

Univerza v Mariboru
Fakulteta za naravoslovje in matematiko
Oddelek za biologijo

DIPLOMSKO DELO

Natalija PUNGERL

Maribor, 2011

Univerza v Mariboru
Fakulteta za naravoslovje in matematiko
Oddelek za biologijo

Natalija PUNGERL

**Vpliv netoksinogenega seva bakterije *Clostridium difficile* s
hemolitično aktivnostjo na morfologijo celic mišjih
fibroblastov**

DIPLOMSKO DELO

Mentorica: doc. dr. Saška LIPOVŠEK

Somentorica: prof. dr. Maja RUPNIK

Maribor, 2011

IZJAVA O AVTORSTVU

Podpisana Natalija Pungerl, študentka Fakultete za naravoslovje in matematiko Univerze v Mariboru, študijskega programa biologija izjavljam, da je diplomsko delo z naslovom Vpliv netoksinogenega seva bakterije *Clostridium difficile* s hemolitično aktivnostjo na morfolologijo celic mišjih fibroblastov pri mentorici doc. dr. Saški Lipovšek in somentorici prof. dr. Maji Rupnik avtorsko delo. Delo sem opravljala na Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor, Center za mikrobiologijo, Oddelku za biologijo, Fakulteta za naravoslovje in matematiko Univerze v Mariboru ter Inštitutu za fiziologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru.

Diplomsko delo je nastalo kot rezultat lastnega dela. Vsi privzeti podatki so citirani skladno z mednarodnimi pravili o varovanju avtorskih pravic.

Natalija Pungerl

Pungerl N: Vpliv netoksinogenega seva bakterije *Clostridium difficile* s hemolitično aktivnostjo na morfolologijo celic mišjih fibroblastov. Diplomsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo, 2011.

POVZETEK

Bakterija *Clostridium difficile* je normalno prisotna v naravi in prebavilih sesalcev. Je po Gramu pozitivna, anaerobna, sporogena bakterija. Spore so zelo odporne proti izsuševanju, kemikalijam ter ekstremnim temperaturam. Najpogosteje se okužijo starejši hospitalizirani ljudje, ki se jim poruši ravnovesje v črevesni flori, običajno zaradi daljšega zdravljenja z antibiotiki. Sevi, ki povzročajo bolezen, proizvajajo toksine, med katerimi sta najpomembnejša toksin A in toksin B.

V diplomski nalogi smo se osredotočili na vpliv netoksinogenih sevov bakterije *Clostridium difficile* s hemolitično aktivnostjo na citoskelet mišjih fibroblastov. V raziskavi smo uporabili celice McCoy, ki smo jih tretirali s supernatantom, barvali aktinske filamente in jedra ter opazovali učinek na aktinskem citoskeletu s konfokalnim mikroskopom.

Ugotovili smo, da je prišlo pri celicah tretiranih s supernatantom s hemolitično aktivnostjo do določenih sprememb, predvsem na aktinskem citoskeletu, medtem ko na jedrih ni bilo večjih razlik. Spremembe so bile vidne na aktinskih filamentih, ki so bili prekinjeni in združeni v skupke.

Ključne besede: *Clostridium difficile*, aktinski filamenti, celice McCoy, konfokalni mikroskop, supernatant, toksini

Pungerl N: Influence of non-toxinogenic strains of *Clostridium difficile* with hemolytic activity on cell morphology in mouse fibroblasts. Graduation Thesis, University of Maribor, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Department of Biology, 2011.

THESIS ABSTRACT

Clostridium difficile is an anaerobic, Gram-positive bacterium which is usually present in environment and often resides in the gut of mammals. The bacteria forms spores that are resistant to desiccation, chemicals and extreme temperatures. Elderly hospitalized patients with damaged gut microbiota due to prolonged antibiotic treatment are the main population at risk. Strains which cause disease produce toxins. The most important toxins are toxin A and toxin B.

In this work we were focusing on the influence of non-toxinogenic strains of *Clostridium difficile* with hemolytic activity on the cytoskeleton of mice fibroblasts. McCoy cells were treated with bacterial culture supernatant. Actin filaments and nucleuses were stained and the effect on the actin cytoskeleton was observed with confocal microscope.

We found some changes on the cells that were treated with supernatant that has hemolytic activity, especially on actin cytoskeleton, but there were no essential modifications on nucleuses.

Key words: *Clostridium difficile*, actin filaments, McCoy cells, confocal microscope, supernatant, toxins

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BSA	goveji serumski albumin (ang. »Bovine Serum Albumin«)
CD	<i>Clostridium difficile</i>
CDC	od holesterola odvisni citolizin (ang. »cholesterol dependent cytolysin«)
CDT	binarni toksin <i>C. difficile</i>
COH	krvni agar (ang. »Columbia agar«)
CPB	β -toksin <i>C. perfringens</i> (ang. » <i>C. perfringens</i> type C β -toxin«)
D-MEM	gojišče za celice (ang. »Dulbecco's Modified Eagle Medium«)
FBS	serum govejega fetusa (ang. »Fetal Bovine Serum«)
μ l	mikroliter
min	minuta
ml	mililiter
obr/min	število obratov v eni minuti
PBS	fosfatni pufer s soljo (ang. »Phosphate-buffered saline«)
PFT	toksin, ki tvori pore (ang. »pore-forming toxin«)
RTX	(ang. »repeats found in each toxin«)
T	temperatura
TcdA	toksin A <i>C. difficile</i>
TcdB	toksin B <i>C. difficile</i>

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Namen dela in delovne hipoteze	1
2	PREGLED OBJAV	2
2.1	BAKTERIJA <i>Clostridium difficile</i>	2
2.1.1	Bolezenski znaki, ki jih povzroča bakterija <i>Clostridium difficile</i>	2
2.1.2	Toksini kot dejavniki virulence pri bakteriji <i>Clostridium</i>	2
2.2	BAKTERIJSKI TOKSINI IN VLOGA TOKSINOV V PATOGENEZI	3
2.2.1	Citolitični (hemolitični) bakterijski toksini	3
2.2.2	Toksini bakterij iz rodu <i>Clostridium</i>	6
2.2.3	Toksini bakterije <i>Clostridium difficile</i>	7
2.2.4	Uporaba celičnih kultur in modernih mikroskopskih tehnik za proučevanje toksinskih učinkov	7
2.2.5	Učinek toksinov bakterije <i>Clostridium difficile</i> na aktinski citoskelet	9
2.2.6	Aktinski filament ali mikrofilamenti	9
3	MATERIALI IN METODE	11
3.1	Bakterija <i>Clostridium difficile</i> in izbor sevov	11
3.2	Priprava supernatantov za testiranje hemolitične aktivnosti	11
3.3	Hemoliza in test na hemolitično aktivnost	12
3.4	Celična linija in gojenje celic	12
3.5	Spremljanje učinka supernatanta na celični liniji z uporabo invertnega mikroskopa.....	13

3.6 Barvanje aktinskih filamentov in jeder ter sledenje spremembam v aktinskem citoskeletu z uporabo konfokalnega mikroskopa.....	13
4 REZULTATI.....	15
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	19
5.1 RAZPRAVA	19
5.2 SKLEPI	20
6 POVZETEK	21
7 ZAHVALA	22
8 VIRI	23
9 PRILOGE.....	30

KAZALO SLIK

Slika 4.1 Vretenaste celice McCoy posnete skozi okular invertnega mikroskopa, pri 10x povečavi.	15
Slika 4.2 Pobarvani aktinski filamenti celic McCoy	17

KAZALO PRILOG

Priloga A. Serije presekov kontrolnih celic tretiranih s <i>C. perfringens</i> /CCUG 2036 hemolitičnim sevom.	30
Priloga B. Serije presekov celic tretiranih z netoksinogenim sevom <i>C. difficile</i> ZZV09-1747 s hemolitično aktivnostjo.....	31

1 UVOD

Clostridium difficile je anaerobna, sporogena, po Gramu pozitivna bakterija, ki je normalno del črevesne mikroflore. Bolezen povzročajo sevi, ki proizvajajo toksine, med njimi sta najpomembnejša toksin A (TcdA) in toksin B (TcdB).

