

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Molekulinės biologijos studijų programos magistrantė

Benita STOČKŪNAITĖ

Magistrinis darbas

**Klebicinų receptorių ir translokatorių identifikavimas transpozonų  
mutagenezės būdu**

Darbo vadovė:

Dr. Aušra Ražanskienė

Vilnius, 2020

**Klebicinų receptorių ir translokatorių identifikavimas transpozonų  
mutagenezės būdu**

Darbas atliktas UAB Nomads

Benita Stočkūnaitė

parašas

Darbo vadovė:

Leisti / neleisti gintis:

Dr. Aušra Ražanskienė

parašas

## TURINYS

Santrumpos .....	5
ĮVADAS .....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	8
1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> patogeniškumas .....	8
1.2 <i>Klebsiella</i> filogenetinės grupės .....	10
1.3 Bakteriocinai .....	11
1.3.1 Kolicinai .....	14
1.3.2 Klebicinai .....	16
1.4 Baltymų raiškos sistemos augaluose .....	20
1.4.1 Binariniai vektoriai .....	21
1.4.2 Laikinoji ir pastovioji raiškos sistemos .....	21
1.5 Baltymų gryninimas .....	22
1.5.1 Hidrofobinės sąveikos chromatografija .....	23
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	26
2.1 Medžiagos .....	26
2.1.1 Reagentai .....	26
2.1.2 Padermės .....	26
2.1.3 Augalai .....	26
2.1.4 Plazmidės .....	26
2.1.5 Antibiotikai .....	27
2.1.6 Bakterijų auginimo terpės .....	27
2.1.7 Rinkiniai .....	27
2.1.8 Pradmenys .....	27
2.1.9 DNR elektroforezės tirpalai .....	28
2.1.10 NDS-PAGE elektroforezės tirpalai .....	28
2.1.11 Baltymų gryninimo buferiniai tirpalai .....	28
2.1.12 Kiti buferiniai tirpalai .....	29
2.1.13 Molekulinės masės standartai .....	29
2.1.14 Fermentai .....	29
2.2 Metodai .....	29
2.2.1 Polimerazės grandininė reakcija transpozonų lokalizacijai .....	29
2.2.2 Polimerazės grandininė reakcija genų padauginimui .....	29

2.2.3 PGR produktų gryninimas iš agarozės gelio .....	30
2.2.4 Fragmento ligavimas su vektoriaus DNR.....	30
2.2.5 Kompetentinių <i>E. coli</i> bakterijų ruošimas .....	31
2.2.6 Kompetentinių <i>E. coli</i> bakterijų transformacija .....	31
2.2.7 Kompetentinių <i>K. quasipneumoniae</i> bakterijų ruošimas.....	32
2.2.8 <i>K. quasipneumoniae</i> transformacija užšaldymo-atšildymo metodu.....	32
2.2.9 <i>K. quasipneumoniae</i> kamienų užšaldymas.....	32
2.2.10 Biparentalinė konjugacija.....	32
2.2.11 Ekskonjugantų atranka .....	33
2.2.12 Atrinktų ekskonjugantų pakartotinis jautrumo klebacinams tikrinimas .....	33
2.2.13 <i>N. benthamiana</i> vakuuminė agroinfiltracija .....	34
2.2.14 Baltymų išskyrimas iš augalų lapų .....	34
2.2.15 Hidrofobinės sąveikos chromatografija.....	34
2.2.16 Baltymų NDS-PAGE elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje ir jo dažymas.....	35
2.2.17 Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu.....	35
3. REZULTATAI.....	36
3.1 Klebicino KpnEa gryninimas .....	36
3.2 <i>K. quasipneumoniae</i> mutagenėzė ir mutantinių klonų atranka .....	38
3.3 Transpozonų įsiterpimo vietos <i>K. quasipneumoniae</i> nustatymas ir mutuotų genų identifikavimas .....	41
3.4 Kryžminio mutantų atsparumo tyrimas.....	43
3.5 Mutantų patikrinimas genų komplementacijai .....	44
3.6 Genų komplementacija.....	47
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	50
4.1 Mutuotų genų nustatymas .....	50
4.2 Genų komplementacija.....	51
IŠVADOS .....	53
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	56

## Santrumpos

angl. – angliškai

APS – amonio persulfatas

aps./min – apsisukimai per minutę

bp – bazių poros

EB – eliucijos buferis

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis

DMSO – dimetilsulfoksidai

DNR – deoksiribonukleorūgštis

DNazė – deoksiribonukleazė

dNTP – deoksinukleozidtrifosfatas

HIC – hidrofobinės sąveikos chromatografija (angl. hydrophobic interaction chromatography)

HV – hipervirulentiškas

kb – kilobazės

KFV – kolonijas formuojantys vienetai

KT – kolonos tūris

LB – Luria-Bertani mitybinė terpė

NDS – natrio dodecilsulfatas

NDS-PAGE – denatūruojanti elektroforezė su natrio dodecilsulfatu poliakrilamido gelyje

OMP – išorinės membranos baltymas (angl. outer membrane protein)

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

rRNazė – ribosominės 16S RNR ribonukleazė

SOB – Super Optimal Broth mitybinė terpė

TEMED – N,N,N',N'tetrametiletildiaminas

tRNazė – transportinės RNR ribonukleazė

Tris – tris(hidroksimetil)aminometanas

## ĮVADAS

Bakterijų sukeltos infekcijos yra viena iš dažniausių žmonių susirgimų ir mirtingumo priežasčių. Jos ypač pavojingos pacientams, turintiems nusilpusį imunitetą. Šiuo metu kovai prieš patogenus plačiausiai naudojama antibiotikų terapija, tačiau vis daugėja bakterijų padermių, įgavusių daugybinių atsparumą antibiotikams.

Vienas iš pavojingiausių oportunistinių patogenų yra *Klebsiella* genties bakterijos, galinčios sukelti pneumoniją, šlapimo takų, kraujotakos bei kitas infekcijas. Pagrindinis šių bakterijų užkrato šaltinis yra žmogaus virškinimo traktas ir ligoninių personalo rankos. Invazinių priemonių, tokių kaip kvėpavimo palaikymo sistemos, šlapimo takų kateterių bei antibiotikų naudojimas klinikoje padidina infekcijos tikimybę. *Klebsiella* ypač lengvai geba įgyti atsparumą antibiotikams, kas labai apsunkina infekcijų gydymą.

Dėl vis opėjančios atsparumo antibiotikams problemos, jaučiamas didžiulis naujų antimikrobinių preparatų poreikis. Vienas iš galimų būdų kovojant su antibiotikams atspariomis bakterijomis yra kolicino tipo bakteriocinų panaudojimas. Kad patektų į ląstelę bakteriocinai „užgrobia“ bakterijos molekulinis kelius, skirtus maistinių medžiagų pasisavinimui. Šie baltymai dažniausiai turi fermentinį aktyvumą arba bakterijų membranoje formuoja poras. Siekiant pritaikyti bakteriocinus kovai prieš patogenus, svarbu išsiaiškinti kokie ląstelės apvalkalo komponentai panaudojami jų translokacijai į ląstelės vidų. Kolicinų atveju šie baltymai yra gerai ištirti – dažniausiai tai Tol arba TonB pernašos sistemų komponentai. Tačiau *Klebsiella* peptidoglikaną degraduojantys ir poras formuojantys bakteriocinai – klebicinai – tik neseniai buvo klonuoti UAB Nomads ir jų receptijos ir translokacijos mechanizmai nėra ištirti. Jų nustatymas padėtų kuriant naujus antimikrobinius preparatus.

Šio darbo metu, pasitelkiant transpozonų mutagenezę, buvo nustatinėjami genai, atsakingi už klebicinų receptorių ir translokatorių sintezę, tam pasitelkiant jautrią *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* bakterijų padermę.

**Darbo tikslas:**

Nustatyti *Klebsiella quasipneumoniae* genus, susijusius su jautrumu klebicinams.

**Darbo uždaviniai:**

1. Naudojant baltymų raiškos sistemą augaluose, ekspresuoti ir išgryninti klebiciną KpneIa.
2. Įvykdyti *Klebsiella quasipneumoniae* DSM 28212 transpozonų mutagenezę.
3. Atrinkti klebicinams KpneM, KpneM2, KvarM, KpneA, KaerA, KvarIa ir KpneIa atsparius ekskonjugantus.
4. Lokalizuojant transpozonus mutantų genome, nustatyti genus, kuriuos išmutavus prarandamas jautrumas klebicinams.
5. Sukonstruoti plazmides su įterptais nustatytais genais ir atlikti genų komplementacijos tyrimą.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

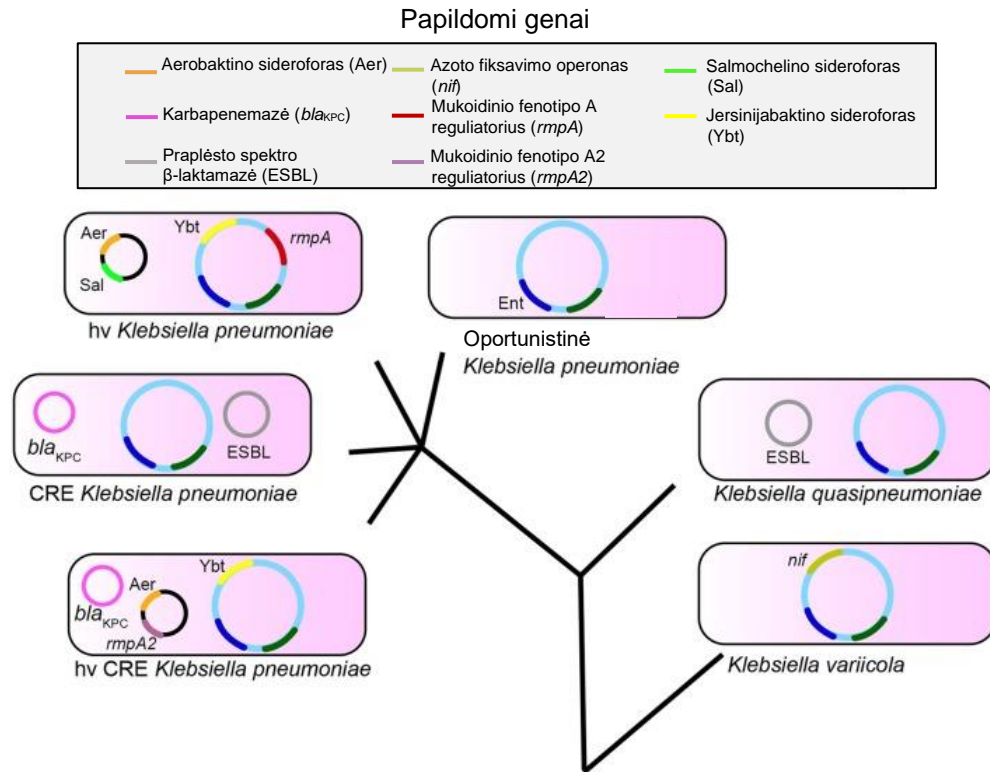
## 1.1 *Klebsiella pneumoniae* patogeniškumas

*Klebsiella pneumoniae* yra gram-neigiamos bakterijos sukeliančios įvairias žmogaus infekcijas: plaučių, šlapimo takų, kraujotakos ir kt. Anksčiau buvo manoma, kad šios bakterijos pavojingiausios žmonėms, kurių imunitetas nusilpęs, tačiau pastaruoju metu atrasta hipervirulentiškų (HV) *K. pneumoniae* padermių, sukeliančių rimtas infekcijas ir sveikuose organizmuose. Nėgana to, vis daugėja atsparumą antibiotikams turinčių padermių, todėl eksperimentai su *K. pneumoniae* bakterijomis ir efektyvaus gydymo prieš jų sukeltas infekcijas paieškos tampa vis svarbesne tyrimų sritimi.

Pirmą kartą *K. pneumoniae* atrastos devyniolikto amžiuje (Friedlaender, 1882). Jos priklauso *Enterobacteriaceae* šeimai į kurią įeina tokios gerai žinomos patogeniškos bakterijos kaip *Escherichia coli* bei *Yersinia*, *Salmonella* ir *Shigella*. *K. pneumoniae* yra nejudrios, kapsulę turinčios bakterijos aptinkamos įvairiose aplinkos vietose, įskaitant dirvą, vandens bei medicininių įrankių paviršius. Jos taip pat natūraliai aptinkamos žmogaus mukoziniame sluoksnyje virškinamajame trakte bei viršutinėse kvėpavimo trakto dalyse (Bagley, 1985). Pavojingas hospitalines infekcijas sukeliančių bakterijų pagrindinis šaltinis yra žmogaus virškinimo traktas ir ligoninių personalo rankos. Infekcijos tikimybę padidina invazinių priemonių, tokių kaip kvėpavimo palaikymo įrangos, šlapimo takų kateterių bei antibiotikų naudojimas klinikoje (Podschun ir Ullmann, 1998).

*K. pneumoniae* bakterijos yra ypač išvermingos ir gebančios išlikti. Manoma, kad jos pasitelkia gynybinį modelį, kurio tikslas yra ne aktyviai slopinti šeimininko imuninį atsaką, bet jo išvengti ir jį apeiti (Paczosa ir Meccas, 2016). Šių bakterijų patogeniškumą apsprendžia papildomi specifiniai genai, aptinkami skirtingose padermėse. Šie genai gali būti koduojami tiek chromosomoje, tiek ir plazmidėse, ir bendrai yra vadinami papildomu genomu (angl. accessory genome) (1.1 pav.). Šie skirtumai leidžia suskirstyti *K. pneumoniae* į tris grupes: oportunistinės, hipervirulentiškos (HV) ir turinčios daugybinių atsparumą vaistams (Martin ir Bachman, 2018).





**1.1 pav. *K. pneumoniae*, *K. variicola* ir *K. quasipneumoniae* papildomas genomas (pagal Martin ir Bachman, 2018).** Genai skirtingai pasiskirsto tarp rūšių ir rūšies viduje, susidarant patotipams, pvz. oportunistinėms, hipervirulentiškoms (hv) arba karbapenamams atsparioms (CRE) rūšims. Taip pat jie gali sudaryti kombinacijas (hvCRE). Enterobaktiną (Ent, mėlynas) ir fimbrijas (tamsiai žalia) koduojantys genai yra konservatyvūs, o papildomi genai pavaizduoti kaip pavyzdys.

HV padermės pasižymi invazyvumu ir neretai sukelia kepenų pūlinius bei meningitą sveikuose, neimunosupresuotuose žmonėse. *K. pneumoniae* virulentiškumo padidėjimas susijęs su 200-220 kb ilgio plazmidės įgijimu. Ši plazmidė turi papildomus genus, kurie pagerina kapsulės susidarymą bei koduoja sideroforus (Patel et al., 2014). Kitaip nei klasikinės *K. pneumoniae*, HV padermių infekcijos įgyjamos ne tik ligoninėse ir yra pavojingos diabetu sergantiems bei sveikiems, jauniems žmonėms.

Papildomas genomas vis dėl to labiausiai siejamas su atsparumu antibiotikams. Yra nustatyti du pagrindiniai *K. pneumoniae* atsparumo antibiotikams mechanizmai. Vienas iš jų remiasi praplėsto spektro β-laktamazės (angl. extended-spectrum β-lactamase, ESBL) sinteze, suteikiančia atsparumą cefalosporinams ir monobaktamams. Ją sintetinančių bakterijų infekcijos dažniausiai buvo gydomos karbapenemais, tačiau neilgai trukus išsivystė atsparumas ir jiems. *Klebsiella pneumoniae* karbapenamazės (angl. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC)

sintezė suteikia atsparumą beveik visiems žinomiems  $\beta$ -laktamams, įskaitant karbapenemus. *K. pneumoniae* yra dažniausiai sutinkamos karbapenemams atsparios *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijos (angl. carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE).

Nors atsparumas antibiotikams labiausiai siejamas su klasikinėmis padermėmis, jau yra keletas pranešimų apie atsparias HV padermes, įgijusias gebėjimą sintetinti praplėsto spektro  $\beta$ -laktamazę arba karbapenamazę (Su et al., 2008; Zhang et al., 2015). Papildomo genomo genų pasiskirstymas įtakoja skirtingomis infekcinėmis ir antibiotinio atsparumo savybėmis pasižyminčių *Klebsiella* padermių susikūrimą.

## 1.2 *Klebsiella* filogenetinės grupės

Šiuo metu iš viso nustatyta 11 *Klebsiella* rūšių: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ornithinolytica*, *K. planticola*, *K. terrigena* (Murray and Baron, 2007), *K. variicola* (Rosenblueth et al., 2004), *K. granulomatis* (Carter et al., 1999), *K. aerogenes* (Tindall et al., 2017), *K. africanensis* (Rodrigues et al., 2019), *K. grimontii* (Passet and Brisse, 2018) ir *K. quasipneumoniae* (Brisse et al., 2014). Tačiau dažniausiai patogeninės *Klebsiella* genties bakterijos skirstomos į tris pagrindines filogenetines grupes: *K. pneumoniae*, *K. variicola* ir *K. quasipneumoniae*. *K. pneumoniae* rūšis yra geriausiai žinoma ir labiausiai siejama su *Klebsiella* sukeliama infekcija. *K. variicola* ir *K. quasipneumoniae* dažniausiai laikomos oportunistinėmis bakterijomis, turinčiomis žemesnį virulentiškumą nei *K. pneumoniae* ir klinikinės diagnostikos metu dažnai yra klaidingai nustatomos kaip *K. pneumoniae* (Long et al., 2017). *K. quasipneumoniae* neretai kolonizuoja sveikų žmonių virškinamąjį traktą, o *K. variicola* aptinkama augaluose, vandens paviršiuje bei dirvoje (Brisse ir Verhoef, 2001; Zadoks et al., 2011; Martínez-Romero et al., 2015). Anksčiau buvo manoma, kad šių dviejų rūšių bakterijos yra nekenksmingi augalų endosimbiontai ir infekcijų nesukelia. Tačiau, kaip ir *K. pneumoniae*, abi šios rūšys gali turėti chromosominius ir mobilius genus, koduojančius virulentiškumo faktorius bei atsparumą antibiotikams. Jų infekcinės ir atsparumo savybės taip pat priklauso nuo papildomo genomo. Dėl panašių biocheminių savybių šias rūšis sunku atskirti įprastais fenotipiniais testais (Alves et al., 2006). Kitos diagnostinės sistemos paremtos įvairiais metodais, tokiais kaip masių spektrometrija, PGR analizė bei viso genomo sekvenavimas. Vienas iš daugiau žadančių metodų remiasi skirtingų chromosominių  $\beta$ -laktamazių variantų atpažinimu (Fonseca et al., 2017), tačiau ir jis nėra pakankamai tikslus,

kadangi tam tikri  $\beta$ -laktamazės genai aptinkami ir plazmidėse. Be to, neseniai *K. variicola* izoliatuose nustatytas *K. quasipneumoniae*  $\beta$ -laktamazės variantas (Long et al., 2017).

Šio darbo metu buvo naudojamos *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* bakterijos. Kaip ir *K. pneumoniae*, tai gram-neigiamos, nejudrios, sporų neformuojančios, turinčios kapsulę lazdelių formos bakterijos. Formuoja lygias, apvalias, baltas, kupolo pavidalo, blizgias kolonijas. Nuo kitų *Klebsiella* rūšių gali būti atskiriamos atliekant biocheminius testus, tokius kaip indolo fermentacijos, tačiau tokio atpažinimo efektyvumas nėra didelis, be to, tiksliam rūšies atpažinimui reikia atlikti įvairius testus vienu metu (Brisse et al., 2014). Skirtingi porūšiai taip pat identifikuojami pagal praplėsto spektro  $\beta$ -laktamazės arba karbapenemazės genų nešiojimą chromosomoje bei plazmidėse, kapsulės serotipą, namų ruošos genų alelių sekas, atsparumą įvairiems antibiotikams bei virulentiškumo genus. Pavyzdžiui, ištyrus 36 skirtingų *Klebsiella* filogenetinių grupių genomus, N-acetil-neuramino rūgšties genai aptikti išimtinai tik *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* bakterijose (Nicolás et al., 2018). Vis dėl to, sisteminių genomo tyrimų nėra atlikta daug. Kol kas esami rezultatai rodo, kad šio porūšio bakterijos turi didelį potencialą sukelti rimtas infekcijas ir išvengti esamų antibiotinių gydymų.

### 1.3 Bakteriocinai

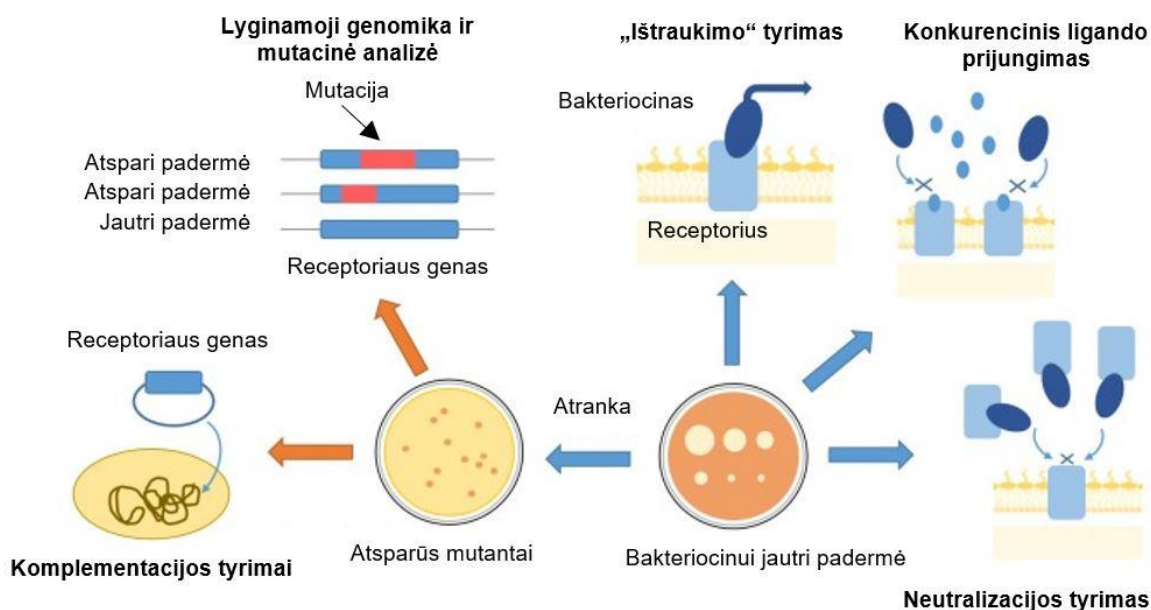
Bakterijos geba sintetinti įvairius antimikrobinius peptidus ir baltymus, skirtus varžyti su kitomis bakterijomis. Viena iš priemonių yra bakteriocinai – ribosomose sintetinami peptidai, turintys bakteriocidinį arba bakteriostatinį poveikį kitoms bakterijoms. Dauguma bakteriocinų yra siauro spektro ir veikia tik panašias arba gimingas bakterijų padermes (Riley ir Wertz, 2002). Bakteriocinus gali sintetinti gram-neigiamos ir gram-teigiamos bakterijos, nors dauguma iki šiol aprašytų bakteriocinų rasta gram-teigiamose bakterijose (Hammami et al., 2010). Šie peptidai klasifikuojami įvairiai, bendro susitarimo dar nėra. Vienas iš pasiūlymų – bakteriocinus skirstyti į keturias grupes, apimančias tiek gram-neigiamus, tiek gram-teigiamus bakteriocinus: lantibiotikai (I), nelantibiotikai (II), didelės molekulinės masės (III) ir cikliniai (IV) peptidai (Heng ir Tagg, 2006).

