

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Renatas

KRASAUSKAS

A. baumannii BfmRS sistemos įtaka
patogeno išlikimui aplinkoje ir
tarpbakterinėje konkurencijoje

DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA

Gamtos mokslai,
Biochemija N 004

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2015 – 2019 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų institute.

Mokslinė vadovė:

prof. dr. Edita Sužiedėlienė

(Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkė – **dr. Milda Plečkaitytė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija - N 004).

Nariai:

prof. dr. Rimantas Daugelavičius (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biochemija - N 004);

dr. Natalija Gerasimčik (Karolinska institutas, gamtos mokslai, biologija - N 010);

doc. dr. Eglė Lastauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija - N 010);

prof. dr. Jaunius Urbonavičius (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, gamtos mokslai, biochemija - N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2020 m. rugsėjo mėn. 25 d. 15 val. Gyvybės mokslų centre (Vilniaus universitetas) R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7 LT-10257 Vilnius, Lietuva.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendarius>

VILNIUS UNIVERSITY

Renatas
KRASAUSKAS

The role of *Acinetobacter
baumannii* BfmRS system in
environmental fitness and
inter-bacterial competition

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Life Sciences,
Biochemistry N 004

VILNIUS 2020

This dissertation was written between 2015 and 2020 in the Institute of Biosciences, Life Sciences Center, Vilnius University.

Academic supervisor:

Prof. Dr. Edita Sužiedėlienė

(Vilnius University Life Sciences, Biochemistry – N 004).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Dr. Milda Plečkaitytė (Vilnius University, natural sciences, biochemistry – N 004).

Members:

Prof. Dr. Rimantas Daugelavičius (Vytautas Magnus University, natural sciences, biochemistry – N 004);

Dr. Natalija Gerasimčik (Karolinska Institutet, natural sciences, biology – N 010);

Assoc. Prof. Dr. Eglė Lastauskienė (Vilnius University, natural sciences, biology – N 010);

Prof. Dr. Jaunius Urbonavičius (Vilnius Gediminas Technical University, natural sciences, biochemistry – N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 15:00 on 25 September 2020 in R401 auditorium of the Life Sciences Center (Vilnius University).

Address: Saulėtekio av. 7, LT-10257 Vilnius, Lithuania

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

ĮVADAS

Acinetobacter baumannii yra Gram-neigiamas oportunistinis patogenas, pastaraisiais metais išplitęs viso pasaulio ligoninėse. Šis mikroorganizmas infekuoja sunkiomis ligomis sergančius ligonius, nudegimų aukas, individus su nusilpusia ar dar nepilnai susiformavusia imunine sistema.

Infekcijų spektras, kurias sukelia *A. baumannii*, yra labai platus ir varijuoja nuo dažniausiai pasitaikančių plaučių uždegimo ir bakteremijos, iki infekcijų šlapimo takuose ar žaizdose, taip pat endokardito, meningito, ar nekrozinio fascito (Peleg ir kt., 2008).

A. baumannii pasižymi dauginiu atsparumu antibiotikams, atsparumu išdžiūvimui ir oksidaciniam stresui, jam būdingas bioplėvelių formavimas ir judrumas paviršiumi (Harding ir kt., 2018; Morris ir kt., 2019). Minėtos savybės įgalina šį patogeną efektyviai plisti ir išsitvirtinti ligoninių aplinkoje. Tik pastaraisiais metais atkreiptas dėmesys į *A. baumannii* virulentiškumo mechanizmus, kurie yra tiesiogiai susiję su patogeno sėkme kolonizuojant šeimnininką. Nepaisant šios bakterijos keliamos grėsmės, vis dar nėra pakankamai gerai suprasti mechanizmai, kurie lemia *A. baumannii* gebėjimą išsitvirtinti aplinkoje.

Vienas iš mechanizmų, kuriuos prokariotai pasitelkia reaguoti į aplinkos pokyčius, yra dvikomponentės reguliacinės sistemos. Sistemos sudarytos iš jutiklio – membraninės histidino kinazės, ir citozolinio atsako regulatoriaus. Histidino kinazė geba reaguoti į aplinkos veiksnius, autofosforilintis nuo ATP molekulės, ir keisti atsako regulatoriaus aktyvumą fosforilindama jo konservatyvų glutamatą. Regulatoriaus fosforilinimas sukelia erdvinius pokyčius, kurie gali daryti įtaką jo sąveikai su DNR, RNR, kitais baltymais, ar keisti fermentinį aktyvumą (Groisman, 2016). Nustatyta, kad *A. baumannii* BfmRS sistema yra viena pagrindinių reguliacinių sistemų patogeno virulentiškumo ir bendro atsako į nepalankius aplinkos veiksnius reguliavime. Tyrimai rodo, kad BfmRS reguliuoja

patogeno judrumą, bioplėvelių formavimą, atsparumą antimikrobinėms medžiagoms, atsparumą išdžiūvimui, adheziją prie epitelio ląstelių, ir atsparumą šeimininko imuninės sistemos komponentams (Clemmer ir kt., 2011; Farrow ir kt., 2018; Geisinger ir kt., 2018; Geisinger ir Isberg, 2015; Russo ir kt., 2016; Tomaras ir kt., 2008).

A. baumannii atsakui į aplinką pasitelkia ir baltymų sekrecijos mašinas, kurios neretai prisideda ir prie patogeno virulentiškumo (Harding ir kt., 2018; Weber ir kt., 2017). Nustatyta, kad *A. baumannii* turi bent dvi skirtingas sekrecijos sistemas, kurios atsakingos už tarpbakterinę konkurenciją: VI tipo sekrecijos sistemą ir nuo kontakto priklausomą augimo slopinimo (CDI) mechanizmą, priskiriamą V tipo sekrecijos sistemoms (Harding ir kt., 2018). Spėjama, kad šios sistemos *A. baumannii* suteikia evoliucinį pranašumą prieš kitas bakterijas aplinkoje, kurioje ir taip yra labai ribotas maisto medžiagų kiekis (Garcia, 2018). Pastaraisiais metais parodyta, kad konkurencijos sistemos gali būti panaudotos ir tiesioginei virulentiškumo veiksnių sekrecijai, adhezijai prie paviršių, ar ribotų resursų, tokių kaip geležies jonai, paėmimui iš aplinkos (Coulthurst, 2019; Meuskens ir kt., 2019). Tai rodo, kad minimos sistemos potencialiai galėtų suteikti pranašumą ir kolonizuojant šeimininką. Dar labai nedaug yra žinoma apie šių struktūrų reguliacinius mechanizmus ir/arba kokiose sąlygose jie aktyvinami ar slopinami. Todėl geresnis *A. baumannii* sekrecijos sistemų reguliacinių mechanizmų supratimas ne tik prisidėtų prie bendro patogeno fiziologijos supratimo, bet ir, tikėtina, paskatintų naujų terapijos metodų kūrimą.

Šiame darbe mes ištyrėme *A. baumannii* dvikomponentės sistemos BfmRS įtaką patogeno judrumui, pelikulės formavimui, ir tarpbakterinei konkurencijai naudojant VI tipo sekrecijos ir CDI mechanizmus. Mes taip pat charakterizavome *A. baumannii* V15 klinikinio kamieno CDI veikimo mechanizmą.

Šio **darbo tikslas** buvo ištirti *A. baumannii* dvikomponentės sistemos BfmRS įtaką patogeno gebėjimui plisti nepalankioje aplinkoje ir tarpbakterinėje konkurencijoje.

Tikslui pasiekti buvo iškelti tokie **uždaviniai**:

- Įvertinti BfmRS sistemos įtaką *A. baumannii* V15 kamieno judrumui ir gebėjimui formuoti pelikulę;
- Įvertinti BfmRS sistemos vaidmenį tarpbakterinėje konkurencijoje panaudojant VI tipo sekrecijos sistemą;
- Nustatyti, kaip BfmRS sistema reguliuoja nuo kontakto priklausomą augimo slopinimo mechanizmą *A. baumannii* V15 klinikiniam kamienė;
- Įvertinti *A. baumannii* polisacharidinės kapsulės įtaką apsaugoje nuo kontakto priklausomo augimo slopinimo sistemos poveikio;
- Įvertinti nuo kontakto priklausomo augimo slopinimo sistemos toksinio komponento – CdiA baltymo poveikį.

Mokslinis naujumas

Šiame darbe pirmą kartą parodyta, kad *A. baumannii* BfmRS dvikomponentė reguliacinė sistema daro įtaką bakterijos gebėjimui formuoti pelikulę ir vykdyti tarpbakterinę konkurenciją. Mes taip pat paaiškinome, kaip ši sistema prisideda prie judėjimo augimo terpės paviršiumi.

Pelikulė yra savita laisvai plaukiojanti bioplėvelių forma, kuri leidžia bakterijai kolonizuoti strategiškai palankią nišą, suteikiančią jai tiesioginį priėjimą prie deguonies, maisto medžiagų, ir galimybę lengvai plisti. Kol kas nieko nebuvo žinoma apie šios struktūros reguliacinius mechanizmus. Disertacijoje mes pirmieji parodėme, kad BfmRS sistema yra būtina pelikulės formavimui.

Yra laikoma, kad judėjimo fenotipo slopinimas, kai yra formuojamos bioplėvelės, bakterijoms yra naudingas. BfmR vaidmuo šiame procese kol kas nebuvo visiškai aiškus. Mes

nustatėme, kad *bfmR* alelio perprodukcija lemia ir *A. baumannii* judėjimo terpės paviršiumi fenotipo slopinimą. Tai rodo, kad *A. baumannii* naudoja vieną sistemą dviejų skirtingų fenotipų reguliavimui.

Disertacijoje pateikti rezultatai rodo, kad BfmRS sistemos netekimas lemia žymų Hcp baltymo sekrecijos sumažėjimą į augimo terpę. Šis komponentas yra sudėtinė VI tipo sekrecijos sistemos dalis, kuri, formuodama adatos pavidalo vamzdelį, geba į šalia esančias ląsteles pernešti toksinus, lemiančius augimo slopinimą arba ląstelės žūtį. Tai, kad dvikomponentė sistema prisideda prie Hcp sekrecijos dar nebuvo aprašyta. Tiesa, mūsų rezultatai rodo, kad Hcp sekrecijos sumažėjimas dėl BfmRS sistemos delecijos, nedarė įtakos per VI tipo sekrecijos sistemą vykdomos *A. baumannii* tarpbakterinės konkurencijos. Atradimas leidžia įtarti, kad *A. baumannii* padidėjusią Hcp sekreciją gali naudoti kitiems, kol kas nežinomiems fiziologiniams procesams.

Darbe pirmą kartą apibūdintas BfmRS vaidmuo neigiamai reguliuojant *A. baumannii* nuo kontakto priklausomą augimo slopinimo (CDI) sistemą. Gram-neigiamų bakterijų koduojamos CDI struktūros naudojamos šalia esančių bakterijų augimo slopinimui. CDI fenomenas dažniausiai pasireiškia prieš tos pačios rūšies bakterijas ir paremtas tuo, kad, dalyvaujant membraniniam nešikliui CdiB, ant ląstelės paviršiaus yra eksponuojamas CdiA baltymas. C-galinis šio baltymo domenas koduoja toksinį komponentą, kuris pernešamas į ląstelę-taikinį po to, kai ji yra atpažįstama CdiA receptoriaus domenu.

Iki šiol buvo laikoma, kad CDI sistemos yra funkcionalios tik esant ląstelės-ląstelės sąveikai. Šiame darbe pirmą kartą parodėme, kad didžioji dalis toksinio CDI sistemos komponento – CdiA baltymo – yra augimo terpėje, kur jis išlieka funkcionalus ir geba efektyviai nuslopinti bakterijų-taikinių augimą. Tai liudija, kad *A. baumannii* vykdo CDI, nepriklausomai nuo ląstelės-ląstelės kontakto, taip išplėsdama tarpbakterinės įtakos sferą. Mūsų

žiniomis, gebėjimas sekretuoti funkcionalų toksinį CDI sistemos komponentą į augimo terpę, yra pirmasis toks aprašytas veikimo mechanizmas.

Disertaciniame darbe mes pirmieji parodėme, kad *A. baumannii* formuojama kapsulė efektyviai apsaugo nuo CDI sistemos vykdomo slopinimo. Tiesa, apsauginis kapsulės vaidmuo nuo šios sistemos jau buvo aprašytas *Escherichia coli* bakterijoje. Nepaisant to, mūsų surinkti įrodymai leidžia daryti prielaidą, kad šis apsauginis mechanizmas galėtų būti būdingas daugumai bakterijų rūšių.

Apibendrinant, šis darbas atskleidžia reikšmingą BfmRS reguliacinės sistemos vaidmenį *A. baumannii* gebėjimui išgyventi nepalankiomis sąlygomis ir dalyvauti tarpbakterinėje konkurencijoje.

Ginamieji teiginiai

- Dvikomponentė BfmRS sistema aktyvina *A. baumannii* pelikulės formavimą, tačiau slopina judėjimą terpės paviršiumi;
- BfmRS sistemos praradimas slopina VI tipo sekrecijos sistemos komponento Hcp baltymo sekreciją į terpę, nedarant įtakos tarprūšinės konkurencijos efektyvumui;
- BfmRS sistema neigiamai reguliuoja *A. baumannii* nuo kontakto priklausomą augimo slopinimo sistemą;
- *A. baumannii* formuojama kapsulė efektyviai apsaugo nuo augimo slopinimo sistemos poveikio vidurūšinėje konkurencijoje;
- *A. baumannii* V15 į augimo terpę sekretuoja funkcionalų toksinį augimo slopinimo sistemos komponentą, CdiA baltymą, kuris sukelia ląstelės-taikinio augimo slopinimą.

Disertacijos turinys

Disertacija parašyta anglų kalba ir sudaryta iš šių dalių: Turinys, Santrumpų Sąrašas, Įžanga, Mokslinis Naujumas, Literatūros Apžvalga, Medžiagos ir Metodai, Rezultatai, Diskusija, Išvados, Publikacijų Sąrašas, Padėkos, Literatūros šaltiniai, Priedai (2 lentelės). Disertacijoje yra 53 paveikslai ir 5 lentelės. Disertacijos puslapių skaičius: 136.

MEDŽIAGOS IR METODAI

Darbe naudoti reagentai gauti iš Thermo Fisher Scientific; Bio-Rad laboratories; Carl Roth GmbH&Co; Sigma-Aldrich; GE Healthcare. Oligonukleotidiniai pradmenys susintetinti Metabion International AG arba Thermo Fisher Scientific.

Darbe naudoti reprezentatyvūs izoliatai iš ankščiau aprašytos *A. baumannii* klinikiųjų bakterijų kolekcijos (Povilonis ir kt., 2013). Šie izoliatai išskirti iš trijų Lietuvos ligoninių pacientų: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kauno klinikų, Respublikinės Vilniaus universitetinės ligoninės, Respublikinės Šiaulių ligoninės. Bakterijos identifikuotos ligoninių laboratorijose naudojant automatizuotą Phoenix TB (BD) mikrobiologinę sistemą ir/arba naudojant rūšiai specifinius pradmenis pagal Chen ir kt., (2007).

Darbe naudotos augimo terpės ir jų sudėtys (g/l): LB (Lysogeny Broth) – 10 g triptono, 5 g mielių ekstrakto, 5 g NaCl. TSB (Tryptic Soy Broth) – 17 g skaidyto kazeino, 3 g hidrolizuoto sojos pupelių ekstrakto, 5 g NaCl, 2,5 g K₂HPO₄, 2,5 g gliukozės. TSB augimo terpės mišinys įsigytas iš Oxoid. Ruošiant agarizuotas terpes, į 1 l skystos terpės prieš autoklavavimą pridėta 15 g agarų agarų.

Pagrindiniai darbe naudoti bakterijų izoliatai, plazmidės, ir oligonukleotidai nurodyti Lentelėje 1.

Lentelė 1. Darbe naudoti bakterijų izoliatai, plazmidės, ir oligonukleotidai.

