

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Gordana S. Uzelac

**KARAKTERIZACIJA BAKTERIOCINA
BAKTERIJA MLEČNE KISELINE I
MEHANIZMI DELOVANJA NA
SENZITIVNE ĆELIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Gordana S. Uzelac

**CHARACTERISATION OF
BACTERIOCINS OF LACTIC ACID
BACTERIA AND MECHANISMS OF
ACTION ON SENSITIVE CELLS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

Komisija za ocenu i odbranu:

Mentori:

dr Zorica Radulović, vanredni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Milan Kojić, naučni savetnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Miomir Nikšić, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Lozo, vanredni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Ivana Strahinić, naučni savetnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije _____

Ova doktorska disertacija realizovana je u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju, u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja u okviru čijeg je projekta „Izučavanje gena i molekularnih mehanizama u osnovi probiotske aktivnosti bakterija mlečne kiseline izolovanih sa područja Balkana“ br. 173019, finansirana ova doktorska disertacija.

Možete naučiti sve što je potrebno kako biste ostvarili sebi postavljene ciljeve;

ograničenja ne postoje ako ste spremni na učenje!

Zahvalnica

*Pre svih, želim da se zahvalim mentoru, **dr Milanu Kojiću** na predloženoj temi disertacije, nesebičnom angažovanju na izradi, na tumačenju rezultata i brojnim stručnim savetima, sugestijama tokom pisanja, kao i kritičkoj oceni teze. Hvala Vam šefe i na bezrezervnoj podršci i razumevanju, na pruženoj šansi, hvala što ste uvek bili tu za mene.*

*Zahvaljujem se mentorki, **prof. dr Zorici Radulović** na stručnoj pomoći, poverenju i podršci. Takođe, na izuzetno korisnim sugestijama koje su bile neophodne za finalno oblikovanje ove teze, kao i za kritičku ocenu teze.*

*Posebnu zahvalnost dugujem **prof. dr Jeleni Lozo**. Veliko hvala na bezgraničnoj pomoći od samog početka mog naučnog rada, hvala na trudu i vremenu, kao i na brojnim stručnim savetima. Posebno sam joj zahvalna na sugestijama tokom pisanja teze, kao i za kritičku ocenu teze.*

*Zahvaljujem se **prof. dr Miomiru Nikšiću** na stručnoj pomoći i sugestijama tokom pisanja teze, kao i za kritičku ocenu teze.*

*Zahvaljujem se **dr Ivani Strahinić** na uloženom trudu i kritičkoj oceni teze. Takođe, hvala na svim prijatnim trenucima u laboratoriji.*

*Veliko hvala **prof. dr Viktoru Nedoviću** na nesebičnoj pomoći i podršci u ključnim trenucima. **Prof. dr Ljubiši Topisiroviću** na ukazanom poverenju, stručnim savetima, na izdvojenom vremenu za mnogobrojne diskusije tokom eksperimentalnog rada. **Prof. dr Dragojlu Obradoviću** i **prof. dr Đorđu Firi** na poverenju i podršci.*

Želim da se zahvalim svim kolegama sa Poljoprivrednog fakulteta koji su sa mnom činili prve korake u naučnom radu, naročito Nemanji, Ani i Mileni koji su uvek bili uz mene. Hvala kolegama Maji, Mici, Kaći, Goranu, Kaćici, Nataši, Sanji, Amareli, Jovanki, Jeleni, Branku, Brankici koji su rad često činili opuštenijim i zanimljivijim. Maki, tebi hvala za sve provedene sate, hvala i na pomoći u eksperimentalnom radu. Hvala dragim prijateljima Mariji, Jeleni, Sladjici, Sanji koji su sa mnom proživljavali sve uspone i padove proteklih godina.

Posebno želim da se zahvalim mojoj Ivani na vremenu koje je uvek nalazila za mene, na svakodnevnoj podršci, nesebičnoj ljubavi i pažnji, na prijateljstvu.

Na kraju, želim da se zahvalim svojoj porodici, roditeljima, bratu Dušanu i sestri Nini, koji su uvek bili moja sigurna luka. Hvala na strpljenju, ljubavi i razumevanju.

KARAKTERIZACIJA BAKTERIOCINA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE I MEHANIZMI DELOVANJA NA SENZITIVNE ĆELIJE

REZIME

Bakteriocini bakterija mlečne kiseline predstavljaju antimikrobne komponente proteinske prirode koje se primenjuju u prehrambenoj industriji (kao konzervansi), a takođe imaju potencijalnu primenu u veterini i medicini (kao alternativa ili dodatak antibiotskoj terapiji). Takođe, ove antimikrobne komponente danas se izučavaju i sa fundamentalnog aspekta, pre svega se izučava njihova struktura i mehanizam delovanja na senzitivne ćelije. Za bakteriocine klase I (nizin), pokazano je da koristi lipid II (prekursor sinteze ćelijskog zida) kao ciljni vezujući molekul za svoje delovanje. Do nedavno je definisano samo nekoliko membranskih proteina kao bakteriocinski receptori za bakteriocine klase II. Okarakterisane membranske komponente koje imaju ulogu receptora uključene su u transport šećera (komponente man-PTS sistema i maltoza-ABC transporter), takođe je nedavno okarakterisan UppP protein, receptor za dvokomponentni bakteriocin, laktokokcin G.

LsbB bakteriocin je jedan od bakteriocina koje produkuje prirodni izolat *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5. U cilju identifikacije receptora za LsbB bakteriocin, urađena je nasumična mutageneza *Lc. lactis* BGMN1-596, soja senzitivnog na LsbB, nakon čega su selekcijom na šoljama koje su sadržale LsbB bakteriocin dobijene dve kategorije mutanata (BGMN1-596R2 i BGMN1-596R3), dok su analizom stepena tolerancije polaznog soja BGMN1-596 na hemijski sintetisanom LsbB bakteriocinu dobijeni spontano rezistentni mutanti kategorije BGMN1-596SR. U cilju komplementiranja senzitivnosti mutanata na LsbB konstruisana je kozmidna biblioteka soja BGMN1-596, gde je dobijeno 148 kozmidnih klonova, od kojih je svaki nosio fragmente *EcoRI* parcijalo isečene hromozomalne DNK veličine oko 40 kb. Kozmidna DNK je izolovana iz svakog klona i njom su transformisani mutanti. Kozmid pAZILcos/MN2 je komplementirao LsbB rezistentne mutante sve tri kategorije, odnosno vratio

senzitivnost mutanata na LsbB bakteriocin. Primenom metode prekloniranja manjih fragmenata i sekvenciranjem kozmida mapiran je gen *yvjB*, koji kodira YvjB protein (Zn-zavisna metalopeptidaza), a koji je sposoban da komplementira rezistentne mutante. YvjB je membranski protein odgovoran za senzitivnost ćelije na LsbB bakteriocin, i najverovatnije predstavlja receptor koji funkcioniše kao zasebna jedinica.

Sekvenciranjem i poređenjem genoma divljeg soja BGMN1-596 i mutanata BGMN1-596R2/23 i BGMN1-596R3/19 potvrđeno je prisustvo mutacija u *yvjB* kod mutanata obe kategorije; sekvenciranjem svih dobijenih mutanata u *yvjB* uočeni su različiti tipovi mutacija: tačkaste mutacije koje dovode do promene aminokiseline glicin u serin na poziciji 188 uzrokuju ograničenu rezistenciju senzitivnog soja na LsbB bakteriocin, dok prisustvo STOP kodona dovodi do potpune rezistencije istog soja na LsbB bakteriocin; "knock-out" *yvjB* u senzitivnim sojevima BGMN1-596 i IL1403 dovodi do rezistencije sojeva na LsbB bakteriocin. Pored toga, heterologa ekspresija *yvjB*_{BGMN1-596} gena u prirodno rezistentnim sojevima *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei* i *Enterococcus faecalis*, dovodi do njihove senzitivnosti na LsbB.

Pored izučavanja mehanizma kojim LsbB bakteriocin deluje na senzitivne ćelije, analizirana je domenska struktura LsbB bakteriocina u okviru koje je definisan domen odgovoran za interakciju sa receptorom, kao i uticaj pojedinačnih aminokiselina u okviru tog domena. Analizom domenske strukture LsbB bakteriocina pokazano je da je C-terminalni domen odgovoran za interakciju sa receptorom senzitivne ćelije, a takođe i da je poslednjih 8 aminokiselina C-terminalnog domena dovoljno da se LsbB veže za aktivna mesta receptora. Zamenom svake aminokiseline u okviru C-terminusa alaninom kao neutralnom aminokiselinom, analiziran je značaj pojedinačnih aminokiselina. Pokazano je da su triptofan na poziciji 25 (W25), kao i poslednja aminokiselina alanin na poziciji 30 (A30) najznačajnije za interakciju bakteriocina sa receptorom. Na osnovu rezultata može se zaključiti da je C-

terminalni domen uključen u specifično vezivanje bakteriocina za receptor, dok su ostali domeni uključeni u nespecifično prepoznavanje bakteriocina i receptora.

Osim toga, analizirana je regulacija ekspresije LsbB bakteriocina, gde je pokazano da se region odgovoran za regulaciju nalazi u okviru (*EcoRI/ScaI*) na pMN5 plazmidu nizvodno od *lsbB* gena, međutim ne može se zaključiti da li se regulacija odvija na transkripcionom ili translacionom nivou. Ono što je sigurno jeste da nizvodni region odgovoran za povećanu ekspresiju LsbB bakteriocina bilo "in-cis" ili "in-trans" mora biti u "cis-konstalaciji" sa *lsbB* genom.