Skirtingi bakteriocinai skiriasi savo veikimo mechanizmu bei biocheminėmis savybėmis. Bakteriocinų pritaikymo galimybės kyla iš jų natūralių funkcijų įvairovės. Šie baltymai geba ne tik žudyti. Bakteriocinai yra vienos iš molekulių, dalyvaujančių kvorumo jutimo (angl. quorum sensing) atsakuose, tokiuose kaip bioplėvelių formavimo stabdymas bei perėjimas į genetinio

kompetentiškumo stadiją. Pavyzdžiui, nustatytas ryšys tarp streptokokų ComCDE signalinimo sistemos, atsakingos už kompetentiškumo iniciaciją, ir BlpRH kelio, reguliuojančio bakteriocinų produkciją (Shanker ir Federle, 2017). Genetinis kompetentiškumas užtikrina natūralią bakterijų transformaciją, kurios dėka bakterijos geba prisitaikyti. Nėgana to, *Streptococcus mutans* sintetinamas bakteriocinas – mutacinas V – gali veikti lizuojamai prieš jį sintetinančią bakteriją aplinkoje esant genetinį kompetentiškumą stimuliuojančioms molekulėms (Perry et al., 2009). Taip pat parodytos bakteriocinų reguliacinės bei autoreguliacinės savybės kituose ląstelinuose keliuose (Chikindas et al., 2018). Vis dėl to, viena aktualiausių bakteriocinų savybių tiek pramonėje, tiek klinikoje, yra būtent jų bakteriocidinis poveikis. Dauguma šių baltymų veikia sudarydami poras bakterijos membranoje, dėl ko keičiasi membrininis potencialas ir ląstelė žūva, tačiau jie taip pat gali paveikti ląstelės transkripcinius, replikacinius, sienelės biosintezės ar kitus gyvybiškai svarbius procesus (C. Oscáriz ir Pisabarro, 2001; Cotter et al., 2013).

Iš pradžių bakteriocinai pradėti naudoti kaip konservantai maisto kokybės gerinimui ir apsaugai nuo mikroorganizmų (Gálvez et al., 2007). Kylant antibiotikams atsparių patogeninių bakterijų grėsmei, vis dažniau svarstoma apie bakteriocinų panaudojimą kovojant prieš ligas sukeliančias bakterijas (Drider et al., 2016). Priešingai nei antibiotikai, bakteriocinai veikia gana specifiskai, todėl yra mažiau pavojingi žarnyno mikroflorai. *In vivo* tyrimai su gyvūnais parodė tam tikrų bakteriocinų efektyvumą infekcijų prevencijai ir gydymui. Pavyzdžiui, parodyta, kad lakticinas sustabdo sisteminę *Staphylococcus aureus* plitimą pelėse (Piper et al., 2012), o piocinas S5 veiksmingai kovoja su *Pseudomonas aeruginosa* infekcijomis pelių plaučiuose (McCaughy et al., 2016) bei vaškinės kandies lervose *Galleria mellonella* (Paškevičius et al., 2017).

Genetinės inžinerijos pagalba kuriami siauro spektro, padidinto aktyvumo ir stabilumo bakteriocinai, kuriuos būtų galima pritaikyti žmonių gydymui. Todėl svarbu suprasti bakteriocinų patekimo į bakterijų ląsteles mechanizmą. Tam taikomi įvairiausi genetiniai, struktūriniai, biocheminiai bei biofizikiniai metodai (1.2 pav.) (Atanaskovic ir Kleanthous, 2019).



**1.2 pav. Bakteriocinų translokonių nustatymo būdai (pagal Atanaskovic ir Kleantous, 2019).** Translokonių komponentai gali būti nustatomi „ištraukimo“ būdu, panaudojant afininę žymę žymėtą bakteriociną, atliekant konkurencinį ligando prijungimą arba bakteriocino prijungimą prie išgryninto translokono komponento (neutralizacija). Taip pat transpozonių mutagenėzės pagalba kuriami atsparūs mutantai, analizuojami jų genomai ir atliekama komplementacija rezultatų patvirtinimui.

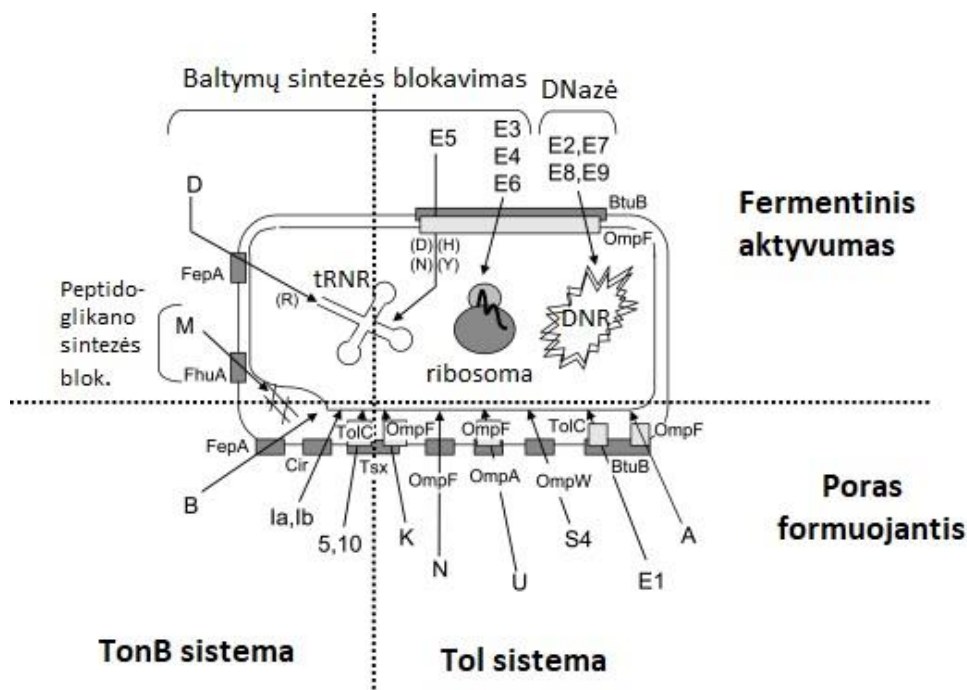
Vienas iš tyrimo būdų paremtas mutantinių, atsparių klonų kūrimu ir ši atsparumą suteikiančių genų paieška. Atsparumą bakteriocinams bakterijos dažniausiai įgyja modifikuodamos ląstelės apvalkalo storį arba krūvį, mažindamos bakteriocinų receptorių raišką arba reguliuodamos bakteriocinų bei antibiotikų pernašos ląstelėje komponentų kiekį. Pavyzdžiui, *S. aureus* mutantai su išveiklintais dviejų komponentų sistemos (angl. two-component system, TCS) ir ABC transporterių genais, atsakingais už antibiotikų pernašą ląstelėje, įgavo padidėjusį jautrumą bacitracinui ir nizinui (Hiron et al., 2011). Įvairiems bakteriocinams, tarp jų ir *Klebsiella* mikrocinui E492, pediocinams bei laktokocinams, atsparios bakterijos pasižymi sumažėjusia manozės fosfotransferazės sistemos (angl. mannose phosphotransferase system, Man-PTS), veikiančios kaip šių bakteriocinų receptorių, genų raiška (Bieler et al., 2006; Diep et al., 2007). Vis dėl to, daugumos bakteriocinų patekimo į ląstelę mechanizmas dar nėra suprastas. Išaiškinus translokacijos kelius būtų lengviau kurti naujus vaistinius preparatus, pvz. chimerinius, didesnio toksiškumo bakteriocinus, bei užkirsti kelią atsparių bakterijų vystymuisi (Lukacik et al., 2012). Nėgana to, sparčiai tobulėjant genetikos ir nanotechnologijų mokslams atsiranda perspektyvos

ateityje pritaikyti bakteriocinus ne tik infekcijų, bet ir vėžio gydymui bei molekulių pernašos sistemų kūrimui.

### 1.3.1 Kolicinai

Pats pirmasis atrastas bakteriocinas buvo *Escherichia coli* kolicinas (Fredericq and Levine, 1947). Tai didelės molekulinės masės termostabilūs baltymai. Kiek vėliau buvo identifikuoti mikrocinai – mažos molekulinės masės peptidai, dažniausiai iki 10 kDa dydžio (Baquero ir Asensio, 1976). Tai nedideli, ribosomose sintetiniai, bakteriostatiniai peptidai, dažniausiai išskiriami *Enterobacteriaceae*. Kitaip nei kolicinai, kurie aptinkami tik plazmidėse, mikrocinai gali būti koduojami ir chromosomoje. Be to, priešingai nei kolicinų atveju, mikrocinų sintezė nėra letali produkuojančiai ląstelei ir jų sintezės nereguliuoja bakterijų DNR pažeidomiu indukuojama SOS sistema (Budič et al., 2011). Skirtingi mikrocinai veikia įvairiai – dažniausiai formuodami poras ląstelių membranoje, stabdydami baltymų sintezę, blokuodami DNR girazę, protonų kanalus arba ATP sintazę (Baquero et al., 2019).

Tuo tarpu kolicinai dažniausiai turi fermentinį aktyvumą (DNazės, RNazės), stabdo peptidoglikano sintezę arba formuoja poras membranoje. Kolicinai geba nužudyti tik giminingas bakterijas ir dažniausiai veikia rūšies arba genties viduje. Siaurą veikimo spektrą lemia specifiniai receptoriai, aptinkami kolicinams jautrių padermių paviršiuje, prie kurių jie jungiasi prieš nužudydami bakteriją. Pagal tai, kokią ląstelės pernašos sistemą baltymas pritaiko patekimui į vidų, kolicinus galima skirstyti į dvi grupes – A ir B. A grupės kolicinai transportuojami Tol sistema, o B grupės – TonB sistema. (Davies ir Reeves, 1975a, 1975b). Grupės A kolicinams reikalingi dvejopi receptoriai: pirmasis receptorius yra išorinės membranos baltymas, skirtas kolicino atpažinimui ir prisitvirtinimui prie membranos. Pavyzdžiui, kolicinai A ir E1-9 sąveikauja su vitamino B12 receptoriumi BtuB (1.3 pav.).

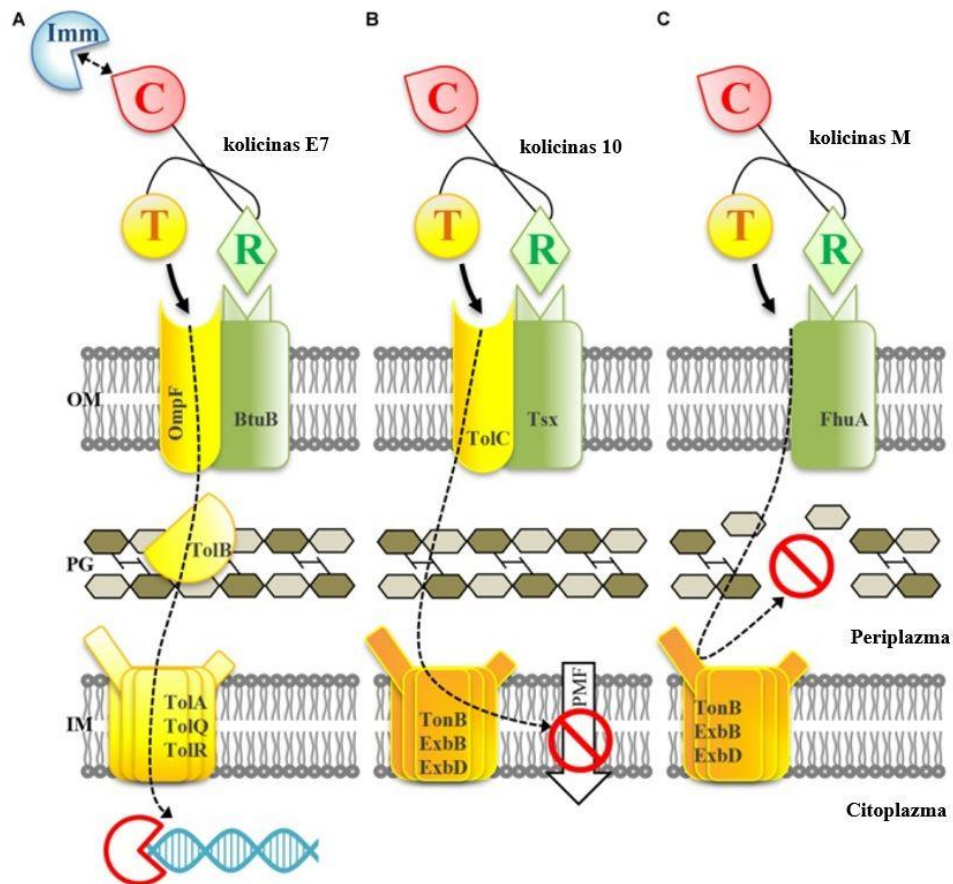


**1.3 pav. Schematinis geriausiai ištirtų kolicinų receptorių, transportavimo ir veikimo mechanizmų apibendrinimas (Cascales et al., 2007).** Schema padalinta pagal kolicinų veikimo tipą (viršuje – turintis fermentinį aktyvumą, apačioje – poras formuojantis) ir naudojamą translokacijos sistemą (kairėje – TonB sistema, dešinėje – Tol sistema). Pažymėti kolicinų pavadinimai (ties rodyklių pradžia) ir pernašoje dalyvaujantys baltymai. Fermentinių kolicinų poveikis ląstelėje taip pat pažymėtas. tRNR veikiančių kolicinų specifiskumas nurodytas ant rodyklių skliausteliuose (raidės atitinka aminorūgščių žymėjimą).

Antro receptoriaus surišimas reikalingas baltymo translokacijai į ląstelės vidų. Tai dažniausiai išorinės membranos porinai arba kanalai, pvz. OmpF arba TolC. Nėra tiksliai aišku, kaip citoplazmoje veikiančią DNazinę aktyvumą turintys kolicinai pereina per išorinę membraną, tačiau yra nustatyta, kad pernašai per vidinę membraną svarbus nukleazinio domeno krūvis bei tam tikra elektrostatinė sąveika tarp domeno ir vidinės membranos. Yra žinoma, kad kolicinas E9 translokacijai pasitelkia FtsH, AAA<sup>+</sup> ATPazę/proteazę, nukreipiančią netinkamai sulankstytus membranos baltymus į citoplazmą degradacijai (Walker et al., 2007). B grupės kolicinams prisitvirtinimui ir translokacijai per išorinę membraną dažniausiai užtenka vieno receptoriaus. Pavyzdžiui, FepA transportuoja kolicinus B ir D, o FhuA perneša koliciną M (Cascales et al., 2007).

Trims kolicinų veikimo žingsniams – receptoriaus atpažinimui, translokacijai ir žudymui – naudojami trys skirtingi domenai, iš kurių sudaryti visi žinomi kolicinai. Centrinis, N-galinis ir C-galinis domenai atitinkamai yra atsakingi už specifinio išorinės membranos receptoriaus surišimą,

translokaciją per ląstelės apvaskalą ir citotoksinį poveikį ląstelėje (1.4 pav.). Kartu su koliciniais bakterijos taip pat sintetina imuninį baltymą (angl. immunity protein), kuris rišasi prie C-galinio domeno ir blokuoja kolicino citotoksinį poveikį, taip apsaugodamas ląstelę nuo jos pačios išskirto nuodo (Kim et al., 2014).



**1.4 pav. Nukleazinį (A), poras formuojantį (B) ir peptidoglikano sintezę blokuojantį (C) aktyvumą turinčių kolicinų veikimo schemas (pagal Hahn-Löbmann et al., 2019).** Centrinis domenas (R) suriša išorinės membranos (OM) receptorių. Translokacija vyksta sąveikaujant N-galiniam (T) domenui ir ląstelės translokacijos sistemai (Tol arba TonB). (A) Nukleazinį poveikį turintis kolicinas translokuojamas į citoplazmą. (B) Poras formuojantis kolicinas įsiterpia į vidinę membraną (IM), suformuoja porą ir taip suardo protonovaros jėgą (PMF) bei membranos integralumą. (C) Kolicinas M peptidoglikano sintezę stabdo veikdamas periplazmoje, neleidamas vykti polimerizacijai.

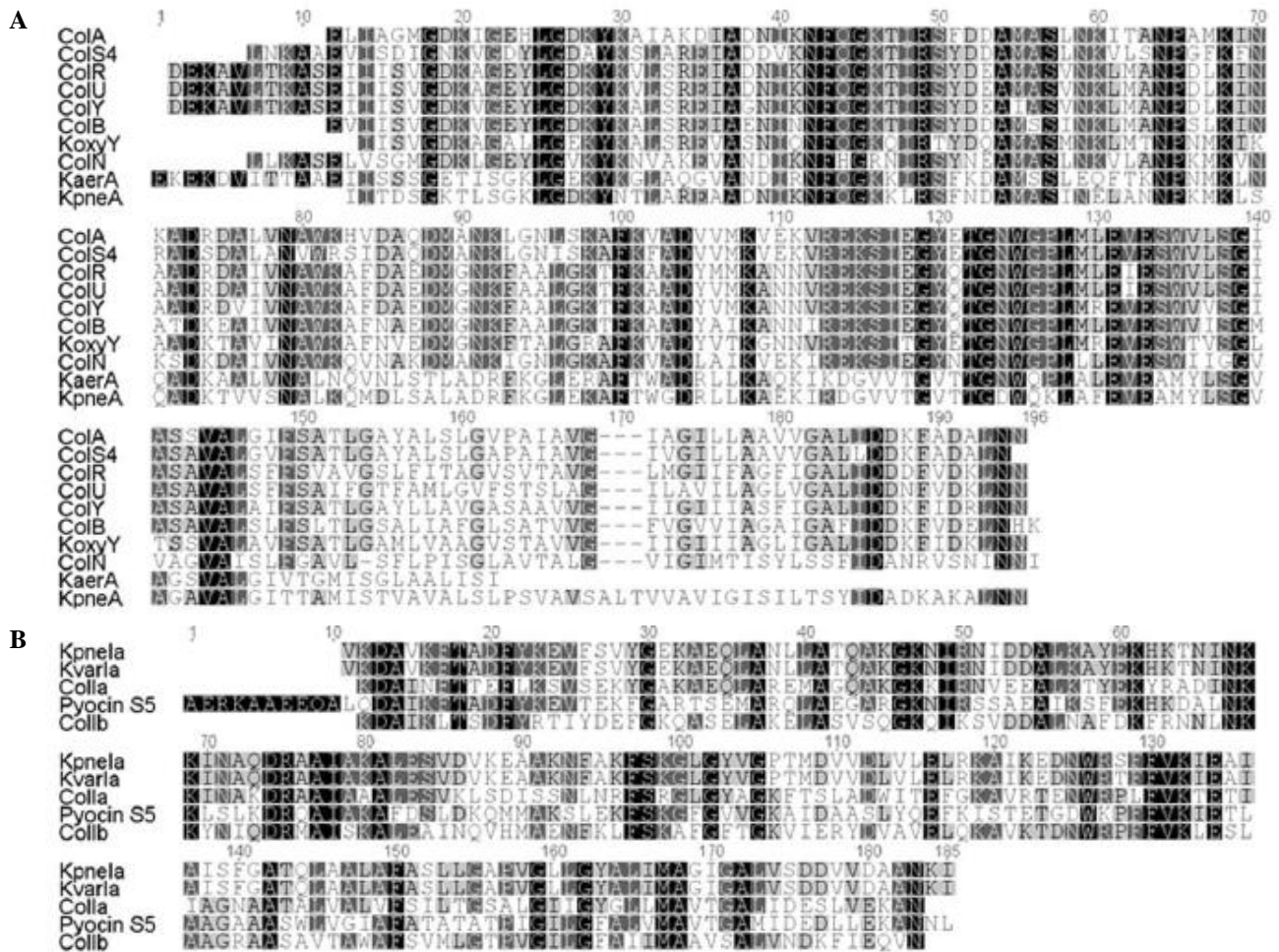
### 1.3.2 Klebicinai

Apie *Klebsiella* genties bakteriocinus žinoma daug mažiau. Jie priklauso vadinamiems į koliciną panašiams (angl. colicin-like) bakteriocinams ir pasižymi panašia struktūra ir veikimo mechanizmu. Yra nustatytos kelios klebicinų grupės – A, B, C ir D. Klebicinas A1 priklausomas nuo TonB pernašos sistemos, o klebicinas B homologiškas kolicinams, turintiems DNazės



aktyvumą (Riley et al., 2001; Cascales et al., 2007). Abu šie klebicinai veikia kaip nespecifinės endonukleazės. Remiantis baltymų sekų palyginimu ir filogenetine analize taip pat nustatyta, kad klebicas C gali turėti rRNazės aktyvumą, o klebicas D priklauso tRNazių grupei (Chavan et al., 2005).

UAB Nomads buvo klonuoti nauji klebicinai, priklausantys dviems skirtingoms grupėms: poras formuojantys klebicinai ir į koliciną M panašūs peptidoglikano sintezę blokuojantys klebicinai (Denkovskienė et al., 2019). Klebacinų poras formuojančių domenų aminorūgščių sekos buvo identifikuotos naudojantis NCBI BLAST paieška ir, pasitelkiant Clustal W programą, lygintos su žinomomis poras formuojančių aktyvumą turinčių kolicinų ir pocieno S5 domenų sekomis (1.5 pav.)



1.5 pav. Poras formuojančių kolicinų ir jų *Klebsiella* homologų sekų analizė (pagal Denkovskienė et al., 2019). Naudojantis Clustal W programa, palygintos kolicino A-tipo (A) ir kolicino Ia-tipo (B) baltymų poras formuojančių domenų aminorūgščių sekos.