Bakterijų kamieniai		
Kamienas	Savybės/genotipas	Šaltinis
<i>Escherichia coli</i> JM107	<i>endA1, glnV44, thi⁻, relA1, gyrA96, Δ(lac-proAB)</i> [F', <i>traD36, proAB⁺, lacI⁺ZAM15], hsdR17(R_K m_K⁻), λ</i>	Yanisch-Perron ir kt., (1985)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>F⁻, Δ(argF-lac)169, φ80dlacZ58(M15), ΔphoA8, glnX44(AS), λ⁻, deoR481, rfbC1, gyrA96(NalR), recA1, endA1, thiE1, hsdR17</i>	Woodcock ir kt., (1989)
<i>Escherichia coli</i> MC4100	<i>F⁻, [araD139]_{WR}, Δ(argF-lac)169, λ⁻, e14⁻, flhD5301, Δ(fruK-yeiR)725(fruA25), relA1, rpsL150(strR), rbsR22, Δ(fimB-fimE)632(::IS1), deoC1</i>	Casadaban ir Cohen, 1979
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	<i>F⁻, lon-11, Δ(ompT-nfrA)885, Δ(galM-ybhJ)884, λDE3 [lacI, lacUV5-T7 gene 1, ind1, sam7, nin5], Δ46, [mal⁺]_{K-12}(λ^S), hsdS10</i>	Wood, 1966
<i>Bacillus subtilis</i>	Laukinis tipas. Naudotas kaip <i>sacB</i> geno šaltinis	Dovana iš Audriaus Gegecko ATCC 33305
<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	Laukinis tipas	
<i>AbV15</i>	<i>A. baumannii</i> V15 kamienas	Povilonis ir kt., (2013)
<i>AbV15 ΔbfmRS</i>	<i>AbV15</i> kamienas su <i>bfmRS</i> operono delecija	Šis darbas
<i>AbV15 ΔbfmR</i>	<i>AbV15</i> kamienas su <i>bfmR</i> geno delecija	Šis darbas

<i>AbV15 AbfmS</i>	<i>AbV15</i> kamienas su <i>bfmS</i> geno delecija	Šis darbas
<i>AbV15 AbfmRS pbfmRS</i>	<i>AbV15 AbfmRS</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_bfmRS_TER_lacI ^o 2	Šis darbas
<i>AbV15 AbfmRS pbfmR</i>	<i>AbV15 AbfmRS</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_bfmR_TER_lacI ^o 2	Šis darbas
<i>AbV15 AbfmRS pbfmS</i>	<i>AbV15 AbfmRS</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_bfmS_TER_lacI ^o 2	Šis darbas
<i>AbV15 Ahcp</i>	<i>AbV15</i> kamienas su <i>hcp</i> geno delecija	Šis darbas
<i>AbV15 Ahcp phcp</i>	<i>AbV15 Ahcp</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_hcp_TER_lacI ^o 2	Šis darbas
<i>AbV15 AbfmRSAhcp</i>	<i>AbV15 AbfmRS</i> mutantas su <i>hcp</i> geno delecija	Šis darbas
<i>AbV15 AbfmRSAhcp pbfmRS</i>	<i>AbV15 AbfmRSAhcp</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_bfmRS_TER_lacI ^o 2	Šis darbas
<i>AbV15 AbfmRSAhcp pbfmR</i>	<i>AbV15 AbfmRSAhcp</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_bfmR_TER_lacI ^o 2	Šis darbas
<i>AbV15 AbfmRSAhcp phcp</i>	<i>AbV15 AbfmRSAhcp</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_hcp_TER_lacI ^o 2	Šis darbas
<i>AbV15 AbfmRSAcdi</i>	<i>AbV15 AbfmRS</i> mutantas su daline <i>cdiBAI</i> operono delecija	Šis darbas
<i>AbV15 AbfmRSAhcpAcdi</i>	<i>AbV15 AbfmRSAhcp</i> mutantas su daline <i>cdiBAI</i> operono delecija	Šis darbas
<i>AbV15 AbfmRSAcdi pbfmRS</i>	<i>AbV15 AbfmRSAcdi</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_bfmRS_TER_lacI ^o 2	Šis darbas
<i>AbV15 AbfmRSAcdi pbfmR</i>	<i>AbV15 AbfmRSAcdi</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_bfmR_TER_lacI ^o 2	Šis darbas
<i>AbV15 AbfmRSAcdi pbfmRS</i>	<i>AbV15 AbfmRSAcdi</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_bfmRS_TER_lacI ^o 2	Šis darbas
<i>AbV15 AbfmRSAhcpAcdi pbfmR</i>	<i>AbV15 AbfmRSAhcpAcdi</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_bfmR_TER_lacI ^o 2	Šis darbas
<i>A. baylyi ADP1 pcdil</i>	<i>AbV15 AbfmRSAhcpAcdi</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_bfmR_TER_lacI ^o 2 <i>A. baylyi</i> ADP1 kamienas komplementuotas su pUC_AcORI_Ptac_cdiI_TER_lacI ^o 2 gm	Šis darbas
II-h	<i>A. baumannii</i> II-h kamienas	Povilonis ir kt., (2013)
II-g	<i>A. baumannii</i> II-g kamienas	
II-a1	<i>A. baumannii</i> II-a1 kamienas	
II-a	<i>A. baumannii</i> II-a kamienas	
II-c	<i>A. baumannii</i> II-c kamienas	
II-a1 <i>AgalU</i>	II-a1 kamienas su <i>galU</i> geno delecija	Šis darbas
II-a <i>AgalU</i>	II-a kamienas su <i>galU</i> geno delecija	Šis darbas
II-c <i>AgalU</i>	II-c kamienas su <i>galU</i> geno delecija	Šis darbas
II-a1 <i>AgalU</i> pgalU	II-a1 <i>AgalU</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_galU ^{II-a1} _TER_lacI ^o 2 gm	Šis darbas
II-a <i>AgalU</i> pgalU	II-a <i>AgalU</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_galU ^{II-a} _TER_lacI ^o 2 gm	Šis darbas
II-c <i>AgalU</i> pgalU	II-c <i>AgalU</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_galU ^{II-c} _TER_lacI ^o 2 gm	Šis darbas
II-a1 <i>AgalU</i> pcdil	II-a1 <i>AgalU</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_cdiI ^{AbV15} _TER_lacI ^o 2 gm	Šis darbas
II-a <i>AgalU</i> pcdil	II-a <i>AgalU</i> mutantas komplementuotas pUC_AcORI_Ptac_cdiI ^{AbV15} _TER_lacI ^o 2 gm	Šis darbas
II-c <i>AgalU</i> pcdil	II-c <i>AgalU</i> mutantas komplementuotas su pUC_AcORI_Ptac_cdiI ^{AbV15} _TER_lacI ^o 2 gm	Šis darbas

Plazmidēs

Plazmidēs pav.	Aprašymas/Savybēs	Šaltinis
pUC19	Naudota kaip karkasas plazmidēs pUC_AcORI_Ptac_gfp_TER_lacI ^o 2 ir pUC19_sacB; Amp ^R	Norrander ir kt., (1983)
pWH1266	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> plazmidēs fragmentas su <i>ori</i> seka iš pBR322 plazmidēs	Hunger ir kt., (1990)
pAcGFP1-C3	<i>gfp</i> geno šaltinis; Kan ^R	Clontech laboratories.

pKK223-3	<i>Ptac</i> promotoriaus ir TER sričių šaltinis; Amp ^R	PL-Pharmacia.
pUC19_ <i>sacB</i>	<i>A. baumannii</i> sąvaidė plazmidė su <i>sacB</i> genu iš <i>Bacillus</i> spp. delecijoms įvedinėti; Amp ^R	Šis darbas
pUC19_ <i>sacB_bfmRSUP</i> Dwn_gmR	pUC19_ <i>sacB</i> plazmidė su <i>AbfmRS::aac3I</i> ; Amp ^R ; Gm ^R	Šis darbas
pUC19_ <i>sacB_hcpUPDw</i> n_gmR	pUC19_ <i>sacB</i> plazmidė su <i>Ahcp::aac3I</i> ; Amp ^R ; Gm ^R	Šis darbas
pUC19_ <i>sacB_cdiUPDw</i> n_gmR	pUC19_ <i>sacB</i> plazmidė su <i>AcdiAI::aac3I</i> ; Amp ^R ; Gm ^R	Šis darbas
pUC19_ <i>sacB_galU^{II-a1/II-}</i> <i>a1/II-UPDwn_gmR</i>	pUC19_ <i>sacB</i> plazmidė su <i>AgalU^{II-a1}::aac3I</i> , arba <i>AgalU^{II-a}::aac3I</i> , arba <i>AgalU^{II-c}::aac3I</i> ; Amp ^R ; Gm ^R	Šis darbas
pUC_AcORI_ <i>Ptac_gfp_</i> <i>TER_lacI²</i>	Indukuojama <i>E. coli</i> – <i>A. baumannii</i> plazmidė genams klonuoti vietoje <i>gfp</i> geno; Amp ^R	Šis darbas
pUC_AcORI_ <i>Ptac_gfp_</i> <i>TER_lacI²_gm</i>	Indukuojama <i>E. coli</i> – <i>A. baumannii</i> plazmidė genams klonuoti vietoje <i>gfp</i> geno, kur <i>bla</i> genas pakeistas <i>aac3I</i> kasete; Gm ^R	Šis darbas
pUC_AcORI_ <i>Ptac_TER_</i> <i>lacI²</i>	pUC_AcORI_ <i>Ptac_gfp_TER_lacI²</i> plazmidė be <i>gfp</i> , naudota kaip plazmidės kontrolė komplementacijose; Amp ^R	Šis darbas
pUC_AcORI_ <i>Ptac_TER_</i> <i>lacI²_gm</i>	pUC_AcORI_ <i>Ptac_gfp_TER_lacI²_gm</i> plazmidė be <i>gfp</i> , naudota kaip plazmidės kontrolė komplementacijose; Gm ^R	Šis darbas
pUC_AcORI_ <i>Ptac_bfm</i> <i>RS_TER_lacI²</i>	pUC_AcORI_ <i>Ptac_gfp_TER_lacI²</i> plazmidė, kur <i>gfp</i> genas pakeistas <i>bfmRS</i> operonu; Amp ^R	Šis darbas
pUC_AcORI_ <i>Ptac_bfm</i> <i>R_TER_lacI²</i>	pUC_AcORI_ <i>Ptac_gfp_TER_lacI²</i> plazmidė, kur <i>gfp</i> genas pakeistas <i>bfmR</i> genu; Amp ^R	Šis darbas
pUC_AcORI_ <i>Ptac_bfm</i> <i>S_TER_lacI²</i>	pUC_AcORI_ <i>Ptac_gfp_TER_lacI²</i> plazmidė, kur <i>gfp</i> genas pakeistas <i>bfmS</i> genu; Amp ^R	Šis darbas
pUC_AcORI_ <i>Ptac_hcp_</i> <i>TER_lacI²</i>	pUC_AcORI_ <i>Ptac_gfp_TER_lacI²</i> plazmidė, kur <i>gfp</i> genas pakeistas <i>hcp</i> genu; Amp ^R	Šis darbas
pUC_AcORI_ <i>Ptac_cdiI_</i> <i>TER_lacI²_gm</i>	pUC_AcORI_ <i>Ptac_gfp_TER_lacI²_gm</i> plazmidė, kur <i>gfp</i> genas pakeistas <i>cdiI</i> genu; Amp ^R	Šis darbas
pUC_AcORI_ <i>Ptac_gal</i> <i>U^{II-a1}_TER_lacI²_gm</i>	pUC_AcORI_ <i>Ptac_gfp_TER_lacI²_gm</i> plazmidė, kur <i>gfp</i> genas pakeistas <i>galU</i> genu iš II-a1; Gm ^R	Šis darbas
pUC_AcORI_ <i>Ptac_gal</i> <i>U^{II-a}_TER_lacI²_gm</i>	pUC_AcORI_ <i>Ptac_gfp_TER_lacI²_gm</i> plazmidė, kur <i>gfp</i> genas pakeistas <i>galU</i> genu iš II-a; Gm ^R	Šis darbas
pUC_AcORI_ <i>Ptac_galU</i> <i>II-c_TER_lacI²_gm</i>	pUC_AcORI_ <i>Ptac_gfp_TER_lacI²_gm</i> plazmidė, kur <i>gfp</i> genas pakeistas <i>galU</i> genu iš II-c; Gm ^R	Šis darbas

Oligonukleotidai

Pavadinimas	Seka (5'→3')	Aprašymas/šaltinis
sacB_F	GTTGCTAGAGATCCCTTTTAACCCATCAC	<i>sacB</i> geno padauginimui
sacB_R	GTTGGCATGCTGGGATTCACCTTTATGTTG	
BfmR_Ptac_F	CATGAGCCAAGAAGAAAAGTTACC	<i>bfmRS</i> operono ir <i>bfmR</i> geno padauginimui
BfmR_Ptac_R	TTACAATCCATTGGTTTCTTTAAC	
BfmS_Ptac_R	GAACCTGATGCAACTCAG	
BfmS_Ptac_F	CGTGTTTAAACACAGTATATTCCTGC	<i>bfmS</i> geno padauginimui
hcp_compl_F	CATGAAAGATATATACGTTGAGTTTCGC	
hcp_compl_R	CTTTATGTCAGCCTCCACCAA	<i>hcp</i> geno padauginimui
BfmR_F	GTTGAAGCTTAAATGCAGCAACATCTCC	
ter_F	GGGCCATGGGCATGCGGTACCTGTTTTGGCG GATGAGAC	TER regiono padauginimui iš pKK223-3
ter_R	GTTGGAGCTCTTTGTAGAAACGAAAAAGGC	
LacIq2_R	CTCACTGCCCGCTTTCCA	<i>lacI²</i> geno padauginimui iš <i>E. coli</i> BL21(DE3)
LacIq2_F	ATCGAATGGTGCAAAAAC	
BfmR01F	TCACGCATTGCACCAATA	Priešrovinio <i>bfmRS</i> regiono padauginimui
BfmRS01R	GGAACCTGATGCAACTCAGTTATAAATCATTG CCCCTATAAATCTC	

BfmS02F BfmS02Rgm	TTATAACTGAGTTGCATCAGG CGTTCAAGCCGAGATGAATTCGATCGGCCGAA TTTGGTTATTG	Pasrovinio <i>bfmRS</i> regiono padauginimui
5_hcpFwd 5_hcpRev	TCAGGAAACGCCCTTCAAATC CTTTATGTCAGCCTCCACCAAGCTGACCTTGAT TAATTTGAGG	Priešsrovinio <i>hcp</i> regiono padauginimui
3_hcpFwd 3_hcpRev	TTGGTGGAGGCTGACATAAAG CGTTCAAGCCGAGATGAATTCGATCGCTCAAA TTCCGATACATGCTG	Pasrovinio <i>hcp</i> regiono padauginimui
GentR_F GentR_R	GATCGAGCTCAGGACAGAAATGCCTCGACT GATCGAATTCATCTCGGCTTGAACGAATTG	<i>aac3I</i> atsparumo kasetės padauginimui
Bfm_check_F Bfm_check_R	CAACACCTGAGATTTACCG CAGCAACTTTTGTGCCTATG	<i>AbfmRS</i> delecijos regiono padauginimui ir sekvenavimui
hcp_checkF hcp_checkR Hcp_seq_chk	GTCAACTTGGCGTGGTCTTT TGGGGTTCAGCATATTTTTCA TGCTTCTGCTGGAAATGTTG	<i>Ahcp</i> delecijos regiono padauginimui ir sekvenavimui
rpoB_qF rpoB_qR	CGATTCGTACAGAACATTCTT TAAAGCAGCATTGCCAGAATA	Genų raiškos matavimams. Endogeninė kontrolė
T6hcF T6hcR	ACTTCAAGTAGTGTGGGCGG AAGTCCACTCAACAGCAGCA	<i>hcp</i> geno raiškos matavimui
TssMF TssMR	TGCTTGGCGCAGTAAGACA CTTGCTGTGCGGATACAACG	<i>tssM</i> geno raiškos matavimui
CDI_5Fwd_final_short CDI_5Rev_final_short	GCTGATGACCTGACAGCA TAAACGACCTGTAATAGCCGCACTGACATTA TTCGCCCC	<i>cdiBAI</i> regiono delecijai
CDI_3Fwd_final CDI_3Rev_final_gm	GGTCTATTACAGGTCGTTTACTTTAAATAG CGTTCAAGCCGAGATGAATTCGATCACCCCAA ATCTTACTCCAATCG	<i>cdiBAI</i> regiono delecijai
Cdi_Imm_F Cdi_Imm_R	TTAAAGTAAACGACCTGTAATAGACC CATGATCGATTTTGTTAAAGAATTACTGTC	<i>cdiI</i> geno padauginimui
CDI1F CDI1R	GGTAAATGGCCGCAATAGCATA TGCTGTGAGGTGCAATCAGC	<i>cdiBAI</i> raiškos matavimui
galU_Up_F galU_Up_R	GTCCGTAAAAATTTAGGTTT CAAATAGTTAAAGCAGAGCTACGTAGAACTGCT TTTTAATCAT	Priešsrovinio <i>galU</i> regiono padauginimui
galU_Dwn_F galU_Dwn_R_gmR	GTAGCTCTGCTTAACTATTTG CGTTCAAGCCGAGATGAATTCGATCCGGAATA AAATTTCTTTTGTGTTG	Pasrovinio <i>galU</i> regiono padauginimui
galU_check galU_check2	CTGCTTCCATGCCGTAACATA TTGTTTCCATGCGGTTACTA	<i>galU</i> delecijos regiono sekvenavimui
galU_compl_F galU_compl_R	CATGATTA AAAAGGCAGTTTTACCT CAAATACTTAAAGCAGAGCTAC	<i>galU</i> geno padauginimui

Amp^R – atsparumas ampicilinui; Gm^R – atsparumas gentamicinui.

Bakterijų auginimo sąlygos.

Visos bakterijos auginamos aerobinėmis sąlygomis esant 37°C arba 30°C temperatūrai. Augimo terpės, kur reikėjo, buvo praturtintos antibiotikais: ampicilinu (iki 100 µg/ml), gentamicinu (10 µg/ml), ceftazidimu (10 µg/ml). Visi eksperimentai su kamienais ir izoliatais, reikalaujančiais atitinkamo biosaugos lygio, atlikti griežtai vadovaujantis darbo su jais taisyklėmis.

Plazmidžių konstravimas.

IPTG indukuojama plazmidė (pUC_gm_AcORI_Ptac_gfp_TER), gebanti amplifikuotis *A. baumannii* ir *E. coli* kamienuose sukonstruota perkeliama *Acinetobacter sp. ori* seką iš pWH1266 į pUC19. Tai pat į ją, iš pKK223–3 ir pAcGFP1-C3 plazmidžių, įklonuota transkripcijos terminacijos seka (TER), *P_{tac}* promotorius, ir *gfp* genas. Nuo indukcijos priklausoma reguliacija užtikrinta į plazmidę įklonuojant *lacI^f* geną iš *E. coli* BL21 kamieno. Plazmidėi atsparumą suteikė arba natyvi atsparumo ampicilinui determinantė, arba vietoj pastarosios įklonuota *aac3I* kasetė iš klinikinio *A. baumannii* izoliato, suteikianti atsparumą gentamicinui (plazmidė pUC_gm_AcORI_Ptac_gfp_TER_gm). Tiksliniai fragmentai į indukuojamą plazmidę įklonuoti pakeičiant *gfp* geną. Plazmidė su pašalintu *gfp* genu naudota kaip kontrolė. Delecijoms skirta plazmidė pUC19_ *sacB* sukonstruota *sacB* geną, padaugintą nuo *B. subtilis* genomines DNR, įklonuojant į pUC19.

