

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Biochemijos ir biofizikos katedra

Biofizikos studijų programos II magistrantūros kurso studentė

Ana JUZĖNAITĖ

Magistrinis darbas

**Infekcijos terpės fizikocheminių savybių įtakos
bakteriofago PRD1 sąveikai su *Salmonella enterica* ląstelių
apvalkalėliu tyrimai**

Darbo vadovas:

Doc. habil. dr. (hp) Rimantas Daugelavičius

Vilnius 2008

**Infekcijos terpės fizikocheminių savybių įtakos bakteriofago PRD1
sąveikai su *Salmonella enterica* ląstelių apvalkalėliu tyrimai**

Darbas atliktas VU Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir biofizikos katedroje

Ana Juzėnaitė

Darbo vadovas:

Doc. habil. dr. (hp) Dr. Rimantas Daugelavičius

TURINYS

Santrumpos	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Bakterijų apvaskalėlių struktūra	8
1.1.1. Gramteigiamųjų bakterijų apvaskalėlių struktūra	9
1.1.2. Gramneigiamųjų bakterijų apvaskalėlių struktūra	11
1.2. Bakterijų ląstelių paviršiaus pralaidumo barjerai	13
1.2.1. Išorinės membranos barjeras	14
1.2.1.1. Baltyminiai kanalai	15
1.2.1.2. Lipopolisacharidų barjeras	17
1.3. Lipofilinių jonų sąveika su bakterijų membranomis	18
1.4. Membranas turinčių virusų patekimo į ląstelę būdai	19
1.4.1. Gyvūnų virusų patekimas į ląstelę	19
1.4.2. Membraną turinčio bakteriofago PRD1 patekimas į ląstelę	21
1.4.3. DNR patekimas į ląstelę šeimininkę	24
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	25
2.1. Medžiagos, biologiniai objektai ir prietaisai	25
2.1.1. Reagentai, mikroorganizmai ir aparatūra	25
2.1.2. Mitybinės terpės, tirpalai ir jų paruošimas	26
2.2. Metodai	27
2.2.1. Ląstelių auginimas	27
2.2.2. Ląstelių paruošimas potenciometriniam matavimams	27
2.2.3. Ląstelių dorojimas EDTA, EGTA	27
2.2.4. Bakteriofago titro nustatymas	28
2.2.5. Bakteriofago gryninimas	28
2.2.6. Potenciometriniai TPP^+ ir K^+ koncentracijos matavimai	29
2.2.7. Osmosinio slėgio ir joninės jėgos įtakos bakteriofago PRD1 infektyvumui nustatymas	30
2.2.8. Lizės tyrimas	30
2.2.9. Duomenų analizė	30

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	31
3.1. Bakteriofago PRD1 poveikio <i>S. enterica</i> ląstelių apvalkalėliui priklausomybė nuo infekcijos daugybės.....	31
3.2. Antibiotikų įtaka membranų laidumui.....	32
3.3. Temperatūros įtaka bakteriofago PRD1 infekcijai	33
3.4. Fago PRD1 įtakos bakterijų apvalkalėlio laidumui priklausomybė nuo terpės joninės jėgos ir osmosinio slėgio.....	35
3.5. Dvivalenčių jonų svarbos bakteriofago PRD1 infektyvumui tyrimai	37
3.6. Arsenato įtaka membranų laidumui ir bakteriofago infektyvumui	41
3.7. Aeracijos įtaka bakteriofago PRD1 infekcijai	41
3.8. Dvivalenčių jonų įtaka bakteriofago PRD1 sukiamai ląstelių lizei.....	44
IŠVADOS	46
SANTRAUKA (lietuvių kalba).....	47
SANTRAUKA (anglų kalba)	48
LITERATŪROS SĄRAŠAS	49

SANTRUMPOS

$\Delta\psi$ – membranos įtampa

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

EGTA – etilenglikolio(2-aminoetileterio)-N,N,N'N'-tetraacto rūgštis

GD – gramicidinas D

Glc – gliukozė

IM – išorinė membrana

LB – Luria-Bertani terpė

LPS – lipopolisacharidas

MOI – infekcijos daugybiškumas

OT – optinis tankis

PCB⁻ – fenildikarbaundekaborano anijonas

PM – plazminė membrana

PMB – polimiksinas B

TPP⁺ – tetrafenilfosfonio katijonas

Tris – tris-(hidroksimetil)aminometanas

ĮVADAS

Virusų ir ląstelės membranų sąveika yra svarbus kiekvienos virusinės infekcijos vyksmas. Infekcinio ciklo eigoje virusas mažiausiai du kartus turi įveikti ląstelių plazminę membraną – patekdamas į ją ir išeidamas iš ląstelės infekcijos pabaigoje. Eukariotinių ląstelių virusai reprodukcijos metu gali sąveikauti ir su viduląstelinėmis membranomis. Membranų susiliejimas (fuzija) yra įprastas reiškinys virusams patenkant į eukariotines ląsteles. Kai kurie apvalkalėlių turintys virusai tiesiogiai sulieja savo membraną su ląstelių plazmine membrana (PM), kiti į ląsteles patenka endocitozės būdu (Poranen et al., 2002). Daugelyje virusų identifikuoti specializuoti viriono glikoproteinai, atsakingi už viruso apvalkalėlio sąveiką su ląstelės membranomis. Santykinis sąveikoje dalyvaujančių viruso komponentų apibrėžtumas bei galimybė sekti ir kontroliuoti patį sąveikos procesą skatina tirti šį reiškinį ir teikia vilties ne tik giliau pažinti biologinių membranų sąveiką, bet ir sukurti naujus efektyvius priešvirusinius vaistus.

Bakteriofagai (bakterijų virusai, fagai) turi keletą pranašumų prieš tradicinius antibiotikus. Antibiotikai ypatingai nesirinkdami užmuša visas jautrias bakterijas, tame tarpe ir gerąsias, atliekančias esmines funkcijas žmogaus organizme. Fagus galima labai atrankiai nutaikyti į kenksmingas bakterijas ir jas išnaikinti, visiškai nekenkiant naudingosioms. Dėka to, kad fagai dauginasi eksponentiniu greičiu, mažos šių bakterijų virusų dozės gali užtekti bakterinės infekcijos išgydymui. Be to, bakteriofagai negali infekuoti žmogaus, kitų gyvūnų ar augalų, jie pavojingi tik bakterijoms.

Biologinių membranų sąveika yra neatsiejama ir bakterijų infekcijos membraną turinčiais fagais dalis. Žinoma, kad lipidinį apvalkalėlių turintys fagai, tokie kaip $\phi 6$, $\phi 13$, sulieja jį su ląstelių-šeimininkių išorine membrana (IM) (Bamford et al., 1987; Daugelavičius et al., 2005). Manoma, kad fagas PM2, turintis membraną baltyminės kapsidės viduje, taip pat ją sulieja su infekuojamų ląstelių IM (Kivela et al., 2004). *Tectiviridae* šeimai priklausantis bakteriofagas PRD1, infekuojantis dauginiu atsparumu antibiotikams pasižyminčias gramneigiamąsias bakterijas, bei gramteigiamųjų bakterijų *Bacillus thuringiensis* fagas BAM35 kapsidės viduje esančią membraną taip pat naudoja patekimui į ląstelę. Manoma (Grahn et al., 2003; Gaidelytė et al., 2006; Daugelavičius et al., 2007), kad šių fagų membrana patekimo metu susilieja su infekuojamų ląstelių plazmine membrana. Deja, tai įrodyti tiesiogiai yra gana sudėtinga.

Lipofiliniai jonai – tai krūvį turinčios molekulės, kurios yra tirpios tiek poliniuose, tiek ir nepoliniuose tirpikliuose. Biologinės membranos yra laidžios šiems jonams dėl jų

gebėjimo susirišti su lipidiniais dvisluoksniais bei įveikti hidrofobinį membranų sluoksnį. Lipofiliniai jonai dažnai naudojami kaip membranos įtampos ($\Delta\psi$) indikatoriai mikroorganizmų ląstelėse, eukariotinių ląstelių organelėse ir membraninėse pūslelėse. Panaudojant lipofilinius jonus galima tirti ir antibiotikų bei fagų poveikį bakterijų IM laidumui (Daugelavičius et al., 1997; 2000).

Registruodami fago sukiamas tetrafenilfosfonio (TPP^+), fenildikarbaundekaborano (PCB^-) ir kalio (K^+) jonų sroves bei tirdami membranose aktyvių antibiotikų poveikį membranos įtampai ir kalio jonų gradientui pabandėme įvertinti *Salmonella enterica* ląstelių PM ir IM laidumo pokyčius bakteriofago PRD1 infekcijos eigoje. Šio darbo tikslas buvo iširti infekcijos terpės fizikocheminių savybių ir ląstelių energetikos įtaką bakteriofago PRD1 sąveikai su *S. enterica* ląstelių apvalkalėliu. Tuo būdu buvo tikėtasi geriau pažinti ląstelės ir fago membranų sąveiką bei ją įtakojančius veiksnius.

Darbo tikslui įgyvendinti buvo iškelti tokie uždaviniai:

- Iširti pradinėse infekcijos stadijose vykstančius infekuojamų *S. enterica* ląstelių membranų laidumo pokyčius bei nustatyti jų priklausomybę nuo viduląstelinio ATP;
- Iširti kaip bakteriofago PRD1 sąveika su *S. enterica* ląstelių apvalkalėliu priklauso nuo infekcijos terpės temperatūros, joninės jėgos, osmosinio slėgio ir divalenčių jonų koncentracijos;
- Iširti infekuotų ląstelių aeracijos ir viduląstelinio ATP įtaką fago sukeliama lizei.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Bakterijų apvalkalėlių struktūra

Bakterijos ląstelę sudaro šie komponentai: ląstelės apvalkalėlis, į kurio sudėtį gali įeiti kapsulė, ląstelės sienelė, išorinė (IM) ir plazminė (PM) membranos, bei citoplazminiai elementai: citozolis, nukleoidas, ribosomos ir kt. Bakterijų ląstelėse nėra viduląstelinių membraninių struktūrų: branduolio membranos, mitochondrijų, Goldžio aparato, endoplazminio tinklo (Alberts et al., 2002).

Bakterinę citoplazmą supa PM, kuri yra sudaryta iš dvigubo fosfolipidų sluoksnio su įsiterpusiais į ją baltymais. Vidinė dvisluoksnio dalis yra hidrofobinė ir jos storis sudaro apie 3.5 nm. Išorinių sluoksnių, kurie susideda iš polinių lipidų molekulių sričių ir baltymų, storis yra apie 2 nm. Taigi, visos membranos storis yra apie 7.5 nm. Išskirtų bakterinių membranų cheminė analizė parodė, kad jos turi panašumų su membraninėmis struktūromis, išskirtomis iš augalų ir gyvūnų. Bakterinių PM ypatumas yra tas, kad jose yra ypač daug baltymų, kurie sudaro 70–75% sausos šių struktūrų masės (Madison et al., 2003). Baltymai yra pagrindinis biologiškai aktyvus membranų komponentas. Plazminėje membranoje išsidėsčiusios įvairios medžiagų pernašos sistemos, taip pat oksidacinio fosforilimo bei makromolekulių biosintezės fermentai. Ši membrana – tai difuzinis barjeras hidrofilinėms medžiagoms (Osborn et al., 1980).

Ląstelės sienelė – tai svarbus prokariotų struktūros elementas. Tai standi, porėta, uždara struktūra, apsauganti ląstelę nuo fizinių poveikių. Tyrimai parodė, kad bakterijų ląstelių apvalkalėliai dalyvauja daugelyje fiziologinių procesų. Ląstelių sienelė atlieka šias funkcijas:

1. suteikia ląstelei atitinkamą dydį ir formą;
2. tai mechaninis barjeras, neleidžiantis į ląstelę patekti didelėms molekulėms ir apsaugantis ją nuo osmosinio slėgio pasikeitimų;
3. tai selektyvus barjeras, per kurį gali vykti atranki pernaša;
4. ląstelių sienelėje yra specifiniai receptoriai bakteriofagams.