Ključne reči: Bakterije mlečne kiseline, bakteriocini, mehanizam, receptori, domenska struktura, interakcija, regulacija ekspresije

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Tehnološka mikrobiologija

UDK: 579.222(043.3)

CHARACTERISATION OF BACTERIOCINS OF LACTIC ACID BACTERIA AND MECHANISMS OF ACTION ON SENSITIVE CELLS

ABSTRACT

Bacteriocins of lactic acid bacteria are antimicrobial peptides used in food industry as preservatives, but also they could be used in veterinary and medicine (as alternatives to antibiotics). These antimicrobial components are also studied from a fundamental aspect, with a primarily focus on structure and mechanisms of action. The class I bacteriocin, nisin and some closely related lantibiotics have all been shown to employ lipid II, a cell wall precursor molecule, as a docking site. Until recently, only a few membrane proteins were defined as receptors for class II bacteriocins. Membrane receptors for these bacteriocins are involved in sugar transport (man-PTS system and maltose-ABC transporter). Another recently characterized protein, UppP protein was identified as receptor for two component bacteriocin, lactococcin G.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* BGMN1-5 among others produces a leaderless class II bacteriocin called LsbB. In order to identify the receptor for LsbB, MNNG was used for random mutagenesis of the LsbB sensitive strain *Lc. lactis* BGMN1-596. Two categories of resistant mutants were obtained (BGMN1-596R2 and BGMN1-596R3) by selection on LsbB bacteriocin containing plates, whereas spontaneously resistant mutants (BGMN1-596SR) were obtained by selection on plates containing synthesized LsbB bacteriocin. In order to complement sensitivity in mutants cosmid library of the LsbB-sensitive strain BGMN1-596 was constructed in *E. coli*, and 148 cosmid clones (*EcoRI* partially digested chromosomal DNA, each clone contain about 40 kb of genomic DNA) were obtained. Cosmid DNA was individually isolated and transferred to LsbB-resistant mutants of BGMN1-596. Cosmid pAZILcos/MN2, carrying a 40-kb insert, was found to be able to restore LsbB sensitivity in LsbB-resistant mutants. In order to identify the minimal genetic unit on the cosmid pAZILcos/MN2, which could transfer sensitivity to LsbB, pAZILcos/MN2 was

digested with different restriction enzymes and subcloned into pAZIL vector. Only the clone (pAZIL/ZnMP) that contained the *yvjB* gene was able to restore sensitivity. YvjB protein is responsible for cell sensitivity to LsbB bacteriocin, most likely serves as the sole receptor unit and acts in a species-independent manner.

In parallel, the genomes of two resistant mutants (BGMN1-596R2/23 and BGMN1-596R3/19) and the wild-type strain BGMN1-596 were completely sequenced in order to identify genes which may be involved in the resistance phenotype. It was found that both mutants indeed harbored mutations in the *yvjB* gene; *yvjB* gene was sequenced and in all other isolated mutants were found: point mutation which causes amino acid substitution (Gly into Ser) in position 188, gave mutants with limited resistance on LsbB bacteriocin, while mutations which lead to the STOP codon cause totally resistance to LsbB bacteriocin. "Knock-out" in *yvjB* gene in sensitive strains BGMN1-596 and IL1403 cause resistance to LsbB bacteriocin confirming role of *yvjB* gene in sensitivity to LsbB. Perhaps most convincingly, *yvjB* also conferred sensitivity to LsbB when expressed in heterologous hosts outside the *Lactococcus* genus, such as *Lactobacillus paracasei* and *Enterococcus faecalis*, which are normally resistant to LsbB.

In addition to mechanism of action of LsbB bacteriocin, its domain structure was analyzed as well, leading to a definition of the domain responsible for the interaction with the receptor, as well as the effect of the individual amino acids within this domain. The results indicate that eight amino acids at the C-terminus are likely to contain the receptor-binding domain, because only truncated fragments from this region could antagonize the antimicrobial activity of LsbB. Furthermore, alanine substitution experiment revealed that the tryptophan at position 25 (W25) is crucial for the blocking activity of the truncated peptides as well as for the antimicrobial activity of the full-length bacteriocin. Alanine in position A30 is also important for bacteriocin activity. Taken together, these structure-function studies provide strong

evidence that the receptor-binding parts of LsbB and sequence-related bacteriocins are located in their C-terminal end.

Furthermore, regulation of the expression of LsbB bacteriocin was analyzed, indicating that the region responsible for the regulation is located within the (*EcoRI/ScaI*) restriction site on the pMN5 plasmid downstream of the *lsbB* gene. However, up to now, it cannot be finally confirmed whether the regulation occurs at the transcriptional or translational level. It is surely proven that the downstream region responsible for increased expression of LsbB bacteriocin, must be in the "cis-constellation" with *lsbB* gene as entire entity.

Key words: Lactic acid bacteria, Bacteriocins, Mechanism, Receptor, Domain Structure, Interaction, Regulation of Expression

Academic Expertise: Biotechnology

Field of Academic Expertise: Food and Industrial Microbiology

UDK: 579.222(043.3)

SKRAĆENICE

ak - aminokiselina

BLAST - Basic Local Alignment Search Tools

BMK - bakterije mlečne kiseline

CD - Circular Dichroism

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

FDA - Food and Drug Administration

GRAS - Generally Regarded As Safe

LMM, IMGGI - Laboratorija za molekularnu mikrobiologiju, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

man-PTS - manozna-fosfotransferazni sistem

MNNG - *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine

MOPS - 3-(*N*-Morpholino) propanesulfonic acid

MRSA - meticilin rezistentne *Staphylococcus aureus*

NaPi - Natrijum fosfatni pufer

NMR - Nuclear Magnetic Resonance

OD - Optimal Density

ONPG - *ortho*-nitrophenyl- β -galactoside

ORF - Open Reading Frame

PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

PMSF - phenylmethanesulfonylfluoride

SDS - Sodium Dodecyl Sulfate

VRE - vankomicin rezistentne enterokoke

X-gal - 5-bromo-4-hloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Bakterije mlečne kiseline	5
2.1.1. Opšte karakteristike bakterija mlečne kiseline	5
2.1.2. Karakteristike soja <i>Lactococcus lactis</i>	5
2.1.3. Karakteristike prirodnog izolata <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGMN1-5	7
2.2. Bakteriocini	8
2.2.1. Bakteriocini bakterija mlečne kiseline	9
2.3. Klasifikacija bakteriocina	10
2.3.1. Bakteriocini klase I – lantibiotici	11
2.3.1.1. Klasifikacija bakteriocina klase I	11
2.3.1.2. Geni uključeni u biosintezu lantibiotika	12
2.3.1.3. Mehanizam delovanja lantibiotika	13
2.3.2. Bakteriocini klase II	14
2.3.2.1. Klasifikacija bakteriocina klase II	14
2.3.2.2. Geni uključeni u biosintezu bakteriocina klase II	17
2.3.2.3. Mehanizam delovanja bakteriocina klase II	18
2.3.3. Bakteriolizini	21
2.4. Imuni proteini bakteriocina	22
2.5. Rezistencija bakterija na bakteriocine	23
2.6. Transport bakteriocina	24
2.7. Regulacija produkcije bakteriocina klase I i klase II	25
2.8. Primena bakteriocina	27
2.9. Najnovija istraživanja vezana za receptore bakteriocina	28
3. CILJEVI RADA	30
4. MATERIJAL I METODE	33

4.1. Bakterijski sojevi i plazmidi korišćeni u radu	34
4.2. Medijumi za optimalan rast bakterija	43
4.3. Metode rada sa bakteriocinima	43
4.3.1. Difuzioni test u bunarićima	43
4.3.2. Dilucioni test u mikrotitar pločama	44
4.3.3. Pripremanje bakteriocinskih šolja	45
4.4. API i Biolog test	45
4.5. Metode izolacije nukleinskih kiselina iz bakterija	46
4.5.1. Metoda izolacije hromozomalne DNK iz laktokoka	46
4.5.2. Metoda izolacije plazmidne DNK iz <i>E. coli</i> (DH5 α i EC101)	47
4.5.3. Metoda izolacije kozmidne DNK iz <i>E. coli</i> (HB101)	48
4.5.4. Prečišćavanje totalne DNK u gradijentu CsCl	49
4.5.5. Metode izolacije plazmidne DNK iz laktokoka	49
4.5.6. Metoda izolacije RNK iz laktokoka	50
4.6. Metode transformacije bakterija plazmidima	50
4.6.1. Priprema kompetentnih ćelija <i>E. coli</i>	50
4.6.2. Ligacija DNK fragmenata i transformacija <i>E. coli</i> (EC101 i DH5 α) ćelija „Heat shock“	51
4.6.3. Priprema elektrokompetentnih ćelija i transformacija sojeva metodom elektroporacije	52
4.7. Metode lančane reakcije polimeraze (Polimerase Chain Reaction)	53
4.7.1. PCR metoda	53
4.7.2. RT-PCR metoda	53
4.8. Metode mutiranja gena	57
4.8.1. Metoda nasumične mutageneze	57
4.8.2. Metoda mesto specifične mutageneze	57
4.9. Konstruisanje kozmidne biblioteke	61
4.9.1. Parcijalna digestija DNK, kloniranje fragmenata u kozmid pAZILcos	61
4.9.2. Pakovanje kozmidne DNK u λ fage	61