Do okužbe pride, ko se poruši normalno ravnovesje v črevesju. Starejši in hospitalizirani ljudje, ki se dolgotrajno zdravijo z antibiotiki, so najbolj podvrženi okužbi z omenjeno bakterijo. Bolnišnično okolje in jemanje antibiotikov omogočajo dobre pogoje za rast in obstoj bakterije *Clostridium difficile*. Ta povzroča diarejo ali celo psevdomembranozni kolitis, ki se lahko konča s smrtjo (Dawson et al., 2009).

Bakterija *Clostridium difficile* je vse bolj pomembna, saj je število okužb vedno večje tudi pri mlajših ljudeh, ki niso bili hospitalizirani ali zdravljeni z antibiotiki. Pogosta tarča so tudi nosečnice in otroci (Chernak et al., 2005; Roupael, 2008; Kim, 2008).

Vir okužbe so spore, ki se nahajajo vsepovsod v okolju, hrani in živalskih iztrebkih.

1.1 Namen dela in delovne hipoteze

Namen diplomske naloge je opazovati učinek netoksinogenega seva bakterije *Clostridium difficile* s hemolitično aktivnostjo na aktinske filamente v mišjih fibroblastih. Pri raziskavi je bila uporabljena celična linija McCoy. Celice so bile tretirane s supernatantom in barvane s fluorescenčnim barvilom za aktin.

Delovna hipoteza predvideva, da:

- je učinek supernatanta na nebarvanih celicah viden z invertnim mikroskopom,
- je sprememba na barvanih aktinskih filamentih celic tretiranih s supernatantom vidna s konfokalnim mikroskopom.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Clostridium difficile*

Clostridium difficile je bakterija, ki je normalno prisotna v črevesni mikroflori. Ta se lahko namnoži pod vplivom dolgotrajnega zdravljenja z antibiotiki, ki poškodujejo pacientovo črevesno mikrobioto. Bolezen povzročajo toksinogeni sevi, najpomembnejša sta toksina A (TcdA) in toksin B (TcdB) (Dawson et al., 2009).

Clostridium difficile je po Gramu pozitivna, anaerobna bakterija, ki tvori spore in je bila prvič opisana leta 1935, kot normalni del črevesne mikrobne združbe in do leta 1978 ni veljala za povzročitelja bolezni pri človeku (Rupnik et al., 2009).

2.1.1 Bolezenski znaki, ki jih povzroča bakterija *Clostridium difficile*

Clostridium difficile je patogena bakterija in je najpogosteje prisotna v bolnišničnem okolju. Po dolgotrajnem zdravljenju z antibiotiki se zaradi porušenega ravnovesja v črevesju bakterija namnoži, kar lahko povzroči resnejše bolezni. Okužba lahko neopazno mine ali pa se pri bolniku pojavi blaga driska. Lahko pa pride do hude bolezni- psevdomembranoznega kolitisa, ki je lahko smrtno nevaren (Deneve et al., 2009). Simptomi okužbe so razen driske še bolečine v trebuhu, povišana temperatura in povišana vsebnost belih krvnih teles (Rupnik et al., 2009).

2.1.2 Toksini kot dejavniki virulence pri bakteriji *Clostridium*

Clostridium difficile lahko proizvaja toksin A (TcdA) in toksin B (TcdB), ki sta glavna dejavnika virulence, ter binarni toksin CDT. Netoksinogeni sevi ne proizvajajo toksinov in ne povzročajo bolezni (Deneve et al., 2009).

Toksina A in B sta citotoksična encima, ki povzročita poškodbe sluznice v črevesju, kar je razlog za povečano izločanje sekreta v črevesni lumen (Thelestam et al., 1999).

Toksina ne vplivata na permeabilnost membrane črevesnih celic in celic McCoy, ampak zavirata sintezo beljakovin, posredno pa pride do morfoloških sprememb (skrčenje in zaokroženje) celic McCoy. Tak učinek ima predvsem toksin B, ki je 1000 krat bolj toksičen od toksina A (Draganov et al., 2004-2005).

Oba toksina prav tako povzročata poškodbe aktinskega dela citoskeleta in tesnih stikov, kar je razlog za uničenje črevesnega epitelija (Thelestam in Chaves-Olarte, 1999; Rupnik in Just, 2006; Riegler et al., 1995).

Natančneje bodo molekularni mehanizmi delovanja vseh toksinov, ki jih izloča *C. difficile*, opisani v poglavju 2.2.3.

2.2 BAKTERIJSKI TOKSINI IN VLOGA TOKSINOV V PATOGENEZI

Pomembni dejavniki virulence so bakterijski proteinski toksini, ki poškodujejo celice v gostiteljevem telesu ali preprečijo njihovo delovanje. Posebej značilni so za rod *Clostridium*.

2.2.1 Citolitični (hemolitični) bakterijski toksini

Citolitični encimi poškodujejo celične membrane, razgrajujejo membranske lipide, vplivajo na prehajanje snovi in povzročajo celično smrt. Razlikujejo se glede na mehanizem delovanja in strukturo. Znane so fosfolipaze, ki hidrolizirajo fosfolipide v membrani in jo poškodujejo.

Najpomembnejši citolizin, ki ga proizvaja *Clostridium perfringens*, je toksin α , ki deluje na različne fosfolipide (Karasawa et al., 2003).

Bakterijski citolitični proteini se razlikujejo po izvoru, strukturi in mehanizmu delovanja. Glede na mehanizem delovanja ločimo več vrst toksinov.

❖ Toksine, ki tvorijo pore (PFT)

Plazmalemo lahko poškodujejo proteini, ki tvorijo pore (pore forming proteins, PFP). Te lahko organizem proizvede sam ali pa patogene bakterije, ki vdrejo v organizem. Te bakterije proizvajajo toksine, ki tvorijo pore (pore forming toxins, PFT) (Biscfofberger et al., 2009).

PFT so topni monomeri, ki se vstavljajo v membrane. Za vezavo na membrano potrebujejo nekateri toksini specifične receptorje. To so največkrat proteini in lipidi. Pri od holesterola odvisnih citolizinih (CDC) je to holesterol. CDC predstavljajo največjo skupino bakterijskih toksinov, ki jih proizvajajo po Gramu pozitivne bakterije (Alouf et al., 2006).

Tvorba por se razlikuje glede na strukturne elemente. Tako delimo PFT na dve skupini:

- α -PFT naredijo pore v membrano z α -vijačnicami,
- β -PFT pa so toksini, ki tvorijo stabilni transmembranski β -sodček, tako da v membrano vstavljajo amfipatične β -lasnice, ki se prečno povezujejo (Anderluh in Lakey, 2008).

Učinki PFT so različni in odvisni od velikosti por in koncentracije toksinov. Pri velikih porah lahko pride do izhajanja večjih makromolekul. Če je koncentracija toksina nizka, pride do vdora sekundarnega prenašalca (Ca^{2+}) v celico, kar lahko povzroči razne procese (npr. sproščanje vnetnih mediatorjev) (Alouf et al., 2006).

❖ **Od holesterola odvisne citolizine (CDC)**

Od holesterola odvisni citolizini (CDC) so velika skupina bakterijskih toksinov, ki tvorijo pore in so produkt po Gramu pozitivnih bakterij iz rodu *Clostridium*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Bacillus* in *Arcanobacterium* (Rodney K. Tweten, 2005). So v vodi topni monomeri, ki tvorijo eksogene pore v membranah gostitelja (Rossjohn, 2007).

