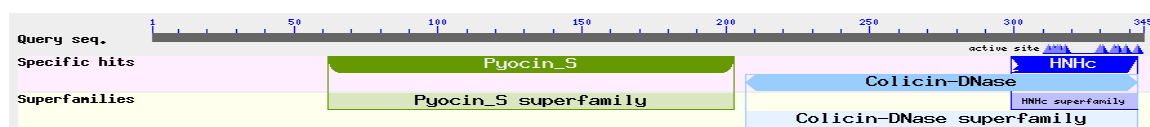
Poravnava nukleotidnih zaporedij podtipa IIa je pokazala, da med njimi ni bistvenih razlik (**Priloga E1**). V primerjavo smo vključili nukleotidna zaporedja, ki smo jih pridobili sami (H41, H61 in HS2), ter zaporedja iz baze podatkov (Z13, Z16, UTI89, S88, UM146 in IHE3034). Izjema je sev Z13, ki ima dodani bazi gvanina. Posledično je bralni okvir premaknjen, AK zaporedje pa je drugačno od referenčnega seva Z16. Nukleotidna zaporedja preiskovanih sevov (H41, H61 in HS2) so identična sevu Z16, tudi AK zaporedja so enaka, zato sklepamo, da aktivnost proteina ni spremenjena (**Slika 30**). Protein UspII seva Z13 se močno razlikuje od ostalih, saj mu primanjkuje DNazna in H-N-H endonukleazna domena. Razlike so vidne na **Sliki 31**, ki prikazuje ohranjene domene v UspII seva HS2 ter na **Sliki 32**, kjer je vidno, da UspII seva Z13 teh domen nima.

|                   |            |            |            |            |            |            |             |            |            |            |     |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| E. coli Z16_UspII | MLLFPGSVLA | AQIWGKWSLS | GILSATCGSY | IGALASALYI | PSAGEGSARV | PGRDEFWYEE | ELRQKALAGS  | TATTRVRFWF | GTDIHGKPVQ | YGVHTGEGTP | 100 |
| H41_UspII         | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | 100 |
| H61_UspII         | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | 100 |
| HS2_UspII         | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | 100 |
| E. coli Z13_UspII | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | 100 |
| E. coli Z16_UspII | YENVRVANMQ | WNEQTQRYEF | TPAHDVDGPL | ITWTPENPEH | GYVPGHTGND | RPPLEQPTIL | VTPIPDGTDT  | YTTPPF---- | PVPDPK     | EFNDYILVFP | 192 |
| H41_UspII         | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | 192 |
| H61_UspII         | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | 192 |
| HS2_UspII         | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | 192 |
| E. coli Z13_UspII | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | 192 |
| E. coli Z16_UspII | AGSGIKPIYV | YLKEDPRKLP | GVVTGRGVPL | SPGTRWLDMS | VSNNGNGAPI | PAHIADKL-R | GREFKTFDEF  | REALWLEV-- | -SQDPEL-IA | QFSSGNQTRI | 287 |
| H41_UspII         | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | 287 |
| H61_UspII         | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | 287 |
| HS2_UspII         | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | 287 |
| E. coli Z13_UspII | KN.T....FW | FFRR..VLS  | SMF..RIRE  | .....-CL   | L*Q.AASCF  | HQEL.GWIC  | YPITA.AHQS  | RI.LINCAD  | G.LK.LMSF  | RRCGWR*V.. | 273 |
| E. coli Z16_UspII | KQGLTAKAPI | DGWYYGPKI  | VKKFQIHHRV | AVEYGGSVYD | IDNLR-IVTP | RLHDEIHYR  | .....-R*    | .....      | .....      | .....      | 347 |
| H41_UspII         | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | 347 |
| H61_UspII         | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | 347 |
| HS2_UspII         | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | 345 |
| E. coli Z13_UspII | RS**RSFQVV | TK*HV*N.D* | PQ.....LL  | T.GIMALKK* | LK.S.Y.IVL | Q.NMAAA.TI | L.IIYELLPPD | YTMRFRTGD  | .....      | .....      | 347 |

Slika 30: Poravnava AK zaporedja proteina UspII.



**Slika 31:** Usp seva Z13 ima zaradi spremenjenega bralnega okvirja drugačno AK zaporedje kot ostali proteini istega podtipa. Primanjkuje mu H-N-H endonukleazna domena, manjka pa tudi domena z DNazno aktivnostjo.



**Slika 32:** Usp seva HS2 ima ohranjene regije znotraj proteina. Na C-terminalnem delu se nahaja H-N-H endonukleazna domena, ki je pomembna pri aktivnosti bakteriocinov.

Pri poravnavi nukleotidnih zaporedij podtipov Ib in IIb ni bilo posebnosti, ki bi lahko vplivale na aktivnost proteina. Pri primerjavi genov *uspI* in *uspII* je vidno, da se razlike v nukleotidnem zaporedju nahajajo na 3' koncu (**Priloga E4**). To povzroči razliko v AK zaporedju proteinov UspI in UspII (**Slika 33**). Zaporedja se razlikujejo predvsem na C-terminalnem koncu proteina, kar pa najverjetneje ne vpliva na samo aktivnost. DNazne in endonukleazne domene so namreč ohranjene v obeh vrstah proteina Usp. To lahko vidimo na **Sliki 27**, ki je primer proteina UspI, in na **Sliki 32**, ki prikazuje domene proteina UspII.

|            |       |        |         |        |         |         |
|------------|-------|--------|---------|--------|---------|---------|
|            | 20    | 40     | 60      | 80     | 100     |         |
| H6 UspI    | MLLFP | GSVLA  | AIWGW   | SLSGI  | LSATRGS | YIGALAS |
| H28 UspI   | ..... | S..... | T.....  | V..... | .....   | .....   |
| HS2 UspII  | ..... | .....  | C.....  | .....  | .....   | .....   |
| HS27 UspII | ..... | .....  | .....   | .....  | .....   | .....   |
|            | 120   | 140    | 160     | 180    | 200     |         |
| H6 UspI    | YENVR | VANML  | WNEER   | QRYE   | FTPAHD  | VDGPI   |
| H28 UspI   | ..... | L..... | P.....  | .....  | .....   | .....   |
| HS2 UspII  | ..... | Q..... | QT..... | .....  | Y.....  | .....   |
| HS27 UspII | ..... | Q..... | QT..... | .....  | T.....  | .....   |
|            | 220   | 240    | 260     | 280    | 300     |         |
| H6 UspI    | YVYLK | EDPRK  | LPGVV   | TGRGV  | LLSPG   | TRWLD   |
| H28 UspI   | ..... | H..... | P.....  | .....  | .....   | .....   |
| HS2 UspII  | ..... | H..... | P.....  | .....  | T.....  | .....   |
| HS27 UspII | ..... | H..... | P.....  | .....  | I.....  | .....   |
|            | 320   | 340    |         |        |         |         |
| H6 UspI    | YYGP  | NEIVK  | KFQI    | HHVVA  | IEHGG   | GVYDI   |
| H28 UspI   | ..... | .....  | .....   | .....  | .....   | .....   |
| HS2 UspII  | ..... | K..... | .....   | R..... | V.....  | Y.....  |
| HS27 UspII | ..... | K..... | .....   | R..... | V.....  | Y.....  |

**Slika 33:** Poravnava AK zaporedja proteinov UspI in UspII.

#### 4.6.2 Mozaična struktura PAI<sub>usp</sub>

Podobno raziskavo so naredili že Nakano in sodelavci leta 2001, kjer so primerjali gene in intergenske regije (IR) znotraj otoka, da bi prikazali preurejanje elementov. V ta namen smo analizirali nukleotidna zaporedja med geni imunosti. **Slika 34** prikazuje mozaično strukturo otoka patogenosti *usp*. Podobnosti med intergenskimi regijami so navedene v **Preglednici 34**. Vidno je, da so si IR zelo podobne. S sivo barvo so v preglednici označene tiste IR, kjer je podobnost največja, razlike med njimi pa so posledica različnih dolžin IR.

|             |             |   |             |   |             |
|-------------|-------------|---|-------------|---|-------------|
| <i>uspI</i> | <i>imu1</i> | A | <i>imu2</i> | B | <i>imu3</i> |
|-------------|-------------|---|-------------|---|-------------|

|              |             |   |             |   |             |
|--------------|-------------|---|-------------|---|-------------|
| <i>uspII</i> | <i>imu2</i> | C | <i>imu3</i> | D | <i>imu1</i> |
|--------------|-------------|---|-------------|---|-------------|

|             |             |   |             |
|-------------|-------------|---|-------------|
| <i>uspI</i> | <i>imu1</i> | E | <i>imu3</i> |
|-------------|-------------|---|-------------|

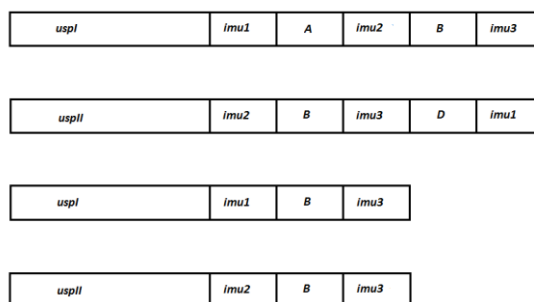
|              |             |   |             |
|--------------|-------------|---|-------------|
| <i>uspII</i> | <i>imu2</i> | F | <i>imu3</i> |
|--------------|-------------|---|-------------|

**Preglednica 34:** Podobnosti med intergenskimi regijami v odstotkih.

|   | A    | B    | C    | D    | E    | F    |
|---|------|------|------|------|------|------|
| A |      | 86,7 | 85,7 | 88,3 | 85,7 | 85,7 |
| B | 86,7 |      | 95,6 | 91,7 | 94,9 | 94,6 |
| C | 85,7 | 95,6 |      | 89,3 | 99,3 | 99,0 |
| D | 88,3 | 91,7 | 89,3 |      | 89,1 | 88,8 |
| E | 85,7 | 94,9 | 99,3 | 89,1 |      | 98,8 |
| F | 85,7 | 94,6 | 99,0 | 88,8 | 98,8 |      |

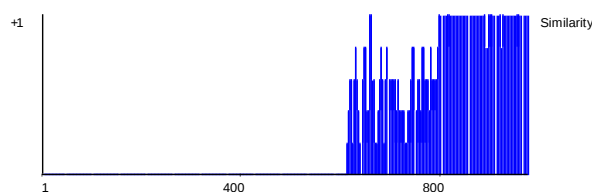
**Slika 34:** PAI<sub>usp</sub>, razdeljen na genske in intergenske regije.

Intergenske regije B, C, E in F se pri vseh podtipih nahajajo pred genom imunosti *imu3* in se med seboj le malo razlikujejo, zato smo jih označili s skupno oznako B, kot je prikazano na **Sliki 35**. B se vedno nahaja pred *imu3* ne glede na podtip otoka patogenosti.

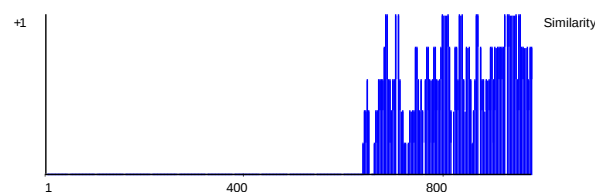


**Slika 35:** Otok patogenosti *usp* razdeljen na genske in intergenske regije.

Če IR A razdelimo na polovico, ugotovimo, da je nukleotidno zaporedje druge polovice, skoraj identično (v 97,2 %) končnemu delu gena *uspII* (**Slika 36**). To je tisti del gena, ki v proteinu Usp zagotavlja H-N-H endonukleazni motiv. Podobnost tega dela IR A z genom *uspI* je samo 70 % (**Slika 37**).

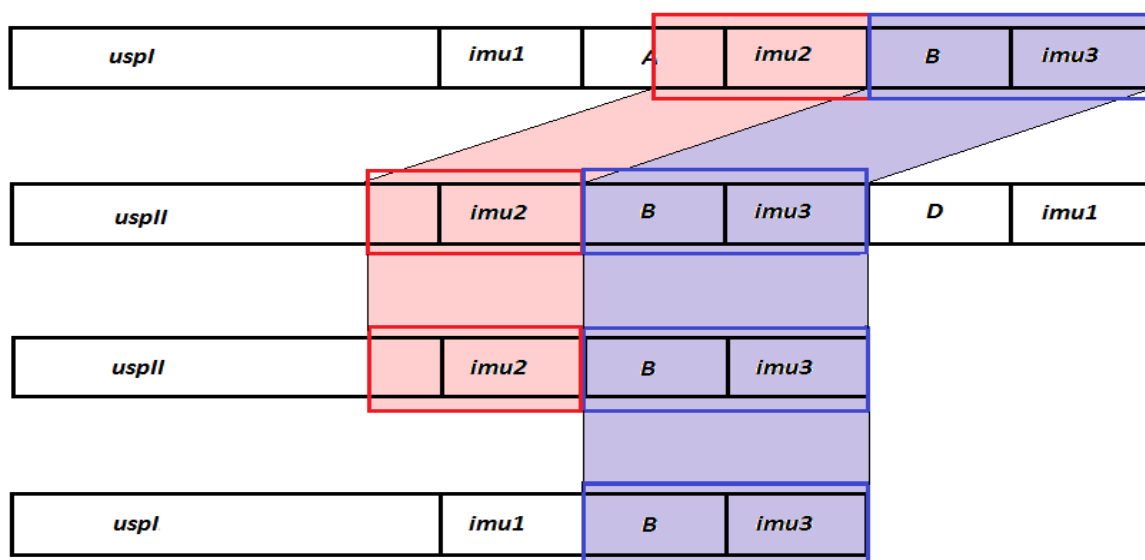


**Slika 36:** Grafičen prikaz podobnosti IR A in gena *uspII*.



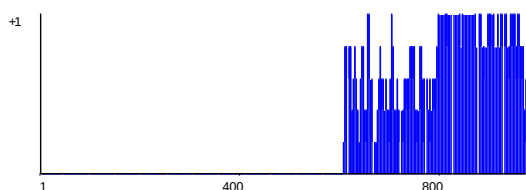
**Slika 37:** Grafičen prikaz podobnosti IR A in gena *uspI*.

Mozaična struktura PAI<sub>usp</sub> je prikazana na **Sliki 38**. Prikazuje povezanost IR A z genom *imu2*. Vidno je, da je nukleotidno zaporedje dela IR A skoraj identično nukleotidnemu zaporedju gena *uspII*.

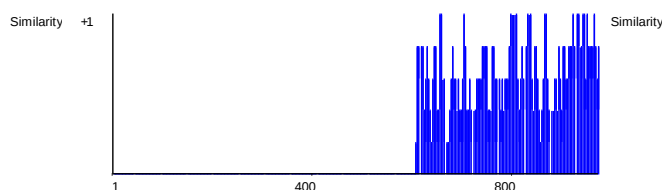


**Slika 38:** Prikaz mozaične strukture PAI<sub>usp</sub> in razporejenosti IR ter genov imunosti pri različnih podtipih.

Lahko bi pričakovali, da je zadnji del regije D homologen nukleotidnemu zaporedju gena *uspI*, saj se *imu1* pri podtipih Ia in Ib pojavlja takoj za njim. Vendar temu ni tako, saj je regija D bolj podobna genu *uspII* (**Slika 39**). Celotna regija D je genu *uspI* podobna v 60,8 %, zadnji del pa 69,4 % (**Slika 40**). Podobnost z *uspII* je večja, saj je 69,6 %, zadnji del pa celo 86,6 %.

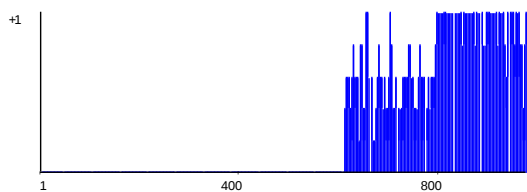


**Slika 39:** Grafičen prikaz podobnosti IR D in gena *uspII*.

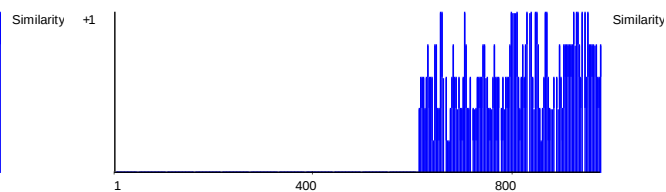


**Slika 40:** Grafičen prikaz podobnosti IR D in gena *uspI*.

Značilnosti regije B so podobne ostalim IR, saj je bolj podobna zaporedju gena *uspII*. Podobnost je 67,7 %, v zadnjem delu pa 84,6 % (**Slika 41**). Podobnost z *uspI* je manjša, 57,9 %, v zadnjem delu pa je 65,7 % (**Slika 42**).



**Slika 41:** Grafičen prikaz podobnosti IR B in gena *uspII*.



**Slika 42:** Grafičen prikaz podobnosti IR B in gena *uspI*.

## 5 RAZPRAVA

V zbirki 105. sevov *E. coli* smo s pomočjo reakcije PCR določili podtip PAI<sub>usp</sub>. Ugotovili smo, da večina sevov spada v podtip Ia, kjer nukleotidnemu zaporedju za genom *uspI* sledijo geni imunosti *imu1*, *imu2* ter *imu3*. Petdeset odstotkov sevov spada v to skupino. Četrtna sevov je spadala v podtip IIa, nekoliko manj (22 %) pa v podtip Ib. Podtip IIb se pojavlja zelo redko. Kot je bilo že znano iz prejšnjih raziskav se, gen *usp* večinoma pojavlja pri *E. coli* filogenetske skupine B2, kar smo potrdili tudi mi.

Podtipoma Ib in IIb manjkata po en gen imunosti. Preverili smo, če se gena *imu1* ter *imu2* nahajata izven otoka patogenosti in ugotovili, da ju ni v kromosomu preiskovanih sevov. Črnigoj in sodelavci (Črnigoj in sod., 2014) so pokazali, da je protein Imu1 pomemben pri obrambi bakterije pred lastnim proteinom Usp. Toksičnost proteina Usp je brez proteina Imu1 večja, s tem pa je večja nevarnost za bakterijsko celico, ki Usp proizvaja. Zato bi bilo smiselno, da bi se Imu1 pojavljal pri vseh podtipih, da lahko zavaruje celico pred DNazno aktivnostjo proteina Usp. Imu2 in Imu3 pri obrambi nimata tako pomembne vloge, vplivata pa na toksičnost samega proteina. Predvsem povezava med Usp in Imu3 močno vpliva na fiziologijo evkariontskih celic (Nipič in sod., 2013).

Preverjali smo prisotnost gena *tcpC* v izolatih *E. coli* in ugotovili, da je 17 % sevov *tcpC*<sup>+</sup>. Vsi *tcpC* pozitivni sevi spadajo v filogenetsko skupino B2, kar je bilo dokazano že v pri prejšnjih študijah. Podobno dejstvo smo potrdili tudi pri tipizaciji otoka patogenosti *pks*, saj se nahaja samo pri sevih filogenetske skupine B2. Slednji je bolj pogost kot *tcpC* in se pojavlja pri 28 % preiskovanih sevov. Ker so vsi virulentni dejavniki, ki smo jih dokazali v naši raziskavi, prisotni pri filogenetski skupini B2, je njihovo sopojavljanje statistično značilno. Medtem ko so Starčič Erjavec in sodelavci (Starčič-Erjavec in sod., 2010) pokazali, da se *tcpC* pogosto pojavlja pri sevih, ki imajo virulentne dejavnike *cnf1* in *hlyA*, smo v naši raziskavi pokazali, da se *tcpC* sopojavlja tudi z genom *usp*. Pri povezanosti *tcpC* s podtipi PAI<sub>usp</sub> smo ugotovili, da se gen *tcpC* pojavlja pri podtipu Ia in podtipu Ib, vendar za slednjega podatki niso bili statistično značilni. Gen *tcpC* se ne pojavlja pri podtipu IIa. Podtip IIb smo dokazali pri samo enem sevu, ki pa ni imel gena *tcpC* ali otoka patogenosti *pks*, zato sopojavljanje teh virulentnih dejavnikov ni statistično značilno. Da bi

izključili povezanost virulentnih dejavnikov s podtipom IIb, bi potrebovali več IIb+ sevov. Otok patogenosti *pks* je bil prisoten pri vseh sevih podtipa Ia in Ib.

Sevi bakterije *E. coli* so zelo variabilni, saj je njihov genom izredno dinamičen. S primerjalnimi študijami so ugotovili, da ima horizontalni prenos genov, izguba ali dodajanje genov ter njihova prerazporeditev velik vpliv na sposobnost prilagajanja v gostitelju ter na virulenco mikroorganizma. Spremembe genov imajo pomembno vlogo pri evoluciji bakterije, še posebno so temu podvrženi otoki patogenosti (Brzuszkiewicz in sod., 2006).