Buvo išskirtos dvi pagrindinės poras formuojantį domeną turinčių klebacinų grupės: *K. pneumoniae* BAS34675 ir *K. variicola* KDL88409, labiausiai panašūs į koliciną Ia, ir *K. aerogenes* WP\_063414841, *K. pneumoniae* SAV78255 bei *K. oxytoca* WP\_024273778, priskirti grupei baltymų, panašių į koliciną A. WP\_024273778 panašiausias į koliciną Y, su kuriuo sekos sutapo 75 %. Naujai atrasti klebacinai buvo pavadinti sujungiant bakterijos šeimininkės rūšies ir nustatyto panašaus kolicino pavadinimus: KpneA (*K. pneumoniae* SAV78255.1), KaerA (*K. aerogenes* WP\_063414841.1), KoxyY (*K. oxytoca* WP\_024273778), KvarIa (*K. variicola* KDL88409) ir KpneIa (*K. pneumoniae* BAS34675). Pasitelkiant Geneious programą, sugeneruotas filogenetinis medis (1.6 pav.).



**1.6 pav. Kolicinų, piocino S5 ir klebacinų nuspėjamų poras formuojančių domenų (pfam01024) filogenetinis medis (pagal Denkovskienė et al., 2019).** Pažymėti žinomi kolicinai, piocinas S5 ir naujai identifikuoti klebacinai. Medis sudarytas naudojantis Geneious programa.

Tokiu pat būdu buvo nustatyti ir keturi kolicino-M tipo domeną turintys klebacinai, atitinkamai pavadinti KpneM (*K. pneumoniae* EWD35590.1), KpneM2 (*Klebsiella* sp. WP\_047066220), KvarM (*K. variicola* CTQ17225.1) ir KaerM (*K. aerogenes* WP\_015367360.1). (1.7 pav.).

```

ColM      1  MEETLWHPSPS-----TNLPSTENCAEISLAP-HVHGAGPLLVWVYSFFNSPNMLOALTOLEDYIK
KpneM    1  MSEWVWVWVATPTG----FEPAGMGGLLESPTPNHSSSCHOIEFQVTLPLYYNSKFEQDSMAWLAQYVK
KpneM2   1  MSEWVWVWVATPAPS----APSMTWGGLIYSSIP-SGNESEKQIEFQVTLPLAYSSPNEQTDRLRWVVKFIN
KvarM    1  MSEWVWVWVATPTPGFSYASGLTMEGGAFAAGAPA-NGHSEKQIEFQVTLPLAYSSPNEIGQLAWMTDYIN
KaerM    1  MITLWVWVWVATIPNG-SSFNFQFEGMENYYAAGSSSTWDDPAMADAHLYNAISMEDGSFTKALFADWLQ

ColM     70  KHEASNHLWLQIESTNIGYICNWRNRLVHLHGIGISVYDAYH----FAKPAHESQYDYSMNMKOMSENWTH
KpneM    70  THHAQDHLWVIOVVANNIRYHLNANWNLCHNPKONWWEAFHSEMTHSGPPEAKYDYHSMLEKQSENWVW
KpneM2   70  ENGVGNHDLWVKTLDVIRYYASQWNAISKNKTNPYDAWH----KCPWPEAKSFDVKTMSVEKESWVW
KvarM    70  KNGVGNHDLWVWVETISQNLVLCSSQWNAISLVNKRIAVYDGFH----KTKWAKAKFNFKTOSQEKESWVW
KaerM    70  FNAKGR-----ENIPMINARASATMENMRFNDSGKAYFQFAQ-----YNEMEGHTPG-NNETSQAFA

ColM    140  IELVLAHVVYVGNCAERISWNIANIENKISPMKNNQIKDIKSGVVTFFEVSTKTHANGDYN-VITGAMW
KpneM    140  IAAAEFGHVVYVGNCAEARVYWNLPDVFQKITPQMPELMNIVNSGVTCHIEVDIKVHDVSVSGGIVPAAMW
KpneM2   140  IELVLEGHVVYVGNCAEKPHSVDLSTVFAKQVQANQMDPVMIAVKSRYGAKTYQINGNINRRNFFDDG-VIPGLW
KvarM    140  IIAAEFGHVVYVGNCAEKPHPTWDLSSVFAKQVQANQMDPVMIAVKNNAATYQISGNINRRNFFIDG-DIPGLW
KaerM    140  IELVLEGHVVYVGNCAEKPHSVDLSTVFAKQVQANQMDPVMIAVKSRYGAKTYQINGNINRRNFFDDG-VIPGLW

ColM    210  ENNHLKVVYVGNCAEKPHSVDLSTVFAKQVQANQMDPVMIAVKSRYGAKTYQINGNINRRNFFDDG-VIPGLW
KpneM    210  ENNHLKVVYVGNCAEKPHSVDLSTVFAKQVQANQMDPVMIAVKSRYGAKTYQINGNINRRNFFDDG-VIPGLW
KpneM2   210  ENNHLKVVYVGNCAEKPHSVDLSTVFAKQVQANQMDPVMIAVKSRYGAKTYQINGNINRRNFFDDG-VIPGLW
KvarM    210  ENNHLKVVYVGNCAEKPHSVDLSTVFAKQVQANQMDPVMIAVKSRYGAKTYQINGNINRRNFFDDG-VIPGLW
KaerM    210  ENNHLKVVYVGNCAEKPHSVDLSTVFAKQVQANQMDPVMIAVKSRYGAKTYQINGNINRRNFFDDG-VIPGLW

ColM    260 262  KESSEKR
KpneM    260 262  SCSSEKR
KpneM2   260 262  SCSSEKR
KvarM    260 262  SCSSEKR
KaerM    260 262  QLSSEKR

```

1.7 pav. Kolicino M ir jo *Klebsiella* homologų sekų analizė (pagal Denkovskienė et al., 2019). Naudojantis Clustal W programa, palygintos kolicino M ir jį panašių klebicinų domenų aminorūgščių sekos.

Nustatyti M-tipo klebicinai savo domenų sekomis buvo nuo 29 iki 48 % identiškai kolicinui M, o poras formuojančių klebicinų ir atitinkamų kolicinų sekų panašumas siekė 42-52 %.

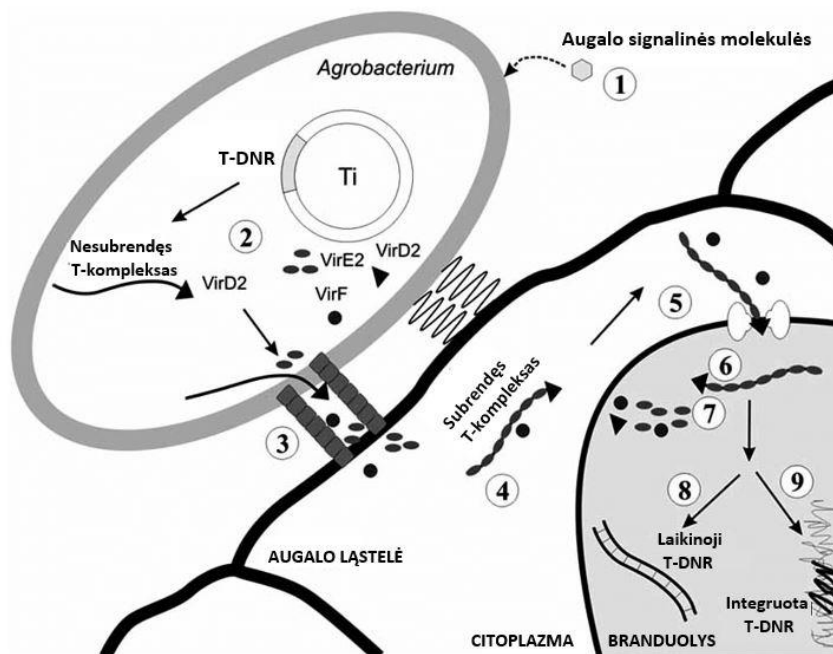
Visi identifikuoti klebicinai buvo klonuoti į magnICON tabako mozaikos viruso vektorių pICH29912 ir juo transformuotos *Agrobacterium tumefaciens* bakterijos (Marillonnet et al., 2005). Klebicinai buvo susintetinti pasitelkiant laikinąją raiškos sistemą agroinfiltruotuose *Nicotiana benthamiana* augaluose. Klebicinų raiška augaluose yra ypač efektyvi, lyginant su kolicinų ir salmocinų raiška: kolicino K daugiausia susintetinta 3 mg/g šviežios žaliavos, o salmocino E2 – 1.7 mg/g (Schneider et al., 2018; Schulz et al., 2015). Tuo tarpu geriausia raiška pasižymėjusio klebicino KpneM2 buvo susintetinta 4.4 mg/g, o KpneM – 3.3 mg/g.

Klebicinų antimikrobinės savybės buvo iširtos patikrinus 100 antibiotikams atsparių klinikinių *Klebsiella* izoliatų jautrumą klebicinams. Šio tyrimo rezultatai atskleidė, kad 92 % tirtų izoliatų buvo jautrūs bent vienam klebicinui. Ypač plačiu aktyvumo spektru pasižymėjo KvarM, kuriam jautrūs buvo 85 % visų izoliatų, bei KpneM, aktyvus prieš 74 % izoliatų. Taip pat buvo atlikta klebicinų aktyvumo analizė skystoje terpėje ir prieš ląstelių biofilmus, kur ypatingai pasižymėjo poras formuojantys klebicinai. Negana to, skirtingai nuo daugumos kitose bakterijų rūšyse sintetinamų kolicinų tipo bakteriocinų, kurie paprastai žudo tik tos pačios rūšies bakterijų padermes, šie klebicinai pasižymi platesniu veikimo spektru ir veikia genties viduje. Jų aktyvumas

parodytas prieš 12 skirtingų padermių, priklausančių penkioms *Klebsiella* rūšims – *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae*, *K. variicola*, *K. oxytoca* ir *K. aerogenes* (Denkovskienė et al., 2019).

#### 1.4 Baltymų raiškos sistemos augaluose

Augalų naudojimo rekombinantinių baltymų sintezei istorija prasidėjo apie 1897-aisiais metais, kuomet buvo atrastos gram-neigiamos bakterijos *A. tumefaciens*. Šios fitopatogeniškos, dirvoje aptinkamos bakterijos turi specifinę plazmidę, pavadintą Ti (angl. tumour-inducing) plazmide, kuri geba pernešti tam tikrą savo dalį į augalo ląstelę bei įterpti ją į augalo genomą (1.8 pav.) (Chilton et al., 1977).



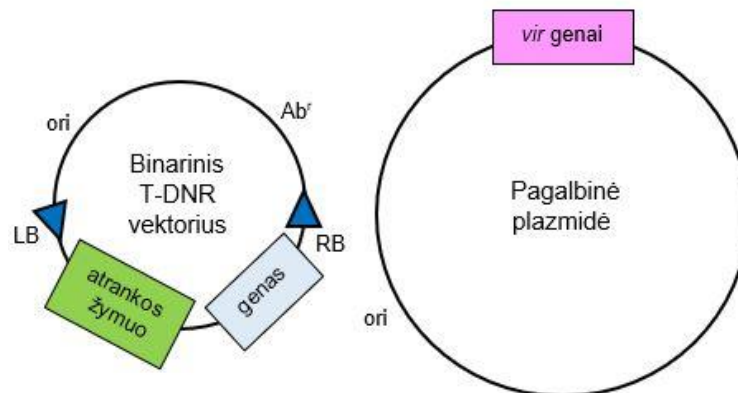
**1.8 pav. *Agrobacterium* sukeltos genetinės augalo transformacijos schema (pagal Sheludko, 2008).** 1 – augalo signalinės molekulės indukuoja *vir* genų raišką; 2 – nesubrendusio T-komplekso (ssT-DNR-VirD2) susiformavimas; 3 – kompleksas ir kitų Vir baltymų pernaša į augalo ląstelę; 4 – subrendusio T-komplekso susiformavimas; visa ssT-DNR molekulė pasidengia VirE2 baltymais, o VirD2 prisijungia 5' gale; 5, 6 – kompleksas pernaša į branduolį; 7 – Vir baltymų pašalinimas; 8 – ssT-DNR vertimas į dsT-DNR (*laikinoji raiška*); 9 – T-DNR integracija į augalo chromosomas (*pastovioji raiška*).

Ši sritis vadinama T-DNR (angl. transfer DNA). Ji yra apie 10-30 kb ilgio, Ti plazmidėje iš abiejų pusių įrėmintą 25 bp ilgio pasikartojimais. Pati T-DNR koduoja opinus – mažos molekulinės masės junginius, bakterijų naudojamus kaip anglies ir azoto šaltiniai, ir fitohormonus (auksinus ir citokininus), dėl kurių padidėjusio kiekio augaluose formuojasi augliai. Augalų transformacijai svarbūs *vir* (angl. virulence) genai, taip pat koduojami toje pačioje Ti plazmidėje.

Jų koduojami baltymai atsakingi už T-DNR iškirpimą iš Ti plazmidės ir pernešimą į augalo genomą.

#### 1.4.1 Binariniai vektoriai

Didesnis šuolis tiriant Ti plazmides įvyko 1983 m., kuomet į ją pirmą kartą buvo įterpti heterologinių baltymų genai – mielių alkoholio dehidrogenazė bei bakterijų neomicino fosfotransferazė (Barton et al., 1983). Vis dėl to, pirmieji bandymai nebuvo sėkmingi. Sunkumų kėlė Ti plazmidės dydis, tai, kad ji yra mažakopijinė, ją sunku izoliuoti, o be to ji nesireplikuoja *E. coli* bakterijose – patogiausiam organizme vykdyti genetines manipuliacijas. Tačiau ne ilgai trukus buvo pastebėta, kad *vir* genai ir T-DNR sritis gali būti atskiriami į du replikonus (Hoekema et al., 1983). Patalpinus abi plazmides į tą pačią agrobakterijų ląstelę, *vir* genai veikia kaip *trans* elementas ir geba atlikti savo funkciją – iškirpti ir nugabenti T-DNR į augalo genomą. Tokia dviejų replikonų sistema buvo pavadinta T-DNR binarine sistema, kadangi galėjo replikuotis tiek *A. tumefaciens*, tiek *E. coli* bakterijose (1.9 pav.) (Lee ir Gelvin, 2008).



**1.9 pav. T-DNR binarinės sistemos schema (pagal Lee ir Gelvin, 2008).** Tikslinis genas patalpinamas T-DNR regione binariniame vektoriuje. Vir baltymai koduojami pagalbinėje plazmidėje. Atrankos žymuo naudojamas sėkmingai augalo transformacijai patvirtinti. ori – replikacijos pradžios sritis, Ab<sup>r</sup> – atsparumo antibiotikams genas, reikalingas *A. tumefaciens* arba *E. coli* transformantų atrankai, LB ir RB – T-DNR ribojančios pasikartojančios sekos.

#### 1.4.2 Laikinoji ir pastovioji raiškos sistemos

Heterologiniai baltymai gali būti sintetinami augaluose dviem būdais – laikinąja arba pastoviąja raiška. Pastoviosios transformacijos metu tikslinis genas yra įterpiamas į augalo chromosominę DNR. Tokiu būdu gaunami transgeniniai augalai, gebantys perduoti naujai įgytus požymius kitoms kartoms. Šio būdo privalumai yra atsikartojantys rezultatai ir didelio masto

produkcijos galimybė, tačiau tai daug laiko užimantis procesas. Be to, tokia sistema visiškai netinkama greitam, didelės įvairovės konstruktyvų tikrinimui, todėl šiuo metu daug plačiau taikomos laikinosios raiškos sistemos (Kusnadi et al., 1997).

Laikinosios raiškos sistemos leidžia rekombinantinius baltymus išgauti saugiai, paprastai ir dideliais kiekiais vos per kelias dienas. Paprastai vykdoma agroinfiltracija – procesas, kurio metu fiziškai (švirkštu) arba vakuomo pagalba į augalo lapų tarpląstelines ertmes suleidžiama transformuotų agrobakterijų suspensija. Tik labai nedidelė į augalo ląsteles patekusios T-DNR dalis įsiterpia į chromosominę DNR. Visa kita dalis lieka citoplazmoje epizomų pavidalu ir kelias dienas yra transkribuojama (Jones et al., 2009). Tokia laikina baltymo genų raiška nepriklauso nuo integracijos į chromosomą, todėl nereikia atsižvelgti į padėties efektą (Komarova et al., 2010).

Didžiausios rekombinantinių baltymų išeigos gaunamos naudojant virusinės kilmės laikinos raiškos vektorius. Dėl virusų efektyvaus infekavimo ir greitos replikacijos šios sistemos sutrumpina produkcijos laiką bei padidina išeigą. Naudojant „dekonstruotus“ virusus pašalinami limituojantys (pvz. siauras šeimininkų spektras, rūšių specifiškumas) arba nepriimtini (pvz. gebėjimas sintetinti infekcines viriono dalis, galinčias kelti grėsmę organizmams) genai bei funkcijos. Tarpusavyje derinant virusinių vektorių replikacijos sistemos ir agroinfiltracijos privalumus gaunamos baltymų raiškos sistemos, kurios nereikalauja genetiškai modifikuotų organizmų kūrimo ir yra greitesnės, efektyvesnės, geriau kontroliuojamos ir saugesnės (Gleba et al., 2014).

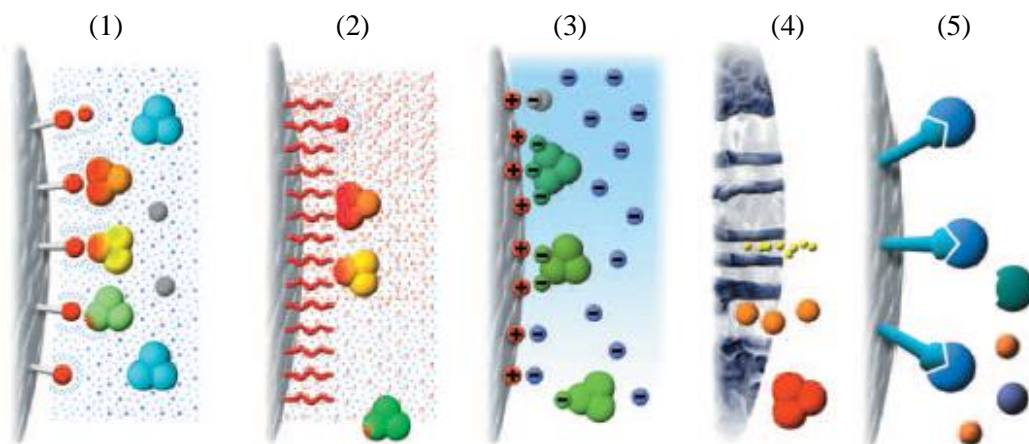
### **1.5 Baltymų gryninimas**

Chromatografija (gr. *chroma* – spalva, *graphein* – rašyti) – vienas iš nepamainomų laboratorinių metodų įvairių medžiagų atskyrimui. Jos atsiradimu laikoma 20-to amžiaus pradžia, kuomet rusų botanikas Mikhail Tswett, naudodamas kalcio karbonatą, atskyrė skirtingų spalvų augalų pigmentus – chlorofilą, karoteną bei ksantofilą. Vėliau, 1952 m., A. Martin ir R. Synge buvo apdovanoti Nobelio premija už jų aprašytus padalijimo (angl. partition) chromatografijos pagrindinius principus (Martin ir Synge, 1941). Tai davė pradžią skirtingoms chromatografijos rūšims – skysčių, dujų, plonasluoksnei bei popieriaus chromatografijai. Per kelis sekančius dešimtmečius išsivystė ir ištobulėjo daugybė chromatografijos atšakų (1.1 lentelė).

**1.1 lentelė.** Baltymų savybės ir jomis paremti chromatografiniai metodai (pagal GE Healthcare).

Baltymo savybė	Metodas
Krūvis	Jonų mainų chromatografija
Dydis	Dydžio išskyrimo chromatografija
Hidrofobiškumas	Hidrofobinės sąveikos chromatografija Atvirkščių fazių chromatografija
Specifinis ligando atpažinimas	Afininė chromatografija

Chromatografija yra paremta sąveika tarp judriojoje fazėje esančios tiriamos medžiagos ir stacionariosios fazės, vadinamos sorbentu arba nešikliu. Parenkamas toks sorbentas, kuris skirtingai sąveikaus su skirtingomis tiriamajame mėginyje esančiomis molekulėmis, dėl ko jos bus atskiriamos viena nuo kitos. Ši sąveika gali būti įvairi: paremta skirtingu molekulių hidrofobiškumu, krūviu arba specifinių ligandų sąveika. Manipuliuojant sorbento porėtumu taip pat galima atskirti molekules pagal jų dydį (1.10 pav.) (GE Healthcare Strategies for Protein Purification).

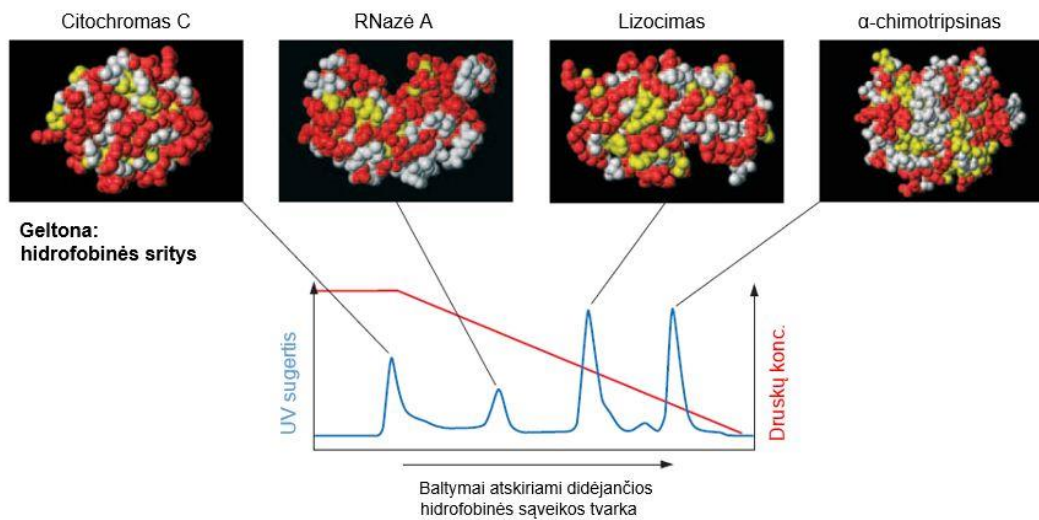


**1.10 pav. Schematiniai skirtingų chromatografinių metodų atskyrimo principai (pagal GE Healthcare).** 1 – hidrofobinės sąveikos chromatografija, 2 – atvirkščių fazių chromatografija, 3 – jonų mainų chromatografija, 4 – dydžio išskyrimo chromatografija, 5 – afininė chromatografija.