Bakterijos skiriasi savo sienelės struktūra ir chemine sudėtimi. Pagal reakciją į danų mokslininko Grammo pasiūlytą diferencinį prokariotų dažymo būdą, bakterijos skirstomos į gramteigiamąsias ir gramneigiamąsias. Šis empirinis kriterijus remiasi nuosekliu ląstelių

apdorojimu: dažymu kristaliniu violetiniu bei jodu, blukinimu etilo alkoholio ir acetono mišiniu, ir papildomu dažymu safraninu. Po šių procedūrų gramteigiamosios bakterijos nusidažo violetine spalva, o gramneigiamosios, - t.y. nesidažančios bakterijos (pvz.: *Escherichia coli* ar *Salmonella enterica*)- yra rausvos.

Gramneigiamųjų bakterijų sienelė yra sudėtingesnė negu gramteigiamųjų. Standus bakterinių sienelių karkasas susidaro kovalentiškai susijungiant polisacharidams ir polipeptidams. Šis karkasas gramteigiamosiose bakterijose yra storesnis negu gramneigiamosiose. Prie šio struktūrinio pagrindo jungiasi sienelių komponentai, skirtingi gramteigiamosiose ir gramneigiamosiose bakterijose (Madison et al., 2003).

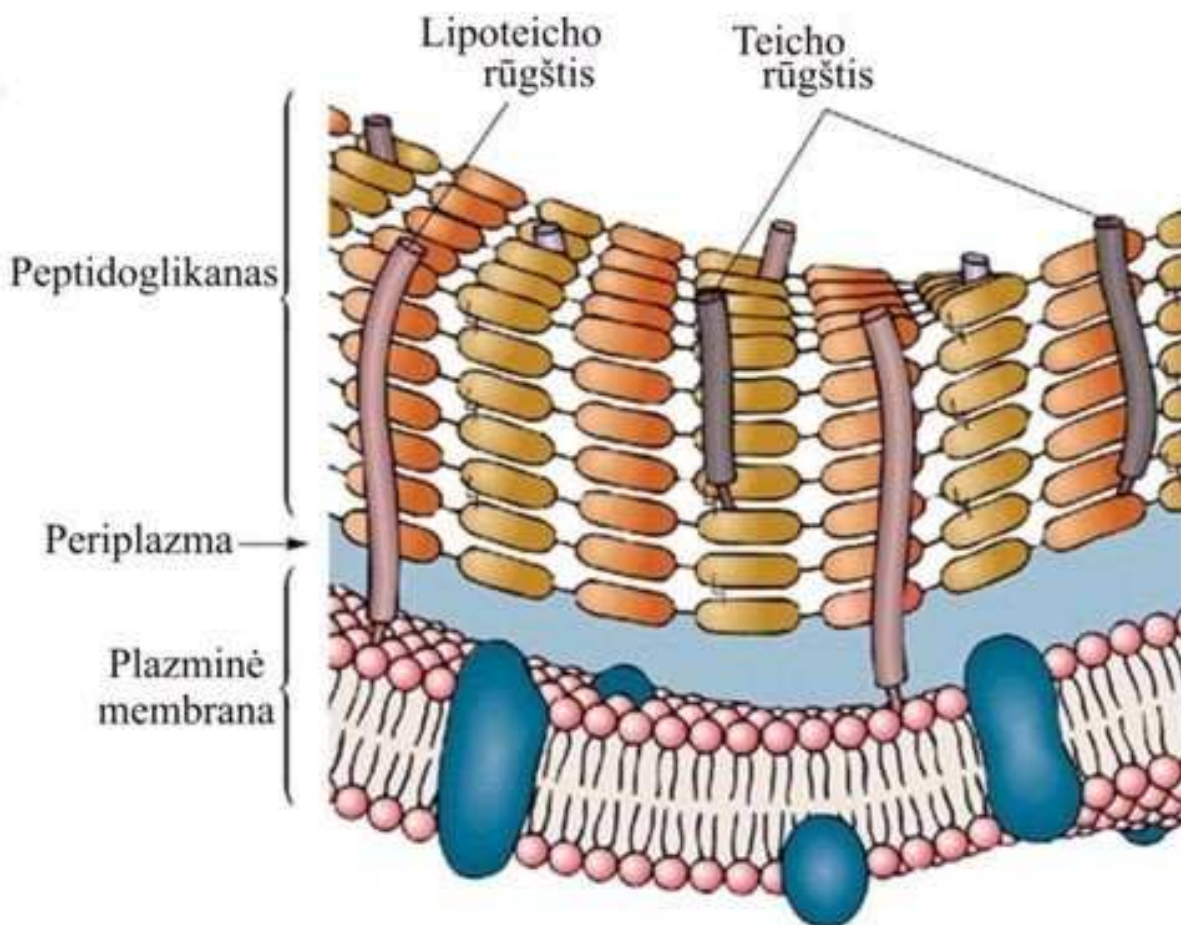
1.1.1. Gramteigiamųjų bakterijų apvalkalėlių struktūra

Gramteigiamųjų bakterijų sienelė (1.1 pav.) yra storesnė ir labiau amorfinė lyginant su gramneigiamosiomis bakterijomis. Jos pagrindinę masę sudaro specifinis heteropolimeras – peptidoglikanas (Madison et al., 2003), dar vadinamas mureinu (lot. murus – sienelė). Gramteigiamosiose bakterijose peptidoglikanas sudaro 50 – 90% sausos sienelės masės, jo storis 20-80 nm. Gramteigiamųjų ląstelių peptidoglikanas – tai didžiulė polisacharidinio – peptidinio komplekso molekulė su kryžmiškai išsidėsčiusiomis glikano grandinėmis, kurios susijungusios glikozidinėmis ir peptidinėmis jungtimis.

Pagrindinis pasikartojantis polisacharidinių grandinių vienetas yra muropeptidas - disacharidas, kuriame N-acetil-D-gliukozaminas sujungtas β (1-4) ryšiu su N-acetilmuramo rūgštimi, prie kurios prijungta tetrapeptidinė šoninė grandinė, susidedanti iš L-Ala, D-Ala, D-Glu ir arba diaminopimelo rūgšties, arba L-Lys, kuris yra diaminopimelo rūgšties dekarboksilinimo produktas. Skersiniai tilteliai tarp ilgų lygiagrečių polisacharidinių grandinių susidaro susijungiant šoninėms peptidinėms grandinėms. Tai išaiškinta, tiriant mureino hidrolizės produktus: vieno polisacharido galinė D-Ala liekana šoninėje peptidinėje grandinėje kovalentiškai jungiasi su kaimyninio polisacharido peptidine šonine grandine.

Peptidoglikanas – tai polielektrolitas, kurio įkrautos grupės sąveikauja tarpusavyje. Jo matrica kovalentiškai "prisiūta" prie kitos makromolekulinės sienelės dalies, sudarytos iš polisacharidų ir polifosfatų – teicho rūgščių. Tai vandenyje tirpūs polimerai, turintys fosfodiesterinėmis jungtimis sujungtas ribitolio ar glicerolio liekanas. Teicho rūgštys gali kovalentiškai jungtis su N-acetilmuramo rūgštimi (Madison et al., 2003). Prie laisvų ribitolio ar glicerolio hidroksilinių grupių gali būti prisijungusios įvairios medžiagos; pvz., *B. subtilis*

ląstelėms būdinga D-gliukozė. Ilgos teicho rūgščių molekulės perveria peptidoglikano sluoksnį ir gali išsikišti į paviršių. Tai nulemia bakterijos pagrindines antigenines savybes. Priklausomai nuo augimo sąlygų, sienelės teicho rūgštys gali būti pakeistos kitais anijoniniais polisacharidais – teichurono rūgštimis, kurios taip pat gali surišti peptidoglikaną. Lipoteicho rūgštys susijungia su plazmine membrana, todėl yra nepakeičiamos ir nepriklauso nuo augimo sąlygų (Archibald *et al.*, 1989).



1.1 pav. Gramteigiamųjų bakterijų apvalkalėlis.

Sienelės mechaninės savybės labai priklauso nuo sienelių hidratacijos laipsnio, kuris įtakojamas augimo terpės. Gramteigiamųjų bakterijų sienelės lengvai suriša jonus. Peptidoglikanas turi tiek anijonines (karboksi), tiek katijonines (amino) grupes. Bendras krūvis augimo metu visada yra neigiamas. Pasiekiamos jonų surišimo vietos sienelėje yra nevienodai pasiskirsčiusios. Nors joninis polimeras yra visoje sienelėje, *B. subtilis* daugiau surišimo vietų turi išorinėje sienelės dalyje. Neigiamai įkrautų grupių taip pat daugiau ląstelės poliuose negu cilindrinėje dalyje. Manoma, kad septoje jų visai nėra.

B. subtilis peptidoglikano ir teicho rūgščių sintezė yra slopinama skyriklių ir jonoforų, pvz., valinomicino. Tačiau valinomicinas neslopina laisvų lipidų arba lipoteicho rūgščių formavimosi. Tai rodo, kad lipoteicho rūgščių ir sienelės teicho rūgščių sintezės mechanizmai yra skirtingi. Ląstelės sienelės sintezėje dalyvaujančių fermentų aktyvumas priklauso nuo elektrocheminio protonų gradiento. Jis reikalingas kaip energijos šaltinis sintetinamų fermentų rotacijai ir reorientacijai, sienelės pirmtakų translokavimui per PM. Sienelių teicho rūgščių glikozilinimas nėra jautrus valinomicinui. Jam jautrus glicerolio fosfato grandinėlių formavimas.

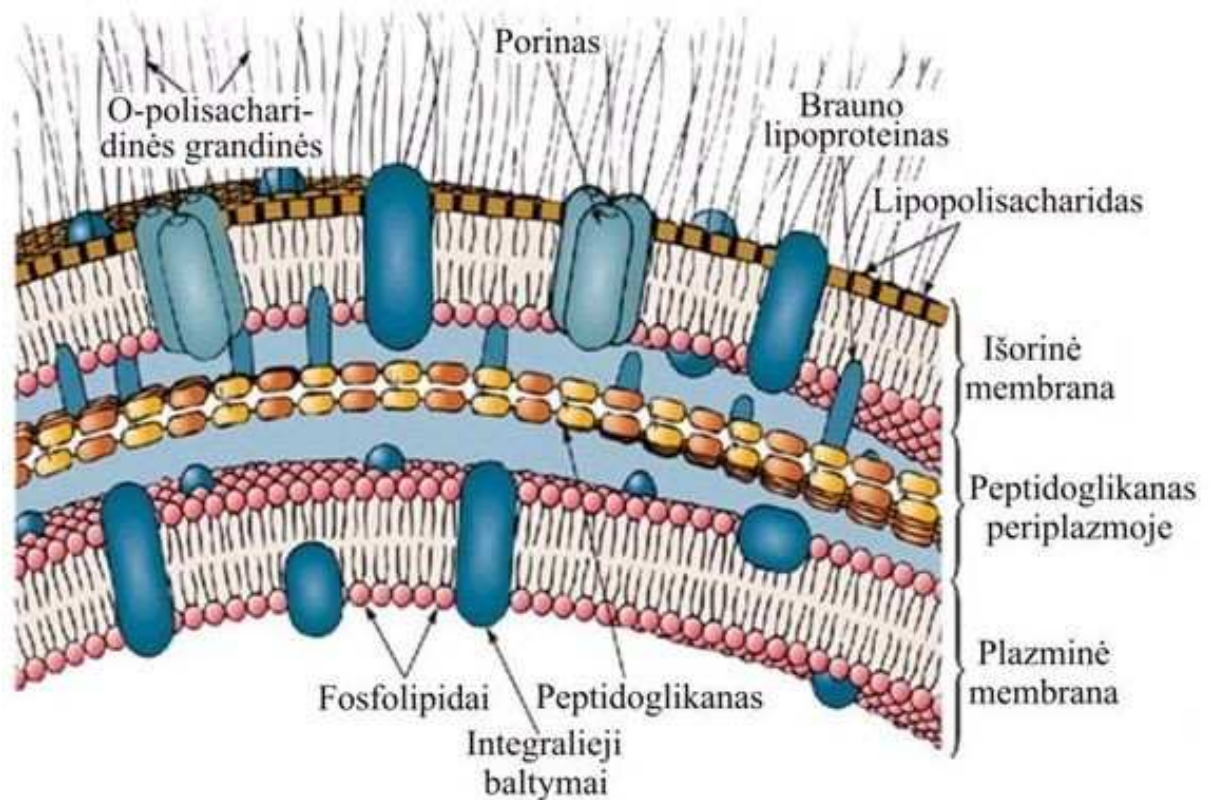
Elektrocheminio protonų gradiento išnykimas gali aktyvuoti autolizinus arba fermentus, kurie degraduoja membranos lipidus. Teicho rūgštis degraduojantys fermentai rasti sporuliacijos arba badavimo metu (Harrington ir Badilly, 1984). Teicho rūgštys nulemia ne tik nespecifines ląstelių savybes (pvz.: krūvį, poliškumą, hidrofobiškumą), bet ir specifines paviršiaus savybes (pvz.: antigeniškumą, sugebėjimą surišti antikūnus ir fagus (Archibald et al., 1989)).

