КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доц. Олексій Юрійович Нипорко
Протокол №____ засідання кафедри
від “____” _____2023 р.

ТЕМПЕРАТУРНА ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ ЕКСПРЕСІЇ АМІЛОЇДІВ CURLI У ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ ШТАМАХ ESCHERICHIA COLI

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студентки спеціальності
091 Біологія
ОП «Біологія (високі технології)»
Пащенко Анни Павлівни

Науковий керівник від кафедри
професор кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
д.б.н. **Дзядевич Сергій Вікторович**

Робота виконана у відділі системної та синтетичної мікробіології
Інституту наземної мікробіології ім. Макса Планка
під керівництвом д.б.н. **Суржика Віктора**

Оцінка захисту роботи
_____

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Пащенко А. П. Температурна варіабельність експресії амілоїдів curli у генетично модифікованих штамах *Escherichia coli*. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

У роботі проведено дослідження залежності експресії амілоїдів curli від температурних умов на проміжку 26-37°C та бімодальності експресії curli у колоніях штамів дикого типу, квадрупольного нокауту ΔpdeHΔdgcEΔpdeRΔdgcM та нокауту ΔrcsB бактерії *Escherichia coli*. Встановлено, що для усіх трьох штамів пік експресії виникає при температурі 28°C, після чого рівень експресії поступово знижується, аж до повного її припинення за температури 37°C. Бімодальність експресії curli має різні тенденції для кожного зі штамів, однак значне або повне зниження curli-позитивних клітин спостерігається при 34°C. Отримані результати можуть бути використані для розробки нових моделей дослідження сигнальних шляхів утворення амілоїдів, пов’язаних з нейродегенеративними захворюваннями; покращення проникності бактеріальних векторів та вакцин; попередження рослинних бактеріальних захворювань; визначення передумов виникнення синдрому раптової дитячої смерті та боротьби з резистентністю бактеріальних штамів у навколишньому середовищі.

Ключові слова: curli, біоплівки, експресія, бімодальність, нокаут, температура, сигнальний каскад.

ВСТУП ***4***

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ***6***

1.1. Поняття біоплівок та актуальність поточних досліджень 6

1.2. Склад та характеристика біоплівок, їх роль в адаптації бактерій 7

1.3. Поняття curli та шляхи їх біогенезу 8

1.4. Сигнальні шляхи регуляції експресії curli та бімодальність культури 11

1.5. Позаклітинний матрикс Enterobacteriaceae у природніх господарів та пов'язані хвороби 13

1.6. Позаклітинний матрикс Enterobacteriaceae за межами організму хазяїв 14

1.7. Цільові генетично модифіковані штами 14

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ***17***

2.1. Цільові штами культур бактерій 17

2.2. Отримання початкової культури на чашках Петрі 17

2.3. Умови інкубації планктонних культур 18

2.3.1. Планктонна накопичувальна культура 18

2.3.2. Планктонна цільова культура 18

2.4. Підготовка культури до скринінгу 19

2.5. Ідентифікація оптичної густини та експресії curli 20

2.6. Ідентифікація експресії curli та бімодальності клітин культури 21

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІЖДЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ ***23***

3.1. Інтенсивність експресії curli в залежності від температурних умов 23

3.2. Бімодальність культури при досліджуваних температурах 26

3.3. Застосування отриманих даних та дискусія 29

ВИСНОВКИ ***33***

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ***35***

ДОДАТКИ ***54***

ВСТУП

Ріст резистентності бактерій, які існують як у природних середовищах, так і в організмах господарів, є вкрай інтенсивним. Механізми утворення резистентних штамів досі з'ясовуються, в той час як потенційна їх небезпека зростає погодинно. Однією з підстав резистентності є утворення бактеріями щільних асоціатів – біоплівок, так званих спільнот, які кардинально підвищують стійкість бактерій до несприятливих зовнішніх умов, зменшують чутливість до антибіотиків, фагоцитозу та дезінфікуючих компонентів. Одними з основних складових біоплівок є амілоїди curli («завитки»), вивчення яких почалося лише в 90-х роках 20 сторіччя, і є вкрай актуальним дотепер. Цікавим є й те, що лише частина клітин в колоніях експресують curli, тобто наявна бімодальність їх синтезу. Розуміння механізмів регуляції curli потенційно дозволить оперувати стабільністю біоплівки бактерій. Це дасть змогу розробляти нові антибактеріальні препарати та зробити крок у розуміння складного процесу переходу бактерій з рухомого стану до прикріплених спільнот.

Об'єктами дослідження виступають три штами бактерій *Escherichia coli*, кожен з яких має флуоресцентну мітку для ідентифікації кількості амілоїду curli в цільовій культурі. Штам, названий в цій роботі як дикий тип, виступає контролем для визначення експресії амілоїдів та бімодальності культури, в той час як два інші штами мають видозміну в сигнальному каскаді контролю експресії curli й одночасно залежні від температурних умов. Наукова новизна роботи полягає в тому, що один зі штамів отриманий саме в Інституті наземної мікробіології ім. Макса Планка, і є революційним у своїй здатності регулювати сигнальний каскад curli. Поєднання цих характеристик дає широкий спектр для інтерпретації результатів.

В цьому дослідженні використано ефективні методи ідентифікації амілоїдів curli. Plate reader зчитує флуоресценцію та оптичну густину, що дає змогу кількісно оцінити curli синтезовані в культурі. Проточний цитометр

надає опис зовнішньої структури кожної клітини в зразку культури та статистику відносно бімодальності фракцій клітин.

Метою роботи є дослідження температурної залежності експресії curli та бімодальності біоплівок клітин генетично модифікованих штамів бактерій *Escherichia coli*. Для досягнення мети поставлено такі завдання:

1. Підібрати оптимальні умови інкубації для реалізації температурного скринінгу;
2. Виміряти оптичну густину та флуоресценцію штамів Wild Type, ΔpdeHΔdgcEΔpdeRΔdgcM та ΔrcsB при температурах від 26 до 37°C;
3. Проаналізувати бімодальність культур зазначених штамів за допомогою проточної цитометрії.

Робота була виконана завдяки підтримці українських науковців професором, д.б.н. Віктором Суржиком та дослідницькою групою AG Sourjik в Інституті наземної мікробіології Макса Планка, Відділ системної та синтетичної мікробіології.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Поняття біоплівок та актуальність поточних досліджень

У природних умовах багато бактерій зустрічаються у вигляді асоційованих на поверхні спільнот, які називаються біоплівками [1–3]. Бактерії, що ростуть у вигляді біоплівки, розвивають значні фенотипові, біохімічні та морфологічні відмінності від своїх планктонних аналогів. Ця відмінна біохімічна та фенотипова поведінка відображає різні моделі експресії генів порівняно з планктонними клітинами [4, 5].

Escherichia coli є одним з найбільш досліджених організмів у світі, оскільки вивчення цієї бактерії, як універсального модельного об’єкту, триває вже понад століття. Більшість робіт були спрямовані на дослідження *E. coli* вирощеної в лабораторних умовах, які в повній мірі не відтворюють її природне середовище. Зазвичай *Escherichia coli* є коменсалом, який мешкає в нижній кишці великої кількості тварин. За межами нижньої кишки *E. coli* може пристосовуватися та виживати в кардинально інших умовах довкілля. Формування біоплівки дозволяє бактерії виживати та навіть процвітати в умовах, які не підтримують зростання популяцій у планктонній формі. *Escherichia coli* може утворювати біоплівки практично скрізь: в сечовому міхурі під час інфекції сечових шляхів, на медичних пристроях та поза господарем на рослинах та в ґрунті. Зовнішня матриця *E. coli* складається головним чином з білкового полімеру, названого curli, та полісахариду – целюлози; вона сприяє прикріпленню до органічних та неорганічних поверхонь, стійкості до висихання, захисту від дії імунної системи господаря та антимікробних препаратів [6].

Curli, в свою чергу, демонструють пряму взаємодію з субстратом і формують міжбактеріальні пучки, забезпечуючи згуртовану та стабільну асоціацію клітин у біоплівці [7].

Розуміння регуляції експресії curli та її залежності від навколишніх умов є важливим для впливу на проблему резистентності бактерій, стійкості

біоплівок до знешкоджуючих агентів та вирішення проблеми поширення резистентних штамів у довкіллі й ураженому бактеріями організмі.

1.2. Склад та характеристика біоплівок, їх роль в адаптації бактерій

В огляді Hufnagel et al. (2015), досліджено явище формування біоплівки, яке може зробити бактерії більш адаптованими як в середовищі господаря, так і поза його організмом [8, 9]. Вчені визначають біоплівку як групу поверхнево-асоційованих бактерій, які оточені позаклітинним матриксом, що самостійно ними виробляється [10]. Позаклітинний матрикс *E. coli* містить головний білковий полімер, відомий як curli, а також вуглеводний полімер целюлозу [11–13]. Хоча curli та целюлоза є найбільш поширеними складовими біоплівки, позаклітинний матрикс *E. coli* також може містити пілі типу 1, джгутики, антиген 43, ДНК, β-1,6-N-ацетилглюкозамін (β-1,6-GlcNAc), капсульний цукор і коланінову кислоту [14]. Багато штамів патогенної, екзогенної та комменсальної *E. coli* легко утворюють біоплівки в лабораторних умовах, тому є чудовими модельними організмами для досліджень даного процесу [15–19].

Біоплівки можуть забезпечити бактеріям вищу стійкість до різних впливів навколишнього середовища, таких як антибіотики, імунна система та хижаки. По-перше, позаклітинний матрикс фізично захищає бактерії, утворюючи бар'єр, який здатний протистояти напрузі зсуву, розпізнаванню та фагоцитозу імунними клітинами. По-друге, бактерії, які утворюють біоплівки, можуть збиратися в різні субпопуляції, які мають відмінні між собою фізіологічні характеристики [20, 21].

Розвиток субпопуляції може бути викликаний мутаціями, стохастичною експресією генів або хімічними градієнтами, які розвиваються під час формування біоплівки [22, 23]. Наприклад, бактерії на поверхні біоплівки піддаються впливу більшої кількості кисню, що стимулює більш високу швидкість аеробного дихання [24, 25].

Метаболічні зміни часто збігаються зі стійкістю до різних стресів [26]. Спільнота біоплівок із кількома субпопуляціями, кожна з яких стійка до різних стресів, таким чином демонструє стійкість до ширшого діапазону тиску навколишнього середовища для спільноти біоплівок у цілому.

1.3. Поняття curli та шляхи їх біогенезу

Curli вперше були описані в 1989 році, коли Стаффан Нормарк і його колеги досліджували ізоляти бичачого маститу на здатність зв'язуватися з компонентами матриці клітин-господарів [32]. Автори помітили, що половина ізолятів зв'язувала фібронектин при вирощуванні в умовах, які сприяють утворенню curli. Електронна мікроскопія показала, що ізоляти, що зв'язують фібронектин, створюють волокнисті згорнуті поверхневі структури – curli.

Волокна curli були першими описаними позаклітинними волокнами, які полімеризувалися за допомогою механізму нуклеації-преципітації, також відомого як система секреції типу VII [33–37]. Субодиниці волокон curli та механізм їх збірки кодуються на двох дивергентно транскрибованих оперонах, csgDEFG і csgBAC, які мають спільну міжгенну регуляторну область (рис. 1.1) [27]. Експресія цих оперонів регулюється сигма-фактором стаціонарної фази σS (RpoS) і таким чином активується під час входу в стаціонарну фазу росту [38–42]. Оперон csgBAC кодує головну та мінорну субодиниці curli, CsgA та CsgB відповідно. І CsgA, і CsgB секретуються через зовнішню мембрану. На поверхні клітини CsgB зв'язується із зовнішньою мембраною і створює матрицю, яка сприяє утворенню CsgA амілоїдної складки та утворенню асоційованих з клітиною curli-волокон (рис.1.1) [43]. Електронно-мікроскопічний аналіз привів до оцінки, що 30% клітин *E. coli* виробляють curli в умовах, що викликають завивання [44]. Мутант CsgB секретує розгорнутий CsgA, який може полімеризуватися на поверхні мутантної клітини CsgA у процесі, що називається «міжбактеріальною

комплементацією» [33, 35]. Субодиниці curli з *E. coli* можуть пересіватися та полімеризуватися в амілоїдні волокна in vitro [45].

CsgC є периплазматичним білком, який інгібує полімеризацію амілоїду CsgA при дуже низьких субстехіометричних співвідношеннях [46]. Коли CsgA не секретується належним чином на поверхню клітини, CsgC необхідний для утримання CsgA в неагрегованому стані, що забезпечує протеолітичну деградацію CsgA.

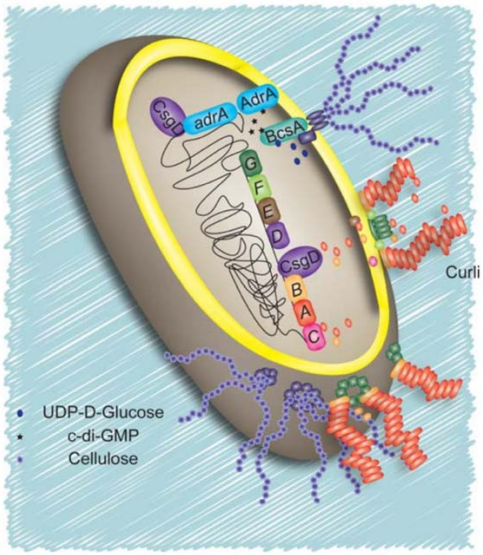


Рис. 1.1 – Модель виробництва позаклітинного матриксу біоплівки [6].

Оперон csgDEFG кодує регулятор CsgD і три допоміжні білки збірки curli (рис. 1.1) [27]. CsgG утворює нонамерну пору у зовнішній мембрані, яка сприяє секреції curli (рис. 1.1) і має центральну пору розміром приблизно 2 нм, яка охоплює зовнішню мембрану [47-49]. Під час збирання curli CsgG утворює дискретні точки, які асоціюються з двома іншими допоміжними білками curli, CsgE та CsgF (рис. 1.1) [47]. Електронно-мікроскопічний аналіз показав, що CsgG, CsgE та CsgF скупчуються навколо волокон curli [44].

Експресія csgD у *E. coli* та *S. Typhimurium* прямо чи опосередковано регулюється кількома клітинними факторами, які опосередковують відповіді на різноманітні зміни навколишнього середовища, включаючи як глобальні, так і специфічні регулятори транскрипції, малі регуляторні РНК та вторинні месенджери [50-53].

Біогенез curli піддається жорсткій і складній регуляції; у *E. coli* амілоїди виробляються при температурах близько 30°C, низькій осмолярності та в стаціонарній фазі [27–29]. Експерименти in vitro показують, що curli за нормальних фізіологічних умов не експресуються в умовах ссавців-господарів (37°C, висока осмолярність). Електронно-мікроскопічний аналіз показав, що всі зразки клітин *E. coli*, вирощені при 25°C на чашках з агаром CFA (CampyFood agar), у середовищі CFA зі струшуванням або в статичному середовищі CFA, експресували curli (та рис. 1.2, a, c та e). З іншого боку, коли клітини інкубували при 37°C, бактерії з біоплівки експресували curli лише після статичного росту (рис. 1.2, f), але не на чашках з агаром CFA або в середовищі CFA зі струшуванням (рис. 1.2, b і d) [30].

Ще одне дослідження White-Ziegler et al. (2008), показало, що при специфічних умовах вирощування та індикації, спостерігається значний сплеск експресії curli при 23°C.

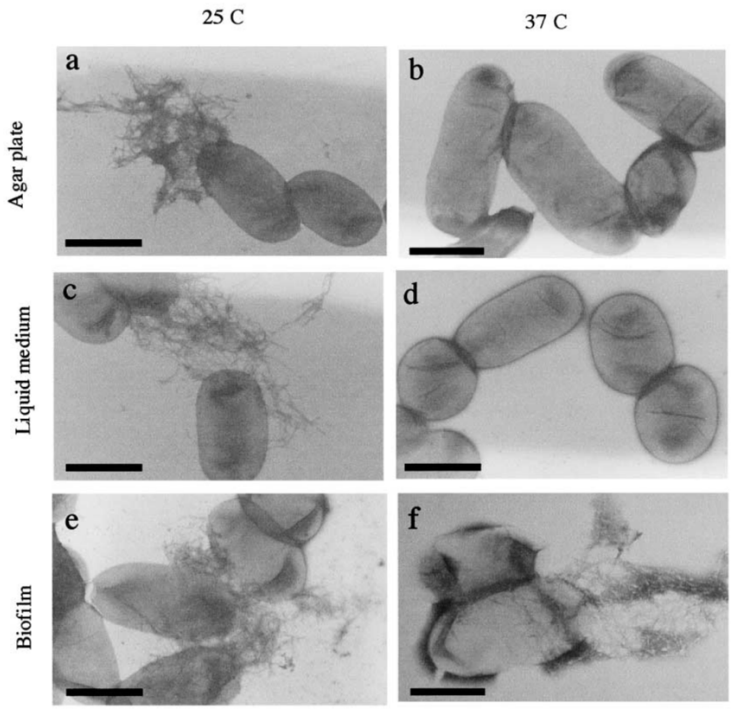


Рис. 1.2 – Електронні мікрофотографії негативно пофарбованої кишкової палички K-12 YMel. Бактерії вирощували на чашках з агаром CFA протягом 2 днів (a і b), у середовищі CFA зі струшуванням протягом ночі (c і

d) або в середовищі CFA в статичних умовах протягом 4 днів для утворення біоплівки (e і f). Масштабні смуги представляють 500 нм [30].

