

1. Bakterie mlekowe LAB – wykorzystanie w medycynie

Bakterie mlekowe LAB (*lactic acid bacteria*) grupujące mikroorganizmy należące do różnych rodzajów takich jak np. *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* spp. od wielu lat stanowiły obiekt zainteresowań mikrobiologów ze względu na ich zastosowanie w przemyśle spożywczym. Wiele z nich należy do grupy probiotycznych bakterii o statusie GRAS (*generally regarded as safe*) wywierających korzystny wpływ na zdrowie człowieka, głównie na drodze zapewnienia właściwej równowagi mikroflory kolonizującej przewód pokarmowy. Tworząc ochronną warstwę przylegającą do nabłonka jelit, ograniczają one możliwość kolonizacji tej niszy ekologicznej przez bakterie patogenne blokując jednocześnie procesy inwazyjności. Probiotyki wytwarzają też różnorodne, nie zawsze jeszcze w pełni scharakteryzowane, substancje hamujące wzrost patogenów (kwasy organiczne, substancje podobne do bakteriocyn). Dodatkowo, jak wykazano ostatnio modulują one odpowiedź immunologiczną organizmu gospodarza. Z podanych wyżej powodów bakterie probiotyczne są coraz częściej wykorzystywane w eksperymentalnych terapiach chorób indukowanych infekcjami *S. enterica*, *E. coli* (EPEC, EHEC, ETEC), *H. pylori* czy *C. difficile*.

Wspomniany wyżej korzystny wpływ LAB na organizmy zwierząt/człowieka w połączeniu z ich niską immunogennością (możliwość wielokrotnego użycia) stanowi podstawę koncepcji ich zastosowania jako nośników aktywnych cząsteczek biologicznych (antygenów bakterii i wirusów, przeciwciał, cytokin) w celach profilaktycznych lub terapeutycznych, zarówno w medycynie jak i weterynarii. Najintensywniej przebadano pod tym względem przedstawicieli *Lactobacillus* spp., *Streptococcus gordonii* oraz *Lactococcus lactis*. Dwa pierwsze występują jako składniki fizjologicznej flory człowieka. Ta ich cecha może przyczynić się do podniesienia indukowanej specyficznej odpowiedzi immunologicznej przeciwko heterologicznym antygenom. Z drugiej strony *L. lactis* organizm nie kolonizujący przewodu pokarmowego, może być zastosowany do krótkotrwałego dostarczania antygenów lub innych biologicznie aktywnych produktów.

Wykonanie ćwiczeń:

Cel: Określenie właściwości szczepów bakterii mlekowych stosowanych do konstrukcji szczepionek.

Przygotowanie szalek:

1. wykorzystanie laktozy – posiew redukcyjny

M17 agar
0,008% X-gal
1% celobioza

2. produkcja kwasu mlekowego - „słoneczko”

M17 agar
0,5% laktoza
0,0001% purpura bromokrezolowa

3. własności proteolityczne – „kreska”

50% mleko odtłuszczone
1,5% agar
0,5% glukoza

4. produkcja bakteriocyn – na szalki wysiać szczep IL1403 (10^{-2} - murawa) i nakroplic badany szczep

0,5% glukoza
M17 agar

odczynniki:

M17 agar
3% agar
100% mleko odtłuszczone
4% X-gal
8% celobioza
10% laktoza
0,01% purpura bromokrezolowa
20% glukoza

W celu określenia właściwości bakterii mlekowych otrzymanych od prowadzącego ćwiczenia szczep należy wysiać na każdy rodzaj szalek.

UWAGA! Posiew redukcyjny przeprowadzić należy z kolonii a nie z hodowli nocnej.

2. Wykorzystanie białek bakteryjnych patogenów w medycynie - czynniki rozprzestrzeniania bakterii patogennych (streptokinaza)

Wiele gatunków bakterii patogennych wytwarza tzw. czynniki rozprzestrzeniania (spreading factors), zewnątrzkomórkowe enzymy hydrolityczne ułatwiające patogenom rozprzestrzenianie się w organizmie gospodarza i dotarcie do właściwej niszy ekologicznej. Należą do nich proteazy, nukleazy, hialuronidazy, kolagenazy i wiele innych enzymów o różnorodnej specyficzności substratowej. Wyjątkowo dużą liczbę tego typu białek wytwarzają patogenne szczepy rodzaju *Staphylococcus* i *Streptococcus*.