4.10. Sekvenciranje pAZILcos/MN2	62
4.11. „Knock-out“ <i>yvjB</i> gena	63
4.12. Sekvenciranje genoma BGMN1-596 i MNNG mutanata	64
4.13. Metode elektroforeze	64
4.13.1. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu	64
4.13.2. Gel elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE)	64
4.14. DNK/DNK hibridizacija („Southern blot“)	66
4.14.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane	66
4.14.2. Obeležavanje probe sa digoksinom-dUTP-om	67
4.14.3. Neradiokativna DNK/DNK hibridizacija	67
4.15. „Knock out“ <i>lsbB</i> i <i>lmrB</i> gena	68
4.16. Konstruisanje vektora – transkripcione fuzije	68
4.17. Merenje β -galaktozidazne aktivnosti	70
5. REZULTATI	71
5.1. Mehanizam delovanja LsbB bakteriocina	72
5.1.1. Antimikrobna aktivnost bakteriocina soja BGMN1-596T	72
5.1.2. Kloniranje <i>lsbB</i> i njegova ekspresija u MG7284 soju	72
5.1.3. Mutageneza soja BGMN1-596 i analiza dobijenih mutanata	74
5.1.4. API i Biolog test	77
5.1.5. Kozmidna biblioteka soja BGMN1-596	78
5.1.6. Komplementiranje rezistentnih mutanata manjim fragmentima pAZILcos/MN2	79
5.1.7. Komplementiranje LsbB rezistentnih mutanata konstruktom pAZIL/ZnMP	83
5.1.8. Komparativna analiza DNK sekvence <i>yvjB</i> gena	83
5.1.9. „Knock-out“ <i>yvjB</i> gena	86
5.1.10. Heterologa ekspresija <i>yvjB</i> gena	86
5.2. LsbB bakteriocin-interakcija sa receptorom	88
5.2.1. Mutacije aminokiselina na C-terminusu LsbB bakteriocina	89
5.2.2. Mutacije na C-terminalnom alaninu LsbB bakteriocina	91

5.3. Regulacija ekspresije LsbB bakteriocina	92
5.3.1. BGMN1-596T sintetiše samo LsbB bakteriocin	93
5.3.2. Region pMN5 plazmida odgovoran za ekspresiju LsbB	94
5.3.3. Analiza transkripcionog nivoa regulacije ekspresije LsbB	96
6. DISKUSIJA	98
6.1. Mehanizam delovanja LsbB bakteriocina	99
6.2. Strukturno funkcionalna analiza LsbB bakteriocina	103
6.3. Regulacija ekspresije LsbB bakteriocina	108
7. ZAKLJUČCI	109
7.1. Mehanizam delovanja LsbB bakteriocina	110
7.2. Strukturno funkcionalna analiza LsbB bakteriocina	111
7.3. Regulacija ekspresije LsbB bakteriocina	113
8. LITERATURA	115

1. UVOD

Bakterije mlečne kiseline (BMK) obuhvataju heterogenu grupu Gram-pozitivnih, nesporogenih, katalaza negativnih bakterija. One proizvode mlečnu kiselinu kao glavni proizvod fermentativnog metabolizma, potom različite antimikrobne komponente kao što su organske kiseline, H₂O₂, diacetil i acetaldehid, piroglutaminska kiselina, a takođe i komponente proteinske prirode koje se nazivaju bakteriocini. Bakteriocini se definišu kao ribozomalno sintetisani proteini ili peptidi koji najčešće ispoljavaju uzak spektar antimikrobnog delovanja ograničen na srodne bakterije, a prema kojima soj proizvođač ima specifičan mehanizam samozaštite (Jack *et al.*, 1995; Cotter *et al.*, 2005). Bakteriocini su svoju primenu našli pre svega u prehrambenoj industriji kao konzervansi različitih prehrambenih proizvoda, međutim kako se danas sve češće javlja problem rezistencije bakterija na postojeće antibiotike, bakteriocini se pominju i kao jedno od rešenja u antibiotskoj terapiji, tako da se sve više proučavaju sa aspekta primene u farmaceutskoj industriji (Benmechernene *et al.*, 2013), a takođe i sa fundamentalnog aspekta (de Vuyst and Leroy, 2007). Iako je u poslednje dve do tri decenije otkriveno na stotine bakteriocina za koje se tvrdilo da imaju veliki potencijal bilo kao konzervansi u proizvodnji hrane ili u farmaceutskoj industriji, nizin A i pediocin PA-1 su do sada jedini bakteriocini čije je korišćenje dozvoljeno u prehrambenoj industriji u većem broju zemalja (Chen and Hoover, 2003). Jedan od glavnih razloga za ovako slabu uspešnost u primeni bakteriocina je svakako nedovoljna istraženost mehanizama kojim bakteriocini deluju. Poznavanje strukture bakteriocina i mehanizma delovanja je od suštinskog značaja u cilju njihove potencijalne primene kao lekova ili konzervanasa. Takođe, istraživanja mehanizma delovanja na molekularnom nivou od ključnog su značaja za prevenciju bakteriocin-rezistentnih bakterija.

Bakteriocini svoje antimikrobno delovanje ispoljavaju pre svega permeabilizacijom plazma membrane (Cotter *et al.*, 2013), iako mnogi od njih imaju indirektno delovanje na membranu tako što se vezuju za različite membranske receptore (Ramnath *et al.*, 2000; Hechard and Sahl, 2002; Diep *et*

al., 2007; Gabrielsen *et al.*, 2012). Mehanizam delovanja baktriocina zavisi od primarne strukture njihovih peptida, tako bakteriocini koji pripadaju istoj klasi imaju i slične mehanizme delovanja s obzirom da je primarna struktura peptida uzeta kao osnov klasifikacije bakteriocina. Oni se generalno mogu podeliti na postranslaciono modifikovane bakteriocine klase I (lantibiotici) i nemodifikovane ili minimalno modifikovane bakteriocine klase II (Cotter *et al.*, 2005).

Vezivanje za lipid II komponentu (prekursor sinteze ćelijskog zida) je osnov mehanizma delovanja bakteriocina klase I, kao i laktokokcina 972 koji pripada podklasi IId. Ovakvom interakcijom inhibira se sinteza ćelijskog zida, a takođe lipid II komponenta može služiti kao specifičan vezujući molekul prilikom formiranja pora na membrani ćelije (Breukink and de Kruijff, 2006). Bakteriocini klase II svoje inhibitorno delovanje vrše permeabilizacijom ćelijske membrane, gde dolazi do curenja malih molekula i na kraju smrti ćelije. Pokazano je da se bakteriocini slični pediocinu (podklase IIa), laktokokcin A i B (podklasa IId), kao i mikrocina E492 vezuju za membranske komponente manoza-fosfotransferaznog (man-PTS) sistema (Bieler *et al.*, 2006; Diep *et al.*, 2007), dok je nedavno otkriveno da je maltoza-ABC transporter odgovoran za senzitivnost ćelije na garvicin ML, cirkularni bakteriocin (podklasa IIc) (Gabrielsen *et al.*, 2012). Najnovija istraživanja pokazuju i značaj UppP proteina kao receptora za dvokomponentni bakteriocin laktokokcin G (podklasa IIb) (Kjos *et al.*, 2014).

U ovom doktoratu je definisan još jedan membranski protein, YvjB, (Zn-zavisna metalopeptidaza) koji predstavlja receptor za LsbB, bakteriocin koji se sintetiše bez lider peptida (podklasa IId) (Uzelac *et al.*, 2013).

S obzirom na veliku raznolikost bakteriocina u pogledu strukture, smatra se da postoje mnogi receptori koji još nisu definisani, a rezultatima do kojih se došlo u ovom doktoratu dat je određen doprinos ovoj naučnoj oblasti.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. BAKTERIJE MLEČNE KISELINE

2.1.1. Opšte karakteristike bakterija mlečne kiseline

Bakterije mlečne kiseline (BMK) obuhvataju heterogenu grupu Gram-pozitivnih bakterija koje proizvode mlečnu kiselinu kao glavni proizvod fermentativnog metabolizma. To su anerobne ili fakultativno anaerobne bakterije, što im omogućava da naseljavaju veoma različite ekološke niše (Michaela *et al.*, 2009). BMK se u zavisnosti od metabolizma (glikoliza ili pentoza fosfatni put) mogu podeliti na homofermentativne i heterofermentativne, odnosno one kojima je krajnji proizvod metabolizma mlečna kiselina i one koje pored mlečne kiseline proizvode i druge proizvode fermentacije (Klerrebezem and Hugenholtz, 2003). Metabolička aktivnost BMK tokom procesa fermentacije utiče, pre svega, na trajnost proizvoda jer snižavanje pH sredine kao posledica njihovog metabolizma ima značajnu ulogu u konzervisanju hrane. Pored komponenti koje nastaju kao posledica homofermentativnog ili heterofermentativnog metabolizma, veliki broj BMK proizvode antimikrobne komponente kao što su: organske kiseline (Earnshaw, 1992), diacetil i acetaldehid (Jay, 1982), H₂O₂ (Kandler and Weiss, 1986), masne kiseline (Sanz *et al.*, 1988), piroglutaminska kiselina (Huttunen *et al.*, 1995), rojterin (Axelsson *et al.*, 1989), kao i komponente proteinske prirode koje se nazivaju bakteriocini, a čija je antimikrobna aktivnost najčešće usmerena na srodne vrste bakterija.

Najznačajniji rodovi BMK su: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* i *Oenococcus*.

2.1.2. Karakteristike soja *Lactococcus lactis*

U prirodi, BMK su široko rasprostranjene kao deo epifitne mikroflore na biljkama, članovi su kompleksnih zajednica mikroorganizama usne duplje, gastrointestinalnog i urogenitalnog trakta. U industriji mleka i fermentisanih

mlečnih proizvoda najčešće se koriste rodovi: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* i *Leuconostoc*.