1.4. Сигнальні шляхи регуляції експресії curli та бімодальність культури

Одним із ключових регуляторів csgD є фактор транскрипції MlrA [41, 42, 55, 56]. Активність MlrA залежить від клітинних рівнів бактеріального вторинного месенджера біс-(3'-5')-циклічного димерного гуанозинмонофосфату (c-di-GMP), а в *E. coli* цей контроль, як відомо, опосередковується парою взаємодіючих ферментів - дигуанілатциклаза (DGC) і фосфодіестераза (PDE), DgcM і PdeR, які утворюють потрійний комплекс з MlrA (рис. 1.3) [40, 42, 57]. MlrA підтримується неактивним шляхом зв'язування з PdeR, і ця взаємодія послаблюється, коли останній стає активним як PDE, таким чином діючи як тригерний фермент [57, 58]. Цьому гальмуванню протидіє DgcM, який локально виробляє c-di-GMP для залучення PdeR, а також глобальний пул c-di-GMP. Окрім своєї ферментативної активності, DgcM також може активувати MlrA через пряму взаємодію з білками. Інша пара DGC-PDH, DgcE і PdeH, забезпечує глобальний регулятивний внесок у місцеве регулювання DgcM-PdeR-MlrA [40, 59].

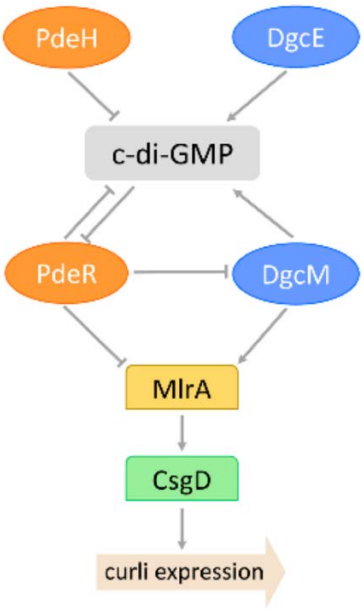


Рис. 1.3 – Сучасна модель регуляції експресії гена curli за допомогою c-di-GMP в *E. coli*, адаптована з Serra & Hengge (2019) [60]. Регуляція здійснюється двома парами дигуанілатциклаз (DGC; синій) і фосфодіестераз (PDE; помаранчевий). PdeH і DgcE контролюють глобальний рівень c-di-GMP, тоді як PdeR і DgcM опосередковують локальне c-di-GMP-залежне регулювання експресії гена curli шляхом контролю активності фактора транскрипції MlrA, який активує інший специфічний для curli фактор транскрипції CsgD [61].

Амілоїдні волокна Curli є основною складовою матриці позаклітинної біоплівки, утвореної бактеріями родини Enterobacteriaceae. У біоплівках *Escherichia coli* експресія гена curli обмежена субпопуляцією бактерій, що призводить до неоднорідності синтезу позаклітинного матриксу. Автори показують [61], що бімодальна активація експресії curli також відбувається в добре змішаних планктонних культурах *E. coli*, що призводить до стохастичної диференціації на окремі субпопуляції curli-позитивних і curli-негативних клітин на вході в стаціонарну фазу росту.

Попередні дослідження біоплівок макроколонії *E. coli*, сформованих на чашках з агаром, показали, що експресія curli відбувається у верхньому шарі колонії, але навіть у цьому шарі її експресія залишалася неоднорідною [15, 20, 60]. Це вказує на взаємодію між глобальною регуляцією експресії гена curli завдяки градієнтам мікросередовища всередині біоплівок і властивою їм стохастичністю. Диференціація *E. coli* на окремі субпопуляції клітин, що експресують або не експресують curli, також спостерігалася в занурених біоплівках, утворених у рідких культурах, в результаті чого експресія curli була пов’язана з клітинною агрегацією [62]. Крім того, бі- або мультимодальність активності репортера csgD також спостерігалася на ранній стаціонарній фазі серед планктонних клітин *S. Typhimurium* [63, 64] та *E. coli* [60]. Враховуючи встановлену c-di-GMP-залежну регуляцію активності CsgD, було запропоновано, що бістабільна експресія curli

походить від тумблера, створеного взаємним інгібуванням між DgcM і PdeR, який може діяти як бістабільний перемикач [60, 65].

1.5. Позаклітинний матрикс Enterobacteriaceae у природніх господарів та пов'язані хвороби

Незважаючи на те, що багато штамів *E. coli* експресують curli та целюлозу на максимальному рівні при 26°C, як це може бути поза межами хазяїна, обидва компоненти експресуються в середовищі хазяїна та відіграють важливу роль у коменсальних і хворобливих взаємодіях. *E. coli* при патологічних станах може експресувати CsgD, curli та целюлозу при 37°C [41, 54].Уропатогенне утворення curli є частиною ранньої стадії колонізації сечового міхура на моделі миші [66]. Curli сприяють взаємодії з епітеліальними клітинами, і можуть пригнічувати полімеризацію антимікробного фактора LL-37, який відіграє важливу роль у захисті сечовивідних шляхів [67]. Неліковані уропатогенні інфекції можуть призвести до дисемінації та інфекцій кровотоку, також відомих як бактеріємія [68]. Цікаво, що уропатогенні штами, виділені від бактеріємічних пацієнтів, утворюють більше curli при 37°C, ніж уропатогенні штами, виділені від небактеріємічних пацієнтів [69]. Крім того, понад 50% ізолятів кишкової палички від пацієнтів із сепсисом утворюють curli при 37°C [70]. Зразки сироватки пацієнтів із сепсисом містили антитіла проти головної субодиниці curli, CsgA, тоді як у контрольних пацієнтів таких не було [70]. Оскільки curli та целюлоза експресуються клінічними ізолятами в умовах колонізації хазяїна, вкрай важливо зрозуміти, як ці компоненти матриці формують взаємодію хазяїн-патоген і молекулярні шляхи, які індукують їх виробництво в нелабораторних умовах.

Окрім захворювання сечовивідних шляхів, більшість *E. coli* в організмі людини зберігається та асоціюється в нижніх відділах кишкового тракту, взаємодіючи з епітеліями кишечника та товстої кишки. Curli та целюлоза необхідні для належного прикріплення та «втирання» кишкової палички до

клітин раку товстої кишки та експлантатів товстої кишки великої рогатої худоби [71].

1.6. Позаклітинний матрикс Enterobacteriaceae за межами організму хазяїв

Кишкова паличка також використовує біоплівки у своєму життєвому циклі поза господарем. Стратегія кишкових мікробів за межами хазяїна змінюється від росту та отримання поживних речовин до прикріпленого способу життя, аеробіозу та тривалого виживання [72]. Умови, пов'язані з життям за межами господаря, такі як низька температура, низький рівень глюкози та поживних речовин, а також окислювальний стрес, викликають утворення позаклітинного матриксу [15, 73–75]. Curli та целюлоза, як правило, спільно експресуються через їх взаємну залежність від регулятора транскрипції CsgD [12, 27, 38]. Експресія як волокон curli, так і целюлози у фракції позаклітинного матриксу ругозних біоплівок корелює зі стійкістю до H2O2 [15, 76]. Також не дивно, що клітини біоплівки, вкриті curli, більш захищені від хижаків, наприклад, від хижих бактерій *Myxococcus xanthus* [77]. На додачу, було виявлено, що curli та целюлоза виробляються екологічними ізолятами *E. coli, Salmonella* та *Citrobacter koseri* в середовищах, що імітують природніх господарів, таких як свинячий гній, продукти та м'ясо [77]. Середовище поза хазяїном провокує утворення curli та целюлози, які захищають Enterobacteriaceae від суворих умов.

1.7. Цільові генетично модифіковані штами

Хоча в типовому геномі *E. coli* міститься близько 4800 генів, лише приблизно 1700 з них є загальними (спільними) для кожного штаму *E. coli* [78]. У загальному випадку, пангеном *E. coli* складається з понад 15 000 генів [79]. Це свідчить про генетичну варіабельність різних ізольованих штамів E. coli та їх здатність до проліферації та виживання в різноманітних середовищах [80, 81].

Як зазначалося вище, експресія curli залежить від регуляції за допомогою c-di-GMP та супутніх дигуанілатциклаз і фосфодіестераз. У дослідженні Lamprecht et al. (2022), [61] показано, що квадрупольний нокаут супутніх регуляторних генів ΔpdeHΔdgcEΔpdeRΔdgcM (також буде позначатися тут як NiBu), наявний в піддослідному штамі в Інституті наземної мікробіології імені Макса Планка, змінює експресію curli таким чином, що лише мала частина фракції клітин *E. coli* є curli-позитивною після інкубації при 30°C. З цієї причини, має сенс дослідити експресію curli, у штамі з її наднизьким рівнем, за більш широкого діапазону температур.

Ще однією цільовою мішенню є білок RcsB (від «Regulator capsule synthesis B») є регулятором відповіді, який належить до багатокомпонентної системи фосфорелей RcsF/RcsC/RcsD/RcsA-RcsB [82–87] та і бере участь у регуляції синтезу капсули колановой кислоти, поділу клітин, периплазматичних білків, рухливості, утворення біоплівки та малої РНК [84, 88–102]. Було виявлено, що сенсорна кіназа RcsC фосфорелея RcsB/CD контролює експресію csgD гена curli [103]; наступні дослідження також підтвердили, що RcsB помірно пригнічує оперон csgDEFG та сильно пригнічує csgBA оперон. Білки RcsB–RcsA є хорошими кандидатами для контролю експресії гена curli у відповідь на зміни клітинної оболонки [100].

Гени fts поділу клітини [94], осморегульований ген osmC і rprA, що кодує малу РНК, яка стимулює трансляцію сигма-фактора RpoS загальної реакції на стрес [104, 105], також контролюються RcsB, але незалежно від RcsA.

Трансляція сигма-фактора стаціонарної фази RpoS (або σ^S) стимулюється принаймні двома малими РНК, DsrA та RprA. На додачу, YcgZ, ymgA та ymgB знаходяться під контролем RpoS, як фактора загального стресу. Сигнальний каскад, що умовно починається з RpoS фактору та проходить через контрольовану невелику регуляторну білкову мережу, зв’язує RpoS та вищезазначений RcsB білок, який, в свою чергу, контролює експресію curli разом з c-di-GMP (рис. 1.4). У дослідженні Rudenko et al.

(2019) [106], зазначається, що рівень білку RpoS варіюється в залежності від температурних умов, а саме диференціально регулюється при 37°C і 42°C, з тенденцією до зниження рівня білку при підвищенні температури. В той же час, у дослідженні Tschowri et al. (2009) [107], вказано, що σ^S фактор накопичується при несприятливих умовах середовища бактерій, включаючи низьку температуру. Отже, доцільно дослідити штам бактерій з нокаутом гену білка родини фосфорелей Rcs, які є зв'язуючою ланкою між відомо температуро-залежним RpoS та експресією curli.

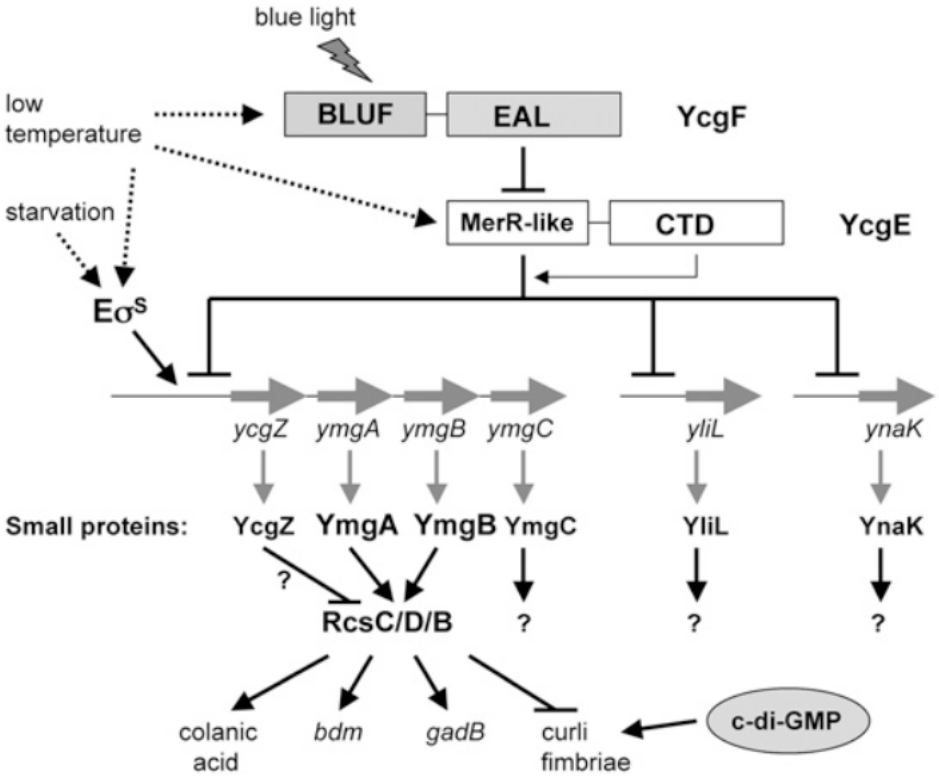


Рис. 1.4 – Модель для YcgF/YcgE-контрольованої малої регуляторної білкової мережі. Інактивація YcgE призводить до індукції восьми малих білків (YcgZ, YmgA, YmgB, YmgC, YliL, YnaK, Bdm і YbgS). Експресія малих білкових генів bdm і ybgS активується YmgB. Ген bdm є відомим членом регулону RcsB; як YmgB впливає на ген ybgS, ще не з'ясовано (тому ybgS не включено на малюнок). Кілька сигналів інтегруються шляхом YcgF/YcgE: синє світло впливає на активність білка YcgF; низька температура індукує експресію YcgF, YcgE та σ^S [107].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Цільові штами культур бактерій

Усі штами та плазміди, використані в цьому дослідженні, перераховані в таблиці 2.1. Похідне *Escherichia coli* W3110 csgA::csgA_RBS_sfgfp [20], яке було сконструйовано для кодування хромосомного транскрипційного репортера sfGFP нижче гена csgA [62] (VS1146), було використано як штам дикого типу (буде позначатися в цій роботі як WT). Генні делеції отримували за допомогою фагової трансдукції P1 з використанням штамів колекції Keio [108] як донорів, а касету стійкості до канаміцину видаляли за допомогою рекомбінази FLP [109].

Штами WT ΔrcsB та WT ΔpdeHΔdgcEΔpdeRΔdgcM (далі буде позначатися як NiBu) взяті з колекції штамів Інституту наземної мікробіології ім. Макса Планка, де їх і було виведено.

Таблиця 2.1 – Штами *Escherichia coli*, використані у цій дослідницькій роботі.

№	Штам	Альтернативна назва	Релевантний генотип
1	VS1146	Wild Type (WT)	W3110 csgA::csgA_RBS_sfgfp
2	-	ΔrcsB	VS1146 ΔrcsB
3	VS1729	NiBu	VS1146 ΔpdeHΔdgcEΔpdeRΔdgcM

2.2. Отримання початкової культури на чашках Петрі

Для того, щоб отримати колонії чистої культури кожного зі штамів, музейний зразок був висіяний на чашки Петрі із середовищем лізогенного бульйону (LB) (10 г триптону, 10 г NaCl і 5 г дріжджового екстракту на літр) методом штриха. Бактерії інкубувалися протягом 48 годин при температурі 37ºC. Після закінчення інкубації чашки зберігалися в холодильнику при температурі ~ - 4ºC протягом 1 місяця, після чого виконувався пересів, потрібний для збереження життєздатності культури.

2.3. Умови інкубації планктонних культур

Планктонні культури *Escherichia coli* вирощували в середовищі триптонного бульйону (ТВ) (10 г триптону, 5 г NaCl на літр). Культури були вирощені вночі (overnight cultures) протягом 22 годин. Для того щоб почати синтезувати curli, культура *Escherichia coli* має увійти в стаціонарну фазу. Експериментально показано, що 22 години є оптимальним часом для виходу культури на плато, і при цьому не є занадто довгим часом очікування результатів та використання інкубатору.

Оскільки в літературних джерелах вказано, що оптимальною для експресії curli цільовою культурою, є температура в околі 30ºС, а при 37ºС синтез остаточно припиняється (у непатогенних штамів), для моніторингу було обрано такі температурні точки: 26 ºС, 28 ºС, 30 ºС, 32 ºС, 34 ºС, 37 ºС. Найнижча температура 26ºС обрана таким чином, щоб за даних умов інкубації культура могла дорости до достатнього рівня, потрібного для коректної ідентифікації її оптичної густини (OD), та, відповідно, флуоресценції.

Усі штами бактерій були вирощені у 100 мл колбах за однакових умов у ротаційному шейкері-інкубаторі при 200 об/хв.

2.3.1. Планктонна накопичувальна культура

Кожен зі штамів WT, WT ΔrcsB та NiBu був узятий для утворення культури накопичення. Колонія з чашки Петрі була внесена у 5 мл триптонного бульйону (ТВ) та інкубувалася у 100 мл колбах протягом 22 годин у ротаційному шейкері-інкубаторі при 200 об/хв та температурі 30 ºС.