CDC lahko preidejo v membransko vezano obliko tako, da spremenijo konformacijo brez prisotnosti beljakovine, ki je načeloma potrebna za pravilno gubanje polipeptidne verige. Za vezavo potrebujejo nekateri toksini specifične receptorje (Lesieur et al., 1997).

❖ **Toksine, ki tvorijo majhne pore (small PFT)**

Majhne pore omogočajo prehajanje majhnih molekul in ionov, njihov premer pa je med 1 in 1,5 nm.

Znani toksini, ki tvorijo majhne pore so α -hemolizin, levkocidin in γ -hemolizin bakterije *Staphylococcus aureus*, α -toksin bakterije *Clostridium septicum*, β -toksin bakterije *Clostridium perfringens*, hemolizin II bakterije *Bacillus cereus* in aerolizin bakterije *Aeromonas hydrophyla* (Tweten in Melton, 2006).

❖ **RTX toksine (repeats found in each toxin)**

Značilnosti RTX toksinov so ponovitve 9 aminokislin dolgega zaporedja v katerem prevladujeta aspartat in glicin. Ti toksini so veliki, enoverižni, od Ca^{2+} odvisni hemolizini.

Znani RTX toksini so hemolizini bakterij iz skupin *Pasteurellaceae* in *Enterobacteriaceae*, hemolizin bakterije *E. coli*, hemolizin bakterije *Actinobacillus pleuropneumoniae*, levkotoksin bakterije *Actinobacillus actinomycescomitans* in adenilat ciklaza hemolizin bakterije *Bordetella pertussis* (Kraig et al., 1990; Pizza et al., 2005).

2.2.2 Toksini bakterij iz rodu *Clostridium*

Klostridiji proizvedejo največ toksinov od katerih koli drugih bakterij in so povzročitelji zelo resnih bolezni pri človeku in živalih. Večina klostridijskih toksinov spada med toksine, ki tvorijo pore (PFT) in so povezani s simptomi gangren in črevesnih obolenj. Toksin perfringolizin je primer od holesterola odvisnih citolizinov, medtem ko spadata aerolizinu podoben ϵ -toksin bakterije *C. perfringens* in α -toksin bakterije *C. septicum* med tako imenovane toksine, ki tvorijo majhne pore (small PFT) (Popoff, 2006).

Tetanusni toksin bakterije *C. tetani* deluje nevrotoksično. Vpliva na osrednji živčni sistem tako, da inhibira delovanje živčnih celic, ki omogočajo sproščanje mišic. Nevrotoksin bakterije *C. botulinum* učinkuje na periferno živčevje. *C. perfringens* izdeluje 12 različnih toksinov, θ -toksin povzroča nekroze mišic in hemolizo eritrocitov, skupaj z α -toksinom pa oslabi premik nevtrofilcev na mesto infekcije ter povzroči razpad endotelijskih celic. Toksin Tcna bakterije *C. septicum* povzroča hemolizo in nekroze, toksini bakterije *C. hystoliticum* pa povzročajo odmiranje tkiva in plinsko gangreno. *C. sordellii* proizvaja hemoragični toksin TcsH in letalni toksin TcsL. Hemolizinu podobna proteina pa proizvaja *C. bifermentas*. *Clostridium difficile* proizvaja do sedaj znane tri toksine (enterotoksin TcdA, citotoksin TcdB in binarni toksin CDT) (Boquet et al., 1998; Petit et al., 1999; Borriello et al., 2005; Cohen et al., 2007; Barley et al., 1998).

2.2.3 Toksini bakterije *Clostridium difficile*

Clostridium difficile (CD) proizvaja toksin A (TcdA), toksin B (TcdB) in binarni toksin (CDT).

Študije narejene v osemdesetih letih 20. st. so pokazale, da povzroča TcdA močno vnetje in zastajanje vode v črevesnih krivinah živali. Toksin so opisali kot enterotoksin in je glavni virulenčni dejavnik, medtem ko je TcdB močan citotoksin in ni tako pomemben v patogenezi pri okužbah s *Clostridium difficile*. *In vitro* poskusi na celicah T84 so pokazali, da na njih učinkujeta oba toksina, vendar je toksin A 10-krat močnejši od toksina B (Hecht et al., 1988, 1992). Temu so pripisovali dejstvo, da se TcdA močnejše veže na T84 celice kot pa TcdB (Chaves-Olarte et al., 1997). Nasprotno temu pa Riegler et.al. (1995) opisujejo, da ima TcdB 10-krat močnejši vpliv kot TcdA in povzroča poškodbe črevesnega epitelija in ima pomembno vlogo pri obolenjih človeka (Thelestam et.al., 1999).

Danes vemo, da sta oba toksina glavna dejavnika virulence, tako pri človeku kot pri živalih. Biokemijske in molekularne raziskave kažejo, da lahko simptome okužbe s CD (driska, vnetje črevesne sluznice) pripišemo toksinoma TcdA in TcdB. Oba toksina sta citotoksična in povzročata prekinitve aktinskih filamentov in tesnih stikov, kar omogoča povečano prepustnost epitelija, izločanje tekočine v lumen črevesja in odmiranje celic črevesnega epitelija. Prav tako povzročata vnetni odziv ter sproščanje nevtrofilcev in makrofagov (Rupnik et.al., 2009).

2.2.4 Uporaba celičnih kultur in modernih mikroskopskih tehnik za proučevanje toksinskih učinkov

Za *in vitro* raziskave se lahko uporabijo različni tipi celičnih kultur: npr. McCoy, Vero, T84, HT-29 itd.

Pri poskusih smo uporabili celično linijo McCoy, ki je znana že okoli 50 let. V laboratorijih se te celice uporabljajo pri diagnostičnih testih, ki so bistveni za proučevanje interakcij med različnimi patogeni in gostiteljskimi celicami. Najpogosteje pa takšni poskusi povzročijo citotoksične poškodbe ali celično smrt (Draganov et al., 2005).

Celična linija McCoy je bila ustvarjena v teksaškem laboratoriju (Tissue Culture Laboratory, Texas) leta 1955 iz celic v sklepnih tekočini kolenskega sklepa pacienta z degenerativnim artritismom. Na razpolago sta dve vrsti celic McCoy, ki prihajata iz dveh različnih laboratorijev (University of Texas, Houston in Winstar Institute, Philadelphia), to sta celična linija McCoy A (človeške celice) in McCoy B (mišje celice) (Draganov et al., 2004-2005).

Učinki na celičnih kulturah se najlažje opazujejo z invertnim in s konfokalnim mikroskopom.

Invertni mikroskop omogoča direktno opazovanje celic v posodi, v kateri rastejo. Ker so objektivni nameščeni pod mizico, višina posode ne ovira izostritve slike, preparat pa je osvetljen od zgoraj. Optični del mikroskopa je lahko prirejen tako, da omogoča fluorescenčno ali faznokontrastno mikroskopiranje (Veranič et al., 2010).

Glavna lastnost konfokalnega mikroskopa je, da omogoča poleg dvodimenzionalnega še trodimenzionalno opazovanje celice ali tkiva. Osnova takega mikroskopa je fluorescenčni mikroskop. Pri konfokalnem mikroskopu ne osvetljujemo celotnega preparata, ampak ga po točkah pregledujemo v določeni optični ravnini z laserskim žarkom. Detektor sprejme vzpodbujeno fluorescenčno svetlobo iz posameznih točk in informacijo s pomočjo računalnika pretvori v sliko. Dve zaslonki z zelo majhnima odprtinama pa omogočata skeniranje preparata v izbrani ravnini z nastavljivo globino. Zaslonki sta nameščeni v gorišču za lečo objektiva (konfokalno). Prva zaslonka nam omogoča osvetljevanje preparata le v izbrani točki v nekem trenutku in je nameščena za izvorom svetlobe, druga pa preprečuje vstopanje fluorescentne svetlobe, ki izhaja

iz območij preparata zunaj gorišča. Ta zaslonka je nameščena pred detektorjem. Konfokalni mikroskop omogoča opazovanje več sto μm debelih preparatov. Trodimenzionalno sliko tkiva pa lahko sestavimo iz optičnih rezin preparata (Veranič et al., 2010).

