

HELSINGIN YLIOPISTO - HELSINGFORS UNIVERSITET - UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto - Fakultet/sektion - Faculty Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Laitos - Institution - Department Biotieteiden laitos	
Tekijä - Författare - Author Terhi Miikkulainen			
Työn nimi - Arbets titel - Title Vastasyntyneiden meningiittiä aiheuttavan <i>Escherichia coli</i> -kannan flagelliini -geenin hiljentäminen paikkaspesifisellä mutagenisaatiolla sekä mutantin karakterisointi			
Oppiaine - Läroämne - Subject yleinen mikrobiologia			
Työn laji - Arbets art - Level Pro gradu -tutkielma		Aika - Datum - Month of year 20.03.1997	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 55
Tiivistelmä - Referat - Abstract			
<p>Vastasyntyneiden meningiitissä yleisin taudin aiheuttaja on <i>Escherichia coli</i>. Näiden meningiittiä aiheuttavien kantojen S- ja tyyppi 1-fimbrioiden on todettu immobilisoivan veressä olevaa plasminogeenia, ja näin edistävän tämän aktivoitumista plasmiiniksi, proteolyyttiseksi entsyymiksi, jonka avulla bakteerit pääsevät tunkeutumaan kudoksiin. Myös <i>E. coli</i> flagellojen on huomattu immobilisoivan plasminogeeniä. Flagellojen osuus bakteerien pääsyssä kudoksiin on kuitenkin vielä epäselvä. Työssä hiljennettiin meningiittipotilaasta eristetyt S- ja tyyppi 1-fimbriallisen <i>E. coli</i> 3034-kannan flagelliinia koodaava <i>fliC</i>-geeni käyttäen homologiseen rekombinaatioon perustuvaa paikkaspesifistä mutagenisaatiota. <i>fliC</i>-geenin koodaamat flagelliini-proteiinit muodostavat flagellan filamentin.</p> <p>Työssä <i>fliC</i>-geeni monistettiin polyeraasiketjureaktion avulla käyttäen kohde-DNA:na <i>E. coli</i> 3034-kannan kromosomaalista DNA:ta. Monistettu geeni digestoitettiin keskeltä restriktioentsyymien avulla, ja antibiootti-resistenttiyttä koodaava geeni liitettiin tähän katkaisukohtaan. Hiljennetty geeni siirrettiin konjugatiiviseen pGP704-plasmidiin, joka replikoituaikseen tarvitsee isäntäkannassaan <i>pir</i>-geenin tuotetta. Konjugation avulla plasmidi siirrettiin <i>E. coli</i> 3034-kantaan, jossa <i>pir</i>-geeniä ei ole, eikä plasmidi siten pysty replikoitumaan. Plasmidin hävitessä solusta hiljennetty flagelliini-geeni pystyy homologisen rekombinaation avulla kiinnittymään <i>E. coli</i> 3034-kannan kromosomaalisessa DNA:ssa olevaan flagelliini-geeniin, joka samalla hiljenee. Ne konjugantit, joiden flagelliini-geeni on hiljentynyt, pystytään selektoimaan flagelliini-geenin mukana siirtyneen antibioottiresistenttiyden avulla. Aluksi flagelliini-geenin hiljentämisessä käytettiin tetrasykliinille resistenttiyttä koodaavaa geeniä. Konjugation jälkeinen selektio ei kuitenkaan onnistunut, sillä konjugantit eivät kasvaneet kun selektiossa käytettiin tetrasykliinin kanssa streptomysiiniä, jolle <i>E. coli</i> 3034-kanta on resistentti. Konjugantit olivat kyllä resistenttejä tetrasykliinille ja streptomysiinille näitä erikseen käytettynä, mutta kun näitä antibiootteja käytettiin yhdessä, eivät bakteerit enää kasvaneet. Tetrasykliiniresistenttiyttä koodaavan geenin siirtyminen <i>E. coli</i> 3034-kannan kromosomaaliseen DNA:han varmistettiin dot blottauksella ja hybridisaatiolla.</p> <p>Kun tetrasykliinigeeni korvattiin kloramfenikoliresistenttiyttä koodaavalla geenillä konjuganttien selektio kloramfenikolia ja streptomysiiniä käyttäen onnistui ongelmitta. Konjuganttien flagellattomuus tarkistettiin elektronimikroskoopilla ja agglutinaatiotestillä käyttäen antisecrumia, joka oli tehty <i>E. coli</i> 3034-kannan flagelloja vastaan.</p> <p>Flagellattoman <i>E. coli</i> 3034/<i>fliC::cat</i>-kannan vaikutus plasminogeenin aktivoitumiseen testattiin plasminogeeni-aktivaatiokokeella, jossa mukana olivat jo aiemmin <i>E. coli</i> 3034-kannasta tehdyt S-fimbriallinen, tyyppi 1-fimbriallinen ja fimbriaton kanta. Käytettäessä flagellatonta kantaa, oli plasminogeenin aktivaatio selvästi alhaisinta, mikä viittaisi flagellojen merkitykseen plasminogeenin aktivaatiossa. Kuitenkin flagellallinen, mutta fimbriaton kanta sai aikaan selvästi heikomman plasminogeenin aktivaation kuin fimbriallinen, mikä viittaa siihen, että plasminogeenin tehokkaaseen aktivoitumiseen vaikuttavat fimbriat ja flagellat yhdessä.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords flagella, paikkaspesifinen mutagenisaatio, plasminogeeni			
Säilytyspaikka - Förvaringsställe - Where deposited Yleisen mikrobiologian osaston kirjasto			
Muita tietoja - Övriga uppgifter - Additional information			