2.3.2. Планктонна цільова культура

З добре перемішаної накопичувальної культури було відібрано 50 мкл та внесено у 5 мл триптонного бульйону (ТВ) для кожного штаму відповідно (розведення 1:100). Процедуру повторили 3 рази, так щоб в результаті було отримано по 3 колби на кожен штам *E. coli*. Повтори необхідні для

вдосконалення статистики та уникнення випадкових похибок. Умови інкубації аналогічні до пункту 2.3.1., за виключенням температури.

Експеримент із дев’ятьма колбами послідовно повторювали при температурах 26 ºС, 28 ºС, 30 ºС, 32 ºС, 34 ºС та 37 ºС.

2.4. Підготовка культури до скринінгу

Після 22 годин інкубації, цільові культури були розведені у співвідношенні 1:2. З добре перемішаної проби відбиралося 4 мл, стільки ж було додано свіжого триптонного бульйону (ТВ); процедура повторювалася для кожного зі штамів. Після цього отриману суспензію миттєво розливали у 48-лункові планшети Greiner 48 Flat Bottom Transparent Polystyrene, для уникнення осідання клітин та рівномірної їх кількості у пробах. Об’єм суспензії у кожній лунці 500 мкл. Розлив кожного зі штамів проводили за схемою, наведеною на рис. 2. 1.

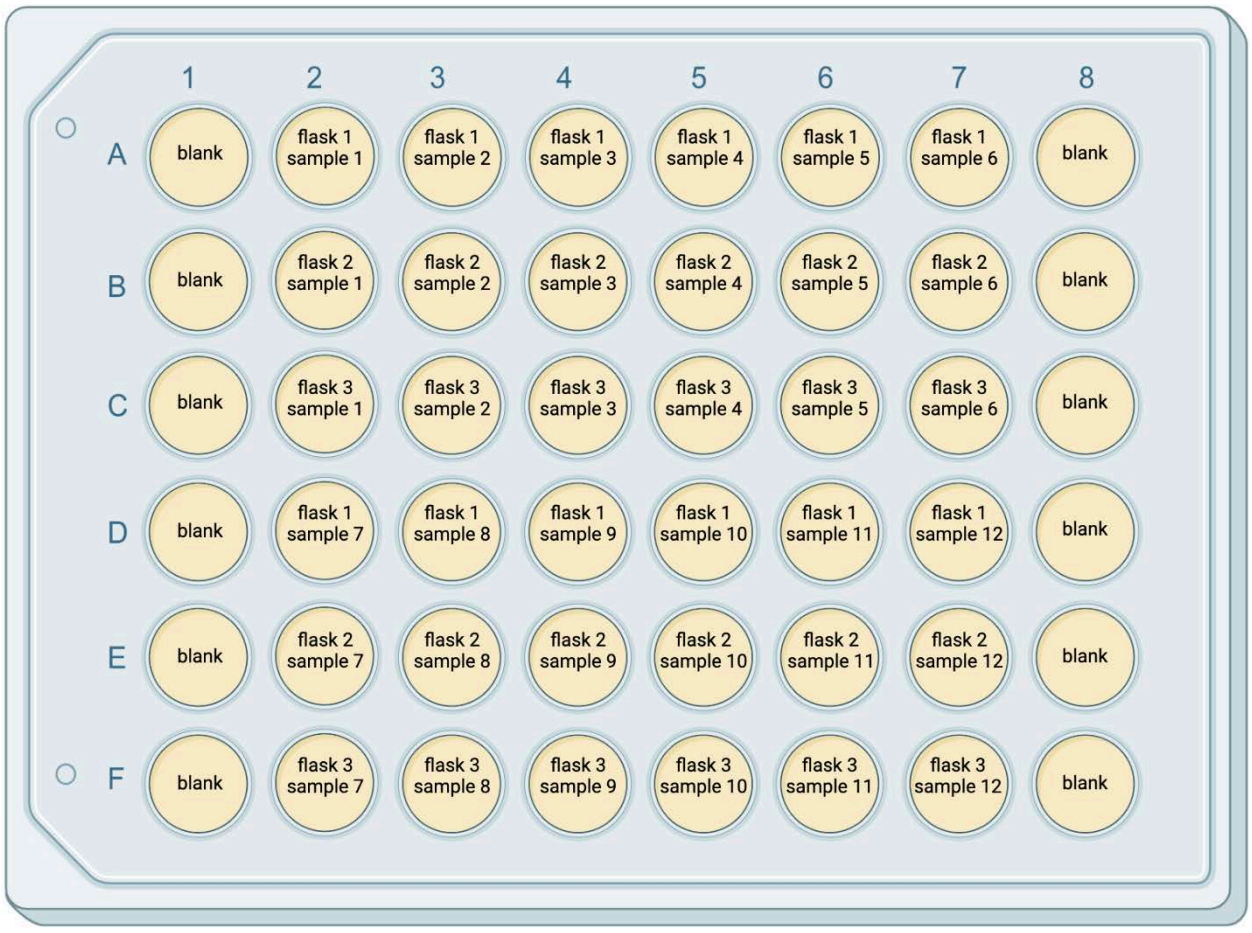


Рис. 2.1 – Схема розливу цільової культури у 48-лунковий планшет, де blank – свіжий ТВ без культури бактерій, flask – колба-реплікат з відповідним номером, sample – послідовно відібраний зразок з відповідної колби [112].

Бокові лунки заповнювалися чистим середовищем ТВ без бактерій, яке виступало в ролі негативного контролю. Схема виконана таким чином, аби уникнути випадкових розкидів значень, що можуть бути спровоковані швидким осіданням культури, похибкою приладу зчитування або характеристиками матеріалу мікропланшету.

Аналогічно зразки розливали для культур, вирощених за усіх досліджуваних температур.

2.5. Ідентифікація оптичної густини та експресії curli

Для ідентифікації оптичної густини та експресії curli використовувався плейт рідер Tecan Infinite® M Nano+, dual-mode microplate reader (рис. 2.1). Використовуючи оптику на основі монохроматора, цей інструмент ідеально підходить для різноманітних застосувань, включаючи робочі процеси геноміки і може зчитувати флуоресценцію із хвилями 280 нм - 850 нм. Білок GFP, що і має ідентифікуватися, може збуджуватися лазерною лінією 488 нм і оптимально виявляється при 510 нм [110].

Рис. 2.1. Зовнішній вигляд Tecan Infinite® M Nano+, dual-mode microplate reader [111]

Вимірювалася оптична густина культури (OD – Optical Density) та флуоресценція (F – fluorescence), враховуючи що білок GFP, який виступає в ролі флуоресцентної мітки, приєднаної нижче гена csgA для ідентифікації експресії curli, може збуджуватися лазерною лінією 488 нм. Параметри зчитування для кількісної оцінки експресії амілоїдів наведені нижче у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2 – Налаштування зчитування OD та F плейт-рідером Tecan Infinite® M Nano+.

Параметр	**Оптична густина (OD)**	**Флуоресценція (F)**
Режим	Absorbance	Fluorescence
Довжина хвилі	600 нм	Збудження – 488 нм, випромінювання – 522 нм
Пропускна здатність	9 нм	Збудження – 9 нм, випромінювання – 20 нм
Посилення	-	100
Кількість спалахів	25	10
Час інтеграції	-	20 мкс
Час затримки	-	0 мкс
Загальний час зчитування	20 мс	50 мс

2.6. Ідентифікація експресії curli та бімодальності клітин культури

Експресія curli та бімодальність клітин культури *E. coli* вимірювалася за допомогою проточного цитофлуориметра BD LSRFortessa Sorp cell analyzer (BD Biosciences, Germany).

У пробірці, до 2 мл дистильованої води додавалося 70 мкл проби культури, попередньо розведеної в ТВ у 2 рази, згідно методики, описаної у пункті 2.4. Зразки відповідних штамів інтенсивно перемішували протягом 1-2 хвилин та негайно піддавали проточному цитометричному аналізу з використанням 488-нм лазера. Активне довготривале перемішування було необхідне для того, щоб розбити агрегати бактерій, що могли бути утворені впродовж пробопідготовки. У кожному експерименті аналізували 50 000 окремих клітин.

У ході дослідження вимірювалися такі параметри, як бічне розсіяне світло (SSC) пропорційне зернистості клітини або внутрішній складності та світло, розсіяне вперед (FSC) пропорційне площі або розміру поверхні клітини. FSC забезпечує відповідний метод виявлення частинок, розмір яких перевищує заданий. SSC – це вимірювання переважно заломленого та відбитого світла, яке виникає на будь-якій поверхні розділу всередині комірки, де відбувається зміна показника заломлення. Корельовані вимірювання FSC і SSC можуть дозволити диференціювати типи клітин у гетерогенній популяції клітин, що і необхідно для вимірювання бімодальності експресії curli.

Результати проточної цитометрії оброблялися за допомогою програмного забезпечення BD FACSDiva™.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІЖДЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Інтенсивність експресії curli в залежності від температурних умов

В ході дослідження були отримані результати, що наведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Результати вимірювання оптичної густини та флуоресценції. Значення флуоресценції нормалізоване на оптичну густину, враховуючи стандартне відхилення. Усі значення наведені в умовних одиницях. Зліва наведені номери колб-реплікатів та температура інкубації.

Strain:	**WT**			**NiBu**			**ΔrcsB**		
Parameter:	**OD**	**F**	**F/OD**	**OD**	**F**	**F/OD**	**OD**	**F**	**F/OD**
26°C flask 1	0,2639	3490	13227	0,2772	973	3510			
26°C flask 2	0,2704	4015	14849	0,2824	1174	4158			
26°C flask 3	0,2742	3874	14125	0,2815	1421	5049			
26°C AVERAGE	**0,2695**	**3793**	**14067**	**0,2804**	**1190**	**4239**			
ST DEV	0,0056	242	712	0,0049	188	642			
28°C flask 1	0,3014	4641	15399	0,3166	1924	6077	0,2842	5711	20097
28°C flask 2	0,3014	4848	16080	0,3114	1989	6386	0,2632	4267	16213
28°C flask 3	0,3051	5033	16496	0,3009	1588	5278	0,2915	6101	20933
28°C AVERAGE	**0,3026**	**4841**	**15992**	**0,3096**	**1834**	**5914**	**0,2796**	**5359**	**19081**
ST DEV	0,0058	209	516	0,0083	182	477	0,0129	809	2127
30°C flask 1	0,3456	3191	9232	0,3529	1159	3284	0,3185	5057	15935
30°C flask 2	0,3403	3216	9449	0,3538	1295	3659	0,319	4884	15312
30°C flask 3	0,3430	3211	9360	0,3497	1171	3349	0,3218	5186	16116
30°C AVERAGE	**0,3430**	**3206**	**9347**	**0,3522**	**1208**	**3431**	**0,3198**	**5049**	**15788**
ST DEV	0,0063	87	160	0,0054	66	171	0,0028	155	424
32°C flask 1	0,2398	934	3932	0,3605	300	832	0,3253	2663	8187
32°C flask 2	0,2351	1143	4860	0,2466	132	537	0,3413	2790	8173
32°C flask 3	0,2423	977	4034	0,243	138	567	0,3325	2869	8628
32°C AVERAGE	**0,2391**	**1021**	**4276**	**0,2834**	**190**	**645**	**0,3331**	**2774**	**8329**
ST DEV	0,0040	92	430	0,0556	79	135	0,0071	97	241
34°C flask 1	0,3306	243	735	0,3467	164	474	0,3274	651	1987
34°C flask 2	0,3288	232	704	0,3450	161	466	0,329	657	1997
34°C flask 3	0,3395	232	683	0,3500	165	471	0,3214	696	2164
34°C AVERAGE	**0,3330**	**235**	**707**	**0,3473**	**163**	**470**	**0,3259**	**668**	**2049**
ST DEV	0,0064	8	27	0,0051	4	10	0,0055	24	87
37°C flask 1	0,3038	126	415				0,3031	128	422
37°C flask 2	0,3070	122	397				0,3020	124	411
37°C flask 3	0,3018	125	415				0,2984	128	430
37°C AVERAGE	**0,3042**	**124**	**409**				**0,3012**	**127**	**421**
ST DEV	0,0040	4,3	15				0,0035	3,7	13

Результати вимірювання флуоресценції були нормалізовані (F/OD) на значення оптичної густини. Ця процедура потрібна для уникнення помилкової інтерпретації результатів через варіабельність росту культури при різних температурах. З таблиці видно, що при 26ºС культура росте найменш інтенсивно, проте зі збільшенням температури прогресивна лінійність не обов'язково має зберігатися. Це залежить від багатьох факторів, зокрема кількості клітин відібраних з колонії для створення культури накопичення; терміну зберігання культури; чашки Петрі, з якої відібраний зразок та багатьох інших.

Окремо було виміряно штучну флуоресценцію та оптичну густину в чистому ТВ та незаповнених пластикових лунках. Нормалізоване значення F/OD варіювалося від 250 до 800 у. о. відповідно.

Крайні точки 37ºС для NiBu та 26ºС для ΔrcsB навмисне не брали участь у дослідженнях, адже в першому варіанті, для NiBu, curli перестали експресуватися уже при 34ºС, отже використання подальших інкубаційних умов не вимагалося. У другому випадку, клітини штаму ΔrcsB при температурі 28°С мали більше curli-позитивних клітин, ніж дикий тип при будь-яких протестованих температурах. З таблиці видно, що при температурі 26ºС ріст культури йде на спад, тому для штаму ΔrcsB очікувалася аналогічна ситуація, яка не представляє цікавості для визначення максимального рівня експресії.

Для більш наглядної візуалізації отриманих даних побудовано графік, наведений на рис. 3.1.

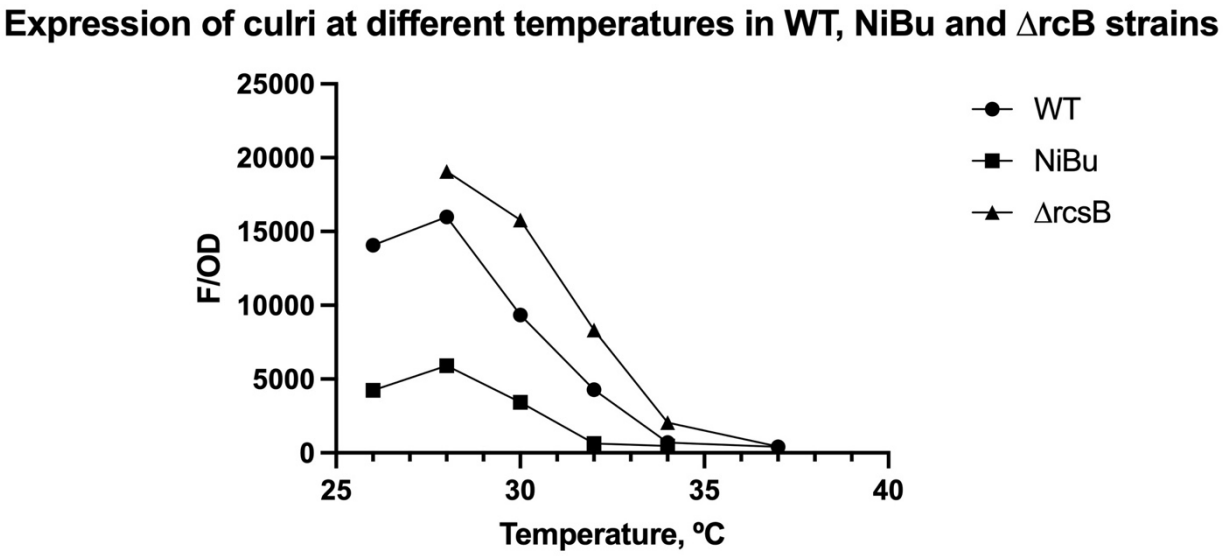


Рис. 3.1 – Візуалізація даних, отримана під час вимірювання температурної варіабельності експресії curli за допомогою плейт-рідера Tecan Infinite® M Nano+. Вертикальна вісь позначає відношення флуоресценції нормалізоване на оптичну густину розбавленої вдвічі культури *E. coli*. На горизонтальній осі представлені температури в межах від 26 до 37 градусів Цельсія. Точками, квадратами та трикутниками на графіку показані значення для штамів дикого типу (WT), квадрупольного нокауту NiBu та нокаутного ΔrcsB бактерії *Escherichia coli*.

Рис. 3.1. містить графік варіабельності експресії curli в залежності від температури. Як і очікувалося, при температурі 26ºC для штамів Wild Type та NiBu нарощування маси клітин *Escherichia coli* відбувається гірше, ніж при наступному значенні 28ºC. Слабкий ріст бактерій не є гарною передумовою для дослідження експресії амілоїда, тому більш низькі температури не брали участь у дослідженні, а значення експресії при 26ºC умовно вважається достовірним.

При температурі 28ºC в усіх штамах спостерігається максимум експресії curli. Штам NiBu, що має квадрупольний нокаут дигуанілатциклаз та фосфодіестераз, які мають прямий вплив на сигнальний каскад експресії curli. Згідно попередніх випробувань інкубації штамів, проведених в

Інституті наземної мікробіології імені Макса Планка, штам проявляє сильно знижену схильність до експресії curli. Це підтверджується результатами, які видно на рис. 3.1. Максимальне значення F/OD для цього штаму є близьким до 6000 у. о., в той час як у контрольного дикого типу (WT) експресія майже у 2,7 разів інтенсивніша.