2.2.5 Učinek toksinov bakterije *Clostridium difficile* na aktinski citoskelet

Znotrajcelični citotoksini lahko depolimerizirajo sistem mikrofilamentov na dva različna načina; lahko direktno vplivajo na aktin in spremenijo njegovo funkcijo ali pa inaktivirajo signalne poti (npr. GTPaze), ki upravljajo dinamični sistem aktinskih filamentov (Boquet et al., 1998).

Toksina A in B delujeta na aktin preko ATPaz. Inaktivirata Rho GTPaze (Just et al., 2004; Davies et al., 2011).

Binarni toksin CDT je ADP-riboziltransferaza, ki vpliva direktno na aktin. Depolimerizira aktinski citoskelet in formira izbokline na membrani mikrotubulov ter tako omogoči povečano adhezijo bakterij in naselitev hipervirulentnega seva *C. difficile*. Take modifikacije inhibirajo polimerizacijo aktinskih filamentov in uničijo aktinski citoskelet (Schwan et al., 2011).

2.2.6 Aktinski filament ali mikrofilamenti

Citoskelet je celično ogrodje, ki daje celici obliko in trdnost. Ima pomembno vlogo pri znotrajceličnem transportu, omogoča gibanje organelov ter spreminjanje oblike celice. Sodeluje pri celični delitvi in pri kontroli rasti celične stene pri rastlinah.

Poznamo tri tipe citoskeletnih filamentov, vsak od njih ima specifično strukturo in funkcijo, vsi so pomembni pri prostorski organizaciji celice. Ti so: *intermediarni filament*, *mikrotubuli* in *aktinski filament*.

Intermediarni filamenti omogočajo mehansko trdnost okoli jedra in zaščito pred udarci. Delimo jih na citoplazemske in jedrne filamente.

Mikrotubuli so cevaste strukture, sestavljene iz α in β tubulinskih dimerov. Sodelujejo pri znotrajceličnem transportu, delitvi celic ter premikanju bičkov in migetalk.

Aktinski filamentni so zgrajeni iz dveh prepletajočih verig - polimerov aktina (premer 5-9 nm). Filamenti potekajo po celotni celici, najbolj pa so koncentrirani tik pod plazmalemo v celičnem korteksu. Imajo vlogo pri mišični kontrakciji, vzdrževanju oblike celice, delitvi celice, lokomociji in ameboidnem gibanju (Alberts et al., 2010).

Glavni gradnik aktina je protein G-aktin, ki je zgrajen iz 375 aminokislin. Ti proteini se združijo v protofilament F-aktin. Dva protofilamenta pa tvorita aktin (Štajner, 2010).

Pri vdoru patogenov v celico ti najprej poškodujejo citoskelet, tako da prekinejo povezave v njem (Gouin et al., 2005; Bhavsar et al., 2007; Cossart in Toledo-Arana, 2008). Ti procesi se zgodijo zaradi nenehne polimerizacije in depolarizacije aktina v zelo kratkem času. Aktin je ATPaza. Sestava citoskeletnega omrežja je odvisna od urejenega prehoda celičnega aktina od monomera G-aktina do vlaknastega F-aktina. Prehod med G-aktinom in F-aktinom regulira hidroliza (Dominguez, 2009).

Treadmilling je proces pri katerem se ohranja konstantna dolžina polimernega proteina z dodajanjem proteinskih podenot na enem (+) koncu in odcepljanjem monomerov na drugem (-) koncu (Alberts et al., 2010). Aktinski monomeri (ATPaze) se priključijo hitro rastočemu pozitivnemu (+) koncu filamenta, hidroliza zavzame mesto na filamentu in ADP-aktinski monomeri se ločijo od negativnega (-) konca (Pollard in Borisy, 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Bakterija *Clostridium difficile* in izbor sevov

Kot vemo, lahko bakterija *C. difficile* proizvaja tri toksine (TcdA, TcdB in CDT). Za poskuse smo izbrali sev, ki ne dela toksinov A, B ali CDT, ima pa hemolitično aktivnost:

- ZZV09-1747 – netoksinogeni sev, A⁻B⁻ (toksin A negativen, toksin B negativen), hemoliza – pozitivna

Za pozitivno kontrolo smo uporabili sev *Clostridium perfringens* /CCUG 2036.

Sevi bakterije *Clostridium difficile*, ki smo jih uporabili, so bili identificirani s klasičnimi in molekularnimi postopki (Rupnik in sod., 1998; <http://www.mf.uni-mb.si/Mikro/tox/>). Ti so trajno shranjeni v zbirki sevov Oddelka za mikrobiološke raziskave, Centra za mikrobiologijo, Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor, pri -80°C.

3.2 Priprava supernatantov za testiranje hemolitične aktivnosti

Seve uporabljene pri hemoliznem testu, smo s cepilno zanko nanesti na površino selektivnega trdnega gojišča za izolacijo posameznih kolonij. Plošče smo nato inkubirali pod anaerobnimi pogoji pri 37°C 72 ur. Kolonijo smo s trdnega gojišča prenesli v epruvete s 5 ml tekočega gojišča Schaedler in jih inkubirali 5 dni pri 37°C. Nato smo v vrtičniku premešali vsebino in ločili supernatant od peletov z 10 min centrifugiranjem pri 12000 obr/min. Dobljen supernatant smo prefiltrirali skozi membranski poliacetilni filter s porami premera 0,22μ (Millipore) (Zemljič, 2010).

3.3 Hemoliza in test na hemolitično aktivnost

Za test na hemolitično aktivnost smo uporabili suspenzijo eritrocitov. Eritrocite smo pripravili tako, da smo prenesli kri v 2ml epice, jih centrifugirali pri 3500 obr/min, 5 min. Supernatant smo odpipetirali in zavrgli, usedlino pa trikrat sprali z 0,85% NaCl.

Pred testiranjem hemolitične aktivnosti smo naredili 2% suspenzijo eritrocitov, tako da smo v 980 μ l NaCl dodali 20 μ l peletov.

Za ugotavljanje hemolitične aktivnosti smo v 125 μ l 2% suspenzije eritrocitov dodali 50 μ l pufru in 125 μ l supernatanta. Po končani inkubaciji (1 ura, 37°C, anaerobni pogoji) smo suspenzijo centrifugirali (3 min, 4000 obr/min). Supernatant smo odpipetirali v 96-jamsko ploščico (200 μ l/jamico) in izmerili optično gostoto pri 450 nm in 620 nm.

3.4 Celična linija in gojenje celic

Pri raziskavi *in vitro* smo uporabili celično linijo mišjih fibroblastov McCoy B. Celice smo gojili v gojišču D-MEM (10 % FBS, 1 % MEM NEA, 1 % natrijev piruvat, penicilin (100 U/ml) in streptomycin (100 μ g/ml); Gibco-Invitrogen, Kalifornija, ZDA) in v CO₂ inkubatorju v aerobnih razmerah pri 37°C in 5% CO₂. Za gojenje in razmnoževanje smo uporabili posode za gojenje celičnih kultur ter 6-, 12- in 96-jamske ploščice. Celice smo precepili v sveže gojišče vsake 4 dni oz. odvisno od poteka poskusa. Da smo celice odlepili od podlage, smo jih sprali z medijem RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, Kalifornija, ZDA). Z 0,25% tripsin-EDTA (Gibco-Invitrogen, Kalifornija, ZDA) smo prekinili medcelične povezave in celice resuspendirali v gojišču D-MEM ter jih prešteli. Tako pripravljene celice smo uporabili za nadaljnje poskuse. Za proučevanje so celice najprimernejše takrat, ko je njihova konfluentna rast med 80-95%.