PAI<sub>usp</sub> je nedvomno mobilni element, ki ga je bakterija *E. coli* prejela s horizontalnim prenosom genov. Kot so napisali Kurazono in sodelavci, je otok pridobila s transpozicijo. Ob analizi nukleotidnega motiva so predpostavili, da gre za mobilni element iz družine transpozonov Tn3 (Kurazono in sod., 2000). Številni otoki patogenosti so izredno mobilni in se preko plazmidov ali fagov prenašajo v druge bakterijske celice, obstajajo pa tudi takšni, ki so močno integrirani v kromosom gostitelja in so že izgubili številne lastnosti, ki so značilne za PAI. Elementi otoka postanejo del gostiteljeve genetske informacije. Tako lahko opazimo, da številni PAI nimajo več genov za integracijo ali transpozacijo. Primer je *Listeria monocytogenes* in PAI LIPI-1 ter PAI<sub>cag</sub> pri bakteriji *Helicobacter pylori* (Schmidt in Hensel, 2004). Tudi PAI<sub>usp</sub> primanjkujejo številne lastnosti otokov patogenosti npr. tako se v bližini ali znotraj PAI ne nahajata transpozaza in resolvaza, prav tako se v PAI ne nahaja gen za integracijo, otok pa ni vstavljen v bližino genov tRNK in je relativno kratek. Te spremenjene lastnosti nakazujejo na to, da je *E. coli* otok pridobila že dolgo nazaj, ta pa je bil kasneje podvržen mutacijam, delecijam in prerazporejanju genov, kar je vodilo v nastanek več podtipov PAI<sub>usp</sub>.

S poravnavo aminokislinskega zaporedja proteinov UspI in UspII, smo pokazali očitne razlike v C-terminalnem delu proteina, medtem ko je N-terminalna regija močno ohranjena. Ugotovili smo tudi homologijo nukleotidnega zaporedja navzgor od gena *imu2* in regijo gena *uspII*, ki kodira H-N-H regijo pomembno za endonukleazno aktivnost proteina. Podobnost je 97 % in definira podtip gena *uspII*. Genu *uspI* vedno sledi *imu1*. Tako je znotraj gena *usp*, kot tudi v samem PAI<sub>usp</sub>, očitna mozaična struktura, ki je najverjetneje posledica rekombinacij segmentov, ki so se združili pri horizontalnem

prenosu genov. Glede na razporejenost segmentov, bi lahko predvidevali, da je evolucijsko starejši gen *uspI*, nato pa je prišlo do rekombinacije, kjer se je na 3'-konec vstavila regija od IR A do *imu3*, kar je spremenilo nukleotidno in s tem tudi AK zaporedje proteina Usp. Tako se je spremenilo tudi zaporedje genov imunosti, nastali pa so različni podtipi. Podobno prerazporejanje lahko opazimo v PAI LEE ter genu *eae*, ki kodira intimin. Obstajajo številne različice gena, vsem pa je skupna mozaična struktura, ki je posledica rekombinacije. Podobno, kot pri *usp*, je tudi tu spremembam najbolj podvržen 3'-konec gena. Segmentiranost je prav tako značilna za celoten PAI LEE (McGraw in sod., 1999).

Že dolgo je znano, da se geni bakterij, ki so združeni v operone, pogosto prepisujejo v skupno mRNK. Prvi opisani je bil operon *lac* bakterije *E. coli*, odgovoren za prenos in metabolizem laktoze pri *E. coli*. Geni, pomembni pri metabolizmu laktoze, se prepišejo v skupno mRNK, informacija pa se na ribosomu prevede v različne proteine. Policistronska mRNK se pri prokariotih pogosto pojavlja in velja bolj za pravilo kot izjemo (Kozak, 1983). Številni otoki patogenosti se izražajo na tak način, npr. PAI LEE pri sevih EPEC, ki je organiziran v 5 policistronskih operonov (Gal-Mor in Finlay, 2006), ter operon *mpt* pri bakteriji *Mycobacterium avium* (Heinzmann in sod., 2008).

Zanimalo nas je, če se tudi geni PAI*usp* prepisujejo v skupno molekulo mRNK. Zato smo iz sevov *usp*<sup>+</sup> izolirali celokupno mRNK ter jo prevedli v cDNK, ki smo jo uporabili za analizo PCR. Podobno analizo so leta 2000 opravili tudi Klein in sodelavci, ki so pri bakteriji *Salmonella enterica* ugotovili, da se kar 10 genov otoka patogenosti 1 prepisuje v skupno mRNK (Klein in sod., 2000). Ugotovili smo, da se gen *usp* prepisuje skupaj z geni imunosti *imu1*, *imu2* ter *imu3*. Rezultat ni presenetljiv, če upoštevamo dejstvo, da je policistronska mRNK pri prokariotih pogosta. Geni imunosti so pomembni za zaščito bakterijske celice, ki proizvaja Usp, zato je nujno, da se le-ti izražajo istočasno kot toksin. Hkrati naj bi protein Imu3 bistveno povečal toksičnost toksina Usp (Nipič in sod, 2013), kar bi lahko bil dodaten razlog za skupen prepis.

S tem, ko smo pridobili nukleotidna zaporedja PAI*usp* sevov različnih podtipov, smo lahko le-te primerjali med seboj. Hitro smo ugotovili razlike v samem genu *usp* ter njegovo povezanost z genom imunosti, ki mu sledi. Gen *uspI* je povezan z genom *imu1*, opazimo pa

lahko, da je baza adenin terminalnega kodona *usp* del start kodona gena *imu1*. Gre torej za prekrivanje genov.

Pri večini policistronskih mRNK so medgenske regije dolge od 1 do 400 nukleotidov in ločujejo kodirajoča zaporedja. Vendar obstajajo številni primeri kodirajočih zaporedij, ki se prekrivajo, pogosto so ta prekrivanja na terminalnem kodonu (Kozak, 1983), to lahko vidimo tudi pri genu *uspI*. Pri prevajanju takšno prekrivanje nima negativnega vpliva na nastanek proteinov (Kozak, 1983). Gre namreč za mehanizem, ki ga imenujemo translacijska reiniciacija (ang. »translational reinitiation ali translational coupling«). Ribosom pri prevajanju v protein doseže terminacijsko mesto in takoj začne prevod drugega proteina, katerega začetni kodon se nahaja v bližini, ali pa se tako kot pri genu *uspI* prekriva s terminacijskim mestom prvega proteina (Andre in sod., 2000). Gen *uspII* je povezan z genom *imu2*, gena pa se ne prekrivata.

Kljub temu, da se nukleotidno zaporedje gena *uspI* razlikuje od gena *uspII*, v bazi podatkov nismo našli dokaza, da se razlikuje tudi aktivnost samih proteinov. Oba imata kolicinsko DNazno domeno z endonukleazno domeno H-N-H. Da bi ugotovili razlike v toksičnosti obeh proteinov, bi ju morali testirati na evkariontskih celicah. V raziskavi, ki so jo opravili Nipič in sodelavci (Nipič in sod., 2013), se je izkazalo, da je protein Usp ob prisotnosti Imu3 bolj toksičen, vendar ni znano, če je bil testiran protein UspI ali UspII. Možno je, da so sevi podtipa IIb bolj patogeni, saj nimajo gena *imu1*, ki je odgovoren za zaščito bakterije producentke, imajo pa *imu2* ter *imu3*. Slednji močno poveča genotoksično aktivnost proteina Usp, pojavlja pa se pri vseh štirih podtipih PAI*usp*, kar nakazuje na njegovo pomembnost pri patogenezi sevov *usp*<sup>+</sup>.

S primerjavo nukleotidnih zaporedij, ki smo jih pridobili sami in iz podatkovnih baz, smo ugotovili, da znotraj gena *usp* prihaja do mutacij, ki lahko odločilno vplivajo na aktivnost samega proteina. V primeru seva H24 in Z13 je prišlo do dodajanja nukleotidov v samem genu, kar je močno spremenilo bralni okvir, s tem pa je protein izgubil ključne domene, ki mu omogočajo toksičnost.

## 6 SKLEPI

- Podtip PAI<sub>usp</sub>, ki je najbolj razširjen, je Ia, saj se je pojavljal pri polovici testiranih sevov, sledita mu IIa ter Ib. Podtip IIb je najmanj pogost.
- Geni imunosti, ki manjkajo v samem PAI<sub>usp</sub>, se ne nahajajo na drugem mestu kromosoma *E. coli*.
- Gen *tcpC* se pojavlja pri 17 % testiranih sevov.
- Otok patogenosti *pks* se pojavlja pri 28 % testiranih sevov.
- Gen *tcpC* se pogosto pojavlja skupaj z genom *usp*, najpogosteje pri podtipu Ia.
- Otok patogenosti *pks* se pogosto pojavlja pri podtipih Ia ter Ib.
- PAI<sub>usp</sub> je mobilni element, ki ga je *E. coli* pridobila s horizontalnim prenosom genov.
- Horizontalni prenos PAI<sub>usp</sub> se je zgodil že zelo dolgo nazaj, nukleotidno zaporedje pa je bilo podvrženo številnim delecijami in rekombinacijam, ki so povzročile nastanek različnih podtipov.
- Gen *usp* se skupaj z geni imunosti prepisuje v policistronsko mRNK, ki se nato na ribosomu prevedejo v različne proteine.
- Gena *uspI* ter *imu1* se prekrivata.
- Ni dokazov za raznolikost aktivnosti proteinov UspI in UspII, kljub temu da imata različne C-terminalne konce.
- Pri pregledu nukleotidnih zaporedij smo odkrili seve z mutacijami v genu *usp*. Te mutacije najverjetneje vplivajo na aktivnost proteina, saj zaradi spremenjenega bralnega okvirja nima endonukleazne domene.

## 7 POVZETEK

Okužbe urinarnega trakta so najbolj pogosta oblika zunajčrevesne okužbe, ki jo v večini primerov povzroča bakterija *E. coli*. Je zelo variabilna vrsta bakterije, okužbe pa povzročajo tisti sevi, ki so pridobili zapise za virulentne dejavnike. Eden takšnih je PAI*usp*, ki so ga odkrili leta 2000 in kodira protein Usp z endonukleazno aktivnostjo. Poleg gena *usp* se na otoku nahajajo še 3 odprti bralni okvirji, ki kodirajo proteine imunosti (*imu1-3*), le-ti pa varujejo bakterijo pred lastnim proteinom Usp. PAI*usp* povezujejo s uropatogenimi sevi *E. coli*. Obstajajo podtipi PAI*usp*, ki se razlikujejo po razporeditvi genov imunosti in nukleotidnem zaporedju gena *usp*. V tej raziskavi smo želeli pojasniti kako nastajajo podtipi, kateri prevladujejo in kako so povezni z virulentnima dejavnikoma *tcpC* ter otokom patogenosti *pks*. Z izolacijo RNK smo preverili, kako se gen *usp* prepisuje.

Ugotovili smo, da se najpogosteje pojavlja podtip Ia (50 %), sledita mu IIa (25 %) in Ib (22 %). Podtip IIb smo dokazali samo pri enem testiranem sevu. Gen *tcpC* se je pojavljal pri 17 % sevov iz zbirke in se pogosto pojavlja z genom *usp*, predvsem pri podtipu Ia. Otok patogenosti *pks* smo dokazali pri 28 % sevov in se je pogosto pojavljal pri podtipih Ia ter Ib.

Izolacija celokupne RNK je pokazala, da se vsi geni v otoku patogenosti prepisujejo skupaj v policistronsko mRNK.

Z analizo nukleotidnega zaporedja PAI*usp* smo prikazali mozaično strukturo genov in intergenskih regij, ki so podvržene rekombinacijam. Zaporedje genov imunosti se je ob tem spremenilo, nastali pa so različni podtipi. Nekaterim celo manjkajo geni imunosti, kar je najverjetneje posledica delecij. Spremembam je podvržen tudi 3' konec gena *usp*. Na tem delu gena se je skupaj z genom *imu2* vstavila intergenska regija in s tem povzročila 2 različici gena *usp*.

## 8 VIRI

Andre A., Puca A., Sansone F., Brandi A., Antico G., Calogero A. 2000. Reinitiation of protein synthesis in *Escherichia coli* can be induced by mRNA cis-elements unrelated to canonical translation initiation signals. Federation of European Biochemical Societies, 468: 73-78

Bien J., Sokolova O., Bozko. P. 2012. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. International Journal of Nephrology, 2012: 1-15

Bowie A., Kiss-Toth E., Symons J.A., Smith G.L., Dower S.K. 2000. A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97: 10162-10167

Brzuszkiewicz E., Brüggemann H., Llesegang H., Emmerth M., Ölschläger T., Nagy G., Albermann K., Wagner C. 2006. How to become a uropathogen: Comparative genome analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103: 12879-12884

Cirl C., Wieser A., Yadav M., Duerr S., Schubert S. 2008. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. Nature Medicine, 14: 399-406

Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Applied and Environmental Microbiology, 66: 4555-4558

Cuevas-Ramos G., Petita C.R., Marcq I., Boury M., Oswald E., Nougayrède JP. 2010. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107: 11537-11542

Črnigoj M., Podlesek Z., Budic M., Žgur-Bertok D. 2014. The *Escherichia coli* uropathogenic-specific-protein-associated immunity protein 3 (Imu3) has nucleic acid - binding activity. *BMC Microbiology*, 14: 1-8

Eberspächer B., Hugo F., Bhakdi S. 1989. Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of *Escherichia coli* hemolysin. *Infection and immunity*, 57: 983-988

Gal-Mor O., Finlay B. 2006. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular Microbiology*, 8: 1707-1719

Gunther N. W., Snyder J.A., Lockatell V., Blomfield I., Johnson D.E., Mobley H.L.T. 2002. Assessment of virulence of uropathogenic *Escherichia coli* Type 1 fimbrial mutants in which the invertible element is phase-locked On or Off. *Infection and Immunity*, 70: 3344-3354

Heinzmann J., Wilkens M., Dohmann K., Gerlach G. 2008. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-specific *mpt* operon expressed in *M. bovis* BCG as vaccine candidate. *Veterinary microbiology*, 130: 330-337

Hofman P., Le Negrate G., Mograbi B., Hofman V., Brest P., Alliana-Schmid A., Flatau G., Boquet P., Rossi B. 2000. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1) increases the adherence to epithelia and the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes but decreases bacteria phagocytosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 68: 522-528.

Homburg S., Oswald E., Hacker J., Dobrindt U. 2007. Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. *Federation of European Microbiological Societies*, 275: 255-262

Hung C., Bouckaert J., Hung D., Pinkner J., Widberg C., DeFusco A., Auguste C.G., Strouse R., Langermann S., Waksman G., Hultgren S. J. 2002. Structural basis of tropism

of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Molecular Microbiology*, 44: 903-915

Johnson J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 80-128

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: 754-760

Kawai T., Akira S. 2006. TLR signaling. *Cell death and differentiation*, 13: 816-825.

Kennedy R. P., Plorde J. J., Petersdorf R. G. 1965. Studies on the epidemiology of *Escherichia coli* infections. IV. Evidence for a nosocomial flora. *Journal of Clinical Investigation*, 44: 194-201

Klein J., Fahlen T., Jones B. 2000. Transcriptional organization and function of invasion genes within *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenicity island 1, including the *prgH*, *prgI*, *prgJ*, *prgK*, *orgA*, *orgB* and *orgC* genes. *Infection and immunity*, 68: 3368-3376

Kouokam J.C., Nyunt Wai S., Fällman M., Dobrindt U., Hacker J., Uhlin B.E. 2006. Active cytotoxic necrotizing factor 1 associated with outer membrane vesicles from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 74: 2022-2030.

Kozak M., 1983. Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiological Reviews*, 3: 1-45

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: 183-189

Langrud 2004. Fischer's exact test. Oslo, Statistics Norway, Division for statistical methods and standards: software.

<http://www.langsrud.com/fisher.htm> (oktober, 2014)

Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A., Clark D.P. 2012. Molecular biology of Bacteria. V: Brock Biology of Microorganisms. Espinosa D. (eds). 13<sup>th</sup> ed. San Francisco, Pearson Education: 151-235

Marrs C.F., Zhang L., Foxman B. 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 252: 183-190

Mcgraw E., Li J., Selander R.K., Whittam T.S. 1999. Molecular evolution and mosaic structure of  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  intimins pf pathogenic *Escherichia coli*. Molecular Biology and Evolution, 16: 12-22

Mulvey M.A. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. Cellular Microbiology, 4: 257-271

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. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 205: 71-76

Newman R.M., Salunkhe P., Godzik A., Reed J.C. 2006. Identification and characterization of a novel bacterial virulence factor that shares homology with mammalian Toll/interleukin-1 receptor family proteins. Infection and Immunity, 74: 594-601

Nipič D., Podlesek Z., Budic M., Črnigoj M., Žgur-Bertok D. 2013. *Escherichia coli* uropathogenic-specific protein, Usp, is a bacteriocin-like genotoxin. The Journal of Infectious Diseases, 208: 1545-1552

Nougayrède, JP., Homburg S., Taieb F., Boury M., Brzuszkiewicz E., Gottschalk G., Buchrieser C., Hacker J., Dobrindt U., Oswald E. 2006. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. Science, 313: 848-851

Orskov F., Orskov I. 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. Canadian Journal of Microbiology, 38: 699-704

Parret A., De Mot R. 2002. *Escherichia coli*'s uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity? Microbiology, 148: 1604-1606

Riley M. A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. Annual Review of Genetics, 32: 255-278

Russo T. A., Johnson J. R. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. The Journal of Infectious Diseases, 181: 1753-1754

Schaeffer A. J., Schaeffer E. M. 2007. Infections of the urinary tract. V: Campbell-Walsh Urology. Wein A.J., Kavoussi L. R. (eds). 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Saunders: 257-326

Secher T., Samba-Louaka A., Oswald E., Nougayrède JP. 2013. *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. Public Library of Science ONE, 8: 1-17

Schmidt H., Hensel M. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clinical Microbiology Reviews, 17: 14-56

Sokolowska-Köhler W., Schönián G., Bollmann R., Schubert A., Parschau J., Seeberg A., Presber W. 1997. Occurrence of S and F1C/S-related fimbrial determinants and their expression in *Escherichia coli* strains isolated from extraintestinal infections. Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology, 18: 1-6

Starčič Erjavec M., Jesenko B., Petkovšek Ž., Žgur-Bertok D. 2010. Prevalence and associations of *tcpC*, a gene encoding a toll/Interleukin-1 receptor domain-containing protein, among *Escherichia coli* urinary tract infection, skin and soft tissue infection, and commensal isolates. Journal of Clinical Microbiology, 48: 966-968

Starčič Erjavec M., Žgur-Bertok D. 2011. Extended characterization of human uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Slovenia. V: Clinical Management of Complicated Urinary Tract Infection. Nikibakhsh A. (ed). Rijeka, InTech: 36-50

Thura Zaw M., 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 H-N-H nuclease superfamily. Gut Pathogens, 5: 1-9

Wroblewska-Seniuk K., Selvarangan R., Hart A., Pladzyk R., Goluszko P., Jafari A., du Merle L., Nowicki S., Yallampalli C., Le Bouguenec C., Nowicki B. 2005. Dra/AfaE adhesin of uropathogenic Dr/Afa *Escherichia coli* mediates mortality in pregnant rats. Infection and Immunity, 73: 7597-7601

Yadav M., Zhang J., Fischer H., Huang W., Lutay N., Cirl C., Lum J., Miethke T., Svanborg C. 2010. Inhibition of TIR domain signaling by TcpC: MyD88-dependent and independent effects on *Escherichia coli* virulence. PLOS Pathogens, 6: 1-18

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. The Journal Of Urology, 165: 1347–1351

## ZAHVALA

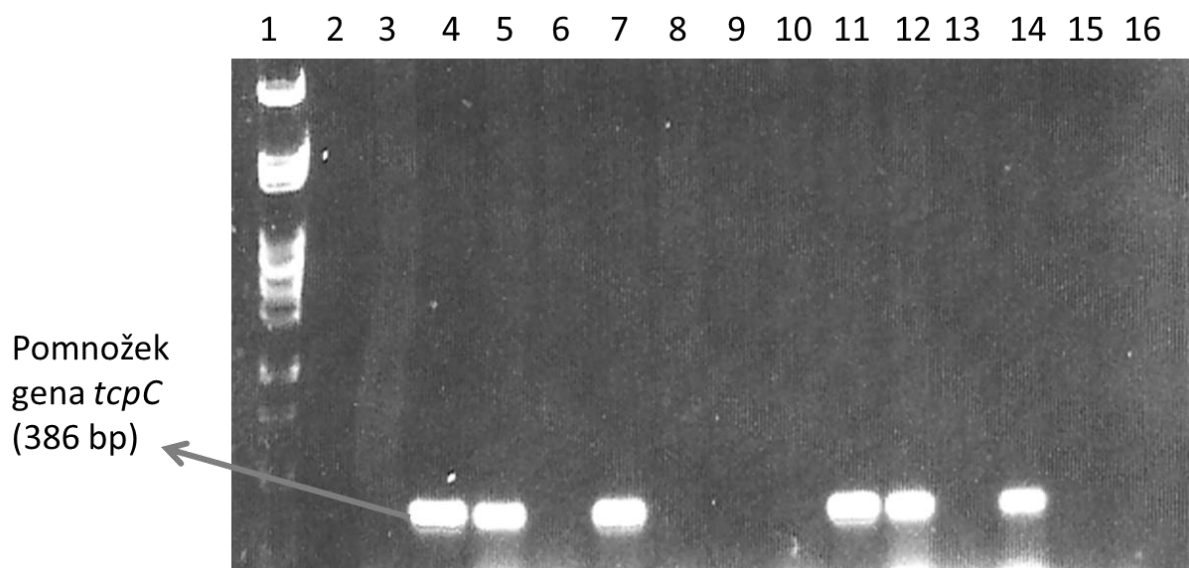
Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Darji Žgur-Bertok za vodenje, nasvete in pomoč pri nastajanju magistrske naloge ter dr. Zdravku Podlesku za vodenje in pomoč pri laboratorijskem delu. Iskrena hvala tudi prof. dr. Manici Mueller-Premru za hitro recenzijo.