### 1.5.1 Hidrofobinės sąveikos chromatografija

Hidrofobinės sąveikos chromatografija (angl. hydrophobic interaction chromatography, HIC) atskiria baltymus remiantis skirtingu molekulių hidrofobiškumu. Paprastai tretinės struktūros baltymai stengiasi savo hidrofobines aminorūgštis nukreipti į molekulės vidų, o hidrofilines – į išorę. Paviršiuje liekančios hidrofobinės dalys ir yra atsakingos už hidrofobinę sąveiką (Lee ir

Richards, 1971). Hidrofobinės sąveikos chromatografijos metu tiriamame mėginyje turi būti didelė druskos koncentracija. Taip pagerinama sąveika tarp hidrofobinių mėginio komponentų ir sorbento. Užnešus mėginį, per kolonėlę toliau leidžiamas praplovimo buferis, dėl ko mažėja druskos koncentracija ir tuo pačiu joninė jėga. Tokiu būdu po truputį išplaunami prie kolonėlės prisikabinę baltymai, pradedant nuo silpniausių hidrofobinę sąveiką turinčių ir baigiant stipriausiai sąveikaujantiems (1.11 pav.) (GE Healthcare Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography).



**1.11 pav. Baltymų atskyrimo pavyzdys atliekant hidrofobinės sąveikos chromatografiją (pagal GE Healthcare Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography).** Geltona spalva pažymėtos hidrofobinės, o raudona – hidrofiliinės baltymų aminorūgštys.

Tikslus mechanizmas nėra išaiškintas, tačiau žinoma vandens molekulių svarba šioje sąveikoje. Vandens molekulės yra polinės ir tarpusavyje formuoja vandenilinius ryšius. Nėpolinės molekulės, tokios kaip baltymai, patekusios į vandenį priverčia vandens molekules formuoti organizuotas, tvarkingas struktūras, panašias į apvaskalą. Taip yra todėl, kad vandens molekulės negali sudaryti ryšių su hidrofobine molekule. Tokių tvarkingų struktūrų suardymas yra termodinamiškai palanki situacija, kadangi mažėjant tvarkai didėja entropija (Tomaz, 2017). Siekdamas entropiją padidinti, hidrofobinės molekulės verčiamos jungtis, kad kuo labiau sumažintų tokių apvaskalų kiekį. Gryname vandenyje hidrofobinis efektas yra per silpnas sąveikoms atsirasti, todėl į baltymų mėginį pridedama anti-chaotropinių druskų (pvz.:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ), kurios didina hidrofobinį efektą. Tokiu būdu baltymai tiriamajame mėginyje jungiasi prie hidrofobinių ligandų esančių ant kolonėlės sorbento ir vėliau,



keičiant sąlygas, yra po vieną išelijuojami (GE Healthcare Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography).

Esant per didelei druskų koncentracijai baltymai gali iškristi į nuosėdas. Joninės jėgos pokyčiai, organinių tirpiklių buvimas, temperatūra bei pH turi įtakos baltymų stabilumui ir tirpumui, o tuo pačiu ir jų sąveikai su kitomis hidrofobinėmis molekulėmis, pvz. chromatografijos kolonėlės ligandais. Hidrofobinės sąveikos chromatografijoje naudojami įvairūs sorbentai, dažniausiai pagaminti silikagelio, celiuliozės arba agarozės pagrindu. Jie sudaryti iš mažų, porėtų rutuliukų prie kurių prikabinti ligandai (pvz. butil-, fenil-, octil- grandinės). Optimizuojant chromatografiją svarbu atsižvelgti ne tik į naudojamą ligandą, bet ir į kitas minėtas sąlygas (GE Healthcare Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Medžiagos

#### 2.1.1 Reagentai

2.1 lentelė. Darbe naudoti reagentai.

Gamintojas	Reagentai
Amresco	LB terpė, agarozė
Applichem	NDS, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Boehringer Mannheim	Tetraciklinas
ChemaPol	KOH
Duchefa Biochemie	Rifampicinas
Fluka	MgSO <sub>4</sub> , MnCl <sub>2</sub> , TEMED
Merck	Acto rūgštis, amonio sulfatas, DTT
Obermeier	Silwet-L77
Roth	Ampicilinas, kanamicinas, agaras, Bradfordo reagentas, etidžio bromidas, izopropanolis, Pipes, SOB terpė, APS
Sigma	Tris, Tris-HCl, EDTA, CaCl <sub>2</sub> , KCl <sub>2</sub> , chloramfenikolis, bromfenolio mėlis
Sigma-Aldrich	DMSO, akrilamido/bisakrilamido tirpalas
Thermo Fisher Scientific	DNR molekulinės masės žymenys, rinkiniai, <i>Taq</i> polimerazė, Phusion High-Fidelity polimerazė, dNTP, restrikcijos ir modifikacijos fermentai
Vilniaus degtinė	Etanolis

#### 2.1.2 Padermės

*Escherichia coli* S17-1 ( $\lambda$  pir)

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$

*Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* DSM 28212

*Agrobacterium tumefaciens* GV1301 (pNMDV953)

#### 2.1.3 Augalai

Tabakas *Nicotiana benthamiana*

#### 2.1.4 Plazmidės

pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific)

pACYC184 (New England Biolabs)

pICH29912 (Icon Genetics)

### 2.1.5 Antibiotikai

Ampicilinas – tirpinamas 70 % etanolyje, pradinis 100 mg/ml tirpalas laikomas -20 °C (Roth)

Kanamycinas – tirpinamas vandenyje, pradinis 50 mg/ml tirpalas laikomas -20 °C (Roth)

Chloramfenikolis – tirpinamas 96 % etanolyje, pradinis 25 mg/ml tirpalas laikomas -20 °C (Sigma)

Tetraciklinas – tirpinamas vandenyje, pradinis 5 mg/ml tirpalas laikomas -20 °C (Boehringer Mannheim)

Rifampicinas – tirpinamas metanolyje, pradinis 25 mg/ml tirpalas laikomas -20°C (Duchefa Biochemie)

### 2.1.6 Bakterijų auginimo terpės

LB terpė: 25 g LB ištirpinami 1000 mL dejonizuoto H<sub>2</sub>O.

SOB terpė: 26,64 g SOB ištirpinami 1000 mL dejonizuoto H<sub>2</sub>O.

Agarizuota 1,5 % LB terpė: 25 g LB ištirpinami 1000 mL dejonizuoto H<sub>2</sub>O, įberiama 1,5 % agaro.

Paruoštos terpės sterilinamos 20 min 121 °C esant 1 atm.

### 2.1.7 Rinkiniai

GeneJET Gel Extraction Kit #K0692 (Thermo Fisher Scientific)

GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0722 (Thermo Fisher Scientific)

GeneJET Plasmid Miniprep Kit #K0503 (Thermo Fisher Scientific)

CloneJET PCR Cloning Kit #K1232 (Thermo Fisher Scientific)

Su visais rinkiniais naudotasi pateiktomis instrukcijomis.

### 2.1.8 Pradmenys

**2.2 lentelė.** Darbe naudotų pradmenų sekos. Komplementari pradmens dalis paryškinta. Restriktazių taikiniai pabraukti.

<b>Pradmenų pavadinimai</b>	<b>Pradmenų sekos</b>
ARB2 (#744)	5'-GGCACGCGTCGACTAGTAC-3'
ARB6 (#745)	5'-GGCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNACGCC-3'
ME-I-extR (#746)	5'-CTCGTTTCACGCTGAATATGGCTC-3'
ME-I-intR (#747)	5'-CAGTTTTATTGTTTCATGATGATATA-3'
ME-O-extF (#748)	5'-CGGTTTACAAGCATAACTAGTGCGGC-3'
ME-O-intF (#749)	5'-AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCG-3'

ExbB Eco81I rev (#778)	5'-AAAC <u>CTGAGGT</u> CAACCTACCCGTAATTTCTGCG-3'
ExbB Eco88I fwd (#779)	5'-AAACTCGGGTTGATGAACCTGTTTTTATACGTCT-3'
ExbD Eco81I rev (#889)	5'-AAAC <u>CTGAGGT</u> TATTTGGCTTTGACGGTCTC-3'
FhuA Eco81I fwd (#780)	5'-AAAC <u>CTCAGGT</u> TTAAGCCCTAAGACCAGACCC-3'
FhuA Eco81I rev (#781)	5'-AAAC <u>CTGAGGT</u> TAGAAACGGAAGGTGGCGGTG-3'
OmpC Eco81I rev (#782)	5'-AAAC <u>CTGAGGT</u> TAGAACTGGTAAACCAGGCC-3'
OmpC Eco88I fwd (#783)	5'-AAACTCGGGCTTGTGGCTGAACGACTCATCA-3'
TonB BseSI rev (#784)	5'-AAAGTGCCCTCAGTTAATCTCGACGCCGTTG-3'
TonB PsyI fwd (#785)	5'-AAAGACCGGGTCGGCAAAGCTCCTTATCAATAAACA-3'
FimB Eco88I fwd (#866)	5'-AAACTCGGGGCTCCCGTAGCAAATAAAAACG-3'
FimB Eco81I rev (#866)	5'-AAAC <u>CTGAGGT</u> TACTGAAGCAGCGACAGGCG-3'

### 2.1.9 DNR elektroforezės tirpalai

TAE buferis: 40 mM Tris, 20 mM acto rūgštis, 1 mM EDTA, pH 8,5.

Agarozė: 0,8 % agarozė TAE tirpale.

### 2.1.10 NDS-PAGE elektroforezės tirpalai

10x buferis Tris-Glicino-NDS-PAGE: 30,3 g/L Tris, 144 g/L glicino, 10 g/L NDS.

Laemmli buferis (baltymų dažas): 240 mM Tris-HCl (pH 6,8), 6 % NDS, 30 % glicerolio, 0,06 % bromfenolio mėlynojo, 300 mM DTT. Laikomas -20 °C temperatūroje.

Coomassie dažo tirpalas: 50% etanolio, 0,25% Coomassie brilliantinio mėlio dažo (Coomassie Brilliant Blue R-250), 10% acto rūgštis. Laikomas kambario temperatūroje.

Gelių blukinimo tirpalas: 5 % acto rūgštis. Laikomas kambario temperatūroje.

Koncentruojamojo gelio tirpalas: 40 % akrilamido/bisakrilamido mišinio, 0,5 M Tris (pH 6,8), 10 % NDS, TEMED, 10 % APS. Naudojamas šviežias.

Skiriamąjo gelio tirpalas: 40 % akrilamido/bisakrilamido mišinio, 1,5 M Tris (pH 8,8), 10 % NDS, TEMED, 10 % APS. Naudojamas šviežias.

### 2.1.11 Baltymų gryninimo buferiniai tirpalai

Baltymų išskyrimo iš augalų lapų (ekstrakcijos) buferis: 50 mM natrio fosfatas, pH 5,0.

Kalibravimo/praplovimo buferis: 50 mM natrio fosfatas, 0,95 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 6,0.

Eliucijos buferis: 50 mM natrio fosfatas, pH 6,0.

### **2.1.12 Kiti buferiniai tirpalai**

TB buferis: 10 mM Pipes, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl ir naudojant KOH pH nustatoma iki 6,7. Tuomet pridedama 55 mM MnCl<sub>2</sub> ir steriliai filtruojama.

### **2.1.13 Molekulinės masės standartai**

DNR fragmentų agarozės gelyje standartai: GeneRuler Express DNA Ladder #SM1553 (Thermo Fisher Scientific) ir GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder #SM1331 (Thermo Fisher Scientific).

Baltymų poliakrilamido gelyje standartas: PageRule Prestained Protein Ladder #26616 (Thermo Fisher Scientific)

### **2.1.14 Fermentai**

FastAP šarminė fosfatazė (Thermosensitive Alkaline Phosphatase; Thermo Fisher Scientific)

Phusion High-Fidelity DNA polimerazė (Thermo Fisher Scientific)

*Taq* DNR polimerazė (Thermo Fisher Scientific)

T4 DNR ligazė (Thermo Fisher Scientific)

## **2.2 Metodai**

### **2.2.1 Polimerazės grandininė reakcija transpozonų lokalizacijai**

Polimerazės grandininė reakcija (PGR) buvo taikoma lokalizuoti transpozonus, po biparentalinės konjugacijos įsiterpusius į genominę *K. quasipneumoniae* bakterijų DNR. PGR buvo atliekama dviem etapais, naudojant specifinius pradmenis (žr. 2.2 lentelę) ir Thermo Fisher Scientific buferinius tirpalus, dNTP mišinį ir *Taq* DNR polimerazę. Genominė DNR nebuvo gryninama, tiesiog naudojamos šviežios bakterijų kolonijos. Antro etapo metu buvo imami 2 µL pirmo etapo metu gauto produkto. PGR salygos pateiktos 2.3 lentelėje.

### **2.2.2 Polimerazės grandininė reakcija genų padauginimui**

Polimerazės grandininė reakcija (PGR) buvo taikoma padauginti genus komplementacijos tyrimui. Tiriama genai ir sritys, kuriose numanoma jog yra jų promotoriai, buvo padauginti naudojant *K. quasipneumoniae* bakterijų genominę DNR, išgrynintą naudojant GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0722 (Thermo Scientific) laikantis gamintojo rekomendacijų. PGR buvo atliekama naudojant specifinius pradmenis (žr. 2.2 lentelę) ir Thermo Fisher Scientific buferinius

tirpalus, dNTP mišinį, DNR polimerazę Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. PGR sąlygos pateiktos 2.3 lentelėje.

**2.3 lentelė.** PGR naudotos pradmenų poros, jų panaudojimo tikslas ir PGR sąlygos.

Panaudojimas	Pradmenų poros	PGR sąlygos			
		DNR denatūracijos temp.	Pradmenų prilydimo temp.	DNR grandinės ilginimo temp.	Ciklų skaičius
Transpozonų lokalizacijos I PGR etapas (I var.)	ARB6 – ME-I-extR	95 °C	30 °C	72 °C	36
Transpozonų lokalizacijos II PGR etapas (I var.)	ARB2 – ME-I-intR	95 °C	30 °C	72 °C	36
Transpozonų lokalizacijos I PGR etapas (II var.)	ARB6 – ME-O-extF	95 °C	30 °C	72 °C	36
Transpozonų lokalizacijos II PGR etapas (II var.)	ARB2 – ME-O-intF	95 °C	30 °C	72 °C	36
ExbB geno padauginimui	ExbB Eco88I fwd – ExbB Eco81I rev	98 °C	56,9 °C	72 °C	30
FhuA geno padauginimui	FhuA Eco81I fwd – FhuA Eco81I rev	98 °C	59,7 °C	72 °C	30
OmpC geno padauginimui	OmpC Eco88I fwd – OmpC Eco81I rev	98 °C	60,2 °C	72 °C	30
TonB geno padauginimui	TonB PsyI fwd – TonB BseSI rev	98 °C	57,7 °C	72 °C	30
FimB geno padauginimui	FimB Eco88I fwd – FimB Eco81I rev	98 °C	58,2 °C	72 °C	30
ExbB-ExbD genų srities padauginimui	ExbB Eco88I fwd – ExbD Eco81I rev	98 °C	56,6 °C	72 °C	30

### 2.2.3 PGR produktų gryninimas iš agarozės gelio

PGR metu gauti fragmentai buvo išgryninti, leidžiant elektroforezę 1,2 % agarozės gelyje ir išskiriant iš jo reikiamą DNR fragmentą, naudojantis rinkiniu GeneJET Gel Extraction Kit #K0692 (Thermo Scientific) laikantis gamintojo rekomendacijų.

### 2.2.4 Fragmento ligavimas su vektoriaus DNR

Eppendorf mėgintuvėlyje paruošiamas 20 µl tirpalas dejonizuotame vandenyje: sumaišoma linearizuota vektoriaus DNR (20-100 ng) ir fragmento (padauginto geno) DNR (fragmento ir vektoriaus galų molinis santykis 3:1), 2 µl 10x reakcijos buferio, 1 U T4 DNR ligazės ir vandens, kad galutinis reakcijos mišinio tūris būtų 20 µl. Jei reikia, prieš ligavimą vektorius defosforilnamas

naudojant FastAP fosfatazę (Thermo Fisher Scientific), pagal gamintojo rekomendacijas. Gerai sumaišoma ir inkubuojama 1 valandą kambario temperatūroje. T4 DNR ligazė išaktyvinama reakcijos mišinį pakaitinant 5 min 75 °C temperatūroje.

### **2.2.5 Kompetentinių *E. coli* bakterijų ruošimas**

*E. coli* DH5α kamienas buvo užsėjamas į 4 mL LB terpės ir bakterijos auginamos 17-18 val. purtyklėje 37 °C temperatūroje, purtant 200 aps./min greičiu. Pamatuojamas užaugusių bakterijų optinis tankis (bangos ilgis 595 nm). Naktinė kultūra inokuliuojama į 200 mL SOB terpės dviejų litrų kolboje, prieš inokuliaciją į terpę įdedant 1 M MgSO<sub>4</sub> (galutinė koncentracija 20 mM). Po inokuliacijos optinis tankis turėtų būti ~0,1 optinių vienetų. Bakterijos auginamos purtyklėje 30 °C temperatūroje 200 aps./min greičiu, kol optinis tankis pasiekia 0,6. Užaugusios bakterijos buvo paliekamos ledo vonelėje 10 min (visos tolimesnės procedūros atliekamos bakterijas laikant ant ledo). Kultūra padalinama į graduotus kūginius mėgintuvėlius (50 mL) ir bakterijos surenkamos centrifuguojant 10 min 4 °C temperatūroje 3220 x g greičiu (Eppendorf 5810R centrifuga). Supernatantas pašalinamas, bakterijos resuspenduojamos 2 mL šalto TB buferio. Gautas tirpalas supilamas į vieną kūginį mėgintuvėlį. Įpilama tiek TB buferio, kad bendras tūris būtų 30 mL. Palaikoma 10 min ledo vonelėje ir vėl nucentrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Resuspendavus ląsteles 2 mL TB buferio, įpilama TB buferio iki 5 mL. Įpilama DMSO (galutinė koncentracija 7 %) ir inkubuojama ant ledo 10 min. Bakterijos supilstomos į sterilius 1,5 mL mėgintuvėlius ir užšaldomos skystame azote. Paruoštos kompetentinės bakterijos laikomos -70 °C temperatūroje.

### **2.2.6 Kompetentinių *E. coli* bakterijų transformacija**

Paruošti vektoriai bei sukonstruotos plazmidės buvo transformuojamos į *E. coli* DH5α padermės kompetentines ląsteles karščio šoko metodu. Transformacijos mišinys: 150 µL šaldytų kompetentinių ląstelių ir 100 ng DNR. Inkubuojama 15 min ledo vonioje. Mėgintuvėlis perkeliamas į 42 °C vandens vonią, palaikomas 90 s, po to ląstelės atšaldomos lede. Tada įpilama 1 ml LB terpės ir inkubuojama 1 val. 37 °C purtyklėje. Ląstelės išsodinamos centrifuguojant 5 min 2500 x g greičiu (Eppendorf 5424 centrifuga). Nupilamas gautas supernatantas. Tada ląstelės suspenduojamos likusiame laše ir sėjamos ant LB terpės su reikiamu antibiotiku (pJET1.2 transformantai – su 100 µg/mL ampicilino, o pACYC184 – su 15 µg/mL tetraciklino). Lėkštelės inkubuojamos 37 °C temperatūroje 17-18 val.

### **2.2.7 Kompetentinių *K. quasipneumoniae* bakterijų ruošimas**

*K. quasipneumoniae* DSM 28212 kamienas buvo užsėjamas į 4 mL LB terpės ir bakterijos auginamos 17-18 val. purtyklėje 37 °C temperatūroje, purtant 200 aps./min greičiu. 500 µl naktinės kultūros inokuliuojama į 4,5 mL LB terpės ir inkubuojama 2 val. purtyklėje tomis pačiomis sąlygomis. Po to ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant 5 min 3220 x g greičiu (Eppendorf 5810R centrifuga), supernatantas nupilamas, o ląstelės resuspenduojamos 400 µl 50 mM CaCl<sub>2</sub>. Taip paruoštos *K. quasipneumoniae* iškart naudojamos transformacijai užšaldymo-atšildymo metodu.

### **2.2.8 *K. quasipneumoniae* transformacija užšaldymo-atšildymo metodu**

400 µl šviežiai paruoštų kompetentinių *K. quasipneumoniae* DSM 28212 padalinama į du Eppendorf mėgintuvėlius po 200 µl, į vieną įdedama plazmidinė DNR ir abu mėgintuvėliai užšaldomi skystame azote. Ląstelės atšildomos 32 °C temperatūroje ir vėl užšaldomos skystame azote. Ciklas pakartojamas dar kartą, tuomet ląstelės perkeliamos į mėgintuvėlius su 5 mL LB terpės ir inkubuojamos purtyklėje 37 °C temperatūroje, purtant 200 aps./min greičiu, 2-3 val. (kol bakterijos matomai auga). Užaugusios ląstelės išsodinamos centrifuguojant 11 min 3220 x g greičiu (Eppendorf 5810R centrifuga) ir resuspenduojamos 200 µl LB terpės. Daromi 1:10 skiedimai iki galutinio 10<sup>-2</sup> praskiedimo. Po 100 µl kiekvieno skiedimo suspensijos išsėjama ant selektyvios LB terpės su 15 µg/mL tetraciklino. Lėkštelės inkubuojamos 37 °C temperatūroje 17-18 val. (Merrick et al., 1987).

### **2.2.9 *K. quasipneumoniae* kamienų užšaldymas**

Bakterijų kamienas buvo inkubuojamas per naktį 4 mL LB terpės su 50 µg/mL kanamicino ir 30 µg/mL chloramfenikolio, purtyklėje 37 °C temperatūroje, purtant 200 aps./min greičiu. 750 µL užaugusios naktinės kultūros sumaišoma su 750 µL LB terpės, kurioje yra 30 % glicerolio. Užšaldoma skystame azote ir laikoma -70 °C temperatūroje.