***A. baumannii* delecinių mutantų kūrimas.**

Delecijos įvestos pagal anksčiau Oh ir kt., (2015) aprašytą metodiką. Trumpai, ~1 kilobazės ilgio priešsroviniai ir pasroviniai taikinio sekos regionai padauginėti ir sulieti su *aac3I* genu, koduojančiu atsparumą gentamicinui. Gauti fragmentai įklonuoti į delecijoms įvesti skirtą plazmidę pUC19_ *sacB*. Sukonstruotos plazmidės atrinktos *E. coli* JM107 kamieno. Plazmidės išskirtos ir transformuotos į reikalingą *A. baumannii* kamieną elektroporacijos būdu. Kolonijos, su integruota į genomą plazmidė, atrinktos ant terpės su gentamicinu. Kelios išaugusios kolonijos 4 valandoms inokuliuotos į skystą terpę be antibiotiko ir inkubuotos 37°C temperatūroje purtant. Po inkubacijos, kultūros išsėtos ant agarizuotos LB terpės su 10 % sacharozė. Tokios sąlygos lemia tai, kad yra atsirenkamos tik tos bakterijos, kurios netenka plazmidės. Taip yra dėl levansukrazės (*sacB*) geno produkto vykdomos reakcijos, kurios produktai yra toksiški

Gram-neigiamoms bakterijoms. Netekusios plazmidės bakterijos gali būti identiškos tėviam organizmui, arba su įvesta taikinio delecija, jeigu plazmidė yra pašalinama per antrines homologines sekas (t.y. kitas, nei integravosi). Deleciniai mutantai atrinkti darant kolonijų PGR. Visos įvestos delecijos taip pat patikrintos ir sekvenuojant padaugintus regionus, apimančius delecijas.

A. baumannii bioplėvelių formavimas.

Naktinės *A. baumannii* kultūros, augintos skystoje TSB terpėje esant 37°C temperatūrai purtant, praskiestos su 4 kartus vandeniu skiesta TSB terpe iki laštelių tankio 10⁶ kolonijas formuojančių vienetų 1 mililitre terpės (CFU/ml). Bakterijų skiedimai inokuliuoti į 150 μl bendrą tūrį 96 šulinėlių mikroplokštelės šulinėliuose. Plokštelės toliau inkubuotos stacionariai 24 valandas esant 37°C aplinkos temperatūrai drėgnomis sąlygomis. Po inkubacijos, šulinėliai 2-3 kartus plauti su dejonizuotu vandeniu ir 15 minučių dažyti su 0,1 % kristalo violeto vandeniniu tirpalu. Po dažymo, šulinėliai vėl 2-3 kartus praplauti dejonizuotu vandeniu. Bioplėvių kiekis įvertintas kristalo violetą eliuojant į 33 % vandeninį acto rūgšties tirpalą ir išmatuojant jo optinę sugertį, esant 580 nm bangos ilgiui. Gauta vertė normalizuota pagal bendrą bakterijų prieaugį išmatavus sugertį, esant 600 nm bangos ilgiui. Visi matavimai vykdyti Tecan Infinite® 200 PRO spektrofotometru (Tecan). Eksperimentai buvo kartoti tris kartus po du techninius pakartojimus.

Judrumo terpės paviršiuje vertinimas.

Šviežia naktinė bakterijų kultūros kolonija, augusi ant agarizuotos TSB terpės, inokuliuota į 90 mm skersmens Petri lėkštelę su paruošta ir 80 minučių laminarinėje traukos spintoje džiovinta judėjimo terpe (4 kartus dejonizuotu vandeniu skiesta TSB terpė su 0,25 % agaru (Roth)). Bakterijos inokuliuotos mažu automatinės pipetės antgaliu praduriant terpę iki dugno Petri lėkštelės centre. Inokuliuotos kultūros toliau buvo stacionariai inkubuojamos drėgoje aplinkoje 24 valandas. Judėjimas įvertintas matuojant išaugusios bakterijų kultūros zonos skersmenį. Eksperimentai kartoti tris kartus.

Pelikulės formavimas.

Naktinės *A. baumannii* kultūros, augintos skystoje TSB terpėje esant 37°C temperatūrai purtant, buvo praskiestos šviežia terpe iki 10⁶ CFU/ml

ląstelių tankio. Suspensijos toliau inokuliuotos į 12 šulinėlių mikroplokštelės šulinėlius (TPP) 3 ml bendrame tūryje ir inkubuotos stacionariai 30 valandų esant 30°C aplinkos temperatūrai. Suformuotos pelikulės automatinės pipetės antgaliu perkeltos į švarius Eppendorf mėgintuvėlius prieš tai į šulinėlį įpylus 200 μl 2-propanolio. Perkeltos pelikulės suspenduotos 500 μl 10 mM NaOH tirpale ir iš karto neutralizuotos HCl tirpalu. Biomassė kiekybiškai įvertinta išmatuojant optinę sugertį esant 600 nm bangos ilgiui. Eksperimentai kartoti tris kartus.

Baltymų sekrecija.

Visuminis į augimo terpę išskirtų baltymų profilis vertintas 30 valandų 30°C TSB terpėje augintose stacionariose kultūrose. Ląstelės iš terpės buvo pašalintos kultūras centrifuguojant 10000 g 10 minučių esant 4°C temperatūrai. Kultūrų supernatantai papildomai filtruoti per 0,22 μm porų dydžio filtrus. Baltymai iš supernatantų išsodinti trichloracto rūgštimi (10 % galutinė koncentracija) centrifuguojant 15000 g greičiu 60 minučių esant 4°C temperatūrai. Nuosėdos du kartus praplautos šaltu acetonu ir išdžiovintos kelias minutes inkubuojant 95°C temperatūroje. Paruošti mėginiai suspenduoti mėginio užnešimo buferyje (62.5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2,5 % NDS; 0,002 % bromfenolio mėlynasis; 5 % 2-merkaptoetanolio; 10 % glicerolio) ir analizuoti frakcionuojant 12,5 % arba 15 % natrio dodecilsulfato poliakrilamidiniame gelyje taikant standartinę Lemli elektroforezės sistemą (NDS-PAGE). Baltymai vaizdinti gelius dažant Coomassie mėlynuoju.

RNA skyrimas ir tikro laiko PGR.

Naktinės *A. baumannii* kultūros, augintos skystoje TSB terpėje esant 37°C temperatūrai purtant, praskiestos 4 kartus vandeniui skiestoje šviežioje augimo terpėje iki ląstelių tankio 10⁶ CFU/ml ir inokuliuotos į 96 šulinėlių mikroplokštelės šulinėlius 200 μl bendrame tūryje. Plokštelės toliau inkubuotos Tecan Infinite® 200 PRO spektrofotometre 37°C temperatūroje purtant iki vidurio logaritmo augimo fazės (optinė sugertis ties 600 nm = 0,35-0,4). RNR išskirta naudojant GeneJET RNA gryninimo rinkinį, genominė DNR pašalinta su deoksiribonukleaze I, kopijinė DNR susintetinta naudojant RevertAid First Strand cDNA Synthesis rinkinį (visi Thermo Fisher Scientific) su atsitiktiniais pradmenimis. Paruoštos RNR koncentracija išmatuota Nanodrop (Thermo Fisher Scientific), o

integralumas patikrintas 1 % nedematuojančiame agarozės gelyje. Realus laiko PGR atliktas su pradmenimis nurodytais Lentelėje 1. Detekcijai naudotas interkaluojantis Syto 9 dažas (Invitrogen). Reakcijos vykdytos tikro laiko termocikleryje CFX Real-Time System (Bio-Rad). Analizė atlikta įrenginio programine įranga. Visiems taikiniams, naudojant *A. baumannii* V15 genomines DNR skiedimus. Nustatytas pradmenų dauginimo efektyvumas siekė 95 – 107 % (koreliacijos koeficientas $R^2 > 0,99$). Iš viso atlikti trys nepriklausomi eksperimentai su dviem techninėmis replikomis kiekviename. Susidariusio produkto specifškumas įvertintas lydimosi kreivės analize. Raiškos pokyčiai įvertinti $\Delta\Delta C_t$ metodu, naudojant *rpoB* geno raišką kaip endogeninę kontrolę.

Tarpbakterinė konkurencija.

Naktinės *A. baumannii* kultūros, augintos skystoje TSB terpėje esant 37°C temperatūrai purtant, du kartus praplautos švaria augimo terpe ir praskiestos iki 10⁸ CFU/ml koncentracijos. Paruoštos skirtingų bakterijų kultūros sumaišytos įvairias santykiais (agresorius:auka, tikslus santykis nurodytas prie kiekvieno eksperimento). 5 μ l suspensijos perkelta ir išdžiovinta ant agarizuotos TSB terpės. Konkurencijos eksperimentas vykdytas 6 valandas esant 37°C temperatūrai tamsoje. Po inkubacijos, bakterijų zonos iš agarizuotos terpės išpjautos, suspenduotos 500 μ l sterilius TSB, ir išsėtos serijiniais skiedimais ant selektyvių agarizuotų terpių bakterijų skaičiui įvertinti. Visais atvejais, *E. coli* DH5 α kamienas naudotas kaip nekonkurencinė kontrolė. Eksperimentai kartoti bent tris kartus.

Kapsulės polisacharidų frakcionavimas.

Šviežia naktinė bakterijų kultūra, augusi ant agarizuotos LB terpės, suspenduota steriliu PBS buferiu (1 ml) iki OD₆₀₀=3. Suspensija intensyviai purtyta 2 minutes ir toliau centrifuguota 10000 g 10 minučių. Į gautą supernatantą pripilta 95 % etanolio iki galutinės 75 % koncentracijos. Mišinys toliau centrifuguotas 15000 g 2 valandas, esant 4°C temperatūrai. Gautos nuosėdos suspenduotos NDS mėginio užnešimo buferyje ir analizuotos frakcionuojant 12,5 % NDS poliakrilamidiniame gelyje. Kapsulės polisacharidai vizualizuoti gelį dažant su 0,1 % (w/v) polisacharidams specifiniu Alciano mėlio (Alfa Aesar) dažu kaip aprašyta Mercaldi ir kt., (2008).

A. baumannii augimo slopinimas.

Naktinės *A. baumannii* kultūros, augintos skystoje LB terpėje esant 37°C temperatūrai purtant, praskiestos LB terpe iki ląstelių tankio 10⁶ CFU/ml. Suspensijos toliau inokuliuotos 150 µl bendrame tūryje į 96 šulinėlių mikroplokštelės šulinėlius. Plokštelės inkubuotos Tecan Infinite® 200 PRO spektrofotometre 37°C temperatūroje purtant iki kol kultūros pasiekė ankstyvąją logaritminę fazę (optinė sugertis ties 600 nm = 0,25-0,35). Į šią fazę pasiekusią kultūrą pripilta (10 µl bendrame tūryje): steriliai filtruoto bakterijų kultūrų supernatanto (kaip aprašyta aukščiau); sterilios LB terpės; steriliaus PBS buferio. Bakterijų auginimas buvo iš karto tęsiamas toliau. Eksperimentai kartoti tris kartus.

CdiA gryninimas.

Naktinės *A. baumannii* kultūros, augintos skystoje TSB terpėje esant 37°C temperatūrai purtant, praskiestos šviežia terpe iki ląstelių tankio 10⁷ CFU/ml ir inokuliuotos į 750 ml galutinį tūrį. Kultūros toliau augintos stacionariai 30 valandų esant 30°C temperatūrai. Ląstelės pašalintos kultūras centrifuguojant 10000 g 10 minučių ir gautus supernatantus papildomai filtruojant per 0,22 µm dydžio porų filtrus. CdiA išgrynintas pirmiausiai baltymus išsodinant pridėjus amonio sulfato iki 40 % galutinės koncentracijos. Išsodinta frakcija surinkta mėginius centrifuguojant 15000 g 25 minutes ir ištirpinta 10 ml 0,05 M Natrio fosfatiniame buferyje (pH 7,0), turinčiame 10 % amonio sulfato. CdiA toliau grynintas hidrofobinių mainų chromatografija. Baltymai pirmiausia užkabinti ant kolonėlės (Butyl Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare)) su 0,05 M Natrio fosfatinu buferiu (pH 7,0) turinčiu 1 M amonio sulfato. Kolonėlę praplovus, baltymai išeliuoti linijiniu gradientu į 0,05 M Natrio fosfato buferį (pH 7,0). Gryninimas atliktas ÄKTA FPLC chromatografijos sistema (GE Healthcare). CdiA turinčios frakcijos sukonzentruotos į PBS buferį su Pierce™ baltymų koncentratoriumi (Thermo Fisher Scientific), turinčiu 100 kDa dydžio perskyrimo vertę, vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis. Baltymų koncentracija įvertinta Roti®Quant Bradford assay rinkiniu (Carl-Roth), kalibracijai naudojant BSA baltymą.

CdiA dydžio nustatymas gelfiltracija.

Išgryninto CdiA baltymo molekulinė masė PBS buferyje nustatyta naudojantis Superose 12 10/300 GL gelfiltracijos kolonėle (GE Healthcare),

vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis. Kalibracinei tiesei naudoti šie dydžių standartai: Mėlynasis Dekstranas, Feritinas (440 kDa), Katalazė (232 kDa), Aldolazė (158 kDa), BSA (68 kDa) (visi Amersham Biosciences). Tėkmės greitis laikytas ties 0,6 ml/min. Kiekvienam standartui nustatytas pasiskirstymo koeficientas K_{av} , kuris apskaičiuotas pagal formulę $(V_e - V_o)/(V_t - V_o)$, kur V_e – eliuato tūris, ties kuriuo iš kolonėlės išteka baltymas (ml), V_o – kolonėlės ertmės tūris (ml), V_t – visas kolonėlės tūris (24 ml)). Kalibracinė tiesė plokštumoje nubraižyta kaip K_{av} priklausomybė nuo atitinkamo baltymo molekulinės masės dešimtainio algoritmo. Visos surinktos frakcijos patikrintos NDS poliakrilamidiniame gelyje ir vykdam auginimus, kaip aprašyta *A. baumannii* augimo slopinimas skyrelyje.

Bakterijų gyvybingumo matavimas.

Naktinės *A. baumannii* kultūros, augintos skystoje LB terpėje esant 37°C temperatūrai purtant, praskiestos LB terpe iki ląstelių tankio 10^8 CFU/ml 100 μl bendrame tūryje. Suspensija sumaišyta su 5 μl išgryninto CdiA baltymo arba PBS buferio (neigiama kontrolė). Mišinys toliau inkubuotas 37°C temperatūroje. Įvairiais laiko intervalais ant selektyvios agarizuotos LB terpės atlikti serijiniai mišinio išsėjimai likusių kolonijas formuojančių vienetų įvertinimui.

Minimalios slopinančios koncentracijos (MSK) nustatymas.

MSK nustatyta mikroplokštelėse, naudojant mikroskiedimo metodą. 50 μl kiekvieno serijinio LB terpėje padaryto CdiA skiedimo inokuliuota į mikroplokštelės šulinėlius. Į kiekvieną šulinėlį su CdiA įpilta 50 μl naktinės *A. baumannii* kultūros praskiestos LB terpe iki ląstelių tankio 10^6 CFU/ml. *A. baumannii* naktinė kultūrą prieš tai auginta LB terpėje 16 valandų esant 37°C temperatūrai ir purtant. Mikroplokštelė po inokuliacijos inkubuota 16 valandų stacionariai, esant 37°C. MSK reikšmė laikoma mažiausia CdiA koncentracija, reikalinga nuslopinti akimis stebimą bakterijų augimą.

Gyvų/žuvusių bakterijų fluorescencinė mikroskopija.

Naktinės *A. baumannii* kultūros, augintos skystoje LB terpėje esant 37°C temperatūrai purtant, 2 kartus praplautos su steriliu PBS buferiu ir praskiestos iki ląstelių tankio 10^8 CFU/ml 250 μl bendrame tūryje į 3 skirtingus mėgintuvėlius. Suspensijos centrifuguotos 5000 g 2 minutes. Ląstelės resuspenduotos: PBS buferyje (gyvų bakterijų kontrolė), 70 % vandeniniame 2-propanolio tirpale (žuvusių bakterijų kontrolė), arba

išgryninto CdiA baltymo tirpale (galutinė baltymo koncentracija 5 µg/ml). Po 30 minučių arba 3 valandų inkubacijos kambario temperatūroje, suspensijos 3 kartus praplautos steriliu PBS buferiu, sukonzentruotos iki 10⁹ CFU/ml, ir sumaišytos su SYTO9 (9,4 nM) ir propidžio jodido (42,4 nM) suspensija PBS buferyje. Bakterijos 15 min dažytos tamsoje. Nudažytos ląstelės stebėtos pro Olympus AX70 mikroskopą su UPlanApo objektyvu esant 1000 x didinimui. SYTO9 ir propidžio jodido fluorescencijai stebėti naudoti atitinkamai U-WIBA ir U-MWG filtrai. Nuotraukos apdorotos su Fiji programine įranga (Schindelin ir kt., 2012).

Statistinė analizė.

Visi palyginimai statistiškai įvertinti t-testu arba ANOVA ($p = 0,05$) su Tukey HSD *post-hoc* testu. Skaičiavimai atlikti naudojantis R programiniu paketu (3.4.4 versija). Bakterijų konkurencija vertinta naudojant dešimtainį logaritmą iš apskaičiuotų likusių kolonijas formuojančių vienetų vienam mililitrui suspensijos. Genų raiškos pokyčiai laikyti reikšmingais, jeigu skirtumas nuo endogeninės kontrolės buvo didesnis nei 2 kartai. Paveiksluose reikšmingumas žymi: n.s., nėra reikšmingumo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Visi grafikai nupiešti naudojantis QtiPlot programine įranga.