Posebna zahvala gre tudi moji družini – mami, očetu in sestrama Tamari ter Jerneji za vso pomoč in podporo tekom mojega študija.

Hvala tudi vsem, ki ste mi stali ob strani, in ste kakorkoli pripomogli k uspešnemu zaključku izdelave te magistrske naloge.

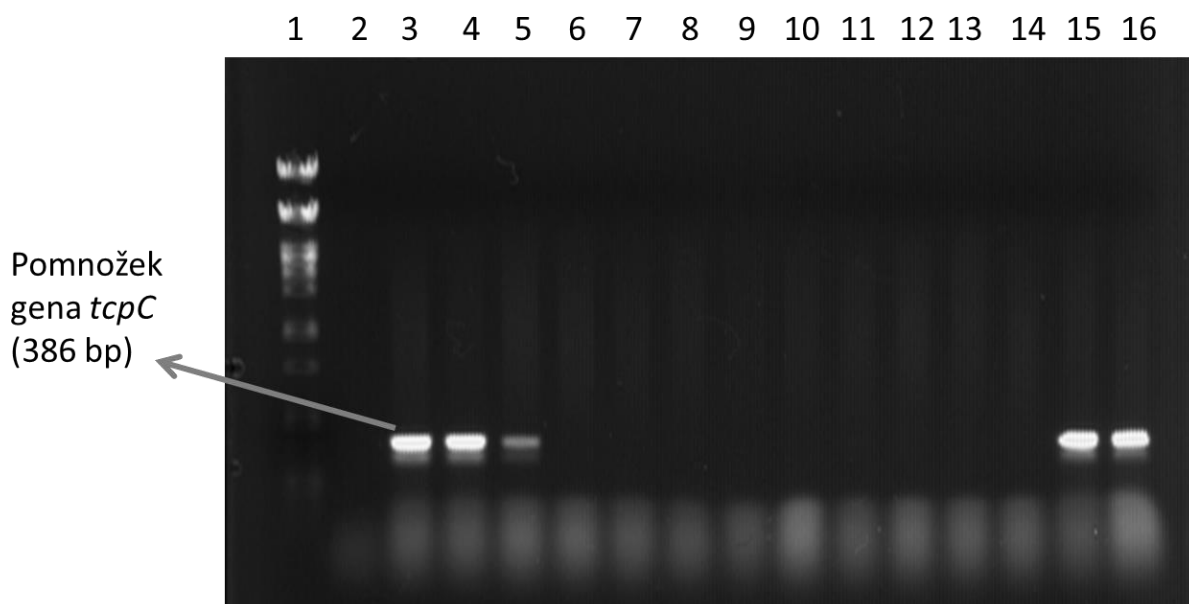
## PRILOGE

**Priloga A:** Rezultati pomnoževanja gena *tcpC* z verižno reakcijo s polimerazo.



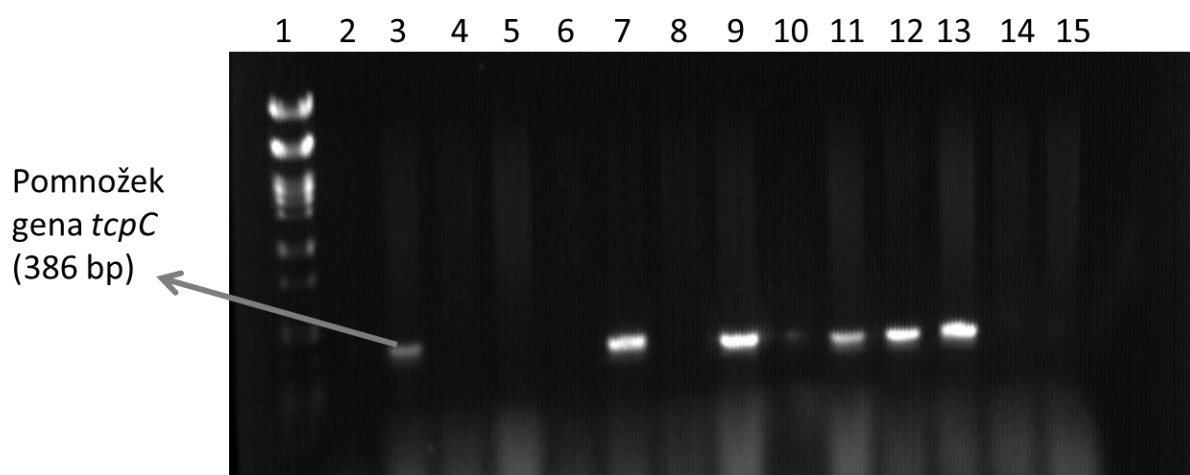
**Priloga A1:** Rezultati pomnoževanja gena *tcpC* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – negativna kontrola, 3 – negativna kontrola, 4 – sev H6, 5 – sev H10, 6- sev H24, 7- sev H28, 8 – sev H30, 9- sev H33, 10- sev H35, 11- sev H36, 12 - sev H38, 13- sev H41, 14- sev H50, 15- sev H54, 16- sev H61



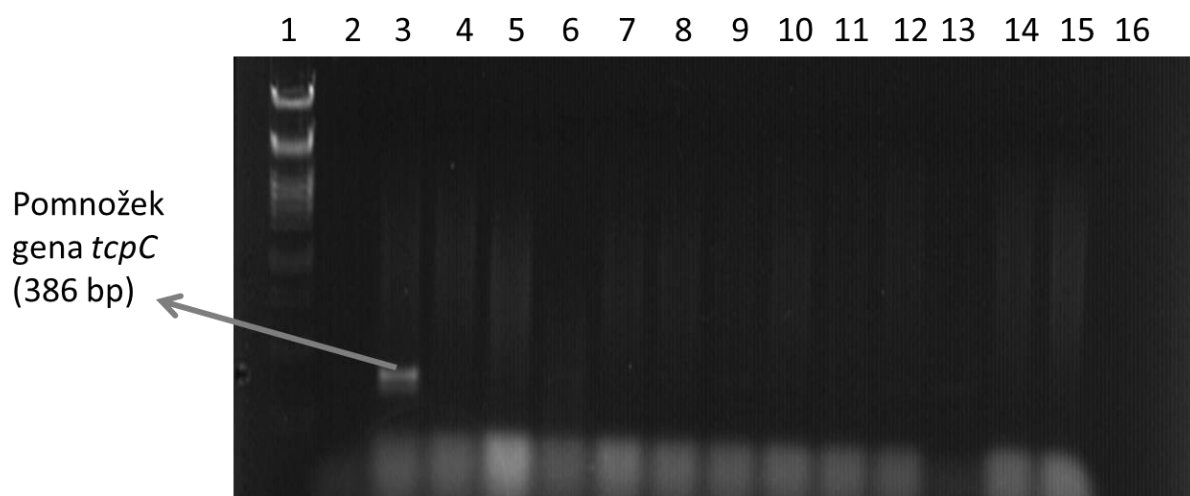
**Priloga A2:** Rezultati pomnoževanja gena *tcpC* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – negativna kontrola, 3 – pozitivna kontrola, 4 – sev H62, 5 – sev H71, 6- sev H74, 7- sev H79, 8 – sev HS2, 9- sev HS3, 10- sev HS6, 11- sev HS8, 12 - sev HS11, 13- sev HS15, 14- sev HS16, 15- sev HS20, 16- sev HS22



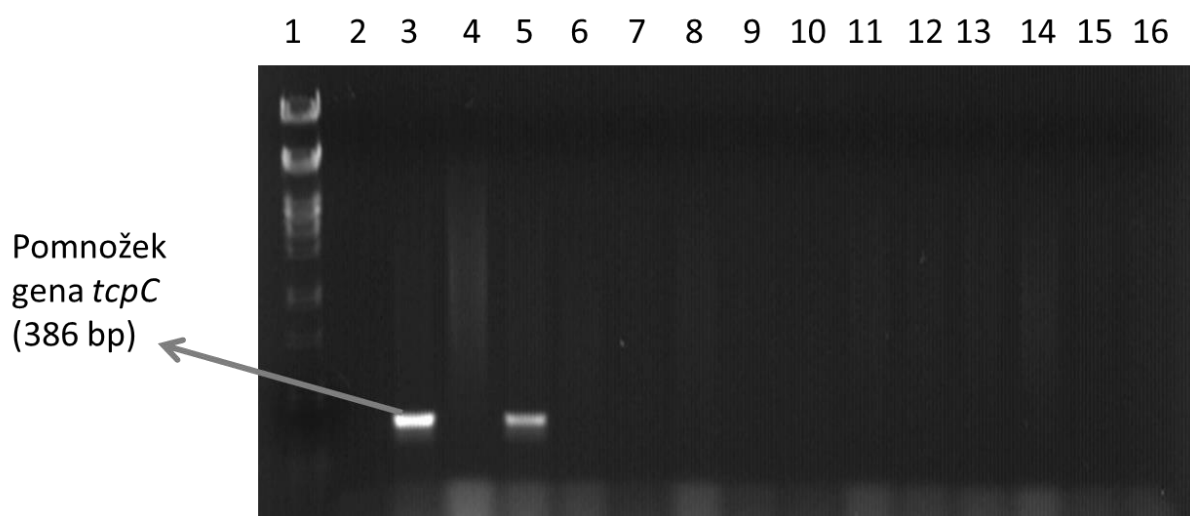
**Priloga A3:** Rezultati pomnoževanja gena *tcpC* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – negativna kontrola, 3 – pozitivna kontrola, 4 – sev HS23, 5 – sev HS24, 6- sev HS27, 7- sev HS32, 8 – sev HS33, 9- sev HS34, 10- sev HS47, 11- sev HS49, 12 - sev HS50, 13- sev CHS2, 14- sev H1, 15- sev H2



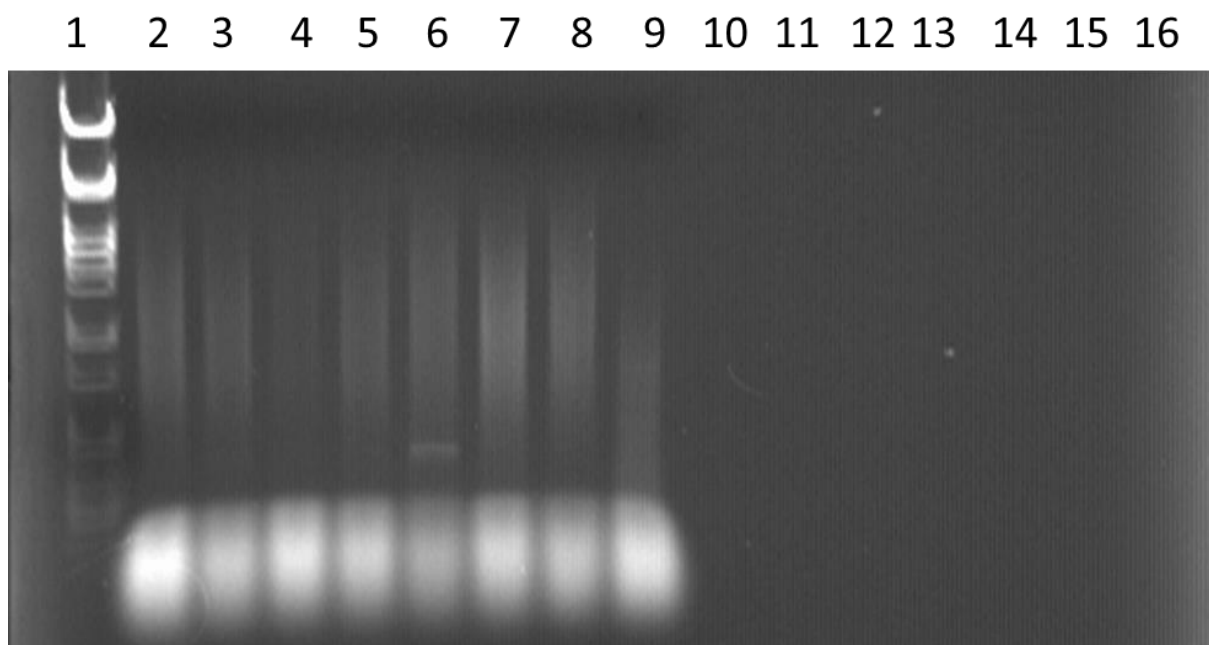
**Priloga A4:** Rezultati pomnoževanja gena *tcpC* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – negativna kontrola, 3 – pozitivna kontrola, 4 – sev H3, 5 – sev H4, 6- sev H5, 7- sev H8, 8 – sev H9, 9- sev HS11, 10- sev H13, 11- sev H15, 12 - sev H16, 13- sev HS47, 14- sev H1, 15- sev H2



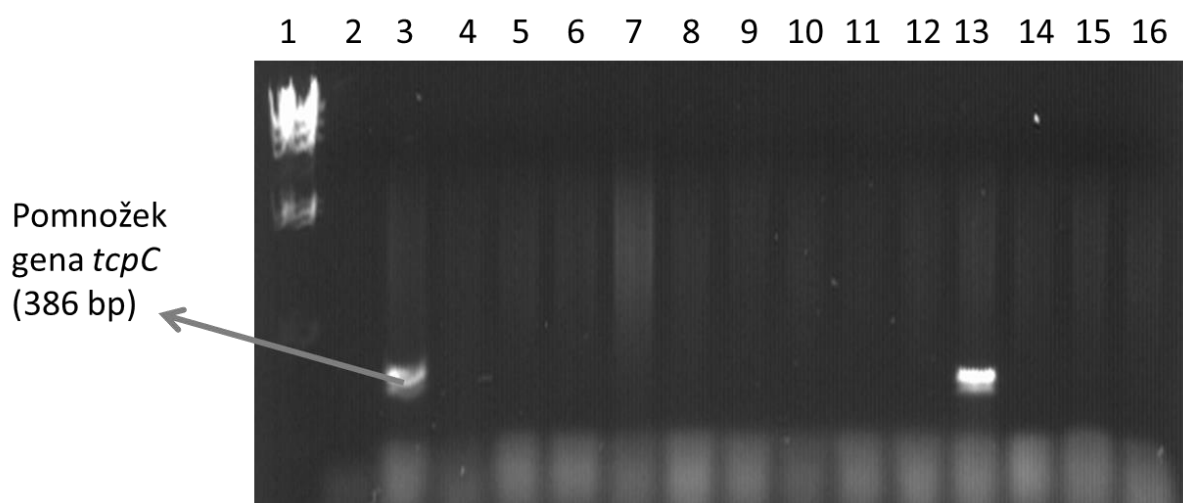
**Priloga A5:** Rezultati pomnoževanja gena *tcpC* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – negativna kontrola, 3 – pozitivna kontrola, 4 – sev H17, 5 – sev H18, 6- sev H19, 7- sev H20, 8 – sev H21, 9- sev H27, 10- sev H29, 11- sev H32, 12 - sev H39, 13- sev H42, 14- sev H43, 15- sev H44, 16- sev H45



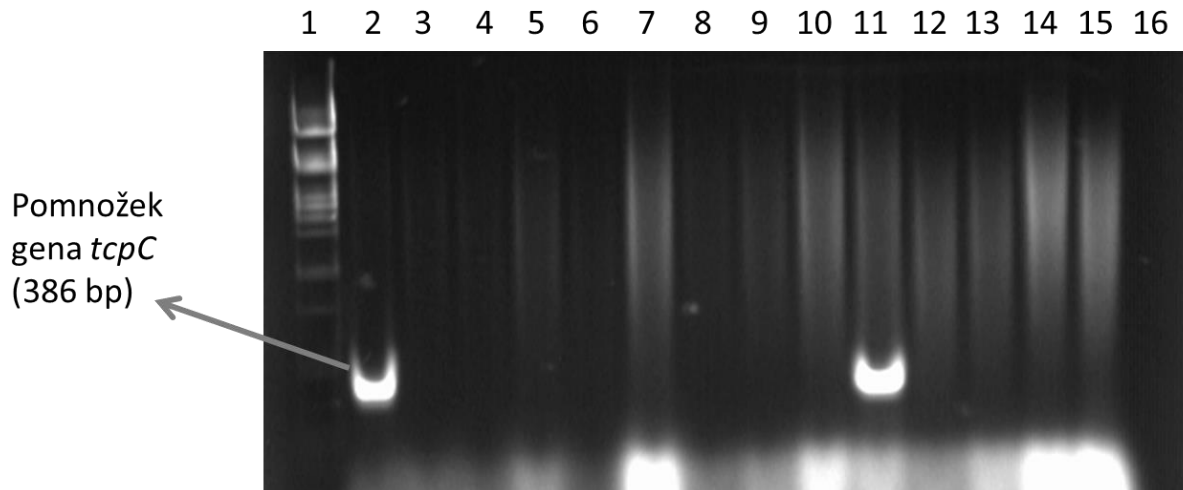
**Priloga A6:** Rezultati pomnoževanja gena *tcpC* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – sev H46, 3 – sev H48, 4 – sev H49, 5 – sev H51, 6- sev H52, 7- sev H55, 8 – sev H58, 9- sev H59



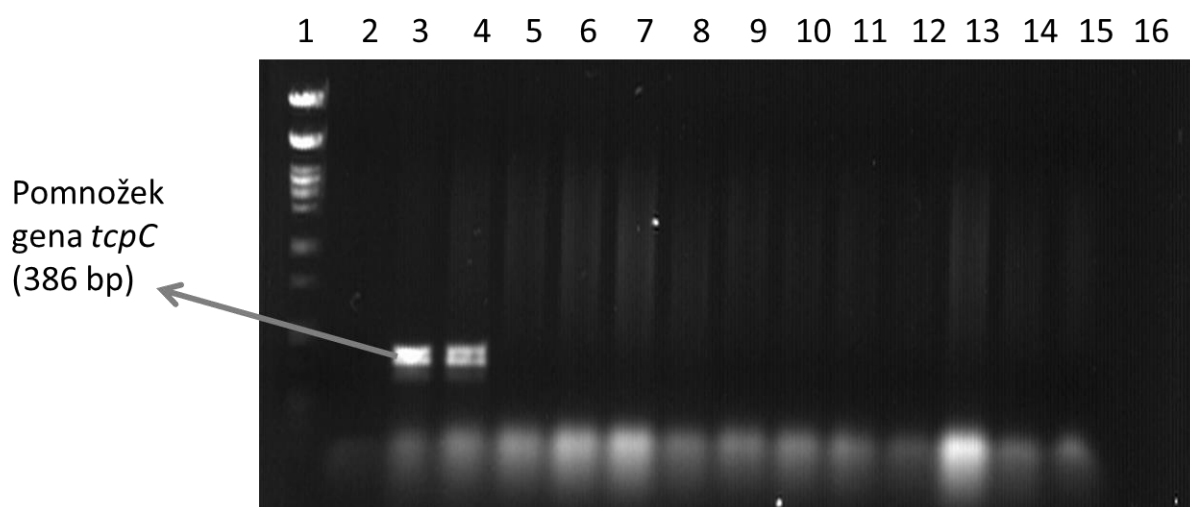
**Priloga A7:** Rezultati pomnoževanja gena *tcpC* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – negativna kontrola, 3 – pozitivna kontrola, 4 – sev H52, 5 – sev H60, 6- sev H63, 7- sev H65, 8 – sev H67, 9- sev H68, 10- sev H72, 11- sev H75, 12 - sev H76, 13- sev H77, 14- sev H78, 15- sev H80, 16- sev HS1



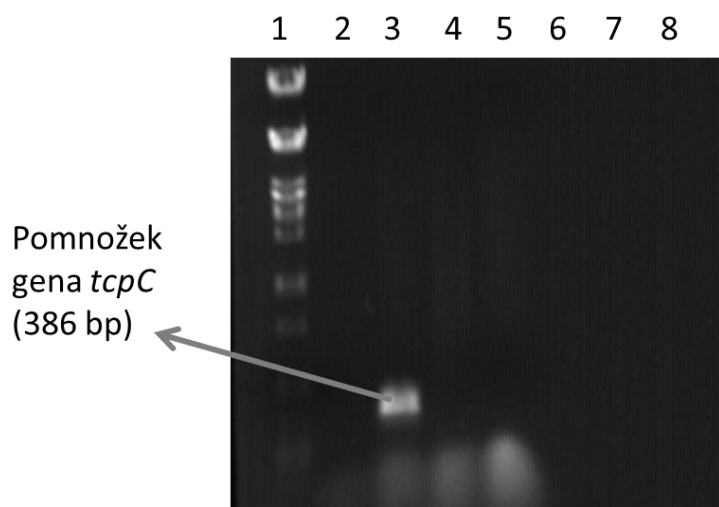
**Priloga A8:** Rezultati pomnoževanja gena *tcpC* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – pozitivna kontrola, 3 – HS4, 4 – sev HS7, 5 – sev HS13, 6- sev HS18, 7- sev HS19, 8 – sev HS23, 9- sev HS30, 10- sev HS31, 11- sev HS34, 12 - sev HS36, 13- sev HS37, 14- sev HS38, 15- sev HS39