1.1.2. Gramneigiamųjų bakterijų apvalkalėlių struktūra

Gramneigiamųjų bakterijų ląstelės turi sudėtingos struktūros apvalkalėlius (1.2 pav.), sudarytus iš kelių sluoksnių. Iš išorės ląstelę supa išorinė membrana (IM), kurią nuo plazminės membranos (PM) skiria periplazma. Periplazmoje yra plonas, 2- 3 nm, peptidoglikano sluoksnis. Jis sudaro 15-20 % sauso sienelės svorio. Išorinė membrana savo sudėtyje turi unikalų komponentą – lipopolisacharidą (LPS). LPS molekulės yra išsidėsčiusios IM išoriniame sluoksnyje. Jų sudėtyje išskiriamos trys dalys: proksimalinė hidrofobinė lipido A, sudaryto iš sočiųjų riebalų rūgščių, susijungusių su fosforilinto gliukoamino disacharido molekulėmis; distalinė hidrofilinė polisacharido dalis, nukreipta į terpę; ir šias dalis jungianti šerdinio polisacharido sritis. Šerdinio polisacharido sritis turi daug neigiamai įkrautų grupių, kurios nulemia antigenines bakterijos savybes, o lipidas A lipopolisacharidą įtvirtina išorinėje membranoje. Išorinę LPS dalį – O-polisacharidą – sudaro pasikartojančios heksozės: gliukozė, galaktozė, manozė, ramnozė. Galimi šimtai O-polisacharidų kombinacijų; skirtingų gramneigiamųjų bakterijų kamienų ląstelės savo sudėtyje turi skirtingas O-polisacharidų molekules. Būtent šios LPS dalys lemia bakterinių ląstelių antigenines savybes bei toksiškumą. Išorinės membranos vidinis sluoksnis sudarytas iš fosfolipidų. *E. coli* atveju

tai daugiausia fosfatidiletanolaminas, su nedideliais kiekiais fosfatidilglicerolio ir kardiolipino.

IM – tai difuzinis barjeras hidrofobinėms ir amfifilinėms medžiagoms: jonoforams, pvz., karbonilcianid-p – trifluormetoksifenilhidrazonui ir valinomicinui, dažams – metileno mėliui, kristalvioletui, daugeliui antibiotikų. Barjerinės IM savybės priklauso tiek nuo LPS, tiek ir nuo baltymų, įeinančių į šios membranos sudėtį. Įvairios hidrofilinės baltyminės poros, perveriančios IM, užtikrina pasyvią mažos molekulinės masės medžiagų difuziją pro IM. Šios membranos baltymų sudėtis ir kiekis skirtingų bakterijų ir jų kamienų ląstelėse yra skirtingas ir gali labai keistis, priklausomai nuo bakterijų kultyvavimo sąlygų. *E. coli* IM baltymai Omp C, Omp D, Omp F sudaro poras, laidžias hidrofilinėms medžiagoms, kurių molekulinė masė nesiekia 600 Da (Vaara, 1992). Šie baltymai dar vadinami “matriksiniais” poriniais. Jie beveik be atrankos praleidžia mažas hidrofilines molekules. IM yra baltymų, sudarančių ir atrankius kanalus, pvz., baltymas Lam B sudaro poras, laidžias tik maltozei ir maltozės oligosacharidams. Gramneigiamųjų bakterijų IM su po ja esančiu peptidoglikano sluoksniu yra sujungta lipoproteinų molekulėmis. Lipoproteinų baltyminių komponentą sudaro 57 aminorūgštys, vyrauja 15 aminorūgščių pasikartojančios sekos. Pagrindinė lipoproteinų funkcija gramneigiamųjų bakterijų apvalkalėlių struktūroje yra IM stabilizavimas, jos pritvirtinimas prie peptidoglikano sluoksnio. Tyrimai elektroniniu mikroskopu parodė, kad trys porino molekulės sudaro hidrofilinę porą, kurios diametras 1.5-2 nm. Manoma kad kiekviena porino molekulė sąveikauja su trimis lipoproteino molekulėmis, iš kurių viena susirišusi su peptidoglikanu, o kitos dvi – laisvos.



1.2 pav. Gramneigiamųjų bakterijų apvalkalėlis.

IM yra apie 10 nm atstumu nuo ląstelės PM, sudarytos iš dvigubo fosfolipidų sluoksnio su įsiterpusiais į jį baltymais. Šioje membranoje yra išsidėstę už įvairių medžiagų pernašą atsakingi baltymai, taip pat oksidacinio fosforilavimo bei kai kurios makromolekulių biosintezės sistemos.

PM yra difuzinis barjeras hidrofiliinėms molekulėms. Tarp PM ir IM yra periplazminė ertmė, į kurios sudėtį įeina peptidoglikano sluoksnis. Kai kurios medžiagos, patekusios į periplazminę ertmę, gali protonizuotis, kadangi periplazmos pH yra žemesnis nei ląstelės išorėje (Lipowsky, 1995).

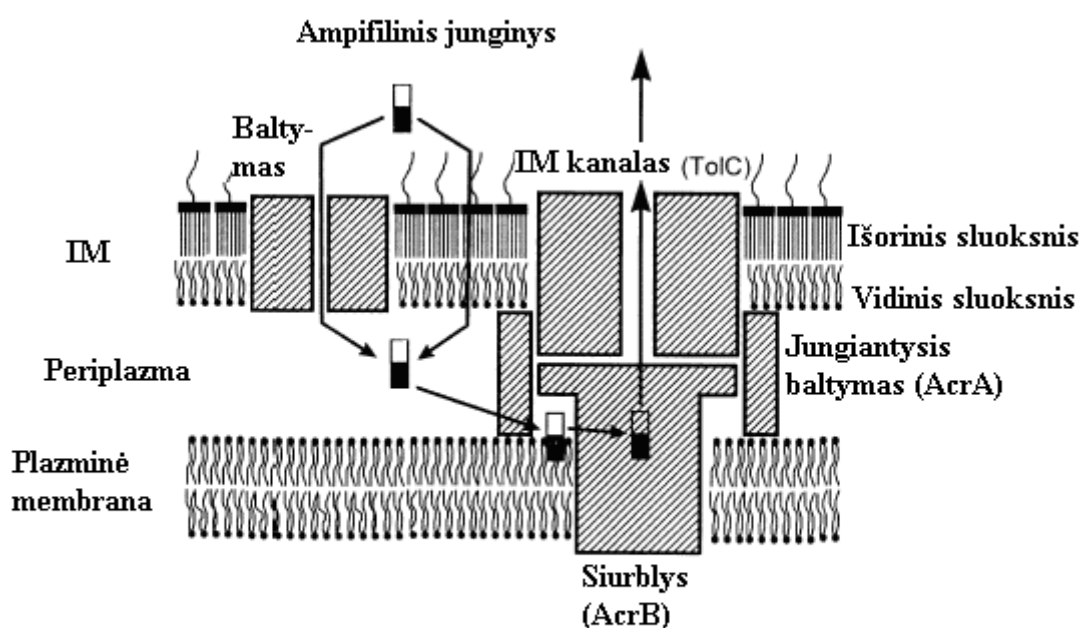
1.2. Bakterijų ląstelių paviršiaus pralaidumo barjerai.

Bakterijos, būdamos vienaląstėmis, yra pastoviai veikiamos aplinkoje esančių nuodingų junginių. Gramneigiamosios bakterijos ir mikobakterijos labai sėkmingai išgyvena būdamos nuodinguose mišiniuose, kadangi jos turi bent 2 atsparumo mechanizmus. Visų

pirma, jos turi efektyvų pralaidumo barjerą, sudarytą iš IM (gramneigiamųjų atveju) arba mikolato turinčios ląstelės sienelės (mikobakterijų atveju). Be to, jos aktyviai stumia vaistų molekules pro barjerus iš ląstelės, dažnai tam panaudodamos dauginio atsparumo vaistams (DAV) siurblius. Gramneigiamųjų bakterijų DAV siurbliai atpažįsta ir išstumia iš ląstelės labai įvairias medžiagas. Būdami integralia PM dalimi, jie, panaudodami pagalbinius baltymus, dažniausiai sąveikauja su IM poriniais, formuodami baltyminius kompleksus, kurie, apeidami IM barjerą, išstumia vaistų molekules tiesiai į terpę (Nikaido, 2001).

1.2.1. Išorinės membranos barjeras

IM – tai difuzinis barjeras hidrofobinėms ir amfifilinėms medžiagoms. Visos gramneigiamųjų bakterijų ląstelės yra padengtos IM, kuri yra virš PM ir periplazmos (1.3 pav.). Šio apvalkalėlio sluoksnio pagrindinė funkcija yra ta, kad jis tarnauja kaip efektyvus pralaidumo barjeras (Nikaido, 2000; Nikaido, 2001).



1.3 pav. IM pralaidumo barjero ir dauginio atsparumo vaistams siurblio sąveika gramneigiamųjų bakterijų apvalkalėlyje

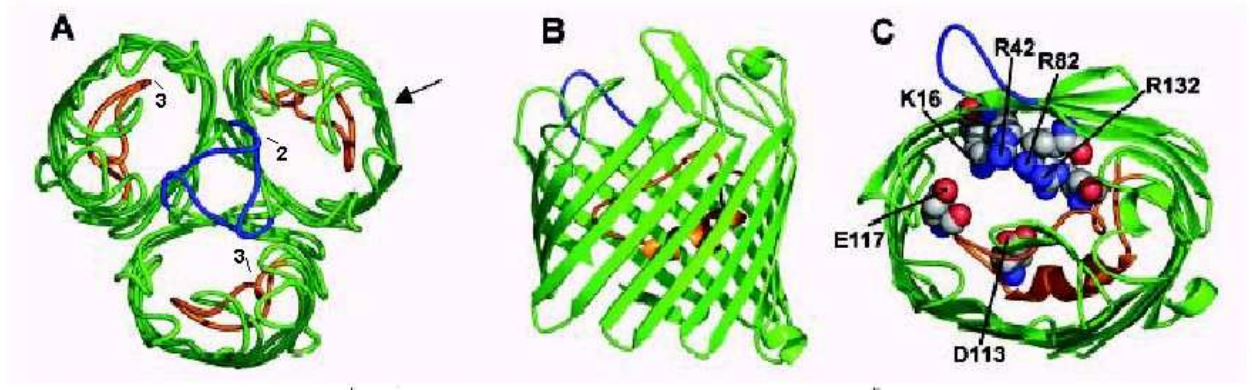
IM dvisluoksnio struktūra yra asimetrinė, turinti fosfolipidų vidiniam sluoksnyje ir LPS išoriniam sluoksnyje (Snyder ir McIntosh, 2000). Difuzija per nespecifinius porinų kanalus ir atrankios pernašos kanalus, nustačius šių baltymų kristalinę struktūrą, dabar išaiškinta molekuliniam lygmenyje. LPS tyrinėjimai ne tik parodo įspūdingą LPS struktūros įvairovę bakterijų viešpatijoje, bet ir leidžia suprasti, kad LPS struktūra gali būti modifikuojama priklausomai nuo terpėje fizikocheminių savybių (Nikaido, 2003).