### **2.2.10 Biparentalinė konjugacija**

Donorinės *E. coli* S17-1 (λ pir) padermės bakterijos, turinčios pBAM1 plazmidę (Martínez-García et al., 2011), ir recipientinės *K. quasipneumoniae* DSM 28212 bakterijos 17-18 val. buvo auginamos 4 mL LB terpės 37 °C temperatūroje purtant 200 aps./min greičiu. Į terpę su *E. coli* S17-1 (λ pir) bakterijomis buvo pridėdama 150 µg/mL ampicilino ir 50 µg/mL kanamicino. *K.*



*quasipneumoniae* buvo auginamos be antibiotikų. Po to, po 15-25 µL donorinių ir recipientinių naktinių kultūrų (~10<sup>8</sup> KFV) buvo perkeliama į 5 mL 10 mM MgSO<sub>4</sub>, trumpai suvorteksuojama, perpilama į 5 mL švirkštą ir filtruojama per sterilų Millipore 13 mm 0,45 µM filtrą (Merck), įdėta į daugkartinio naudojimo filtrų laikiklį. Tokiu pat būdu buvo paruošiamos ir neigiamos kontrolės, į mišinį nededant donoro arba recipiento kultūros. Po filtravimo filtro laikiklis atidaromas, steriliu pincetu atsargiai išimama membrana ir perkeliama ant agarizuotos LB terpės membranos puse su laštelėmis viršuje. Lėkštelės inkubuojamos 37 °C temperatūros termostate 18 val.

### **2.2.11 Ekskonjugantų atranka**

Po biparentalinės konjugacijos mišinio filtravimo ir inkubacijos (žr. 2.2.13) membranos su laštelėmis buvo perkeliamos į 5 mL 10 mM MgSO<sub>4</sub> ir suvorteksuojama laštelėms suspenduoti. Gautas konjugantų mišinys buvo sukonzentruojamas centrifuguojant 11 min 3220 x g greičiu (Eppendorf 5810R centrifuga) ir resuspenduojant lašteles 150 µL 10 mM MgSO<sub>4</sub>. Tuomet, po 50 µL mišinio išsėjama ant selektyvios agarizuotos LB terpės su 50 µg/mL kanamicino ir 30 µg/mL chloramfenikolio. Kiekvienam klebicinui tirti buvo ruošiamos 2-3 lėkštelės. Ant lėkštelių buvo lašinama skirtingos koncentracijos klebicinai ir inkubuojama 37 °C temperatūros termostate 17-18 val. Ant selektyvios terpės išsėti ekskonjugantai auga kaip gazonas, o klebicinai gazone sudaro inhibicijos zonas. Inhibicijos zonose užaugusios pavienės ekskonjugantų kolonijos buvo atrenkamos tolimesniems tyrimams.

### **2.2.12 Atrinktų ekskonjugantų pakartotinis jautrumo klebicinams tikrinimas**

Po ekskonjugantų atrankos (žr. 2.2.14) lizės zonose galinčios augti kolonijos, atsparios tam tikram klebicinui, buvo inokuliuojamos į 4 mL LB su 50 µg/mL kanamicino ir 30 µg/mL chloramfenikolio ir auginamos 17-18 val. 37 °C temperatūroje purtant 200 aps./min greičiu. Po to, 20 µl naktinių kultūrų buvo išsėjama ant agarizuotos LB terpės su 50 µg/mL kanamicino ir 30 µg/mL chloramfenikolio ir lašinami išgryninti klebicinai, ištirpinti 200-400 µL dH<sub>2</sub>O. Skirtingos koncentracijos klebicinai buvo lašinami ant Petri lėkštelių su tiriamo *K. quasipneumoniae* ekskonjuganto gazonu. Lėkštelės inkubuojamos 37 °C temperatūros termostate 17-18 val. Klebicinams atsparūs ekskonjugantai, ant kurių gazono nebuvo matomos lizės zonos, buvo atrenkami tolimesniems tyrimams.

### **2.2.13 *N. benthamiana* vakuuminė agroinfiltracija**

Šaldytų (laikomų -70 °C temperatūroje) bakterijų *A. tumefaciens* GV310, transformuotų pICH29912 plazmide su įstatytu KpneIa genu, kultūra buvo užsėjama į 4 mL LB terpės su 50 µg/mL kanamicino ir 50 µg/mL rifampicino ir bakterijos auginamos 17-18 val. purtyklėje 37 °C temperatūroje, 200 aps./min greičiu. Naktinė kultūra (OT<sub>600</sub>=1,5) buvo skiedžiama 1000 kartų, sumaišant 2,7 mL kultūros su 4 L vandens (iš krano), ir dar pridedama 200 µL (0,005%) Silwet L-77. Vakuuminė agroinfiltracija buvo atliekama naudojant specialų vakuomo infiltracijos indą (DURAN Vakuom Desiccator). Į šį indą su agrobakterijų mišiniu buvo panardinami 5 savaičių *Nicotiana benthamiana* augalų lapai, apverčiant vazonėlį, kuriame buvo auginti atskiri augalai. Uždaromas dangtis ir įjungžiama vakuomo pompa, kol slėgis nukrenta iki -800 mbar. Tuomet, po truputį įleidžiant orą ir kylant slėgiui, mišinys kartu su agrobakterijomis įsigeria į augalo lapus. Augalai paliekami augti po fluorescencinėmis lempomis. Lapai surenkami praėjus 5 dienoms po infiltracijos ir užšaldomi naudojant skystą azotą. Laikomi -70 °C temperatūroje.

### **2.2.14 Baltymų išskyrimas iš augalų lapų**

Nedidelis kiekis užšaldyto lapo audinio (2-8 g) buvo sutrinamas skystame azote iki miltelių, naudojant atšaldytą grūstuvę. Milteliai kūginame mėgintuvėlyje (50 mL) sumaišomi su 4 °C temperatūros ekstrakcijos buferiu (santykiu 1 g žaliavos : 5 mL buferio) ir inkubuojama 15 min, kartais pavartant mėgintuvėlį. Po to centrifuguojama 20 min 3220 x g greičiu (Eppendorf 5810R), 4°C temperatūroje. Supernatantas filtruojamas naudojant pirma 5 µm porų dydžio švirkštinius filtrus (Chromafil Xtra PES-500/25), o po to 0,45 µm porų dydžio švirkštinius filtrus (Roth). Paruoštas baltymų ekstraktas naudojamas chromatografinėi analizei.

### **2.2.15 Hidrofobinės sąveikos chromatografija**

Kolonėlė (C 10/20 Column (GE Healthcare)) buvo užpildoma 11 mL nešiklio (Phenyl sepharose 6 Fast Flow (low sub) (GE Healthcare)) ir prijungiama prie ÄKTA start (GE Healthcare) skysčių chromatografijos sistemos. Nukalibruojama per kolonėlę leidžiant 10 tūrių buferinio tirpalo (kol nusistovi UV reikšmė) 2 mL/min greičiu. Į paruoštą baltymų mėginį (žr. 2.2.17) pridedama reikiamas kiekis amonio sulfato druskos ir mėginys užnešamas ant kolonėlės 2 mL/min greičiu. Tuomet kolonėlė plaunama buferiniu tirpalu trimis kolonėlės tūriais (kol pasiekia pradinę UV reikšmę). Baltymų atskyrimas nuo sorbento buvo vykdomas pakopiniu gradientu (angl. step gradient) mažinant joninę jėgą eliuacijos buferiu 2 mL/min greičiu. Surenkamos prabėgimo (angl. flow through)

ir baltymų frakcijos. Chromatografijos procesas stebimas bei chromatogramos analizuojamos naudojant kompiuterinę programą UNICORN start 1.0.

#### **2.2.16 Baltymų NDS-PAGE elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje ir jo dažymas**

Pirmiausia buvo paruošiami dviejų dalių poliakrilamidiniai geliai, sudaryti iš skiriamojo ir koncentruojamojo sluoksnių. Pirmia paruošiamas skiriamasis gelis ir supilamas tarp stiklinių plokštelių, iki viršaus paliekant apie 3 cm atstumą. Šiame laisvame tūryje pripilama vandens. Susipolimerizavus pirmajam geliui (apie 40 min), nupilamas vanduo, iki viršaus pripilama koncentruojamojo gelio tirpalo bei įstatomos šukutės. Susipolimerizavus antrajam geliui šukutės ištraukiamos. Į elektroforezės aparatą pripilamas atitinkamas kiekis Tris-Gly-NDS buferio. Paruošti baltymų mėginiai kartu su pasirinktu baltymų dydžio standartu yra suleidžiami į gelį. Elektroforezė atliekama esant 180 V įtampai. Po elektroforezės gelis dažomas Coomassie briliantinio mėlio dažu ir po to blukinamas 5 % acto rūgšties tirpale.

#### **2.2.17 Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu**

Liofilizuotų klebicinų (laikomų -20 °C temperatūroje), ištirpintų 200-400 µl dH<sub>2</sub>O, ir chromatografijos metu gautų baltymų frakcijų koncentracija buvo nustatoma pagal standartinę Bradfordo kreivę, nubraižytą naudojant skirtingų koncentracijų standartinių baltymų tirpalą. Buvo imamas 10 µl baltymo mėginys, pilamas į kiuvetę su 200 µl Bradfordo reagentu ir 800 µl H<sub>2</sub>O. Spektrofotometru matuojamas optinis tankis 595 nm bangos ilgyje. Koncentracija (µg/µl) paskaičiuojama pagal atitinkamą formulę, sudarytą Bradfordo reagentui, naudojantis kalibracine kreive.

### 3. REZULTATAI

#### 3.1 Klebicino KpneIa gryninimas

Siekiant nustatyti genus, svarbius klebicinų translokacijai į ląstelę, buvo naudojami septyni mūsų laboratorijoje klonuoti klebicinai (3.1 lentelė).

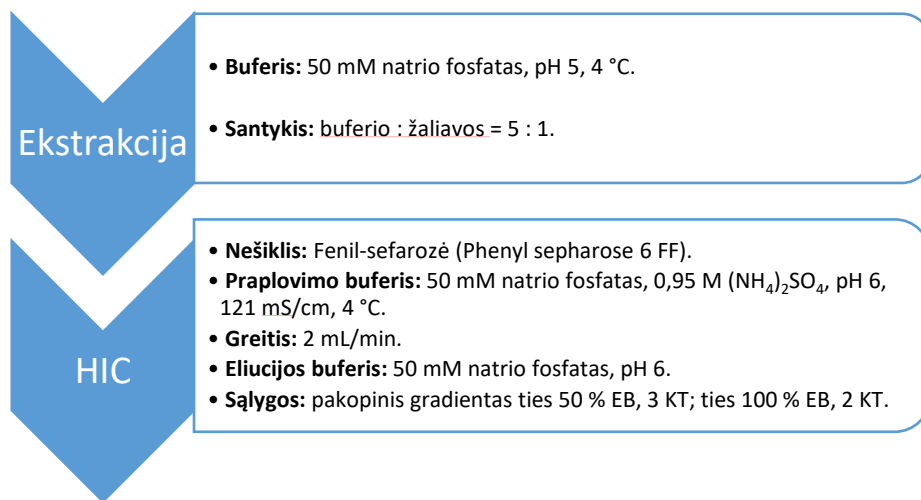
**3.1 lentelė.** Darbe naudoti klebicinai.

Pavadinimas	Funkcinis domenas	Veikimo principas
<b>KvarM</b>	Panašus į koliciną M	Stabdo mureino sintezę
<b>KpneM</b>	Panašus į koliciną M	Stabdo mureino sintezę
<b>KpneM2</b>	Panašus į koliciną M	Stabdo mureino sintezę
<b>KaerA</b>	Poras formuojantis	Sudaro poras vidinėje membranoje
<b>KvarIa</b>	Poras formuojantis	Sudaro poras vidinėje membranoje
<b>KpneA</b>	Poras formuojantis	Sudaro poras vidinėje membranoje
<b>KpneIa</b>	Poras formuojantis	Sudaro poras vidinėje membranoje

Visi klebicinai, išskyrus KpneIa, buvo išgryninti dr. A. Misiūno. KpneIa gryninimo metodika buvo sukurta šio darbo metu. Šis klebicinas yra beveik identiškas KvarIa, tik KpneIa turi papildomas 52 aminorūgštis centrinėje baltymo dalyje.

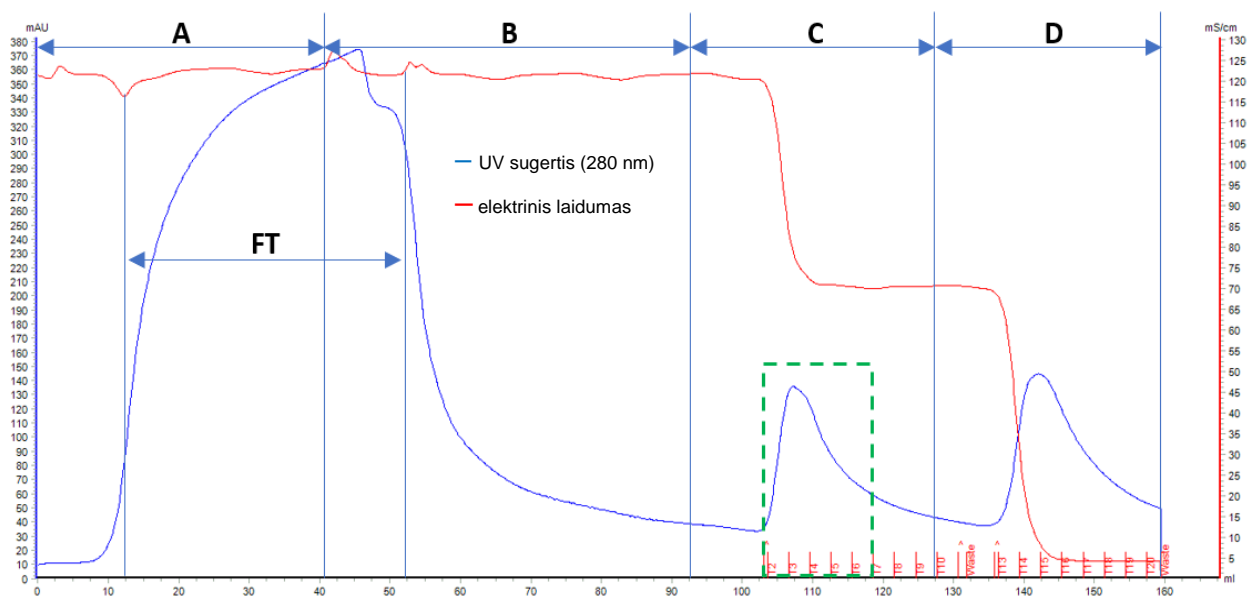
KpneIa, kaip ir kiti tirti klebicinai, buvo ekspresuotas augaluose, pasitelkiant laikinos raiškos sistemą. *A. tumefaciens* kamienas GV3101 (pNMDV953) su KpneIa raiškos kasete infiltruotas į *N. benthamiana* augalus vakuuminės agroinfiltracijos būdu. Po 5 dienų augalų lapai surenkami ir užšaldomi skystame azote. KpneIa buvo išskiriamas iš augalų lapų ir gryninamas hidrofobinės sąveikos chromatografijos (angl. hydrophobic interaction chromatography, HIC) būdu.

Pirmiausia buvo optimizuojamos chromatografijos sąlygos. Naudojant nedidelius žaliavos kiekius iširtos skirtingos hidrofobinei sąveikai naudojamo amonio sulfato koncentracijos (0,8 M, 0,9 M, 0,95 M, 1 M, 1,35 M) ir eliucijos buferio, naudojamo tiksliniam baltymui išeliuoti, kiekis (40 % ir 50 %). Kitos sąlygos bei naudojamas nešiklis parinkti atsižvelgiant į ankstesnius tyrimus. Galutinė gryninimo schema pateikta 3.1 pav.



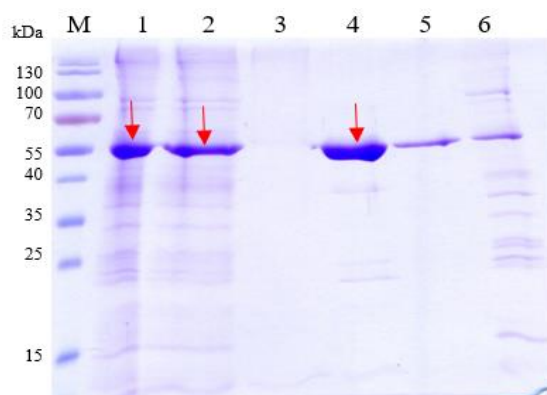
**3.1 pav. Baltymų išskyrimo iš augalų lapų ir chromatografijos sąlygų schema.** KT – kolonos tūriai, EB – eliucijos buferio.

Atlikus hidrofobinės sąveikos chromatografiją pagal 3.1 pav. pateiktas sąlygas, gauta chromatograma, parodyta 3.2 pav.



**3.2 pav. Kpnela gryninimo chromatograma.** A – baltymų mėginio užnešimas ant kolonėlės; B – kolonėlės praplovimas; C – pakopinė eliucija ties 50 % EB; D – pakopinė eliucija ties 100 % EB. FT (angl. flow through) – su sorbentu nesąveikavusios baltymų frakcijos. Kpnela frakcija pažymėta žalia punktyrine linija.

Po chromatografijos gautos FT (angl. flow through) ir eliucijos frakcijos analizuotos NDS-PAGE (3.3 pav.).

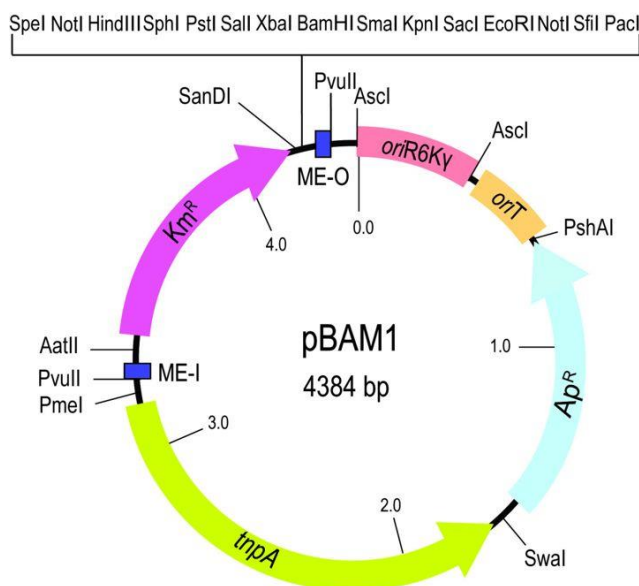


**3.3 pav. NDS-PAGE elektroforezės gelio nuotrauka.** Takeliuose: baltymų ekstraktas (1), ant chromatografijos kolonėlės užneštas baltymų tirpalas (2), FT frakcijos (3), KpneIa frakcijos (4) ir kitų surinktų frakcijų (5, 6) mėginiai. M, molekulinės masės standartas #26616 (Thermo Scientific).

Bradfordo metodu apskaičiuota išgryninto KpneIa baltymo koncentracija buvo 0,186  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (163  $\mu\text{g}$  baltymo/g šviežios žaliavos masės). Viso išgryninta 3,11 mg baltymo.

### 3.2 *K. quasipneumoniae* mutagenėzė ir mutantinių klonų atranka

Norint nustatyti genus, reikalingus klebicinų veikimui, transpozicinės mutagenėzės būdu buvo siekiama gauti tiriamiems klebicinams atsparius mutantus. Mutagenėzei buvo panaudotas mini-transpozoną Tn5 turintis vektorius pBAM1 (Martínez-García et al., 2011). Šis sintetinis vektorius turi efektyviai transpozicijai ir atrankai reikalingus elementus (3.4 pav.).

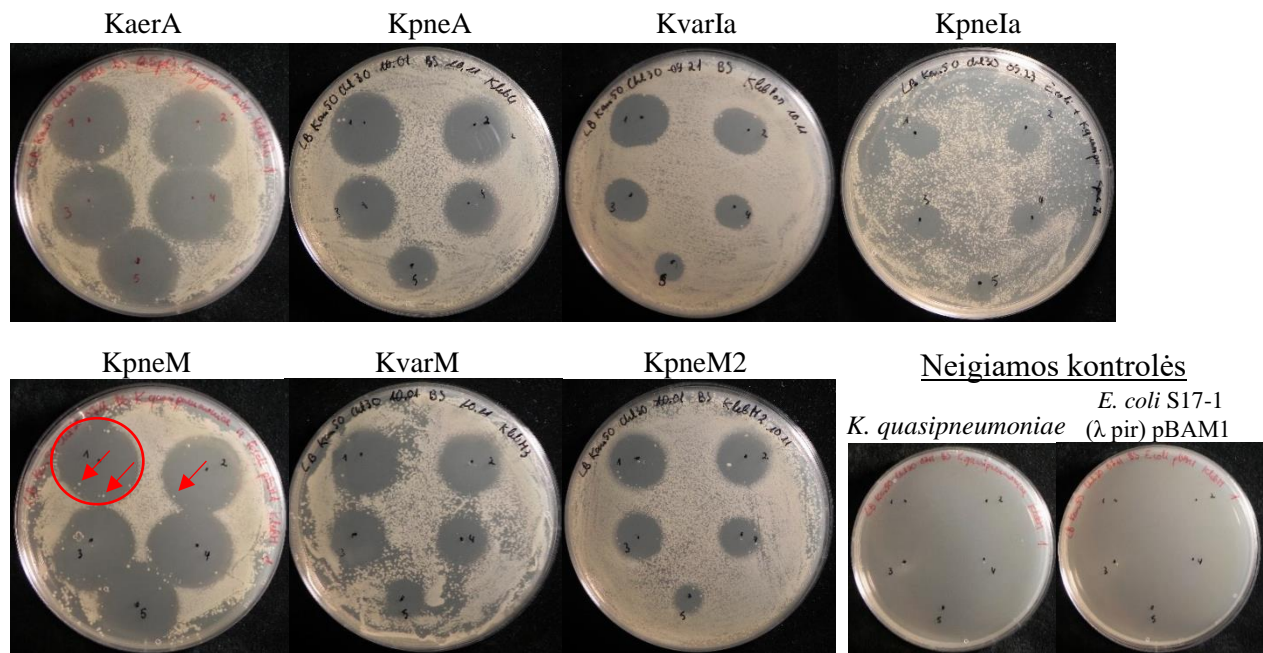


**3.4 pav. pBAM1 plazmidės schema (pagal Martínez-García et al., 2011).** Pavaizduotos restrikcijos vietos ir funkciniai plazmidės elementai: antibiotikų žymenys (Ap – ampicilinas, Km – kanamicinas), transpozazė (*tnpA*), replikacijos *ori* sritis (R6K), plazmidės pernešimo *ori* sritis (*oriT*) ir Tn5 transpozoną ribojančios galinės sekos ME-I ir ME-O.