**Priloga A9:** Rezultati pomnoževanja gena *tcpC* z verižno reakcijo s polimerazo.

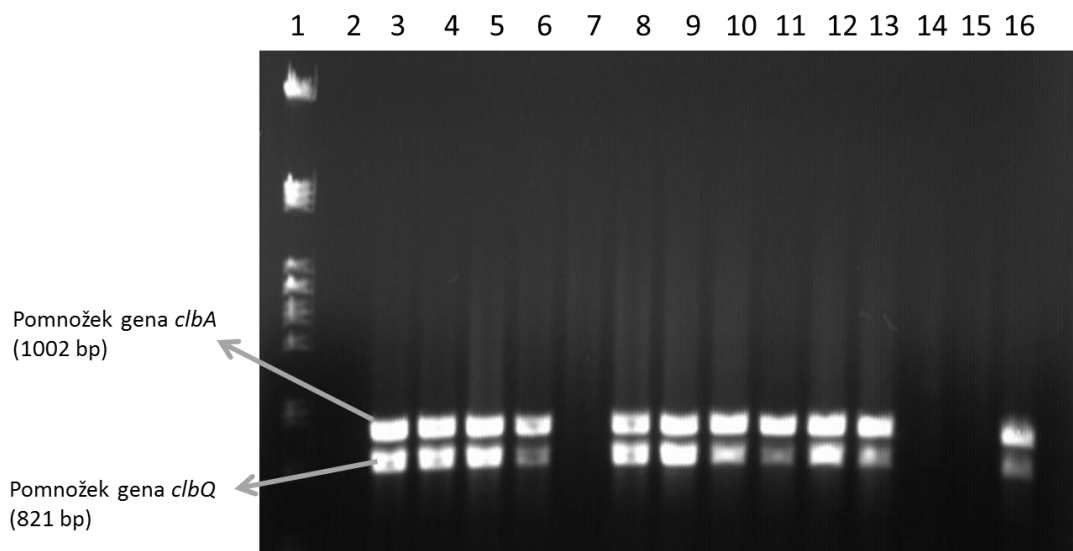
Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – negativna kontrola, 3 – pozitivna kontrola, 4 – sev HS41, 5 – sev HS42, 6- sev HS45, 7- sev HS46, 8 – sev HS48, 9- sev CH1, 10- sev CH2, 11- sev CH3, 12 - sev CH5, 13- sev CH9, 14- sev CH14, 15- sev CH15



**Priloga A10:** Rezultati pomnoževanja gena *tcpC* z verižno reakcijo s polimerazo.

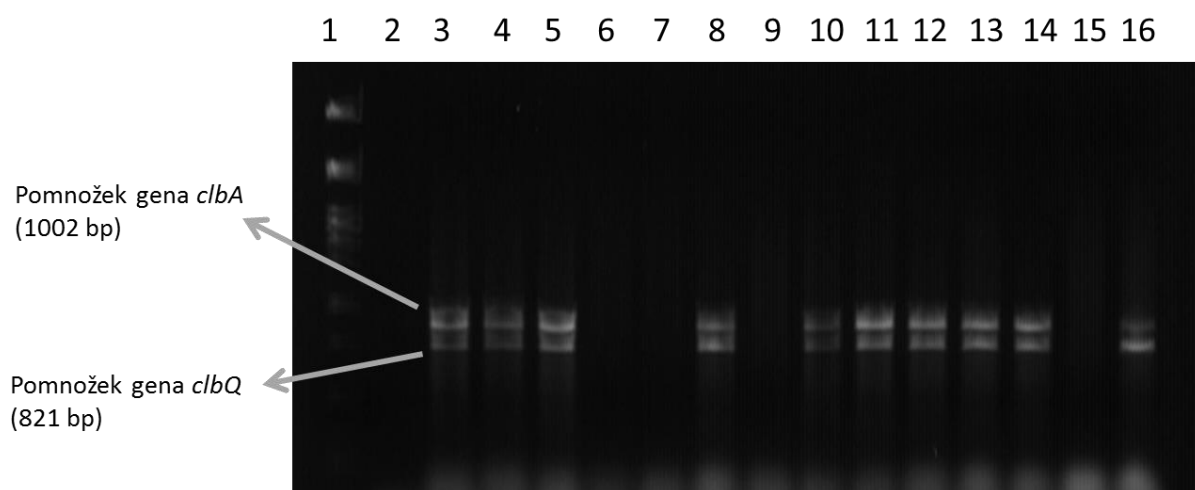
Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – negativna kontrola, 3 – pozitivna kontrola, 4 – sev CH4, 5 – sev CHS3

**Priloge B:** Rezultati pomnoževanja gena *clbA* in *clbQ* z verižno reakcijo s polimerazo.



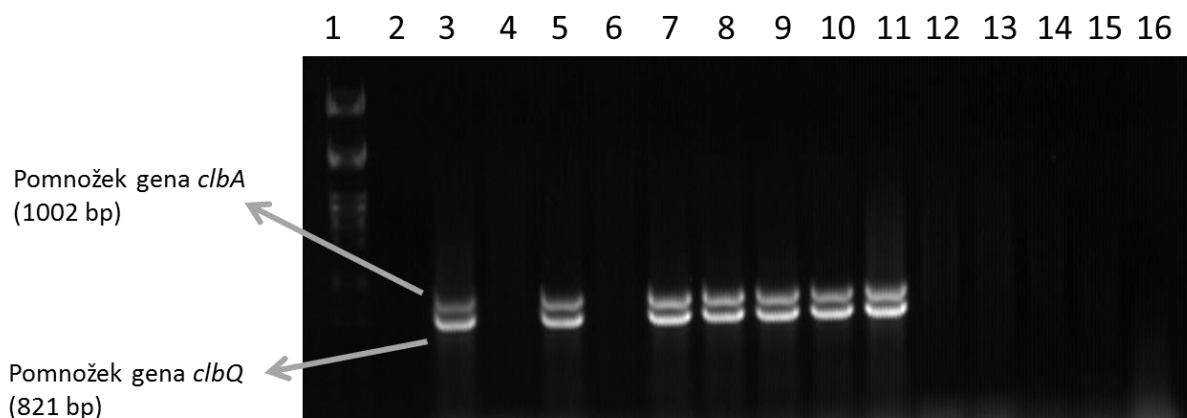
**Priloga B1:** Rezultati pomnoževanja gena *clbA* in *clbQ* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – negativna kontrola, 3 –sev H6 , 4 – sev H10, 5 – sev H24, 6- sev H28, 7- sev H30, 8 – sev H33, 9- sev H35, 10- sev H36, 11- sev H38, 12 - sev H41, 13- sev H50, 14- sev H54, 15- sev H61 , 16- sev H62



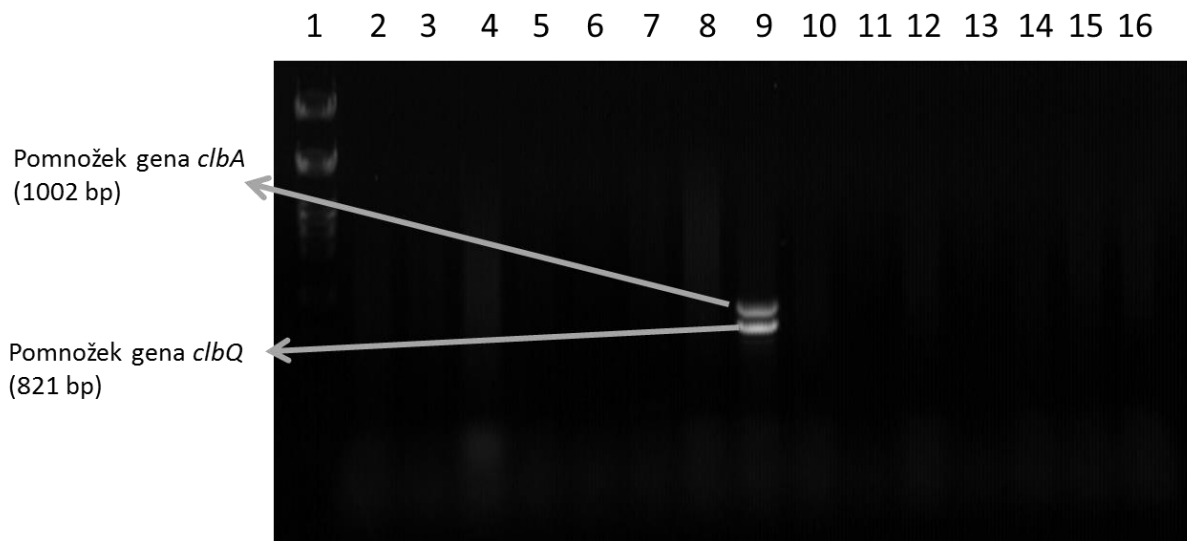
**Priloga B2:** Rezultati pomnoževanja gena *clbA* in *clbQ* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – negativna kontrola, 3 –sev H71 , 4 – sev H74, 5 – sev H79, 6- sev HS2, 7- sev HS3, 8 – sev HS6, 9- sev HS8, 10- sev HS11, 11- sev HS15, 12 - sev HS16, 13- sev HS20, 14- sev HS22, 15- sev HS23 , 16- sev HS24



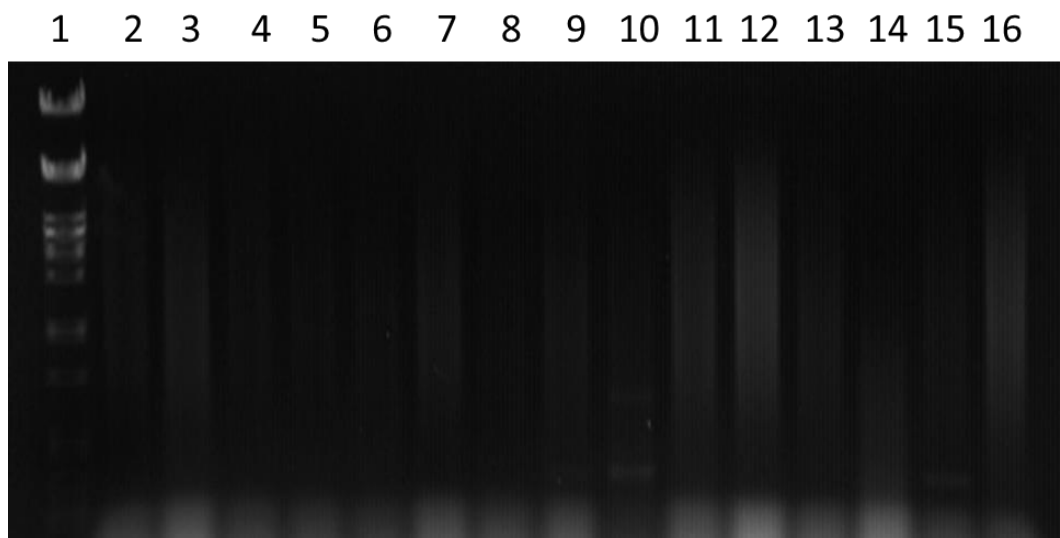
**Priloga B3:** Rezultati pomnoževanja gena *clbA* in *clbQ* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – negativna kontrola, 3 – pozitivna kontrola, 4 – sev HS27, 5 – sev HS32, 6- sev HS33, 7- sev HS34, 8 – sev HS47, 9- sev HS49, 10- sev HS50, 11- sev CHS2, 12 - sev H1, 13- sev H2, 14- sev H3, 15- sev H4, 16- sev H5



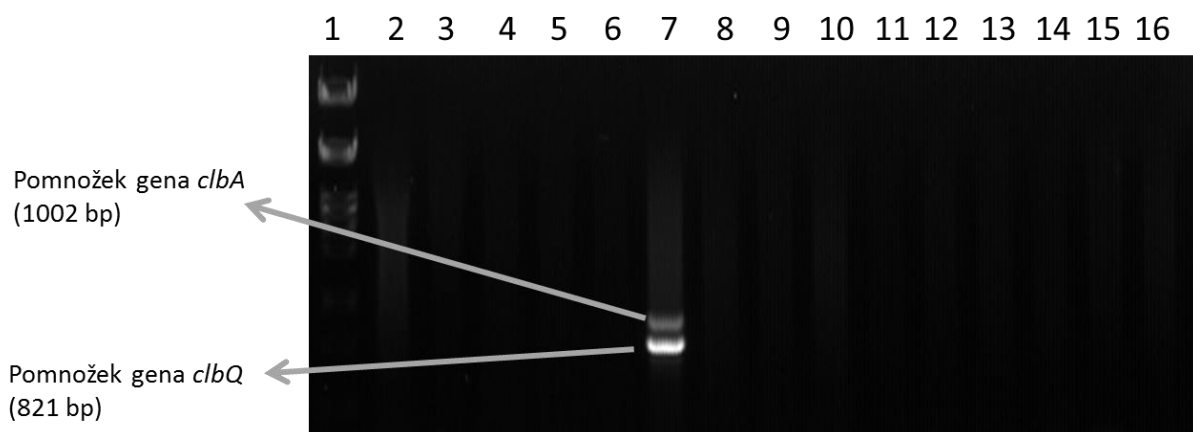
**Priloga B4:** Rezultati pomnoževanja gena *clbA* in *clbQ* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – sev H8, 3 – sev H9, 4 – sev H13, 5 – sev H11, 6- sev H15, 7- sev H16, 8 – sev H17, 9- sev H18, 10- sev H19, 11- sev H20, 12 - sev H21, 13- sev H27, 14- sev H29, 15- sev H32, 16- sev H39



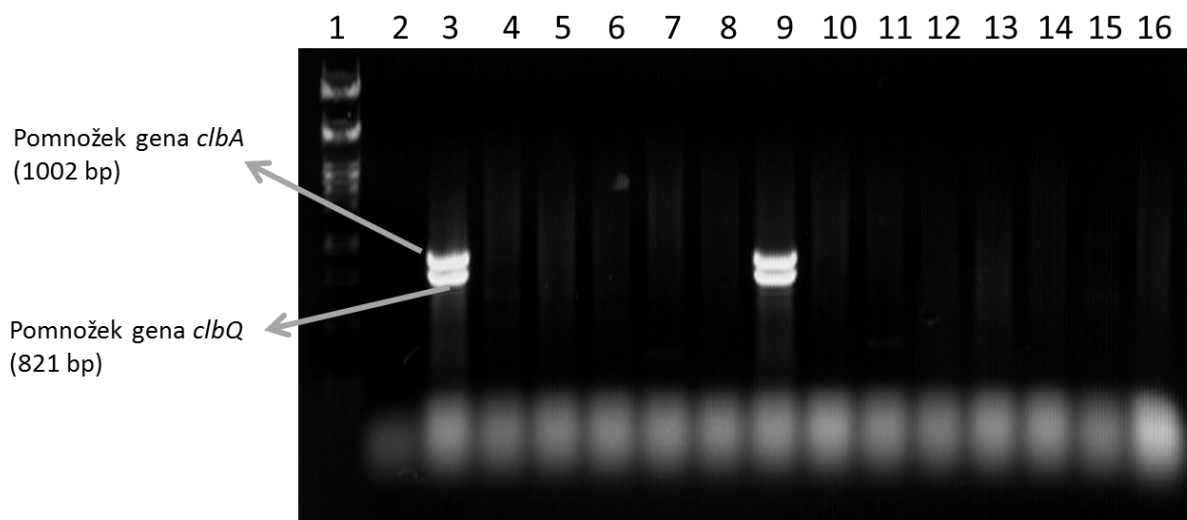
**Priloga B5:** Rezultati pomnoževanja gena *clbA* in *clbQ* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – sev H42, 3 – sev H43, 4 – sev H44, 5 – sev H45, 6- sev H46, 7- sev H48, 8 – sev H49, 9- sev H51, 10- sev H52, 11- sev H55, 12 - sev H58, 13- sev H60, 14- sev H59, 15- sev H63, 16- sev H65



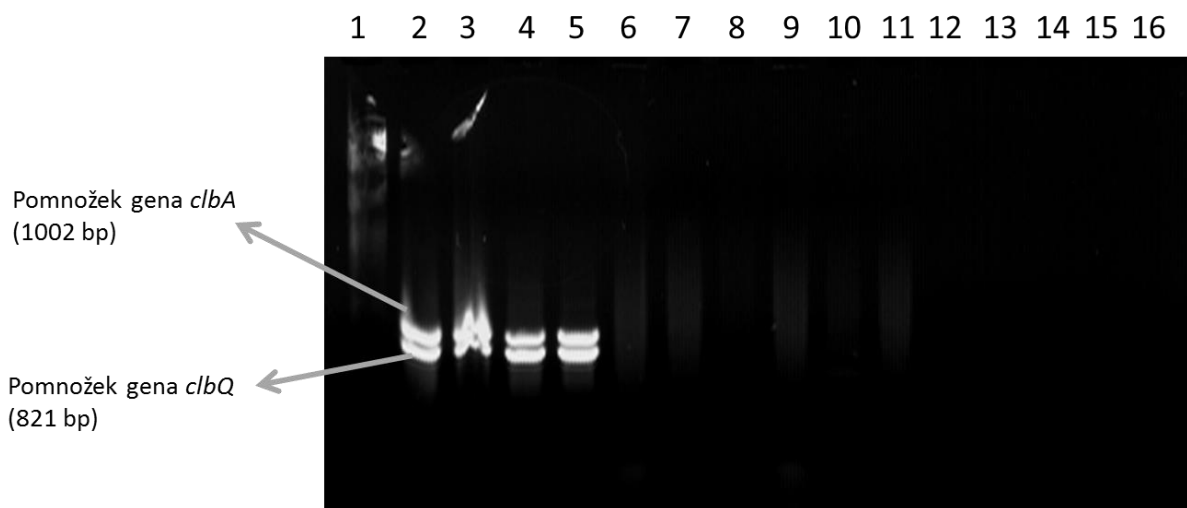
**Priloga B6:** Rezultati pomnoževanja gena *clbA* in *clbQ* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – sev H67, 3 – sev H68, 4 – sev H72, 5 – sev H75, 6- sev H76, 7- sev H77, 8 – sev H78, 9- sev H80, 10- sev HS1, 11- sev HS4, 12 - sev HS7, 13- sev HS13, 14- sev HS18, 15- sev HS19, 16- sev HS30



**Priloga B7:** Rezultati pomnoževanja gena *clbA* in *clbQ* z verižno reakcijo s polimerazo.

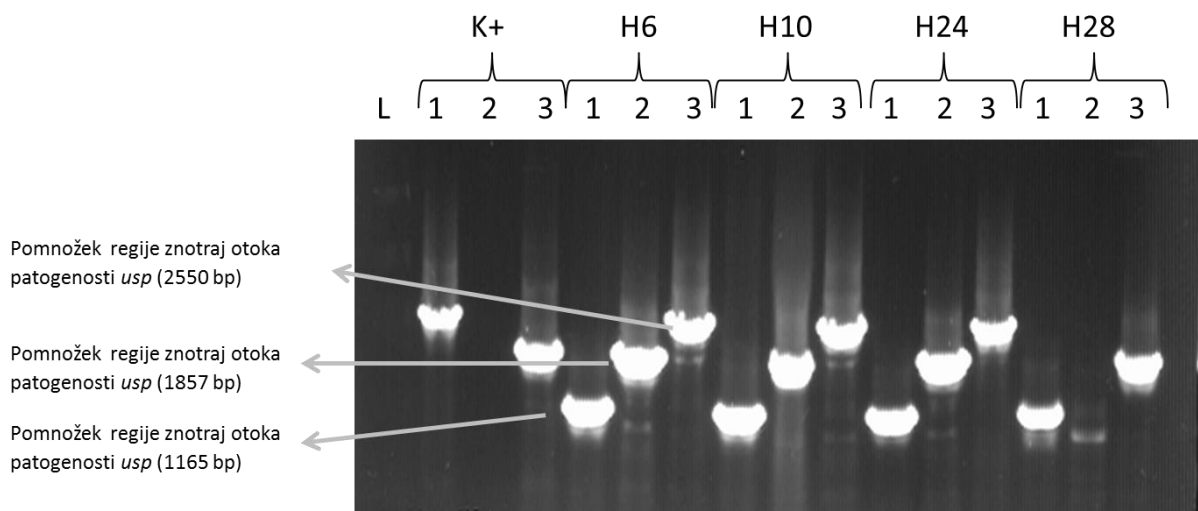
Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – Negativna kontrola, 3 – pozitivna kontrola, 4 – sev HS31, 5 – sev HS36, 6- sev HS37, 7- sev HS38, 8 – sev HS39, 9- sev HS41, 10- sev HS42, 11- sev HS45, 12 - sev HS46, 13- sev HS48, 14- sev CH1, 15- sev CH2, 16- sev CH3