1.2.1.1. Baltymų kanalai

IM, kaip ir kitos biologinės membranos, iš esmės yra lipidinis dvisluoksnis. Tai lemia IM lipidinės dalies silpną pralaidumą hidrofilinėms medžiagoms ir taip apsunkina ląstelių sąveiką su inkubacijos terpe. Todėl IM turi hidrofilinius kanalus formuojančius baltymus, kurie leidžia maisto medžiagoms patekti į ląstelę ir padeda pašalinti medžiagų apykaitos produktus. Pirmieji tokius silpnai atrankius kanalus formuojantys baltymai – porinai – buvo atrasti 1976 metais. Žodžiu „porinas“ buvo pasiūlyta pavadinti baltymų, formuojančių neatrankius difuzinius kanalus, klasę. Kaip ir galima tikėtis, porinai buvo rasti visose ištirtose gramneigiamosiose bakterijose ir netgi grupėje gramteigiamųjų bakterijų, kurios turi lipidais turtingą ląstelės sienelę (Nikaido, 2003).

Klasikiniais poriniais vadinami trys *E. coli* gaminami porinai: OmpF, OmpC ir PhoE. Jie rodo bendrą pirmenybę medžiagų krūviui ir dydžiui. OmpF ir OmpC teikia pirmenybę katijonams, o PhoE- anijonams. Porinų kanalai paprastai yra gana siauri. Pagrindinio *E. coli* porino skerspjūvio siauriausia vieta, kartais vadinama plyšiu (kilpele), yra tik 11Å. PhoE ir OmpF leidžia prasiskverbti šiek tiek didesnėms molekulėms negu OmpC. Cukrų difuzijos tyrimai leido nustatyti, kad OmpF porino kanalo skersmuo yra apie 12Å (Nikaido, 2003).

Tik nedaugelis porinų formuoja kristalus, ir nėra lengva nustatyti jų tretinę struktūrą. Žinoma, kad porinų monomerai kerta lipidų dvisluoksnį kaip β-statinė, sudaryta iš 16 β-juostų. OmpF porine transmembraninių fragmentų ilgis yra nuo 7 iki 16 aminorūgščių liekanų. Ryšys tarp monomerų stabilizuojamas dėka hidrofobinės ir polinės sąveikos.

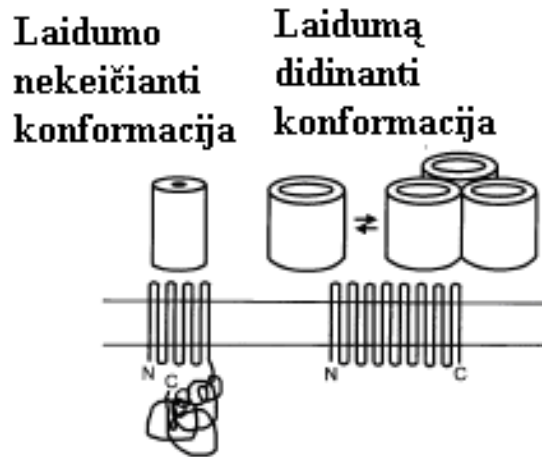


1.4 pav. *E. coli* OmpF porino struktūra.

- A- vaizdas statmenas membranos plokštumai;
 B- vaizdas kryptimi, kuri paveiksle A pažymėta rodykle;
 C- vaizdas iš viršaus, žiūrint per vieną iš trimerų.

Kilpa 2 (1.4A pav.) vaidina svarbų vaidmenį monomerų sąveikoje su kaimyniniais subvienetais. Kilpa 3 siaurina kanalą. Plyšelis (1.4C pav.) sudarytas iš kilpos 3 Glu117 ir Asp113 taip pat 4 bazinių liekanų Lys16, Arg42, Arg82 ir Arg132, esančių priešingose grandinės pusėse (Nikaido, 2003).

Pseudomonas aeruginosa ląstelės pasižymi ypač dideliu atsparumu daugeliui antibiotikų, nes jų IM pralaidumas hidrofilinėms medžiagoms yra 2 laipsniais žemesnis negu *E. coli*. Pagrindinis *P. aeruginosa* porinas OprF įgalina tik labai lėtą smulkių molekulių difuziją pro IM, nors ir jo išskyrimo riba yra net didesnė negu *E. coli* OmpF. *E. coli* porinas OmpA taip pat leidžia tik labai lėtą mažų hidrofilinių medžiagų molekulių prasiskverbimą į ląstelę. Įrodyta, kad OmpA ir OmpF turi 2 konformacijas: viena (apie 98%) neformuojanti kanalo, o kita (apie 2%) formuojanti didelį kanalą. Panašus pasiskirstymas yra ir OprF populiacijoje (1.5 pav.). Galima didžiųjų (pagrindinių) porinų konformacijų netektis, kuri didina atsparumą hidrofiliniams antibiotikams, tokiems kaip β -laktamas.



1.5 pav. OmpA ir OmpF konformacijos

Manoma, kad vartojant antibiotikus vyksta mutantų, gaminančių pakeistus porinus, atranka (Nikaido, 2001). Tačiau porinų netektis sukuria kliūtis organizmams mutantams, kadangi maisto medžiagos (ypač esant mažoms koncentracijoms) taip pat daug lėčiau patenka į ląsteles.

1.2.1.2. Lipopolisacharido barjeras

Nors per porinų kanalus kartais gali praeiti palyginti didelės molekulinės masės ilgi ir lankstūs tirpiniai, molekulių lipofiliškumas žymiai sulėtina jų difuziją per porinus (Nikaido, 2003). Didelio lipofiliškumo vaistai sunkiai skverbiasi per porinų kanalus, kurie savo viduje turi tvarkingą vandens molekulių grandinėle. Taigi pagrindinis tokių junginių įėjimo kelias yra per IM lipidų dvisluoksnį. Patekimas šiuo keliu įvertintas naudojant labai lipofiliškus junginius – steroidus. Nedidelį elektrinį krūvį turintys steroidai prasiskverbia per laukinio tipo *E.coli* ląstelių IM dvisluoksnį greičiau negu nedidelis lipofilinis kefalosporinas cefalothinas prasiskverbia per poriną OmpF. Taigi, labai lipofiliški junginiai gali praeiti pro IM dvisluoksnį pastebimu greičiu, nors šis greitis ir yra bent 2 eilėmis žemesnis negu jų prasiskverbimo greitis per ląstelės PM (Nikaido, 2001). Tiriant bakterijų jautrumą lipofilinius vaistais, nėra lengva įvertinti IM dvisluoksnio pralaidumo vaidmenį. Tokie vaistai yra ir geras siurblių, išstumiančių iš ląstelių lipofilines medžiagas, substratas. Dėl šios priežasties daugelio vaistų difuzija per IM dvisluoksnį dažnai yra gana lėta (Nikaido, 2001).

LPS yra pagrindinis lipidus gramneigiamųjų bakterijų ląstelių paviršiuje. LPS sluoksnis veikia kaip pralaidumo barjeras, darantis išorinę membraną nepralaidžia

hidrofobiniams antibiotikams, detergentams, daugeliui baltymų (Snyder ir McIntosh, 2000). LPS pagrindą sudaro cukrų liekanos. Šis junginys molekulėje taip pat gali turėti iki septynių riebalų rūgščių ir ilgą polisacharido grandinę (Snyder ir McIntosh, 2000).

Taigi daugumos organinių junginių patekimas į gramneigiamąsias bakterijas yra gana lėtas, ypač vaistų, kurių molekulės paprastai būna žymiai didesnės negu tipiškos maisto medžiagų molekulės. Gramneigiamosios bakterijos yra mažiau jautrios vaistams, nes jų paviršius mažiau pralaidus specifiniams antibiotikams negu gramteigiamųjų bakterijų. LPS yra pagrindinis pralaidumą hidrofobinėms molekulėms mažinantis faktorius. Tai paaiškina nepaprastai lėtą lipofilinių medžiagų patekimą į ląstelę (Snyder ir McIntosh, 2000).

Tarp *P. aeruginosa*, *P. putida*, *E. coli*, *S. enterica* ir kelių kitų gramneigiamųjų bakterijų rūšių IM dvisluoksniu pralaidumo skirtumai yra nedideli. LPS mutantų, tokių kaip *lpxA*, IM dvisluoksnis įgalina žymiai greitesnį lipofilinių vaistų patekimą į ląstelę, bet jautrumas hidrofiliniams vaistams nepakinta (Nikaido, 2001). Laukinio tipo ląstelių jautrumas vaistams gali būti padidintas polikatijoniniais junginiais, pvz., polimiksino B nanapeptidui. Tokie junginiai sąveikauja su LPS, pažeidžia išorinio IM sluoksnio struktūrą ir padaro ląsteles ypač jautrias lipofilinėms medžiagoms, tokioms kaip rifampinas, fusidinė rūgštis, novobiocinas, klindamycinas, eritromicinas ir nalidikso rūgštis. Vienok polikatijonai nepadidina jautrumo tokiems junginiams, kaip ciprofloksacinas, ampicilinas ar tetraciklinas ir kitiems, kurie prasiskverbimui per IM naudoja porinų kelią (Nikaido, 2001).

Kai kurių gramneigiamųjų bakterijų rūšių IM dvisluoksnis gali būti neįprastai pralaidus. *N. gonorrhoeae* ir *H. influenzae* paprastai yra labiau nei kitos gramneigiamosios bakterijos jautrios tokioms medžiagoms kaip eritromicinas, nalidikso rūgštis (Nikaido, 2001).

1.3. Lipofilinių jonų sąveika su bakterijų membranomis

Lipofiliniai jonai – tai klasė įkrautų molekulių, tirpių tiek hidrofiliuose, tiek hidrofobiniuose tirpikliuose. Biologinės membranos yra laidžios šiems jonams dėl jų gebėjimo susirišti su lipidiniais dvisluoksniais bei translokuotis per juos. Šie junginiai dažnai naudojami kaip membranos įtampos ($\Delta\psi$), t.y. transmembraninio elektrinių potencialų skirtumo, indikatoriai mikroorganizmų ląstelėse, eukariotinių ląstelių organelėse ir membraninėse pūslelėse.

Lipofilinis katijonas TPP^+ yra plačiai naudojamas kaip membranos įtampos ($\Delta\psi$) indikatorius biologinėse mikrosistemose, turinčiose neigiamai įkrautą vidų, pavyzdžiui, mitochondrijose ir bakterijose. Veikiant elektrinių potencialų skirtumui, TPP^+ pasiskirsto

abipus šiems jonams laidžios ląstelės PM. Energizuotos mitochondrijos kaupia lipofilinius katijonus, o submitochondrinės pūslelės kaupia lipofilinius anijonus. Taigi mitochondrijos ir bakterijos generuoja viduje neigiamą membranos įtampą, o submitochondrinės ir bakterinės pūslelės – teigiamą. Lipofiliniai anijonai, tokie kaip PCB^- ir tetrafenilboratas (TPB^-), naudojami bakterinių ir mitochondriinių membraninių pūslelių, turinčių atvirkščią poliaringumą, $\Delta\psi$ nustatymui.