3.5 Spremljanje učinka supernatanta na celični liniji z uporabo invertnega mikroskopa

Pripravljene celice (glej 3.4) smo gojili v standardnih razmerah na objektnih stekelcih (Tissue Culture Coverslips 13 mm, Sarstedt) v 24-jamski ploščici; čas inkubacije 24 ur oz. do 80-90% konfluentne rasti celic. Pripravili smo razredčine bakterijskega supernatanta v razmerju 1:5 ter 100 µl razredčine dodali v jamico z 900 µl D-MEM gojišča in celicami. Učinek smo nato opazovali z invertnim mikroskopom po 12. in 48. urah inkubacije. Celice so bile tako pripravljene za barvanje aktinskih filamentov in jeder.

3.6 Barvanje aktinskih filamentov in jeder ter sledenje spremembam v aktinskem citoskeletu z uporabo konfokalnega mikroskopa

Celice smo gojili na objektnih stekelcih, kot je opisano zgoraj.

Celice tretirane s supernatantom smo pred barvanjem opazovali z invertnim mikroskopom, da smo potrdili učinek supernatanta. Nato smo celice barvali z barvilom Alexa Fluor® 546 phalloidin (Invitrogen, Kemomed), ki obarva samo aktinski citoskelet ter barvilom ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen, Kemomed), ki obarva jedra.

Pred barvanjem aktinskih filamentov smo odstranili medij in celice spirali z 1xPBS, 3x5 min. Nato smo jih 10 min fiksirali z 4% raztopino paraformaldehida (PFA v 0,1M PBS, pH 7.4) ter ponovno spirali z 1xPBS, 3x5 min. Celično membrano smo permeabilizirali z raztopino 0,1% tritona X-100 v 1xPBS (Triton® X-100, Bio-Rad).

Nespecifično barvanje ozadja smo blokirali v 2% raztopini BSA (Albumin, from bovine serum, Sigma-Aldrich) v 1xPBS, 20 min, pri sobni temperaturi.

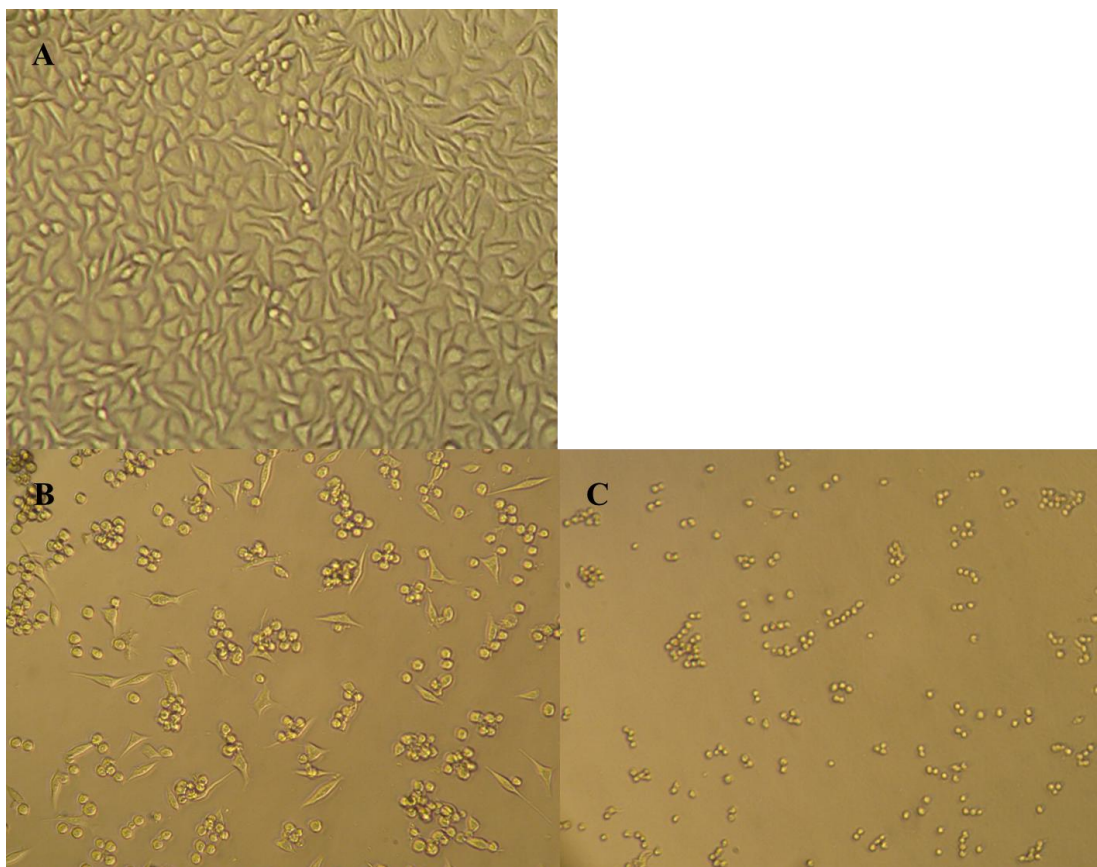
Celice smo nato inkubirali s FITC označenim faloidinom (0,3 μ M, Alexa Fluor® 546 phalloidin, Invitrogen) v 0,5% raztopini BSA v 1xPBS 1 uro, pri sobni temperaturi (pred vplivom svetlobe smo jih zavarovali z alu folijo). Po inkubaciji smo celice temeljito spirali z 1xPBS, 3x5 min in jih prekrili s snovjo proti zbleditvi signala (0,02 M natrijev borat, 90% glicerol, 3% N-propil galat ali 70% glicerol v 1xTBS pufri (TRIS 42,23 g, NaCl 80,06 g, dH₂O do 1000ml, pH=7.6)). Krovna stekla s pobarvanimi celicami smo prenesli na objektna stekla, na katera smo predhodno kanili mounting medij (7ml glicerola in 3 ml 1xTBS) in nato robove premazali z lakom, da smo preprečili vdor imerzijskega olja oz. vode pri mikroskopskem opazovanju.

Pred barvanjem jeder smo odstranili medij in celice spirali z 1xPBS, 3x5 min. Na filter papir smo kanili kapljico DAPI reagenta. S pinceto smo previdno prijeli krovno steklo in ga položili na filter papir tako, da so bile celice pomočene v DAPI reagent. Preko noči smo jih inkubirali pri sobni temperaturi (celice smo zavarovali pred vplivom svetlobe z alu folijo). Po inkubaciji smo celice prekrili s snovjo proti zbleditvi signala (0,02 M natrijev borat, 90% glicerol, 3% N-propil galat ali 70% glicerol v 1xTBS pufri) in jih pritrdili na objektno steklo, na katero smo predhodno nanesli mounting medij, nato smo robove premazali z lakom.

Tako pripravljene preparate za imunofluorescenčno dokazovanje proteina citoskeleta smo pogledali s konfokalnim mikroskopom Leica TCS SP5 II na Inštitutu za fiziologijo Medicinske fakultete Univerze v Mariboru.

4 REZULTATI

Učinke sevov s hemolitično aktivnostjo smo opazovali z invertnim mikroskopom Zeiss KPL Axiovert 40 CFL. Slike smo posneli skozi okular invertnega mikroskopa z digitalnim fotoaparatom Canon IXUS 70.