Donorinės *E. coli* S17-1 ( $\lambda$  pir) bakterijos, turinčios pBAM1 plazmidę, biparentalinės konjugacijos būdu buvo kryžminamos su recipientinėmis *K. quasipneumoniae* DSM 28212 bakterijomis. Tokiu būdu Tn-5 transpozonas, kartu su galinėmis ME-I ir ME-O sekomis, įsistatė į atsitiktines recipientinių bakterijų genomo vietas. Mutantai, į kurių genomą sėkmingai įsistatė mini-Tn5, buvo atsparūs kanamicinui. Kad neaugtų donorinės *E. coli* S17-1 ( $\lambda$  pir) bakterijos, atrankai naudojamas ir chloramfenikolis, kuriam natūraliai atspari *K. quasipneumoniae* DSM 28212 padermė.

Tuomet buvo atrinkami klebacinams atsparūs ekskonjugantai. Atrankos metu ant transpozicinių mutantų gazono buvo lašinami septyni skirtingi klebacinai (3.1 lentelė).

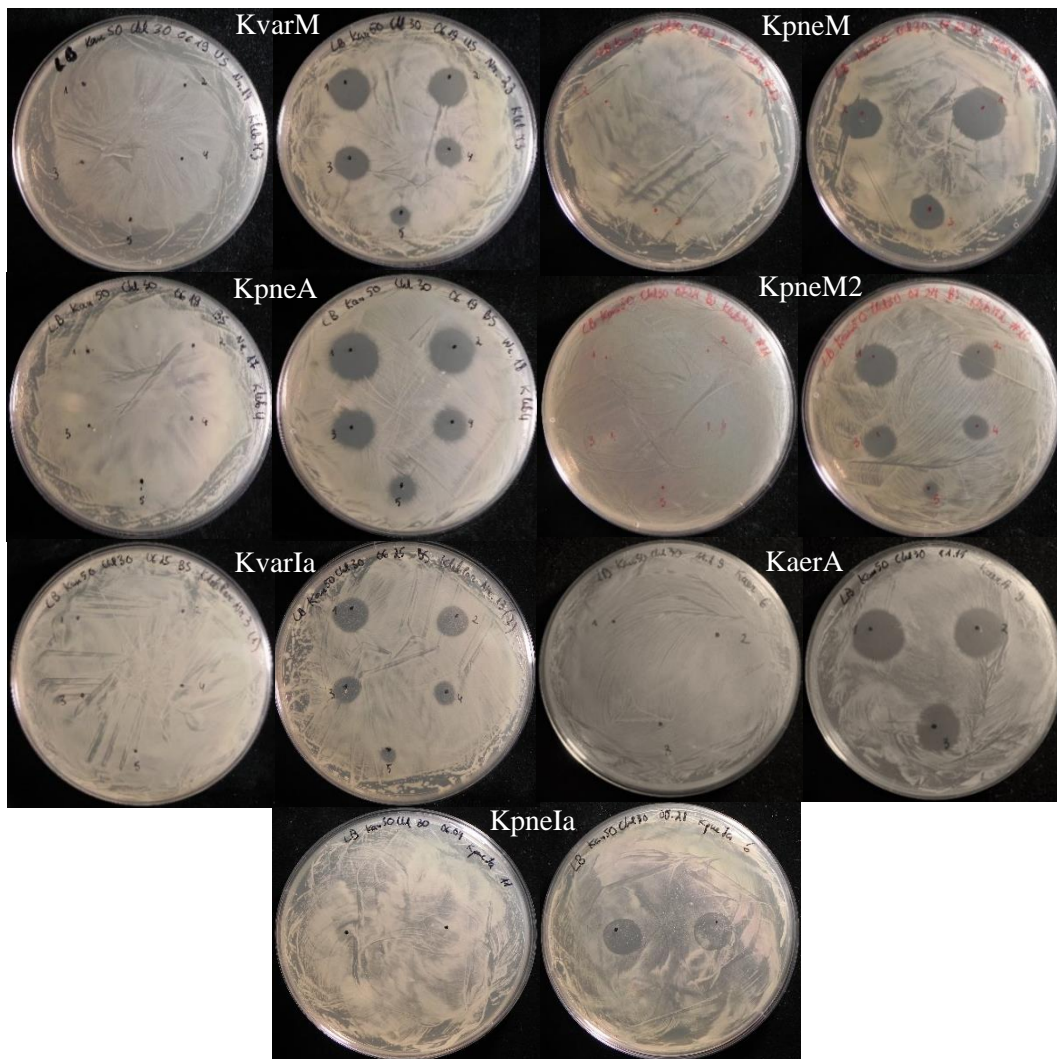
Kiekvienas klebacinas buvo lašinamas atskirai po 0,9-12,6  $\mu$ g baltymo ant 2-3 lėkštelių su ekskonjugantais. Neigiamai kontrolei ant selektyvios LB terpės su 50  $\mu$ g/mL kanamicino ir 30  $\mu$ g/mL chloramfenikolio buvo išsėjamos *E. coli* S17-1 ( $\lambda$  pir) ir *K. quasipneumoniae* DSM 28212 kultūros, kurios buvo auginamos tomis pačiomis sąlygomis, bet tarp kurių nebuvo vykdoma biparentalinė konjugacija (3.5 pav.).



**3.5 pav. Ekskonjugantų atrankos metu gautų lėkštelių nuotraukos.** Lašinta po 0,9-12,6  $\mu$ g išgrynintų klebacinų. Parodyta po vieną iš 2-3 kiekvieno klebacinio lėkštelių. Neigiamos kontrolės: neekskonjugantai neauga ant selektyvios terpės. Klebacinui KpneM atsparios kolonijos pažymėtos rodyklėmis lizės zonose.

Transpoziciniai mutantai, arba ekskonjugantai, kurie dėl transpozono insercijos įgijo atsparumą klebacinui, formavo pavienes kolonijas klebacinų lizės zonose.

Siekiant patvirtinti, kad atrinkti ekskonjugantai tikrai įgavo atsparumą klebacinams ir lizės zonose auga ne atsitiktinai, atrinktų klonų jautrumas kiekvienam klebacinui buvo tiriamas juos išsėjant ant selektyvios terpės ir dar kartą lašinant klebacinus. Buvo lašinama po 3-5 skirtingą kiekį (0,6-20,4 µg) baltymo turinčius lašus. Dalies skirtingiems klebacinams atsparių ekskonjugantų atsparumas buvo patvirtintas: 4 iš 13 KvarM klonų, 5 iš 17 KpneA klonų, 16 iš 26 KvarIa klonų, 19 iš 24 KpneM2 klonų, 22 iš 32 KpneM klonų, 11 iš 17 KaerA klonų, 4 iš 20 KpneIa klonų. Žemiau pateikta dalis gautų rezultatų (3.6 pav.). Mutantai, kurių lėkštelėse nebuvo matomos lizės zonos, buvo laikomi atspariais tirtam klebacinui.



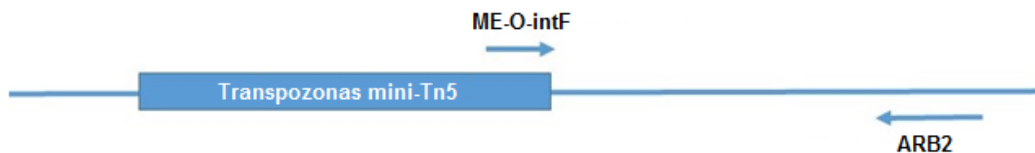
**3.6 pav. Jautrumo klebacinams tyrimo metu gautų lėkštelių pavyzdys.** Lašinta 0,6-20,4 µg išgrynintų klebacinų. Kairė lėkštelė: atsparūs klebacinams klonai (nėra lizės zonų). Dešinė lėkštelė: klebacinams jautrus *K. quasipneumoniae* DSM 28212 prieš mutagenę (matomos lizės zonos).



Gauti skirtingi kiekiai kiekvieno klebicino atsparumą turinčių ekskonjugantų klonų. Skirtingų klebicinų lizės zonose augo nevienodo dydžio kolonijos. Taip pat buvo atrenkamos ir kolonijos, augančios ties lizės zonos riba, kurios galėjo ir nebūti atsparios. Ypač sunkiai pavyko rasti KvarIa ir KpneIa klebicinams atsparius klonus. Klebicino KvarIa atveju, kai kurios iš lizės zonų atrinktos kolonijos jautrumo tyrimo metu taip pat turėjo lizės zonas, kuriose augo pavienės kolonijos. Šios kolonijos buvo vėl atrenkamos. Tokiu būdu tikrai atsparios KvarIa kolonijos buvo atrenkamos du kartus pakartojant jautrumo tyrimą. Iš viso atrinkta 81 iš 149 skirtingiems klebicinams atsparių ekskonjugantų.

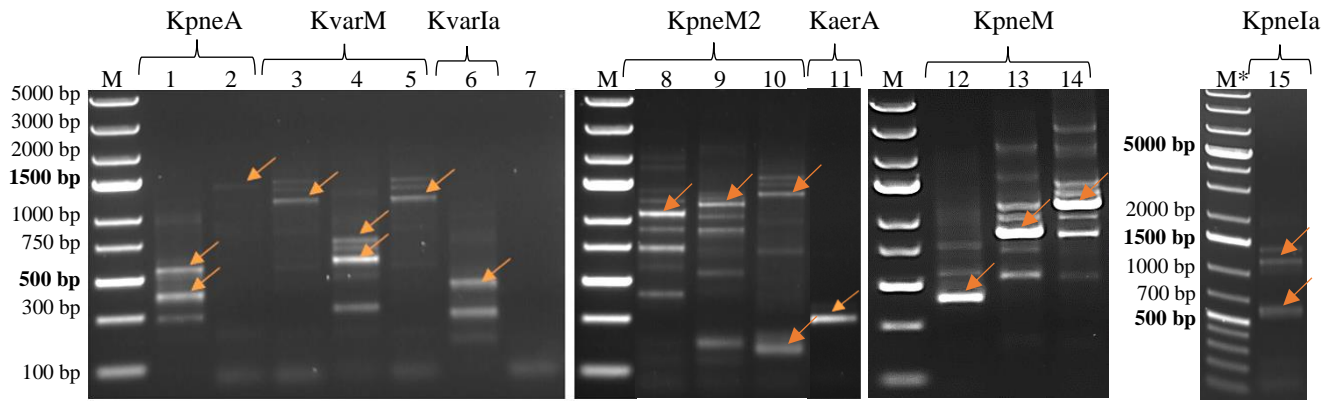
### 3.3 Transpozonų įsiterpimo vietos *K. quasipneumoniae* nustatymas ir mutuotų genų identifikavimas

Atrinktų klebicinams atsparių *K. quasipneumoniae* DSM 28212 mutantų genomuose įsiterpusių transpozonų vietos buvo nustatomos atliekant atsitiktinę (angl. arbitrary) PGR (Martínez-García et al., 2011). Jos metu naudojamos pradmenų poros, kuriose vienas iš pradmenų jungiasi prie atsitiktinės sekos genominiėje DNR (pradmenys ARB2 ir ARB6), o kitas yra komplementarus vienam iš galinių mini-Tn5 transpozono elementų (ME-I ir ME-O) (žr. 2.2 lentelę). Po dviejų PGR etapų gaunama seka, rodanti transpozono įsiterpimo vietą genome. Transpozonas įsiterpęs šalia sekos iš tos pusės kur jungėsi ME-O arba ME-I pradmuo (3.7 pav.).

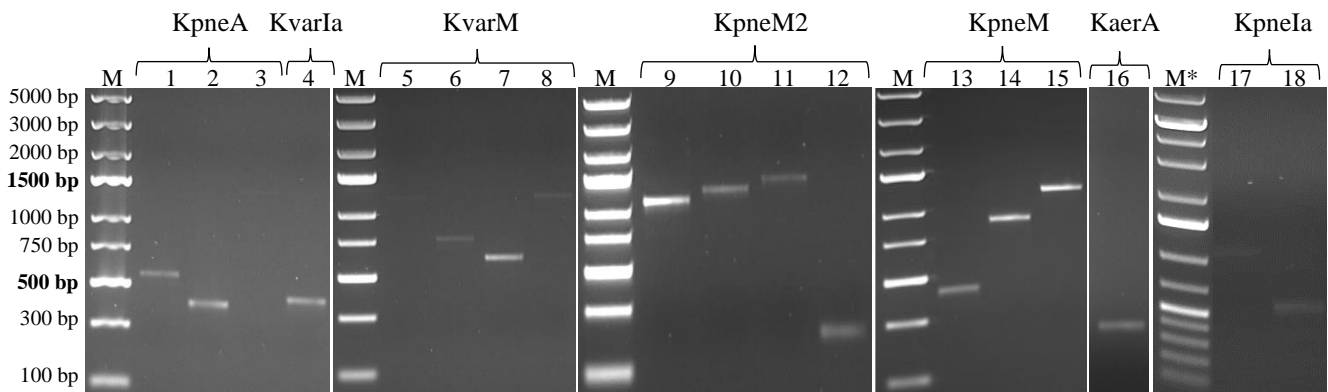


**3.7 pav. Atsitiktinės PGR schema.** Schematiškai pavaizduota bakterijų genominiės DNR dalis su įsiterpusiu mini-Tn5 transpozonu. Rodyklės žymi II PGR etapo pradmenų prilydimo vietas.

PGR metu gauti skirtingo ilgio DNR fragmentai. Dalis gautų rezultatų pateikta nuotraukose (3.8 pav.). Fragmentai buvo atskiriami nuo PGR mišinio komponentų leidžiant elektroforezę ir išpjaunant pasirinktus fragmentus iš gelio (3.9 pav.).



**3.8 pav. PGR produktų 0,8 % agarozės gelyje nuotraukos.** Takeliuose: klebicinui KpneA (1-2), KvarM (3-5), KvarIa (6), KpneM2 (8-10), KaerA (11), KpneM (12-14), KpneIa (15) atsparių klonų PGR produktai ir neigiama (7) kontrolė. Rodyklėmis nurodyti iš gelio išskirti fragmentai. M, molekulinės masės standartas #SM1553 (Thermo Scientific), M\*, molekulinės masės standartas #SM1331 (Thermo Scientific).

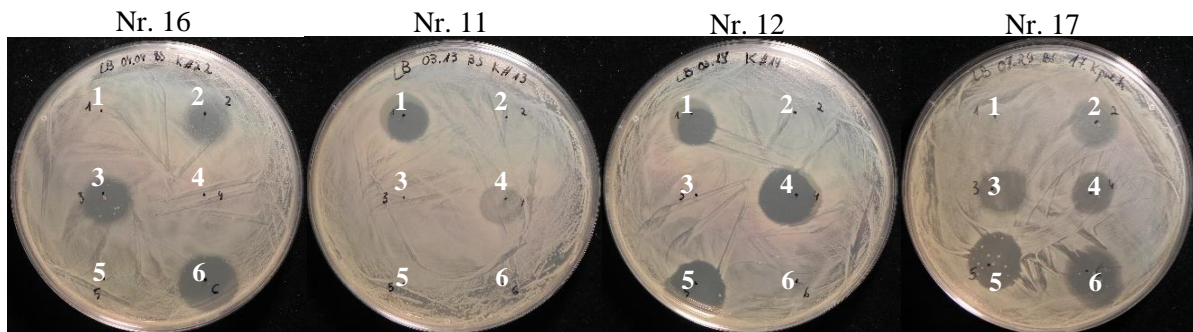


**3.9 pav. Iš gelio išskirtų PGR fragmentų 0,8 % agarozės gelyje nuotraukos.** Takeliuose: klebicinui KpneA (1-3), KvarIa (4), KvarM (5-8), KpneM2 (9-12), KpneM (13-15), KaerA (16), KpneIa (17-18) atsparių klonų išgryninti PGR fragmentai. M, molekulinės masės standartas #SM1553 (Thermo Scientific), M\*, molekulinės masės standartas #SM1331 (Thermo Scientific).

Toliau buvo nustatomos išskirtų fragmentų sekos. Iš viso nustatytos 29 fragmentų sekos, gautos iš septyniems skirtingiems klebicinams atsparių mutantų. Gautų PGR fragmentų sekos buvo lyginamos su *K. quasipneumoniae* DSM 28212 genomines DNR seka (naudojant Geneious R8 programą) ir nustatyti 6 genai, kuriuose įsiterpę transpozonai: *fhuA*, *exbB*, *tonB*, *ompC*, *fimB* ir *yaeT*.

### 3.4 Kryžminio mutantų atsparumo tyrimas

Ekskonjugantų atrankos metu buvo atrenkami mutantai pagal atsparumą vienam klebicinui. Buvo nuspręsta patikrinti ar klonai, kurių mutuoti genai buvo identifikuoti, atsparūs kuriam nors kitam klebicinui iš šešių tiriamų. Klebicasin KpneIa išgrynintas vėliau, todėl šio tyrimo metu nebuvo lašinamas. Mutantas Nr. 17, atrinktas pagal atsparumą KpneIa, dėl kryžminio atsparumo taip pat ištirtas vėliau nei kiti. Tyrimas buvo atliekamas tokiu pačiu principu kaip ankstesnis jautrumo klebicinams tyrimas, tačiau naudota terpė be antibiotikų. Mutantiniai klonai buvo išsėjami ant terpės ir ant užaugusių bakterijų gazono lašinami skirtingi klebicinai. Mutantas buvo laikomas atspariu tiems klebicinams, kurie neformavo lizės zonų ant bakterijų gazono. Dalis rezultatų pateikta paveikslėlyje (3.10 pav.).



**3.10 pav. Kryžminio mutantų atsparumo tyrimo metu gautų lėkštelių nuotraukos.** Pažymėti ant kiekvienos lėkštelės augančio mutantinio klon numeriai. Lašinta skirtingas kiekis išgrynintų klebicinų. 1 – KvarIa (10,8 µg), 2 – KpneM2 (7,8 µg), 3 – KvarM (1,4 µg), 4 – KpneA (2,5 µg), 5 – KaerA (1,9 µg), 6 – KpneM (5,7 µg).

Rezultatai, gauti ištyrus 17 iš 22 klonų kryžminį atsparumą klebicinams, pateikti 3.2 lentelėje.

### 3.2 lentelė. Atsparumo klebacinams tyrimo rezultatai.

Mutanto Nr.	Mutuotas genas	Atrinktas pagal atsparumą:	Taip pat atsparus:
1	<i>fhuA</i>	KpneM	KpneM2, KvarM,
2	<i>fhuA</i>	KpneM	KpneM2, KvarM
3	<i>fhuA</i>	KpneM	KpneM2, KvarM
4	<i>tonB</i>	KpneM	KpneM2, KvarM, KpneA, KaerA
5	<i>fhuA</i>	KpneM2	KvarM, KpneM
6	<i>exbB</i>	KaerA	KpneM2 (dalinai KvarM, KpneA, KpneM)
7	<i>ompC</i>	KaerA	KvarIa, KpneA
8	<i>exbB</i>	KpneA	KpneM2, KpneM, KvarM, KaerA
9	<i>ompC</i>	KpneA	KvarIa, KaerA
10	<i>fhuA</i>	KvarM	KpneM, KpneM2
11	<i>exbB</i>	KvarM	KpneM, KpneM2, KaerA (dalinai KpneA)
12	<i>fhuA</i>	KpneM2	KvarM, KpneM
13	<i>fhuA</i>	KpneM2	KvarM, KpneM
14	<i>fhuA</i>	KpneM2	KvarM, KpneM
15	<i>exbB</i>	KpneM2	KpneM, KvarM, KaerA (dalinai KpneA)
16	<i>fimB</i>	KvarIa	KpneA, KaerA
17	<i>yaeT</i>	KpneIa	KvarIa (dalinai KpneM2)

Tyrimo metu buvo nustatyta, kad visi tirti klonai atsparūs bent dviems klebacinams. Dauguma tirtų klonų buvo atsparūs trimis klebacinams – visiems kolicinų M tipo arba visiems poras formuojantiems klebacinams. Du klonai buvo atsparūs keturiems (KvarM, KpneM, KpneM2, KaerA), ir dar du – penkiems (KvarM, KpneM, KpneM2, KaerA, KpneA) klebacinams. Klonas, atrinktas pagal atsparumą KpneIa klebacinui, taip pat buvo atsparus klebacinui KvarIa, bet ne kitiems poras formuojantiems klebacinams.