Tačiau lipofilinių jonų panaudojimo galimybės neapsiriboja tik biologinių objektų $\Delta\psi$ matavimais. Matuojant lipofilinių jonų PCB^- , sugertų mikroorganizmų ląstelėmis, kiekį, galima greitai kiekybiškai nustatyti ląstelių biomasę, gyvų ir negyvų ląstelių skaičių tiriamajame mėginyje, ląstelių jautrumą įvairiems biocidiniams agentams, pvz.: antibiotikams, bakteriofagams. Tokie tikslūs ir greitai nustatymo metodai labai reikalingi eksperimentinėje mikrobiologijoje ir biotechnologijoje, tačiau norint juos sėkmingai taikyti, būtina išsiaiškinti mikroorganizmų ląstelių barjerines savybes veikiančius faktorius.

Lipofiliniai anijonai su membranomis sąveikauja kitaip, nei struktūriškai panašūs katijonai. Net tiriant artimus struktūrinius analogus, kaip TPP^+ ir TPB^- , lengva pastebėti, kad membranos anijonų suriša keliomis eilėmis daugiau, o prasiskverbimo pro dvisluoksnius greitis yra keliomis eilėmis didesnis nei katijonų. Teigiamų ir neigiamų lipofilinių jonų adsorbcijos skirtumai sėkmingai aiškinami lipidų dvisluoksniu dipolinėmis savybėmis (Daugelavičius et al., 1997).

1.4. Membranas turinčių virusų patekimo į ląstelę būdai

1.4.1. Gyvūnų virusų patekimas į ląstelę

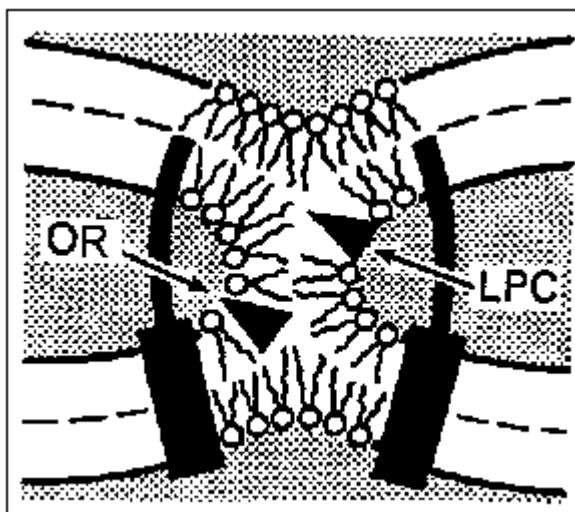
Membranas turinčių virusų genomai į ląstelę gali patekti keliais būdais: 1) viruso apvalkalui susiliejam su ląstelių PM ir tokiu būdu genomui tiesiogiai prasiskverbiant per PM; 2) endocitozės būdu.

Membranų susiliejimas būdingas visems apvalkalėlių turintiems virusams. Tai sudėtingas procesas, susidedantis iš kelių stadijų (Burger, 1995):

- 1) specifinių membranos sričių atpažinimo,
- 2) suliejimo baltymų aktyvacijos,
- 3) fuzijos porų susidarymo (ši stadija dar vadinama, nuo lipidų priklausančia),
- 4) fuzijos porų išsiplėtimo.

Viruso ir ląstelės membranų susilieėjimas gali vykti dvejopai. Viruso apvaskalėlis gali tiesiogiai susilieti su ląstelės PM (*Paramyxo-, retro- ir herpes* virusų atveju). Toks procesas nepriklauso nuo pH. Kitu atveju viruso virionas iš pradžių patenka į ląstelę endocitozės būdu, sulieėjimo baltymai aktyvuojasi endosomose veikiant rūgštiniam pH, ir tik tada viruso apvaskalėlis susilieja su endosomų membrana (pvz. *Alpha-, rhapdo-, Orthomyxo-, Togaviridae* atveju). (White et al., 1983)

Membranų sulieėjimo procesas geriausiai ištirtas endocitozės atveju. Šį procesą reguliuoja viduląstelinis Ca^{2+} , ATP, fermentai fosfatazės ir GTP. Endocitozė indukuojama padidėjus viduląstelinei kalcio koncentracijai, tačiau tiesiogiai kalcio jonai membranų sulieėjime nedalyvauja. ATP yra svarbus sekrecinių granulių judėjimui prie ląstelės PM (Burger, 1995).



1.6 pav. Lipidų persitvarkymas susiliejančiose membranose (Chernomordik et al., 1997).

OR – oleino rūgštis, LPC – lizofosfatidilcholinai.

Viruso ir ląstelės membranų susilieėjimas prasideda, kai membranų išoriniai monosluoksniai suartėja ir suformuoja kontaktinį dvisluoksnį (1.6 pav.). Ši membranų sąveikos stadija dar kartais vadinama monosluoksne fuzija arba pusiau fuzija. Šį procesą gali įtakoti membranos lipidų sudėtis, kuri nulemia membranos polinkį lankstyti skirtingomis kryptimis (Chernomordik et al., 1997). Pvz., invertuoto kūgio formos lizofosfatidilcholinai (LPC) inhibuoja, o kūgio formos oleino rūgštis (OR) skatina fuziją (1.6 pav). Sekančiame etape tarp sąveikaujančių membranų susiformuoja hidrofilinės poros. Fuzijos porų diametras tik 1 – 3 nm, ir tik kelios lipidų molekulės dalyvauja šiame procese. Poroms plečiantis

sąveikaujantys monosluoksniai susispaudžia, o tolimesni – išsiplečia. Susiliejiimo pabaigoje susidaro kritinio diametro poros, kurios vėliau išplinta visame kontaktuojančiame dvisluoksnyje (Burger, 1995; Chernomordik et al., 1997).

Kitas būdas, kuriuo virusas gali patekti į ląstelę yra endocitozė. Endocitozė yra tipinis daugelio gyvūnų virusų infekcijos procesas. Ilgą laiką buvo manoma, kad ji gali vykti tik eukariotų ląstelėse. Tačiau prokariotuose taip pat vyksta procesas panašus į endocitozė – tai $\phi 6$ grupės bakteriofagų kapsidės patekimas į citozolį (Poranen et al., 1999).

Yra žinomi penki endocitozės tipai (Riezman et al., 1997):

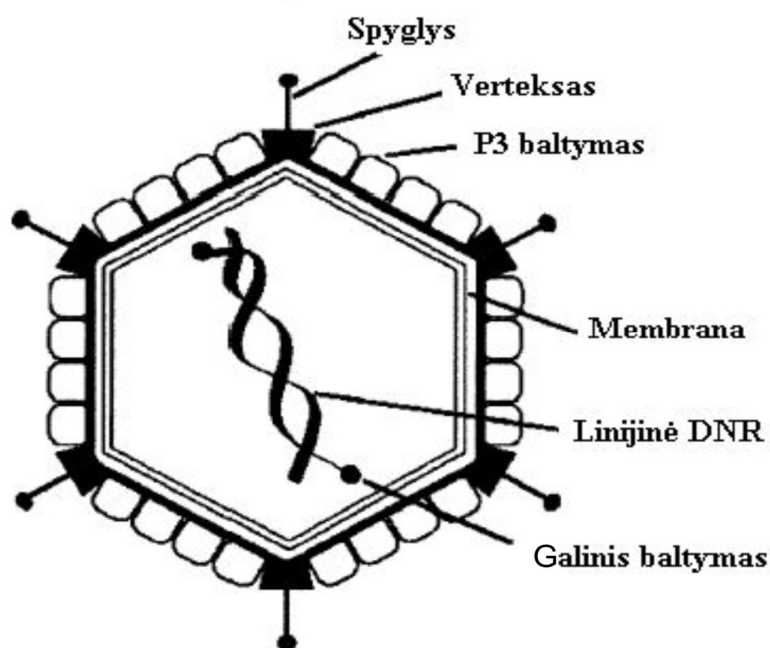
1. nuo klatrino priklausoma endocitozė;
2. nuo kaveolino priklausoma endocitozė;
3. nuo klatrino ir kaveolino priklausoma endocitozė;
4. makropinocitozė;
5. fagocitozė.

Geriausiai ištirta yra gyvūnų virusų endocitozė, kurios metu susidaro klatrinu dengtos pūslelės ir endosomos (Marsh ir Helenius, 1989). Nėra iki galo tiksliai žinoma, kaip virusas iš šių pūslelių “pabėga”. Pagal žemo pH modelį ląstelių rūgštinis pH keičia į membraną įsiterpiančio baltymo konformaciją, ko pasekoje susiformuoja pora ir virusinė dalelė translokuojama per pūslelės membraną į ląstelės citozolį (Carasco, 1994; Marsh ir Helenius, 1989). Pagal protonovaros jėgos modelį, virusams prasiskverbti per ląstelės membraną vien rūgštinės terpės nepakanka. Carrasco (1994, 1995) padarė prielaidą, kad viruso patekimui į citozolį reikalinga protonovaros jėga. Manoma, kad viruso baltymai, įsiterpę į membraną, panaudoja protonų (arba kitų jonų) judėjimo į citozolį energiją genomo translokacijai ta pačia kryptimi (Carasco, 1994).

1.4.2 Membraną turinčio bakteriofago PRD1 patekimas į ląstelę

Daugiasluoksnis prokariotinių ląstelių apvalkalėlis yra barjeras makromolekulėms ir didelėms dalelėms, tokioms kaip virusų kapsidės. Todėl daugumos bakterijas infekuojančių virusų kapsidės niekuomet nepatenka į ląstelę, jos lieka ląstelės išorėje. Genomas iš kapsidės į ląstelę pernešamas per vieną iš specializuotų ikosaedro (kapsidės) kampų. Apvalkalėlį turintys virusai į ląstelę patenka suliedami savo membraną su viena iš ląstelės membranų.

Bakteriofagas PRD1 (1.7 pav.) priklauso palyginus neseniai atrastai lipidų turinčiai bakteriofagų grupei. Šiai grupei priklausantys virusai skiriasi savo morfologija, nukleorūgšties tipu, lipidų išsidėstymu virione bei ląstelėmis – šeimininkėmis.