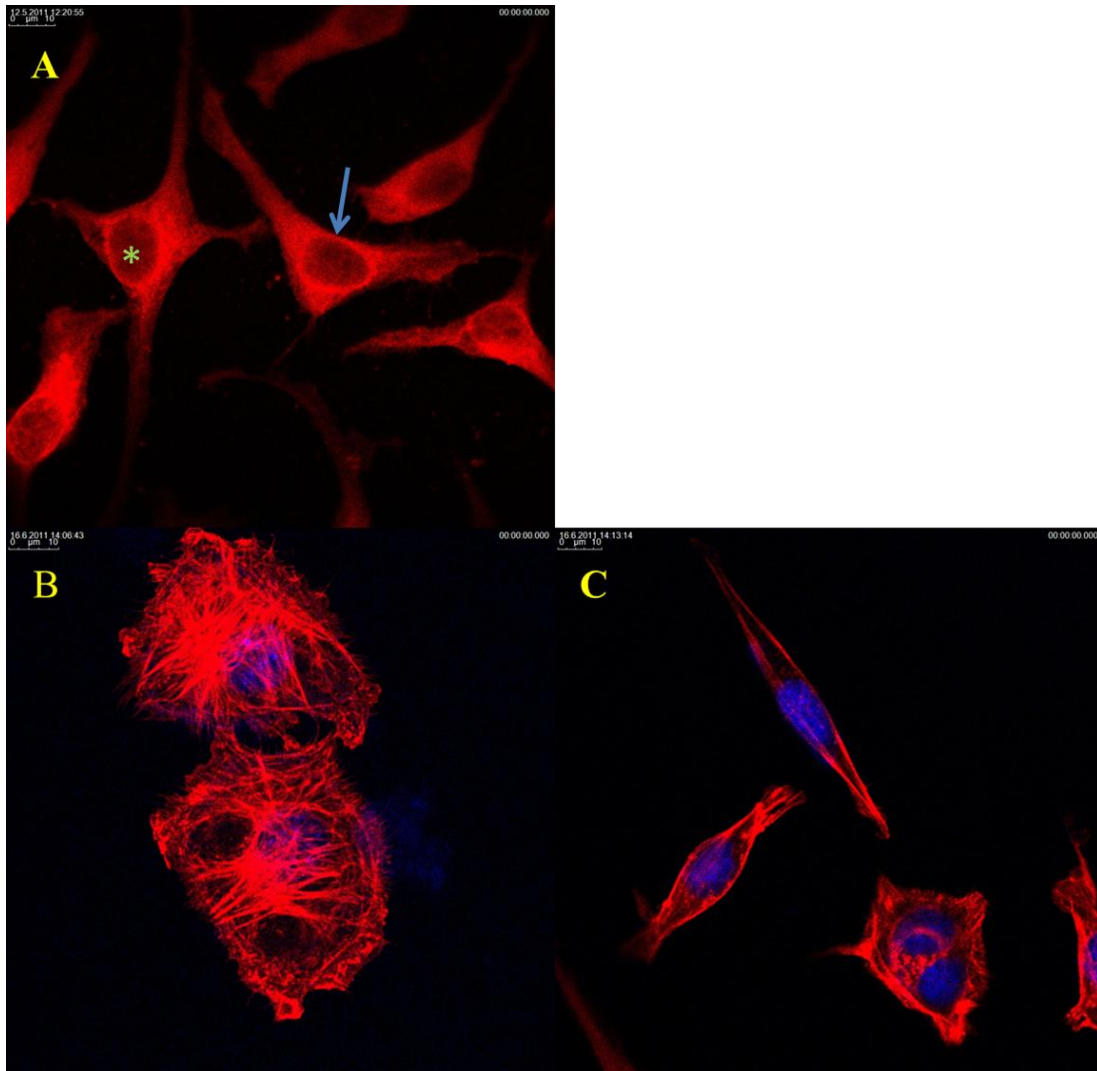
Slika 4.1 Vretenaste celice McCoy posnete skozi okular invertnega mikroskopa, pri 10x povečavi. (A) Celice so dosegle 80-90% konfluentno rast in niso tretirane s supernatantom. (B) Celice so tretirane z netoksinogenim sevom bakterije *C. difficile* ZZV09-1747 s hemolitično aktivnostjo. (C) Celice so tretirane s supernatantom *Clostridium perfringens* /CCCUG 2036 kot pozitivna kontrola.

Na sliki 4.1 so prikazani učinki netoksinogenega seva *C. difficile* s hemolitično aktivnostjo (Slika 4.1(B)). Po 48 urni inkubaciji s supernatantom ugotovimo, da so se

celice v primerjavi s kontrolnimi (Slika 4.1(A)) sprijele v skupke in zaokrožile. Učinek je podoben tistemu, ki ga opazimo tudi pri kontrolnem klostridiju (*C. perfringens* s hemolitično aktivnostjo) (Slika 4.1(C)).

Učinek se je manjšal z razredčitvami supernatanta (rezultati niso prikazani).

S konfokalnim mikroskopom Leica TCS SP5 II smo opazovali obarvani aktinski citoskelet na Inštitutu za fiziologijo Medicinske fakultete v Mariboru. Uporabili smo 60x povečavo.



Slika 4.2 Pobarvani aktinski filamentii celic McCoy.

* prikazuje jedro; perinuklearni prostor- območje okoli jedra (→). (A) Kontrolne, netretirane celice. (B) Celice tretirane z netoksinogenim sevom *C. difficile* ZZV09-1747 s hemolitično aktivnostjo. (C) Kontrolne celice tretirane s *C. perfringens* /CCUG 2036 hemolitičnim sevom. Jedra so obarvana z barvilom DAPI (samo B in C).

Pri kontrolnih celicah (Slika 4.2(A)) je viden preplet aktinskih filamentov po celotnem volumnu citoplazme, ki je močnejši, z rahlo kondenzacijo okoli jedra.

Celice tretirane s *C. difficile* s hemolitično aktivnostjo (Slika 4.2(B)) se zaokrožijo. Pride do sprememb v aktinskem citoskeletu. Filamenti so opazni, ni posebne kondenzacije niti okrog jedra, niti pod plazmalemo.

Pri celicah pozitivne kontrole (hemolitičen *C. perfringens*; Slika 4.2(C)) je prav tako prišlo do sprememb na aktinskem citoskeletu, ki pa so drugačne kot pri kontrolnem sevu *C. difficile* (Slika 4.2(B)). Aktinski filament niso več opazni, opazna je kondenzacija aktina pod plazmalemo.

Preparate smo analizirali tako, da smo celice opazovali in fotografirali na različnih ravneh preparata. Napravili smo serije fotografij celic in potrdili spremembe na citoskeletu (glej Prilogo A in B).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V raziskavi smo uporabili netoksinogeni sev bakterije *C. difficile*, ki ima hemolitično aktivnost. Klostridiji so grampozitivne anaerobne bakterije, ki delajo več različnih toksinov. Sevi bakterije *C. perfringens* izdelujejo kar 12 različnih toksinov, večina od njih ima hemolizni učinek (Zemljič, 2010). Hemolizini, ki jih najdemo pri številnih vrstah, pri *C. difficile* še niso bili opisani.

V okviru diplomskega dela smo ugotavljali učinke netoksinogenega seva s hemolitično aktivnostjo bakterije *C. difficile* na aktinski citoskelet mišjih fibroblastov. Pri tem so bile uporabljene celice McCoy. Na podlagi rezultatov vidimo, da ima hemolitičen sev *C. difficile* podoben, ampak drugačen učinek na aktinski citoskelet kot *C. perfringens*.