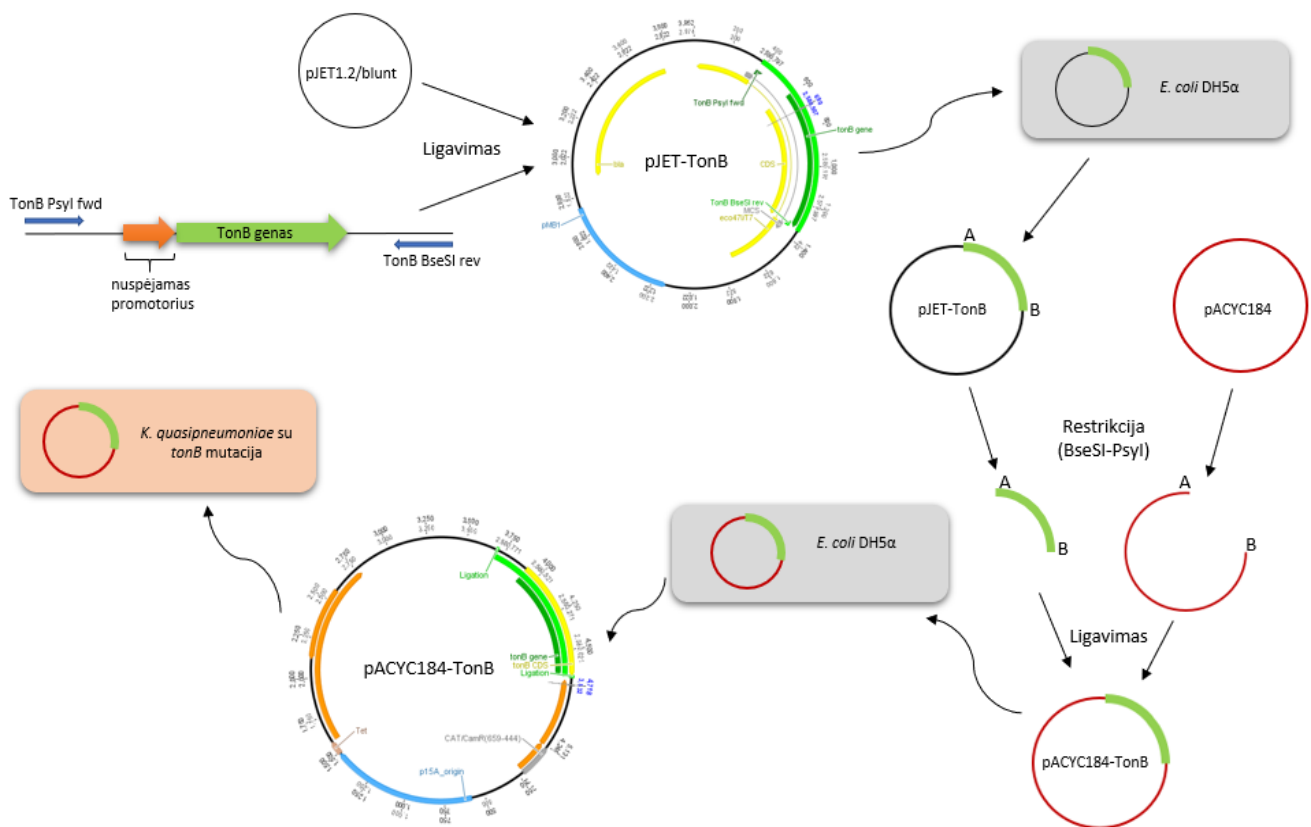
### 3.5 Mutantų patikrinimas genų komplementacijai

Siekiant patvirtinti, kad nustatyti genai tikrai reikalingi klebacinų patekimui į *K. quasipneumoniae*, buvo atlikta genų komplementacija. Jos metu genas, kuris yra išmutuotas tiriamame bakterijų klone, įterpiamas į vektorių ir juo transformuojamos atitinkamo mutanto

ląstelės. Tokiu būdu ląstelėje atstatomas išveiklinto geno baltymo kiekis ir mutantas turėtų atgauti jautrumą klebacinams, tuo patvirtinant ryšį tarp tiriamo geno ir klebacinų atsparumo bakterijose. Tam tikslui pirmiausia buvo parenkamas selekcijai tinkamas vektorius ir konstruojamos plazmidės su įterptais tiriamais genais. *K. quasipneumoniae* DSM 28212 bakterijos buvo transformuotos skirtingiems antibiotikams atsparumą turinčiomis plazmidėmis užšaldymo-atšildymo metodu ir parinktas vektorius pACYC184, tinkamiausias transformantų selekcijai.

pACYC184 plazmidė turi p15A replikacijos pradžios sritį, yra mažakopijinė, o chloramfenikoliui ir tetraciklinui atsparumą suteikiantys genai palengvina transformantų atranką. Darbo metu buvo naudojama selektyvi terpė su 15 µg/mL tetraciklino, ant kurios neauga *K. quasipneumoniae* DSM 28212 kamieno bakterijos.

Naudojant pACYC184 vektorių, toliau buvo konstruojamos plazmidės su tiriamais genais. Konstravimo eiga pateikta schemeje (3.11 pav.).



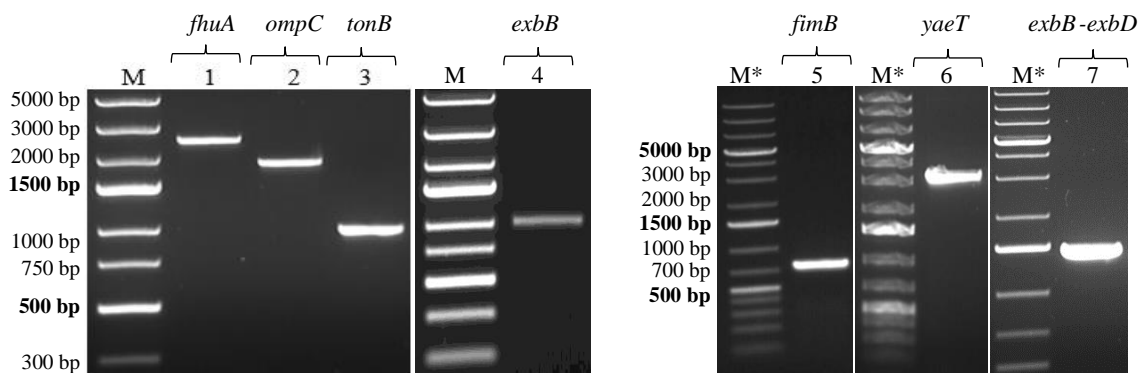
**3.11 pav. Plazmidžių konstravimo genų komplementacijai schema.** pACYC184-TonB plazmidės konstravimo pavyzdys. Žalia spalva pavaizduotas tiriamas genas, oranžine – sritis, kurioje manoma, jog yra geno promotorius, mėlyna – geno padauginimui naudoti pradmenys. Rodyklės rodo veiksmų eigą.

Pirma, PGR metodu padaugintos genų ir numanomos jų promotorių sritys (3.3 lentelė). Promotoriaus sritimis laikytos sekos, esančios nekoduojančioje dalyje tarp genų. Kaip matrica buvo naudojama iš *K. quasipneumoniae* DSM 28212 išskirta genomine DNR.

**3.3 lentelė.** PGR metu dauginami genai ir sričių, kuriose yra numanomi jų promotoriai, ilgis.

Dauginamas genas	Numanomo promotoriaus regiono ilgis
<i>exbB</i>	252 bp
<i>tonB</i>	211 bp
<i>fhuA</i>	196 bp
<i>fimB</i>	133 bp
<i>ompC</i>	621 bp
<i>yaeT</i>	635 bp

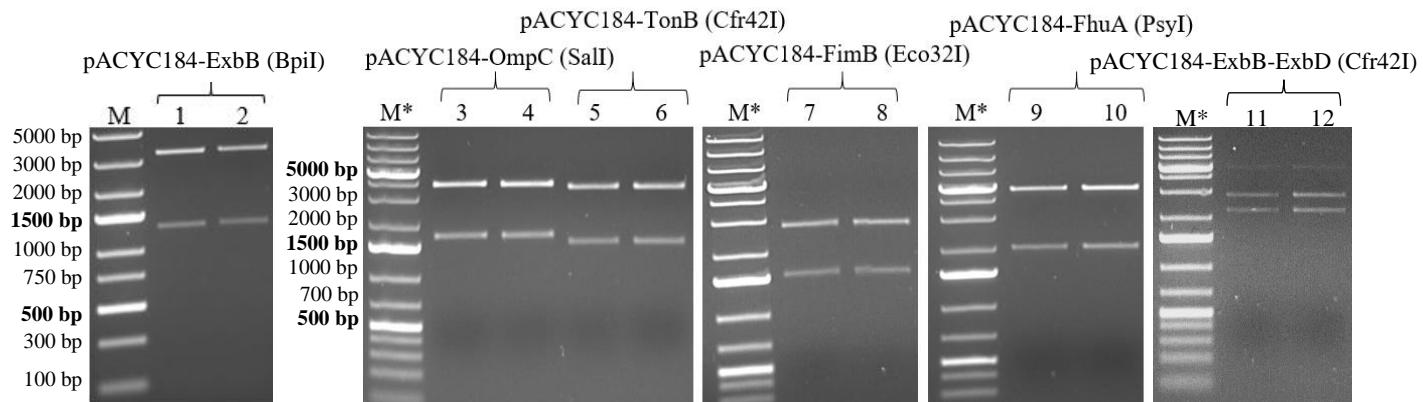
Naudoti pradmenys turintys tam tikrų endonukleazių atpažinimo sekas (2.2 lentelė). Gauti fragmentai pateikti nuotraukose (3.12 pav.).



**3.12 pav. PGR produktų 0,8 % agarozės gelyje nuotrauka.** Takeliuose: padaugintos genų *fhuA* (1), *ompC* (2), *tonB* (3), *exbB* (4), *fimB* (5), *yaeT* (6) ir *exbB-exbD* (7) sekos. M, molekulinės masės standartas #SM1553 (Thermo Scientific), M\*, molekulinės masės standartas #SM1331 (Thermo Scientific).

Padaugintas genas klonuojamas į pJET1.2/blunt vektorių naudojant CloneJET PCR Cloning Kit #K1232 (Thermo Scientific) laikantis gamintojo rekomendacijų, ir ligatas transformuojamas į kompetentines *E. coli* DH5 $\alpha$  kamieno bakterijas. Tuomet padauginta plazmidė išskiriama iš bakterijų naudojant GeneJET Plasmid Miniprep Kit #K0503 (Thermo Fisher Scientific) laikantis gamintojo rekomendacijų ir, kartu su pACYC184 plazmide, kerpama

atitinkamomis restriktazėmis. Iškirptas fragmentas su tiriamu genu liguojamas į pACYC184 plazmidę ir vėl transformuojamos *E. coli* DH5 $\alpha$  bakterijos. Galiausiai sukonstruota plazmidė išskiriama iš *E. coli* bakterijų ir patikrinama, atliekant restrikcijos produktų analizę agarozės gelyje (3.13 pav.).



**3.13 pav. Sukonstruotų plazmidžių restrikcijos analizės 0,8 % agarozės gelyje nuotrauka.** Takeliuose: plazmidžių pACYC184-ExbB (1-2), pACYC184-OmpC (3-4), pACYC184-TonB (5-6), pACYC184-FimB (7-8), pACYC184-FhuA (9-10), pACYC184-ExbB-ExbD (11-12) restrikcijos fragmentai. M, molekulinės masės standartas #SM1331 (Thermo Scientific), M\*, molekulinės masės standartas #SM1331 (Thermo Scientific).

Tokiu būdu buvo sukonstruotos plazmidės pACYC184-ExbB, pACYC184-OmpC, pACYC184-TonB, pACYC184-FimB ir pACYC184-FhuA, turinčios vieną iš penkių nustatytų klebacinų receptorių koduojančių genų bei plazmidė pACYC184-ExbB-ExbD, turinti du genus – *exbB* ir *exbD*. Šie genai *K. quasipneumoniae* genome yra vienas šalia kito, jie priklauso tam pačiam operonui ir traspozonų mutagenezės metu gali būti išveiklinami vienu metu. Plazmidės, turinčios *yaeT* geną, sukonstruoti nepavyko. Gautos plazmidės turi p15A replikacijos pradžios sritį, atsparumą tetraciklinui suteikiantį geną bei įterptą vieną iš penkių nustatytų receptorių genų su numanomomis jų promotorių sekomis. Tokios plazmidės tinkamos *K. quasipneumoniae* mutantų transformavimui, užtikrina plazmidės replikaciją ir įterptų genų transkripciją bei leidžia atlikti transformantų selekciją ant terpės su antibiotiku.

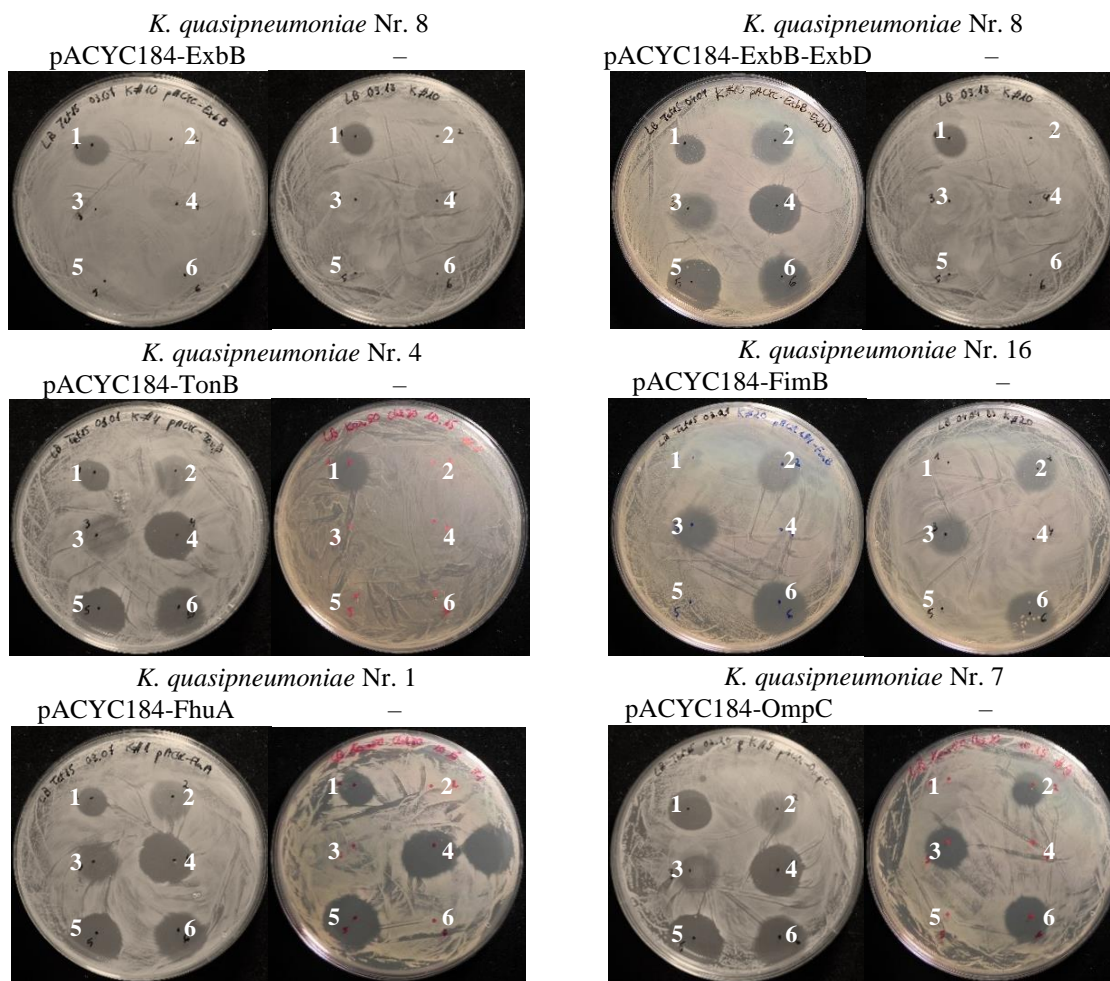
### 3.6 Genų komplementacija

Komplementacijai buvo pasirinkta po vieną iš mutantinių *K. quasipneumoniae* klonų su kiekvieno geno mutacija. Sukonstruotomis plazmidėmis užšaldymo-atšildymo metodu buvo transformuojami mutantai su atitinkamų genų mutacijomis (3.4 lentelė). Atrenkamos ant selektyvios terpės augančios transformantų kolonijos.

**3.4 lentelė.** Komplementacijai naudoti *K. quasipneumoniae* mutantai.

Mutanto Nr.	Mutuotas genas	Atsparumas klebicinams
8	<i>exbB</i>	KvarM, KpneM, KpneM2, KaerA, KpneA
4	<i>tonB</i>	KvarM, KpneM, KpneM2, KaerA, KpneA
1	<i>fhuA</i>	KvarM, KpneM, KpneM2
16	<i>fimB</i>	KaerA, KpneA, KvarIa
7	<i>ompC</i>	KaerA, KpneA, KvarIa

Siekiant patikrinti ar įvyko genų komplementacija, buvo atliekamas klebicinų jautrumo tyrimas, naudojant terpę su 15 µg/mL tetraciklino. Gauti transformantų klonai buvo išsėjami ant selektyvios terpės ir lašinami šeši klebicinai (3.14 pav.). Rezultatai lyginami su netransformuotų mutantinių klonų kryžminio atsparumo tyrimo rezultatais.



**3.14 pav.** Mutantų kryžminio atsparumo klebicinams tyrimo metu gautų lėkštelių nuotraukos. Tirtų mutantų numeriai pažymėti. Lašinta 0,7-14,1 µg išgrynintų klebicinų: 1 – KvarIa, 2 – KpneM2, 3 – KvarM, 4 – KpneA, 5 – KaerA, 6 – KpneM.



Geno komplementacija buvo laikoma įvykusia tuose mutantuose, kuriuose buvo atstatytas jautrumas klebicinams ir susiformavo lizės zonos. Sėkmingai genų komplementacija įvyko keturiuose iš penkių tirtų mutantų. Jautrumas klebicinams atsistatė *fhuA*, *ompC*, *tonB* ir *exbB* genų mutantuose. pACYC184-ExbB plazmide transformuotos bakterijos liko atsparios tiems patiems klebicinams kaip ir netransformuotas mutantas, tačiau, kaip ir buvo tikėtasi, pACYC184-ExbB-ExbD transformantuose jautrumas klebicinams buvo atstatytas.

## 4. REZULTATŲ APTARIMAS

### 4.1 Mutuotų genų nustatymas

Darbo metu buvo nustatyti 6 genai susiję su bakterijų atsparumu tirtiems klebacinams (3.2 lentelė). Daugiausia tirtų klonų turėjo mutuotą *fhuA* geną – 9 klonai. Visi šie klonai buvo atsparūs visiems trimis kolicino M-tipo klebacinams (KvarM, KpneM, KpneM2). Šis genas koduoja ferichromo poriną (angl. ferrichrome porin), kuris yra bakterijų išorinės membranos baltymas atsakingas už geležies pernašą į ląstelę (Hantke ir Braun, 1975). Porinas FhuA yra bakteriocinų kolicino M ir mikrocino J25 bei kai kurių bakteriofagų receptorių, o tiriant *E. coli* bakterijas nustatytos papildomos jo funkcijos transportuojant kai kuriuos antibiotikus (Carmel ir Coulton, 1991). Geležies importo sistemos receptoriai yra dažnai bakteriocinų „užgrobiami“ baltymai. *P. aeruginosa* piocinas S2 į ląstelę patenka imituodamas sideroforo feripioverdino (angl. ferripyoverdine) struktūrą ir taip „apgaudamas“ jo receptorių (White et al., 2017), o šių bakterijų jautrumas M-tipo piocinams priklauso nuo FiuA receptoriaus (Latino et al., 2019). FhuA baltymas, kaip ir kiti geležies transporto receptoriai, ląstelėje glaudžiai susijęs su TonB/ExbB/ExbD transporto kompleksu (Moeck et al., 1997). TonB geno mutacija šio darbo metu nustatyta viename iš klonų. Šis klonas buvo atsparus penkiems tirtiems klebacinams, išskyrus KvarIa ir KpneIa. Tiems patiems klebacinams atsparumą suteikė ir *exbB* geno mutacija, šio darbo metu nustatyta 6 klonuose. Kaip ir dauguma čia aptariamų genų, geriausiai aprašytas *E. coli exbB* genas, tačiau jo homologas *Klebsiella* ir kitose bakterijose atlieka labai panašias funkcijas. TonB/ExbB/ExbD transporto kompleksas dalyvauja įvairių junginių pernašoje, pavyzdžiui, sideroforų, hemo, vitamino B12, nikelio kompleksų bei karbohidratų. Jis taip pat susijęs su bakteriocinų, pavyzdžiui, kolicino M bei piocinų pernaša (Krewulak ir Vogel, 2011).

Geno *ompC* funkcijos taip pat susijusios su ląsteliniu transportu – jis koduoja išorinės membranos baltymą (angl. outer membrane protein, OMP) poriną. Klonai, kuriuose išmutuotas šis genas, buvo atsparūs visiems tirtiems poras formuojanti aktyvumą turintiems klebacinams (KaerA, KpneA, KvarIa). OMP porinai, tokie kaip OmpA arba OmpW, yra vieni iš dažniausiai naudojamų receptorių įvairių kolicinų pernašai (Kim et al., 2014).

Vienam klebacinui KvarIa atspariame klone nustatyta *fimB* mutacija. FimB yra fimbrijas reguliuojantis baltymas. Kol kas nėra žinoma, ar jis susijęs su bakteriocinų recepcija ir translokacija. Ištyrus klebacinui KpneIa atsparų kloną, nustatyta mutacija *yaeT* gene, kuris taip pat

žinomas kaip *bamA*. Jo koduojamas BamA baltymas įeina į BAM (angl.  $\beta$ -barrel assembly machinery) kompleksą, atsakingą už kitų  $\beta$ -statinės struktūrą turinčių baltymų taisyklingą sulankstymą ir įterpimą į išorinę bakterijų membraną (Kim et al., 2012; Werner ir Misra, 2005). Dauguma šių baltymų yra OMP baltymai. BamA taip pat dalyvauja, kuomet ląstelių paviršiuje CU (angl. chaperone-usher) mechanizmu surenkamos fimbrijos (Palomino et al., 2011). Kai kurie antimikrobiniai preparatai, pvz. nitazoksanidas (NTZ), veikia blokuodami bakterijų pilių susidarymą, o šis poveikis savo ruožtu moduluojamas BAM ekspresija (Psonis et al., 2019). Yra žinoma, kad pati BAM sistema gali būti naudojama bakteriocinų veikimui. Parodyta, kad į lektinus panašūs bakteriocinai (angl. lectin-like bacteriocins, LlpAs) pasitelkia BAM kompleksą *Pseudomonas* bakterijų žudymui (Ghequire et al., 2018). Pats žudymo mechanizmas dar nėra išaiškintas. Žinoma, kad LlpA bakteriocinai neturi citotoksinio domeno ir imuniteto baltymą koduojančio domeno, todėl tikėtina, kad žudymui nereikalinga bakteriocino translokacija į ląstelę.

#### 4.2 Genų komplementacija

Tam, kad būtų patvirtinta nustatytų genų reikšmė klebicinų veikimui prieš *K. quasipneumoniae* bakterijas, buvo nuspręsta atlikti genų komplementacijos tyrimą. Jo metu genai, kurie buvo išveiklinti mutantų klonuose dėl transpozonų įsiterpimo, yra klonuojami į vektorių ir transformuojami į bakterijas. Tokiu būdu mutuoti genai komplementuojami, ląstelėse vėl sintetinamas trūkstamas baltymas ir atkuriamos natyvios funkcijos. Dėl to mutantai turėtų tapti jautriais klebicinams, kuriems buvo atsparūs, kas įrodytų šių receptorių funkcijas klebicinų prisijungime ir transportavime per ląstelės membraną.

Darbo metu buvo sukonstruotos penkios plazmidės su įterptu vienu genu: pACYC184-ExbB, pACYC184-OmpC, pACYC184-TonB, pACYC184-FimB ir pACYC184-FhuA. Šios plazmidės turi p15A replikacijos pradžios sritį, atsparumą tetraciklinui suteikiantį geną bei įterptą vieną iš penkių nustatytų receptorių genų su numanomomis jų promotorių sekomis. Tokios plazmidės tinkamos *K. quasipneumoniae* mutantų transformavimui, užtikrina plazmidės replikaciją ir įterptų genų transkripciją bei leidžia atlikti transformantų selekciją ant terpės su antibiotiku. Papildomai buvo sukonstruota dar viena plazmidė pACYC184-ExbB-ExbD, turinti įterptus du genus – *exbB* ir *exbD*. Šie genai *K. quasipneumoniae* genome yra vienas šalia kito, todėl gali priklausyti vienam operonui ir transpozonų mutagenezės metu būti išveiklinami vienu metu. ExbB ir ExbD baltymų glaudus ryšys parodytas *E. coli* bakterijų genome (Ahmer et al., 1995).