Streptokoki produkują między innymi dwa, wydzielane do środowiska, białka: streptodornazę i streptokinazę. Pierwsze z nich jest nukleazą drugie aktywatorem plazminogenu. Aktywacja plazminogenu, zachodząca, w tym przypadku, na drodze zmiany konformacji białka doprowadza do jego przejścia w plazminę i ujawnienia aktywności proteolitycznej. Plazmina jest serynową proteazą o szerokim spektrum działania i istotnej roli w wielu procesach fizjologicznych oraz patologicznych zachodzących w organizmach ssaków. Jednym z substratów plazminy jest fibryna, słabo rozpuszczalne białko krwi; powstawanie skrzepów fibrynowych jest jedną z przyczyn zawału serca. Szybkie podanie pacjentom aktywatorów plazminogenu doprowadza do rozpuszczenia skrzepów fibrynowych i chroni komórki mięśnia sercowego przed niedotlenieniem. Prowadzone są też próby somatycznej terapii genowej polegające na umieszczeniu w komórkach endothelium (śródbłónka naczyń krwionośnych) pacjentów zagrożonych zawałem genu warunkującego wytwarzanie aktywatora plazminogenu.

Poza bakteriami rodzaju *Streptococcus* aktywator plazminogenu produkują też szczepy rodzaju *Staphylococcus* oraz *Yersinia pestis* (białko Pla). Streptokinaza i streptodornaza nie wykazują aktywności proteolitycznej, podczas gdy białko Pla działa podobnie jak ssacze aktywatory, aktywuje Plg na drodze hydrolizy.

Plazminogen, 90 kDa białko, obecne w dużych ilościach w plazmie krwi w formie proenzymu aktywowane jest na drodze proteolizy przez wiele aktywatorów. Proces ten jest w komórkach ssaków ściśle regulowany poprzez działanie wielu inhibitorów oddziaływujących zarówno na ssacze aktywatory plazminogenu jak i blokujących aktywność plazmidy. Komórki ssaków wytwarzają dwa rodzaje aktywatorów plazminogenu tPa i uPa. Oba białka są serynowymi proteazami.

Mikroorganizmy aktywują plazminogen w dwojaki sposób. Poza omówioną wyżej zdolnością do wytwarzania zewnątrzkomórkowego aktywatora plazminogenu, wiele gatunków patogenów wytwarza receptory plazminogenu, zakotwiczone w osłonach

komórkowych lub wchodzące w skład organelli komórkowych białka, zdolne do wyłapywania i wiązania plazminogenu, co doprowadza do jego aktywacji.

Wykonanie ćwiczeń:

Cel: Wykazanie aktywności sklonowanego w komórkach *E. coli* genu *S. equisimilis* warunkującego wytwarzanie streptokinazy.