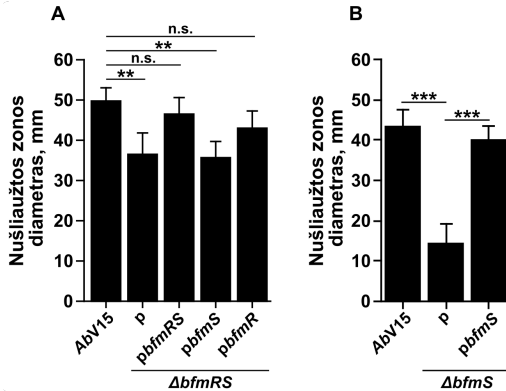
Priėjimas prie duomenų.

Nusekvenuota *A. baumannii* V15 *cdiBAI* lokuso seka pasiekama GenBank duomenų bazėje, prieigos numeris: MK405474.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Iki šiol žinomas pagrindinis *A. baumannii* BfmRS dvikomponentės sistemos (TCS) komponento – atsako regulatoriaus BfmR vaidmuo yra bioplėvelių formavimo aktyvinimas reguliuojant pilę koduojančio *csuA/BABCDE* operono raišką (Tomaras ir kt., 2008). Įdomu, kad kiti tyrimai parodė *bfmS* jutiklio svarbą *A. baumannii* judrumui augimo terpės paviršiumi – pažeidus jutiklį koduojantį geną, judėjimas yra nuslopinamas (Clemmer ir kt., 2011). Regulatoriaus BfmR vaidmuo šiame procese nėra išaiškintas. Todėl pirmoje darbo dalyje nusprendėme ištirti BfmRS svarbą oportunistinio patogeno gebėjimui judėti paviršiumi ir formuoti pelikulę. Šie fenotipai laikomi naudingomis adaptacijomis plintant ligoninių aplinkoje ir kolonizuojant šeimininkus. Taip pat, jų pasireiškimui reikalingi veiksniai gali būti panaudoti virulentiškumui (Armitano ir kt., 2014; Kentache ir kt., 2017; McQueary ir kt., 2012; Nait Chabane ir kt., 2014).

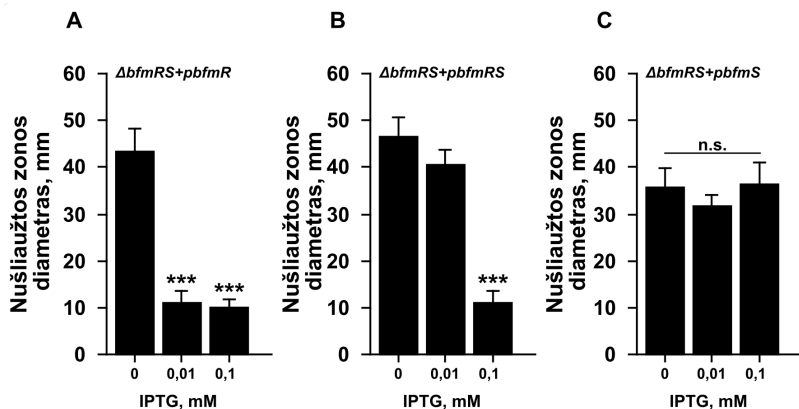
Pasirinkome klinikinį *A. baumannii* V15 izoliatą, kuris pasižymėjo visais reikalingais fenotipais – formavo bioplėveles, pelikules bei judėjo terpės paviršiumi. Šiame izoliate įvedę *bfmRS* operono deleciją parodėme, kad dvikomponentės sistemos netekimas tik nežymiai slopina judrumo paviršiumi fenotipą (30 %) (1 pav. A). Slopinimas atstatytas komplementuojant *bfmR* ir *bfmRS*, bet ne *bfmS* aleliais (1 pav. A). Skirtingai, *bfmS* delecija lėmė žymų judrumo sumažėjimą, kas atitiko kitų autorių pastebėjimus (Clemmer ir kt., 2011). Šis slopinimas atstatytas komplementuojant laukinio tipo *bfmS* aleliu (1 pav. B).



1 pav. *A. baumannii* judrumas augimo terpės paviršiumi. Pateiktas nušliaužtos zonos diametras šių kamienų: **(A)** V15 (*AbV15*), jo *ΔbfmRS* mutanto, ir *ΔbfmRS* komplementuoto plazmidėmis *pbfmR* *pbfmS*, *pbfmRS*; **(B)** *AbV15*, *ΔbfmS* mutanto su arba be komplementuojančios plazmidės *pbfmS*, esant 0,1 mM IPTG koncentracijai. Paklaidų intervalai rodo standartinį nuokrypį. **, $p < 0,01$ ***, $p < 0,001$; n.s. nereikšminga. Komplementacijai naudota kontrolinė plazmidė p.

Neseniai parodyta, kad *A. baumannii* BfmS jutiklis slopina BfmR reguliatorių (Geisinger ir Isberg, 2015), todėl išsikėlėme hipotezę, kad *ΔbfmS* mutante stebimas aiškus judėjimo slopinimas galėtų būti įtakotas aktyvaus BfmR reguliatoriaus. Yra žinoma, kad reguliatoriaus perprodukcija bakterijose dažnai lemia jo reguliuojamų genų įjungimą/išjungimą (Groisman, 2016).

Nusprendėme indukuoti *bfmR* geno, įterpto už IPTG indukuojamo promotoriaus, sintezę *ΔbfmRS* mutante, ir įvertinti šio kamieno judėjimą terpės paviršiumi. Nustatėme, kad *bfmR* ir *bfmRS*, bet ne *bfmS* indukcija, slopina *A. baumannii* klinikinio kamieno judėjimo fenotipą (2 pav. A-C).



2 pav. *A. baumannii* judrumas augimo terpės paviršiumi. Paveiksle pateikta *A. baumannii* V15 $\Delta bfmRS$ kamienų, komplementuotų plazmidėmis *pbfmR* (A), *pbfmRS* (B), *pbfmS* (C). judrumo terpės paviršiumi indukciniams judrumas. Paklaidų intervalai rodo standartinį nuokrypį. ***, $p < 0,001$ (lyginant su fenotipu neindukcinėmis sąlygomis); n.s. nereikšminga.

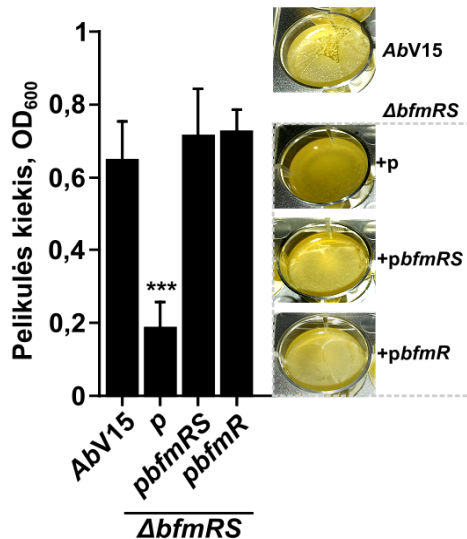
Gauti rezultatai paaiškina judėjimo slopinimą stebėtą $\Delta bfmS$ mutante (Clemmer ir kt., 2011; taip pat mūsų duomenys) ir patvirtina mūsų išsikeltą hipotezę. Gauti rezultatai rodo, kad BfmRS reguliatorius yra atsakingas ne tik už *A. baumannii* bioplėvelių formavimą, bet ir už šio patogeno judėjimo slopinimą. Pastaruoju metu beveik neabejojama, kad bioplėvelių formavimo ir judėjimo fenotipai tarpusavyje susiję, nes bakterijai energetiškai turėtų būti naudingiau vieną procesą slopinti, kai kitas yra aktyvinamas (Guttenplan ir Kearns, 2013). Mes parodėme, kad *A. baumannii* bakterijoje šiuos du procesus jungia ir reguliuoja viena dvikomponentė sistema BfmRS.

Toliau nusprendėme įvertinti, ar BfmRS sistema yra atsakinga už pelikulės formavimą. Šis į bioplėvelę panašus fenotipas yra būdingas kai kurioms bakterijoms, tarp jų ir *A. baumannii* (Armitano ir kt., 2014). Pelikulės struktūra yra unikalus ant skysčio paviršiaus formuojamos bioplėvelės tipas, kuris leidžia bakterijoms susiburti į vientisą plaukiojančią struktūrą (Armitano ir kt., 2014). Toks fenotipas bakterijų kolonijai suteikia tiesioginį priėjimą prie

deguonies, maisto medžiagų, ir leidžia lengvai plisti per skysčių lašelius (Armitano ir kt., 2014; Nait Chabane ir kt., 2014).

Pelikulių formavimą vertinome *A. baumannii* kultūras augindami 30°C temperatūroje stacionariai, nes pastebėta, kad tokios sąlygos yra tinkamesnės šiam fenotipui (Armitano ir kt., 2014; Giles ir kt., 2015). Nustatėme, kad *bfmRS* operono delecija lemia pelikulės fenotipo praradimą, kuris buvo atstatytas komplementuojant plazmidėmis su *bfmRS* operonu arba *bfmR* aleliu net ir neindukcinėmis sąlygomis (3 pav.).

3 pav. *A. baumannii* pelikulės kiekio įvertinimas. Vertinti kamienai: V15 (*AbV15*), jo $\Delta bfmRS$ mutanto, ir $\Delta bfmRS$ komplementuoto plazmidėmis *pbfmR* ir *pbfmRS*. Paklaidų intervalai rodo standartinį nuokrypį. ***, $p < 0,001$ (lyginant su laukiniu tipu). Komplementacijai naudota kontrolinė plazmidė p. Grafiko dešinėje yra pateiktos šulinėlių su pelikulėmis fotografijos.

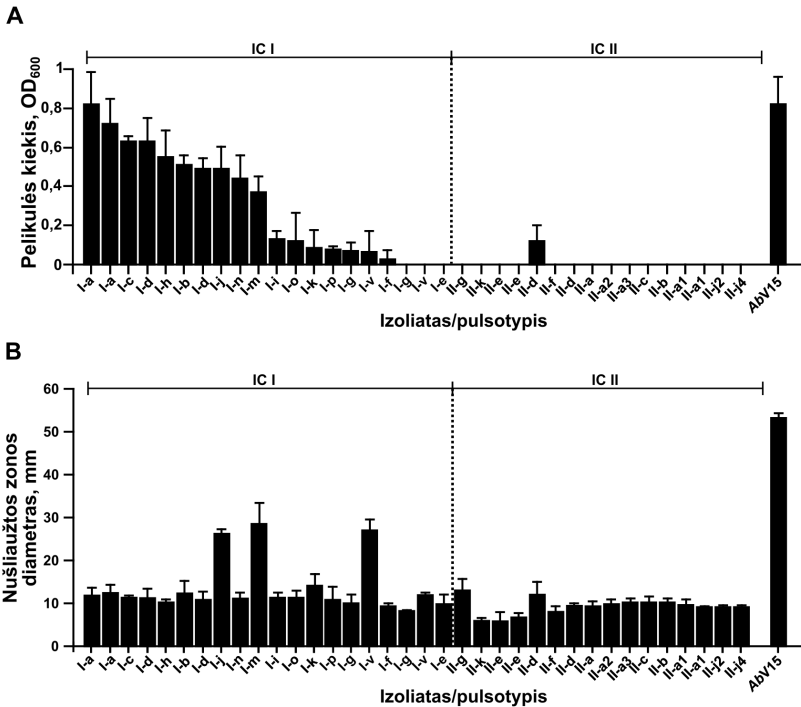


Gauti rezultatai liudija, kad: pirma, BfmR reguliatorius skatina sėslią *A. baumannii* fiziologinę būseną, aktyvindamas pelikulės susidarymą ir slopindamas judėjimo fenotipą; antra, mūsų rezultatai neprieštaruoja anksčiau iškeltai hipotezei, kad BfmS jutiklis slopina BfmR, ir tai, kad šio reguliatoriaus valdomi fenotipai gali būti atstatyti komplementuojant pavieniu *bfmR* aleliu (Geisinger ir kt.,

2018; Geisinger ir Isberg, 2015). Verta pastebėti, kad kol kas nėra iki galo aiškus šios reguliacijos mechanizmas.

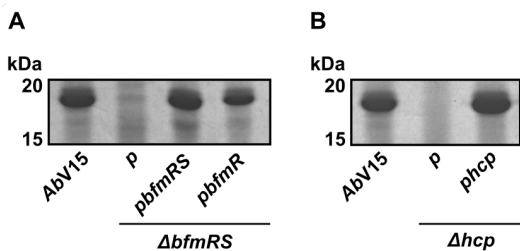
Buvo nuspręsta patikrinti, kaip yra paplitę pelikulės ir judėjimo terpės paviršiumi fenotipai tarp klinikinių *A. baumannii* izoliatų. Tikrinimui pasirinkome reprezentatyvius izoliatų iš skirtingų genotipiškai artimų grupių – pulsotipų (Povilonis ir kt., 2013). Visi izoliatai pagal genetinį panašumą gali būti priskirti dviem didelėms grupėms – tarptautiniam klonui I (IC I) ir II (IC II). Pastaruoju metu šioms grupėms priskiriami klonai yra labiausiai paplitę visame pasaulyje (Wright ir kt., 2014). Tarpusavyje jie skiriasi keliomis klinikoje svarbiomis savybėmis: IC II klonai demonstruoja gausesnį bioplėvelių formavimą ir efektyvesnę adheziją prie plaučio epitelio ląstelių (de Breij ir kt., 2010; Giannouli ir kt., 2013). Tuo tarpu IC I klonai yra labiau atsparesni išdžiūvimui ir geba judėti trukčiojant (Eijkelkamp ir kt., 2011; Giannouli ir kt., 2013). Neseniai pastebėta, kad skirtingo kloniškumo izoliatai gali infekuoti tą patį pacientą (Snitkin ir kt., 2013; Wright ir kt., 2014). Tai paskatintų horizontalią genų pernašą tarp populiacijų, kas neišvengiamai lemtų didesnę genetinę įvairovę. Būtent todėl atskirų izoliatų tyrimai yra labai svarbūs (Wright ir kt., 2014).

Įvertinę pelikulės formavimo fenomeną tarp klinikinių klonų nustatėme, kad fenotipas buvo būdingas beveik išskirtinai tik IC I tipo klono izoliatams (4 pav. A). Šis fenotipas nepriklausė nuo gebėjimo judėti terpės paviršiumi (4 pav. B). Rezultatai rodo, kad bent tarp klinikinių izoliatų, pelikulių formavimas ir judėjimas nėra susiję.



4 pav. *A. baumannii* izoliatų, priskiriamų tarptautiniams klonams (IC) I ir II, pelikulės kiekio (A) ir judėjimo augimo terpės paviršiumi (B) kiekybinis įvertinimas. Raidės ir romėniški pavadinimai nurodo pulsotipą ir kloniškumą pagal Povilonis ir kt., (2013). *A. baumannii* V15 (AbV15) kamienas buvo naudojamas kaip teigiama pelikulės formavimo ir judėjimo kontrolė.

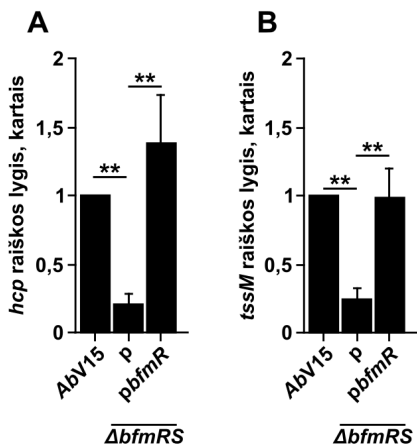
Neseniai atlikta proteominė pelikulių analizė parodė, kad joje esančiose ląstelėse yra padidėjusi virulentiškumo genų raiška (Kentache ir kt., 2017). Nustatę BfmRS sistemos svarbą pelikulių formavimui, nusprendėme įvertinti, ar sistemą reguliuoja ir papildomų komponentų sekrecija į bakterijų augimo terpę. Palyginome į terpę išskirtus baltymus tarp laukinio tipo ir jo *AbfmRS* mutanto. Baltymai iš bakterijų supernatantų buvo išsodinti trichloracto rūgštimi ir analizuoti NDS poliakrilamido gelyje.



5 pav. *A. baumannii* demonstruojamos baltymų sekrecijos į augimo terpę įvertinimas. Paveikslas rodo 12,5 % NDS poliakrilamidinio gelio dalis, su Hcp sekrecijos į augimo terpę pokyčiais stebimus kamienuose: **(A)** V15 (*AbV15*), jo *ΔbfmRS* mutanto, ir *ΔbfmRS* komplementuoto plazmidėmis *pbfmRS*, *pbfmR*; **(B)** *AbV15*, jo *Δhcp* mutanto, ir *Δhcp* komplementuoto plazmide *phcp*. Komplementacijai naudota kontrolinė plazmidė p.

sistemos (T6SS) komponentas – Hcp baltymas. Baltymo tapatybę taip pat patvirtinome nustatę, kad Hcp baltymas nesintetinamas *Δhcp* mutante, o sintezė atstatoma komplementavus su plazmide, turinčia laukinį geno alelį (5 pav. B). Sekrecijos sumažėjimas koreliavo ir su reikšmingai sumažėjusia *hcp* ir *tssM* genų raiška (6 pav. A ir B). Abu genai koduoja T6SS veikimui būtinuosius komponentus (Coulthurst, 2019; Weber ir kt., 2013).

6 pav. T6SS esminių genų raiškos pokyčio *A. baumannii* vertinimas. Tirti genai: *hcp* **(A)** ir *tssM* **(B)**. Tirti kamienai: V15 (*AbV15*), *ΔbfmRS*, ir *ΔbfmRS* su plazmide *pbfmR*. Komplementacijai naudota kontrolinė plazmidė p. Pokyčiai įvertinti lyginant su laukinio tipo kamieniu, kurio raiška prilyginta 1. Paklaidų intervalai rodo standartinį nuokrypį. **, $p < 0,01$.