Iz tega lahko zaključimo, da *C. difficile* verjetno izdeluje hemolizin, ki ni soroden *C. perfringens*.

Gurtner in sodelavci so gledali podobne učinke na aktinski citoskelet pri *C. perfringens* β -toksinu (CPB). Barvali so aktinske filamente in celice tretirali z CPB ter ugotovili, da je prišlo do poškodb aktinskega citoskeleta, prekinitev stikov in skrčitve celic (Gurtner et al., 2010).

Naše ugotovitve smo prav tako primerjali z raziskavo, kjer so Basaraba in sodelavci opazovali, ne samo hemolizni učinek na aktin, ampak vpliv povečane koncentracije čistega aktina na bakterijsko kulturo, oz. na ekspresijo hemolitične aktivnosti. Prišli so do ugotovitev, da se je povečanje hemolitične aktivnosti pojavilo samo, kadar so povečali koncentracijo aktina med rastočo fazo, medtem ko ni bilo učinka, ko so dodali aktin h kulturi supernatanta, ki je vsebovala hemolizin. Povečanje hemolitične aktivnosti je bilo odvisno od koncentracije aktina samo v zgodnji fazi rasti celic (Basaraba et al., 1998).

5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov zbranih pri diplomskem delu lahko zaključimo:

- netoksinogeni sev bakterije *C. difficile* s hemolitično aktivnostjo ima vpliv na morfolologijo celic mišjih fibroblastov,
- sev bakterije *C. perfringens* /CCCUG 2036 spremeni obliko celic in vpliva na razporeditev aktinskih filamentov,
- *C. difficile* izdeluje hemolizine, ki niso sorodni *C. perfringens*.

6 POVZETEK

Bakterija CD velja za enega najpogostejših črevesnih patogenov bolnišničnih okolij današnjega časa. Problem predstavlja pri bolnikih, ki se dolgotrajno zdravijo z antibiotiki in je posledično oslABLjena njihova črevesna mikrobiota, kar omogoča bakteriji ugodne pogoje za namnožitve. Pri okuženih ljudeh se pojavijo driske, lahko pa zbolijo za hudo boleznijo - psevdomembranoznim kolitisom, ki se lahko konča s smrtjo.

V diplomski nalogi smo želeli dokazati vpliv netoksinogenega seva bakterije CD s hemolitično aktivnostjo na strukturo aktinskega citoskeleta pri mišjih fibroblastih. Predpostavili smo, da bo učinek supernatanta na nebarvanih celicah viden z uporabo invertnega mikroskopa, in da bo sprememba na barvanih aktinskih filamentih celic tretiranih s supernatantom vidna s konfokalnim mikroskopom. Obe hipotezi smo potrdili z rezultati, ki smo jih prikazali v obliki slik.

Po analizi rezultatov smo ugotovili, da so učinki netoksinogenih sevov bakterije CD s hemolitično aktivnostjo na aktinski citoskelet vidni tako z invertnim mikroskopom, kot s konfokalnim, ter da se razlikujejo od učinkov kontrolnega hemolitičnega seva *Clostridium perfringens*.

7 ZAHVALA

“Gratitude makes sense of our past, brings peace for today, and creates a vision for tomorrow”

[Melody Beattie]

Za vso strokovno pomoč, nasvete in izkušnje se iskreno zahvaljujem mentorici doc. dr. Saški Lipovšek in somentorici prof. dr. Maji Rupnik.

Hvala Beati in vsem, ki ste mi pomagali in svetovali pri delu v laboratoriju, še posebej hvala dr. Mateji Zemljič za vso strokovno pomoč, vzpodbudne besede, potrpljenje in prijaznost.

Hvala Rudiju Mlakarju za tehnično pomoč pri mikroskopiranju.

Iskrena hvala Jani Jereb za slovnični pregled besedila.

Najlepša hvala vsem domačim, ki ste me moralno in finančno podpirali skozi vsa leta študija.

Hvala Loriju in najinemu sinu Liamu za vso podporo, obilico smeha in dobre volje!

8 VIRI

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2010. Molecular Biology of the Cell. Garland Science. New York. Str. 907-982.

Alouf J. E., Billington S.J., Jost H.B. 2006. Repertoire and general features of the family of cholesterol-dependent cytolysins. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, Chapter 36: 643-657.

Anderluh G., Lakey J.H. 2008. Disparate proteins use similar architectures to damage membranes. Trends in Biochemical Sciences, 33(10):482-490.

Barley F., Lecadet M.M., Delecluse A. 1998. Cloning and sequencing of three new putative toxin genes from *Clostridium bifermentans* CH18. Gene, 211:293-299.

Basaraba R. J., Byerly A.N., Stewart G.C., Mosier D.A., Fenwick B.W., Chengappa M.M., Laegreid W.W. 1998. Actin enhances the haemolytic activity of *Escherichia coli*. Microbiology, **144**, 1845-1852.

Bhavsar A.P., Guttman J.A. in Finlay B.B. 2007. Manipulation of hostcell pathways by bacterial pathogens. Nature 449:827-834.

Boquet P., Munro P., Fiorentini C., Just I. 1998. Toxins from anaerobic bacteria: specificity and molecular mechanisms of action. Current Opinion in Microbiology, 1: 66-74.

Borriello S.P., Wren B.W., Hyde S., Seddon S.V., Sibbons P., Krishna M.M., Tabaqchali S., Manek S., Price A.B. 1992. Molecular, immunological, and biological characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, 60:4192-4199.

Chaves-Olarte E., Weidmann M., Eichel-Streiber Cv., Thelestam M. 1997. Toxins A and B from *Clostridium difficile* differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate, specificities, and surface binding to cultured cells. *J. Clin. Invest.* **100**, 1734-41.

Chernak E., Johnson C.C., Weltman A., McDonald L.C., Wiggs L., Killgore G., Thompson A., LeMaile-Williams M., Tan E., Lewis F.M. 2005. Severe *Clostridium difficile*-associated disease in population previously at low risk-four states. *Journal of the American Medical Association*, 295(1):25-27.

Cohen A.L., Bhatnagar J., Reagan .S, Zane S.B., D'Angeli M.A., Fischer M., Killgore G., Kwan-Gett T.S., Blossom D.B., Shieh W.J., Guarner J., Jernigan J., Duchin J.S., Zaki S.R., McDonald L.C. 2007. Toxic shock associated with *Clostridium sordellii* and *Clostridium perfringens* after medical and spontaneous abortion. *Obstetrics and Gynecology*, 110(5):1027-33.

Cossart P., Toledo-Arana A. 2008. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect* 10:1041-1050.

Davies A. H., Roberts A.K., Shone C. C., Acharya K. R. 2011. *Biochem. J.* **436**, 517-526.

Dawson L. F., Valiente E., Wren B. W. 2009. *Clostridium difficile* – A continually evolving and problematic pathogen. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 1410-1417.

Deneve C., Janoir C., Poilane I., Fantinato C., Collignon A. 2009. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: S24-S28.

Dominguez R. 2009. Actin filament nucleation and elongation factors – structure-function relationships. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*; 44(6): 351-366.

Draganov M., Murdjeva M., Michailova-Topalska T. 2005. McCoy and McCoy-Plovdiv cell lines in experimental and diagnostic practice – past, present and perspectives. *Journal of Culture Collections*, Volume 4, 2004-2005, pp. 3-16.

Gouin E., Welch M.D. in Cossart P. 2005. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol* 8:35-45.

Gurtner C., Popescu F., Wyder M., Sutter E., Zeeh F., Frey J., von Schubert C., Posthaus H. 2010. Rapid Cytopathic Effects of *Clostridium perfringens* Beta-Toxin on Porcine Endothelial Cells. *Infection and Immunity*, 2966-2973.