Штам ΔrcsB має найбільш інтенсивну експресію curli, серед трьох досліджуваних штамів, як у піковій точці (28ºC), так і за результатами усіх подальших умов інкубацій. При цьому, якщо в WT та NiBu при температурі 34ºC практично перестають експресувати curli, то у штаму ΔrcsB досі спостерігається неабияка активність, зі значеннями F/OD >2000 у. о. Збільшення експресії curli у штамі ΔrcsB також проявлялося у попередніх дослідженнях проведених в Інституті наземної мікробіології ім. Макса Планка.

Загальна картина, яку можна спостерігати на рис. 3.1. є доволі схожою для WT, NiBu та ΔrcsB. Починаючи з 28ºC відбувається стрімка регресія експресії curli. Як і описано в літературі, при температурі 37ºC усі штами повністю припиняють синтез амілоїда, хоча для штамів WT та NiBu уже й при 34ºC спостерігається майже повна відсутність експресії.

На противагу більшості літературних даних, які зазначають, що 30°C це найоптимальніші умови для експресії curli, теперішнє дослідження показало, що пік експресії відбувається при 28°C.

3.2. Бімодальність культури при досліджуваних температурах

В ході дослідження бімодальності експресії curli методом проточної цитометрії в пробах цільових культур, отримано результати, які детально представлені в додатках 1-16. Для поверхневого ознайомлення з отриманими даними, піки інтенсивності експресії для кожного зі штамів виведено на рис. 3.2. Гістограма дозволяє переглядати один параметр у порівнянні з кількістю подій.

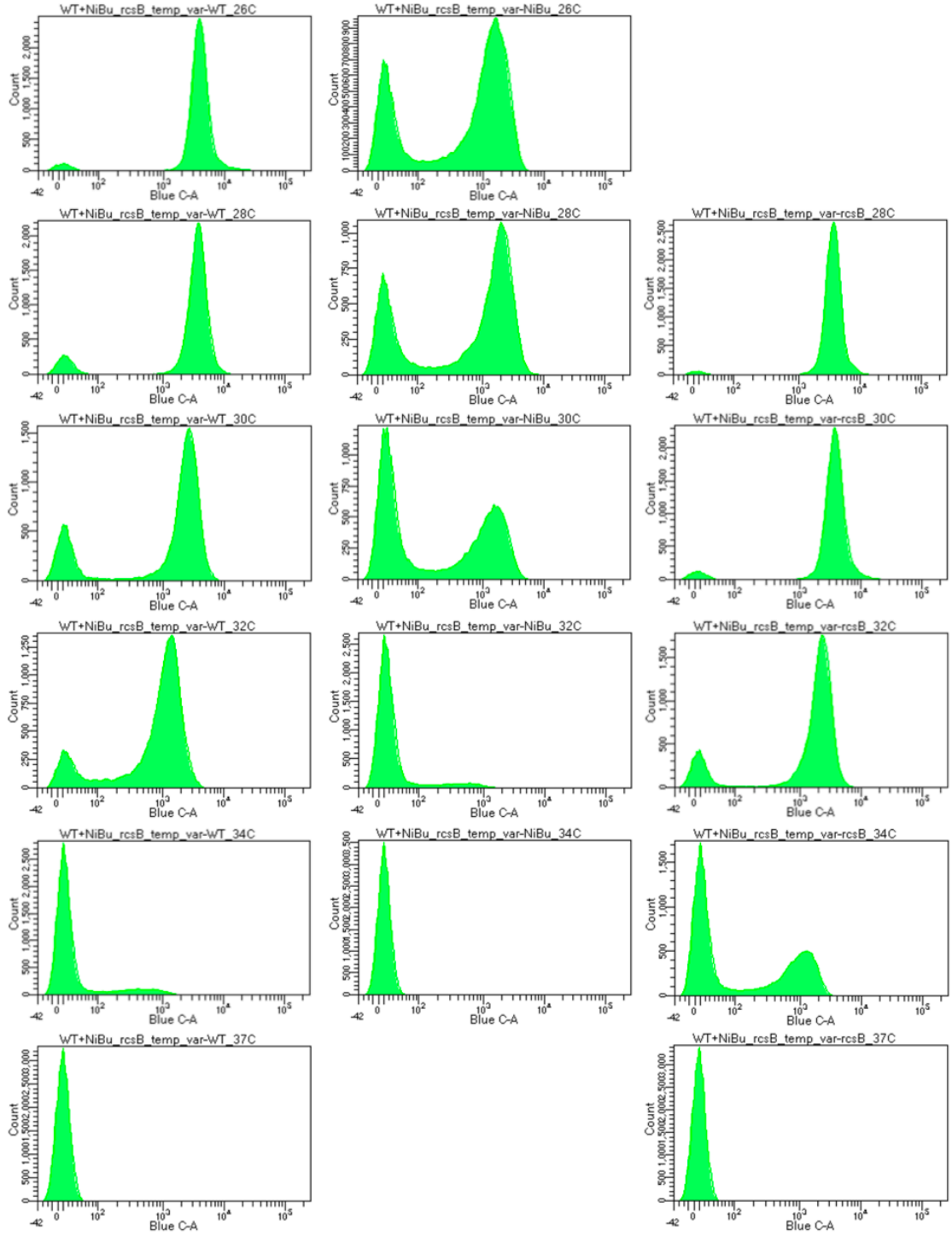


Рис. 3.2 – Значення, отримані після вимірювання методом проточної цитометрії експресії гена curli в культурах *E. coli*, вирощених протягом ночі в колбах в орбітальному шейкері. Значення показано для дикого типу (WT) (перша колонка), штаму із квадрупольним нокаутом ΔpdeHΔdgcEΔpdeRΔdgcM (NiBu) (друга колонка) та штаму із нокаутом ΔrcsB (третя колонка) в межах від 26°C до 37°C відповідно, за винятком температур 37°C для NiBu та 26°C для ΔrcsB. На вертикальній осі позначена кількість

подій (count of events) – кількість клітин, що відповідає конкретному значенню на горизонтальній осі. На горизонтальній осі відображена флуоресценція бактерій, які можна умовно поділити на дві популяції (curli-негативні та curli-позитивні клітини) згідно характеристики їх поверхні.

Підмножину даних можна визначити через ворота (gate). Ворота – це числова або графічна межа, яка може бути використана для визначення характеристик частинок для подальшого аналізу. Виходячи з FSC або розміру клітини, можна встановити gate на графіку FSC проти SSC, щоб дозволити аналізувати лише клітини заданого розміру.

В ході цього дослідження, були встановлені ворота P1 та P2, де P1 позначає межу для бактеріальних клітин шуканого розміру, а P2 – це агрегати клітин, що в даному випадку не мають перевищувати 1-1,5% від загальної кількості клітин (див. додаток 1). Ці агрегати не враховуються під час розрахунку результатів експресії, адже вони є показником того, що культура не коагулювала, а отже, показником якості досліджуваної проби.

Графіки, наведені на рис. 3.2 підтверджують результати, отримані під час вимірювань експресії curli плейт-рідером. При цьому, стає можливим дослідити бімодальність експресії curli в культурі, розділивши її на субпопуляції curli-позитивних бактерій (піки від 10^3 до 10^4) та curli-негативних бактерій (піки від 0 до 10^2).

У випадку штаму дикого типу (WT) в межах від 26°C до 32°C субпопуляція curli-позитивних клітин перевищує кількість curli-негативних клітин у 2,5 рази та більше. На проміжку з 32°C до 34°C відбувається різке зниження кількості curli-позитивних клітин – це говорить про те, що умови інкубації починаючи вже з температури 34°C не є оптимальними для експресії curli.

У випадку штаму з квадрупольним нокаутом ΔpdeHΔdgcEΔpdeRΔdgcM (NiBu), лише при температурах 26°C та 28°C кількість curli-позитивних

клітин перевищує curli-негативні приблизно в 1,3 рази. Починаючи з температури 30°C відбувається спад експресії, а при 32°C флуоресценція і зовсім має залишковий характер.

Для штаму ΔrcsB при температурі 28°C спостерігається найбільше з досліджених в усіх штамах співвідношення позитивних до негативних клітин, а експресія curli на досить високому рівні спостерігається аж до температури 34°C.

Маючи три незалежні один від одного штами, що відображають різні властивості експресії curli, яку умовно можна поділити на низьку (для NiBu), стандартну або середню (для WT) та високу (для ΔrcsB), можна відзначити декілька тенденцій.

По-перше, для усіх трьох штамів очевидним чином експресія є найбільш інтенсивною в межах 26°C – 32°C. На відміну від більшості літературних даних, було визначено, що пік експресії наступає при температурі 28°C, а не 30°C. По-друге, було підтверджено, що в незалежності від штаму, експресія різко закінчується при 37°C – ця температура працює як своєрідний перемикач, вимикаючи експресію навіть у найбільш продуктивних при 34°C штамів (в даному випадку ΔrcsB). По-третє, досить важливим є те, що ми не можемо виділити спільну поведінку синтезу амілоїду curli у різних штамів за умов варіації температури. Кожен штам є особливим за своїми характеристиками початку та закінчення експресії curli, хоча й має спільну з іншими пікову точку експресії.

3.3. Застосування отриманих даних та дискусія

Практичне застосування отриманих результатів щодо експресії curli та бімодальності культури є досить широким. Наприклад, утворення амілоїдних волокон відповідає за кілька захворювань людини, включаючи хвороби Альцгеймера, Хантінгтона та пріонові хвороби, хоча процес утворення амілоїду in vivo недостатньо вивчений [114]. Curli, інкубовані у мутантному штамі зі збільшеною експресією (в даному дослідженні це штам ΔrcsB, проте

допускаються інші штами, нокаутовані гени яких залучені до сигнального каскаду регуляції експресії curli) забезпечує унікальну систему для вивчення макромолекулярної збірки в бактеріях і формування амілоїдних волокон in vivo. Підбір оптимальних умов інкубації для збільшення загального числа curli-позитивних клітин у колонії дозволить зробити *Escherichia coli* кращим модельним об’єктом для дослідження патологічних станів.

За даними літературних джерел, мутації в області промотора csgD можуть призвести до експресії curli при 37°C [115-117]. Крім того, багато клінічних ізолятів експресують curli при 37°C. Актуальною ідеєю для подальших досліджень є моніторинг експресії curli у ширшого спектру бактеріальних ізолятів та збільшення діапазону досліджень для нокаутних штамів, задіяних у сигнальному шляху як експресії curli, так і біоплівок загалом.

Curli зв'язуються з багатьма білками господарів. Вважається, що багато білків, з якими взаємодіють curli, сприяють поширенню бактерій через хазяїна [118]. Curli зв'язуються з ферментом плазміногеном, що руйнує тканини. Плазміноген є сериновою протеазою, яка руйнує фібрин і м’які тканини і повинна бути активована з його проферментної форми [119]. Активуючи плазміноген, curli-позитивні бактерії можуть отримати перевагу всередині господаря, оскільки цей фермент руйнує м’які тканини, що дозволить бактеріям отримати доступ до глибших тканин. Завдяки збільшенню кількості curli у цільових штамах бактерій та покращенню їх проникності у тканини пацієнта, можливе застосування нокаутних штамів *Escherichia coli* як бактеріальних векторів, що глибоко проникають у тканини та органи, що зазнають лікування, винайдення альтернативних методів вакцинації, імунотерапії проти раку та місцевого введення імуномодулюючих цитокінів при запальних захворюваннях кишечника. У дослідженнях із сальмонелою, яка використовується як вектор, спрямований на пухлину, клінічні випробування на людях продемонстрували доказ принципу, але вони також підкреслили необхідність створення штамів зі

зниженою токсичністю та покращеними властивостями колонізації [113]. Саме curli-позитивні штами як модельні об’єкти і є основними претендентами для покращення цих ознак.

Curli-позитивні *E. coli* та *Salmonella spp.* приєднуються до різних еукаріотичних клітинних ліній краще, ніж негативні штами. Експресія генів curli у штамі K-12 *E. coli,* наприклад, призвела до вторгнення бактерій в клітини епітелію шийки матки (HeLa) людини [120]. Вторгнення ізолятів K12, що експресують curli, можна пригнічувати пептидами, які блокують утворення curli [121]. Механізм блокування експресії curli та кількісну оцінку зменшення їх синтезу також можна досліджувати з використанням методів та нокаутних штамів, використаних у цій дослідницькій роботі.

Цікаво, що нещодавно було продемонстровано, що амілоїди curli можуть сприяти зв’язуванню з рослинними клітинами [122-124]. У деяких штамів curli максимально виражені при 26°C, температурі, при якій часто вирощують рослини. Досліджено, що штами *E. coli* K-12, які надмірно виробляють curli, приєднуються до паростків люцерни, але мутації в csgA або csgD не перешкоджають зв’язуванню *E. coli* 0157:H7 [123-124]. Це свідчить про те, що патогенні ізоляти кишкової палички мають кілька способів приєднання до рослинних клітин, тоді як ізоляти K-12 цього не роблять. Оскільки інфекції рослин виникають внаслідок зараження штамами E. *coli* 0157:H7 або *S. enterica*, розуміючи, як ці організми взаємодіють із рослинами, можна вжити заходів для блокування прикріплення. Не менш важливо, що завдяки дослідженню температурної варіації експресії curli у фітопатогенних штамів бактерій, можна незначним чином змінювати умови вирощування рослин. Таким чином, зміна температури культивації рослин на 1-2°C не призведе до значного погіршення плодючості, але може значним чином знизити синтез curli і попередити ураження флори. Наведені результати також передбачають можливість селекції та генної модифікації культивованих рослин для їх пристосування до вирощування за більш високих температурних умов.

Повертаючись до впливу curli на організм пацієнтів, було зроблено цікаве спостереження, коли антисироватку CsgA було знайдено у немовлят, які померли від синдрому раптової дитячої смерті (СРДС), при цьому відповідні за віком контрольні групи не містили антисироватки CsgA [125, 126]. Жодного інфекційного агента не було продемонстровано при СРДС, але цікаво припустити, що curli-вмісні бактерії можуть відігравати певну роль в цьому синдромі. Доцільним є дослідити клінічні ізоляти бактерій *Escherichia coli*, вилучених з постраждалих пацієнтів, визначивши загальне співвідношення curli-позитивних та curli-негативних клітин у колоніях, а також граничні умови експресії амілоїдів в новонародженому організмі, оскільки температура тіла породіллі здатна змінюватися під час пологів [127].

Відтворення умов, за яких *Escherichia coli* утворює мінімальну кількість амілоїдів curli може вплинути на стабільність біоплівок, адже curli є одним з мажорних компонентів екзобактеріальної матриці. Подальше дослідження штамів з низьким вмістом curli на моделях сечової системи та катетерах може відкрити ще один механізм впливу на резистентність біоплівок та зменшення їх стійкості до зовнішніх чинників, в тому числі температури. Це дасть змогу розробляти нові антибактеріальні препарати та зробити зрозуміти процес переходу бактерій з рухомого стану до прикріплених спільнот.

ВИСНОВКИ

В ході цієї дослідницької роботи проведено моніторинг експресії curli у трьох штамів *Escherichia coli* (WT, NiBu та ΔrcsB) з різними пороговими рівнями синтезу амілоїдів. Скринінг проведено в залежності від умов послідовних інкубацій на проміжку 26°C-37°C. В результаті отримано графіки залежності експресії curli від температури та співвідношення curli-позитивних і curli-негативних клітин у колоніях.

На прикладі трьох штамів було показано спільні та відмінні риси експресії curli, а саме тенденцію графіків, мінімальний та максимальний рівень експресії, а також залежність бімодального характеру синтезу curli для кожного зі штамів. Найнижчі рівні експресії curli мав штам NiBu, він же виявився найбільш чутливим до температурних умов, закінчивши експресію уже при 34°C. За результатами проточної цитометрії виявлено, що співвідношення curli-позитивних до curli-негативних клітин у пробах NiBu не перевищує 1,3 рази, на відміну від супутніх штамів, для яких найвище співвідношення рівне 2,5. Штами WT та ΔrcsB мають схожий між собою характер експресії curli на проміжку досліджуваних температур, однак ΔrcsB має значно інтенсивнішу експресію, що в піковій точці в 1,19 разів вища за WT. Усі три штами синтезували curli найбільш інтенсивно при 28°C.

Завдяки науковій новизні як досліджень curli загалом, так і використання ексклюзивних штамів, ця робота може зробити значний внесок у дослідження недостатньо вивчених амілоїдів біоплівки, регуляцію їх експресії та визначення впливу компонентів сигнального каскаду регуляції експресії curli на склад біоплівок. В майбутньому доцільним є дослідити більшу кількість нокаутних штамів та клінічних ізолятів, більший діапазон температур і нові умови інкубації штамів. Більше того, виникнення бімодальності експресії curli в добре перемішуваній пробі планктонної культури досі залишається нез’ясованим та представляє інтерес для подальших досліджень.