**Priloga B8:** Rezultati pomnoževanja gena *clbA* in *clbQ* z verižno reakcijo s polimerazo.

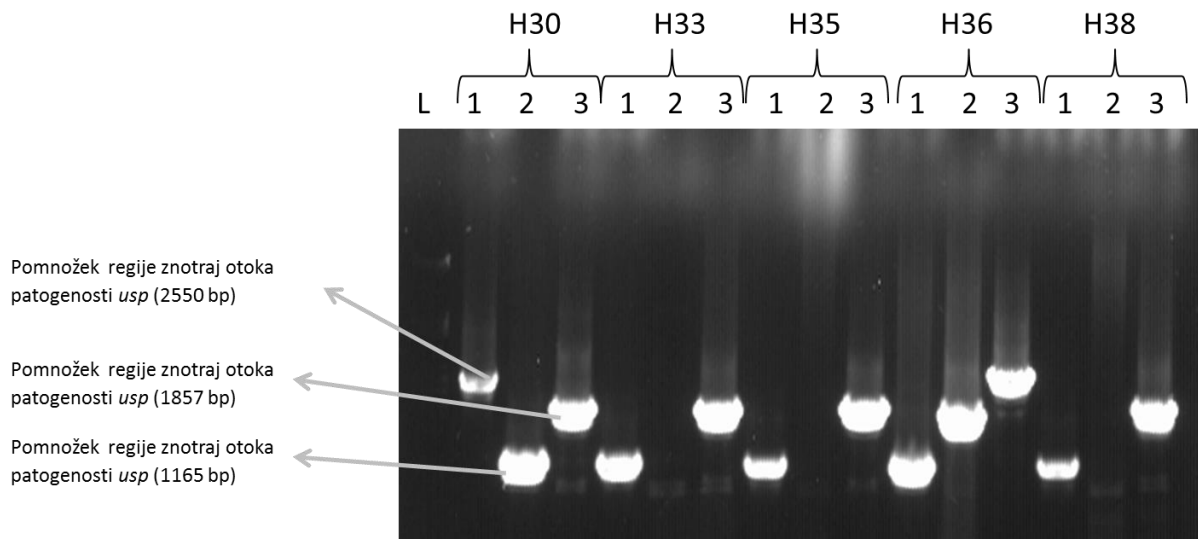
Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – pozitivna kontrola, 3 – sev CH4, 4 – sev CH5, 5 – sev CH9, 6- sev CH14, 7- sev CH15, 8 – sev CHS3, 9- sev H51, 10- sev H52, 11- sev H63

**Priloge C:** Rezultati subtipizacije PA*usp* z verižno reakcijo s polimerazo.



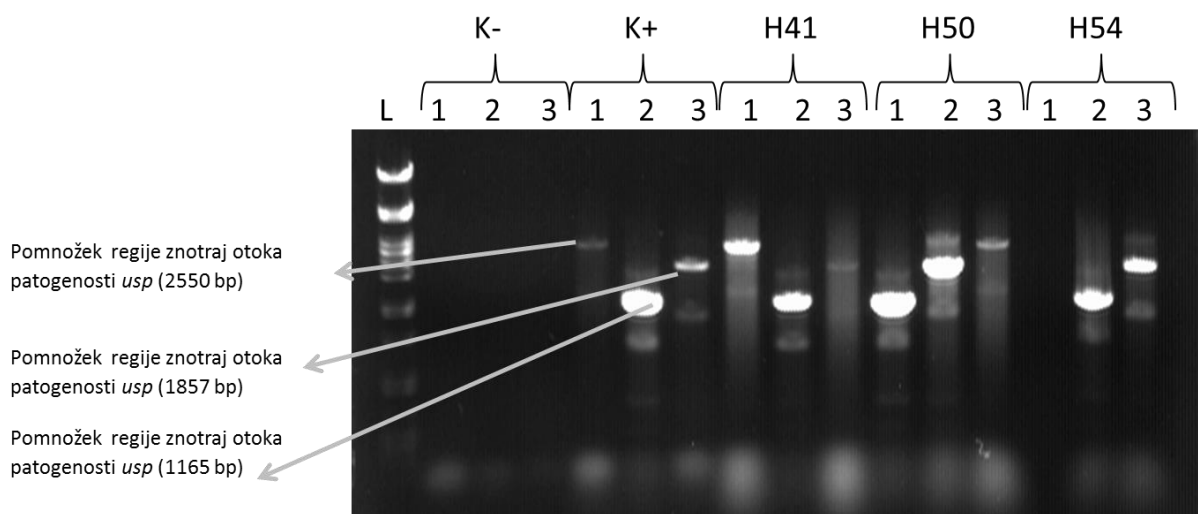
**Priloga C1:** Rezultati subtipizacije PA*usp* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: L- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 1 –primer USP81f in ORFU1r, 2 – primer USP81f in ORFU2r, 3 – primer USP81f in ORFU3r



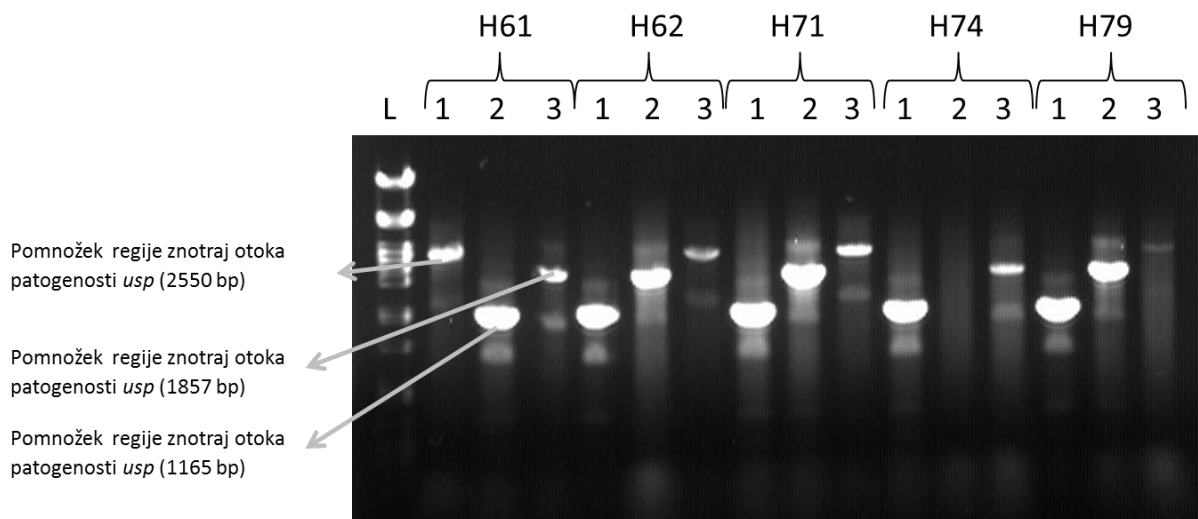
**Priloga C2:** Rezultati subtipizacije PA*usp* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: L- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 1 –primer USP81f in ORFU1r, 2 – primer USP81f in ORFU2r, 3 – primer USP81f in ORFU3r



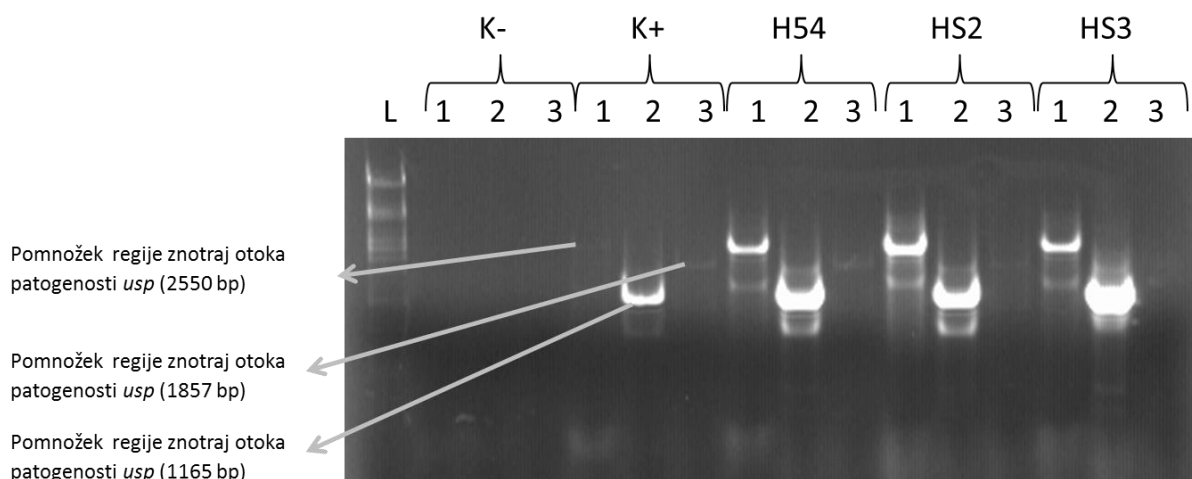
**Priloga C3:** Rezultati subtipizacije *PAIusp* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: L- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 1 –primer USP81f in ORFU1r, 2 – primer USP81f in ORFU2r, 3 – primer USP81f in ORFU3r



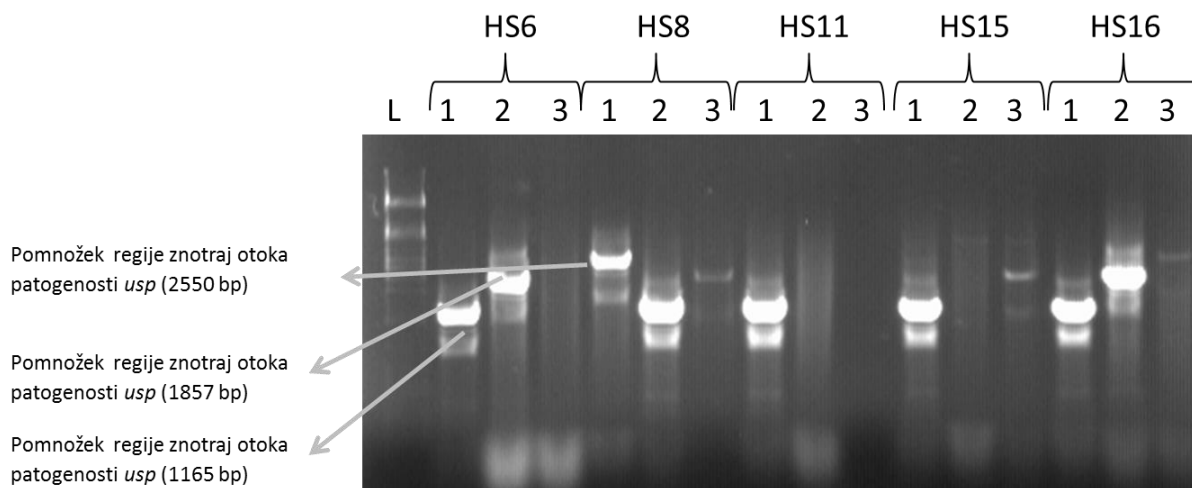
**Priloga C4:** Rezultati subtipizacije *PAIusp* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: L- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 1 –primer USP81f in ORFU1r, 2 – primer USP81f in ORFU2r, 3 – primer USP81f in ORFU3r



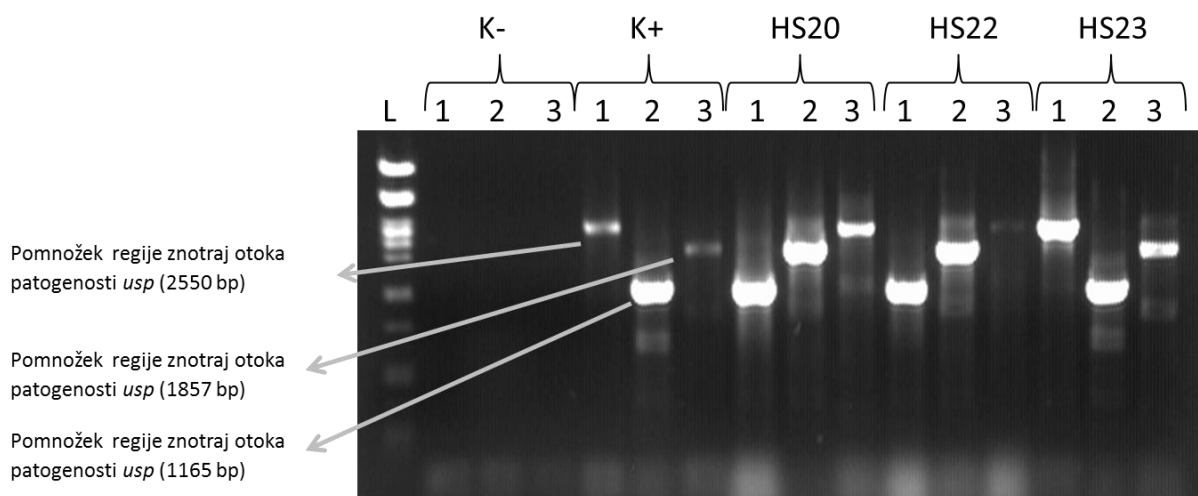
**Priloga C5:** Rezultati subtipizacije *PAI<sub>usp</sub>* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: L- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 1 –primer USP81f in ORFU1r, 2 – primer USP81f in ORFU2r, 3 – primer USP81f in ORFU3r



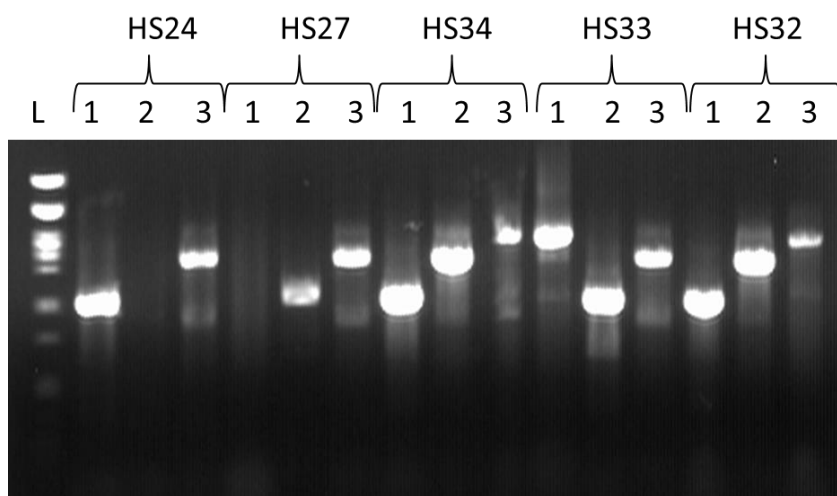
**Priloga C6:** Rezultati subtipizacije *PAI<sub>usp</sub>* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: L- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 1 –primer USP81f in ORFU1r, 2 – primer USP81f in ORFU2r, 3 – primer USP81f in ORFU3r



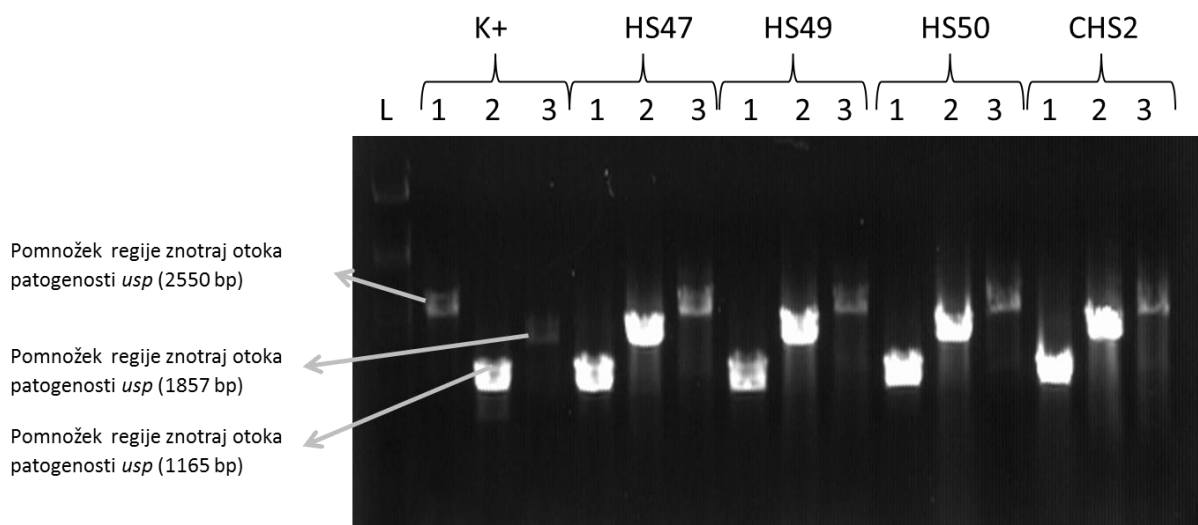
**Priloga C7:** Rezultati subtipizacije *PAI<sub>usp</sub>* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: L- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 1 –primer USP81f in ORFU1r, 2 – primer USP81f in ORFU2r, 3 – primer USP81f in ORFU3r



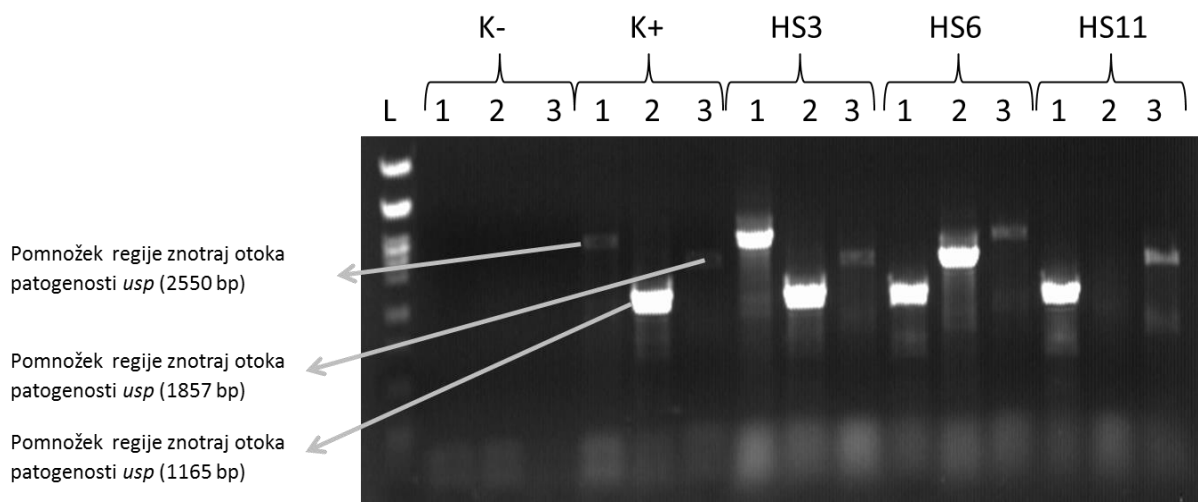
**Priloga C8:** Rezultati subtipizacije *PAI<sub>usp</sub>* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: L- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 1 –primer USP81f in ORFU1r, 2 – primer USP81f in ORFU2r, 3 – primer USP81f in ORFU3r



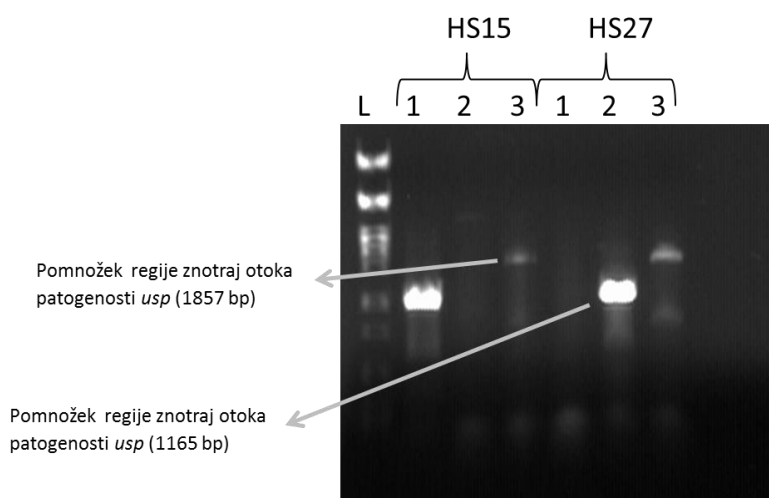
**Priloga C9:** Rezultati subtipizacije *PAI<sub>usp</sub>* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: L- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 1 –primer USP81f in ORFU1r, 2 – primer USP81f in ORFU2r, 3 – primer USP81f in ORFU3r



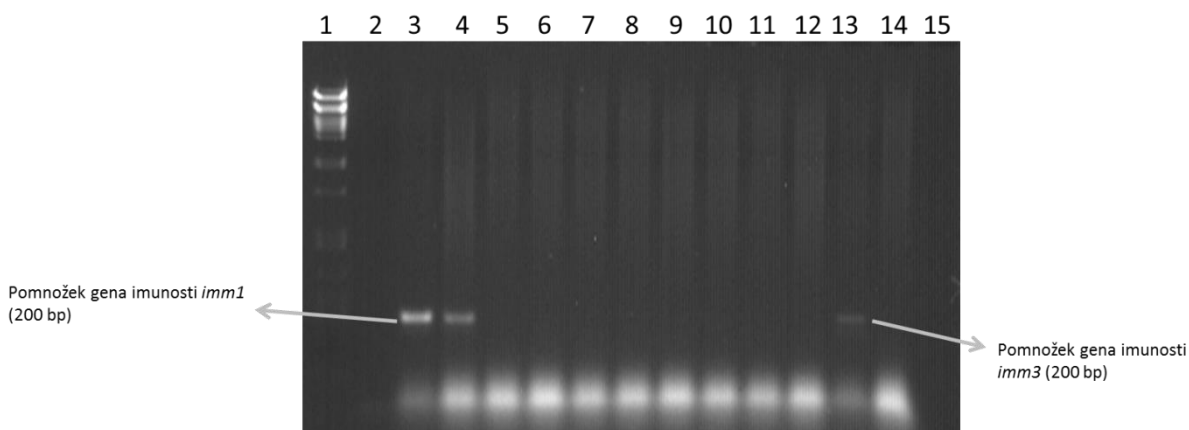
**Priloga C10:** Rezultati subtipizacije *PAI<sub>usp</sub>* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: L- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 1 –primer USP81f in ORFU1r, 2 – primer USP81f in ORFU2r, 3 – primer USP81f in ORFU3r