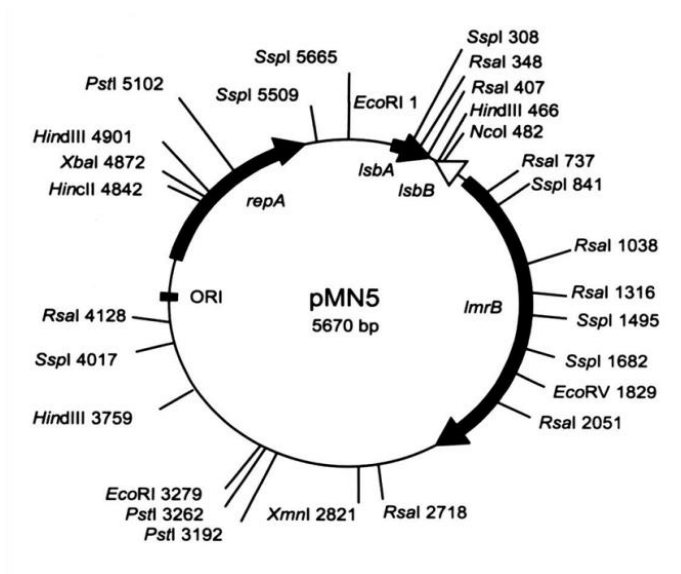
Lc. lactis spada u grupu Gram-pozitivnih bakterija, karakterističnog sfernog oblika, prosečne dužine od 1,5 μm koje se često povezuju u kraće lance. Ovo su nepokretne, nesporogene i nepatogene bakterije koje imaju značajnu ulogu u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda. Razlikuju se dve podvrste *Lc. lactis* subsp. *lactis* i *Lc. lactis* subsp. *cremoris* koje se koriste u proizvodnji mekog odnosno tvrdog sira. Sojevi unutar vrste *Lc. lactis* kod kojih je prisutan homofermentativni metabolizam, koriste se u proizvodnji različitih fermentisanih proizvoda, ali pre svega sira i jogurta. Pored industrijske primene, soj *Lc. lactis* može služiti kao odličan model sistem za izučavanje metabolizma, fiziologije, genetike i molekularne biologije BMK. U prirodi se najčešće nalazi na površini biljaka ili životinja, kao i u gastrointestinalnom traktu životinja (De Vuyst and Vandamme, 1994).



Slika 1. Soj *Lc. lactis*: morfologija soja na čvrstoj podlozi

2.1.3. Karakteristike prirodnog izolata *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5

Prirodni izolat, soj *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5 izolovan je iz autohtonog belog sira korišćenjem standardnih mikrobioloških metoda izolacije BMK (Gajic *et al.*, 1999). Ovaj soj poseduje pet plazmida, pri čemu se na jednom od plazmida (pMN5; 5,67 kb) nalazi strukturni gen *lsbB* koji kodira sintezu bakteriocina LsbB, dok je gen za sintezu laktokocina B lociran na plazmidu pMN80 (Gajic *et al.*, 2003; Kojic *et al.*, 2006). *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5 je čišćen od plazmida korišćenjem subletalne temperature i subletalne koncentracije novobiocina (Kojic *et al.*, 2006; Kojic *et al.*, 2005). Nakon eksperimenata čišćenja plazmida, dobijeni su različiti derivati u pogledu broja plazmida koje su zadržali, dok je potpunim čišćenjem od svih pet plazmida dobijen derivat BGMN1-596. Transformacijom očišćenog derivata BGMN1-596 pMN5 plazmidom dobijen je derivat BGMN1-596T koji sintetiše LsbB bakteriocin (Kojic *et al.*, 2006).



Slika 2: Restrikciona mapa cirkularnog plazmida pMN5. Navedena su relevantna restrikciona mesta i njihove pozicije u plazmidu, pozicije relevantnih gena i njihova orijentacija (Kojic *et al.*, 2006)

LsbB je mali bakteriocin, 30 aminokiselina (ak), koji spada u IId podgrupu linearnih nemodifikovanih bakteriocina koji se sintetišu bez N-terminalnog lider peptida. Ovaj bakteriocin ima uzak spektar antimikrobnog delovanja koji je po dosadašnjim saznanjima usmeren samo na laktokokalne ćelije (Gajic *et al.*, 2003). Poslednjih godina je definisan veliki broj bakteriocina koji se sintetišu bez lider peptida, međutim malo se zna o njihovom biosintetskom putu, kao i o njihovom mehanizmu delovanja na senzitivne ćelije (Zendo, 2013).

2.2. BAKTERIOCINI

Većina organizama proizvodi antimikrobne komponente koje predstavljaju deo prirodnog imunog sistema u cilju zaštite od drugih mikroorganizama. Antimikrobne komponente proizvedene od strane eukariotskih ćelija najčešće imaju širok spektar antimikrobnog delovanja, dok većina bakteriocina najčešće pokazuje uzak spektar delovanja, ograničen na srodne vrste bakterija koje se sa proizvođačima bakteriocina bore za istu ekološku nišu. Osnovna razlika između bakteriocina i antibiotika je da su bakteriocini ribozomalno sintetisani peptidi, dok su za sintezu antibiotika odgovorni multi enzimski kompleksi. Za razliku od antibiotika za čije je antimikrobno delovanje potrebna koncentracija u μg , bakteriocini svoje delovanje ispoljavaju u piko- i nano-molarnim koncentracijama, što pokazuje da su oko 100-1000 puta potentniji od eukariotski sintetisanih antimikrobnih komponenti (Nes *et al.*, 1996; Snyder and Worobo, 2014). Iako su antibiotici najznačajnije otkriće 20 veka, danas se javlja problem sve veće rezistencije bakterija na različite antibiotike. To posebno važi za bakterije prisutne u zdravstvenim ustanovama kao što su meticilin rezistentne stafilokoke, *Staphylococcus aureus* (MRSA) kao i vankomicin rezistentne enterokoke (VRE). Ove bakterije su značajne kako zbog njihove izuzetne patogenosti tako i zbog

potencijalnog prenošenja rezistencija horizontalnim genskim transferom. Upravo iz tog razloga su mnoga istraživanja usmerena na definisanje komponenti koje bi bile adekvatna zamena antibiotika, ili bar koje bi imale sinergistički efekat sa njima. Kombinacijom antibiotika sa bakteriocinima mogla bi se smanjiti pojava potencijalnih rezistencija, s obzirom da bi se u ovom slučaju primenjivala antimikrobna jedinjenja sa potpuno različitim mehanizmima delovanja na ćeliju (Diep *et al.*, 2007; Sang and Blecha, 2008). Značajno je istaći da do danas nisu uočena nikakva neželjena dejstva bakteriocina na ljudske ćelije, a ovo se može objasniti niskim koncentracijama kojima deluju na senzitivne ćelije i proteinskom prirodom bakteriocina zbog čega su podložni degradaciji u organizmu čoveka, kao i u drugim ekološkim sredinama u kojima se nalaze. To bi značilo da bakteriocini ne opstaju u spoljašnjoj sredini, a time je i sticanje rezistencija kod bakterija svedeno na minimum, dok sa druge strane pitanje zagađenja životne sredine reziduima nastalim od antibiotika, danas predstavlja veliki problem (Zendo, 2013).

2.2.1. Bakteriocini bakterija mlečne kiseline

Bakteriocini koje proizvode bakterije najčešće imaju antimikrobnu aktivnost usmerenu prema srodnim vrstama bakterija, kako prema BMK tako i prema Gram-pozitivnim bakterijama koje uzrokuju kvarenje hrane kao što su *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Staphylococcus* sp. i *Listeria* sp. Bakteriocini BMK su najčešće temperaturno stabilni, tolerantni na niske pH vrednosti i degraduju se enzimima digestivnog trakta. Zahvaljujući ovim karakteristikama, kao i činjenici da BMK imaju GRAS („Generally Regarded As Safe“) status (okarakterisane su kao sigurne bakterije od FDA, „Food and Drug Administration“), primena njihovih bakteriocina smatra se sigurnom kako u postupku konzervisanja hrane tako i u farmaceutskoj industriji, zbog čega se danas intenzivno izučavaju (de Vuyst and Leroy, 2007).

2.3. KLASIFIKACIJA BAKTERIOCINA

Klasifikacija bakteriocina predstavlja složen proces izbora adekvatnih kriterijuma na osnovu kojih je moguće sve postojeće bakteriocine razdvojiti u klase. Klasifikacija je ranije vršena na osnovu različitih kriterijuma kao što su: organizam koji produkuje bakteriocin, veličina peptida, fizičke osobine, hemijska struktura, način delovanja peptida i slično. Intenzivna istraživanja u ovoj oblasti, kao i sve više informacija vezanih za strukturu i mehanizam delovanja bakteriocina dovode do čestih otkrivanja novih bakteriocina, kao i reklasifikacije ovih antimikrobnih jedinjenja.

Godine 1993, Klaenhammer (Klaenhammer, 1993) je predložio klasifikovanje bakteriocina u četiri glavne klase: klasa I - posttranslaciono modifikovani bakteriocini - lantibiotici; klasa II - mali (<10 kDa) termostabilni bakteriocini; klasa III: veliki (>30 kDa) termolabilni bakteriocini i klasa IV - kompleksni bakteriocini koji pored proteinskog dela sadrže i neproteinske komponente. Cotter i saradnici su (Cotter *et al.*, 2005) predložili izmene Klaenhammer-ove klasifikacije za bakteriocine BMK po kojoj se razlikuju samo dve osnovne klase: klasa I - lantibiotici i klasa II - bakteriocini koji ne sadrže lantionin. Klasa III je preimenovana u bakteriolizine, a klasa IV je izbačena. Nakon ove klasifikacije, izmenjene ili dopunjene klasifikacije su predlagali i drugi autori (Martin-Visscher *et al.*, 2009; Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Rea *et al.*, 2011). U daljem tekstu je obrađena klasifikacija bakteriocina koju su 2005. godine predložili Cotter i saradnici, a na koju se i dalje poziva veliki broj naučnika.

2.3.1. Bakteriocini klase I – lantibiotici

2.3.1.1. Klasifikacija bakteriocina klase I

Pod bakteriocinima klase I podrazumevaju su mali peptidi (19-38 ak) koji se karakterišu po tome što sadrže neke neuobičajene aminokiseline kao što su lantionin, β-metillantionin, dehidroalanin i/ili dehidrobutirin u aktivnoj formi molekula (Nagao *et al.*, 2006; Field *et al.*, 2010). Upravo su ove aminokiseline odgovorne za stabilnost bakteriocina klase I prilikom izlaganja visokoj temperaturi i širokom opsegu pH, kao i proteolizi i njihovoj velikoj toleranciji na oksidaciju (Sahl *et al.*, 1995). U zavisnosti od strukture i funkcije, lantibiotici se dele u dve podklase (tipa), tip A i tip B. Za ove bakteriocine je karakteristično da podležu postranslacionoj modifikaciji tokom procesa biosinteze, a geni koji učestvuju u ovom procesu su detaljno okarakterisani (Xie *et al.*, 2004, Nishie *et al.*, 2012). Za lantibiotike tipa A, pokazano je da se postranslaciono modifikuju sa dva enzima LanB i LanC (Wescombe and Tagg, 2003; Knerr and van der Donk, 2012), dok se lantibiotici tipa B modifikuju jednim enzimom iz grupe LanM.