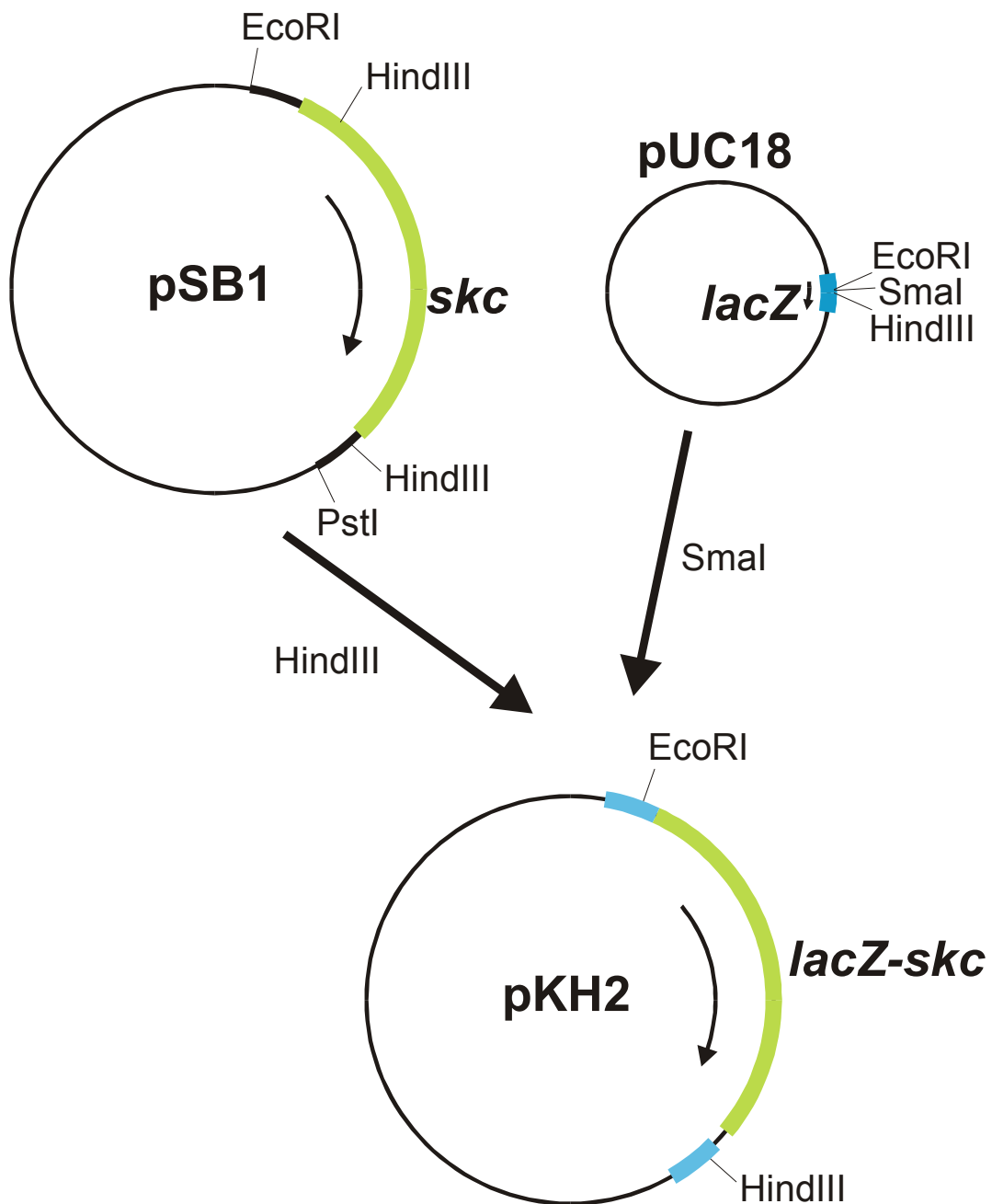
Przygotowanie konstruktów: Gen *skc* ze szczepu *S. equisimilis* został sklonowany i zsekwencjonowany. Stanowi on niezależną jednostkę transkrypcyjną. Otwarta ramka odczytu (1320 bp) koduje 440 aminokwasowe białko. Na końcu aminowym SKC znajduje się 26-aminokwasowy peptyd sygnałowy, odcinany w czasie wydzielania przez błonę komórkową. Obszarem niezbędnym dla biologicznej funkcji SKC jest rejon środkowy, okazuje się bowiem, że usunięcie do 42 aa (w tym peptydu sygnałowego) na końcu N i 41 aa na końcu C nie prowadzi do utraty aktywności.

W banku genomowego DNA skonstruowanym przy użyciu *BclI* i z wykorzystaniem wysokokopijnego wektora pTZ19R (200 kopii na komórkę) odnaleziono klony kazeinolityczne. 2,5 kb *EcoRI* - *PstI* fragment DNA przeklonowano do pBR322 (50 kopii na komórkę) otrzymując dużo bardziej stabilny plazmid rekombinacyjny pSB1. W tym plazmidzie gen *skc* wyrażany jest z własnego promotora.

Fragment DNA *S. equisimilis* przeklonowano następnie do pUC18 tworząc fuzję transkrypcyjną. Gen *skc*, transkrybowany w tym układzie z promotora genu *lacZ*, posiada własne sygnały translacyjne (RBS i kodon inicjacyjny ATG). Produkowane białko lokuje się w peryplazmie. Streptokinaza zlokalizowana w przestrzeni peryplazmatycznej indukuje produkcję kwasu kolaninowego - głównego składnika otoczek śluzowych. Mechanizm tego zjawiska nie został wyjaśniony.