Hecht G., Pothoulakis C., LaMont J. T., Madara J. 1988. *Clostridium difficile* toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.* **82**, 1516-24.

Hecht G., Koutsouris A., Pothoulakis C., LaMont J. T., Madara J. 1992. *Clostridium difficile* toxin B disrupts the barrier function of T84 monolayers. *Gastroenterology* **102**, 416-23.

Jank T., Aktories K. 2008. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Otto-Krayer-Haus, Albertstrasse 25, D-79104 Freiburg, Germany.

Just I., Gerhard R. 2004. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **152**, 23-47.

Karasawa T., Wang X., Maegawa T., Michiwa Y., Kita H., Miwa K., Nakamura S. 2003. *Clostridium sordellii* Phospholipase C: Gene Cloning and Comparison of Enzymatic and Biological Activities with Those of *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans* Phospholipase C. *American Society for Microbiology*, 71:641-646.

Kim J., Smathers P.P., Leckerman K.H., Coffin S., Zaoutis T. 2008. Epidemiological features of *Clostridium difficile*-associated disease among inpatients at children's hospitals in the United States, 2001-2006. *Pediatrics*, 122(6):1266-1270.

Kraig E., Dailey T., Kolodrubety D. 1990. Nucleotide sequence of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: homology to the alpha-hemolysin/leukotoxin gene family. *Infection and Immunity*, 58:920-929.

Lesieur C., Vecsey-Semjen B., Abrami L., Fivaz M., Gisou van der Goot F. 1997. Membrane insertion: The strategies of toxins. *Molecular Membrane Biology*, 14(2), 45-64.

Menestrina G., Vecsey Semjen B. 1999. Biophysical methods and model membranes for the study of bacterial pore-forming toxins. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, Chapter 14: 287-309.

Petit L., Gibert M., Popoff M. 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology*, 7(3):104-10.

Pizza M., Massignani V., Rappuoli R. Bacterial toxins. 1997. V: Aktories K. (ed.), *Bacterial toxins, tools in cell biology and pharmacology*, Chapman & Hall, Weinheim; str. 299-340.

Pollard T.D., Borisy G.G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112:453-465.

Popoff M.R., Geny B. 2006. Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. *Biology of the Cell*, 98: 667-678.

Riegler M., Sedivy R., Pothoulakis C., Hamilton G., Zacherl J., Bishof G., Cosentini E., Feil W., Schiessel R., LaMont J. T., Wenzl E. 1995. *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium *in vitro*. *J. Clin. Invest.* **95**, 2004-2011.

Rouphael N.G., O'Donnell J.A., Bhatnagar J., Lewis F., Polgreen P.M., Beekmann S., Guarner J., Killgore G.E., Coffman B., Campbell J., Zaki S.R., McDonald L.C. 2008.

Clostridium difficile-associated diarrhea: An emerging threat to pregnant women. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 198(6):635e1-635e6.

Rupnik M., Wilcox M., Gerding D.N. 2009. *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology, 7(7):526-536.

Rupnik M., Just I. 2006. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins* 3rd edn (eds Alouf, J. A. & Popoff, M. R.) 409-429 (Academic Press, Burlington, Massachusetts, USA).

Štajner S. 2010. Mehanika citoskeleta. Seminar, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za matematiko in fiziko.

Thelestam M., Chaves-Olarte E., Moos M., von Eichel-Streiber C. 1999. Clostridial toxins acting on the cytoskeleton. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, Chapter 8: 147-173.

Thelestam M., Chaves-Olarte E. 2000. Cytotoxic effects of the *Clostridium difficile* toxins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **250**, 85-96.

Titball R.W. 1999. Membrane-damaging and cytotoxic phospholipases. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, Chapter 15: 310-329.

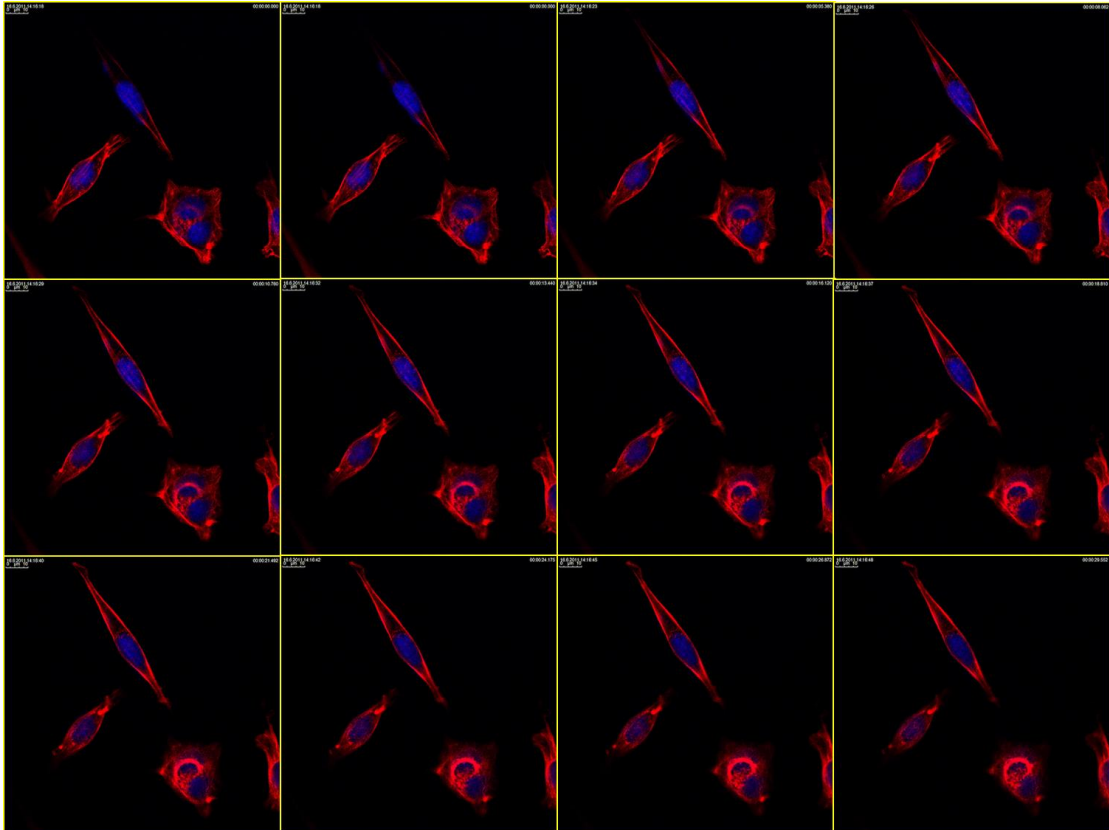
Tweten R.K., Melton J. 2006. *Clostridium septicum* pore-forming α -toxin. V: The Source Book of Bacterial Protein Toxins (Alouf J.E., Popoff M.R., eds), Elsevier Academic press, Amsterdam, 34:623-630.

Veranič P., Romih R., Pšeničnik M. 2010. Praktični pouk celične biologije. Tehniška založba Slovenije. Ljubljana. Str. 12-26.

Zemljič M. 2010. Novi mehanizmi toksičnosti pri bakteriji *Clostridium difficile*. Doktorska disertacija. Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta.

9 PRILOGE

Priloga A. Serije presekov kontrolnih celic tretiranih s *C. perfringens* /CCUG 2036 hemolitičnim sevom. Preseki so narejeni na vsakih 0,1 μm . Slike si sledijo z leve proti desni.



Priloga B. Serije presekov celic tretiranih z netoksinogenim sevom *C. difficile* ZZV09-1747 s hemolitično aktivnostjo. Preseki so narejeni na vsakih 0,418 μm . Slike si sledijo z leve proti desni.