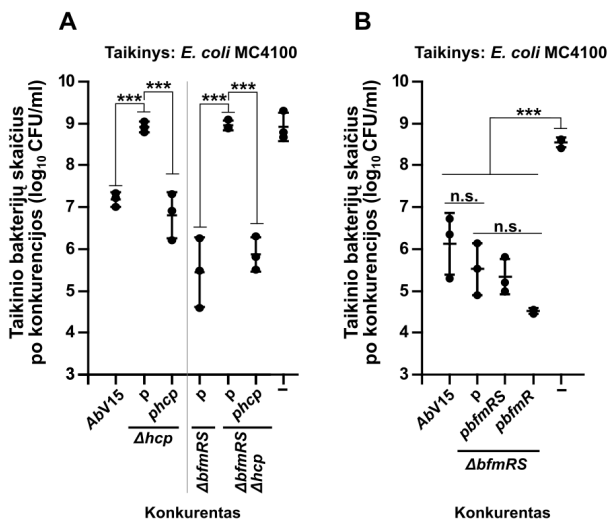
Įvertinę į augimo terpę išskirtus baltymus, parodėme, kad *bfmRS* delecija lemia žymų ~18 kDa dydžio baltymo kiekio sumažėjimą (5 pav. A). Masių spektrometrija nustatėme, kad tai yra *A. baumannii* VI tipo sekrecijos

Gauti rezultatai leidžia manyti, kad *A. baumannii* BfmRS sistema yra atsakinga už T6SS sistemos aktyvinimą.

T6SS sistema koduojama beveik ketvirtadalyje visų proteobakterijų genomų ir naudojama tarpbakterinei konkurencijai (Coulthurst, 2019). Suformavus abi membranas perveriantį, bent 13 baltymų kompleksą su adatos struktūra, į ląstelės išorę ar kitą ląstelę (tai gali būti bakterija arba eukariotinė ląstelė) sekretuojami įvairūs veiksniai. Hcp baltymai formuoja vidinį adatos pavidalo nanovamzdelį, kuriuo veiksniai išstumiami į išorę (Coulthurst, 2019). Išstumtas vamzdelis atgal į ląstelę nėra įtraukiamas ir subyra į monomerus ląstelės išorėje. Hcp baltymo aptikimas augimo terpėje laikomas vienu pagrindinių sistemos aktyvumo indikatorių (Pukatzki ir kt., 2009).

Nustatę, kad *bfmRS* mutante Hcp sekrecija yra nuslopinta (žr. aukščiau), tikėjomės nustatyti gebėjimo nukonkuruoti kitas bakterijas skirtumą tarp V15 laukinio tipo ir jo $\Delta bfmRS$ mutanto, kaip aprašyta „medžiagos ir metodai“ skyriuje.

Pirmiausiai įvertinome, ar *A. baumannii* V15 laukinis tipas ir jo $\Delta bfmRS$ mutantas naudoja T6SS sistemą tarpbakterinėje konkurencijoje. Į pasirinktus kamienus įvedėme *hcp* geno deleciją ir atlikome tarpbakterinės konkurencijos eksperimentus naudodami *Escherichia coli* MC4100 kamieną kaip auką. Nustatėme, kad tiek laukinis tipas, tiek jo $\Delta bfmRS$ mutantas reikšmingai sumažino *E. coli* kolonijas formuojančių vienetų skaičių, o *hcp* geno delecija šį fenotipą visiškai išveiklino (7 pav. A). Konkurencijos fenotipas *hcp* geno mutantuose buvo atstatytas juos komplementuojant laukinio tipo aleliu (7 pav. A). Tai rodo, kad laukinis tipas ir jo $\Delta bfmRS$ mutantas naudoja T6SS tarpbakterinei konkurencijai. Deja, bet palyginę tarpbakterinės konkurencijos efektyvumą tarp laukinio tipo ir jo $\Delta bfmRS$ mutanto, reikšmingo skirtumo nenustatėme. Fenotipas taip pat nepriklausė ir nuo $\Delta bfmRS$ mutanto komplementacijos plazmidėmis *pbfmR* ar *pbfmRS* (7 pav. B).

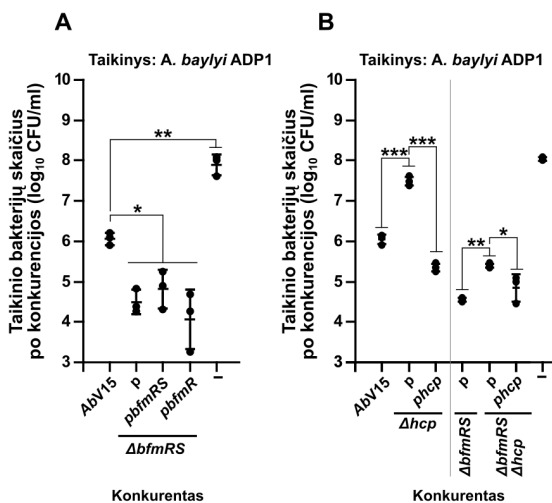


7 pav. Tarpbakterinės konkurencijos vertinimas, rodantis išlikusį *E. coli* MC4100 taikinio bakterijų kiekį. Kaip konkurentai naudoti kamienai: **(A)** *A. baumannii* V15 (*AbV15*), *ΔbfmRS*, ir jų *Δhcp* mutantai be arba su komplementuojančia plazmide *phcp*; **(B)** *AbV15*, *ΔbfmRS*, ir *ΔbfmRS* be arba su komplementuojančia plazmide *pbfmR* arba *pbfmRS*. Konkurencijai naudotas konkurento ir aukos santykis – 10:1. Horizontalios linijos rodo vidurkį. Paklaidų intervalai rodo standartinį nuokrypį. ***, $p < 0,001$; n.s. nereikšminga. Komplementacijai naudota kontrolinė plazmidė p.

Šie rezultatai rodo, kad *A. baumannii* V15 kamieno BfmRS sistema nėra atsakinga už T6SS lemiamą tarpbakterinę konkurenciją. Nepaisant to, padidėjusi Hcp sekrecija į terpę gali sąlygoti papildomas, su tiesiogine T6SS veikla nesusijusias funkcijas. Yra žinoma, kad kai kuriuose organizmuose T6SS sistemos prisideda prie ribojamų metalo jonų paėmimo iš aplinkos ar dalyvauja bioplėvelių formavime (Coulthurst, 2019; Gallique ir kt., 2017).

Naudodami *hcp* geno mutantus, įvertinome ar *A. baumannii* T6SS prisideda prie bioplėvelių formavimo fenotipo. Rezultatai parodė, kad veikli T6SS nėra reikalinga *A. baumannii* bioplėvelėms formuoti (duomenys neparodyti). Taigi, padidinta Hcp sekrecijos į terpę reikšmė kol kas nėra iki galo aiški.

Toliau įvertinome *A. baumannii* konkurenciją su *Acinetobacter baylyi* ADP1 kamieniu tikėdamiesi, kad dėl genetinio artumo, konkurencija su šia auka bus labiau specifiškesnė ir tai lems skirtumą tarp laukinio tipo ir jo $\Delta bfmRS$ mutanto. Rezultatai parodė, kad $\Delta bfmRS$ delecija lėmė agresyvesnį mutanto fenotipą, kuris nepriklausė nuo komplementacijos *pbfmR* ar *pbfmRS* plazmidėmis (8 pav. A). Atlikus tarpbakterinę konkurenciją su *A. baumannii* $\Delta bfmRS\Delta hcp$ dvigubu mutantu, nustatėme, kad nepaisant dėl *hcp* geno delecijos išveiklintos T6SS sistemos, mutantas, palyginus su Δhcp mutantu, vis tiek turėjo aiškų konkurencijos fenotipą (8 pav. B).



8 pav. Tarpbakterinės konkurencijos vertinimas, rodantis išlikusį *A. baylyi* ADP1 taikinio bakterijų kiekį. Eksperimente kaip konkurentai naudoti kamieniai: **(A)** *A. baumannii* V15 (*AbV15*), jo $\Delta bfmRS$, ir $\Delta bfmRS$ be arba su komplementuojančia plazmide *pbfmR* arba *pbfmRS*; **(B)** *AbV15*, $\Delta bfmRS$, ir jų Δhcp mutantai be arba su komplementuojančia plazmide *phcp*. Eksperimente naudotas 10:1 konkurento aukos santykis. Horizontalios linijos rodo vidurkį. Paklaidų intervalai rodo standartinį nuokrypį. *, $p < 0,0$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Komplementacijai naudota kontrolinė plazmidė p.

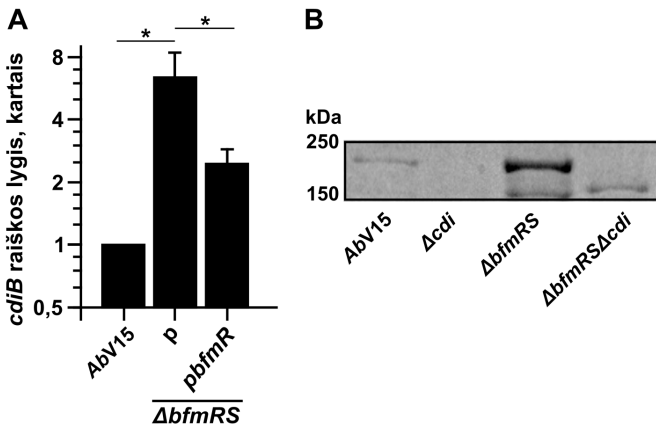
Gautas rezultatas leido manyti, kad *bfmRS* operono delecija lėmė papildomo konkurencijos mechanizmo aktyvinimą. Pastaraisiais metais aprašytas naujas bakterijų konkurencijos mechanizmas, vadinamas nuo kontakto priklausomu augimo slopinimu (CDI) (Aoki ir kt., 2005; Hayes ir kt., 2014). Tai yra V tipo sekrecijos sistemos atmaina, sudaryta iš trijų komponentų: CdiB β -statinės membraninio nešiklio, kuris per bakterijos išorinę membraną perneša CdiA baltymą-efektorių. CdiA savo receptoriaus domenu gali atpažinti ir prisijungti išorinius bakterijos-taikinio baltymus. Tokios sąveikos dėka, C-galo toksinis CdiA domenas (CdiA-CT) yra transportuojamas į taikinio ląstelę, kur, dėl savo aktyvumo, lemia bakterijos augimo stabdymą arba jos žūtį. Trečiasis komponentas, imuniteto baltymas CdiI, saugo šeimininką nuo toksinio domeno poveikio (Hayes ir kt., 2014). Tyrimai rodo, kad CDI veikimui yra būtinas ląstelės-ląstelės kontaktas (Hayes ir kt., 2014), o CDI slopinimas yra labai specifinis – veikia tik prieš tos pačios rūšies bakterijas ir tik retais atvejais yra veiksmingas prieš artimos rūšies atstovus. Spėjama, kad tai užtikrina CdiA receptoriaus domeno specifiškumas taikiniui (Hayes ir kt., 2014; Ruhe ir kt., 2013). Svarbu paminėti ir tai, kad CDI vykdoma tarpbakterinė konkurencija neseniai buvo nustatyta ir *Acinetobacter* genties bakterijose (Harding ir kt., 2017). Tai mums leido iškelti hipotezę, kad BfmRS sistema gali reguliuoti CDI sukeltą slopinimą.

Mes identifikavome *A. baumannii* V15 kamieno koduojamą CDI sistemą ir nustatėme jos nukleotidų seką. Pagal De Gregorio ir kt. (2019) pasiūlytą CDI sistemų klasifikaciją, *A. baumannii* V15 koduoja I tipo CDI sistemą, kuri yra panašiausia į *bau-A1/pit-A3*. CdiB, CdiA, ir CdiI baltymų identiškumas tarp sistemų siekė atitinkamai 98 %, 90 %, 66 %, o baltymai buvo atitinkamai sudaryti iš 579, 2154 ir 185 aminorūgščių.

Identifikavę *A. baumannii* V15 CDI sistemą, palyginome pirmojo *cdiBAI* operono geno raišką tarp laukinio tipo ir jo Δ *bfmRS* mutanto. Nustatėme ~6,4 kartų didesnę *cdiB* geno raišką operono mutante

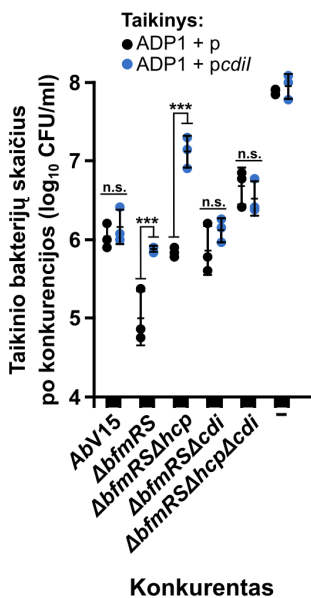
(9 pav. A). Kai *ΔbfmRS* buvo komplementuotas *pbfmR* plazmide, stebėjome CDI sistemos raiškos slopinimą (9 pav. A). Šie rezultatai rodo, kad *bfmRS* delecija aktyvina CDI sistemos raišką *A. baumannii* V15 kamieno.

Toliau nusprendėme išveiklinti CDI sistemą, įvesdami *cdiA* ir *cdiI* genų deleciją laukiniame tipe ir jo *ΔbfmRS* ir *ΔbfmRSΔhcp* mutantuose. Išveiklinome tik dalį *cdiBAI* operono, kadangi nepavyko įvesti viso regiono delecijos. Įdomu, kad delecijos įvedimas sutapo su ~200 kDa juostelės dingimu iš kultūrų supernatantų (9 pav. B). Įtardami, kad tai galėtų būti CdiA (spėjamas dydis apie 229 kDa), atlikome iš gelio išpjautos baltymų juostelės masių spektrometriją. Rezultatai patvirtino mūsų spėjimus ir parodė, kad juostelė yra panašios molekulinės masės CdiA baltymas.



9 pav. *A. baumannii* *cdiB* geno raiškos pokyčio ir baltymų sekrecijos į augimo terpę vertinimas. (A) *cdiB* geno raiškos pokytis *AbV15*, *ΔbfmRS*, ir *ΔbfmRS* komplementuoto plazmide *pbfmR*. Komplementacijai naudota kontrolinė plazmidė p. (B) 10 % NDS poliakrilamidinio gelio dalis, rodanti CdiA sekrecijos į augimo terpę pokyčius stebimus kamienuose: *A. baumannii* V15 (*AbV15*), *Δcdi*, *ΔbfmRS*, *ΔbfmRSΔcdi*. Gelio kairėje pateikti skaičiai nurodo molekulinės masės standartų dydžius kDa. Paklaidų intervalai rodo standartinį nuokrypį. *, $p < 0,05$. Juostelė buvo identifikuota masių spektrometrijos būdu.

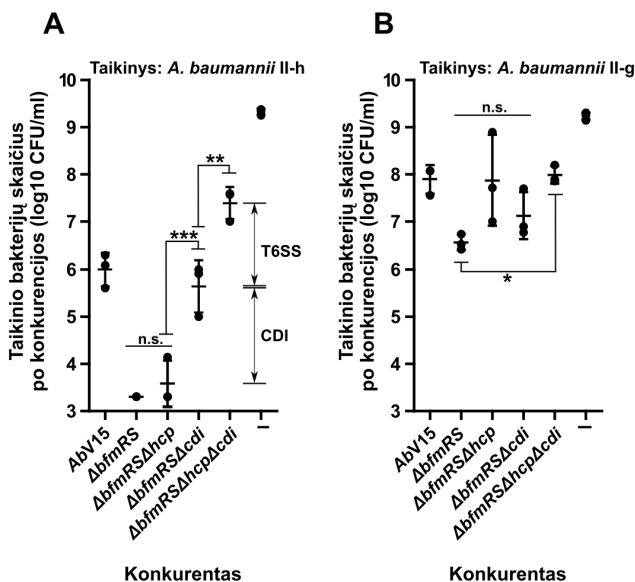
Norėdami įvertinti, ar prie stebėto didesnio *ΔbfmRS* mutanto agresyvumo prieš *A. baylyi* ADP1 kamieną prisidėjo CDI sistema, atlikome tarpbakterinės konkurencijos eksperimentus tarp ADP1 kamieno ir įvairių *A. baumannii* V15 mutantų. Taip pat, norėdami patvirtinti hipotezę, kad *A. baumannii* V15 konkurencijai naudoja ir CDI sistemą, mes ADP1 kamieną komplementavome *pcdII* plazmide, koduojančia imuniteto geną *cdiI*. Nustatėme, kad plazmidė *pcdII* iš dalies lemia apsaugą nuo *ΔbfmRS* ir *ΔbfmRSΔhcp*, bet ne nuo laukinio tipo, *ΔbfmRSΔcdi*, ir *ΔbfmRSΔhcpΔcdi* kamienų (10 pav.). Šie rezultatai patvirtina, kad *A. baumannii* BfmRS neigiamai reguliuoja šio mikroorganizmo CDI sistemą.



10 pav. Tarpbakterinės konkurencijos vertinimas, rodantis išlikusį *A. baylyi* ADP1 taikinio bakterijų kiekį. Eksperimente ADP1 kamienas buvo komplementuotas kontroline plazmide p arba plazmide *pcdII*, koduojančia imuniteto geną. Kaip konkurentai naudoti kamienai: *A. baumannii* V15 (*AbV15*), *ΔbfmRS*, *ΔbfmRSΔhcp*, *ΔbfmRSΔcdi*, *ΔbfmRSΔhcpΔcdi*. Eksperimente naudotas 10:1 konkurento aukos santykis. Horizontalios linijos rodo vidurkį. Paklaidų intervalai rodo standartinį nuokrypį. *cdiI* genas buvo indukuotas su 5 mM IPTG koncentracija. ***, $p < 0,001$; n.s. nereikšminga.