1.7 pav. Bakteriofago PRD1 struktūra. (Bamford JKH et al., 2002)

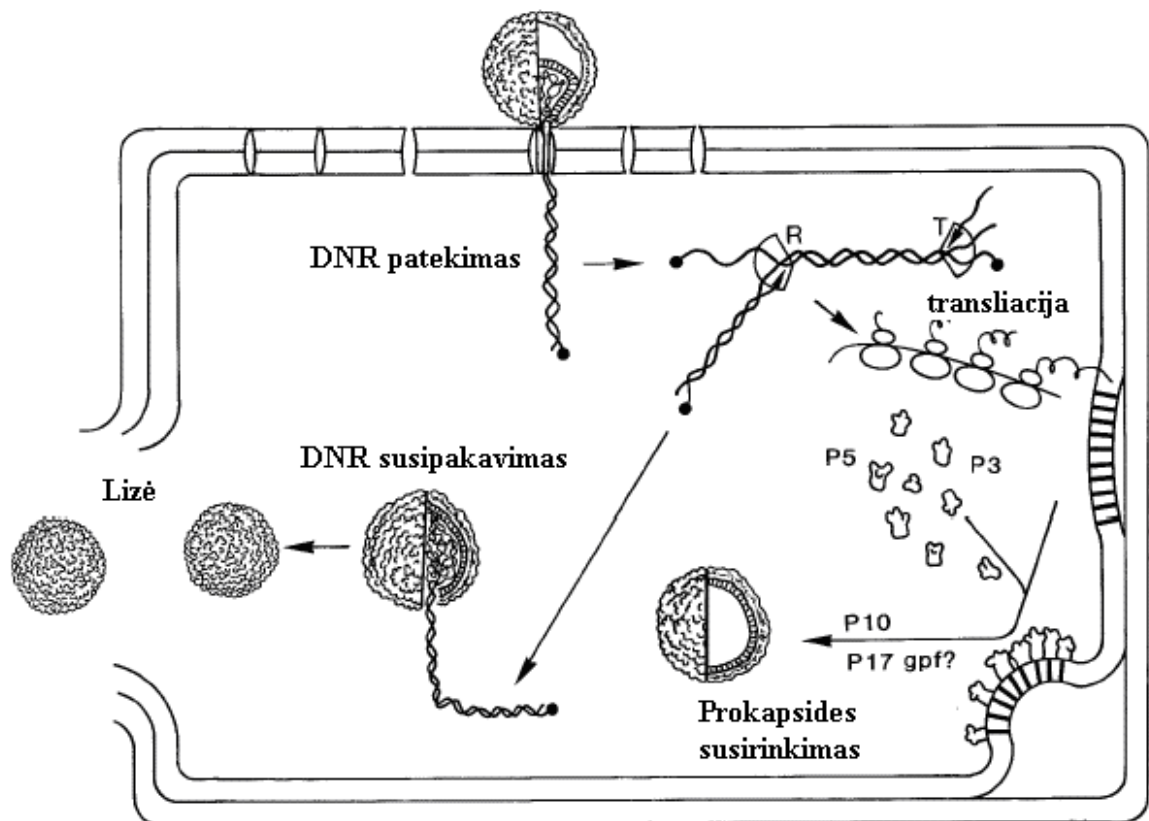
Fagas PRD1 priklauso *Tectiviridae* šeimai (Bamford JKH et al., 2002). Šios šeimos atstovai infekuoja gramteigiamąsias (AP50, Bam35) ir gramneigiamąsias (fagai PRD1, PR3, PR4, PR5, PR772, L17) bakterijas (Rydman, 2001).

Fagas PRD1 infekuoja *E. coli*, *S. enterica* sv. Typhimurium ir *P. aeruginosa* kamienų ląsteles, turinčias konjugacines IncP tipo plazmides (Žiedaitė et al., 2005). Šių plazmidžių koduojamos funkcijos yra būtinos fago patekimui į ląstelę. Bakteriofago receptorius yra pilio galiukas, o fago DNR patekimo į ląstelę mechanizme aktyviai dalyvauja lipidinis sluoksnis.

PRD1 virionas yra 65 nm skersmens, 66 MDa masės, kurios 14% sudaro DNR, 13% lipidai ir 73% baltymai. Infekcijos metu sintetunami virš trisdešimties rūšių baltymai, iš kurių 25 vėliau inkorporuojami į virioną. Fago apvaskalą sudaro du baltymai: didysis – P3 ir mažasis – P5. Abu šie baltymai virione sudaro trimerines struktūras. Baltyminis apvaskalas gaubia fago membraną, kurią sudaro 40% baltymų ir 60% lipidų. Membranoje yra apie dvidešimt baltymų, kurie išsidėstę išorėje arba integruoti į membraną. Svarbiausias su membrana asocijuotas baltymas yra P11, išsidėstęs jos periferijoje, reikalingas fago infektyvumui. Jis formuoja baltyminį tinklą tarp kapsidės ir membranos. Kitas svarbus baltymas P18 dalyvauja membranos transformacijos procese.

Bakteriofago PRD1 genomą sudaro dvigrandė linijinė 14925 bp ilgio DNR molekulė, abu molekūlės galai turi identišką invertuotą terminalinę 110 bp seką. Prie abiejų DNR 5' galų kovalentiškai prijungtas baltymas P8 (Tuma et al., 1996).

Bakteriofagas PRD1 efektyviai išnaudoja baltymų sintezę. PRD1 vystymosi ciklas (1.8 pav.) prasideda bakteriofago prisitvirtinimu ant ląstelės – šeimininkės. Po adsorbcijos fago DNR patenka į ląstelę, o tuščia kapsidė su susitraukusia membrana lieka išorėje. Po to prasideda baltymų sintezė ir DNR replikacija (Grahn et al., 2002). Šio fago DNR patekimas į ląstelę susijęs su viriono membrana, kuri, infekuojant ląstelę, ištįsta ir formuoja membraninę išaugą, atsiveriančią viename ikosaedro kampe. Subliūkstant membraninei pūslei viriono viduje, fago DNR patenka į ląstelės citozolį. Infekcinis ciklas trunka apie valandą.




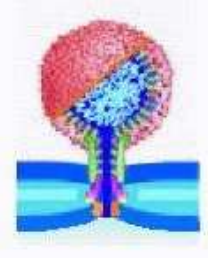
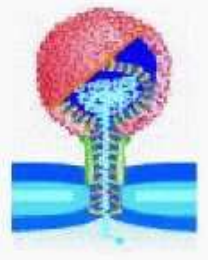


1.8 pav. PRD1 vystymosi ciklas. (Tuma et al., 1996)

Deja, kol kas nepavyko tiesiogiai įrodyti, kad viriono viduje esanti fago membrana susilieja su bakterijų PM. Registruodami fago sukeltą TPP⁺ ir K⁺ srovę bei tirdami membranose aktyvių antibiotikų poveikį membranai ir kalio jonų gradientui pabandėme iširti, kaip keičiasi *Salmonella enterica* ląstelių plazminės ir išorinės membranos

laidumai, šias ląsteles infekuojant bakteriofagu PRD1. Šio darbo tikslas buvo nustatyti infekcijos terpės fizikocheminių savybių įtaką bakteriofago PRD1 sąveikai su *Salmonella enterica* ląstelių apvalkalėliu. Tuo būdu tikėjomės geriau pažinti ląstelės ir fago membranų sąveiką bei ją įtakančius veiksnius.

1.4.3 DNR patekimas į ląstelę šeimininkę

<p>1. Bakteriofagas atpažįsta receptorių ir negrįžtamai susijungia su ląstelės IM.</p>	
<p>2. Virusas prasiskverbia pro ląstelės IM.</p>	
<p>3. Suskaldomas peptidoglikano sluoksnis.</p>	
<p>4. Viruso membrana susilieja su infekuojamos ląstelės PM.</p>	
<p>5. Viruso DNR išvirkščiama į ląstelę.</p>	

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos, biologiniai objektai ir prietaisai

2.1.1. Reagentai, mikroorganizmai ir aparatūra

Agaras Bacto	– Ferak
Arsentas	– Sigma
CaCl ₂ · 2H ₂ O	– Roth
EDTA	– Serva
EGTA	–Roth
Gliukozė	– Roth
Gramicidinas D (GD)	– Sigma
HCl	– Roth
Kanamicinas	– Roth
KCl	– Roth
MgCl ₂ · 6H ₂ O	– Roth
Mielių ekstraktas	– Oxoid
Mitybinis agaras	– Vladivostok
NaCl	– Roth
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	– Lachema
NaOH	– Reachim
PCB ⁻	– susintetintas dr. A. Beganskienės, VU Chemijos fakultete
Polietilenglikolis	– Roth
Polimiksinas B (PMB)	– Sigma
Sacharozė	– Roth
TPP ⁺	– Chemopol
Triptonas Bacto	– Oxoid
Tris	– Flukta

Salmonella enterica serovarieteto Typhimurium DS88 kamieno ląstelės [Δ H2 HI-I::Tn10(Tc^s)(pLM2) bei bakteriofagas PRD1 gauti iš prof. D. Bamfordo, Helsinkio universitetas, Suomija.

Darbe naudoti:

TPP⁺ selektyvūs elektrodai pagaminti VU GMF Biochemijos ir biofizikos katedros Membranų biochemijos laboratorijoje;

K⁺ selektyvūs elektrodai (Orion Research, Inc.; model 93-19).

Centrifugos Beckman J2-21 ir Eppendroff Centrifuge 5804 R.

Ultracentrifuga Sanyo MSE MS 60.

Daugiafunkcinis prietaisas Modulus (naudotas optinio tankio matavimams).

2.1.2. Mitybinės terpės, tirpalai ir jų paruošimas

LB modifikuota terpė: 10 g triptono; 5 g mielių ekstrakto; 5 g NaCl; distiliuoto vandens iki 1000 ml, pH 7,0.

Kieta agarizuota terpė: 1 l LB modifikuotos + 18 g agaro.

Pusiau skysta agarizuota terpė: 1 l LB modifikuotos + 7 g agaro.

Visos terpės autoklavuojamos 30 min. 1 atm. slėgyje.

Tirpalai:

100 mM EDTA, pH 8,0;

150 mM KCl tirpalas;

10%, 15% ir 20% sacharozė;

20% gliukozė;

50 mM NaP, pH 7,0;

20 mM Tris-HCl, pH 7,4;

50 mM Tris-HCl, pH 7,0;

50 mM Tris-HCl, pH 8,0;

Antibiotikai:

Gramicidino D 5 mg/ml tirpalas;

Kanamicino 70 mg/ml tirpalas;

Polimiksino B 25 mg/ml tirpalas;

2.2. Metodai

2.2.1. Ląstelių auginimas

Į sterilią kolbutę su 25 ml LB terpės mikrobiologine kilpele įnešama viena bakterijų kolonija iš muziejinės kultūros. *Salmonella enterica* ląstelės auginamos purtyklėje, +37 °C temperatūroje per naktį. Taip išauginta naktinė kultūra skiedžiama šviežia LB terpe iki optinio tankio 0.1 (540 nm bangoje) ir auginama toliau purtant, kol ląstelių suspensijos optinis tankis pasiekia 1. Žinoma, kad optinis tankis 1 esant 540 nm bangai atitinka 3×10^9 *S. enterica* ląstelių/ml [Ziedaite et al., 2005].

2.2.2. Ląstelių paruošimas potenciometriniais matavimams

Ruošiant ląsteles TPP⁺ matavimams, jos auginamos taip pat kaip aprašyta 2.2.1. skyrelyje, nusodinamos centrifuguojant 15 minučių +4°C temperatūroje 5000 aps./min greičiu (centrifuga Beckman, rotorius JA-14) ir resuspenduojamos mažame 50 mM Tris-HCl (pH 7) buferio tūryje, kad gautos ląstelių suspensijos tūris būtų bent 200 kartų mažesnis negu buvo auginimo metu. Bandyto metu tiršta ląstelių suspensija laikoma vandens-ledo mišinyje.

K⁺ matavimams ląstelės buvo ruošiamos analogiškai kaip ir TPP⁺ matavimams, bet resuspenduojamos mažame 100 mM Tris-HCl (pH 7) buferio tūryje.

Ląstelių suspendavimui naudoto buferio koncentracija ir pH buvo parinkta taip, kad potenciometrinių matavimų metu būtų stebimas geriausias PRD1 indukuotas TPP⁺ jonų sugėrimas bei ryškiausias K⁺ jonų išmetimas.