Tip A obuhvata pozitivno naelektrisane fleksibilne molekule, gde spadaju nizin koji produkuje *Lc. lactis*, Pep 5 koji produkuje *Staphylococcus epidermidis* i streptin koga produkuje *Streptococcus pyogenes* (Wescombe and Tagg, 2003). Tip B uključuje globularne i ne-naelektrisane lantibiotike kao što je mersakidin koga produkuje *Bacillus* sp. (Altena *et al.*, 2000). Pored navedenih bakteriocina u tip B spadaju i dvokomponentni bakteriocini lakticin 3147, plantaricin W i haloduracin (McClerren *et al.*, 2006; McAuliffe *et al.*, 2000; Holo *et al.*, 2001). Lantibiotici tipa A mogu se dalje podeliti na AI i AII podgrupe s obzirom na razlike u biosintetskim putevima i razlike u postranslacionim modifikacijama. Kompleksna struktura i stalno otkrivanje novih bakteriocina ove klase zahteva česte izmene u njihovoj klasifikaciji, pa su tako Chatterjee i saradnici (Chatterjee *et al.*, 2005) tip AI podelili u tri podgrupe. Guder i

saradnici (Guder *et al.*, 2000) predlažu podelu lantibiotika u 8 podgrupa prema primarnom aminokiselinskom sastavu, dok Twomey i saradnici (Twomey *et al.*, 2002) predlažu podelu u 6 podgrupa na osnovu sličnih kriterijuma. Klasifikacijom Bonelli-ja i saradnika (Bonelli *et al.*, 2006) bakteriocini klase I dele se na četiri podgrupe s obzirom da mnogi novi lantibiotici poseduju karakteristike koje su između tipa A i B. Danas je okarakterisano više od 40 lantibiotika, i na osnovu njihovih fizičko-hemijskih osobina može se zaključiti da je ova grupa bakteriocina mnogo raznovrsnija nego što se ranije smatralo.

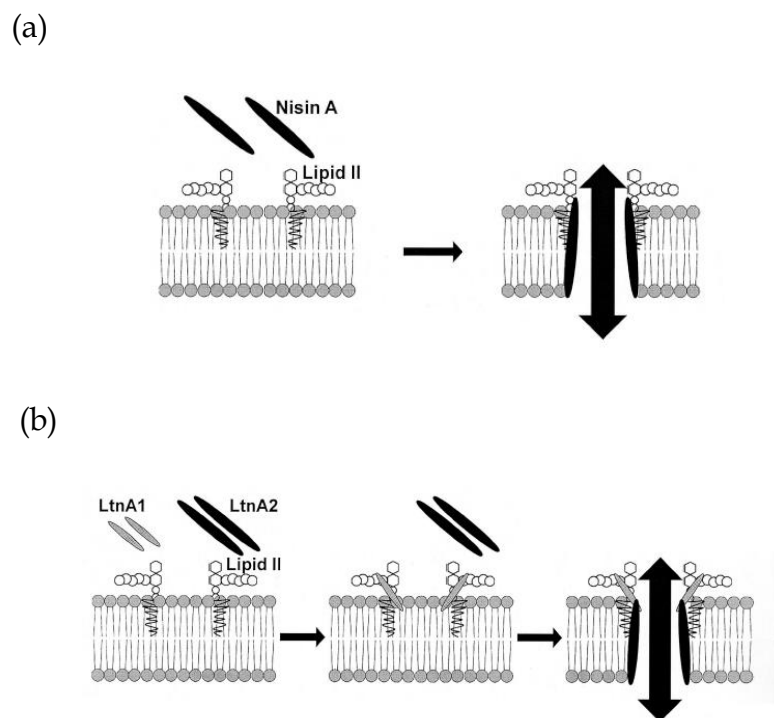
2.3.1.2. Geni uključeni u biosintezu lantibiotika

Geni odgovorni za biosintezu lantibiotika najčešće su lokalizovani na plazmidima ili mobilnim genetičkim elementima i organizovani su u okviru operona. Kompleks koji determiniše biosintezu lantibiotika sastoji se od gena koji kodiraju prepeptid lantibiotika, enzima za modifikaciju prepeptida, sistema za transport i imunog proteina. Takođe, uključeni su i određeni geni za regulaciju biosinteze. Aktivnost lantibiotika je najčešće određena samo jednim peptidom, međutim poznato je da postoje i dvopeptidni lantibiotici gde je za potpunu aktivnost ovakvog bakteriocina potrebno prisustvo oba peptida, a geni koji kodiraju ove peptide nalaze se u okviru istog operona. Imuni proteini predstavljaju sistem samozaštite bakterije od bakteriocina koga produkuje. Do sada su okarakterisana dva glavna mehanizma kojima se obezbeđuje imunost na bakteriocin. Prvi mehanizam čini imuni protein koji je transmembranski lociran i dovoljan je da obezbedi imunost na sopstveni bakteriocin (Nes and Holo, 2000). Drugi mehanizam podrazumeva ABC transportni sistem i transmembranski lociran imuni protein koji obezbeđuju potpunu zaštitu ćelije proizvođača bakteriocina (McAuliffe *et al.*, 2001). Za bakteriocine klase I, karakteristično je prisustvo jednog ili oba mehanizma zaštite (Stein *et al.*, 2005). Kod nizina je pokazano da je potpuna imunost ćelije na bakteriocin omogućena jedino u prisustvu imunog proteina i ABC transportera. Transport lantibiotika

omogućen je različitim vrstama ABC transportera, koji se razlikuju u zavisnosti od sekvence N-terminalnog lidera prepeptida lantibiotika, s obzirom da je transport ove grupe bakteriocina usko povezan sa obradom N-terminalnog lider peptida i modifikacijom prepeptida.

2.3.1.3. Mehanizam delovanja lantibiotika

Vezivanje za lipid II komponentu (prekursor u sintezi ćelijskog zida) je osnov mehanizma delovanja lantibiotika. Vezivanjem za lipid II komponentu inhibira se sinteza ćelijskog zida, a takođe ova komponenta može služiti kao specifičan vezujući molekul prilikom formiranja pora. Kombinovanje dva različita mehanizma delovanja bakteriocina u kojima je ciljani molekul isti, predstavlja ove molekule moćnim antimikrobnim sredstvom, a kao rezultat je delovanje u nanomolarnim koncentracijama. Mnogi lantibiotici, uključujući nizin, lakticin 3147 i mersakidin su ekstremno potentni i imaju antimikrobnu aktivnost usmerenu na veliki broj raznovrsnih Gram-pozitivnih bakterija uključujući patogene rezistentne na antibiotike, patogene prisutne u hrani kao i bakterije koje izazivaju kvarenje namirnica (Wiedemann *et al.*, 2001; Hyde *et al.*, 2006). Način delovanja nizina A je dobro okarakterisan. Naime, nizin A deluje kombinacijom dva mehanizma, formira pore u membrani i inhibira biosintezu ćelijskog zida. Nukacin ISK-1 i mersakidin se takođe vezuju za lipid II, međutim ovi bakteriocini ne pravi pore u membrani već samo inhibiraju biosintezu peptidoglikana ciljane ćelije, gde je mehanizam delovanja sličan vankomicinu koji se takođe vezuje za lipid II (Asaduzzaman *et al.*, 2009; Islam *et al.*, 2012). Dvopeptidni lantibiotici sadrže α komponentu (prvi peptid) koja se vezuje sa lipid II, i β komponentu (drugi peptid) koja se vezuje za kompleks α komponenta/lipid II, gde nastanak trokomponentnog kompleksa dovodi do stvaranja pora u membrane ćelije (Morgan *et al.*, 2005).



Slika 3. Mehanizam delovanja lantibiotika: (a) N-terminalni kraj nizina A se vezuje za lipid II komponentu, gde dolazi do permeabilizacije membrane, što rezultuje formiranjem pora i curenjem ćelijskog sadržaja. (b) LtnA1 komponenta dvopeptidnog bakteriocina, lakticina 3147 intereguje sa lipid II komponentom, i nastaje kompleks LtnA1-lipid II. Za ovaj kompleks se potom vezuje druga komponenta LtnA2 a nastanak trokomponentnog kompleksa dovodi do stvaranja pora (Nishie *et al.*, 2012)

2.3.2. Bakteriocini klase II

2.3.2.1. Klasifikacija bakteriocina klase II

U klasu II spadaju mali (<10 kDa), termostabilni nelantioninski bakteriocini koji se postranslaciono ne modifikuju, ili se minimalno modifikuju enzimima. Ovi bakteriocini su takođe aktivni u nanomolarnim koncentracijama, gde permeabilizuju ćelijsku membranu i na taj način izazivaju smrt ćelije. Velika heterogenost ove klase bakteriocina čini klasifikaciju komplikovanom, mada je nekoliko grupa autora predlagalo različite klasifikacije. Na osnovu

klasifikacije Cottera i saradnika (Cotter *et al.*, 2005), bakteriocini klase II dele se na četiri podklase (IIa, IIb, IIc i IId).