**Priloga C11:** Rezultati subtipizacije PA<sub>usp</sub> z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: L- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 1 –primer USP81f in ORFU1r, 2 – primer USP81f in ORFU2r, 3 – primer USP81f in ORFU3r



**Priloga C12:** Rezultati pomnoževanja genov imunosti *imu1* in *imu2* z verižno reakcijo s polimerazo.

Legenda: 1- DNA-lestevica Lambda DNA PstI digest, 2 – negativna kontrola, 3 – pozitivna kontrola, 4 – pozitivna kontrola H24, 5 – sev H28, 6- sev H33, 7- sev H35, 8 – sev H38, 9- sev H74, 10- sev HS11, 11- sev HS15, 12 - sev HS24, 13- pozitivna kontrola, 14- sev HS27

## Priloga D: Nukleotidno zaporedje PAI<sub>usp</sub>.

**Priloga D1:** Nukleotidno zaporedje PAI<sub>usp</sub>, izoliranega iz seva *E. coli* H6.

### > *Escherichia coli* H6

```
gacctcgtgtgtgtgtttttgaactacgcagcaatgcgtgtgtaattttgtaattccgtttgtgtattgggtttctttacattttatgtaactgaattatg
atgatagtactttcaactatcacagataatggatatgcgcgagaatgcacctgctttatgtagatgtgttgattttctggataaaaaaagcaatt
gtaagttttcatcacattaatagatactttaagctgataacatactgtttaactagctatatgtcggattgtctgcctgctgaacaccatgccttag
ccaccagcacataatcttataaaaaggtcatataagaataaatagatgtaataatacaatgggggtgtaacgcgagttttaataataatattgcga
gctaagtgaacgttaagtaattgaaataattttcattaaaaagcgtttctattgatcgagaaataagttttctattaatgcaaaaaagttaaggata
aacgggaatgaataaagtgggcgatattgttacctgagaataatcgggtgagaagcagggcgatatttctcaggctgtgggacgtatgcgtcg
gttggaatcgtggcaggttgccatgaagatgaattttgctttgactcaccaacgccattaccagtactggtaaaggcgtaatctacagg
ggctacaattttgcaactcattgataaaaagctaccgctactgtctaattgccatcaatcagaatgagcgggtatttattgaaatcgattgtatcgat
aaataaaaagggcgctgggaacgggtatttatattcagctaagaaatgcttcattaactgctattcatgtaaaccattctgacaataatcttctac
cgaatgtgtaaatgttaattatgactacatattatgcaaacatctaagccaatacggaaattgactgggtggcctttctgctggctataatagctta
ttattccacctaaaaacccacctgccagtaatttaacccctgagccgctaccagtgttaaccttccactctctccaccagcgggtaaacgggtcta
tgccaaatcctgtctgaaggagaaggatgtacagatgcgggaacggcgagaagaaccgctgaaaacttcgggcaagtagcgattttgtctct
gccagtggtgatgactgctgtggataccaccatccggaggctaacgatgttgggaacccgcagaagctcaaaccatgctactgtttccgggt
agtgtgtggcggtcaaatatggggaaaatggctgctcagtggtcactcagtgcaacccgcggctcttacatcggtgcgttggcatctgcttt
gtatattccctctcgggcgaggcgagtgctgtgctggacgtgatgagttctggatgaggaagaactgcgccagaaagcgttgacagg
cagtaccgccactaccgggtgcgtttttctgggaactgacattcacagcaagccccaggtatatgggtgtcatacgggtgaaggtagccgt
atgaaaacgtccgctggcgaaatgctgtggaacgaggagaggcagcgttatgaatttaccctcgtcacgatgtcgatggccccctgatta
cctggacgccgaaaatccggaacatgggaatgttccgggccataccggtaacgacaggccgctggatcagcccaccattctggtgac
gccgattccggacggcaccgatactataccacgccgccattccgggtctgatccgaaagaattcaacgattatattctggtttttccggcggg
atccgggtattaagcccatctatgtttacctgaaggaggatccgcgaaagctgcctggtgtgtaacagggcgcggtctgtcttaccaggaa
ctcgtctgggtggatgtcggtatccaataacggcaacggcgaccaaaccggcgcatattgctgataaattgcgcggacgggagttaaaac
ctttgatgagtttcgcgaggcgctgtggctggagggtgagtaaaagactcagtggtattggcgagttataaaaagtaatcagaataacgttagtca
aggatattcccctatgtccctgaggagggtattattacggaccaaatgagatagttaaagaattccagatacatcatgattgtctatagaacat
gggtgtggagtgatgatattgataattttaagattgttacccccgactacatgatgaaattcactacaggagataatgtatgcgtgattaaaa
gataaaatataattttacacagaaagggtgaatttctgaaatgcttgaggagatagtaaatgcaactagcaaaagataaatccctaaaaggaaaaa
attagaaaaatatctgataccttagtgatcatttcattaaaattactgaacatcctaaaaaggagatctcattttatcctaattccaagaagat
gggtgaacctgaaaacatcctgaaaatcgtcaagaatggcggttcacaggggctaccctgtttaagactctaaataaagtagataaaaaa
ctatatatgaacatcatcgctgtggctaattgcgatgatgtaataacataaaaataaatgtggtgtcttataaaaaacaggtaaaaaatactgaa
atcattttatcaatttctgcgttcaccgataccctttggctggagggtgagtcagtatccggagttgatagcgcagtttcaagtgttaaccaaacac
gtataaaaacaggattaacggcaaaagcacctctgaagggtggcattatggccctaaagaatcgtaaaaaattccagatacatcatcggttg
caattgaatatggcggcagcgtatagatattgataatttacgaattgtacccccagactacacgatgagattcactacaggagataaatatgttta
aagaaaagctcgaagattataccgaggagggaatttctaatttttaggcggattgagatcaactatgaaagatggaaagcccttaaaaggtaag
gagctagaaatgtactgggattcattagtagatcatttattgaaattacacagcatccgtcagggagcgtatctattttacccctaaaaatcaagg
agatgataagcctgaaaacatcctgaaaattgtcaaagaatggcggttcacaggggtaccctgtttaagactctaaacaaagtagataat
aaaactatatggaaacatcatcgctgtggctaattgcgatgatgtaataacataaaaataaatgtgggtgcttataaaaaacaggtaaaatactga
aatctcattaggtattttatcaatttccgctttaccgataccctttggctggagggtgagtcagtatccggagttgatagcgcagtttcaagtgtga
atcaaacacgtataaaaacaggattaatcgaaaagcacctctgaagggtggcattatggccctaaagaatcgtaaaaaattccacatgtatc
attgtgtgcgattgaatagtgggcgaattttacgatattgataatttaaggagggcacacctcatttgatgatgaaatttattacaggagatagtt
aaatgtataattttaagataaaaatagaagattacacagagcgggaattcattgagttgcttggcgagtttcaaatccaaccggggataacgctc
aattaaaagggaagagcttgacaaatattgggatgatctagaagaacatcttaccagaattacacaacatccgttgatgagcgtatctatctact
atcctgcaaagaaggagatgataaacctgaaaacatcctgaaaatcgtcaagaatggcggttcgcaaggattgctttgttcaaagattca
gaatgaactctaaacagaatctgtcacctgaaaat
```

**Priloga D2:** Nukleotidno zaporedje PAI<sub>usp</sub>, izoliranega iz seva *E. coli* H24.

>*Escherichia coli* H24

tgttgtgtgtttttgaactacgcagcaatgcgtgtgtaatttgaattccgtttgtgtattggtttctttacatttatgtaactgaattatgatgatagt  
actttcaactatcacaagataatggtatatgcgcgagaatgcacctgctttatgtagatgtgtgtattttctggataaaaaaagcaattgtaagtttt  
tcatacatttaataagatactttaagctgataacatactgttttaactagctatatgtcggattgtctgcctgctgaacacatgccttagccaccag  
cacaataatcttcaaaaaggctcatataagaataaataagatgtaataatacaatggggtgtaacgcgagatttaataataatattgcgagctaagt  
gaaaacgttaagtaattgaaataattttcattaaaagcgtttcttattgatcgagaataaagttttctatttaatgcaaaaaagtaaggataaacggg  
aatgaaataaagtgggcgatattgtttacctgagaataatcggtgagaagcaggcgatatttctcaggctgtgggacgtatgcgtcgggttgga  
atcgtcggcaggttgccatgaagatgaaattttgctttgactcaccaacgccattaccagtagttaaaggcgtaatactacaggggctac  
aattttgcaaacctcattgataaaagctcaccgctactgtctaataccatcaatcagaatgagcgggtatttattgaaatcgattgtatcgataataa  
aagcggcgctgggaacggtattattatattcagctaagaaatgcttcattaactgctattcatgtaaacatttctgacaataatctcctaccgaatg  
tgtaaatgttaattatgactacatatattgcaaacatctaataagccaatacggaaattgactgggtggcctttcctgctggctataatagcttattatcc  
acctaaaaacccactgcccagtaatttaacccctgagccgctaccagttgttaaccttccactctctccaccagcgggttaaaccgggtctatgccaa  
atcctgtctgaaggagaagggtgtacagatgccggaacggcagaagaacctgctgaaaactcgggcaagtagcgattttgtctgccagt  
gggtgatgactgctgtggataccaccatccggaggctaacgatgttgggcaaccgcagaagctcaaacatgctactgttccgggtagtgtgt  
tgggcggtcaaataatggggaaaaatggctgctcagtggtgatactcagtgcaacccgcggctcttacatcggtgcgttggtcatctgtttgatattc  
cctctgcgggcgaggcgagtgctcgtgtgctgctggacgtgatgattctggtatgaggaagaactgcgccagaaaagcgttgacggcagtagacc  
gccactaccgggtgctgtttttctggggaactgacattcacagcaagccccagggtatatgggtgtcatacgggtgaaggtagccgtatgaaaa  
cgtccgctgtggcgaacatgctgtggaacgaggagaggcagcgttatgaatttaccctcgcacgatgtcgatggccccctgattacctggac  
gccggaaaatccggaacatgggaatgtccgggccataccggtaacgacaggccgcctggatcagcccaccattctggtgacgccgattc  
cggacggcaccgatactataccacgccgccattccgggtctctgatccgaagaattcaacgattatattctggttttccggcggtatccggta  
ttaagcccatctatgtttacctgaaggaggatccgcgaaagctgcctgggtgtgtaacaggcgcgggcgtctgtttcaccagggaactcgctgg  
ctggatatgtcggatccaataacggcaacggcgccaatcccggcgcataattgctgataaattgcgcggacgggagtttaaacctttgatga  
gtttcgcgaggcgctgtggctggagggtgagtaagactcagtgttattggcgagtttataaaaagtaatacagaataacgtagtaaggatattc  
ccccttatgtccctgaggaggggtattattacggaccaatgagatagttaagaaattccagatacatcatgtattgtctatagaacatggtgggtg  
gagtgatgatattgataattttaagattgtacgccccgactacatgatgaaattcactacaggagataatgtatatgcgtgatttaaaagataaaa  
tatatttttacagaaaggtgaatttctgaaatgcttgaggagatagtaaatgcaactagcaaagataaatccataaaagggaataaattagaaaa  
atatctcgataccttagtggtatcatttcattaaaactgaacatcctaaaaaggagatctcattttctatcctaattccaagaagatggtgaacct  
gaaaacatcctgaaaatcgtcaagaatggcggcggtcacaggggctaccctgtttaaagactctaaataaagtagataataaaactatatga  
aacatcatcgctctggctaatacgatgatgtaataacataaaataataatgtgggtgctcttaaaaaacaggtaaaaaatactgaaatcatttattc  
aatttctgcgttcaccgataccctttggctggagggtgagtcagtatccggagttgatagcgcagttttcaagtgttaaccaaacacgtataaaac  
aaggattaaccgcaaaagcacctctgaagggtggcattatggccctaaagaaatcgtaaaaaattccagatacatcatcggtgtgcaattgaata  
tgggcgagcgtatagatattgataatttacgaattgttaccccgactcacgatgagattcactacaggagataaatgtttaagaaaaag  
ctcgaagattataccgaggaggaatttcttaatttttagcggttgatgatacaatgaagatggaaagcccttaaaaggtaaggagctagaa  
atgtactgggattcattagtagatcattttattgaaattacacagcatccgtcaggagcgatctaattttctaccctaaaagtaaggagatgataa  
gcctgaaaacatcctgaaaattgtcaagaatggcggcggtcacaggggctaccctgtttaaagactctaacaagtagataataaaactatat  
ggaacatcatcgctctggctaatacgatgatgtaataacataaaataataatgtgggtgctcttaaaaaacaggtaaaaaatactgaaatctcatta  
gggtattttatcaatttccgctttaccgataccctttggctggagggtgagtcagtatccggagttgatagcgcagttttcaagtgttaaccaaacac  
gtataaaacaaggattaatcgaaaagcacctctgaagggtggcattatggccctaaagaaatcgtaaaaaattccacatgtatcattgtgtgc  
gattgaatatagtgggcgaatttaccgatattgataatttaaggaggggcacacctcatttgcagatgaaatttattacaggagatgtaaatgtataa  
tttaaaagataaaatagaagattacacagagcgggaattcattgagttgcttggcgagtttacaatccaaccggggataacgctcaattaaagg  
ggaagagcttgacaaatattgggatgatctagaagaacatctaccagaattacacaacatccgttgatgagcgatcttatctactctgcaaa  
gaaggagatgataaacctgaaaacatcctgaaaatcgtaagaatggcggcggttcgaaggattgcctttgttcaagattcagaatgaact  
ctaaacagaatctgtcacctgaaaatca

**Priloga D3:** Nukleotidno zaporedje PAI<sub>usp</sub>, izoliranega iz seva *E. coli* H41.

>*Escherichia coli* H41

gaaacctcgtgtgtgtgtgtttttgaactacgcagcaatgcgtgtgtaattttgaattccgtttgtgtattggtttctttacattttatgtaactgaattat  
gatgatagtactttcaactatcacagataatgggtatagcgcgagaatgcacctgctttatgtagatgtgtgtattttctggataaaaaaaacaatt  
gtaagttttcatcacattaatagatactttaagctgataacatactgtttaactagctatatgtcggattgtctgcctgctgaacacccatgccttag  
ccaccagcacataatcttacaaggtcatataagaataaatagatgtaataatacaatgggggtgtaacgcgagttttaataataatattgcga  
gctaagtgaacgttaagtaattgaaataattttcattaaaaagcgtttcttattgatcgagaaataagttttctatttaagcaaaaaagttaaggata  
aacgggaatgaataaagtggcgatattgtttacgtgagaataatcggtgagaagcagggcgatatttctcaggctgtgggacgtatgcgtcg  
gttggaatcgtggcaggttgccatgaagatgaaatttttgccttgactcaccaacgccattaccagtactggtaaaggcgtaattctacagg  
ggctacaattttgcaactcattgataaaagctcaccgctactgtctaattgccatcaatcagaatgagcgggtatttattgaaatcgattgtatcgat  
aaataaaagcggcgctgggaacggtattattatcagctaagaatgcttcattaactgtattcatgtaaacatttctgacaataatcttctac  
cgaatgtgtaaatgtaattatgactacatattatgcaaacatctaataagccaatacgggaattgactgggtggcctttctgctggctataatagctta  
tttattccacctaaaaacccacctgccagtaatttaacccctgagccactaccagttgtaaccttccactctctccaccagcgggttaaaccgggtcta  
tgccaaatcctgtctgaaggagaagggtgtacagatgccgggaacggcgagaagaacccgctgaaaacttcgggcaagtagcgattttgtct  
gccagtgggtgatgactgctgtggataccaccatccggaggctaacgatgttgggcaaccgcagaagctcaaaccatgctactgtttccgggt  
agtgtgtggcggtctaaatatggggaaaatggctgctcagtggtgatactcagtgcaacctgcggctctacatcggtgcgttggtcatctgctttg  
tatattccctctgctgggcagggcagtgctcgcgtgcccggacgtgatgagttctggatgaggaagaactgcggcagaaagcactagcagg  
cagtaccgccaccacccgggtacgtttttctggggaactgacattcacggcaagcctcaggtgatggtgttcatacgggtgaaggtagcggcgt  
atgaaaacgtccgctggcgaacatgagtggaacgagcagacgcagcgttatgaattacccccgctcacgatgtcgatggccccctgatta  
cctggacgccgaaaatccggaacatgggtatgttccgggccataccggtaacgacaggccgccgctggagcagccaccattctggtgac  
gccgattccggacggcaccgatactataccacgccgccattccgggtctgatccgaaagaattcaacgattatattctggttttccggcggg  
atccgggtattaagcccatctatgtttacctgaaggaggatccgcgaaagctgcctgggtgtgtaacagggcgcggtccgctttaccagga  
actcgtggtggtgatgtcggtatccaataacggcaacggcgaccaatccggcgcatattgctgataaattgcgcggacgggagtttaaaa  
ccttgatgagttcgcgagggcgctgtggctggagggtgagtcaggatccggagttagatagcgcagtttcaagtggtaaccaaacacgtataaaa  
caaggattaaccgcaaaagcacctattgacgggtggtattatggccctaaagaaatgtaaaaaattccagatacatcatcgtgtgacgttgaat  
atggcggcagcgtatacgtatgataattacgaattgttccccagactacacgatgagattcactacaggagataaatatgtttaaagaaaa  
gctccaggattataccgaggatgaatttctaatttttaggcggattgagatcatctatgaaagatggaaaatccttaaaaggttaaggagctagaa  
atgtactgggattcattagtagatcattttattgaaattacacagcatccgtcagggagcgtatattttctaccctaaaagtcaggagatgataa  
gcctgaaaacatcctgaaaattgtcaaagaatggcggttcacaggggttacctgttttaaagactctaaataaagtagataataaaactatata  
tggaacatcatcgcgtctggctaatacgatgataatgaacataaaataaatgtgattgctcttaaaaaacaggtaaaaaatactgaagcctcatt  
agggtattttatcattttccgcttttaccgataccctttggctggagggtgagtcagtatccggagttgatagcgcagttttcaagcggtaatacaaca  
cgtataaaacaaggattaatcgaaaagcaccactgaaggttgccattatggcactaaagaatcgtaaaaaattccacatgtatcatcgtgtg  
cgattgaatatagtggcggaatttacgatattgataatttaaggaggggcacacctcattgcatgatgaaatttattacaggagatagttaaatgtata  
attttaaagatgaatagaagattacacagagcgggaattcattgagttgcttggcgagtttacaaatccaaccggggataacgcctcaattaaaag  
gggaagagccttgacaataattgggatgatctagaagaacatctaccagaattacacaacatccgttgatgagcgtatctactatcctgcaa  
agaagggagatgatgaacctgaaaacatcctgaaaattgtcaaagaatggcggttcacaggggctaccctgtttaaagactctaaataaag  
tagataaaaaactatataatggaacatcatcgcgtctggctaatacgatgatgtaataacataaaataaatgtgggtgctcttaaaaaacaggta  
aaactgaaatttcattaggtattttatcaatttccgctttaccgataccctttggctggagggtgagtcagtatccggagttgatagcgcagtttt  
caactggttaaccaaacacgtataaaacaaggattaatcgaaaagcgcctctgaaggttggtcattatggcttaaggaaattgttaaagaattcc  
atatatatcatagtgttgcgattgaatgtgggtggcgaaatttatgatattgataattaaaggattttacgcctcgactacatgatgaaattcactacag  
gagataatgtatatgcatgattaaataataaaatatattttacacagaagggtgaatttctgaaatgcttgaggagatagtaaagcaactagcaaa  
gataaatccctaaaaggggaaaaaattagaaaaatatctcgataccttagtggtcatttcataaaattactgaacatcctaaaagggagatctca  
tttctatcctaattcccagaagatggtaaacctgaaaacatcctgaaaatcgtaaaagaatggcggttcgcaaggattgcctttgttcaaga  
ttcagaatgaactctaaac



