

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion		Laitos — institution	
Matemaattis-luonnontieteellinen tdk.		Biotieteiden laitos, yleisen mikrob. os.	
Tekijä — Författare Riitta Pouttu			
Työn nimi — Arbetets titel <i>Escherichia coli</i> IHE3034-kannan tyyppi 1 fimbriaproteiineja koodaavien geenien kloonaus			
Oppiaine — Läroämne Yleinen mikrobiologia			
Työn laji — Arbetets art Pro gradu -tutkielma		Aika — Datum 19.4.1995	Sivumaara — Sidoantal 64
Tiivistelmä — Referat <p>Suurin osa villityyppisistä <i>Escherichia coli</i> -kannoista tuottaa tyyppi 1 fimbrioita, jotka ovat jäykkiä ja lankamaisia, 7 nm paksuja ja noin 1 µm pitkiä bakteerin pinnan proteiiniulokkeita. Tyyppi 1 fimbriat välittävät mannoosisensitiivistä sitoutumista D-mannoosia sisältäviin rakenteisiin, etenkin glykoproteiinien lyhyisiin oligomannoosiketjuihin, jotka ovat yleisiä eukaryoottisten solujen pinnoilla. Tyyppi 1 fimbriallisten bakteerien onkin havaittu sitoutuvan useisiin eukaryoottisiin solutyyppeihin. Tästä huolimatta on tyyppi 1 fimbrioiden rooli virulenssitekijöinä epäselvä. Yksittäinen tyyppi 1 fimbria koostuu noin tuhannen identtisen rakenneproteiinialayksikön sekä useiden minor-proteiinialayksiköiden muodostamasta, keskeltä ontosta helix-rakenteesta, jota ylläpitävät ei-kovalenttiset vuorovaikutukset. Tyyppi 1 fimbriaproteiineja koodaava geeniryhmä sijaitsee <i>E. coli</i>:n kromosomissa ja siihen on paikallistettu yhdeksän eri geeniä: <i>fimA</i>, <i>fimB</i>, <i>fimC</i>, <i>fimD</i>, <i>fimE</i>, <i>fimF</i>, <i>fimG</i>, <i>fimH</i> ja <i>fimI</i>.</p> <p>Työssä kloonattiin vastasyntyneiden meningiittiä aiheuttavan <i>E. coli</i> IHE3034-kannan tyyppi 1 fimbriaproteiineja koodaava geeniryhmä kosmidivektoria käyttäen. Partiaalisella digestiolla aikaansaadut noin 40 kb:n fragmentit kromosomaalista <i>E. coli</i> IHE3034 -DNA:ta ligoitiin pHC79-kosmidivektoriin. Ligaatioseoksen sisältämää DNA:ta pakattiin <i>in vitro</i> λ-faagipartikkeleihin, joita käytettiin kloonausisäntänä toimineen <i>E. coli</i> LE392:n transduktiossa. Tyyppi 1 fimbriaa tuottavat transduktantit selektoitiin agglutinaatiotesteillä, joissa käytettiin <i>E. coli</i> IHE3034:n tyyppi 1 fimbriolle spesifistä antiseerumia sekä hiivasoluja. Agglutinaatiotestien perusteella tyyppi 1 fimbriaa tuottaviksi havaitut kloonit nimettiin <i>E. coli</i> LE392/pREP-kannoiksi 1 - 6. <i>E. coli</i> LE392/pREP-kannat 2 - 6 havaittiin elektronimikroskoopissa tarkasteltuna fimbriallisiksi kloonausisäntänä käytetyn LE392:n ollessa fimbriaton.</p> <p>Työssä selvitettiin myös tyyppi 1 fimbrioita tuottavan kloonin vaikutusta plasminogeenin aktivaatioon. Plasminogeeni on veressä esiintyvä plasmiini-proteaaasin esiaste, joka sitoutuu useisiin bakteerien pintarakenteisiin. Tämän immobilisaation on osoitettu edistävän tPA:n aiheuttamaa plasminogeenin aktivoitumista plasmiiniksi, mikä voi aiheuttaa plasmiiniaktiivisuuden muodostumista bakteerisolun pintaan ja auttaa bakteerin pääsyä kudoksiin. Kloonausisäntänä käytetty LE392 tuottaa flagelloja, jotka sitovat plasminogeenia edesauttaen sen aktivaatiota. Jotta tyyppi 1 fimbrioiden osuutta plasminogeenin aktivaatiossa oltaisiin voitu arvioida, siirrettiin LE392/pREP4-kannan kosmidi elektroporaatiolla fimbriatomaan ja flagellattomaan <i>E. coli</i> JT1-kantaan. Plasminogeenin aktivaatiokokeessa havaittiin JT1/pREP4:n edistävän plasminogeenin aktivaatiota enemmän kuin JT1:n.</p> <p>LE392/pREP-kantojen 2 - 6 kosmideissa havaittiin pMSfim1-plasmidin <i>E. coli</i> K12 PC31:n <i>fim</i>-geeniryhmän kanssa hybridisoituvia fragmentteja. Hybridisaatiopositiivinen noin 6 kb:n fragmentti LE392/pREP4:n kosmidia subkloonattiin pBR322-plasmidiin. Subkloonit havaittiin agglutinaatiotesteillä tyyppi 1 fimbrioita tuottamattomiksi, joten niihin kloonatun fragmentin on täytynyt sisältää vain osa <i>fim</i>-geeniryhmää. Kooltaan suuremmat hybridisaatiopositiiviset fragmentit olisivatkin olleet parempia <i>fim</i>-geeniryhmän subkloonaukseen kokonaisuutena, mutta subkloonaus ei niitä käyttäen onnistunut.</p>			
Avainsanat — Nyckelord Tyyppi 1 fimbria, <i>fim</i> -geeniryhmä, kloonaus, kosmidi, plasminogeeni			
Säilytyspaikka — Förvaringställe Yleisen mikrobiologian osaston käsikirjasto			
Muuta tietoja — Övriga uppgifter			