Bakteriocini podklase IIa

Pod bakteriocinima podklase IIa podrazumevaju se bakteriocini slični pediocinu ("pediocin-like bacteriocins"), koji se karakterišu uskim spektrom delovanja i jakim antimikrobnom aktivnošću protiv jednog od najčešćih patogena hrane, *Listeria monocytogenes*. Prvi otkriveni bakteriocin iz ove klase koji je detaljno proučavan je pediocin PA-1 koga sintetise *Pediococcus acidilactici* (Motlagh *et al.*, 1992; Marugg *et al.*, 1992). Danas je poznato da postoji čitava grupa bakteriocina slična pediocinu kao što su: sakacin A (Holck *et al.*, 1992a), leukocin A (Hastings *et al.*, 1991), mezentericin Y105 (Hechard *et al.*, 1992), i drugi. Svi bakteriocini ove podklase sadrže konzerviranu N-terminalnu sekvencu YGNGVXCXXXVXV (gde je X bilo koja aminokiselina) (Nieto-Lazano, 1992; Eijsink *et al.*, 1998) i formiraju jedan ili dva disulfidna mosta na N-terminusu. C-terminalni domen je manje konzerviran i upravo su u ovom domenu nađene najveće razlike u strukturi bakteriocina podklase IIa, što i doprinosi značajnim varijacijama u njihovom antimikrobnom spektru delovanja. Ovaj domen takođe služi kao osnova za definisanje preostale tri podklase bakteriocina klase II (Johnsen *et al.*, 2005a).

Bakteriocini podklase IIb

Bakteriocini podklase IIb su dvo-peptidni bakteriocini, koji se sastoje od dva nemodifikovana peptida. Potpuna aktivnost ovih bakteriocina ostvaruje se samo kada su prisutna oba peptida. Prilikom testiranja pojedinačnih peptida, oni mogu imati znatno smanjenu aktivnost, izuzetak su laktokokcin G (Nissen-Meyer *et al.*, 1992) i laktocin 705 (Cuozzo *et al.*, 2000) čiji pojedinačni peptidi nemaju antimikrobnost. Svaki peptid je kodiran zasebnim genom,

mada su oba gena u okviru istog operona. Oba peptida imaju isti protein za imunost koji obezbeđuje potpunu imunost ćelije na ovaj bakteriocin. Laktokokcin G (Nissen-Meyer *et al.*, 1992) je prvi otkriveni dvokomponentni bakteriocin čija aktivnost zavisi od oba peptida, odnosno komponenata α i β . Pojedinačni peptidi se mogu vezati za senzitivnu ćeliju ali antimikrobnu aktivnost ispoljavaju tek kada su oba prisutna u odnosu 1:1. Kompleks ova dva peptida najverovatnije vrši narušavanje potencijala membrane ćelije, curenje jona i smanjenje koncentracije ATP-a u ćeliji, što na kraju dovodi do smrti ciljne ćelije (Garneau *et al.*, 2002). Pored laktokokcina G, još su u podklasu IIb svrstani i bakteriocini: laktacin F (Allison *et al.*, 1994), plantaricin EF i JK (Diep *et al.*, 1996), plantaricin S (Jimenez-Diaz *et al.*, 1995), laktokokcin M/N (van Belkum *et al.*, 1991a), acidocin J1132 (Tahara *et al.*, 1996), ABP118 (Flynn *et al.*, 2002), plantaricin NC8 (Maldonado *et al.*, 2003), enterocin 1071 (Franz *et al.*, 2002), laktokokcin Q (Zendo *et al.*, 2006) i drugi.

Bakteriocini podklase IIc

Pod bakteriocinima podklase IIc, podrazumevaju se bakteriocini čiji su C- i N-terminalni krajevi kovalentno povezani, što rezultira u cirkularnoj strukturi ovih bakteriocina (Kawai *et al.*, 2004; Maqueda *et al.*, 2004). Enterocin AS-48 koji proizvodi veliki broj enterokoka je prvi otkriveni bakteriocin iz ove podklase (Galvez *et al.*, 1991). U dobro okarakterisane bakteriocine podklase IIc spadaju gasericin A (Kawaii *et al.*, 1998) i cirkularin A (Kawai *et al.*, 2004), a pored njih poznati su još i: karnociklin A (Martin-Visscher *et al.*, 2008), subtilozin (Babasaki *et al.*, 1985), uberolizin (Wirawan *et al.*, 2007), leukocilizin (Masuda *et al.*, 2011) i laktociklicin Q (Sawa *et al.*, 2009).

Bakteriocini podklase II_d

Podklasa II_d obuhvata veoma heterogenu grupu bakteriocina koje proizvode sojevi izolovani iz različitih ekoloških niša. Tu spadaju linearni peptidi koji nisu slični pediocinu. Najbolje okarakterisan predstavnik podklase II_d je laktokokcin A. U okviru pomenute podklase, pored bakteriocina BMK, svrstani su i bakteriocini izolovani iz *Staphylococcus* sp., *Weissella* sp. i *Propionibacterium* sp. (Heng *et al.*, 2007; Nissen-Meyer *et al.*, 2009). II_d podgrupa je veoma raznovrsna i postoji nekoliko predloga za poddelu unutar grupe u zavisnosti od sekvence lider peptida. Među bakteriocinima podklase II_d mogu se razlikovati: 1. *sec*-zavisni bakteriocini; 2. bakteriocini bez lider peptida ("leaderless bacteriocins") i 3. ostali bakteriocini klase II_d. Poznati bakteriocini ove klase su bakteriocin L50 i enterocin Q (Cintas *et al.*, 1998), kao i aureocin A70 (Netz *et al.*, 2001), a koji se sintetišu bez N-terminalnog lider peptida. Takođe, u ovu grupu spada i LsbB bakteriocin koga sintetiše *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5 a na čijem je mehanizmu delovanja, proteinskoj strukturi i regulaciji genske ekspresije rađeno u okviru ove disertacije.

2.3.2.2. Geni uključeni u biosintezu bakteriocina klase II

U biosintezu bakteriocina su pored strukturnog gena koji kodira prekursor bakteriocina, uključeni i geni koji kodiraju protein za imunost, ABC transporter i pomoćni protein (Nes *et al.*, 1996; Skaugen *et al.*, 2003). Kod bakterija koje sintetišu više bakteriocina, npr. *Lactobacillus plantarum* C11 (plantaricin EF i plantaricin JK) (Diep *et al.*, 1996) geni se najčešće nalaze u okviru istog operona i dele isti imuni i transportni sistem. Takođe, geni za sintezu bakteriocina mogu biti različito locirani (npr. enterocin P, L50 i Q) (Cintas *et al.*, 2000). Mnogi bakteriocini klase II se sintetišu kao prekursori bakteriocina sa N-terminalnim lider peptidom, najčešće dvoglicinskog tipa (-Gly²-Gly¹). Svi bakteriocini koji poseduju lider peptid navedenog tipa

transportuju se ABC transporterom uz pomoćni protein čija funkcija još nije potpuno definisana. Isecanje lider peptida se vrši tokom eksporta bakteriocina pomoću komponenti bakteriocin-transportnog ABC sistema ili u ređim slučajevima pomoću generalnog sekretornog puta (Cintas *et al.*, 1997; Worobo *et al.*, 1995). Nekoliko bakteriocina klase II sekretuje se generalnim sekretornim putem (sec) (van Wely *et al.*, 2001). Ovde spadaju bakteriocini: divergicin A (Worobo *et al.*, 1995), acidocin 8912 (Kanatani *et al.*, 1995), bakteriocin 31 (Tomita *et al.*, 1996), enterocin P (Cintas *et al.*, 1997), laktokokcin 972 (Martinez *et al.*, 1999), propionicin T1 (Faye *et al.*, 2002), hiracin JM79 (Sanchez *et al.*, 2007) i drugi.

Geni uključeni u sintezu bakteriocina klase II najčešće se nalaze na plazmidima ili mobilnim genetičkim elementima čime se objašnjava prisustvo istih ili sličnih bakteriocina u različitim vrstama bakterija, npr. u grupi bakteriocina sličnih pediocinu, dva ista bakteriocina kurvacin A i sakacin A nađeni su u različitim vrstama, kod *Lactobacillus curvatus* odnosno *Lactobacillus sakei*. Takođe, poznati su i bakteriocini čiji geni nisu plazmidno locirani kao što su: enterocin A, divercin V41, sakacin P i karnobakteriocin B2 i BM1 (Aymerich *et al.*, 1996; Huhne *et al.*, 1996; Metivier *et al.*, 1998; Quadri *et al.*, 1997). Zanimljivo je da kod nekih bakteriocina klase II geni koji su uključeni u sintezu bakteriocina, ne samo da nisu locirani u okviru istog operona, već se nalaze na različitim plazmidima kao što je slučaj kod *Pediococcus parvulus* ATO77, *Pediococcus pentosaceus* S34 i *Lb. plantarum* WHE92 (Miller *et al.*, 2005).

2.3.2.3. Mehanizam delovanja bakteriocina klase II

Način delovanja bakteriocina zavisi od primarne strukture njihovih peptida, tako da bakteriocini koji pripadaju istoj klasi ispoljavaju i slične mehanizme delovanja s obzirom da je primarna struktura peptida uzeta kao osnov klasifikacije bakteriocina. Nekoliko studija je pokazalo da bakteriocini klase II deluju tako što vrše permeabilizaciju ćelijske membrane, pri čemu je

smrt ćelije prouzrokovana curenjem malih molekula iz ćelije. Jedno od glavnih pitanja tokom poslednjih godina istraživanja mehanizma jeste da li je neophodno prisustvo receptora na membrani senzitivne ćelije kako bi bakteriocini bili aktivni, i ako jeste koji su to receptori? Odgovor na ovo pitanje je od velikog značaja kako bi se razumeo mehanizam kojim bakteriocini deluju, potom kako se razvija rezistencija, i kako bi se potencijalno ovakve antimikrobne komponente upotrebile u borbi protiv patogenih mikroorganizama.