**Priloga D5:** Nukleotidno zaporedje PAI<sub>usp</sub>, izoliranega iz seva *E. coli* HS2.

>*Escherichia coli* HS2

aattcgaaacctcgtgtgtgtgtgttttgaactacgcagcaatgcgtgtgtaatttgaattccgtttgtgtattggtttctttacattttatgtaactg  
aattatgatgatagtactttcaactatcacagataatggatatgcgcgagaatgcacctgctttatgtagatgtgttgattttctggataaaaaaa  
agcaattgtaagttttcatcacatttaagatactttaagctgataacatactgttttaactagctatatgctggatttatctgctgctgaacacat  
gccttagccaccagcacaataatcttcaaaaaggctatataagaataaataagatgtaataatacaatgggggtgtaacgcgagattttaataataat  
attgcgagctaagtgaacgtaagtaattgaataattttcattaaaagcgtttcttattgatcgagaataagtttctatttaatagcaaaaaaggt  
aaggataaacgggaatgaaataaagggtggcgatattgttacctgagaataatcggtgagaagcagggcgatattttctcaggctgtgggacgt  
atgcgtcggttgtaatcgctggcaggttgccatgaagatgaaattttgctttgactcaccaacgccattaccagtactgtaaaggcgta  
atctacaggggctacaattttgcaaaactcattgataaaaagctcaccgctactgtctaataccatcagaatgagcggttattttgaaatcgatt  
tgtatcgataaaaaagcggggcgctgggaacggtattattatattcagctaagaaatgcttcattaactgctattcatgaaacattttgacaata  
atcttctaccgaatgtgtaaatgtaattatgactacatattatgcaaacatctaatacgcaatacggaaatttgactgggtggcctttctgctggcta  
taataagcttattttccacctaataaaacccacctgccagtaattcctaaccctgagccactaccagttgtaaccttccactctctccaccagcggttaa  
accggtctatgccaaatcctgtctgaaggagaggggatgtacagatgccggaacggcagaagaaccgctgaaaacttcgggcaagtagcg  
attttctctgctccagtggttgatgactgctgtggataccaccatccggaggctaacgacgttgggcaaccgcagaagctcaaacatgctact  
gtttccgggtagtgtgtggcggtcctaaatatggggaatggctcgtcagtgccatactcagtgcaacctgcggctctacatcggtgcgttgg  
catctgctttatatccctctgcggcgaggcgagtgctcgcgtgccggacgtgatgagttctggatgaggaagaactgcggcagaagaac  
actagcaggcagtagccaccacccgggtacgtttttctggggaactgacattcacggcaagcctcaggtgatgggtgtcatacgggtgaa  
ggtagccgtatgaaacgtccgcgtggcgaacatgcagtggaacgagcagacgcagcgttatgaattacccccgctcacgatgtcgatgg  
cccctgattacctggacgccggaaaatccggaacatgggtatgtccgggcataccggtaacgacaggccgctggagcagcccacc  
attctggtagcgcgattccggacggcaccgatactataccacgcccattcccgggtctgatccgaaagaattcaacgattatattctgggtt  
ttccggcgggatccggtattaaagcccatctatgtttacctgaaggaggatccgcgaaagctgcctggtgtgtaacagggcgcggtcccgct  
ttcaccaggaactcgctgggtgatatgtcggtatcctaataacggcaacggcacaccaatccggcgcatattgctgataaattgcgcggacg  
ggagtttaaaactttgatgagtttcgcgagcgctgtggctggaggtgagtcaggatccggagttgatagcgcagtttcaaatgtaaccaa  
cacgtataaaacaaggattaaccgaaaagcacctattgacgggttggtattatggcctaagaaatagttaaaaattccagatacatcatctg  
ttgcagttgaatatggcggcagcgtatagatattgataatttacgaattgtacccccagactacacgatgagattcactacaggagataaatatg  
tttaagaaaaagctccaggattataccgaggatgaatttctaatttttaggcggattgagatcatctatgaaagatggaaaatcctaaaaggtaa  
ggagctgaaatgtactgggattcatttagatcattttattgaattacacgacatccgtcagggaagcagatctattttctacctaagaatcaag  
gagatgataagcctgaaaacatcctgaaaattgtcaagaatggcggcgttcacaggggttacctgtttaaagactctaataaagtagataat  
aaaactatataatggaacatcatcgcatctggctaattgcgatgataatgacataaaataataatgtgattgctcttaaaaaacaggtaaaaact  
gaagcctcattaggtattttatcattttccgcttttaccgataccctttggctggaggtgagtcagtatccggagttgatagcgcagttttcaagcg  
gtaatacaacacgtataaaacaaggattaatcgcaaaagcaccactgaaggttggcattatggcactaaagaaatcgtaaaaaattccacatgt  
atcatcgtgttgcgattgaatatagtggcggaatttacgatattgataattaaaggaggggcacacctcatttgcatgataaattattacaggagata  
gttaaatgtataatttaagatgaaatagaagattacacagagcgggaattcattgagttgcttggcgagttacaaatccaaccggggataacg  
ctcaattaaaagggaagagccttgacaaatattgggatgatctagaagaacatctaccagaattacacaacatccgttgatgagcagatctatct  
actatcctgcaagaaggagatgatgaacctgaaaacatcctgaaaattgtcaagaatggcggcgttcacaggggctaccctgtttaaaga  
ctctaataaagtagataataaaactatatggaacatcatcgctctggctaattgcgatgattgtaataacataaaataataatgtgggtgcttta  
aaaaacaggtaaaaactgaaatttcattaggtattttatcaatttccgctttcaccgataccctttggctggaggtgagtcagtatccggagttga  
tagcgcagttttcaactggtaacaaacacgtataaaacaaggattaatcgcaaaagcgctcttgaaggttggcattatggctctaaggaaattg  
ttaagaattccatataatcatagttgtcgattgaatgtgttggcgaaatttatgatattgataattaaaggattgttacgctcgactacatgatga  
aattcactacaggagataatgtatatgcatgatttaaatataaaatatattttacacagaaggtgaatttctgaaatgcttgaggagatagtaaatg  
caactagcaaaagataaatccctaaaagggaataatgaaaaatctcgatacccttagtggtatcatttcaaaaattactgaacatccctaaaaa  
gggagatctcattttctatcctaattcccagaagatggtaaacctgaaaacatcgtgaaatcgtaagaatggcggcggttcgaaggattgc  
ctttgtcaaagattcagaatgaactctaacagaatctgtcacctgaaaatcatcacgttctggtaagtgtatg

gaattcgaaacctcgtgtgtgtgtgtttttgaactacgcagcaatgcgtgtgtaatttgaattccgtttgtgtattggtttcttacattt  
atgtaactgaattatgatgatagtaacttcaactatcacagaataatggtatatgcgcgagaatgcacctgctttatgcagatgtgtgat  
tttctggataaaaaaagcaattgtaagttttcatcacatttaataagatactttaaagctgataacatactgttttaactagctatatgtcg  
gatttgtctgcctgctgaacacccatgccttagccaccagcacataatcttataaaaaggctatataagaataaatagatgttaataata  
caatgggggtgtaacgcgagtatttaataataatattgcgagctaagtgaaaacgttaagtaattgaaataattttcattaaaagcggtt  
cttattgatcgagaaataagttttctatttaatgcaaaaaagttaaggataaacgggaatgaaataaagtgggcgatattgtttacctga  
gaataatcggtgagaagcagggcgatatttctcaggctgtgggacgtatcgtcgggttggaatcgtggcaggttggccatgaa  
gatgaaattttgcctttgcactcaccaacgccattaccagtactggtaaaggcggttaattctacaggggctacaattttgcaaactcatt  
gataaaagctcaccgctactgtctaataatgccatcaatcagaatgagcgggtatttattgaaatcgatttgcgtataaaaaagcgg  
gcgctgggaacgggtattattatattcagctaagaaatgcttcattaactgctattcatgaaacatttctgacaataatcttctaccgaat  
gtataactgtcgattatgactatatattatgtaaacaatctcatagccaatacagaatttgactgggtggcctttctgctggctataatagc  
ttatttattccgcctaaaaagtcacctgccagtaatacttaagcctgaaccgctaccagttgttaaccttccactctctcaccagcgggta  
acccgggtctatgccaaatcctgtctgaaggtgaagggtgatcacagatgccgggaacggcagaagaacccgctgaaaactcgggtca  
agtagcgattttcgtcagccagtggtgatgactgctgtggataaccaccatcccagggtaacgttatcggggaacccgcagaag  
ctcaaaccatgctactgttcccagtagtgtgttggcgactcaaataatggggaaaatggtcgctcagtgggcgactcagtgcaaccc  
gcggctcttacatcgggtgcgttggcatctgctctgtatatccctctgcgggtgagggcagtgctcgtgtgcctggacgtgatgagtt  
ctggatgaggaagaactgcgccagaaagcgttgcaggcagtagccactaccgggtgcgtttttctggggaaactgacattc  
acagcaagccccaggtatatggtgttcatacgggtgaaggtagccgctatgaaaacgtccgcttggcgaacatgccgttggaaacga  
ggagaggcagcgttatgaattacccccgctcacgatgtcgatggccccctgattacctggacgccggaaaatccggaacatggg  
aatgttccggggccataccggtaacgacaggccgccgctggatcagcccaccattctggtagcgcgattccggacgggtacagata  
cctataaccacgccgccattcccggttctgatccgaagaattcaacgattatattctggtttttccggcgggatccgggtattaagcct  
atctatgtttacctgaaggaggatccgcgaaagctgcctggtgttgaacagggcacggcgctccgctttcaccaggaactcgtcg  
gctggatatgtcggatccaataacggcaacggcgaccaatcccggcgcatattgctgataaattgcgcggacgggagtttaaaa  
cctttgatgagtttcgcgagggcgtgtgtggctggaggtgagtaaaagactcagtggtattggcgcagttataaaaaagtaatcagaataa  
cgtagtcaaggatattcccctatgtccctgaggaggggtattattacggaccaaagagatagtaaagaaattccagatacatcat  
gtagtgtctatagaacatgggtgggtgagtgatgatattgataatttaagattgttacgccccgactacatgatgaaattcactacagg  
agataatgtatatgcgtgatttaaaagataaaatatattttacacagaaggtgaatttctgaaatgcttgaggagatagtaaattgcaac  
tagcaaaagataaatccctaaaagggaaaaaattagaaaaatatctcgataccttagtggtatcttcattaaaattactgaacatcctaa  
aaaggagatctcattttctatcctaattcccaagaagatggtgaacctgaaaacatcctgaaaattgtcaaaagaatggcggcggtca  
caggggttacccttgtttaagactctaaataaagtagataataaaactatatatggaacatcatcgcatctggctaattgcgatgatatt  
aatgacataaaaaataaatgtgattgctcttaaaaaacaggtaaaaaactgaagcctcattaggttattttatcattttcccgctttacc  
gataccctttggctggaggtgagtcagtatccggagttgatagcgcagtttcaagcggtaatacaaacaggtataaaacaaggagta  
atcgaaaagcaccacttgaagggtggcattatggcactaaagaaatcgtaaaaaattccacatgtatcatcgtgttgcgattgaata  
tagtggcggaatttacgatattgataatttaaggaggggcacgcctcatttgcagtgatgaaatttattacaggagatagttaaatgtataat  
tttaaagatgaaatagaagattacacagagcgggaattcattgagttgcttggcgagtttacaataccaaccggggataacgctcaat  
taaaaggggaagagcgttgacaaatattgggatgatctagaagagcatctaccagaattacacaacatccggtgatgagcgtatcttat  
ctatct



gaaacctcgtgtgtgtgttttttgaactacgcagcaatgcgtgtgtaattttgtaattccgtttgtgtattggttctttacattttatgtaa  
ctgaattatgatgatagtactttcaactatcacagataatggatatgcgcgagaatgcacctgctttatgtagatgtgttgattttctgg  
ataaaaaaaaaagcaattgtaagttttcatcacatttaatagatactttaagtctgataacatactgttttaactagctatatgtcggattgt  
ctgcctgctgaacaccatgccttagccaccagcacaataatcttcaaaaaggctcataagaataaatagatgtaataatacaatgg  
gggtgtaacgcgagattttaataataatattgcgagctaagtgaacgtaagtaattgaaataatttttcattaaaagcgttcttattga  
tcgagaaataagttttctatttaagtcaaaaaagttaaggataaacggggaatgaaataaagtgggcgatattgtttacctgagaataat  
cgggtgagaagcagggcgatatttctcaggctgtgggacgtatgcgtcgggttgtaatcgtcggcagggtggccatgaagatgaa  
ttttgccttgcacttaccaacgccattaccagtaactggtaaaggcgtaatactacaggggctacaatttgcaaactcattgataaaa  
gctcaccgctactgtctaagccatcaatcagaatgagcgggtattttattgaaatcgatttgatcgtataaataaaaagcgggcgctgg  
gaacgggtattattatattcagctaagaaatgcttcattaactgctattcatgtaaacatttctgacaataatcttccctaccgaatgtataact  
gtcgattatgactatatattatgtaaacatctcatagccaatacagaatttgactgggtggccttctctgctggctataatagcttatttctc  
cgctaaaaagtcacctgccagtaacttaagcctgaaccgctaccagttgtaaccttccactctcttaccagcggttaaccgggt  
ctatgccaaatcctgtctgaagggtgaagggatgtacagatgccggaacggcagaagaaccgctgaaaacttcgggtcaagtagc  
gattttgctcagccagtggttgatgactgctgtggataccaccgccccgaggctaacgttatcggggaaccgcagaagctcaaa  
ccatgctactgtcccagtagtgtgttggcgactcaaatatggggaaaatggtcgctcagtggcgtactcagtgcaacccgcggct  
cttacctcgggtgcgttggcatctgctctgtatattccctctgcgggtgagggcagtgctcgtgtgcttgacgtgatgagttctggat  
gaggaagaaccgcgccagaaagcgcttcagggcagtaaccgactaccgggtgcgtttttctggggaactgacattcacagc  
aagccccaggtatatgggtgtcatcgggtgaaggtagccgtatgaaaacgtccgcttggcgaacatgctgtggaacgaggaga  
ggcagcggttatgaattacccccgctcacgatgtcgtatggccccctgattacctggacgccggaaaatccggaacatgggaatgt  
ccggggccataaccggtaacgacaggccgccgctggatcagcccaccattctgggtgacgccgattccggacgggtacagatacctat  
accacgccgccattcccgggtcctgatccgaaagaattcaacgattatattctggtttttccggcgggatccggtattaagcctatctat  
gtttacctgaaggaggatccgcgaaagctgcctgggtgttgtaacagggcacggcgctcccgtttaccaggaactcgtggctgg  
atatgtcggatccaataacggcaacggcgccaccaatcccggcgcatattgtgataaattgcgcggacgggagttaaaacctttg  
atgagtttcgcaggcgctgtggctggaggtgagtaaaagactcagtggtattggcgcagttataaaaagtaatcagaataacgttag  
tcaaggatattccccttatgtccctgaggaggggtattattaccggaccaaatgagatagttaagaaattccagatacatcatgtagt  
ctatagaacatgggtgggtgagtgatgatattgataattttaagattgttacgccccgactacatgatgaaattcactacaggagataat  
gtatatgcgtgatttaaaagataaaatatttttacacagaagggtgaatttcttgaaatgcttgaggagatagtaaagcaactagcaa  
agataaatccctaaaagggaaaaaattagaaaaatatctcgataccttagtgatcatttcattaaaattactgaacatcctaaaaagg  
gagatctcattttctatcctaattccaagaagatgggtgaacctgaaaacatctgaaaattgtcaagaatggcggcgcttcacaggg  
gttaccctgtttaaagactctaataaaagtagataataaaactatatatggaacatcatcgcactctggctaatacgcatgatattaatgac  
ataaaataataatgtgattgctcttaaaaaacagggtaaaaaactgaagcctcattaggttattttatcattttccgcttttaccgataccc  
ttggctggaggtgagtcagtatccggagttgatagcgcagttttcaagcggtaatcaaacacgtataaaacaaggagtaatcgcaa  
aagcaccacttgaagggtggcattatggcactaaagaaatcgtaaaaaattccacatgtattatcgtgttcgattgaatatagtggc  
ggaatttacgatattgataatttaaggagggcacacctcatttgcatgatgaaatttattacaggagatagttaaatgtataattttaag  
atgaaatagaagattacacagagcgggaattcattgagttgcttggcgagttacaaatccaaccggggataacgctcaattaaaaag  
gggaagagcttgacaaatattgggatgatctagaagaacatcttaccagaattacacaacatccggtgatgagcgtcttatctactat  
cctgcaaaga

[illegible]

gaaacctcgtgtgtgtgtttttgaactacgcagcaatgcgtgtgtaattttgtaattccgtttgtgtattggttctttacattttatgtaa  
ctgaattatgatgatagtactttcaactatcacagataatggatatgcgcgagaatgcacctgctttatgtagatgtgttgattttctgg  
ataaaaaaaaaagcaattgtaagttttcatcacatttaatagatactttaagtctgataacatactgttttaactagctatataccggattgt  
ctgcctgctgaacaccatgccttagccaccagcacaataatcttaciaaaggctatataagaataaataagatgtaataatacaatgg  
gtttgtaacgcgagtatttaatatataatttgcgagctaaagtgaacacgttaagtaattgaataatttttcataaaagcatttcttattgat  
cgagaaataagttttctatttaatgcaataagttaaggataaacgggaatgaaataaagtgggcgatattgtttacctgagaataatc  
ggtgagaagcagggcgatatttcttcaggctgtgggacgtatgcgtcggttggtaatcgctggcaggttggccatgaagatgaaat  
tttgctttgcactcaccaacgccattaccagtactgataatggcgtaatactacaggggctacaattttgcaaactcattgataaaagc  
tcaccgctattgtctaagccatcaatcagaatgagcgggtatttattgaaatcgatttgatcgtataaataaaagcgggcgatgggaa  
cgggtattattatattcagctaagaaatgcttcattaactgctattcatgtaaacatttctgacaataatcttctaccgaatgtgtaactgtc  
gattatgactacatattatgtaaacatctcatagccaatacgggaattgactggttggcctttctgtcgtggctataatagcttatttccg  
cctaaaagtccacctgccagtaaatcttaagcctgaaccgctaccagttgttaaccttccactctcttcaccagcgggtaacccgggtcta  
tgcaaaatcctgtctgaaggagaagggatgtacagatgctggaacggcagaagaacccgctgaaaacttcgggtcaagtagcgatt  
tttgctcagccagtggttgatgactgctgtggataccaccatcccagggtaacgatgtcgggcaacccgcagaagctcaaacat  
gctactgtttccgggtagtggttgccgggtcaaatatggggtaaatggtcgctcagtggcatactcagtgaacccgcggctcttac  
atcgggtgcgttggcatctgctctgtatattccctctgcgggcgagggcagtgctcgcgtgcccgacgtgatgagttctggatgag  
gaagaactgcggcagaaaagcactagcaggcagttaccgccaccacccgggtgcgtttttctgggggaactgacattcacggcaag  
cctcaggtgatgtgtgttcacaggggtgaagggtacgccgtatgaaaacgtccgcgtggcgaaacatgcagtgggaacgagcagacg  
cagcgttatgaattacccccgctcacgatgtcgatggccccctgattacctggacgccggaaaatccggaacatgggaatgttac  
ggggccataccggtaacgacaggccgccgctggagcagccaccattctggtgacgccgattccggacggcaccgataccctata  
ccacgccgccattcccgggtcctgatccgaaagaattcaacgattatattctggttttccggcggggatccgggttaagcctatctatg  
ttcacctgaaggaggatccgcgaaaagctgcctgggtgtgtaacagggcacggcgctcccgctttaccagggaactcgctgggtgga  
tatgtcgatatccaataacggcaacggcgccaccaatcccggcgcatattgctgataaattgcgcggacggggagttaaacccttga  
tgagtttcgcgaggcgctgtggctggaggtgagtcaggatccggagttgatagcgcagttttcaagtggtaaccaaacacgtataa  
aacaaggattgaccgcaaaagcacctattgacggctggcattatggccctaaagatatagttaaaaaattccagatacatcatcgtgt  
tgcaattgaatatggcggcgagcgtatacgaattgataacttacgaattgttacccccagactacacgatgagattcactacaggaga  
taaatatgtttaaagaaaagctccaggattataccgaggatgaatttctaatttttaggcggattgagatcatctatgaaagattgaa  
aatccttaaaaggtgaaggagctagaaatgtactgggattcattagtagatcattttattgaaattacacagcatccgtcagggagcgat  
ctaattttctaccctaaaagtcaaggagatgataagcctgaaaacatcctgaaaatcgtaaaagaatggcggcggttcacaggggcta  
ccctgtttaagactctaataaagtagataataaaactatataatggaacatcatcgcatctggctaatacgatgatattaatgacata  
aaataataatgtgattgctcttaaaaaacagggtaaaaatactgaagcctcattagggtattttatcattttccacttttaccgataccctt  
ggctggaggtgagtcagtatccggagttgatagcgcagttttcaagcggtaatacaaacgtataaaacaaggattaatcgcaaaa  
gcaccactgaagggttgccattatggcactaaagaaatcgtaaaaaattccacatatatcatcgtgttcgatcgaatatagtggcg  
gaatttacgatattgataatttaaggagggcacacctcatttgcgatgatgaaatttattacaggagatagttaaatgataattttaagat  
aaaatagaagattacacagagcgggaattcattgagttgcttggcgagtttacaatatcaaccggggataacgctcaattaaaagg  
ggaagtgctagacaaatattgggatgatctagaagaacatctaccagaattacacaacatccgttgatgagcgatcttatctactatc  
ctgcaaaagaaggagatgatgaacctgaaaacatcctgaaaatcgtaaaagaatggcggcgcttcgaaggattgcctttgttcaaa  
gattcagaatgaactctaacagaatctgtcacctgaaaatcatcacgttctggttaagtgtg