Nustatyta, kad į *exbB* įsiterpus nukleotidams kinta *exbD* raiška. Be to, ExbB pašalinimas lemia ExbD, bei visos TonB sistemos, stabilumo sumažėjimą (Karlsson et al., 1993). Todėl buvo nuspręsta *exbB* mutantuose atlikti abiejų genų komplementaciją. Plazmidės su įterptu *yaeT* genu sukonstruoti nepavyko. Taip galėjo nutikti dėl mažo pACYC184 plazmidės kopijų skaičiaus arba dėl geno toksiškumo mutantų ląstelėse.

Genų komplementacijos tyrimas patvirtino keturių iš šešių nustatytų genų svarbą klebicinų importui į ląstelę - *fhuA*, *tonB*, *exbB* bei *ompC*. Taip pat nemažiau reikalingas aktyvus ExbD baltymas, kuris yra neatsiejama TonB pernašos sistemos dalis. Panašu, kad translokacijai šią sistemą naudoja visi M-tipo klebicinai bei KaerA ir KpneA klebicinai, kadangi jų jautrumas buvo atstatytas įvykdžius *fhuA*, *tonB*, *exbB* bei *exbD* genų komplementaciją (3.15 pav.). Kita vertus, KvarIa mutanto *fimB* geno komplementacija neatstatė jautrumo šiam klebicinui, kas rodo, kad šis genas tikriausiai nėra reikšmingas klebicino patekimui į ląstelę.

Gauti rezultatai rodo, kad skirtingų klebicinų atsparumą tirtose *K. quasipneumoniae* bakterijose dažniausiai įtakoja su įvairių junginių pernaša susiję genai ir jų koduojami baltymai. Tai leidžia daryti išvadą, kad klebicinų poveikis priklauso nuo šių sistemų veikimo. Šio darbo metu nustatyta, kad klebicinų pernašoje dalyvauja gerai žinomi kolicinų receptoriai ir translokatoriai – FhuA, TonB, ExbB bei ExbD baltymai. Rezultatai atskleidžia, kad M-tipo klebicinų receptoriai yra panašūs į kolicinų receptorių ir translokacijai per bakterijų membraną greičiausiai naudoja TonB pernašos sistemą. Tuo tarpu poras formuojančių klebicinų receptoriai skiriasi nuo kolicinų receptorių. Panašu, kad KaerA bei KpneA, kaip ir M-tipo klebicinai, pernašai pasitelkia TonB sistemą, tačiau jų veikimui svarbus funkcionalus baltymas OmpC. Panašu, kad šis porinas reikalingas ir KvarIa recepcijai. Kita vertus, kadangi *fimB* ir *yaeT* genų komplementacija nebuvo sėkminga, KvarIa ir KpneIa klebicinų translokacija lieka neišaiškinta. Iš turimų duomenų panašu, kad KpneIa baltymas savo veikimui gali pasitelkti visai kitokią BAM komplekso sistemą, tačiau tam patvirtinti reikalingi išsamesni tyrimai.

## IŠVADOS

1. Pasitelkus laikiną augalų raiškos sistemą, sėkmingai susintetintas ir chromatografijos būdu išgrynintas klebicas KpneIa.
2. Transpozonų mutagenezės metu atrinktas 81 *K. quasipneumoniae* DSM 28212 mutantinis klonas, atsparus bent vienam iš septynių tirtų klebicinų.
3. Atlikus PGR analizę nustatytos atsparių klonų mutacijos 6 genuose: *fhuA*, *exbB*, *ompC*, *fimB*, *tonB*, *yaeT*.
4. Genų komplementacijos metu patvirtinti penki klebicinų veikimui svarbūs translokatoriai arba receptoriai: FhuA, ExbB, ExbD, TonB ir OmpC.
5. Visi trys M-tipo klebicinai patekimo į ląstelę metu naudoja geležies receptorių FhuA, o poras formuojantiems klebicinams KaerA, KpneA, KvarIa svarbus funkcionalus OmpC.
6. KpneM, KpneM2, KvarM, KpneA ir KaerA, kaip ir B grupės kolicinai, patekimui į ląstelę naudoja TonB pernašos sistemą.

## Klebicinų receptorių ir translokatorių identifikavimas transpozonų mutagenezės būdu

### Santrauka

Oportunistinės gram-neigiamos *Klebsiella* bakterijos sukelia įvairias žmogaus kvėpavimo sistemos, šlapimo takų bei kraujotakos infekcijas. Vis dažniau pasitaikant daugybinį atsparumą antibiotikams turinčių padermių, reikalingi nauji kovos prieš šias bakterijas būdai. Viena iš aktyviai tiriamų sričių yra kolicinų tipo bakteriocinai – bakterijų ribosomose sintetinami bakteriostatiniai arba bakteriocidiniai baltymai. Laboratorijoje klonuoti *Klebsiella* bakteriocinų - klebicinų KpneM, KpneM2, KvarM, KaerA, KpneA, KvarIa ir KpneIa genai buvo ekspresuoti augalų laikinos raiškos sistemos pagalba, šeši iš šių baltymų išgryninti.

Šio darbo metu siekėme nustatyti genus, kurie koduoja klebicinų recepcijoje ir translokacijoje dalyvaujančius baltymus. Tuo tikslu transpozonų mutagenezės pagalba buvo mutagenizuotas *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* DSM 28212 kamienas, jautrus visiems septyniems klebicinams. Optimizavus sąlygas, hidrofobinės sąveikos chromatografijos metu, buvo išgrynintas klebicinas KpneIa. Visi septyni išgryninti klebicinai panaudoti atsparių transpozicinių mutantų atrankai. Atlikus mutagenezę ir mutantų atranką, PGR pagalba mutantuose buvo lokalizuoti transpozonai ir nustatyti šeši genai, kurių mutacijos bakterijoms suteikė atsparumą klebicinams: *fhuA*, *exbB*, *ompC*, *fimB*, *tonB*, *yaeT*. Keturių iš šių genų – *fhuA*, *exbB*, *tonB* ir *ompC* – svarba klebicinų jautrumui patvirtinta atlikus genų komplementacijos tyrimą.

Nustatyta, kad peptidoglikano sintezę blokuojantys kolicino M-tipo klebicinai veikimo metu naudoja geležies receptorių FhuA. Šie klebicinai, kaip ir *E. coli* B grupės kolicinai, translokacijai pasitelkia ląstelės TonB pernašos sistemą. Šios pernašos sistemos komponentų mutacijos taip pat lemia bakterijų atsparumą dviems poras formuojantiems klebicinams – KaerA ir KpneA. Nustatyta, kad KaerA, KpneA ir KvarIa klebicinams taip pat reikalingas funkcionalus OmpC receptorius. Kita vertus, KpneIa ir KvarIa klebicinų, kuriems atsparūs mutantai turėjo mutacijas *yaeT* ir *fimB* genuose, veikimo principas lieka iki galo neišaiškintas, tačiau panašu, kad KpneIa gali pasinaudoti BAM sistema, ląstelėje atsakinga už baltymų įterpimą į išorinę membraną.

## Identification of Receptors and Translocators of Klebicins by Transposon Mutagenesis

### Summary

Opportunistic, gram-negative bacteria belonging to the genus *Klebsiella* causes a wide range of infections, including pneumonias, bacteremias and urinary tract infections. As bacterial strains become increasingly resistant to antibiotics, new approaches to treatment are urgently needed. One of the most promising alternatives to traditional antibiotics are bacteriocins, i.e. antimicrobial ribosomally synthesized proteins. In our laboratory, *Klebsiella* bacteriocins – klebicins – KpneM, KpneM2, KvarM, KaerA, KpneA, KvarIa and KpneIa were cloned and transiently expressed in plants. Six of these klebicins were purified.

The aim of this work was to identify genes encoding receptors and translocators of klebicins. To do so, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* DSM 28212 strain, sensitive to all seven klebicins, was subjected to several rounds of transposon mutagenesis. Klebacin KpneIa was purified using hydrophobic interaction chromatography. All seven purified klebicins were used for selection of resistant mutants. After performing transposon mutagenesis and selecting mutants with klebacin resistance, PCR analysis was performed to localize transposon insertions which revealed mutations in six genes – *fhuA*, *exbB*, *ompC*, *fimB*, *tonB*, *yaeT*. Complementation assay by ectopic expression of respective wild-type genes confirmed the relation between klebacin sensitivity loss and four genes – *fhuA*, *exbB*, *tonB* and *ompC*.

The results showed that all three colicin M-like klebicins require ferrichrome receptor FhuA. These klebicins are similar to group B colicins and use the TonB-dependent translocation pathway. Mutations in TonB system also lead to resistance to two pore-forming klebicins – KaerA and KpneIa. These klebicins, as well as KvarIa, require in addition functional OmpC. However, the mechanism of import of KpneIa and KvarIa stays unclear, although it seems that BAM system, responsible for protein incorporation into outer membrane, plays a role.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ahmer, B.M., Thomas, M.G., Larsen, R.A., and Postle, K. (1995). Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB and ExbD in TonB function and stability. *J. Bacteriol.* *177*, 4742–4747.
2. Alves, M.S., Dias, R.C. da S., de Castro, A.C.D., Riley, L.W., and Moreira, B.M. (2006). Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. *J. Clin. Microbiol.* *44*, 3640–3646.
3. Atanaskovic, I., and Kleanthous, C. (2019). Tools and Approaches for Dissecting Protein Bacteriocin Import in Gram-Negative Bacteria. *Front. Microbiol.* *10*.
4. Bagley, S.T. (1985). Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect. Control IC* *6*, 52–58.
5. Baquero, F., Lanza, V.F., Baquero, M.-R., del Campo, R., and Bravo-Vázquez, D.A. (2019). Microcins in Enterobacteriaceae: Peptide Antimicrobials in the Eco-Active Intestinal Chemosphere. *Front. Microbiol.* *10*.
6. Barton, K.A., Binns, A.N., Matzke, A.J., and Chilton, M.D. (1983). Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell* *32*, 1033–1043.
7. Bieler, S., Silva, F., Soto, C., and Belin, D. (2006). Bactericidal activity of both secreted and nonsecreted microcin E492 requires the mannose permease. *J. Bacteriol.* *188*, 7049–7061.
8. Brisse, S., and Verhoef, J. (2001). Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *51*, 915–924.
9. Brisse, S., Passet, V., and Grimont, P.A.D. (2014). Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *64*, 3146–3152.
10. Budič, M., Rijavec, M., Petkovšek, Ž., and Žgur-Bertok, D. (2011). *Escherichia coli* Bacteriocins: Antimicrobial Efficacy and Prevalence among Isolates from Patients with Bacteraemia. *PLoS ONE* *6*.
11. C. Oscáriz, J., and Pisabarro, A. (2001). Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positive bacteria.
12. Carter, J.S., Bowden, F.J., Bastian, I., Myers, G.M., Sriprakash, K.S., and Kemp, D.J. (1999). Phylogenetic evidence for reclassification of *Calymmatobacterium granulomatis* as *Klebsiella granulomatis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* *49 Pt 4*, 1695–1700.
13. Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., and Cavard, D. (2007). Colicin Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *71*, 158–229.



14. Chavan, M., Rafi, H., Wertz, J., Goldstone, C., and Riley, M.A. (2005). Phage associated bacteriocins reveal a novel mechanism for bacteriocin diversification in *Klebsiella*. *J. Mol. Evol.* *60*, 546–556.
15. Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A., and Dicks, L.M.T. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol.* *49*, 23–28.
16. Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merio, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P., and Nester, E.W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* *11*, 263–271.
17. Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2013). Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 95.
18. Davies, J.K., and Reeves, P. (1975a). Genetics of resistance to colicins in *Escherichia coli* K-12: cross-resistance among colicins of group A. *J. Bacteriol.* *123*, 102–117.
19. Davies, J.K., and Reeves, P. (1975b). Genetics of resistance to colicins in *Escherichia coli* K-12: cross-resistance among colicins of group B. *J. Bacteriol.* *123*, 96–101.
20. Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., and Nes, I.F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 2384–2389.
21. Drider, D., Bendali, F., Naghmouchi, K., and Chikindas, M.L. (2016). Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents. *Probiotics Antimicrob. Proteins* *8*, 177–182.
22. Fonseca, E.L., Ramos, N. da V., Andrade, B.G.N., Morais, L.L.C.S., Marin, M.F.A., and Vicente, A.C.P. (2017). A one-step multiplex PCR to identify *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae* in the clinical routine. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *87*, 315–317.
23. Fredericq, P., and Levine, M. (1947). Antibiotic Interrelationships among the Enteric Group of Bacteria. *J. Bacteriol.* *54*, 785–792.
24. Friedlaender, C. (1882). Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Arch. Für Pathol. Anat. Physiol. Für Klin. Med.* *87*, 319–324.
25. Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., and Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* *120*, 51–70.
26. Ghequire, M.G.K., Swings, T., Michiels, J., Buchanan, S.K., and De Mot, R. (2018). Hitting with a BAM: Selective Killing by Lectin-Like Bacteriocins. *MBio* *9*.
27. Gleba, Y.Y., Tusé, D., and Giritch, A. (2014). Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *375*, 155–192.
28. Hammami, R., Zouhir, A., Le Lay, C., Ben Hamida, J., and Fliss, I. (2010). BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *BMC Microbiol.* *10*, 22.
29. Hantke, K., and Braun, V. (1975). Membrane receptor dependent iron transport in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* *49*, 301–305.
30. Heng, N.C.K., and Tagg, J.R. (2006). What’s in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nat. Rev. Microbiol.* *4*, 160.
31. Hiron, A., Falord, M., Valle, J., Débarbouillé, M., and Msadek, T. (2011). Bacitracin and nisin resistance in *Staphylococcus aureus*: a novel pathway involving the BraS/BraR two-component system (SA2417/SA2418) and both the BraD/BraE and VraD/VraE ABC transporters. *Mol. Microbiol.* *81*, 602–622.

32. Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., and Schilperoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179–180.
33. Jones, H.D., Doherty, A., and Sparks, C.A. (2009). Transient transformation of plants. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 513, 131–152.
34. Karlsson, M., Hannavy, K., and Higgins, C.F. (1993). A sequence-specific function for the N-terminal signal-like sequence of the TonB protein. *Mol. Microbiol.* 8, 379–388.
35. Kim, K.H., Aulakh, S., and Paetzel, M. (2012). The bacterial outer membrane  $\beta$ -barrel assembly machinery. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 21, 751–768.
36. Kim, Y.C., Tarr, A.W., and Penfold, C.N. (2014). Colicin import into *E. coli* cells: A model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1843, 1717–1731.
37. Komarova, T.V., Baschieri, S., Donini, M., Marusic, C., Benvenuto, E., and Dorokhov, Y.L. (2010). Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert Rev. Vaccines* 9, 859–876.
38. Krewulak, K.D., and Vogel, H.J. (2011). TonB or not TonB: is that the question? *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 89, 87–97.
39. Kusnadi, A.R., Nikolov, Z.L., and Howard, J.A. (1997). Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnol. Bioeng.* 56, 473–484.
40. Latino, L., Patin, D., Ch erier, D., Touz e, T., Pourcel, C., Barreteau, H., and Mengin-Lecreulx, D. (2019). Impact of FiuA Outer Membrane Receptor Polymorphism on the Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* toward Peptidoglycan Lipid II-Targeting Paem Pyocins. *J. Bacteriol.* 201.
41. Lee, B., and Richards, F.M. (1971). The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* 55, 379-IN4.
42. Lee, L.-Y., and Gelvin, S.B. (2008). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiol.* 146, 325–332.
43. Long, S.W., Linson, S.E., Ojeda Saavedra, M., Cantu, C., Davis, J.J., Brettin, T., and Olsen, R.J. (2017). Whole-Genome Sequencing of Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Reveals Misidentification and Misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. *MSphere* 2.
44. Lukacik, P., Barnard, T.J., Keller, P.W., Chaturvedi, K.S., Seddiki, N., Fairman, J.W., Noinaj, N., Kirby, T.L., Henderson, J.P., Steven, A.C., et al. (2012). Structural engineering of a phage lysin that targets gram-negative pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 9857–9862.
45. Martin, A.J.P., and Synge, R.L.M. (1941). A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochem. J.* 35, 1358–1368.
46. Martin, R.M., and Bachman, M.A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8.
47. Martínez-García, E., Calles, B., Ar valo-Rodríguez, M., and de Lorenzo, V. (2011). pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC Microbiol.* 11, 38.
48. Martínez-Romero, E., Silva-Sanchez, J., Barrios, H., Rodríguez-Medina, N., Martínez-Barnetche, J., T llez-Sosa, J., G mez-Barreto, R.E., and Garza-Ramos, U. (2015). Draft Genome Sequences of *Klebsiella variicola* Plant Isolates. *Genome Announc.* 3.

49. McCaughey, L.C., Ritchie, N.D., Douce, G.R., Evans, T.J., and Walker, D. (2016). Efficacy of species-specific protein antibiotics in a murine model of acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Sci. Rep.* *6*, 30201.
50. Moeck, G.S., Coulton, J.W., and Postle, K. (1997). Cell envelope signaling in *Escherichia coli*. Ligand binding to the ferrichrome-iron receptor fhua promotes interaction with the energy-transducing protein TonB. *J. Biol. Chem.* *272*, 28391–28397.
51. Nicolás, M.F., Ramos, P.I.P., Carvalho, F.M. de, Camargo, D.R.A., Alves, C. de F.M., Morais, G.L. de, Almeida, L.G.P., Souza, R.C., Ciapina, L.P., Vicente, A.C.P., et al. (2018). Comparative Genomic Analysis of a Clinical Isolate of *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, a KPC-2 and OKP-B-6 Beta-Lactamases Producer Harboring Two Drug-Resistance Plasmids from Southeast Brazil. *Front. Microbiol.* *9*.
52. Paczosa, M.K., and Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *80*, 629–661.
53. Palomino, C., Marín, E., and Fernández, L.Á. (2011). The Fimbrial Usher FimD Follows the SurA-BamB Pathway for Its Assembly in the Outer Membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *193*, 5222–5230.
54. Paškevičius, Š., Starkevič, U., Misiūnas, A., Vitkauskienė, A., Gleba, Y., and Ražanskienė, A. (2017). Plant-expressed pyocins for control of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* *12*.
55. Passet, V., and Brisse, S. (2018). Description of *Klebsiella grimontii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *68*, 377–381.
56. Patel, P.K., Russo, T.A., and Karchmer, A.W. (2014). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Open Forum Infect. Dis.* *1*, ofu028.
57. Piper, C., Casey, P.G., Hill, C., Cotter, P.D., and Ross, R.P. (2012). The Lantibiotic Lacticin 3147 Prevents Systemic Spread of *Staphylococcus aureus* in a Murine Infection Model. *Int. J. Microbiol.* *2012*, 806230.
58. Podschun, R., and Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* *11*, 589–603.
59. Psonis, J.J., Chahales, P., Henderson, N.S., Rigel, N.W., Hoffman, P.S., and Thanassi, D.G. (2019). The small molecule nitazoxanide selectively disrupts BAM-mediated folding of the outer membrane usher protein. *J. Biol. Chem.* *294*, 14357–14369.
60. Riley, M.A., and Wertz, J.E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* *56*, 117–137.
61. Riley, M.A., Pinou, T., Wertz, J.E., Tan, Y., and Valletta, C.M. (2001). Molecular characterization of the klebicin B plasmid of *Klebsiella pneumoniae*. *Plasmid* *45*, 209–221.
62. Rodrigues, C., Passet, V., Rakotondrasoa, A., Diallo, T.A., Criscuolo, A., and Brisse, S. (2019). Erratum to “Description of *Klebsiella africanensis* sp. nov., *Klebsiella variicola* subsp. *tropicalensis* subsp. nov. and *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* subsp. nov.” [Res Microbiol 170 (3) (2019) 165-170]. *Res. Microbiol.* *170*, 300.
63. Rosenblueth, M., Martínez, L., Silva, J., and Martínez-Romero, E. (2004). *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst. Appl. Microbiol.* *27*, 27–35.

64. Schneider, T., Hahn-Löbmann, S., Stephan, A., Schulz, S., Giritch, A., Naumann, M., Kleinschmidt, M., Tusé, D., and Gleba, Y. (2018). Plant-made Salmonella bacteriocins salmocins for control of Salmonella pathovars. *Sci. Rep.* 8, 4078.
65. Schulz, S., Stephan, A., Hahn, S., Bortesi, L., Jarczowski, F., Bettmann, U., Paschke, A.-K., Tusé, D., Stahl, C.H., Giritch, A., et al. (2015). Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of *Escherichia coli* by mixtures of plant-produced colicins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E5454-5460.
66. Su, S.-C., Siu, L.K., Ma, L., Yeh, K.-M., Fung, C.-P., Lin, J.-C., and Chang, F.-Y. (2008). Community-acquired liver abscess caused by serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* with CTX-M-15-type extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 804–805.
67. Tindall, B.J., Sutton, G., and Garrity, G.M. (2017). *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 502–504.
68. Tomaz, C.T. (2017). Chapter 7 - Hydrophobic interaction chromatography\*. In *Liquid Chromatography (Second Edition)*, S. Fanali, P.R. Haddad, C.F. Poole, and M.-L. Riekkola, eds. (Elsevier), pp. 171–190.
69. Walker, D., Mosbahi, K., Vankemmelbeke, M., James, R., and Kleanthous, C. (2007). The Role of Electrostatics in Colicin Nuclease Domain Translocation into Bacterial Cells. *J. Biol. Chem.* 282, 31389–31397.
70. Werner, J., and Misra, R. (2005). YaeT (Omp85) affects the assembly of lipid-dependent and lipid-independent outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 57, 1450–1459.
71. White, P., Joshi, A., Rassam, P., Housden, N.G., Kaminska, R., Goult, J.D., Redfield, C., McCaughey, L.C., Walker, D., Mohammed, S., et al. (2017). Exploitation of an iron transporter for bacterial protein antibiotic import. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 12051–12056.
72. Zadoks, R.N., Griffiths, H.M., Munoz, M.A., Ahlstrom, C., Bennett, G.J., Thomas, E., and Schukken, Y.H. (2011). Sources of *Klebsiella* and *Raoultella* species on dairy farms: be careful where you walk. *J. Dairy Sci.* 94, 1045–1051.
73. Zhang, Y., Zeng, J., Liu, W., Zhao, F., Hu, Z., Zhao, C., Wang, Q., Wang, X., Chen, H., Li, H., et al. (2015). Emergence of a hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from clinical infections in China. *J. Infect.* 71, 553–560.