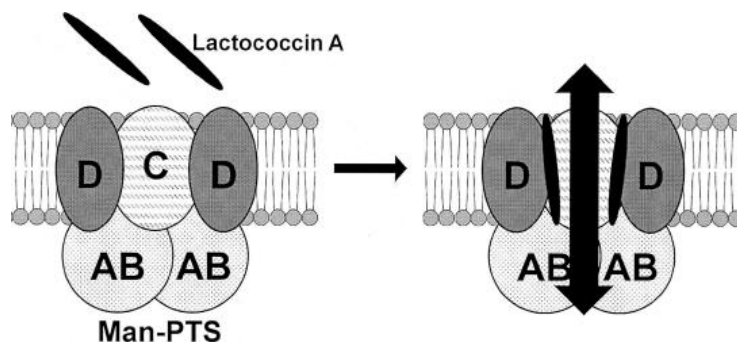
Bakteriocini podkalse Ila su najviše izučavani, gde se pokazalo da oni koristi komponente man-PTS sistema kao receptore na senzitivnim ćelijama, a svoju antimikrobnu aktivnost ostvaruju narušavanjem membranskog potencijala senzitivne ćelije (Ramnath *et al.*, 2004; Diep *et al.*, 2007; Kjos *et al.*, 2010). *mpt* operon kodira manoznu permeazu EII^{Man} koja je deo fosfotransferaznog sistema (PTS) uključenog u transport i fosforilaciju šećera i kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Postma *et al.*, 1993).

Dvokomponentni bakteriocini podklase I Ib, kod kojih je neophodno prisustvo oba peptida za potpunu antimikrobnu aktivnost permeabilizuju ćelijsku membranu, gde dolazi do curenja ćelijskih komponenata kao što su jednovalentni katjoni, fosfati i ATP (Cuozzo *et al.*, 2003) i na taj način izazivaju smrt ćelija (Oppegard *et al.*, 2007).

Slično kao i kod drugih bakteriocina, cirkularni bakteriocini klase I Ic permeabilizuju membranu ciljne ćelije pri čemu dolazi do narušavanja membranskog potencijala i curenja ćelijskih komponenti (van Belkum *et al.*, 2011). Ono što je karakteristično za bakteriocine ove grupe kao što su enterocin AS-48, gasicin A, subtilozin A i karnocilin A jeste da mogu ispoljiti svoju aktivnost bez prisustva bilo kakvog receptora. Enterocin AS-48 stvara ne-selektivne pore, što uzrokuje curenje malih molekula, dok karnocilin A formira anjon-selektivne pore što izaziva depolarizaciju membrane (Gong *et al.*, 2009).

Velika raznovrsnost bakteriocina klase I Id gde su svrstani neklasifikovani, jednopeptidni bakteriocini koji se razlikuju od pediocina

uslovljava i raznovrsnost u mehanizmu koji ovi bakteriocini koriste prilikom delovanja na ciljne ćelije. Za laktokokcin A i laktokokcin B je pokazano da slično bakteriocinima podklase IIa koriste man-PTS komponente kao membranske receptore. man-PTS sistem je sačinjen od četiri domena IIA, IIB, IIC i IID organizovanih u dve do četiri subjedinice. Citoplazmatski domen koji je uključen u fosforilaciju čine IIA i IIB domeni, dok su IIC i IID domeni uključeni u transport. Antimikrobna aktivnost se ostvaruje permeabilizacijom membrane, a potom curenjem ćelijskog sadržaja kroz prethodno narušenu strukturu membrane. Iako ovi bakteriocini koriste isti mehanizam prilikom delovanja oni ne poseduju homologiju kako među sobom tako i sa bakteriocinima podklase IIa. Takođe, lantibiotici koriste samo komponentu IIC man-PTS sistema kao receptor, dok laktokokcini A i B koriste dva membranska proteina IIC i IID (Diep *et al.*, 2007). Rezultati navedenog istraživanja ukazuju da postoji opšti mehanizam koji uključuje specifičnu interakciju između man-PTS i jednopeptidnih bakteriocina. Takođe, formiranje ovog kompleksa ima nepovoljan efekat na rast bakterija jer ugrožava transport manoze i glukoze čime je izazvano smanjenje rasta ćelije. Lakticin Q, koji spada u bakteriocine koji se sintetišu bez lider peptida, ne zahteva prisustvo receptora, a mehanizam delovanja koji koristi zasniva se na depolarizaciji membrane ciljne ćelije (Yoneyama *et al.*, 2008; Yoneyama *et al.*, 2009). Raznovrsnost ove grupe uočava se i u mehanizmu delovanja laktokokcina 972 (lcn972) koji je prvi identifikovani ne-lantibiotik koji specifično intereaguje sa lipid II komponentom (Martinez *et al.*, 2008). Ovaj bakteriocin inhibira aktivnost dva enzima, PBP2 i FemX koji koriste lipid II kao supstrat.



Slika 4: Mehanizam delovanja bakteriocina klase II. Laktokokcin A se vezuje za IIC I IID komponente man-PTS sistema locirane na membrani senzitivne ćelije, dok komponenta IIAB koja je u citoplazmi ne učestvuje u vezivanju. Vezivanjem laktokokcina A za komponente dolazi do permeabilizacije membrane, što prouzrokuje curenje intraćelijskih komponenti (Nishie *et al.*, 2012)

2.3.3. Bakteriolizini

Bakteriolizini predstavljaju velike (>30 kDa), temperaturno nestabilne antimikrobne peptide. Njihov mehanizam delovanja se razlikuje od ostalih bakteriocina s obzirom da se zasniva na lizi ćelije zbog čega se ova jedinjenja i nazivaju litičkim proteinima. Različiti domeni ovih bakteriocina su odgovorni za translokaciju, vezivanje za receptor i ostvarivanje inhibitornog dejstva. Bakteriolizini nemaju uvek imuni protein, nego se njihova imunost zasniva na modifikaciji ćelijskog zida bakterijske ćelije koja sintetiše bakteriocin. U bakteriolizine spadaju: helveticin J (Joerger and Klaenhammer, 1986), zoocin A (Simmonds *et al.*, 1997), enterolizin A (Hickey *et al.*, 2003), milericin B (Beukes *et al.*, 2000) i linocin M18 (Valdes-Stauber and Scherer, 1994).

2.4. IMUNI PROTEINI BAKTERIOCINA

Poznato je da bakterije koje sintetišu bakteriocine, takođe sintetišu i imune proteine, za koje se smatra da su visoko specifični za svaki bakteriocin. Uloga imunih proteina je samozaštita bakterije od antimikrobnog delovanja bakteriocina koji produkuje.

Kada je reč o lantibioticima, pokazano je da se samozaštita bakterija obezbeđuje ABC transporterom (proteinom LanFEG) i specifičnim imunim proteinima LanI ili LanH (Willey and van der Donk, 2007). LanFEG proteini odstranjuju lantibiotike vezane za membranu i na taj način štite ćeliju od sopstvenog bakteriocina. Takođe je pokazano da proteini LanI i LanH ne mogu sami da obezbede imunost ćelije već je to moguće jedino u prisustvu LanFEG proteina (Okuda *et al.*, 2008).

Imuni proteini klase IIa bakteriocina pokazuju visok nivo specifičnosti obezbeđujući imunost samo na određeni bakteriocin ili eventualno na blisko srodne bakteriocine klase IIa (Fimland *et al.*, 1998; Johnsen *et al.*, 2005b). LciA je protein koji obezbeđuje imunost ćeliji koja sintetiše laktokokcin A, bakteriocin koji koristi komponente man-PTS sistema kao receptore. Pokazano je da LciA formira stabilan kompleks sa receptorom, i da na taj način ne dozvoljava vezivanje bakteriocina. Ovaj kompleks se formira samo u prisustvu bakteriocina (Diep *et al.*, 2007). Od bakteriocina klase IIb najviše je rađeno na laktokokcinu G, gde se pretpostavlja da se imuni protein za ovaj bakteriocin takođe vezuje za receptor laktokokcina G i na taj način blokira antimikrobnu aktivnost bakteriocina (Nissen-Mejer *et al.*, 2010). Za bakteriocine klase IIc i IID pretpostavlja se da se imunost ostvaruje prisustvom malih hidrofobnih peptida, ili proteina sličnih ABC transporteru.

2.5. REZISTENCIJA BAKTERIJA NA BAKTERIOCINE

Kako bi eventualna rezistencija bakterija na bakteriocine bila isključena, neophodno je razumevanje mehanizma delovanja i razvoja rezistencije bakterija na bakteriocine.

Robichon i saradnici (Robichon *et al.*, 1997) su pokazali da mutirani soj *L. monocytogenes* koji nosi inaktiviran *rpoN* gen (koji kodira alternativni sigma faktor-sigma⁵⁴- δ^{54}) pokazuje rezistenciju na delovanje mezentericina Y105, a kasnije je pokazano da i u slučaju vrste *Enterococcus faecalis* inaktivacija *rpoN* gena dovodi do pojave rezistentnih varijanti (Dalet *et al.*, 2000). Na taj način je pokazano da je *rpoN* gen, bilo direktno ili indirektno, uključen u generalni mehanizam senzitivnosti na bakteriocine klase IIa. Takođe je pokazano da direktna mutageneza *mpt* operona, koji je pod kontrolom faktora δ^{54} , i kod *L. monocytogenes* i kod *E. faecalis* dovodi do pojave mutanata rezistentnih na bakteriocine klase IIa. Ekspresija *mpt* operona indukovana je prisustvom glukoze i manoze, a pokazano je da je nivo ekspresije *mpt* operona u korelaciji sa senzitivnošću na bakteriocin što je sugerisalo da je EII^{Man} permeaza ciljani molekul za delovanje bakteriocina podklase IIa (Dalet *et al.*, 2001; Hechard *et al.*, 2001). Heterologom ekspresijom *mpt* operona kao i samog *mptC* gena, poreklom iz *L. monocytogenes*, u rezistentnom soju *Lc. lactis* potvrđeno je da je *mpt* operon direktno odgovoran za senzitivnost tako što je nakon indukcije *mpt* operona rezistentni soj *Lc. lactis* postao senzitivan na različite bakteriocine klase IIa. Pokazano je da je ekstracelularna petlja subjedinice IIC man-PTS sistema odgovorna za specifično prepoznavanje bakteriocina klase IIa, dok je za laktokokcin A, koji pripada klasi IID bakteriocina, pokazano da interaguje i sa subjedinicom IIC (PtnC) i IID (PtnD) (Kjos *et al.*, 2010; Kjos *et al.*, 2011). Stepenn rezistencije na bakteriocine varira u zavisnosti od mehanizama koji je obezbeđuju, tako je kod *L. monocytogenes* uočeno da je nizak stepenn rezistencije posledica lipidne kompozicije membrane, dok se visok nivo rezistencije ostvaruje inaktivacijom *mpt* operona.