2.2.3. Ląstelių dorojimas EDTA ir EGTA

Ruošiant EDTA arba EGTA dorotas ląsteles TPP⁺ matavimams, jos auginamos taip pat kaip aprašyta 2.2.1. skyrelyje, nusodinamos centrifuguojant 15 minučių +4°C temperatūroje 5000 aps./min greičiu (centrifuga Beckman, rotorius JA-14) ir resuspenduojamos 10 kartų mažesniame, nei buvo auginama, tūryje 50 mM Tris-HCl, pH 8. Pridedama EDTA arba EGTA iki 1 mM koncentracijos ir inkubuojama 10 min. +37°C temperatūroje aeruojant. Tada ląstelės nusodinamos centrifuguojant 15 minučių +4°C

temperatūroje 5000 aps./min greičiu (centrifuga Beckman, rotorius JA-14) ir resuspenduojamos 200 kartų mažesniame 50 mM Tris-HCl pH 8 buferio tūryje, negu buvo auginta ląstelių. Bandymo metu tiršta ląstelių suspensija laikoma vandens-ledo mišinyje.

2.2.4. Bakteriofago titro nustatymas

Titro nustatymui 3 ml išlydytos pusiau skystos agarizuotos terpės sumaišoma su 0.1 ml išaugintos bakterijų kultūros ir 0.1 ml 10^{-9} - 10^{-11} kartų praskiestos fagų suspensijos. Mišinys išpilamas į Petri lėkštelę su kieta agarizuota terpe. Lėkštelės inkubuojamos $+37^{\circ}\text{C}$ temperatūroje per naktį. Pagal susidariusių negatyvių kolonijų skaičių apskaičiuojamas fago titras.

2.2.5. Bakteriofago gryninimas

Bakteriofagas nutitruojamas kaip aprašyta 2.2.3. skyrelyje. Atrenkamos lėkštelės, kuriose negatyvios kolonijos užima maždaug pusę lėkštelės ploto (400-500 negatyvių kolonijų lėkštelėje). Į sterilią kolbą nuo atrinktų lėkštelių nugramdomas viršutinis minkšto agaro sluoksnis ir užpilamas LB terpe (3ml vienai lėkštelei). Inkubuojama 3 val. $+37^{\circ}\text{C}$ temperatūroje aeruojant. Agaro liekanos ir ląstelių nuolaužos nusodinamos centrifuguojant 15 minučių $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 10000 aps./min greičiu (Eppendorf Centrifuge 5804 R, rotorius F34-6-38). Tokiu būdu gaunama išeiginė bakteriofago suspensija, naudojama tolimesniam fago dauginimui.

Auginama ląstelių kultūra nuo pradinio optinio tankio 0.1 iki 0.7 (540 nm bangoje) ir infekuojama bakteriofagu PRD1, kad infekcijos daugybiškumas (MOI) būtų 15. Ląstelėms lizavus, t.y. terpei nuskaidrėjus (po 4 – 5 val.), ląstelių nuolaužos nusodinamos centrifuguojant 20 minučių $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 8000 aps./min greičiu (centrifuga Beckman, rotorius JA-14). Į supernatantą maišant ant magnetinės maišyklės dedama polietilenglikolio (PEG) iki 10% koncentracijos (tūris/svoris) bei NaCl iki 0.5 M koncentracijos ir inkubuojama 1 val. $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Suspensija centrifuguojama 1 val. $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 10000 aps./min greičiu (centrifuga Beckman, rotorius JA-14). Nuosėdos resuspenduojamos iš anksto atšaldytame 100 kartų mažesniame 50 mM Tris-HCl (pH 7) buferio tūryje, negu buvo auginta ląstelių. Resuspenduotos nuosėdos paliekamos per naktį vandens-ledo vonioje.

Pagaminami 10%– 15% – 20 % sacharozės gradientai, kurie paliekami per naktį +4°C temperatūroje. Resuspenduotų nuosėdų suspensija atsargiai užpilama ant sacharozės gradientų ir centrifuguojama 1 val. +15 °C temperatūroje 24000 aps./min greičiu (centrifuga Sanyo MSE MS 60, rotorius TST 28.38). Nucentrifugavus išryškėja šviesą barstanti juosta, esanti tarp 15% ir 20% sacharozės sluoksnių. Juosta išsiurbiama ir toliau centrifuguojama 2 val. +4 °C temperatūroje 27000 aps./min greičiu (centrifuga Sanyo MSE MS60, rotorius TST 28.38). Nusėdę bakteriofagai resuspenduojami keliuose mililitruose iš anksto atšaldyto 50 mM Tris-HCl (pH 7) buferio.

Bakteriofago infektyvių dalelių koncentracija nustatoma titruojant (žr. 2.2.3. Bakteriofago titro nustatymas).

2.2.6. Potenciometriniai matavimai

Potenciometriniais matavimams buvo naudojami TPP⁺, K⁺ ir PCB⁻ jonams atrankiai jautrūs membraniniai elektrodai. TPP⁺ ir PCB⁻ elektrodų užpildymui atitinkamai naudoti 0.9 % NaCl tirpalai turintys 1 mM TPP⁺ arba 1 mM PCB⁻ chlorido. Elektrodai prijungiami prie signalo stiprinimo sistemos, pagamintos VU Biochemijos ir biofizikos katedroje, aukšta įėjimo varža pasižymintio operacinio stiprintuvo AD549JH pagrindu. Sustiprintas signalas buvo perduodamas kompiuteriui duomenų perdavimo plokštės DT 302 pagalba. Jonų koncentracijų pokyčiai registruojami prie plokštės prijungto kompiuterio pagalba.

Matavimai atliekami 5 ml arba 30 ml kiuvetėse, į kurias pilama inkubacinė terpė. Kiuvetėse termostato pagalba palaikoma stabili temperatūra. Tyrimas pradedamas, kai termostato termometras 10 min stabiliai rodo temperatūrą, kurioje bus atliekamas bandymas.

Kiekvieno tyrimo pradžioje selektyvūs elektrodai kalibruojami, įnešant tam tikrą TPP⁺ chlorido, PCB⁻ chlorido arba KCl kiekį į matavimo terpę. Nusistovėjus elektrodo parodymams, įnešamas ląstelių priedas iki galutinės koncentracijos 3x10⁹ ląst./ml. Ląstelės sugeria arba išskiria tam tikrą indikatorinių jonų kiekį, ko pasekoje nusistovi naujas jonų koncentracijos terpėje lygis. Tada įdedamas bakteriofagas bei kiti priedai (EDTA, EGTA, CaCl₂, MgCl₂, GD, PMB), ir jų poveikis stebimas pagal TPP⁺ arba K⁺ jonų koncentracijos terpėje padidėjimą arba sumažėjimą.

Indikatorinių jonų kiekį galima apskaičiuoti, remiantis tiesine priklausomybe:

E-f(lg C).

Potencialas E išreiškiamas mV (pagal prietaiso parodymus). Potencialas E išreiškiamas mV (pagal prietaiso parodymus). Žinodami tikslų terpės tūrį matavimo kiuvetėje, iš elektrodo parodymų galime apskaičiuoti sugertą arba išskirtą tiriamų jonų kiekį.

2.2.7. Osmosinio slėgio ir joninės jėgos įtakos bakteriofago PRD1 infektyvumui nustatymas

Tiriant osmosinio slėgio įtaką bakteriofago infektyvumui, registruojant TPP⁺ ir K⁺ jonų koncentracijų pokyčius, į matavimo terpę buvo dedamos skirtingos sacharozės koncentracijos. Joninės jėgos poveikiui nustatyti į inkubacijos terpę buvo dedamos skirtingos NaCl koncentracijos.

2.2.8. Lizės tyrimas

Lizės tyrimui *Salmonella enterica* ląstelės auginamos, kaip aprašyta 2.2.1 skyriuje, iki OD 0,6, infekuojamos bakteriofagu PRD1 (MOI 15) ir 5 min inkubuojamos tokiomis sąlygomis, kaip buvo augintos ląstelės. Infekuotų ląstelių suspensija lygiomis dalimis (po 30 ml) išpilstoma į matavimo kiuvetes. Priklausomai nuo eksperimento tikslo, aeracija nustatoma vienoda arba skirtinga visose matavimo kiuvetėse.

PCB⁻ jonų matavimai buvo atliekami kaip aprašyta 2.2.6 skyriuje. Lygiagrečiai su PCB⁻ matavimais buvo matuojamas ir ląstelių suspensijos optinis tankis.

2.2.9. Duomenų analizė

Šio darbo eksperimentai buvo pakartoti po 3 – 5 kartus. Duomenų apdorojimui naudotos programos:

1. Sigma Plot 2001 7.0 versija;
2. Microsoft Office Excel Professional Edition 2003 versija;
3. Corel Photo – Paint 12.0.0.458 versija.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

IŠVADOS

1. Bakteriofagas PRD1, infekuodamas *Salmonella enterica* ląsteles, didina išorinės membranos laidumą, bet nedepoliarizuoja jų plazminės membranos. 300 OsmM ir didesnis infekavimo terpės osmosinis slėgis bei 22 °C ir žemesnė temperatūra slopina bakteriofago PRD1 poveikį *Salmonella enterica* ląstelių apvalkalėlio laidumui.
2. Skirtingai nuo giminingo bakteriofago Bam35 infekcijos poreikių, divalenčiai katijonai nėra reikalingi fago PRD1 sąveikai su *S. enterica* ląstelių apvalkalėliu pradiniuose infekcijos etapuose. Dvalenčių katijonų kompleksonai net skatina membranas laidinantį fago PRD1 poveikį, o Ca^{2+} ir Mg^{2+} jonai šiek tiek slopina plazminės membranos laidinimą.
3. Arsenatas slopina PRD1 poveikį infekuojamų ląstelių apvalkalėliui. Tai gali būti susiję su šio slopiklo sukeliamu viduląstelinio ATP kiekio sumažėjimu.
4. PRD1 infekcinio ciklo trukmė atvirkščiai proporcinga aeracijos intensyvumui. Arsenatas skatina, o divalenčiai katijonai neturi įtakos ląstelių lizei infekcinio ciklo pabaigoje.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
BIOCHEMIJOS IR BIOFIZIKOS KATEDRA

Ana Juzėnaitė

**INFEKCIJOS TERPĖS FIZIKOCHEMINIŲ SAVYBIŲ ĮTAKOS BAKTERIOFAGO
PRD1 SĄVEIKAI SU *SALMONELLA ENTERICA* LAŠTELIŲ APVALKALĖLIU
TYRIMAI**

Baigiamasis darbas magistro laipsniui įgyti

Darbo vadovas:

Doc. habil. dr. (hp) Rimantas Daugelavičius

Santrauka

Tectiviridae šeimos bakteriofagas PRD1, infekuojantis dauginiu atsparumu antibiotikams pasižyminčias gramneigiamąsias bakterijas, patekimui į ląstelę naudoja viriono viduje esančią membraną. Manoma, kad šio bakterijų viruso membrana patekimo metu suliejama su infekuojamų ląstelių plazmine membrana. Deja, tiesiogiai įrodyti, kad faginė membrana susilieja su infekuojamų bakterijų plazmine membrana yra sudėtinga. Registruodami fago sukeliamas TPP⁺ ir K⁺ sroves bei tirdami membranose aktyvių antibiotikų poveikį membranose įtampai ir kalio jonų gradientui pabandėme iširti *Salmonella enterica* ląstelių plazminės ir išorinės membranų laidumo pokyčius pradiniam infekcijos etape ir nustatyti infekcijos terpės fizikocheminių savybių įtaką bakteriofago PRD1 sąveikai su *S. enterica* ląstelėmis. Bakteriofagas PRD1, infekuodamas *Salmonella enterica* ląsteles, didina išorinės membranos laidumą, bet nedepoliarizuoja jų plazminės membranos. 300 OsmM ir didesnis infekavimo terpės osmosinis slėgis bei 22 °C ir žemesnė temperatūra slopina bakteriofago PRD1 poveikį *Salmonella enterica* ląstelių apvalkalėlio laidumui. Skirtingai nuo giminingo bakteriofago Bam35 infekcijos poreikių, divalenčiai katijonai nėra reikalingi fago PRD1 sąveikai su *S. enterica* ląstelių apvalkalėliu pradinuose infekcijos etapuose. Dvivalenčių katijonų kompleksai net skatina membranas laidinantį fago PRD1 poveikį, o Ca²⁺ ir Mg²⁺ jonai šiek tiek slopina plazminės membranos laidinimą. Arsenatas slopina PRD1 poveikį infekuojamų ląstelių apvalkalėliui. Tai gali būti susiję su šio slopiklo sukeliama viduląstelinio ATP kiekio sumažėjimu. PRD1 infekcinio ciklo trukmė atvirkščiai proporcinga aeracijos intensyvumui. Arsenatas skatina, o divalenčiai katijonai neturi įtakos ląstelių lizei infekcinio ciklo pabaigoje.