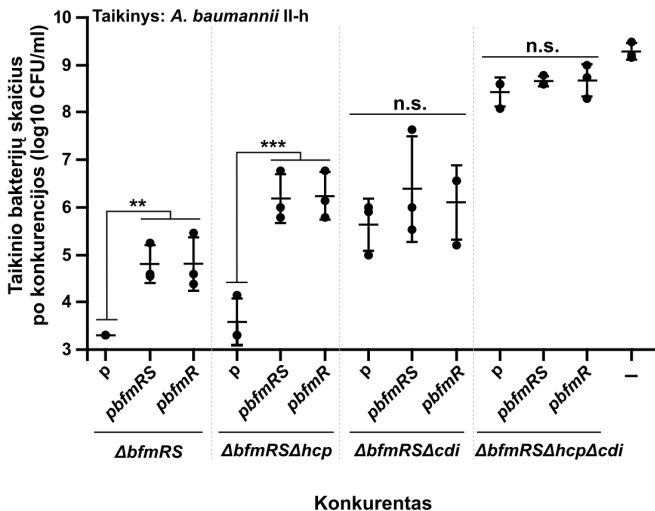
Nepaisant to, kad komplementacija *bfmR* aleliu *A. baumannii* V15 slopino CDI sistemos raišką (9 pav. A), slopinimo nematėme tarpbakterinėje konkurencijoje su *A. baylyi* ADP1 kamieniu (8 pav. A). Dėl to išsiskėlė hipotezė, kad šis fenotipas galėtų būti geriau išreikštas konkuruojant su tos pačios rūšies bakterijomis. Savo

klinikinių izoliatų kolekcijoje nustatėme du kamienus (II-g, II-h), kurie genome nekodavo CDI sistemos (tikrinta PGR su pradmenimis, specifiniais visiems žinomiems *cdiB* genams, koduojamiems *A. baumannii*), ir juos pasirinkome kaip taikinius tarpbakterinės konkurencijos eksperimentams. Kaip konkurentus pasirinkome tokius kamienus: laukinio tipo *A. baumannii* V15 ir jo mutantus: $\Delta bfmRS$ (turi aktyvią T6SS ir CDI), $\Delta bfmRS\Delta hcp$ (turi tik aktyvią CDI), $\Delta bfmRS\Delta cdi$ (turi tik aktyvią T6SS), $\Delta bfmRS\Delta hcp\Delta cdi$ (neaktyvi T6SS ir CDI). Su pasirinktais kamienais atlikti eksperimentai parodė, kad tik vienas iš jų – II-h buvo jautrus CDI sistemos sukeltam augimo slopinimui, tuo tarpu kitas kamienas (II-g) buvo atsparus (11 pav. A ir B).



11 pav. Tarpbakterinės konkurencijos vertinimas, rodantis išlikusį *A. baumannii* II-h (A) ir II-g (B) taikinio bakterijų kiekį. Kaip konkurentai naudoti kamienai: *A. baumannii* V15 (*AbV15*), $\Delta bfmRS$, $\Delta bfmRS\Delta hcp$, $\Delta bfmRS\Delta cdi$, $\Delta bfmRS\Delta hcp\Delta cdi$. Eksperimente naudotas 20:1 konkurento aukos santykis. Horizontalios linijos rodo vidurkį. Paklaidų intervalai rodo standartinį nuokrypį. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; n.s. nereikšminga.

Tarpbakterinei konkurencijai pasirinkus II-h kamieną kaip taikinį, ir įvairius *A. baumannii* V15 kamieno mutantus, komplementuotus *pbfmR* ir *pbfmRS* plazmidėmis, mes stebėjome, kad komplementacija sumažino $\Delta bfmRS$ ir $\Delta bfmRS\Delta hcp$, bet ne $\Delta bfmRS\Delta cdi$ ir $\Delta bfmRS\Delta hcp\Delta cdi$ mutantų agresyvumą (12 pav.). Gauti rezultatai patvirtina, kad *A. baumannii* V15 BfmRS sistema slopina CDI mechanizmą. Kartu jie paaiškina ir CDI sistemos raiškos slopinimo efektą, stebėtą su *bfmR* aleliu (9 pav. A).



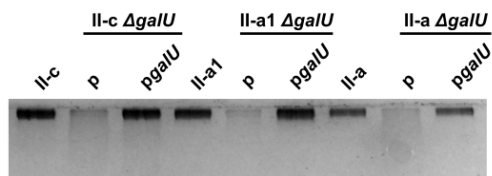
12 pav. Tarpbakterinės konkurencijos vertinimas, rodantis išlikusį *A. baumannii* II-h taikinio bakterijų kiekį. Kaip konkurentai naudoti kamienai: $\Delta bfmRS$, $\Delta bfmRS\Delta hcp$, $\Delta bfmRS\Delta cdi$, $\Delta bfmRS\Delta hcp\Delta cdi$, kurie buvo komplementuoti plazmidėmis *pbfmRS* arba *pbfmR*. Eksperimentuose naudotas 20:1 konkurento aukos santykis. Komplementacijai naudota kontrolinė plazmidė p. Horizontalios linijos rodo vidurkį. Paklaidų intervalai rodo standartinį nuokrypį. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; n.s. nereikšminga.

Toliau mes siekėme atsakyti į klausimą, kodėl iš dviejų klinikinių *A. baumannii* izoliatų, tik vienas buvo jautrus CDI poveikiui. Atkreipėme dėmesį į anksčiau nustatytus jautraus izoliato fenotipinius bruožus – jis neturėjo polisacharidinės kapsulės (Skerniškytė ir kt., 2019). Iškėlėme hipotezę, kad kapsulės struktūra

galėtų paslėpti receptorių nuo CDI sistemos ir taip apsaugoti bakteriją. Toks efektas jau buvo stebėtas *E. coli* rūšyje (Aoki ir kt., 2008), todėl mes nusprendėme patikrinti, ar už kapsulės sintezę atsakingų genų delecija klinikiniuose *A. baumannii* izoliatuose gali turėti įtakos jautrumui CDI.

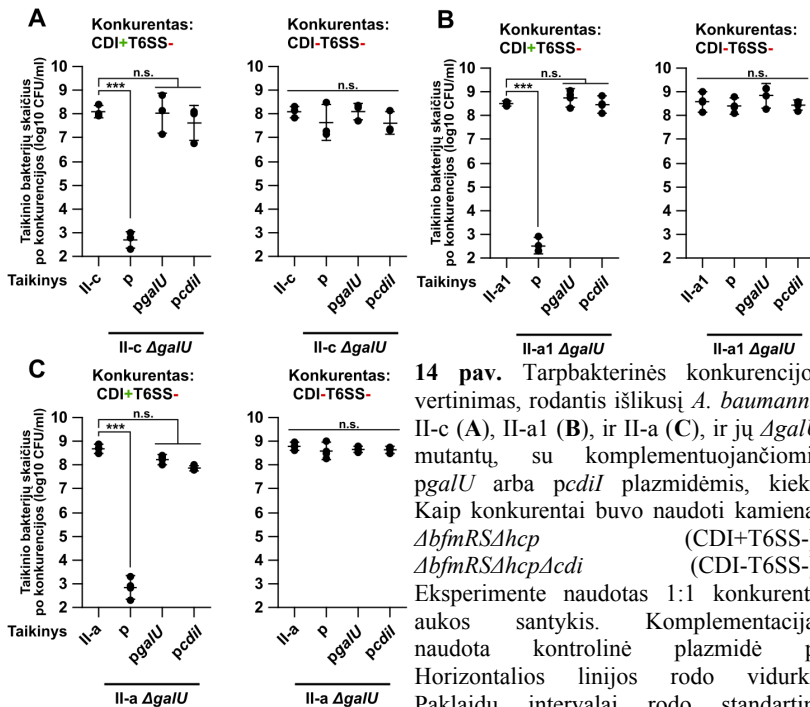
Delecijoms konstruoti iš kolekcijos buvo pasirinkti trys *A. baumannii* izoliatai (II-a, II-a1, II-c), kurie turėjo kapsulę, neturėjo imuniteto geno, ir buvo atsparūs CDI poveikiui, kai konkurencija buvo vykdoma su *A. baumannii* V15 $\Delta bfmRS$ kamieniu. Šie izoliatai skyrėsi atsparumu išdžiūvimui, hidrofobiškumu, jautrumu fagocitozei, virulentiškumu *Caenorhabditis elegans* (Skerniškytė ir kt., 2019).

I pasirinktus izoliatu įvedėme *galU* geno deleciją, kuri lemia kapsulės sintezės slopinimą (Geisinger ir Isberg, 2015). Delecijos buvo patvirtintos sekoskaita ir kapsulės polisacharidų elektroforeze poliakrilamidiniuose geliuose juos dažant Alciano mėlynuoju (13 pav.).



13 pav. *A. baumannii* kapsulės polisacharidų įvertinimas. Paveikslas rodo 12,5 % NDS poliakrilamidinio gelio dalį. Tirti *A. baumannii* klinikiniai kamieniai: II-c, II-a1, II-a, ir jų $\Delta galU$ mutantai su komplementuojančia *pgalU* arba kontroline *p* plazmide. Polisacharidai buvo nudažyti su Alciano mėlynuoju.

Tada atlikome konkurencijos tyrimus, pasirinkę $\Delta bfmRS\Delta hcp$ mutantą. Šis mutantas turi CDI slopinimo mechanizmą, tačiau neturi T6SS sistemos (CDI+T6SS-). Stebėjome akivaizdų beapsulinių *A. baumannii* izoliatų nukonkuravimą palyginu su laukiniu tipu (14 pav. A-C).



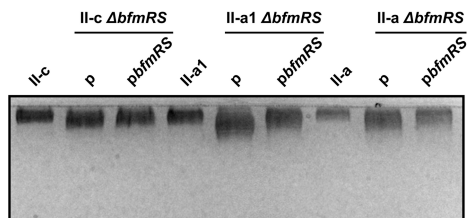
14 pav. Tarpbakterinės konkurencijos vertinimas, rodantis išlikusį *A. baumannii* II-c (A), II-a1 (B), ir II-a (C), ir jų *ΔgalU* mutantų, su komplementuojančiomis *pgalU* arba *pcdiI* plazmidėmis, kiekį. Kaip konkurentai buvo naudoti kamienai *ΔbfmRSΔhcp* (CDI+T6SS-), *ΔbfmRSΔhcpΔcdi* (CDI-T6SS-). Eksperimente naudotas 1:1 konkurento aukos santykis. Komplementacijai naudota kontrolinė plazmidė *p*. Horizontalios linijos rodo vidurkį. Paklaidų intervalai rodo standartinį nuokrypį. ***, $p < 0,001$; n.s. nereikšminga.

Kapsulės neformuojantys mutantai nuo CDI sistemos lemto augimo slopinimo buvo išgelbėti tik šiais atvejais: (1) komplementuojant laukiniu *galU* genu ir atstatant kapsulės formavimo fenotipą, (2) komplementuojant imuniteto genu iš *A. baumannii* V15 kamieno, arba (3) konkurenciją vykdant su *A. baumannii* V15 *ΔbfmRSΔhcpΔcdi* mutantu, kuris turi išveiklintas abi – T6SS ir CDI sistemas (CDI-T6SS-) (14 pav. A-C). Gauti rezultatai įrodo, kad *A. baumannii* bakterijų formuojama kapsulė lemia apsaugą nuo CDI slopinimo.

Neseniai buvo parodyta, kad *A. baumannii* BfmRS sistema teigiamai reguliuoja polisacharidinės kapsulės sintezę kai kuriuose kamienuose (Geisinger ir kt., 2018; Geisinger ir Isberg, 2015; Russo ir kt., 2016). Nusprendėme patikrinti, ar *bfmRS* išveiklinimas mūsų

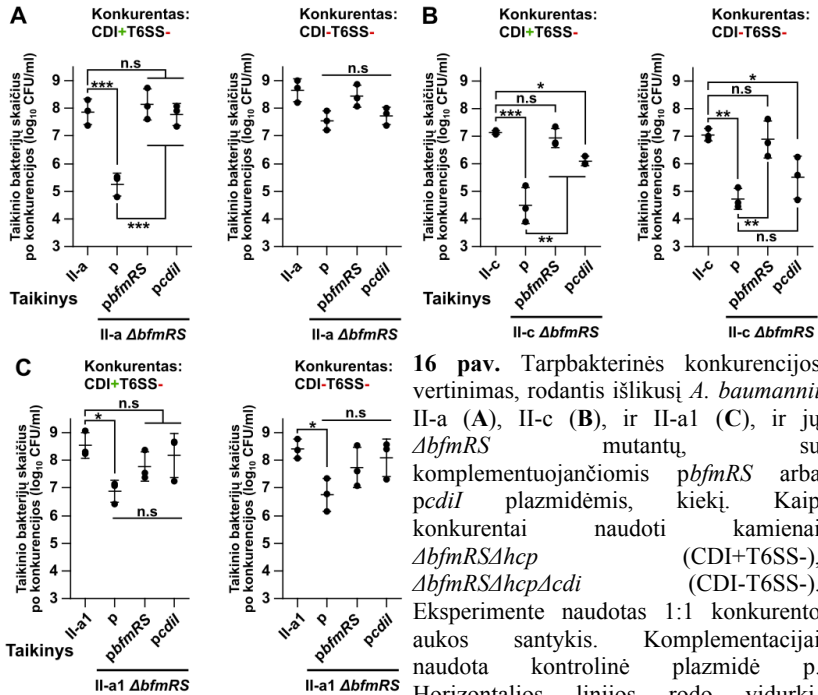
pasirinktuose izoliatuose paveiks jų jautrumą CDI poveikiui. Pirmiausiai įvertinome, kaip operono delecija paveikė šių izoliatų polisacharidinės kapsulės kiekį. Kaip matoma iš 15 paveikslo, *bfmRS* delecija, palyginus su laukiniu tipu, nelėmė aiškaus kapsulės kiekio sumažėjimo nei viename iš mutantų. Nepaisant to, mes stebėjome, kad delecijos lėmė kiek platesnį polisacharidinės kapsulės profilį, kuriam galėjo daryti įtaką sutrikusi kapsulės sintezė (15 pav.).

Manydami, kad galėjo pakisti ir mutantų jautrumas CDI slopinimui, mes atlikome ir tarpbakterinės konkurencijos eksperimentus su *A. baumannii* V15 $\Delta bfmRS\Delta hcp$ (CDI+T6SS-) ir $\Delta bfmRS\Delta hcp\Delta cdi$ (CDI-T6SS-) mutantais. Nustatėme, kad tik vieno izoliato, II-a, *bfmRS* mutantas buvo jautrus CDI slopinimui (16 pav. A). Šį mutantą išgelbėjo komplementacija tiek *bfmRS*, tiek *cdiI* aleliais, koduojančiais atitinkamai *bfmRS* operoną ir imuniteto CDI sistemai geną (16 pav. A). Kiti izoliatai, II-c ir II-a1, nerodė aiškaus jautrumo CDI slopinimui padidėjimo dėl įvestos *bfmRS* delecijos. Pirmuoju atveju stebėjome, kad delecija stipriai sumažina II-c $\Delta bfmRS$ kamieno bakterijų skaičių po konkurencijos. Tiesa, fenotipas buvo komplementuotas tik *bfmRS* operonu, bet ne *cdiI* aleliu (16 pav. B). Tai leidžia daryti prielaidą, kad jautrumas buvo bendro pobūdžio



15 pav. *A. baumannii* kapsulės polisacharidų įvertinimas. Paveikslas rodo 12,5 % NDS poliakrilamidinio gelio dalį. Tirti *A. baumannii* klinikiniai izoliatai: II-c, II-a1, II-a, ir jų $\Delta bfmRS$ mutantų su komplementuojančia *pbfmRS* arba kontroline p plazmide, kapsulės polisacharidų profilius. Polisacharidai buvo nudažyti su Alciano mėlynuoju.

dėl augimo defekto bendrose bakterijų kultūrose. Antruoju atveju, *bfmRS* delecija II-a1 izoliatai lėmė tik nedidelį po konkurencijos išlikusių bakterijų skaičiaus sumažėjimą, kurio nepavyko komplementuoti nei *bfmRS*, nei *cdiI* aleliais (16 pav. C). Apibendrinant, rezultatai rodo, kad BfmRS sistema tik kai kuriuose *A. baumannii* izoliatuose gali lemti papildomą apsaugą nuo CDI poveikio.