Результати, отримані в ході цього дослідження можна використати для розробки нових моделей дослідження сигнальних шляхів утворення амілоїдів, пов’язаних з нейродегенеративними захворюваннями; нокаутування інших генів, що одночасно впливають на температурну залежність та інтенсивність експресії curli; покращення проникності бактеріальних векторів та вакцин; попередження захворювань культурних сільськогосподарських та лабораторних рослин та навіть розуміння передумов виникнення синдрому раптової дитячої смерті. Значну увагу привертає залежність стабільності біоплівок від кількісного складу curli, що потенційно може мати вплив на боротьбу з резистентністю штамів у навколишньому середовищі та ініціює розробку нових антибактеріальних препаратів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, *49*(1), 711–745. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431

2. Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(4), 847–867. https://doi.org/10.1128/mmbr.64.4.847-867.2000

3. Hinsa, S. M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J. L., & O'Toole, G. A. (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by pseudomonas fluorescens WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular Microbiology*, *49*(4), 905–918. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03615.x

4. Prigent-Combaret, C., & Lejeune, P. (1999). [4] monitoring gene expression in biofilms. *Biofilms*, 56–79. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)10006-5

5. Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., & Lejeune, P. (1999). Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *181*(19), 5993–6002. https://doi.org/10.1128/jb.181.19.5993-6002.1999

6. Hufnagel, D. A., Depas, W. H., & Chapman, M. R. (2015). The biology of the *escherichia coli* extracellular matrix. *Microbiology Spectrum*, *3*(3). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0014-2014

7. Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P., & Dorel, C. (2000). Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing escherichia coli strains: Role of flagella, Curli and Colanic acid. *Environmental Microbiology*, *2*(4), 450–464. https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00128.x

8. Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(3), 199–210. https://doi.org/10.1038/nrmicro1838

9. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(2), 95–108. https://doi.org/10.1038/nrmicro821

10. Wilson, M. (2001). Bacterial biofilms and human disease. *Science Progress*, *84*(3), 235–254. https://doi.org/10.3184/003685001783238998

11. Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M., & Lejeune, P. (1998). Isolation of an *escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: Involvement of a new *ompr* allele that increases curli expression. *Journal of Bacteriology*, *180*(9), 2442–2449. https://doi.org/10.1128/jb.180.9.2442-2449.1998

12. Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., & Romling, U. (2001). The multicellular morphotypes of salmonella typhimurium and escherichia coli produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, *39*(6), 1452–1463. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x

13. Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., & Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, *295*(5559), 1487–1487. https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487

14. Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J.-M. (2008). Escherichia coli biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 249–289. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_12

15. DePas, W. H., Hufnagel, D. A., Lee, J. S., Blanco, L. P., Bernstein, H. C., Fisher, S. T., James, G. A., Stewart, P. S., & Chapman, M. R. (2013). Iron induces bimodal population development by *escherichia*

coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(7), 2629–2634. https://doi.org/10.1073/pnas.1218703110

16. Hadjifrangiskou, M., Gu, A. P., Pinkner, J. S., Kostakioti, M., Zhang, E. W., Greene, S. E., & Hultgren, S. J. (2012). Transposon mutagenesis identifies uropathogenic escherichia coli biofilm factors. *Journal of Bacteriology*, *194*(22), 6195–6205. https://doi.org/10.1128/jb.01012-12

17. Uhlich, G. A., Cooke, P. H., & Solomon, E. B. (2006). Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(4), 2564–2572. https://doi.org/10.1128/aem.72.4.2564-2572.2006

18. Liu, N. T., Nou, X., Lefcourt, A. M., Shelton, D. R., & Lo, Y. M. (2014). Dual-species biofilm formation by escherichia coli O157:H7 and environmental bacteria isolated from fresh-cut processing facilities. *International Journal of Food Microbiology*, *171*, 15–20. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.007

19. Reisner, A., Krogfelt, K. A., Klein, B. M., Zechner, E. L., & Molin, S. (2006). In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *escherichia coli* strains: Impact of environmental and genetic factors. *Journal of Bacteriology*, *188*(10), 3572–3581. https://doi.org/10.1128/jb.188.10.3572-3581.2006

20. Serra, D. O., Richter, A. M., Klauck, G., Mika, F., & Hengge, R. (2013). Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *MBio*, *4*(2). https://doi.org/10.1128/mbio.00103-13

21. Boles, B. R., & Singh, P. K. (2008). Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(34), 12503–12508. https://doi.org/10.1073/pnas.0801499105

22. Chai, Y., Chu, F., Kolter, R., & Losick, R. (2007). Bistability and biofilm formation in bacillus subtilis. *Molecular Microbiology*, *67*(2), 254–263. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06040.x

23. Boles, B. R., Thoendel, M., & Singh, P. K. (2004). Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(47), 16630–16635. https://doi.org/10.1073/pnas.0407460101

24. Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C.-T., & McFeters, G. A. (1998). Spatial physiological heterogeneity in *pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(10), 4035–4039. https://doi.org/10.1128/aem.64.10.4035-4039.1998

25. Williamson, K. S., Richards, L. A., Perez-Osorio, A. C., Pitts, B., McInnerney, K., Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2012). Heterogeneity in pseudomonas aeruginosa biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. *Journal of Bacteriology*, *194*(8), 2062–2073. https://doi.org/10.1128/jb.00022-12

26. Lewis, K. (2008). Multidrug tolerance of biofilms and Persister cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 107–131. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_6

27. Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsén, A., & Normark, S. (1995). Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, *18*(4), 661–670. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18040661.x

28. Maurer, J. J., Brown, T. P., Steffens, W. L., & Thayer, S. G. (1998). The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin TSH among avian escherichia coli. *Avian Diseases*, *42*(1), 106. https://doi.org/10.2307/1592582

29. Olsén, A., Arnqvist, A., Hammar, M., Sukupolvi, S., & Normark, S. (1993). The rpos sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of CSGA, the subunit gene of fibronectin-binding curli in escherichia coli. *Molecular Microbiology*, *7*(4), 523–536. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01143.x

30. Kikuchi, T., Mizunoe, Y., Takade, A., Naito, S., & Yoshida, S.-ichi. (2005). Curli fibers are required for development of Biofilm architecture in*escherichia coli*K-12 and enhance bacterial adherence to human Uroepithelial cells. *Microbiology and Immunology*, *49*(9), 875–884. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03678.x

31. White-Ziegler, C. A., Um, S., Pérez, N. M., Berns, A. L., Malhowski, A. J., & Young, S. (2008). Low temperature (23 °C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and rpos-dependent genes in escherichia coli K-12. *Microbiology*, *154*(1), 148–166. https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012021-0

32. Olsén, A., Jonsson, A., & Normark, S. (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on Escherichia Coll. *Nature*, *338*(6217), 652–655. https://doi.org/10.1038/338652a0

33. Hammar, M., Bian, Z., & Normark, S. (1996). Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(13), 6562–6566. https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6562

34. Bian, Z., & Normark, S. (1997). Nucleator function of csgb for the Assembly of adhesive surface organelles in escherichia coli. *The EMBO Journal*, *16*(19), 5827–5836. https://doi.org/10.1093/emboj/16.19.5827

35. Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., & Hultgren, S. J. (2002). Role of *escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*, *295*(5556), 851–855. https://doi.org/10.1126/science.1067484

36. Abdallah, A. M., Gey van Pittius, N. C., DiGiuseppe Champion, P. A., Cox, J., Luirink, J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Appelmelk, B. J., & Bitter, W. (2007). Type VII secretion — mycobacteria show the way. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(11), 883–891. https://doi.org/10.1038/nrmicro1773

37. Desvaux, M., Hébraud, M., Talon, R., & Henderson, I. R. (2009). Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: A semantic awareness issue. *Trends in Microbiology*, *17*(4), 139–145. https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.01.004

38. Römling Ute, Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D., & Normark, S. (1998). Curli fibers are highly conserved between *salmonella typhimurium* and *escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *Journal of Bacteriology*, *180*(3), 722–731. https://doi.org/10.1128/jb.180.3.722-731.1998

39. Brombacher, E., Baratto, A., Dorel, C., & Landini, P. (2006). Gene expression regulation by the curli activator CsgD protein: Modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *Journal of Bacteriology*, *188*(6), 2027–2037. https://doi.org/10.1128/jb.188.6.2027-2037.2006

40. Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehlis, A., & Hengge, R. (2008). Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *escherichia coli*. *Genes & Development*, *22*(17), 2434–2446. https://doi.org/10.1101/gad.475808

41. Romling, U., Rohde, M., Olsen, A., Normark, S., & Reinkoster, J. (2000). AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in salmonella typhimurium regulates at least two independent pathways. *Molecular Microbiology*, *36*(1), 10–23. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01822.x

42. Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G., & Hengge, R. (2006). Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the ?snetwork of escherichia coli. *Molecular Microbiology*, *62*(4), 1014–1034. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05440.x

43. Hammer, N. D., Schmidt, J. C., & Chapman, M. R. (2007). The curli nucleator protein, csgb, contains an amyloidogenic domain that directs CSGA polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(30), 12494–12499. https://doi.org/10.1073/pnas.0703310104

44. Epstein, E. A., Reizian, M. A., & Chapman, M. R. (2009). Spatial clustering of the Curlin secretion lipoprotein requires curli fiber assembly. *Journal of Bacteriology*, *191*(2), 608–615. https://doi.org/10.1128/jb.01244-08

45. Zhou, Y., Smith, D., Leong, B. J., Brännström, K., Almqvist, F., & Chapman, M. R. (2012). Promiscuous cross-seeding between bacterial amyloids promotes interspecies biofilms. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(42), 35092–35103. https://doi.org/10.1074/jbc.m112.383737

46. Evans, M. L., Chorell, E., Taylor, J. D., Åden, J., Götheson, A., Li, F., Koch, M., Sefer, L., Matthews, S. J., Wittung-Stafshede, P., Almqvist, F., & Chapman, M. R. (2015). The bacterial curli system possesses a potent and selective inhibitor of amyloid formation. *Molecular Cell*, *57*(3), 445–455. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.025

47. Robinson, L. S., Ashman, E. M., Hultgren, S. J., & Chapman, M. R. (2006). Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Molecular Microbiology*, *59*(3), 870–881. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04997.x

48. Loferer, H., Hammar, M., & Normark, S. (1997). Availability of the fibre subunit CSGA and the nucleator protein csgb during assembly of fibronectin-binding *curli* is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein csgg. *Molecular Microbiology*, *26*(1), 11–23. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5231883.x

49. Goyal, P., Krasteva, P. V., Van Gerven, N., Gubellini, F., Van den Broeck, I., Troupiotis-Tsaïlaki, A., Jonckheere, W., Péhau-Arnaudet, G., Pinkner, J. S., Chapman, M. R., Hultgren, S. J., Howorka, S., Fronzes, R., & Remaut, H. (2014). Structural and mechanistic insights into the bacterial amyloid secretion channel csgg. *Nature*, *516*(7530), 250–253. https://doi.org/10.1038/nature13768

50. Ishihama, A. (2010). Prokaryotic Genome Regulation: Multifactor Promoters, Multitarget Regulators and hierarchic networks. *FEMS Microbiology Reviews*, *34*(5), 628–645. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00227.x

51. Rossi, E., Cimdins, A., Lüthje, P., Brauner, A., Sjöling, Å., Landini, P., & Römling, U. (2017). “it’s a gut feeling” –*escherichia coli*biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. *Critical Reviews in Microbiology*, *44*(1), 1–30. https://doi.org/10.1080/1040841x.2017.1303660

52. Serra, D. O., & Hengge, R. (2021). Bacterial multicellularity: The biology of *escherichia coli* building large-scale biofilm communities. *Annual Review of Microbiology*, *75*(1), 269–290. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-031921-055801

53. Simm, R., Ahmad, I., Rhen, M., Le Guyon, S., & Römling, U. (2014). Regulation of biofilm formation in *salmonella enterica* serovar typhimurium. *Future Microbiology*, *9*(11), 1261–1282. https://doi.org/10.2217/fmb.14.88

54. Bokranz, W., Wang, X., Tschäpe, H., & Römling, U. (2005). Expression of cellulose and curli fimbriae by escherichia coli isolated from the gastrointestinal tract. *Journal of Medical Microbiology*, *54*(12), 1171–1182. https://doi.org/10.1099/jmm.0.46064-0

55. Brown, P. K., Dozois, C. M., Nickerson, C. A., Zuppardo, A., Terlonge, J., & Curtiss, R. (2001). MLRA, a novel regulator of Curli (AGF) and extracellular matrix synthesis by escherichia coli and salmonella

enterica serovar typhimurium. *Molecular Microbiology*, *41*(2), 349–363. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02529.x

56. Ogasawara, H., Yamada, K., Kori, A., Yamamoto, K., & Ishihama, A. (2010). Regulation of the escherichia coli csgd promoter: Interplay between five transcription factors. *Microbiology*, *156*(8), 2470–2483. https://doi.org/10.1099/mic.0.039131-0

57. Lindenberg, S., Klauck, G., Pesavento, C., Klauck, E., & Hengge, R. (2013). The EAL domain protein YCIR acts as a trigger enzyme in a C-di-GMP signalling cascade in E. coli biofilm control. *The EMBO Journal*, *32*(14), 2001–2014. https://doi.org/10.1038/emboj.2013.120

58. Hengge, R. (2020). Linking bacterial growth, survival, and multicellularity – small signaling molecules as triggers and drivers. *Current Opinion in Microbiology*, *55*, 57–66. https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.007

59. Sarenko, O., Klauck, G., Wilke, F. M., Pfiffer, V., Richter, A. M., Herbst, S., Kaever, V., & Hengge, R. (2017). More than enzymes that make or break cyclic di-GMP—local signaling in the interactome of GGDEF/EAL domain proteins of *escherichia coli*. *MBio*, *8*(5). https://doi.org/10.1128/mbio.01639-17

60. Serra, D. O., & Hengge, R. (2019). A C-di-GMP-based switch controls local heterogeneity of extracellular matrix synthesis which is crucial for integrity and morphogenesis of escherichia coli Macrocolony biofilms. *Journal of Molecular Biology*, *431*(23), 4775–4793. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.001

61. Lamprecht, O., Ratnikava, M., Jacek, P., Kaganovitch, E., Buettner, N., Fritz, K., Biazruchka, I., Köhler, R., Pietsch, J., & Sourjik, V. (2022). Regulation by cyclic-di-GMP attenuates dynamics and enhances robustness of bimodal curli gene activation in *escherichia coli*. https://doi.org/10.1101/2022.05.23.493020

62. Besharova, O., Suchanek, V. M., Hartmann, R., Drescher, K., & Sourjik, V. (2016). Diversification of gene expression during formation of static submerged biofilms by escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01568

63. Grantcharova, N., Peters, V., Monteiro, C., Zakikhany, K., & Römling Ute. (2010). Bistable expression of CsgD in biofilm development of *salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, *192*(2), 456–466. https://doi.org/10.1128/jb.01826-08

64. MacKenzie, K. D., Wang, Y., Shivak, D. J., Wong, C. S., Hoffman, L. J., Lam, S., Kröger, C., Cameron, A. D., Townsend, H. G., Köster, W., & White, A. P. (2015). Bistable expression of csgd in salmonella enterica serovar typhimurium connects virulence to persistence. *Infection and Immunity*, *83*(6), 2312–2326. https://doi.org/10.1128/iai.00137-15

65. Yousef, K. P., Streck, A., Schütte, C., Siebert, H., Hengge, R., & Kleist, M. von. (2015). Logical-continuous modelling of post-translationally regulated bistability of curli fiber expression in escherichia coli. *BMC Systems Biology*, *9*(1). https://doi.org/10.1186/s12918-015-0183-x

66. Cegelski, L., Pinkner, J. S., Hammer, N. D., Cusumano, C. K., Hung, C. S., Chorell, E., Åberg, V., Walker, J. N., Seed, P. C., Almqvist, F., Chapman, M. R., & Hultgren, S. J. (2009). Small-molecule inhibitors target escherichia coli amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature Chemical Biology*, *5*(12), 913–919. https://doi.org/10.1038/nchembio.242

67. Kai-Larsen, Y., Lüthje, P., Chromek, M., Peters, V., Wang, X., Holm, Å., Kádas, L., Hedlund, K.-O., Johansson, J., Chapman, M. R., Jacobson, S. H., Römling, U., Agerberth, B., & Brauner, A. (2010). UROPATHOGENIC escherichia coli modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. *PLoS Pathogens*, *6*(7). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001010

68. Al-Hasan, M. N., Eckel-Passow, J. E., & Baddour, L. M. (2010). Bacteremia complicating gram-negative urinary tract infections: A population-based study. *Journal of Infection*, *60*(4), 278–285. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.01.007

69. Hung, C., Marschall, J., Burnham, C.-A. D., Byun, A. S., & Henderson, J. P. (2014). The bacterial amyloid curli is associated with urinary source bloodstream infection. *PLoS ONE*, *9*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086009

70. Bian, Z., Brauner, A., Li, Y., & Normark, S. (2000). Expression of and cytokine activation by*escherichia coli*curli fibers in human sepsis. *The Journal of Infectious Diseases*, *181*(2), 602–612. https://doi.org/10.1086/315233

71. Saldaña, Z., Xicohtencatl-Cortes, J., Avelino, F., Phillips, A. D., Kaper, J. B., Puente, J. L., & Girón, J. A. (2009). Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing*escherichia coli*and identification of FIS as a negative regulator of Curli. *Environmental Microbiology*, *11*(4), 992–1006. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01824.x

72. Winfield, M. D., & Groisman, E. A. (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *salmonella* and *escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(7), 3687–3694. https://doi.org/10.1128/aem.69.7.3687-3694.2003

73. Gerstel, U., & Romling, U. (2001). Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfd promoter activity and expression of the multicellular morphotype in salmonella typhimurium. *Environmental Microbiology*, *3*(10), 638–648. https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00235.x

74. Olsén, A., Arnqvist, A., Hammar, M., & Normark, S. (1993). Environmental regulation of curli production in Escherichia coli. *Infectious agents and disease*, *2*(4), 272–274.