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF NATURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS

Ana Juzėnaitė

**THE INFLUENCE OF PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS OF INFECTION
MEDIUM ON BACTERIOPHAGE PRD1 INTERACTION WITH THE ENVELOPE
OF *SALMONELLA ENTERICA* CELLS**

Master thesis

Research adviser:

Doc. habil. dr. (hp) Rimantas Daugelavičius

Summary

Bacteriophage PRD1 from *Tectiviridae* family uses its internal membrane to enter the host multiple resistant to antibiotics Gram-negative bacteria. Some indirect evidences indicate that during the entry phage membrane fuses with the plasma membrane of bacterial cell. However, it is very complicated to get the direct evidences or indications of the membrane fusion in this system. Monitoring the phage-induced fluxes of TPP⁺ and K⁺ ions and studying the influence of membrane-active antibiotics on membrane voltage and potassium gradient we were investigating PRD1-induced changes in the permeability of the outer and the plasma membranes of *Salmonella enterica* cells and registering the influence of physicochemical parameters of infection medium on the efficiency of phage-cell interaction. We have shown that phage PRD1 increases permeability of the outer membrane but does not depolarize the plasma membrane during the entry. 300 OsmM and higher osmotic pressure in the infection medium and temperature lower than 22 °C blocks the phage induced changes in bacterial envelope. Differently from the relative bacteriophage Bam35, divalent cations are not needed for PRD1 entry. Complexones of divalent cations EDTA and EGTA stimulate, but Ca²⁺ or Mg²⁺ slightly inhibit the plasma membrane-permeabilizing activity of PRD1. Arsenate inhibits PRD1 induced changes of the cell envelope and the reduced intracellular ATP content could be the reason. Bacteriophage-induced lysis of *S. enterica* cells is aeration-dependent and the shortest infection cycle was observed at conditions of intensive aeration. Arsenate stimulated but divalent cations had no effect on the lysis of PRD1 infected cells.

LITERATŪRA

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Publishing, Inc.; 2002.
2. Archibald AR, Glassey K, Green RS, Lang WK. Cell wall and surface properties in *Bacillus subtilis*: Anomalous effect of incubation temperature on the phage-binding properties of bacteria containing varied amounts of teichoic acid. *J Gen Appl Microbiol.* 1989; 135: 667- 673.
3. Bamford JKH, Cockburn JJB, Diprose J, Grimes JM, Sutton G, Stuart DI, Bamford DH. Diffracton quality crystals of PRD1, a 66-MDa dsDNA virus with an internal membrane. *J Struct Biol.* 2002; 103-112.
4. Burger KNJ. Membrane fusion, molecular mechanism of. In *Molecular biology and biotechnology* (Meyers R., editor), 1995; 536-540.
5. Carrasco L. Entry of animal viruses and macromolecules into cells. *FEBS Lett.* 1994; 350: 151-154.
6. Chernomordik LV, Leikina E, Frolov V, Bronk P, Zimmerman J. An early stage of membrane fusion mediated by the low pH conformation of influenza hemagglutinin depends upon membrane lipids. *J Cell Biol.* 1997; 1: 81-93.
7. Daugelavičius R, Bakienė E, Bamford DH. Stages of Polymyxin B Interaction with the *Escherichia coli* Cell Envelope. *Antimicrob Agents Ch.* 2000; 2969-2978.
8. Daugelavičius R, Bakienė E, Beržinskienė J, Bamford DH. Binding of lipophilic anions to microbial cells. *Bioelektrochem Bioenerget.* 1997; 42: 263- 274.
9. Daugelavičius R, Bamford JKH, Bamford DH. Changes in Host Cell Energetics in Response to Bacteriophage PRD1 DNA Entry. *J Bacteriol.* 1997; 5203-5210.
10. Daugelavičius R, Cvirkaitė V, Gaidelytė A, Bakienė E, Gabrėnaitė-Verkhovskaya R, Bamford DH. (2005) Penetration of enveloped double-stranded RNA bacteriophages f13 and f6 into *Pseudomonas syringae* cells. *J Virol.* 2005; 79:5017-26.
11. Daugelavičius R, Gaidelytė A, Cvirkaitė-Krupovič V, Bamford DH. On-line monitoring of changes in host cell physiology during the one-step growth cycle of *Bacillus* phage Bam35. *J Microbiol Meth.* 2007; 69: 174-179.
12. Dijkstra A-J, Keck W. Peptidoglycan as a Barrier to Transvelope Transport. *J Bacteriol.* 1996; 178: 5555-5562.

13. Etienne G, Villeneuve C, Billman-Jacobe H, Astarie-Dequeker C, Dupont MA, Daffe M. The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*. *Mikrobiology*. 2002; 148, 3089-3100.
14. Gaidelytė A, Cvirkaitė-Krupovič V, Daugelavičius R, Bamford JKH, and Bamford DH. The entry mechanism of membrane-containing phage Bam35 infecting *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, in press. 2006; 188, 5925-5934.
15. Gaidelytė A, Jaatinen ST, Daugelavičius R, Bamford JKH, Bamford DH. The Linear Double-Stranded DNA of Phage Bam35 Enters Lysogenic Host Cells, but the Late Phage Functions Are Suppressed. *J Bacteriol*. 2005; 3521-3527.
16. Grahn AM, Daugelavičius R, Bamford DH. Sequential model of phage PRD1 DNA delivery: active involvement of the viral membrane. *Mol Microbiol*. 2002; 46: 1199-1209.
17. Grahn AM, Daugelavičius R, Bamford DH. The Small Viral Membrane- Associated Protein P32 Is Involved in Bacteriophage PRD1 DNA Entry. *J Virol*. 2002; 4866-4872.
18. Harrington CR, Badilly J. Synthesis of peptidoglycan and teichoic acid in *Bacillus subtilis*: role the elektrochemical proton gradient. *J Bacteriol*. 1984; 925-933.
19. Huisken JT, Manole V, Butcher SJ. Tale of two spikes in bacteriophage PRD1. *PNAS*. 2007; 104: 6666-6671.
20. Karhu NJ, Žiedaitė G, Bamford DH, Bamford JKH. Efficient DNA Packaging of Bacteriophage PRD1 Requires the Unique Vertex Protein P6^V. *J Virol*. 2007; 81: 2970-2979.
21. Kivela HM, Daugelavičius R, Hankkio RH, Bamford JK, Bamford, D.H. (2004) Penetration of membrane-containing double-stranded-DNA bacteriophage PM2 into *Pseudoalteromonas* hosts. *J. Bacteriol*. 2004; 186:5342-5354.
22. Krupovič M, Cvirkaite - Krupovič V, Bamford DH. Identification and functional analysis of the Rz/Rz1-like accessory lysis genes in the membrane-containing bacteriophage PRD1. *Mol Microbiol*. 2008; 68(2): 492-503.
23. Lipowsky R. The morphology of lipid membranes. *Curr Opin Struc Biol*. 1995; 5:531-540.
24. Madison M, JM Martinique, J Parker. *Brock Biology of Microorganisms*. 10th ed. Prentice Hall. Upper Saddle River. 2003.
25. Marsh M, Helenius A. Virus entry into animal cells. *Virus Res*. 1989; 36:107-151

26. Martinez JL, Baquero F, Andersson DI. Predicting antibiotic resistance. *Nature Rev Microbiol.* 2007; 5: 958-965.
27. McGraw T, Yang HL, Mindich L. Establishment of a Physical and Genetic Map for Bacteriophage PRD1. *Mol Gen Genet.* 1983; 190: 237-244.
28. Nikaido H. How do exported proteins and antibiotics bypass the periplasm in Gram-negative bacterial cells? *Trends Microbiol.* 2000; 481-483.
29. Nikaido H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol Mol Biol R,* Dec. 2003; 593- 656.
30. Nikaido H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol.* 2001; 12: 215-223.
31. Osborn MJ, Rick PD, Rasmussen NS. Mechanism of Assembly of the Outer Membrane of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem.* 1980; 255: 4246-4251.
32. Poranen MM, Bamford DH. Packaging and replication regulation revealed by chimeric genome segments of double-stranded RNA bacteriophage phi6. *RNA.* 1999; 5: 446-454.
33. Poranen MM, Daugelavičius R, Ojala PM, Hess MW, Bamford DH. A novel virus-host cell membrane interaction. Membrane voltage-dependent endocytic-like entry of bacteriophage straight phi6 nucleocapsid. *J Cell Biol.* 1999; 147: 671-682.
34. Poranen MM, Daugelavičius R. Common principles in viral entry. *Microbiol.* 2002; 56: 521-538.
35. Poranen MM, Ravantti JJ, Grahn AM, Gupta R, Auvinen P, Bamford DH. Global Changes in Cellular Gene Expression during Bacteriophage PRD1 Infection. *J Virol.* 2006; 80: 8081-8088.
36. Rauch C., Farge E. 2000. Endocytosis switch controlled by transmembrane osmotic pressure and phospholipid number asymmetry. *J. Biophys.* 78: 3036-3047.
37. Riezman H, Woodman PG, Van Meer G, Marsh M. Molecular mechanisms of endocytosis. *Cell.* 1997; 91: 731-738
38. Rydman P. Genetic Approach to Bacteriophage PRD1 Entry and Assembly. Helsinki; 2001.
39. Rydman PS, Bamford DH. Identification and Mutational Analysis of Bacteriophage PRD1 Holin Protein P35. . *J Bacteriol.* 2003; 185: 3795-3803.
40. Saren AM, Ravantti JJ, Benson SD, Burnett RM, Paulin L, Bamford DH, Bamford JKH. A Snapshot of Viral Evolution from Genome Analysis of the *Tectiviridae* Family. *J Mol Biol.* 2005; 350: 427-440.

41. Snyder S, McIntosh T-J. The lipopolisacharide barrier: Correlation of Antibiotic Susceptibility with Antibiotic Permeability and Fluorescent Probe Binding Kinetics. *Biochemistry-US*. 2000; 39: 11777-11787.
42. Sonnenfeld EM, Beveridge TJ, Koch AL, Doyle RJ. Asymetric distribution of charge on the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol Sept*. 1985; 1167-1171.
43. Tuma R, Bamford JHK, Bamford DH, Russell MP, Thomas GJ. Structure, Interactions and Dynamics of PRD1 Virus I. Coupling of Subunit Folding and Capsid Assembly. *J Mol Biol*. 1996; 87-101.
44. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Rev*. 1992; 395-411.
45. White JM, Kielian M, Helenius A. Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. *Quart Rev Bioph*. 1983; 16: 151-195.
46. Žiedaitė G, Daugelavičius R, Bamford JKH, Bamford DH. The Holin Protein of Bacteriophage PRD1 Forms a Pore for Small-Molecule and Endolysin Translocation. *J Bacteriol*. 2005; 187: 5397-5405.

Pagalbinė literatūra:

Biochemijos terminų aiškinamasis žodynas [internetinė svetainė], VDU, VU, KMU Lietuvos Biochemikų draugija [2006 05 15 cituota]. Adresas:

<http://www.bchi.lt/LBD/a-pap.htm>