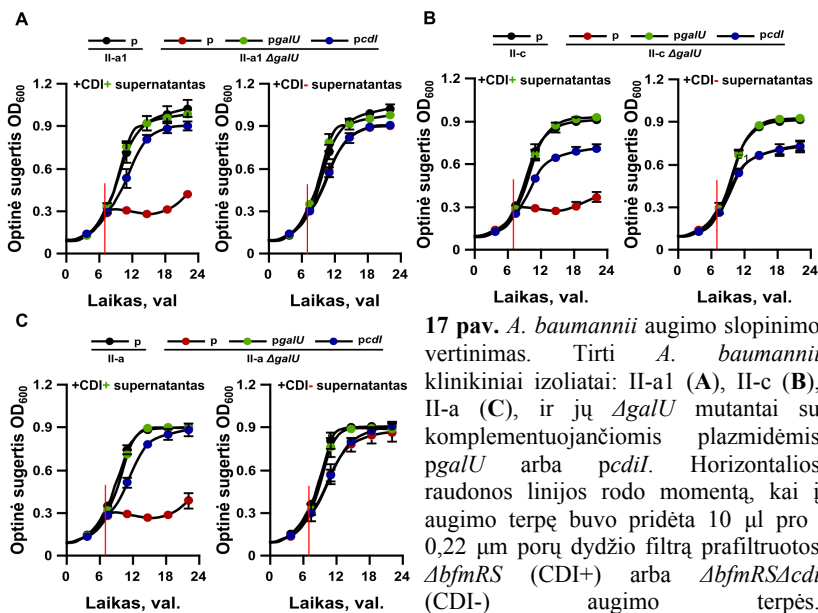


16 pav. Tarpbakterinės konkurencijos vertinimas, rodantis išlikusių *A. baumannii* II-a (A), II-c (B), ir II-a1 (C), ir jų $\Delta bfmRS$ mutantų, su komplementuojančiomis *pbfmRS* arba *pcdiI* plazmidėmis, kieki. Kaip konkurentai naudoti kamienai *AbfmRSAhcp* (CDI+T6SS-), *AbfmRSAhcpAcdi* (CDI-T6SS-). Eksperimente naudotas 1:1 konkurento aukos santykis. Komplementacijai naudota kontrolinė plazmidė p. Horizontalios linijos rodo vidurkį. Paklaidų intervalai rodo standartinį nuokrypį. *, $p < 0,05$ **, $p < 0,01$ ***, $p < 0,001$; n.s. nereikšminga.

Ankščiau buvo parodyta, kad į augimo terpę gali būti sekretuojamos tik nefunkcionalios CdiA baltymo dalys (Aoki ir kt., 2005; Webb ir kt., 2013). Neseniai paskelbti duomenys apie

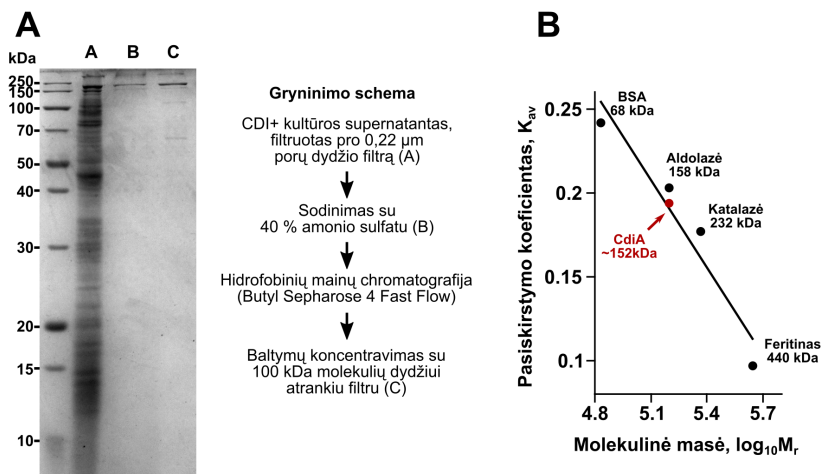
A. baumannii DSM30011 kamieno CDI sistemas. Darbo autoriai augimo terpėje identifikavo viso dydžio CdiA baltymus (Roussin ir kt., 2019). Mes taip pat stebėjome aiškia CdiA sekreciją į augimo terpę (9 pav. B), todėl išskėlėme hipotezę, kad *A. baumannii* galėtų vykdyti CDI slopinimą be ląstelės-ląstelės sąveikos.

Nustatėme, kad *A. baumannii* V15 $\Delta bfmRS$ mutanto beląstelinis augimo terpės supernatantas slopina jautrių CDI bakterijų augimą (17 pav. A-C). Slopinimo efektas nebuvo stebimas su *A. baumannii* V15 $\Delta bfmRS\Delta cdi$ mutanto supernatantu, arba jautrūs kamienai buvo komplementuojami plazmidėmis su laukiniu *galU* genu (*pgalU*) ar imuniteto genu (*pcdiI*) (17 pav. A-C). Šie rezultatai rodo, kad *A. baumannii* V15 kamieno CDI sistema gali veikti per atstumą.



17 pav. *A. baumannii* augimo slopinimo vertinimas. Tirti *A. baumannii* klinikiniai izoliatai: II-a1 (**A**), II-c (**B**), II-a (**C**), ir jų $\Delta galU$ mutantai su komplementuojančiomis plazmidėmis *pgalU* arba *pcdiI*. Horizontalios raudonos linijos rodo momentą, kai į augimo terpę buvo pridėta 10 μ l pro 0,22 μ m porų dydžio filtrą prafiltruotos $\Delta bfmRS$ (CDI+) arba $\Delta bfmRS\Delta cdi$ (CDI-) augimo terpės. Komplementacijai naudota kontrolinė plazmidė p. Paklaidų intervalai rodo standartinę nuokrypį.

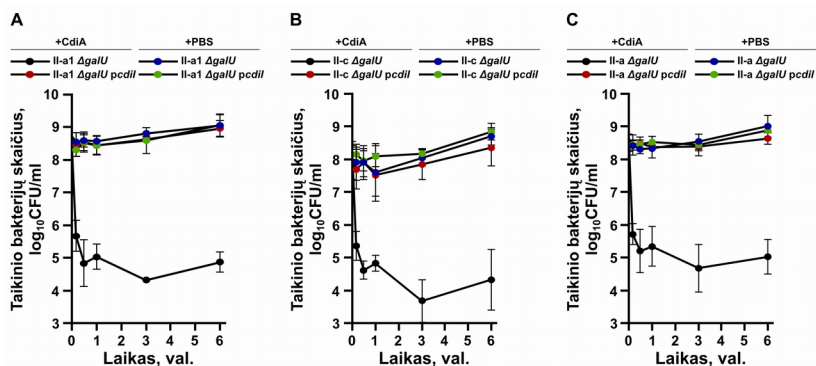
Toksinis CdiA komponentas yra baltymo C-gale (CdiA-CT) ir palyginus su visu baltymu (~229 kDa) yra nedidelio dydžio (~44 kDa). Nusprendėme įvertinti, ar į supernatantą yra išskiriamas visas CdiA, ar tik jo C-galo domenas. Naudodami išsodinimą amonio sulfatu, hidrofobinės sąveikos chromatografiją, ir baltymų koncentravimą pagal dydį, iš augimo terpės išsigryninome toksinį komponentą (iki 70 % grynumo) (18 pav. A). Naudodami gelfiltraciją, nustatėme jo molekulinę masę, kuri buvo ~152 kDa (18 pav. B). Šis rezultatas leidžia manyti, kad sekretuojama didžioji dalis CdiA baltymo.



18 pav. *A. baumannii* toksinio komponento gryninimas iš augimo terpės ir jo molekulinės masės charakterizavimas. **(A)** 12,5 % NDS poliakrilamidinis gelis, rodantis CdiA gryninimo rezultatus po kiekvienos stadijos, nurodytos paveiklo dešinėje. Gelio kairėje pusėje nurodyti molekulinio masės žymens juostelių molekuliniai dydžiai. Gelis buvo nudažytas Coomassie brilliantiniu mėlynuoju. **(B)** Kalibracinė tiesė naudota CdiA molekulinės masės įvertinimui iš gelfiltracijos rezultatų. Tiesė buvo sudaryta apskaičiuojant kiekvieno standarto pasiskirstymo koeficientą K_{av} ir nubraižant jo priklausomybę nuo standarto masės dešimtainio logaritmo. Raudonas taškas grafike rodo apskaičiuotą CdiA molekulinę masę.

Nustatyta, kad vienos CDI sistemos veikia slopinančiai, t.y. toksinis poveikis yra grįžtamas, tuo tarpu kitos CDI sistemos sukelia

ląstelių-taikinių žūtį (Aoki ir kt., 2009; Roussin ir kt., 2019). Įvertinome, koks yra *A. baumannii* V15 koduojamo CdiA toksinis poveikis. Pirmiausia įvertinome CDI slopinimo efektyvumą inkubuodami kapsulės neformuojančius *A. baumannii* izoliatus su išgrynintu CdiA baltymu. Izoliatai buvo su arba be komplementuojančios plazmidės *pcdiI*, koduojančios imunitetą nuo CDI sistemos. Kontrolinėms sąlygoms buvo pasirinkta inkubacija su PBS buferiu. Nustatėme, kad kapsulės neformuojantys *A. baumannii* mutantai, sumaišyti su išgrynintu CdiA baltymu, jau per pirmas 10 minučių rodė apie 500-1000 kartų kolonijas formuojančių vienetų sumažėjimą, kuris išsilaikė iki 6 valandų (19 pav. A-C). Bakterijų skaičius liko nepakitęs, jei jos buvo komplementuotos plazmide su imuniteto genu (*pcdiI*) arba vietoj išgryninto CdiA buvo naudojamas PBS buferis (19 pav. A-C).

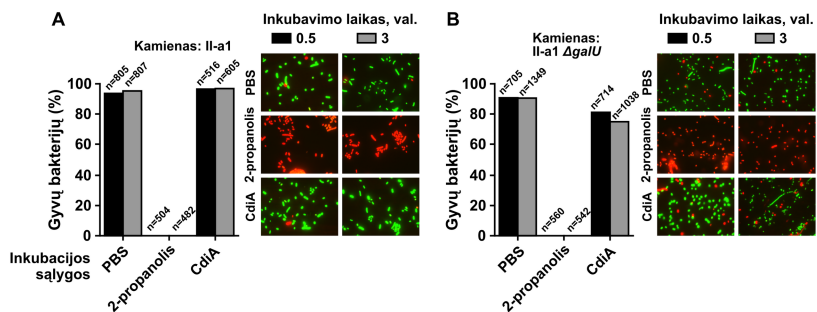


19 pav. *A. baumannii* II-a1 (A) II-c (B) II-a (C) $\Delta galU$ mutantų gyvybingumo įvertinimas. Mutantai buvo komplementuoti arba *pcdiI* plazmide, suteikiančia imunitetą nuo CDI sistemos slopinimo, arba nieko nekoduojančia plazmide. Gyvybingumas buvo įvertintas bakterijų suspensijas sumaišius su 5 μ l PBS buferio (neigiama kontrolė) arba išgryninto CdiA baltymo (5 μ g/ml), ir tam tikrais laiko tarpais atliekant serijinius skiedimus bakterijų-taikinių skaičiui įvertinti. Paklaidų intervalai rodo standartinį nuokrypį.

Norėdami įvertinti, ar po poveikio su CdiA bakterijos žūva, ar pereina į neaktyvią būseną, atlikome gyvų/žuvusių bakterijų

vertinimą fluorescencinės mikroskopijos metodu. Vaizdinta su interkalijuojančiais į DNR fluorescenciniais dažais – SYTO9 ir propidžio jodidu. Pirmasis dažas pereina visų bakterijų (gyvų ir žuvusių) membranas ir, jį sužadinus, fluorescuoja žaliai, tuo tarpu propidžio jodidas nudažo tik žuvusias bakterijas ir fluorescuoja intensyvesne raudona spalva.

Fluorescenciniu mikroskopu įvertinome gyvų ir žuvusių II-a1 bakterijų santykį po 30 minučių ir 3 valandų poveikio su CdiA baltymu (20 pav.).



20 pav. Gyvų/mirusių bakterijų vertinimas fluorescencine mikroskopija naudojant Syto9 ir propidžio jodido dažus. Analizuoti bakterijų kamienai: *A. baumannii* II-a1 (A) ir jo $\Delta galU$ mutantas (B). Prieš dažant, bakterijos buvo 30 minučių arba 3 valandas veiktos su PBS buferiu (gyvų bakterijų kontrolė), 2-propanoliu (mirusių bakterijų kontrolė), arba išgrynintu CdiA. Paveikslai rodo suskaičiuotą gyvų bakterijų kiekį (% nuo visų) po kiekvienos sąlygos. Skaičiai virš stulpelių rodo bendrą analizuotą bakterijų kiekį po dviejų nepriklausomų eksperimentų su panašiais rezultatais. Bakterijos vaizdintos esant 1000 kartų didinimui su Olympus AX70 fluorescenciniu mikroskopu ir WIBA arba MWG filtrais.

Nustatėme, kad, nepriklausomai nuo inkubacijos su CdiA laiko, laukinio tipo izoliatas buvo visiškai atsparus baltymo poveikiui (>90 % gyvų bakterijų) (20 pav. A). Taip pat stebėjome, kad kapsulės neturintis $\Delta galU$ mutantas rodė nedidelį dėl CdiA pridėjimo sumažėjusį gyvų bakterijų skaičių (sumažėjimas iki >75-80 %) (20 pav. B). Panašus gyvų bakterijų skaičius stebėtas ir su mutantu, komplementuotu imunitetą CDI sistemai lemiančiu genu (rezultatai

neparodyti). Šie rezultatai rodo, kad CdiA daro įtaką augimui, bet ne gyvybingumui.

Apibendrinimas

Šiame darbe mes parodėme, kad *A. baumannii* dvikomponentė reguliacinė sistema BfmRS yra būtina bakterijos pelikulių formavimui. Taip pat parodėme, kad BfmRS sistema geba slopinti bakterijos judėjimą terpės paviršiumi. Taigi, *A. baumannii* per šį reguliacinį mechanizmą kontroliuoja du fiziologiškai labai skirtingus fenotipus. Įvertinę klinikinių *A. baumannii* izoliatų pelikulių formavimą ir judėjimą, galime teigti, kad vienas fenotipas negali būti laikomas kito indikatoriumi. Tai rodo, kad *A. baumannii* bakterijose fenotipai gali būti reguliuojami ir kitų mechanizmų. Taip pat parodėme, kad BfmRS sistema reikalinga T6SS sekrecijos sistemos Hcp baltymo padidintai sekrecijai į bakterijų augimo terpę. Nepaisant to, kad Hcp yra būtinas komponentas sistemos funkcijai ir yra vienas jos aktyvumo žymenų, sumažėjusi Hcp sekrecija neturėjo įtakos T6SS lemiamam žudymo fenotipui. Tai rodo, kad padidinta baltymo sekrecija į terpę galėtų vykdyti papildomą, nuo konkurentų žudymo nepriklausomą, funkciją.

Nustatėme, kad BfmRS sistema neigiamai reguliuoja *A. baumannii* koduojamą nuo kontakto priklausomą augimo slopinimo mechanizmą (CDI), ir parodėme, kad kitų bakterijų augimo slopinimas dalyvaujant šios sistemos komponentui CdiA gali vykti ir nuo ląstelės-ląstelės kontakto nepriklausomu būdu. Galiausiai parodėme, kad *A. baumannii* kapsulė veikia kaip efektyvus barjeras, apsaugantis bakteriją nuo CDI slopinimo. Taigi, *A. baumannii* BfmRS sistema yra atsakinga ne tik už patogeno adaptacijos prie nepalankių aplinkos sąlygų reguliaciją, bet ir gebėjimą vykdyti tarpbakterinę konkurenciją pasitelkiant CDI sistemą.

IŠVADOS

- Dvikomponentė BfmRS sistema aktyvina *A. baumannii* pelikulės formavimą, tačiau slopina judėjimą terpės paviršiumi;
- BfmRS sistemos praradimas slopina VI tipo sekrecijos sistemos komponento Hcp baltymo sekreciją į terpę, nedarant įtakos tarpūšinės konkurencijos efektyvumui;
- BfmRS sistema neigiamai reguliuoja *A. baumannii* nuo kontakto priklausomą augimo slopinimo sistemą;
- *A. baumannii* formuojama kapsulė efektyviai apsaugo nuo augimo slopinimo sistemos poveikio vidurūšinėje konkurencijoje;
- *A. baumannii* V15 į augimo terpę sekretuoja funkcionalų toksinį augimo slopinimo sistemos komponentą, CdiA baltymą, kuris sukelia ląstelės-taikinio augimo slopinimą.

PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Krasauskas, R., Skerniškytė, J., Martinkus, J., Armalytė, J., and Sužiedėlienė, E., 2020 Capsule Protects *Acinetobacter baumannii* From Inter-Bacterial Competition Mediated by CdiA Toxin. *Front. Microbiol.* 11,1493.

Krasauskas, R., Skerniškytė, J., Armalytė, J., and Sužiedėlienė, E., 2019. The role of *Acinetobacter baumannii* response regulator BfmR in pellicle formation and competitiveness via contact-dependent inhibition system. *BMC Microbiol.* 19, 241.

Skerniškytė, J., **Krasauskas, R.**, Péchoux, C., Kulakauskas, S., Armalytė, J., and Sužiedėlienė, E., 2019. Surface-Related Features and Virulence Among *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Belonging to International Clones I and II. *Front. Microbiol.* 9, 3116.

Konferencijų tezės

Stendiniai pranešimai

Krasauskas R., Skerniškytė J., Armalytė J., Sužiedėlienė E. „BfmR regulator from *Acinetobacter baumannii* modulates Hcp secretion without effecting killing phenotype mediated by type VI secretion system“. 8th Congress of European Microbiologists (FEMS), Glazgas, Jungtinė Karalystė, liepa, 2019.

Krasauskas R., Skerniškytė J., Armalytė J., Sužiedėlienė E. “The role of regulator BfmR in clinically important features of opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*”. International conference Vita Scientia, Vilnius, Lietuva, sausis, 2018.

Krasauskas R., Skerniškytė J., Armalytė J., Sužiedėlienė E. “Investigation of the role of BfmR regulator in clinically important features of opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*”. 7th Congress of European Microbiologists (FEMS), Valencija, Ispanija, liepa, 2017.

Krasauskas R., Sužiedėlienė E. “The role of response regulator BfmR on *Acinetobacter baumannii* biofilm formation“ XIVth International Conference of the Lithuanian Biochemical Society, Druskininkai, Lietuva, birželis, 2016.

Žodiniai pranešimai

Krasauskas R., Skerniškytė J., Armalytė J., Sužiedėlienė E. „Investigation of the role of BfmR regulator in clinically important features of opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*“. 10-th Young Scientists conference: „Bioateitis“, Vilnius, Lietuva, 2017.