Skonstruowano także fuzję translacyjną genu *lacZ* i *skc*. Wykorzystano enzym *HindII*. Rozcina on ramkę odczytu *skc* między kodonami co umożliwia jej połączenie z 5' fragmentem genu *lacZ* przeciętym *SmaI*. Przy użyciu tej strategii skonstruowano gen fuzyjny *lacZ-sk* kodujący 10 pierwszych aminokwasów β -galaktozydazy i aminokwasy 40-440 SKC (plazmid rekombinacyjny pKH2). Kolonie niosące ten plazmid są aktywne w szalkowym teście SKC, nie mają śluzowatego fenotypu typowego dla kolonii wytwarzających streptokinazę z własnym sygnałem peptydowym.

- pSB1** Skc^+ , około 2,5 kb *EcoRI* - *PstI* fragment DNA *S. equisimilis* sklonowany w pBR322, plazmid stabilnie utrzymywany, gen transkrybowany z własnego promotora, produkt - 45 kDa białko peryplazmatyczne, kolonie mukoidalne.
- p8** Skc^+ , fragment DNA pSB1 sklonowany w pUC18, ekspresja genu *skc* pod kontrolą promotora *lac*, 45 kDa białko peryplazmatyczne, kolonie mukoidalne.
- pKH2** Skc^+ , 1,6 kb *HindII* fragment DNA sklonowany w pUC18. Produkt - 44 kDa cytoplazmatyczne białko, fuzja z β -galaktozydazą (brak sygnału peptydowego i 13 aminokwasów dojrzałej streptokinazy), kolonie niemukoidalne.



A. Schemat konstrukcji plazmidu pKH2

*zaznaczono tylko wybrane miejsca rozpoznawane przez enzym *HindIII*

Szalkowy test wykrywający aktywność streptokinazy:

Test szalkowy wykrywający aktywność streptokinazową wykorzystuje zdolności proteolityczne kompleksu streptokinaza-plazminogen. Jego obecność doprowadza do degradacji kazeiny, co prowadzi do powstania stref przejaśnienia wokół kolonii wytwarzających streptokinazę. Można także zaobserwować mukoidalność kolonii związaną z peryplazmatyczną lokalizacją streptokinazy.

A. Przygotowanie szalek:

1. Wylać szalki LB uzupełnione odpowiednim antybiotykiem.
2. Po ich zastygnięciu wylać na ich powierzchnię po 5 ml buforu:
 - 50 mM TrisHCl pH=8,0
 - 150 mM NaCl,
 - odtłuszczone mleko
 - plazminogen,
 - 0,8 % agaroz.

Do lekko schłodzonej agarozы rozpuszczonej w roztworze 50 mM TrisHCl pH=8,0 oraz 150 mM NaCl (50 ml) dodać 10 ml jałowego mleka i 100-200 µl plazminogenu (roztwór plazminogenu przechowywany jest w -20°C).

B. Transformacja szczepów *E. coli* TG1 DNA plazmidowym kodującym streptokinazę:

1. Do 100 µl odpowiednich komórek kompetentnych dodać 1 µl preparatu DNA (20-200 ng).
2. Inkubować w lodzie 15 minut.
3. Zawiesinę bakterii przenieść do temperatury 42-44°C na 40 sekund.
4. Dodać 1 ml podłoża LB i inkubować 40 minut w 37°C.
5. Wysiewać 100 µl odpowiednio rozcieńczonej mieszaniny transformacyjnej na podłoża selekcyjne:

pSB1/*E. coli* TG1 **rozc. 100x, 50x**
warstwa dolna LB+Tc (25 µg/ml);
warstwa górna LB uzupełnione mlekiem i plazminogenem,

p8/*E. coli* TG1 **rozc. 10x, 20x**
warstwa dolna LB+Ap (50 µg/ml);
warstwa górna LB uzupełnione mlekiem i plazminogenem,

pKH2/*E. coli* TG1 **rozc. 200x, 1000x**
warstwa dolna LB+Ap (50 µg/ml);
warstwa górna LB uzupełnione mlekiem i plazminogenem.

Kontrola aktywności streptokinazowej - wysiew na szalki z mlekiem nie zawierające plazminogenu. Szalki inkubować przez noc w 37°C.