75. Reshamwala, S. M., & Noronha, S. B. (2011). Biofilm formation in escherichia coli CRA mutants is impaired due to down-regulation of curli biosynthesis. *Archives of Microbiology*, *193*(10), 711–722. https://doi.org/10.1007/s00203-011-0708-7

76. White, A. P., Gibson, D. L., Kim, W., Kay, W. W., & Surette, M. G. (2006). Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *salmonella*. *Journal of Bacteriology*, *188*(9), 3219–3227. https://doi.org/10.1128/jb.188.9.3219-3227.2006

77. DePas, W. H., Syed, A. K., Sifuentes, M., Lee, J. S., Warshaw, D., Saggar, V., Csankovszki, G., Boles, B. R., & Chapman, M. R. (2014). Biofilm formation protects escherichia coli against killing by caenorhabditis elegans and Myxococcus xanthus. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(22), 7079–7087. https://doi.org/10.1128/aem.02464-14

78. Kaas, R. S., Friis, C., Ussery, D. W., & Aarestrup, F. M. (2012). Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse escherichia coli genomes. *BMC Genomics*, *13*(1), 577. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-577

79. Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M. E., Frapy, E., … Denamur, E. (2009). Organised genome dynamics in the escherichia coli species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genetics*, *5*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000344

80. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(2), 123–140. https://doi.org/10.1038/nrmicro818

81. Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of Commensal Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(3), 207–217. https://doi.org/10.1038/nrmicro2298

82. CHEN, M. H., TAKEDA, S.-ichiro, YAMADA, H., ISHII, Y., YAMASHINO, T., & MIZUNO, T. (2001). Characterization of the rcsc→yojn→rcsb phosphorelay signaling pathway involved in capsular synthesis in escherichia coli. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *65*(10), 2364–2367. https://doi.org/10.1271/bbb.65.2364

83. Castanié-Cornet, M.-P., Treffandier, H., Francez-Charlot, A., Gutierrez, C., & Cam, K. (2007). The glutamate-dependent acid resistance system in escherichia coli: Essential and dual role of the his–asp phosphorelay rcscdb/AF. *Microbiology*, *153*(1), 238–246. https://doi.org/10.1099/mic.0.29278-0

84. Majdalani, N., & Gottesman, S. (2005). The RCS phosphorelay: A complex signal transduction system. *Annual Review of Microbiology*, *59*(1), 379–405. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.050405.101230

85. Majdalani, N., Heck, M., Stout, V., & Gottesman, S. (2005). Role of rcsf in signaling to the RCS phosphorelay pathway in *escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *187*(19), 6770–6778. https://doi.org/10.1128/jb.187.19.6770-6778.2005

86. Castanié-Cornet Marie-Pierre, Cam, K., & Jacq, A. (2006). RCSF is an outer membrane lipoprotein involved in the RcsCDB phosphorelay signaling pathway in *escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *188*(12), 4264–4270. https://doi.org/10.1128/jb.00004-06

87. Gottesman, S., & Stout, V. (1991). Regulation of capsular polysaccharide synthesis in escherichia coli K12. *Molecular Microbiology*, *5*(7), 1599–1606. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01906.x

88. Huang, Y.-H., Ferrières, L., & Clarke, D. J. (2006). The role of the RCS Phosphorelay in Enterobacteriaceae. *Research in Microbiology*, *157*(3), 206–212. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.11.005

89. Stout, V. (1994). Regulation of capsule synthesis includes interactions of the RCSC/RCSB regulatory pair. *Research in Microbiology*, *145*(5-6), 389–392. https://doi.org/10.1016/0923-2508(94)90086-8

90. Jayaratne, P., Keenleyside, W. J., MacLachlan, P. R., Dodgson, C., & Whitfield, C. (1993). Characterization of rcsb and RCSC from escherichia coli O9:K30:H12 and examination of the role of the RCS regulatory system in expression of group I capsular polysaccharides. *Journal of Bacteriology*, *175*(17), 5384–5394. https://doi.org/10.1128/jb.175.17.5384-5394.1993

91. Brill, J. A., Quinlan-Walshe, C., & Gottesman, S. (1988). Fine-structure mapping and identification of two regulators of capsule synthesis in escherichia coli K-12. *Journal of Bacteriology*, *170*(6), 2599–2611. https://doi.org/10.1128/jb.170.6.2599-2611.1988

92. Wehland, M., & Bernhard, F. (2000). The RCSAB box. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(10), 7013–7020. https://doi.org/10.1074/jbc.275.10.7013

93. Sledjeski, D. D., & Gottesman, S. (1996). Osmotic shock induction of capsule synthesis in escherichia coli K-12. *Journal of Bacteriology*, *178*(4), 1204–1206. https://doi.org/10.1128/jb.178.4.1204-1206.1996

94. Carballes, F., Bertrand, C., Bouche, J.-P., & Cam, K. (1999). Regulation of escherichia coli cell division genes FTSA and ftsz by the two-component system RCSC-RCSB. *Molecular Microbiology*, *34*(3), 442–450. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01605.x

95. Gottesman, S., Trisler, P., & Torres-Cabassa, A. (1985). Regulation of capsular polysaccharide synthesis in escherichia coli K-12: Characterization of three regulatory genes. *Journal of Bacteriology*, *162*(3), 1111–1119. https://doi.org/10.1128/jb.162.3.1111-1119.1985

96. Stout, V., Torres-Cabassa, A., Maurizi, M. R., Gutnick, D., & Gottesman, S. (1991). RCSA, an unstable positive regulator of capsular

polysaccharide synthesis. *Journal of Bacteriology*, *173*(5), 1738–1747. https://doi.org/10.1128/jb.173.5.1738-1747.1991

97. Sledjeski, D., & Gottesman, S. (1995). A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced RCSA gene of escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(6), 2003–2007. https://doi.org/10.1073/pnas.92.6.2003

98. Stout, V. (1996). Identification of the promoter region for the colanic acid polysaccharide biosynthetic genes in escherichia coli K-12. *Journal of Bacteriology*, *178*(14), 4273–4280. https://doi.org/10.1128/jb.178.14.4273-4280.1996

99. Francez-Charlot, A., Laugel, B., Van Gemert, A., Dubarry, N., Wiorowski, F., Castanié-Cornet, M.-P., Gutierrez, C., & Cam, K. (2004). RcsCDB his-asp phosphorelay system negatively regulates the FLHDC operon in escherichia coli. *Molecular Microbiology*, *49*(3), 823–832. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03601.x

100. Vianney, A., Jubelin, G., Renault, S., Dorel, C., Lejeune, P., & Lazzaroni, J. C. (2005). Escherichia coli TOL and RCS genes participate in the complex network affecting Curli Synthesis. *Microbiology*, *151*(7), 2487–2497. https://doi.org/10.1099/mic.0.27913-0

101. Fredericks, C. E., Shibata, S., Aizawa, S.-I., Reimann, S. A., & Wolfe, A. J. (2006). Acetyl phosphate-sensitive regulation of flagellar biogenesis and capsular biosynthesis depends on the RCS phosphorelay. *Molecular Microbiology*, *61*(3), 734–747. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05260.x

102. Corbett, D., & Roberts, I. S. (2008). Capsular polysaccharides in escherichia coli. *Advances in Applied Microbiology*, 1–26. https://doi.org/10.1016/s0065-2164(08)00601-1

103. Ferrières, L., & Clarke, D. J. (2003). The RCSC sensor kinase is required for normal biofilm formation in escherichia coli K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface.

Molecular Microbiology, *50*(5), 1665–1682. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03815.x

104. Davalos-Garcia, M., Conter, A., Toesca, I., Gutierrez, C., & Cam, K. (2001). Regulation of *osmc* gene expression by the two-component system *RCSB-rcsc* in *escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *183*(20), 5870–5876. https://doi.org/10.1128/jb.183.20.5870-5876.2001

105. Majdalani, N., Hernandez, D., & Gottesman, S. (2002). Regulation and mode of action of the second small RNA activator of rpos translation, RPRA. *Molecular Microbiology*, *46*(3), 813–826. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03203.x

106. Rudenko, I., Ni, B., Glatter, T., & Sourjik, V. (2019). Inefficient secretion of anti-sigma factor flgm inhibits bacterial motility at high temperature. *IScience*, *16*, 145–154. https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.022

107. Tschowri, N., Busse, S., & Hengge, R. (2009). The BLUF-eal protein YCGF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *escherichia coli*. *Genes & Development*, *23*(4), 522–534. https://doi.org/10.1101/gad.499409

108. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The keio collection. Molecular Systems Biology, 2(1). https://doi.org/10.1038/msb4100050

109. Cherepanov, P. P., & Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in escherichia coli: TCR and KMR cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. Gene, 158(1), 9–14. https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00193-a

110. *Green Fluorescent Protein (GFP)*. Thermo Fisher Scientific - US. (n.d.). Retrieved April 11, 2023, from https://www.thermofisher.com/ua/en/home/life-science/cell-

analysis/fluorophores/green-fluorescent-protein.html#:~:text=GFP%20can%20be%20excited%20by,optimally%20detected%20at%20510%20nm.

111. *Tecan Systems - IN-MNANO+ - Infinite 200 Pro M Nano+, Dual-mode microplate reader, Monochromator optics*. Neobits.com is where business goes shopping. (n.d.). Retrieved April 11, 2023, from https://www.neobits.com/tecan_systems_in_mnano_infinite_200_pro_m_nano_p21802656.html

112. *Biorender*. BioRender App. (n.d.). Retrieved April 21, 2023, from https://app.biorender.com

113. Vassaux, G., Nitcheu, J., Jezzard, S., & Lemoine, N. R. (2005a). Bacterial gene therapy strategies. *The Journal of Pathology*, *208*(2), 290–298. https://doi.org/10.1002/path.1865

114. Barnhart, M. M., & Chapman, M. R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology*, *60*(1), 131–147. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142106

115. Romling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K., & Normark, S. (1998). Multicellular and aggregative behaviour of salmonella typhimurium strains is controlled by mutations in the AGFD promoter. *Molecular Microbiology*, *28*(2), 249–264. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00791.x

116. Uhlich, G. A., Keen, J. E., & Elder, R. O. (2001). Mutations in the *csgd* promoter associated with variations in curli expression in certain strains of *escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(5), 2367–2370. https://doi.org/10.1128/aem.67.5.2367-2370.2001

117. Uhlich, G. A., Keen, J. E., & Elder, R. O. (2002). Variations in the *csgd* promoter of *escherichia coli* O157:H7 associated with increased virulence in mice and increased invasion of Hep-2 cells. *Infection and Immunity*, *70*(1), 395–399. https://doi.org/10.1128/iai.70.1.395-399.2002

118. Bian, Z., Brauner, A., Li, Y., & Normark, S. (2000). Expression of and cytokine activation by *escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *The Journal of Infectious Diseases*, *181*(2), 602–612. https://doi.org/10.1086/315233

119. Ploplis, V. A., & Castellino, F. J. (2005a). Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thrombosis and Haemostasis*, *93*(04), 647–654. https://doi.org/10.1160/th04-12-0842

120. Gophna, U., Barlev, M., Seijffers, R., Oelschlager, T. A., Hacker, J., & Ron, E. Z. (2001). Curli fibers mediate internalization of *escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, *69*(4), 2659–2665. https://doi.org/10.1128/iai.69.4.2659-2665.2001

121. Cherny, I., Rockah, L., Levy-Nissenbaum, O., Gophna, U., Ron, E. Z., & Gazit, E. (2005). The formation of escherichia coli curli amyloid fibrils is mediated by prion-like peptide repeats. *Journal of Molecular Biology*, *352*(2), 245–252. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.028

122. Barak, J. D., Gorski, L., Naraghi-Arani, P., & Charkowski, A. O. (2005). *salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(10), 5685–5691. https://doi.org/10.1128/aem.71.10.5685-5691.2005

123. Jeter, C., & Matthysse, A. G. (2005). Characterization of the binding of diarrheagenic strains of *E. coli* to plant surfaces and the role of curli in the interaction of the bacteria with alfalfa sprouts. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, *18*(11), 1235–1242. https://doi.org/10.1094/mpmi-18-1235

124. Torres, A. G., Jeter, C., Langley, W., & Matthysse, A. G. (2005). Differential binding of *escherichia coli* O157:H7 to Alfalfa, human epithelial cells, and plastic is mediated by a variety of surface structures. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(12), 8008–8015. https://doi.org/10.1128/aem.71.12.8008-8015.2005

125. Goldwater, P. (2004). SIDS pathogenesis: Pathological findings indicate infection and inflammatory responses are involved. *FEMS*

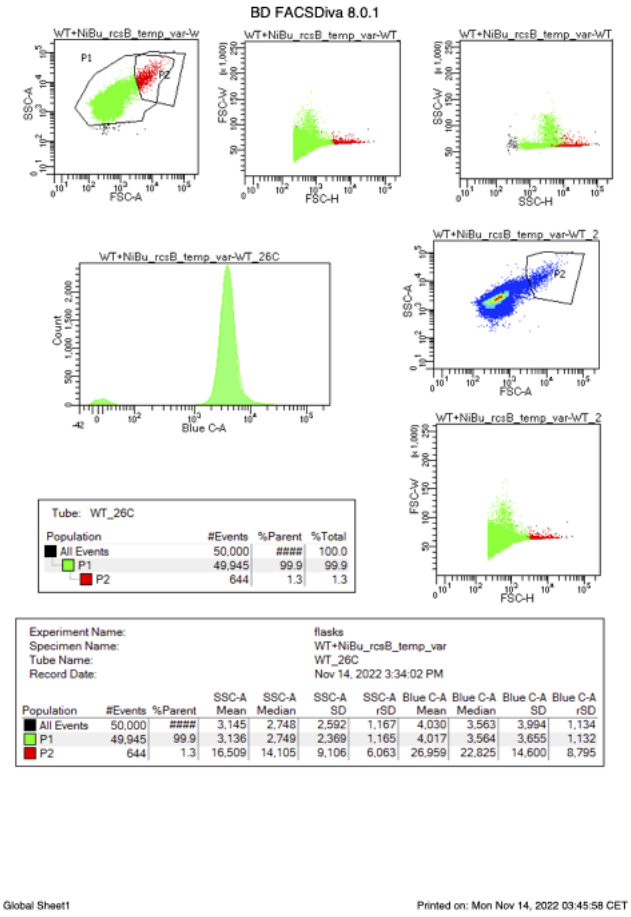
Immunology and Medical Microbiology, *42*(1), 11–20. https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.06.013

126. Goldwater, P. N., & Bettelheim, K. A. (2002). Curliated Escherichia coli, soluble curlin and the sudden infant death syndrome (SIDS). *Journal of Medical Microbiology*, *51*(11), 1009–1012. https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-11-1009

127. Schouten, F., Wolf, H., Smit, B., Bekedam, D., de Vos, R., & Wahlen, I. (2008). Maternal temperature during labour. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, *115*(9), 1131–1137. https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2008.01781.x

ДОДАТКИ

Додаток 1. Результати проточної цитометрії для штаму WT при інкубації за температури 26°C



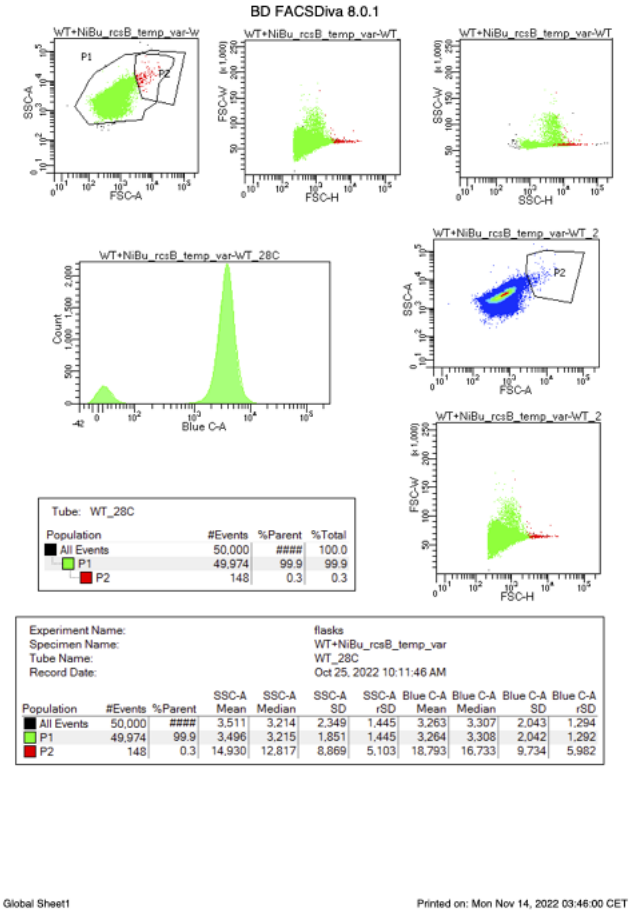
Tube: WT_26C

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
P1	49,945	99.9	99.9
P2	644	1.3	1.3

Experiment Name:	flasks
Specimen Name:	WT+NiBu_rcsB_temp_var
Tube Name:	WT_26C
Record Date:	Nov 14, 2022 3:34:02 PM

Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	SSC-A Median	SSC-A SD	SSC-A rSD	Blue C-A Mean	Blue C-A Median	Blue C-A SD	Blue C-A rSD
All Events	50,000	####	3,145	2,748	2,592	1,167	4,030	3,563	3,994	1,134
P1	49,945	99.9	3,136	2,749	2,369	1,165	4,017	3,564	3,655	1,132
P2	644	1.3	16,509	14,105	9,106	6,063	26,959	22,825	14,600	8,795