Finansinė parama

Europos Mikrobiologų draugijų federacija (FEMS) dalinai finansavo dalyvavimą konferencijose "7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017)" ir "8th Congresses of European Microbiologists (FEMS 2019)".

SUMMARY

This work introduces novel findings regarding the regulatory network of two-component system BfmRS from *A. baumannii*, a Gram-negative opportunistic pathogen responsible for a growing number of severe nosocomial infections. Here, we show that *A. baumannii* BfmRS system promotes formation of pellicle, a specific type of biofilm, allowing bacteria to colonize the surface of a liquid. Additionally, at the same time BfmRS reciprocally regulates surface-associated motility. We also observed that BfmRS system up-regulates the secretion of Hcp protein into the growth media. The protein is an essential component of type VI secretion system (T6SS), which is able to puncture and deliver effectors into the adjacent cells. However, T6SS-mediated inter-bacterial competition was not affected. We identified that BfmRS represses contact-dependent growth inhibition (CDI) system, inhibiting the growth of closely related strains. CDI system relies on the toxic CdiA protein, which is considered to be secreted and exposed on the surface of a cell. We showed that *A. baumannii* can use CDI over a distance by releasing a functional CdiA protein from the cell, which causes the growth arrest of a susceptible non-kin bacteria. Lastly, we determined that *A. baumannii* outer polysaccharide layer, called capsule, is essential from the protection against CDI. Altogether, our results show that BfmRS system plays a central role in how *A. baumannii* responds to environment stressors and mediates inter-bacterial competition.

CURRICULUM VITAE

Vardas Renatas
Pavardė Krasauskas
Adresas Gyvybės mokslų centras, Biomokslų institutas, Saulėtekio al. 7 LT-10257, Vilnius, Lietuva
Telefonas +370 5 239 82 30
El. paštas renatas.krasauskas@gf.vu.lt

Išsilavinimas

2015-2019 Doktorantas, biochemija, Vilniaus universitetas, Lietuva
2013-2015 Molekulinės biologijos magistras, Vilniaus universitetas, Lietuva
2009-2013 Molekulinės biologijos bakalauras, Vilniaus universitetas, Lietuva

Profesinė patirtis

2019-dabar Jaunesnysis mokslo darbuotojas. Biomokslų institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas, Vilnius, Lietuva
2019-dabar Jaunesnysis asistentas. Biomokslų institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas, Vilnius, Lietuva
2019 Jaunesnysis laborantas. Biomokslų institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas, Vilnius, Lietuva
2015-2018 Jaunesnysis mokslo darbuotojas. Biomokslų institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas, Vilnius, Lietuva
2011-2015 Specialistas. Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra, Gamtos mokslų fakultetas, Vilniaus universitetas, Lietuva.

Publikacijų sąrašas

Krasauskas, R., Skerniškytė, J., Martinkus, J., Armalytė, J., and Sužiedėlienė, E., 2020. Capsule Protects *Acinetobacter baumannii* From Inter-Bacterial Competition Mediated by CdiA Toxin. *Front. Microbiol.* 11,1493.

Krasauskas, R., Skerniškytė, J., Armalytė, J., and Sužiedėlienė, E., 2019. The role of *Acinetobacter baumannii* response regulator BfmR in pellicle formation and competitiveness via contact-dependent inhibition system. *BMC Microbiol.* 19, 241.

Skerniškytė J., Karazijaitė E., Deschamps J., **Krasauskas R.**, Briandet R., Sužiedėlienė E., 2019. The Mutation of Conservative Asp268 Residue in the Peptidoglycan-Associated Domain of the OmpA Protein Affects Multiple *Acinetobacter baumannii* Virulence Characteristics. *Molecules*. 24, 1972.

Armalytė J., Skerniškytė J., Bakienė E., **Krasauskas R.**, Šiugždinienė R., Kareivienė V., Kerzienė S., Klimienė I., Sužiedėlienė E. and Ružauskas M., 2019. Microbial Diversity and Antimicrobial Resistance Profile in Microbiota From Soils of Conventional and Organic Farming Systems. *Front. Microbiol.* 10, 892.

Skerniškytė J., **Krasauskas R.**, Péchoux C., Kulakauskas S., Armalytė J., and Sužiedėlienė E., 2019. Surface-Related Features and Virulence Among *Acinetobacter Baumannii* Clinical Isolates Belonging to International Clones I and II. *Front. Microbiol.* 9, 3116.

Armalytė J., Jurėnas D., **Krasauskas R.**, Čepauskas A., Sužiedėlienė E., 2018. The HigBA Toxin-Antitoxin Module From the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter Baumannii* – Regulation, Activity, and Evolution. *Front. Microbiol.* 9, 732.

Ružauskas M., Klimiene I., Armalyte J., Bartkiene E., Siugzdiniene R., Skerniskyte J., **Krasauskas R.**, Suziedeliene E., 2018. Composition and Antimicrobial Resistance Profile of Gram-Negative Microbiota Prevalent in Aquacultured Fish. *J. Food. Saf.* 38, e12447.

Krasauskas R., Labeikytė D., Markuckas A., Povilonis J., Armalytė J., Plančiūnienė R., Kavaliauskas P., Sužiedėlienė E., 2015. Purification and characterization of a New β -lactamase OXA-205 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 14, 52.

Povilonis J., Seputiene V., **Krasauskas R.**, Juskaite R., Miskinyte M., Suziedelis K., Suziedeliene E., 2013. Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1000–1006.

PADĖKOS

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei prof. Editai Sužiedėlienei už begalinį pasitikėjimą, rūpestį, ir galimybę atlikti tyrimus molekulinės biologijos laboratorijoje. Taip pat už išvalgas ir pagalbą interpretuojant bei aprašant rezultatus pateiktus šiame darbe ir straipsniuose. Dėkoju ir už nukreipimą tinkama linkme, kai man pritrūkdavo idėjų.

Taip pat norėčiau padėkoti ir laboratorijos kolegoms dr. Jūratei Skerniškytei ir dr. Julijai Armalytei už diskusijas, patarimus, ir pagalbą planuojant ir atliekant eksperimentus bei aptariant jų rezultatus.

Ačiū Jūratei, už dalijimąsi nesibaigiančiomis idėjomis, kai kurių eksperimentų atlikimą, pastovų naujų eksperimentų siūlymus, ir bendros puikios atmosferos laboratorijoje palaikymą. Gaila, kad neužteko laiko daugeliui idėjų įgyvendinti.

Dėkoju ir visiems laboratorijos buvusiems ir esamiems studentams už puikią atmosferą laboratorijoje ir pagalbą visais klausimais.

Taip pat norėčiau padėkoti kolegoms iš visos biochemijos ir molekulinės biologijos katedros net tik už neatsisakymą padėti visais klausimais, bet ir už puikią nuotaiką ir atmosferą katedroje. Atskirai dėkoju dr. Violetai Jonušienei ir dr. Aušrai Sasnauskienei už reagentus ir galimybę dirbti su fluorescenciniu mikroskopu.

Ačiū Algirdui Mikšiui už komentarus, išvalgas, ir pagalbą redaguojant disertaciją ir rankraščius. Dėkoju Audriui Gegeckui už *Bacillus* spp. izoliatą, o Biotechnologijos instituto Proteomikos centrai už masių spektrometriją.

Galiausiai, dėkoju savo šeimai ir draugams už kantrybę ir rūpestį. Ypatingai ačiū Ingai už palaikymą ir supratingumą, kai darbas tapdavo prioritetu.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Aoki, S.K., Malinverni, J.C., Jacoby, K., Thomas, B., Pamma, R., Trinh, B.N., Remers, S., Webb, J., Braaten, B.A., Silhavy, T.J., Low, D.A., 2008. Contact-dependent growth inhibition requires the essential outer membrane protein BamA (YaeT) as the receptor and the inner membrane transport protein AcrB. *Mol. Microbiol.* 70, 323–340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06404.x>
2. Aoki, S.K., Pamma, R., Hernday, A.D., Bickham, J.E., Braaten, B.A., Low, D.A., 2005. Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science* 309, 1245–1248. <https://doi.org/10.1126/science.1115109>
3. Aoki, S.K., Webb, J.S., Braaten, B.A., Low, D.A., 2009. Contact-dependent growth inhibition causes reversible metabolic downregulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 191, 1777–1786. <https://doi.org/10.1128/JB.01437-08>
4. Armitano, J., Méjean, V., Jourlin-Castelli, C., 2014. Gram-negative bacteria can also form pellicles. *Environ. Microbiol. Rep.* 6, 534–544. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12171>
5. Casadaban, M.J., Cohen, S.N., 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4530–4533. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4530>
6. Chen, T.-L., Siu, L.-K., Wu, R.C.-C., Shaio, M.-F., Huang, L.-Y., Fung, C.-P., Lee, C.-M., Cho, W.-L., 2007. Comparison of one-tube multiplex PCR, automated ribotyping and intergenic spacer (ITS) sequencing for rapid identification of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13, 801–806. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01744.x>
7. Clemmer, K.M., Bonomo, R.A., Rather, P.N., 2011. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiol. Read. Engl.* 157, 2534–2544. <https://doi.org/10.1099/mic.0.049791-0>
8. Coulthurst, S., 2019. The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon. *Microbiol. Read. Engl.* 165, 503–515. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000789>
9. de Breij, A., Dijkshoorn, L., Lagendijk, E., van der Meer, J., Koster, A., Bloemberg, G., Wolterbeek, R., van den Broek, P., Nibbering, P., 2010. Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? *PloS One* 5, e10732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010732>
10. De Gregorio, E., Zarrilli, R., Di Nocera, P.P., 2019. Contact-dependent growth inhibition systems in *Acinetobacter*. *Sci. Rep.* 9, 154. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36427-8>
11. Eijkelkamp, B.A., Stroher, U.H., Hassan, K.A., Papadimitriou, M.S., Paulsen, I.T., Brown, M.H., 2011. Adherence and motility characteristics of

- clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. FEMS Microbiol. Lett. 323, 44–51. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02362.x>
12. Farrow, J.M., Wells, G., Pesci, E.C., 2018. Desiccation tolerance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by the two-component response regulator BfmR. PLoS ONE 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205638>
 13. Gallique, M., Decoin, V., Barbey, C., Rosay, T., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Merieau, A., 2017. Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 Type VI Secretion System to Biofilm Formation. PloS One 12, e0170770. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170770>
 14. Garcia, E.C., 2018. Contact-dependent interbacterial toxins deliver a message. Curr. Opin. Microbiol. 42, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.09.011>
 15. Geisinger, E., Isberg, R.R., 2015. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Pathog. 11, e1004691. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004691>
 16. Geisinger, E., Mortman, N.J., Vargas-Cuebas, G., Tai, A.K., Isberg, R.R., 2018. A global regulatory system links virulence and antibiotic resistance to envelope homeostasis in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Pathog. 14, e1007030. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007030>
 17. Giannouli, M., Antunes, L.C.S., Marchetti, V., Triassi, M., Visca, P., Zarrilli, R., 2013. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. BMC Infect. Dis. 13, 282. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-282>
 18. Giles, S.K., Stroehner, U.H., Eijkelkamp, B.A., Brown, M.H., 2015. Identification of genes essential for pellicle formation in *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiol. 15, 116. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0440-6>
 19. Groisman, E.A., 2016. Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. Annu. Rev. Microbiol. 70, 103–124. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095331>
 20. Guttenplan, S.B., Kearns, D.B., 2013. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. FEMS Microbiol. Rev. 37, 849–871. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12018>
 21. Harding, C.M., Hennon, S.W., Feldman, M.F., 2018. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. Nat. Rev. Microbiol. 16, 91–102. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>
 22. Harding, C.M., Pulido, M.R., Di Venzio, G., Kinsella, R.L., Webb, A.I., Scott, N.E., Pachón, J., Feldman, M.F., 2017. Pathogenic *Acinetobacter* species have a functional type I secretion system and contact-dependent inhibition systems. J. Biol. Chem. 292, 9075–9087. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.781575>
 23. Hayes, C.S., Koskiniemi, S., Ruhe, Z.C., Poole, S.J., Low, D.A., 2014. Mechanisms and biological roles of contact-dependent growth inhibition systems. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010025>

24. Hunger, M., Schmucker, R., Kishan, V., Hillen, W., 1990. Analysis and nucleotide sequence of an origin of DNA replication in *Acinetobacter calcoaceticus* and its use for *Escherichia coli* shuttle plasmids. *Gene* 87, 45–51. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90494-c](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90494-c)
25. Kentache, T., Ben Abdelkrim, A., Jouenne, T., Dé, E., Hardouin, J., 2017. Global Dynamic Proteome Study of a Pellicle-forming *Acinetobacter baumannii* Strain. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 16, 100–112. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.061044>
26. McQueary, C.N., Kirkup, B.C., Si, Y., Barlow, M., Actis, L.A., Craft, D.W., Zurawski, D.V., 2012. Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. *J. Microbiol. Seoul Korea* 50, 434–443. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1555-1>
27. Mercaldi, M.P., Dams-Kozłowska, H., Panilaitis, B., Joyce, A.P., Kaplan, D.L., 2008. Discovery of the dual polysaccharide composition of emulsan and the isolation of the emulsion stabilizing component. *Biomacromolecules* 9, 1988–1996. <https://doi.org/10.1021/bm800239p>
28. Meuskens, I., Saragliadis, A., Leo, J.C., Linke, D., 2019. Type V Secretion Systems: An Overview of Passenger Domain Functions. *Front. Microbiol.* 10, 1163. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.011163>
29. Morris, F.C., Dexter, C., Kostoulias, X., Uddin, M.I., Peleg, A.Y., 2019. The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* 10, 1601. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01601>
30. Nait Chabane, Y., Marti, S., Rihouey, C., Alexandre, S., Hardouin, J., Lesouhaitier, O., Vila, J., Kaplan, J.B., Jouenne, T., Dé, E., 2014. Characterisation of pellicles formed by *Acinetobacter baumannii* at the air-liquid interface. *PloS One* 9, e111660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111660>
31. Norrander, J., Kempe, T., Messing, J., 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26, 101–106. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90040-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90040-9)
32. Oh, M.H., Lee, J.C., Kim, J., Choi, C.H., Han, K., 2015. Simple Method for Markerless Gene Deletion in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3357–3368. <https://doi.org/10.1128/AEM.03975-14>
33. Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L., 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 538–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
34. Povilonis, J., Seputiene, V., Krasauskas, R., Juskaite, R., Miskinyte, M., Suziedelis, K., Suziedeliene, E., 2013. Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1000–1006. <https://doi.org/10.1093/jac/dks499>
35. Pukatzki, S., McAuley, S.B., Miyata, S.T., 2009. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.11.010>

36. Roussin, M., Rabarioelina, S., Cluzeau, L., Cayron, J., Lesterlin, C., Salcedo, S.P., Bigot, S., 2019. Identification of a Contact-Dependent Growth Inhibition (CDI) System That Reduces Biofilm Formation and Host Cell Adhesion of *Acinetobacter baumannii* DSM30011 Strain. *Front. Microbiol.* 10, 2450. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02450>
37. Ruhe, Z.C., Wallace, A.B., Low, D.A., Hayes, C.S., 2013. Receptor polymorphism restricts contact-dependent growth inhibition to members of the same species. *mBio* 4. <https://doi.org/10.1128/mBio.00480-13>
38. Russo, T.A., Manohar, A., Beanan, J.M., Olson, R., MacDonald, U., Graham, J., Umland, T.C., 2016. The Response Regulator BfmR Is a Potential Drug Target for *Acinetobacter baumannii*. *mSphere* 1. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00082-16>
39. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
40. Skermiškytė, J., Krasauskas, R., Péchoux, C., Kulakauskas, S., Armalytė, J., Sužiedėlienė, E., 2019. Surface-Related Features and Virulence Among *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Belonging to International Clones I and II. *Front. Microbiol.* 9, 3116. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03116>
41. Snitkin, E.S., Zelazny, A.M., Gupta, J., NISC Comparative Sequencing Program, Palmore, T.N., Murray, P.R., Segre, J.A., 2013. Genomic insights into the fate of colistin resistance and *Acinetobacter baumannii* during patient treatment. *Genome Res.* 23, 1155–1162. <https://doi.org/10.1101/gr.154328.112>
42. Tomaras, A.P., Flagler, M.J., Dorsey, C.W., Gaddy, J.A., Actis, L.A., 2008. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiol. Read. Engl.* 154, 3398–3409. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/019471-0>
43. Webb, J.S., Nikolakakis, K.C., Willett, J.L.E., Aoki, S.K., Hayes, C.S., Low, D.A., 2013. Delivery of CdiA nuclease toxins into target cells during contact-dependent growth inhibition. *PloS One* 8, e57609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057609>
44. Weber, B.S., Kinsella, R.L., Harding, C.M., Feldman, M.F., 2017. The Secrets of *Acinetobacter* Secretion. *Trends Microbiol.* 25, 532–545. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.005>
45. Weber, B.S., Miyata, S.T., Iwashkiw, J.A., Mortensen, B.L., Skaar, E.P., Pukatzki, S., Feldman, M.F., 2013. Genomic and functional analysis of the type VI secretion system in *Acinetobacter*. *PloS One* 8, e55142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055142>
46. Wood, W.B., 1966. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J. Mol. Biol.* 16, 118–133. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(66\)80267-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(66)80267-x)

47. Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., Graham, M.W., 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 17, 3469–3478. <https://doi.org/10.1093/nar/17.9.3469>
48. Wright, M.S., Haft, D.H., Harkins, D.M., Perez, F., Hujer, K.M., Bajaksouzian, S., Benard, M.F., Jacobs, M.R., Bonomo, R.A., Adams, M.D., 2014. New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *mBio* 5, e00963-00913. <https://doi.org/10.1128/mBio.00963-13>
49. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J., 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–119. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90120-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90120-9)

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p.: info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 16 egz.