## Priloge E: Poravnave nukleotidnih zaporedij PAI*usp*.

|                         |                                                                                                       |      |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| E. coli Z16_usp_PAI     | ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGTTGGCGGCTCAAATATGGGGAAAAATGGTCGCTCAGTGGCATACTCAGTGCAACCTGCGGCTCTTACATCGGTGCGT | 100  |
| H41                     | .....                                                                                                 | 100  |
| H61                     | .....                                                                                                 | 100  |
| HS2                     | .....                                                                                                 | 100  |
| E. coli UT189_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 100  |
| E. coli S88_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 100  |
| E. coli UM146_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 100  |
| E. coli IHE3034_usp_PAI | .....                                                                                                 | 100  |
| E. coli Z13_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 100  |
| E. coli Z16_usp_PAI     | TGGCATCTGCGTTTGTATATTCCTCTGCGGGCGAAGGCGAGTGCCTGCGTGCCGGACGTAATGAGTTCTGGTATGAGGAAGAACTGCGGCAGAAAGCACT  | 200  |
| H41                     | .....                                                                                                 | 200  |
| H61                     | .....                                                                                                 | 200  |
| HS2                     | .....                                                                                                 | 200  |
| E. coli UT189_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 200  |
| E. coli S88_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 200  |
| E. coli UM146_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 200  |
| E. coli IHE3034_usp_PAI | .....                                                                                                 | 200  |
| E. coli Z13_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 200  |
| E. coli Z16_usp_PAI     | AGCAGGCGAGTACCGCCACCCCGGTACGTTTTTCTGGGGAAGTACATTACGCGCAAGCCCTCAGGTGATGGTGTTCATACGGGTGAAGGTACGCCG      | 300  |
| H41                     | .....                                                                                                 | 300  |
| H61                     | .....                                                                                                 | 300  |
| HS2                     | .....                                                                                                 | 300  |
| E. coli UT189_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 300  |
| E. coli S88_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 300  |
| E. coli UM146_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 300  |
| E. coli IHE3034_usp_PAI | .....                                                                                                 | 300  |
| E. coli Z13_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 300  |
| E. coli Z16_usp_PAI     | TATGAAAACGTCGCGTGGCGAAGCATCGATGGAACGAGCAGCAGCGTTATGAATTTACCCCGCTCAGCATGTCGATGGCCCCGTGATTACCTGGA       | 400  |
| H41                     | .....                                                                                                 | 400  |
| H61                     | .....                                                                                                 | 400  |
| HS2                     | .....                                                                                                 | 400  |
| E. coli UT189_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 400  |
| E. coli S88_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 400  |
| E. coli UM146_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 400  |
| E. coli IHE3034_usp_PAI | .....                                                                                                 | 400  |
| E. coli Z13_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 400  |
| E. coli Z16_usp_PAI     | CGCGGAAAAATCGGGAACATGGGTATGTTCCGGG--CCATACCGGTAAAGCAGCAGCGCGGTGGAGCAGCCACCAATCTGGTGACGCCGATTCGGAC     | 498  |
| H41                     | .....                                                                                                 | 498  |
| H61                     | .....                                                                                                 | 498  |
| HS2                     | .....                                                                                                 | 498  |
| E. coli UT189_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 498  |
| E. coli S88_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 498  |
| E. coli UM146_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 498  |
| E. coli IHE3034_usp_PAI | .....                                                                                                 | 498  |
| E. coli Z13_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 498  |
| E. coli Z16_usp_PAI     | GGCACCAGTACCTATACCACGCCGCCATTCCCGGTTCTCGATCCGAAGAATTCAACGATTATATTCTGGTTTTTCCGGCGGGATCCGGTATTAGCCCA    | 598  |
| H41                     | .....                                                                                                 | 598  |
| H61                     | .....                                                                                                 | 598  |
| HS2                     | .....                                                                                                 | 598  |
| E. coli UT189_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 598  |
| E. coli S88_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 598  |
| E. coli UM146_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 598  |
| E. coli IHE3034_usp_PAI | .....                                                                                                 | 598  |
| E. coli Z13_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 598  |
| E. coli Z16_usp_PAI     | TCTATGTTTACC TGAAGGAGGATCCGCGAAAGCTGCCTGGTGTGTAACAGGGCGCGCGTCCCGCTTTCACCAGGAACCTCGCTGGCTGGATATGTCTGG  | 698  |
| H41                     | .....                                                                                                 | 698  |
| H61                     | .....                                                                                                 | 698  |
| HS2                     | .....                                                                                                 | 698  |
| E. coli UT189_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 698  |
| E. coli S88_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 698  |
| E. coli UM146_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 698  |
| E. coli IHE3034_usp_PAI | .....                                                                                                 | 698  |
| E. coli Z13_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 698  |
| E. coli Z16_usp_PAI     | ATCCAATAACGGCAACGGCGCACCAATCCCGGCGCATATTGCTGATAAATTGCGCGGACGGGAGTTTAAAACCTTTGATGAGTTTTCGGAGGCGCTGTGG  | 798  |
| H41                     | .....                                                                                                 | 798  |
| H61                     | .....                                                                                                 | 798  |
| HS2                     | .....                                                                                                 | 798  |
| E. coli UT189_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 798  |
| E. coli S88_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 798  |
| E. coli UM146_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 798  |
| E. coli IHE3034_usp_PAI | .....                                                                                                 | 798  |
| E. coli Z13_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 798  |
| E. coli Z16_usp_PAI     | CTGGAGGTGAGTCAGGATCCGGAGTTGATAGCGCAGTTTTCAAGTGGTAACCAAACCTCGTATAAAACAAGGATTAAACGCAAAAGCACCTATTGACGGTT | 898  |
| H41                     | .....                                                                                                 | 898  |
| H61                     | .....                                                                                                 | 898  |
| HS2                     | .....                                                                                                 | 898  |
| E. coli UT189_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 898  |
| E. coli S88_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 898  |
| E. coli UM146_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 898  |
| E. coli IHE3034_usp_PAI | .....                                                                                                 | 898  |
| E. coli Z13_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 898  |
| E. coli Z16_usp_PAI     | GGTATTATGGCCCTAAAGAAATAGTTAAAAAATCCAGATTACATCTGTTTGCAGTTGAATATGGCGGACGCGTATACGATATTGATAAATTACGAAT     | 998  |
| H41                     | .....                                                                                                 | 998  |
| H61                     | .....                                                                                                 | 998  |
| HS2                     | .....                                                                                                 | 998  |
| E. coli UT189_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 998  |
| E. coli S88_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 998  |
| E. coli UM146_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 998  |
| E. coli IHE3034_usp_PAI | .....                                                                                                 | 998  |
| E. coli Z13_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 998  |
| E. coli Z16_usp_PAI     | TGTTACCCCCAGACTACAGATGAGATTCACTACAGGAGATAA                                                            | 1041 |
| H41                     | .....                                                                                                 | 1041 |
| H61                     | .....                                                                                                 | 1041 |
| HS2                     | .....                                                                                                 | 1041 |
| E. coli UT189_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 1041 |
| E. coli S88_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 1041 |
| E. coli UM146_usp_PAI   | .....                                                                                                 | 1041 |
| E. coli IHE3034_usp_PAI | .....                                                                                                 | 1041 |
| E. coli Z13_usp_PAI     | .....                                                                                                 | 1041 |

## Priloga E1: Poravnava nukleotidnih zaporedij genov *usp* podtipa IIa.

|                    |                                                                                                        |      |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| E.coli Z25_usp_PAI | ATGCTACTGTTCCCGAGTAGTGTGTTGGCGACTCAAATATGGGGAAAAATGGTCGCTCAGTGGCATACTCAGTGCAACCCGCGGGCTCTTACATCGGTGCGT | 100  |
| H28                | .....G.....                                                                                            | 100  |
| H33                | .....C.....                                                                                            | 100  |
| H35                | .....G.....                                                                                            | 100  |
| H38                | .....G.....                                                                                            | 100  |
| E.coli Z25_usp_PAI | TGGCATCTGCTTTGTATATTCCCTCTGCGGGCGAGGGCAGTGCTCGCGTGCCCGGACGTGATGAGTTCTGGTATGAGGAAGAAGTGCAGGAGAAAGCACT   | 200  |
| H28                | .....C.....T.....T.....T.....C.....G.....                                                              | 200  |
| H33                | .....C.....T.....T.....T.....C.....G.....                                                              | 200  |
| H35                | .....C.....T.....T.....T.....C.....G.....                                                              | 200  |
| H38                | .....C.....T.....T.....T.....C.....G.....                                                              | 200  |
| E.coli Z25_usp_PAI | AGCAGGCAGTACCGCCACCCGGGTACGTTTTTCTGGGGAAGTACATTACCGGCAAGCCTCAGGTGTATGGTGTTCATACGGGTGAAGGTACGCCG        | 300  |
| H28                | T.....T.....G.....A.....C.....A.....                                                                   | 300  |
| H33                | T.....T.....G.....A.....C.....A.....                                                                   | 300  |
| H35                | T.....T.....G.....A.....C.....A.....                                                                   | 300  |
| H38                | T.....T.....G.....A.....C.....A.....                                                                   | 300  |
| E.coli Z25_usp_PAI | TATGAAAACGTCCGCGTGGCGAACATGCAGTGGAAACGAGGAGACGACAGCGTTATGAATTTACCCCGGCTCAGCATGTCGATGGCCCCCTGATTACCTGGA | 400  |
| H28                | .....T.....C.....G.....G.....                                                                          | 400  |
| H33                | .....T.....T.....G.....G.....                                                                          | 400  |
| H35                | .....T.....T.....G.....G.....                                                                          | 400  |
| H38                | .....T.....T.....G.....G.....                                                                          | 400  |
| E.coli Z25_usp_PAI | CGCGGAAAAATCCGGAACATGGGAATGTTCCGGGCCATACCGGTAACGACAGGCGCGCTGGAGCAGCCACCATTTCTGGTGACGCCGATTCCGGACGG     | 500  |
| H28                | .....T.....                                                                                            | 500  |
| H33                | .....T.....                                                                                            | 500  |
| H35                | .....T.....                                                                                            | 500  |
| H38                | .....T.....                                                                                            | 500  |
| E.coli Z25_usp_PAI | CACCGATACCTATACCACGCCGCCATTCCCGGTTCTGTATCCGAAAGAATTCAACGATTATATTCTGGTTTTTCCGGCGGGATCCGGTATTAAAGCCTATC  | 600  |
| H28                | T.....A.....                                                                                           | 600  |
| H33                | T.....A.....                                                                                           | 600  |
| H35                | T.....A.....                                                                                           | 600  |
| H38                | T.....A.....                                                                                           | 600  |
| E.coli Z25_usp_PAI | TATGTTTACCTGAAGGAGGATCCGCGAAAGCTGCCTGGTGTGTAACAGGGCGCGGCTCCCGCTTTCACAGGAACCTCGCTGGCTGGATATGTCGGTAT     | 700  |
| H28                | .....A.....                                                                                            | 700  |
| H33                | .....A.....                                                                                            | 700  |
| H35                | .....A.....                                                                                            | 700  |
| H38                | .....A.....                                                                                            | 700  |
| E.coli Z25_usp_PAI | CCAATAACGGCAACGGCGCACCAATCCCGGCGCATATTGCTGATAAATGCGCGGACGGGAGTTTAAACCTTTGATGAGTTTCGCGAGGCGCTGTGGCT     | 800  |
| H28                | .....G.....                                                                                            | 800  |
| H33                | .....                                                                                                  | 800  |
| H35                | .....                                                                                                  | 800  |
| H38                | .....                                                                                                  | 800  |
| E.coli Z25_usp_PAI | GGAGGTGAGTAAAGACTCAGTGTTATTGGCGCAGTTTATAAAAAGTAATCAGAAATAACGTTAGTCAAGGATATTCCCCCTATGTCCTGAGGAGGGGTAT   | 900  |
| H28                | .....                                                                                                  | 900  |
| H33                | .....                                                                                                  | 900  |
| H35                | .....T.....                                                                                            | 900  |
| H38                | .....                                                                                                  | 900  |
| E.coli Z25_usp_PAI | TATTACGGACCAATGAGATAGTTAAGAAATTCCAGATACATCATGTAGTTGCTATAGAACATGGTGGTGGAGTGTATGATATTGATAATTTAGGATTG     | 1000 |
| H28                | .....A.....                                                                                            | 1000 |
| H33                | .....A.....                                                                                            | 1000 |
| H35                | .....A.....                                                                                            | 1000 |
| H38                | .....A.....                                                                                            | 1000 |
| E.coli Z25_usp_PAI | TTACGCCCCGACTACATGATGAAATTCACCTACAGGAGATAA                                                             | 1041 |
| H28                | .....                                                                                                  | 1041 |
| H33                | .....                                                                                                  | 1041 |
| H35                | .....                                                                                                  | 1041 |
| H38                | .....                                                                                                  | 1041 |

Priloga E2: Poravnava nukleotidnih zaporedij genov *usp* podtipa Ib.

|                    |                                                                                                       |      |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| E.coli P17_usp_PAI | ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGTTGGCGGCTCAAATATGGGGAATAATGGTCGCTCAGTGGCATACTCAGTGCAACCCGCGGCTCTTACATCGGTGCGT | 100  |
| HS27               | .....T.....                                                                                           | 100  |
| E.coli P17_usp_PAI | TGGCATCTGCTCTGTATATTCCCTCTGCGGGCGAGGGCAGTGCTCGCTGCCCGGACGTGATGAGTTCTGGTATGAGGAAGAAGTGGCGCAGAAAGCACT   | 200  |
| HS27               | .....                                                                                                 | 200  |
| E.coli P17_usp_PAI | AGCAGGCAGTACCGCCACCAACCCGGGTGCGTTTTTCTGGGGAAGTACATTACACGGCAAGCCTCAGGTGATGGTGTTCATACGGGTGAAGGTACGCCG   | 300  |
| HS27               | .....                                                                                                 | 300  |
| E.coli P17_usp_PAI | TATGAAAACGTCGCGTGGCGAACATGCAGTGGAAACGAGCAGCAGCGTTATGAATTTACCCCCGCTCACGATGTCGATGGCCCCCTGATTACCTGGA     | 400  |
| HS27               | .....                                                                                                 | 400  |
| E.coli P17_usp_PAI | CGCCGGAAAAATCGGGAACATGGGAATGTTACGGGCCATACCGGTAACGACAGCGCGCGCTGGAGCAGCCACCAATTCGGTGACGCCGATTCCGGACGG   | 500  |
| HS27               | .....                                                                                                 | 500  |
| E.coli P17_usp_PAI | CACCGATACCTATACCACGCCGCCATTCCCGGTTCTTGATCCGAAAGAATTCAACGATTATATTCTGGTTTTTCCGGCGGGATCCGGTATTAAAGCCTATC | 600  |
| HS27               | .....                                                                                                 | 600  |
| E.coli P17_usp_PAI | TATGTTTACCTGAAGGAGGATCCGCGAAAGCTGCCGGTGTGTAACAGGGCAGCGGCTCCCGCTTTCACCAGGAACTCGCTGGCTGGATATGTCGATAT    | 700  |
| HS27               | .....C.....                                                                                           | 700  |
| E.coli P17_usp_PAI | CCAATAACGGCAACGGCGACCAATCCCGGCGCATATTGCTGATAAATGCGCGGACGGGAGTTTAAACCTTTGATGAGTTTCGCGAGGCGCTGTGGCT     | 800  |
| HS27               | .....                                                                                                 | 800  |
| E.coli P17_usp_PAI | GGAGGTGAGTCAGGATCCGGAGTTGATAGCGCAGTTTTCAAGTGSTAACCAACACGTATAAAACAAGGATTGACCGCAAAAGCACCTATTGACGGTCGG   | 900  |
| HS27               | .....                                                                                                 | 900  |
| E.coli P17_usp_PAI | CATTATGGCCCTAAAGATATAGTTAAAAAATCCAGATACATCATCGTGTGCAATTGAATATGGCGGCAGCGTATACGATATTGATAACTTACGAATTG    | 1000 |
| HS27               | .....                                                                                                 | 1000 |
| E.coli P17_usp_PAI | TTACCCCCAGACTACACGATGAGATTCACTACAGGAGATAA                                                             | 1041 |
| HS27               | .....                                                                                                 | 1041 |

### Priloga E3: Poravnava nukleotidnih zaporedij genov *usp* podtipa IIb.

|            |                                                                                                                                                       |      |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| H6_uspI    | ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGTTGGCGGCTCAAATATGGGGAATAATGGTCGCTCAGTGGCATACTCAGTGCAACCCGCGGCTCTTACATCGGTGCGT                                                 | 100  |
| H28_uspI   | .....C.....A.....                                                                                                                                     | 100  |
| HS27_uspII | .....T.....                                                                                                                                           | 100  |
| HS2_uspII  | .....T.....                                                                                                                                           | 100  |
| H6_uspI    | TGGCATCTGCTTGTATATTCCCTCTGCGGGCGAGGGCAGTGCTCGTGTGCCGAGTATGAGTTCTGGTATGAGGAAGAAGTGGCGCAGAAAGCGCT                                                       | 200  |
| H28_uspI   | .....C.....T.....                                                                                                                                     | 200  |
| HS27_uspII | .....C.....C.....G.....A.....                                                                                                                         | 200  |
| HS2_uspII  | .....A.....C.....C.....G.....A.....                                                                                                                   | 200  |
| H6_uspI    | TGCAGGCAGTACCGCCACTACCCGGGTGCGTTTTTCTGGGGAAGTACATTACACGCAAGCCCCAGGTATATGGTGTTCATACGGGTGAAGGTACGCCG                                                    | 300  |
| H28_uspI   | .....                                                                                                                                                 | 300  |
| HS27_uspII | A.....C.....A.....G.....T.....G.....                                                                                                                  | 300  |
| HS2_uspII  | A.....C.....A.....G.....T.....G.....                                                                                                                  | 300  |
| H6_uspI    | TATGAAAACGTCGCGTGGCGAACATGCTGTGGAACGAGGAGGCAGCGTTATGAATTTACCCCCGCTCACGATGTCGATGGCCCCCTGATTACCTGGA                                                     | 400  |
| H28_uspI   | .....T.....C.....                                                                                                                                     | 400  |
| HS27_uspII | .....A.....C.....C.....                                                                                                                               | 400  |
| HS2_uspII  | .....A.....C.....C.....                                                                                                                               | 400  |
| H6_uspI    | CGCCGGAAAAATCGGGAACATGGGAATGTTCCGGGCCATACCGGTAACGACAGCGCGCGCTGGATCAGCCACCAATTCGGTGACGCCGATTCCGGACGG                                                   | 500  |
| H28_uspI   | .....                                                                                                                                                 | 500  |
| HS27_uspII | .....T.....A.....G.....                                                                                                                               | 500  |
| HS2_uspII  | .....T.....G.....                                                                                                                                     | 500  |
| H6_uspI    | CACCGATACCTATACCACGCCGCCATTCCCGGTTCTTGATCCGAAAGAATTCAACGATTATATTCTGGTTTTTCCGGCGGGATCCGGTATTAAAGCCATC                                                  | 600  |
| H28_uspI   | .....T.....A.....                                                                                                                                     | 600  |
| HS27_uspII | .....T.....T.....                                                                                                                                     | 600  |
| HS2_uspII  | .....T.....                                                                                                                                           | 600  |
| H6_uspI    | TATGTTTACCTGAAGGAGGATCCGCGAAAGCTGCCGGTGTGTAACAGGGCAGCGGCTCCTGCTTTACCAGGAACTCGCTGGCTGGATATGTCGGTAT                                                     | 700  |
| H28_uspI   | .....C.....                                                                                                                                           | 700  |
| HS27_uspII | .....C.....C.....                                                                                                                                     | 700  |
| HS2_uspII  | .....C.....                                                                                                                                           | 700  |
| H6_uspI    | CCAATAACGGCAACGGCGACCAATCCCGGCGCATATTGCTGATAAATGCGCGGACGGGAGTTTAAACCTTTGATGAGTTTCGCGAGGCGCTGTGGCT                                                     | 800  |
| H28_uspI   | .....                                                                                                                                                 | 800  |
| HS27_uspII | .....A.....                                                                                                                                           | 800  |
| HS2_uspII  | .....                                                                                                                                                 | 800  |
| H6_uspI    | GGAGGTGAGTAAAGACTCAGTGTATTGGCGCAGTTTATAAAAAAGTAATCAGAATAACGTTAGTCAAGGATATCCCCCTATGTCCTCGAGGAGGGGTAT                                                   | 900  |
| H28_uspI   | .....                                                                                                                                                 | 900  |
| HS27_uspII | .....C.....G.....TC.....G.....A.....GA.....A.....TC.....GTG.....C.....A.....CACGTA.....AA.....TGA.....G.....AA.....A.....CA.....ATT.....C.....TCGG    | 900  |
| HS2_uspII  | .....C.....G.....TC.....G.....A.....GA.....A.....TC.....TG.....C.....A.....CACGTA.....AA.....TAA.....G.....AA.....A.....CA.....ATT.....C.....T.....GG | 900  |
| H6_uspI    | TATTACGGACCAATGAGATAGTTAAGAAATCCAGATACATCATGTAGTTGCTATAGAACATGGTGGTGGAGTGTATGATATTGATAATTTAAGATTG                                                     | 1000 |
| H28_uspI   | .....                                                                                                                                                 | 1000 |
| HS27_uspII | C.....T.....C.....T.....A.....T.....A.....CGT.....A.....T.....T.....C.....CA.....C.....A.....C.....C.....ACGA.....                                    | 1000 |
| HS2_uspII  | .....T.....C.....T.....A.....A.....A.....CGT.....AG.....T.....T.....C.....CA.....C.....A.....C.....C.....ACGA.....                                    | 1000 |
| H6_uspI    | TTACGCCCCGACTACATGATGAAATTCACCTACAGGAGATAA                                                                                                            | 1041 |
| H28_uspI   | .....                                                                                                                                                 | 1041 |
| HS27_uspII | .....C.....A.....C.....G.....                                                                                                                         | 1041 |
| HS2_uspII  | .....C.....A.....C.....G.....                                                                                                                         | 1041 |

### Priloga E4: Poravnava nukleotidnih zaporedij genov *uspI* in *uspII*.