Додаток 2. Результати проточної цитометрії для штаму WT при інкубації за температури 28°C



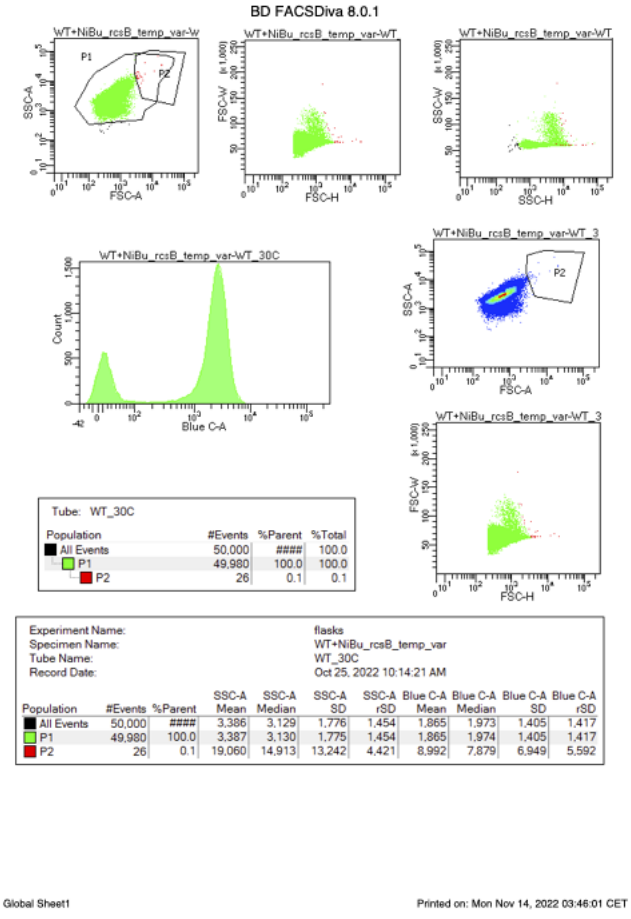
Tube: WT_28C

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
P1	49,974	99.9	99.9
P2	148	0.3	0.3

Experiment Name: flasks
Specimen Name: WT+NiBu_rcsB_temp_var
Tube Name: WT_28C
Record Date: Oct 25, 2022 10:11:46 AM

Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	SSC-A Median	SSC-A SD	SSC-A rSD	Blue C-A Mean	Blue C-A Median	Blue C-A SD	Blue C-A rSD
All Events	50,000	####	3,511	3,214	2,349	1,445	3,263	3,307	2,043	1,294
P1	49,974	99.9	3,496	3,215	1,851	1,445	3,264	3,308	2,042	1,292
P2	148	0.3	14,930	12,817	8,869	5,103	18,793	16,733	9,734	5,982

Додаток 3. Результати проточної цитометрії для штаму WT при інкубації за температури 30°C



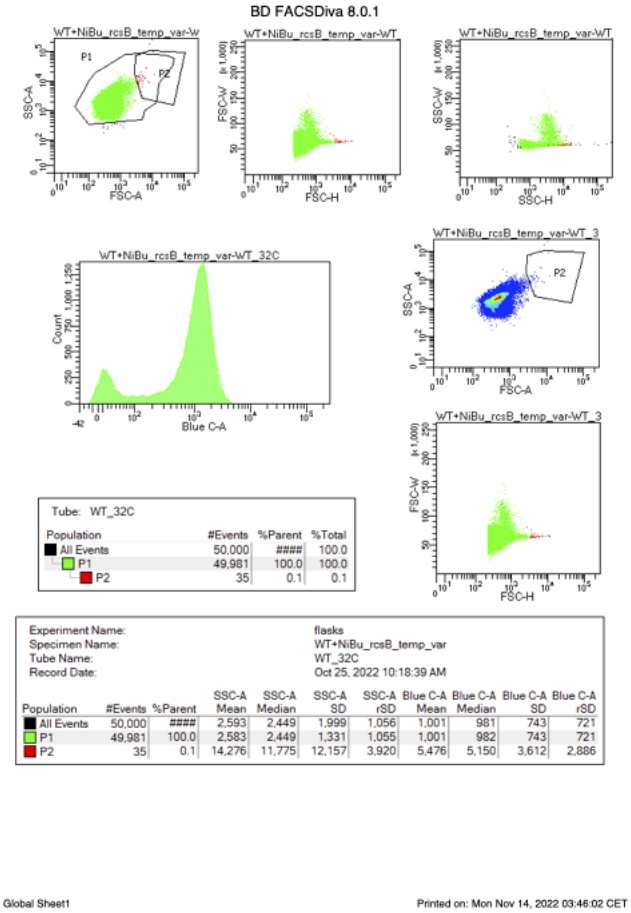
Tube: WT_30C

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
P1	49,980	100.0	100.0
P2	26	0.1	0.1

Experiment Name: flasks
Specimen Name: WT+NiBu_rcsB_temp_var
Tube Name: WT_30C
Record Date: Oct 25, 2022 10:14:21 AM

Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	SSC-A Median	SSC-A SD	SSC-A rSD	Blue C-A Mean	Blue C-A Median	Blue C-A SD	Blue C-A rSD
All Events	50,000	####	3,386	3,129	1,776	1,454	1,865	1,973	1,405	1,417
P1	49,980	100.0	3,387	3,130	1,775	1,454	1,865	1,974	1,405	1,417
P2	26	0.1	19,060	14,913	13,242	4,421	8,992	7,879	6,949	5,592

Додаток 4. Результати проточної цитометрії для штаму WT при інкубації за температури 32°C



Tube: WT_32C

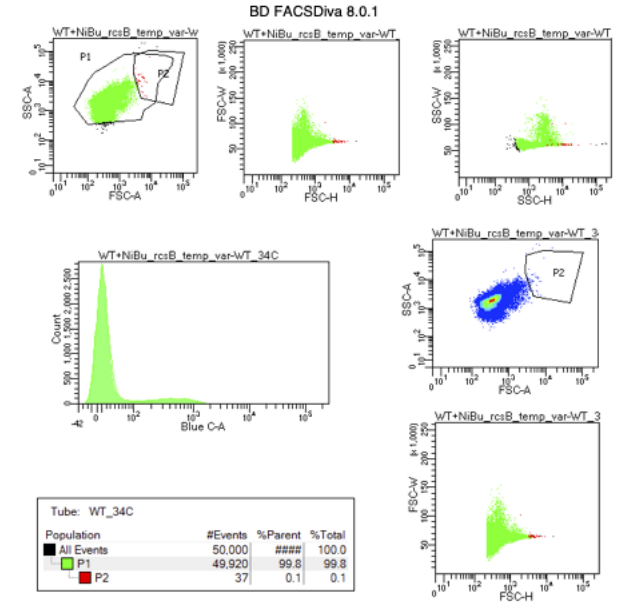
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
P1	49,981	100.0	100.0
P2	35	0.1	0.1

Experiment Name: flasks
Specimen Name: WT+NiBu_rcsB_temp_var
Tube Name: WT_32C
Record Date: Oct 25, 2022 10:18:39 AM

Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	SSC-A Median	SSC-A SD	SSC-A rSD	Blue C-A Mean	Blue C-A Median	Blue C-A SD	Blue C-A rSD
All Events	50,000	####	2,593	2,449	1,999	1,056	1,001	981	743	721
P1	49,981	100.0	2,583	2,449	1,331	1,055	1,001	982	743	721
P2	35	0.1	14,276	11,775	12,157	3,920	5,476	5,150	3,612	2,886

Global Sheet1 Printed on: Mon Nov 14, 2022 03:46:02 CET

Додаток 5. Результати проточної цитометрії для штаму WT при інкубації за температури 34°C



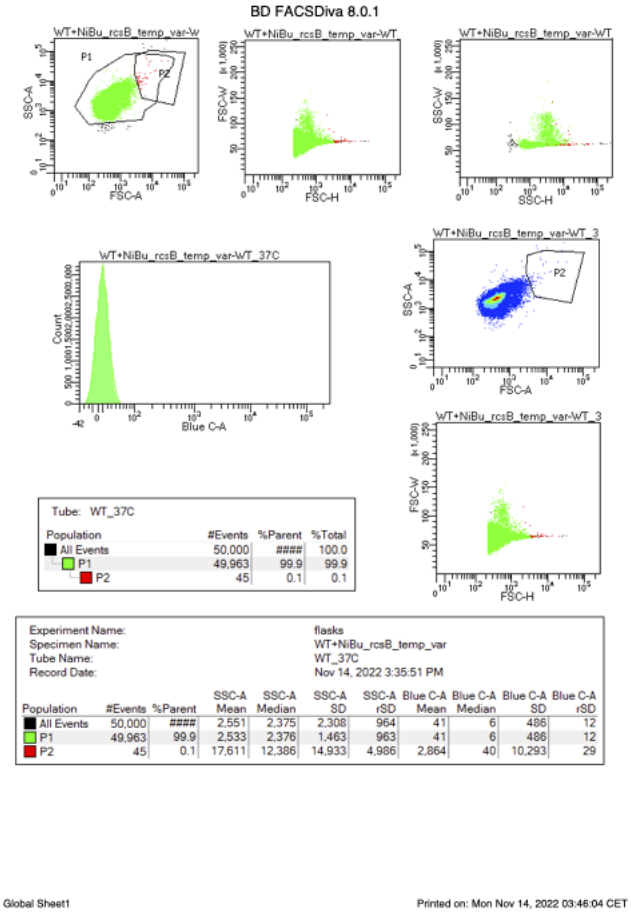
Tube: WT_34C

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
P1	49,920	99.8	99.8
P2	37	0.1	0.1

Experiment Name: flasks
Specimen Name: WT+NiBu_rcsB_temp_var
Tube Name: WT_34C
Record Date: Oct 26, 2022 12:47:22 PM

Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	SSC-A Median	SSC-A SD	SSC-A rSD	Blue C-A Mean	Blue C-A Median	Blue C-A SD	Blue C-A rSD
All Events	50,000	####	2,246	2,100	1,978	827	79	11	231	17
P1	49,920	99.8	2,234	2,101	1,196	826	79	11	231	17
P2	37	0.1	12,169	10,391	9,813	3,884	369	307	377	374

Додаток 6. Результати проточної цитометрії для штаму WT при інкубації за температури 37°C



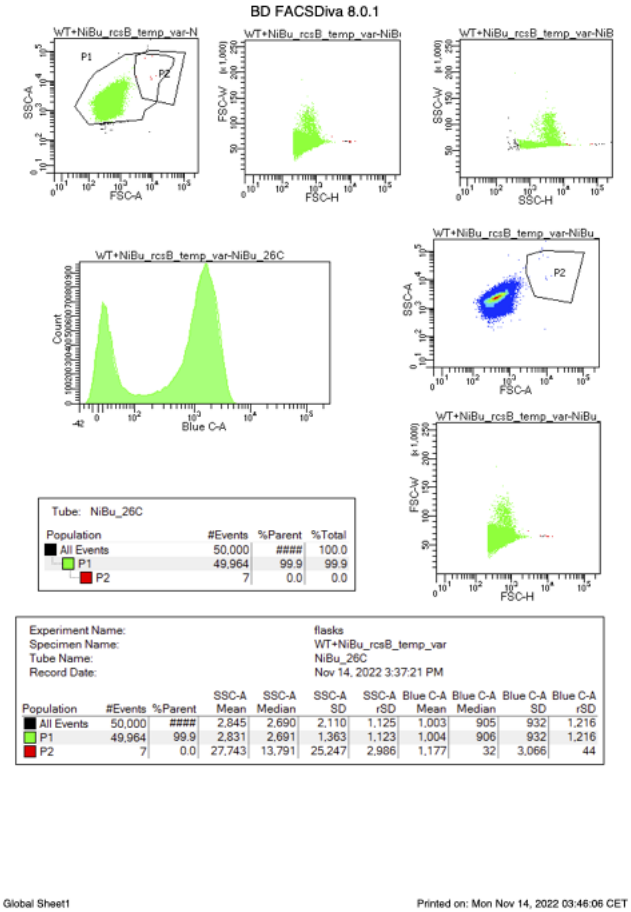
Tube: WT_37C

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
P1	49,963	99.9	99.9
P2	45	0.1	0.1

Experiment Name: flasks
Specimen Name: WT+NiBu_rcsB_temp_var
Tube Name: WT_37C
Record Date: Nov 14, 2022 3:35:51 PM

Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	SSC-A Median	SSC-A SD	SSC-A rSD	Blue C-A Mean	Blue C-A Median	Blue C-A SD	Blue C-A rSD
All Events	50,000	####	2,551	2,375	2,308	964	41	6	486	12
P1	49,963	99.9	2,533	2,376	1,463	963	41	6	486	12
P2	45	0.1	17,611	12,386	14,933	4,986	2,864	40	10,293	29

Додаток 7. Результати проточної цитометрії для штаму NiBu при інкубації за температури 26°C



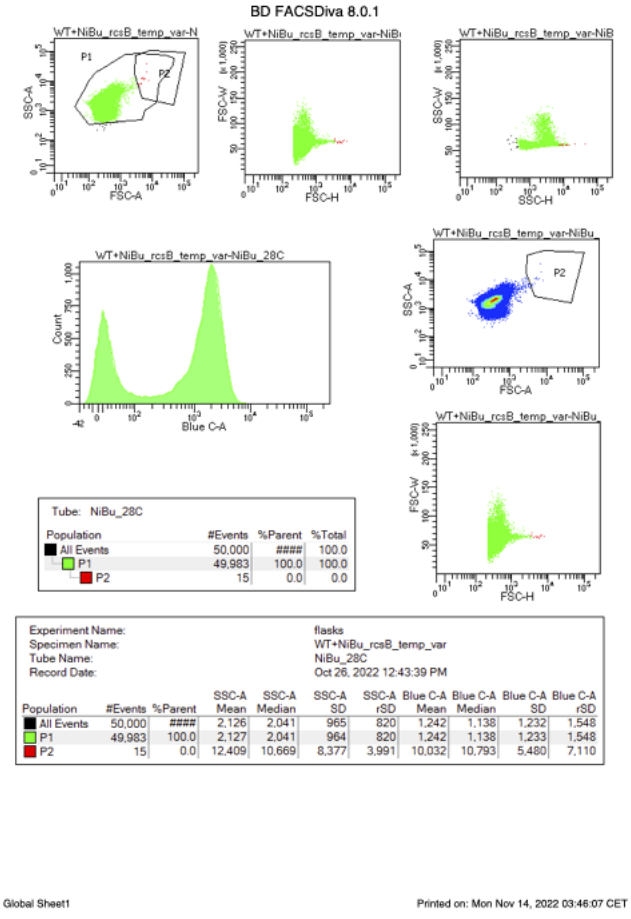
Tube: NiBu_26C

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
P1	49,964	99.9	99.9
P2	7	0.0	0.0

Experiment Name: flasks
Specimen Name: WT+NiBu_rcsB_temp_var
Tube Name: NiBu_26C
Record Date: Nov 14, 2022 3:37:21 PM

Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	SSC-A Median	SSC-A SD	SSC-A rSD	Blue C-A Mean	Blue C-A Median	Blue C-A SD	Blue C-A rSD
All Events	50,000	####	2,845	2,690	2,110	1,125	1,003	905	932	1,216
P1	49,964	99.9	2,831	2,691	1,363	1,123	1,004	906	932	1,216
P2	7	0.0	27,743	13,791	25,247	2,986	1,177	32	3,066	44

Додаток 8. Результати проточної цитометрії для штаму NiBu при інкубації за температури 28°C



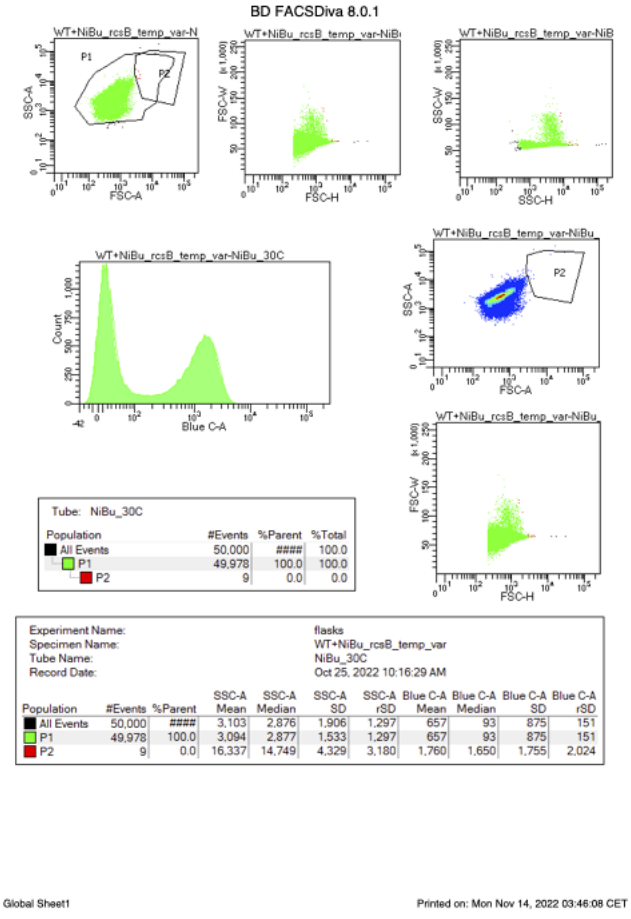
Tube: NiBu_28C

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
P1	49,983	100.0	100.0
P2	15	0.0	0.0

Experiment Name: flasks
Specimen Name: WT+NiBu_rcsB_temp_var
Tube Name: NiBu_28C
Record Date: Oct 26, 2022 12:43:39 PM

Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	SSC-A Median	SSC-A SD	SSC-A rSD	Blue C-A Mean	Blue C-A Median	Blue C-A SD	Blue C-A rSD
All Events	50,000	####	2,126	2,041	965	820	1,242	1,138	1,232	1,548
P1	49,983	100.0	2,127	2,041	964	820	1,242	1,138	1,233	1,548
P2	15	0.0	12,409	10,669	8,377	3,991	10,032	10,793	5,480	7,110

Додаток 9. Результати проточної цитометрії для штаму NiBu при інкубації за температури 30°C



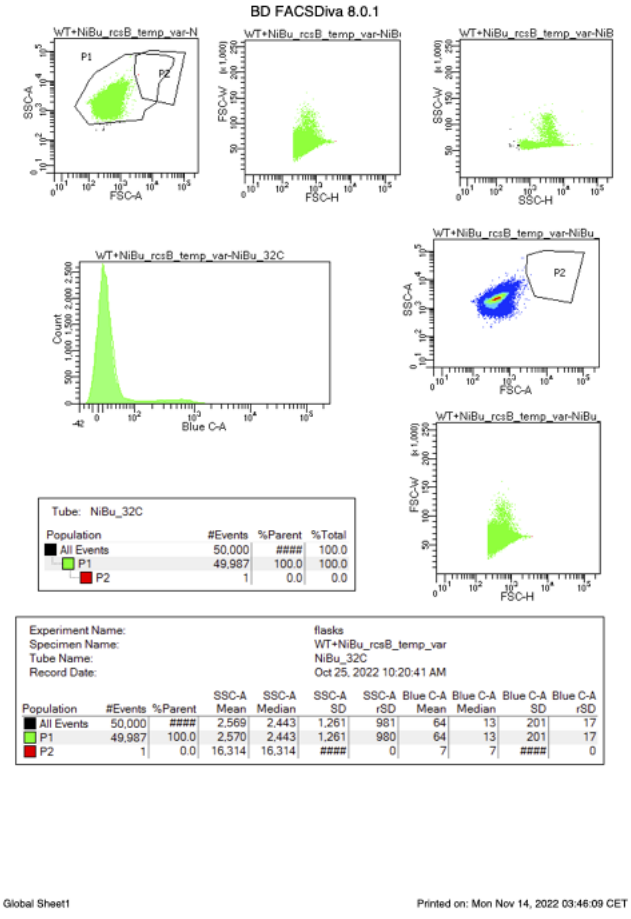
Tube: NiBu_30C

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
P1	49,978	100.0	100.0
P2	9	0.0	0.0

Experiment Name: flasks
Specimen Name: WT+NiBu_rcsB_temp_var
Tube Name: NiBu_30C
Record Date: Oct 25, 2022 10:16:29 AM

Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	SSC-A Median	SSC-A SD	SSC-A rSD	Blue C-A Mean	Blue C-A Median	Blue C-A SD	Blue C-A rSD
All Events	50,000	####	3,103	2,876	1,906	1,297	657	93	875	151
P1	49,978	100.0	3,094	2,877	1,533	1,297	657	93	875	151
P2	9	0.0	16,337	14,749	4,329	3,180	1,760	1,650	1,755	2,024

Додаток 10. Результати проточної цитометрії для штаму NiBu при інкубації за температури 32°C



Tube: NiBu_32C

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
P1	49,987	100.0	100.0
P2	1	0.0	0.0

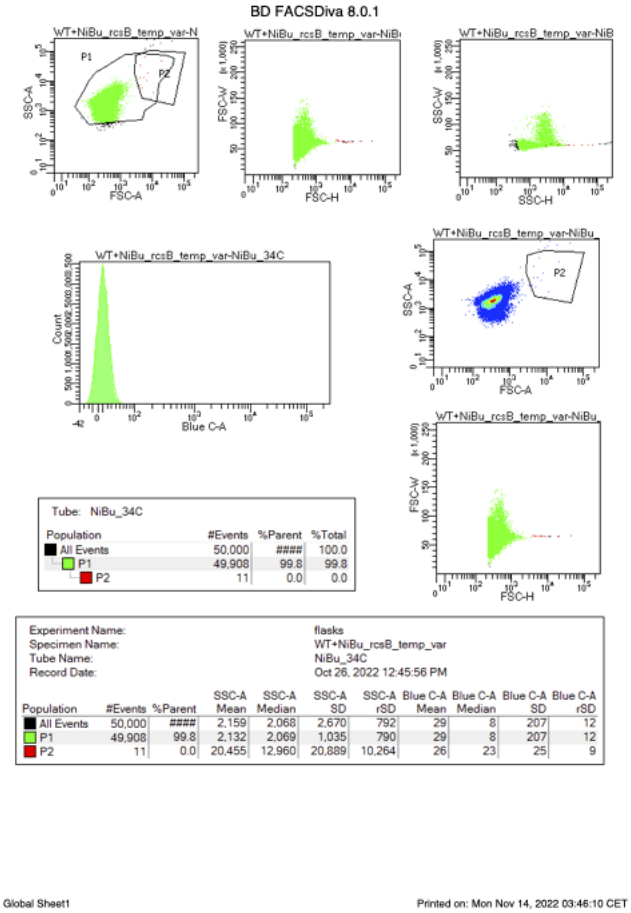
Experiment Name: flasks
Specimen Name: WT+NiBu_rcsB_temp_var
Tube Name: NiBu_32C
Record Date: Oct 25, 2022 10:20:41 AM

Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	SSC-A Median	SSC-A SD	SSC-A rSD	Blue C-A Mean	Blue C-A Median	Blue C-A SD	Blue C-A rSD
All Events	50,000	####	2,569	2,443	1,261	981	64	13	201	17
P1	49,987	100.0	2,570	2,443	1,261	980	64	13	201	17
P2	1	0.0	16,314	16,314	####	0	7	7	####	0

Global Sheet1

Printed on: Mon Nov 14, 2022 03:46:09 CET

Додаток 11. Результати проточної цитометрії для штаму NiBu при інкубації за температури 34°C



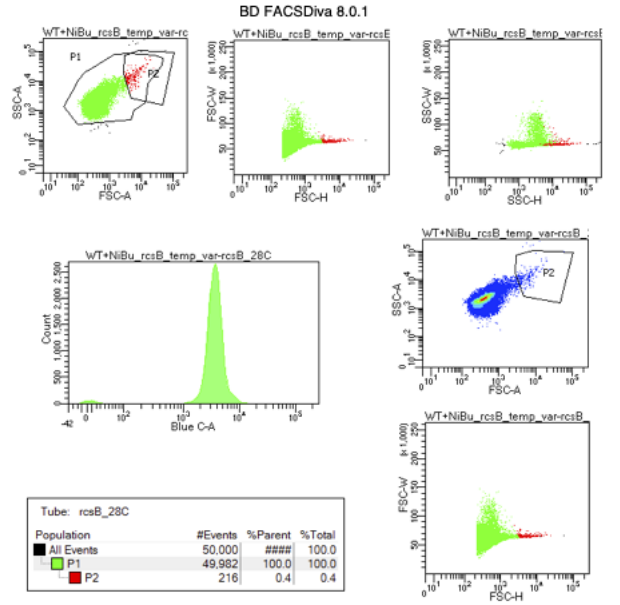
Tube: NiBu_34C

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
P1	49,908	99.8	99.8
P2	11	0.0	0.0

Experiment Name: flasks
Specimen Name: WT+NiBu_rcsB_temp_var
Tube Name: NiBu_34C
Record Date: Oct 26, 2022 12:45:56 PM

Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	SSC-A Median	SSC-A SD	SSC-A rSD	Blue C-A Mean	Blue C-A Median	Blue C-A SD	Blue C-A rSD
All Events	50,000	####	2,159	2,068	2,670	792	29	8	207	12
P1	49,908	99.8	2,132	2,069	1,035	790	29	8	207	12
P2	11	0.0	20,455	12,960	20,889	10,264	26	23	25	9

Додаток 12. Результати проточної цитометрії для штаму ΔrcsB при інкубації за температури 28°C



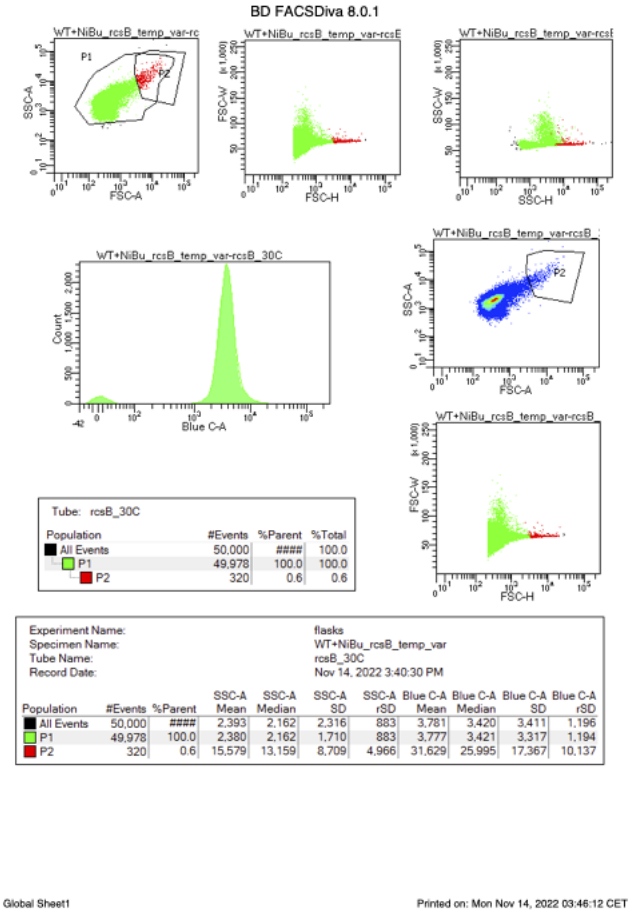
Tube: rcsB_28C

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
P1	49,982	100.0	100.0
P2	216	0.4	0.4

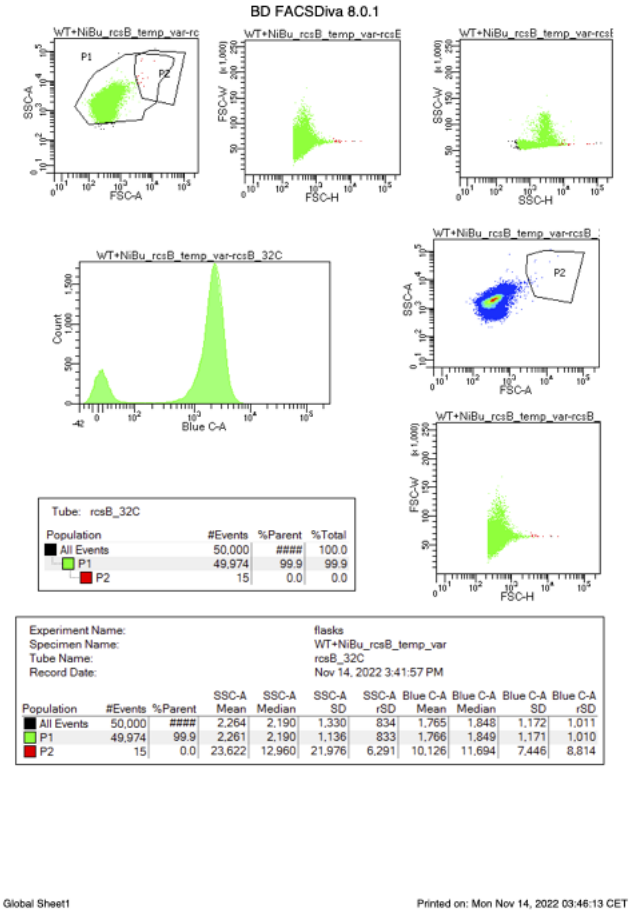
Experiment Name: flasks
Specimen Name: WT+NiBu_rcsB_temp_var
Tube Name: rcsB_28C
Record Date: Nov 14, 2022 3:39:11 PM

Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	SSC-A Median	SSC-A SD	SSC-A rSD	Blue C-A Mean	Blue C-A Median	Blue C-A SD	Blue C-A rSD
All Events	50,000	####	2,705	2,455	2,711	977	3,604	3,364	2,517	985
P1	49,982	100.0	2,681	2,455	1,637	977	3,602	3,365	2,452	985
P2	216	0.4	16,138	13,691	9,304	5,152	26,624	22,147	16,641	8,140

Додаток 13. Результати проточної цитометрії для штаму ΔrcsB при інкубації за температури 30°C



Додаток 14. Результати проточної цитометрії для штаму ΔrcsB при інкубації за температури 32°C



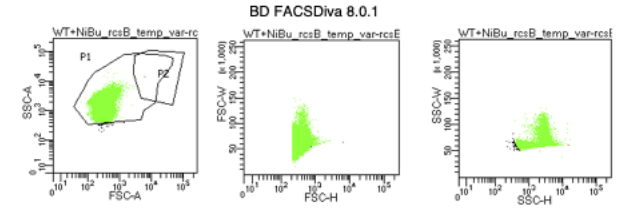
Tube: rcsB_32C

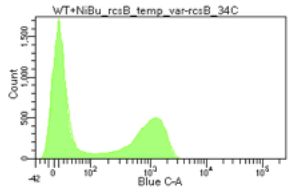
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
P1	49,974	99.9	99.9
P2	15	0.0	0.0

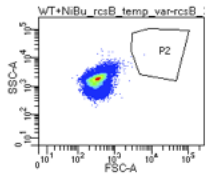
Experiment Name: flasks
Specimen Name: WT+NiBu_rcsB_temp_var
Tube Name: rcsB_32C
Record Date: Nov 14, 2022 3:41:57 PM

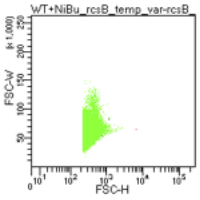
Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	SSC-A Median	SSC-A SD	SSC-A rSD	Blue C-A Mean	Blue C-A Median	Blue C-A SD	Blue C-A rSD
All Events	50,000	####	2,264	2,190	1,330	834	1,765	1,848	1,172	1,011
P1	49,974	99.9	2,261	2,190	1,136	833	1,766	1,849	1,171	1,010
P2	15	0.0	23,622	12,960	21,976	6,291	10,126	11,694	7,446	8,814

Додаток 15. Результати проточної цитометрії для штаму ΔrcsB при інкубації за температури 34°C







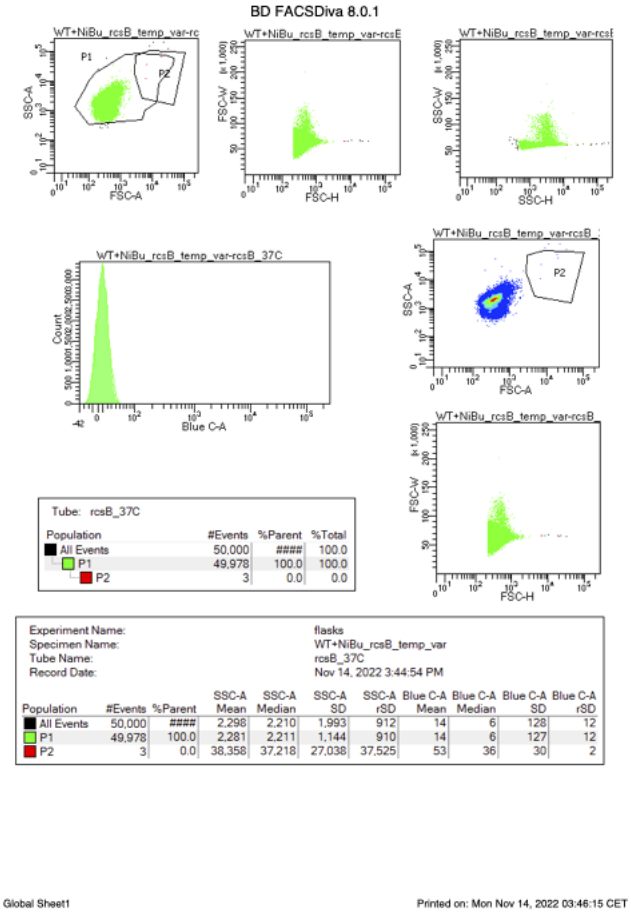


Tube: rcsB_34C

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000	####	100.0
P1	49,929	99.9	99.9
P2	1	0.0	0.0

Experiment Name: flasks
Specimen Name: WT+NiBu_rcsB_temp_var
Tube Name: rcsB_34C
Record Date: Nov 14, 2022 3:43:24 PM

Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	SSC-A Median	SSC-A SD	SSC-A rSD	Blue C-A Mean	Blue C-A Median	Blue C-A SD	Blue C-A rSD
All Events	50,000	####	2,062	2,031	920	770	408	27	604	52
P1	49,929	99.9	2,065	2,033	919	768	408	27	604	52
P2	1	0.0	13,972	13,972	####	0	3,583	3,583	####	0

Global Sheet1 Printed on: Mon Nov 14, 2022 03:46:14 CET

Додаток 16. Результати проточної цитометрії для штаму ΔrcsB при інкубації за температури 37°C