2.6. TRANSPORT BAKTERIOCINA

Bakteriocini se najčešće transportuju kroz membranu pomoću ABC transportera koji predstavljaju deo ATP-vezujućih kaseti, i pomoćnog proteina. ABC-transporteri poseduju N-terminalni proteolitički domen (familija cisteinskih proteinaza), hidrofobni transmembranski domen i ATP-vezujući domen na C-terminusu (Havarstein *et al.*, 1995). Prilikom eksporta bakteriocina ABC-transporter uklanja lider peptid sa N-terminusa prekursora bakteriocina na poziciji dvostrukog glicina (-Gly⁻²-Gly⁻¹) i transportuje obrađen bakteriocin kroz ćelijsku membranu. Geni koji kodiraju ABC-transportere najčešće su deo bakteriocinskog operona, mada mogu biti lokalizovani i u okviru zasebnog operona u blizini strukturnog gena za bakteriocin, dok su geni koji kodiraju pomoćne proteine najčešće lokalizovani u blizini gena za ABC-transportere.

Razlikujemo dve velike grupe bakteriocina za čiji transport je neophodno prisustvo ABC-transportera: a) bakteriocini sa lider peptidom dvoglicinskog tipa (klasa II bakteriocina i neki lantibiotici) (Havarstein *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996) i b) bakteriocini sa drugačijim lider peptidom koji nije *sec*-zavisan (neki lantibiotici). U slučaju ABC-transportera koji vrše eksport lantibiotika sa drugačijim tipom lider peptida, uklanjanje lider peptida se ostvaruje delovanjem serinske proteaze (npr. NisP proteaza u nizinskom operonu) (van der Meer *et al.*, 1993).

Najbolje okarakterisan pomoćni protein je LcnD, uključen u transport laktokokcina (Franke *et al.*, 1996). Varcamonti i saradnici (Varcamonti *et al.*, 2001) su pokazali da LcnD u ćelijskoj membrani ostvaruje interakciju sa LcnC proteinom (Hly-B familija ATP-vezujućih kaseti), na osnovu čega je definisana grupa transportnih proteina koji su fuzionisani sa membranom.

Pored prethodno opisanih mehanizama transporta bakteriocina okarakterisan je i mali broj bakteriocina klase II čiji se eksport odvija preko generalnog, *sec*-zavisnog, sekretornog sistema u kome učestvuje kompleks Sec proteina. *Sec*-zavisan transport identifikovan je kod klase II bakteriocina kao što

su acidocin B (Leer *et al.*, 1995), divergicin A (Worobo *et al.*, 1995), bakteriocin 31 (Tomita *et al.*, 1996), enterocin P (Cintas *et al.*, 1997), laktokocin 972 (Martinez *et al.*, 1999), listeriocin 743A (Kalmokoff *et al.*, 2001), propionicin T1 (Faye *et al.*, 2002), bakteriocin T8 (de Kwaadsteniet *et al.*, 2006) i hiracin JM79 (Sanchez *et al.*, 2007). Ključnu ulogu u *sec*-zavisnoj translokaciji ima N-terminalna signalna sekvenca, a proteini koji se izlučuju, bivaju usmereni ka membrani gde ih obrađuje signalna peptidaza tokom translokacije kroz membranu (van Wely *et al.*, 2001).

2.7. REGULACIJA PRODUKCIJE BAKTERIOCINA KLASE I I KLASE II

Produkcija bakteriocina klase I i klase II kontrolisana je na transkripcionom nivou "quorum sensing" trokomponentnim regulatornim sistemom. Ovaj sistem čine indukcionni peptid (peptidni feromon), transmembranska histidin kinaza (receptor feromona) i citosolni "response" regulator. Značaj ovog sistema je pokazan kod nizina koga produkuje soj *Lc. lactis* i plantaricina koga produkuje soj *Lb. plantarum* C11. "Quorum sensing" mehanizam zasnovan je na prisustvu indukcionog signala, u ovom slučaju peptida feromona u okruženju. Indukcionni peptid (feromon) je ribozomalno sintetisani peptid prisutan u ćeliji u niskoj koncentraciji koji se u spoljašnju sredinu izbacuje putem ABC-transportera (Nes and Eijsink, 1999; Ennahar *et al.*, 2000). Feromoni su najčešće peptidi slični bakteriocinu, ili sam bakteriocin. Pre aktiviranja, odnosno pre ekspresije gena feromoni se produkuju u maloj količini (niska koncentracija), a kako se broj ćelija povećava feromoni se sve više i više izlučuju u okolinu. Kada koncentracija feromona dostigne određeni nivo u ekstracelularnoj sredini dolazi do aktiviranja transmembranske histidin proteinske kinaze (HPK), što dovodi do autofosforilacije konzerviranog histidina sa citosolne strane transmembranskog proteina. Aktivirana histidin kinaza interaguje sa "response" regulatorom koji funkcioniše kao transkripcioni

aktivator vezivanjem za promotor bakteriocinskog gena, a ujedno aktivirajući i gene koji kodiraju trokomponentni sistem inicirajući pozitivnu povratnu spregu (Nes and Eijsink, 1999; Cho *et al.*, 2001).

Regulacija ekspresije bakteriocina najbolje je objašnjena na primeru plantaricina A (Risoen *et al.*, 1998; Risoen *et al.*, 2001), gde se u sistemu nalaze dva regulatora, PlnC i PlnD. Oba regulatora se vezuju kao dimeri za regulatorne sekvence promotora, ali pokazuju različite efekte; PlnC aktivira ekspresiju gena, dok ih PlnD regulator suprimira. Negativna regulacija ekspresije bakteriocinskih gena, pokazana je i kod bakteriocina klase IIa, sakacina P koga sintetiše *Lb. sake* Lb706.

Sinteza dvokomponentnog bakteriocina citolizina, koga produkuje *E. faecalis* takođe odgovara na "quorum sensing" autoindukciju. U ovom sistemu, produkti dva gena *cylR1* i *cylR2* zajedno negativno regulišu ekspresiju gena za citolizin. Represija se javlja kada jedan od peptida dostigne kritičan nivo u spoljnoj sredini. Sistem produkcije citolizina ne podrazumeva prisustvo histidin kinaze ili "response" regulatora u "quorum sensing" sistemu koji su prisutni kod drugih regulatornih sistema. Pored citolizina, izučavana je regulacija ekspresije dvokomponentnog bakteriocina lakticina 3147, gde je pokazano da je gen koji kodira protein odgovoran za imunost na bakteriocin regulisan na transkripcionom nivou represorom LtnR koji uspostavlja ravnotežu između eksprimiranog imunog proteina i bakteriocina.

Kod Gram-pozitivnih bakterija, široko je rasprostranjena familija Rgg regulatora. Ova familija regulatora je prvi put otkrivena u soju *Streptococcus gordonii*, gde je pokazano da reguliše ekspresiju glukoziltransferaznog gena, *gtfG*. Od tada, veliki broj Rgg-sličnih regulatora je otkriveno. Između ostalih, pokazano je da Rgg-slični regulator, LasX reguliše ekspresiju lantibiotika laktocin S koga produkuje soj *Lb. sakei*, dok je Rgg-sličan regulator, MutR uključen u regulaciju lantibiotika mutacin II koga sintetiše *Streptococcus mutans* (Sulavik and Clewell, 1996; Fujiwara *et al.*, 2000).

2.8. PRIMENA BAKTERIOCINA

U prehrambenoj industriji, godinama unazad se primenjuju hemijski aditivi u cilju očuvanja i konzervisanja prehrambenih proizvoda. Međutim, zbog hemijske prirode konzervanasa i različitih neželjenih dejstava koje oni ispoljavaju sve veći broj potrošača se opredeljuje za prirodne proizvode bez dodataka veštačkih konzervanasa. Upravo je to i podstaklo naučnike širom sveta da rade na pronalasku prirodnih komponenti koje bi se koristile u konzervisanju. Prečišćeni ili parcijalno prečišćeni, nemodifikovani ili modifikovani, bakteriocini svakako imaju veliki potencijal da zbog karakteristika koje ispoljavaju budu primenjeni u konzervisanju prehrambenih proizvoda. Najviše korišćeni bakteriocini u prehrambenoj industriji su svakako nizin čija je upotreba dozvoljena u preko 50 zemalja na svetu (Delves-Broughton, 2005) i pediocin PA1 (Chen and Hoover, 2003). Najpoznatiji proizvod nizina je Nisaplin (*Danisco*, Danish) koji sadrži 2,5% nizina, dok je pediocin PA1 komercijalno dostupan kao ALTA2431 (*Quest International*, Sarasota, Florida) (Rodrigues *et al.*, 2002). Potencijal bakteriocina leži kako u mehanizmu delovanja koji ispoljavaju, a koji se značajno razlikuje od mehanizma delovanja antibiotika, tako i što su aktivni u niskim koncentracijama. Pored toga, do sada ne postoji nijedan zabeležen slučaj toksičnosti bakteriocina bilo za ljude ili životinje, niti je pokazano da dolazi do akumulacije bakteriocina u organizmu (Belguesmia *et al.*, 2010; Rea *et al.*, 2010). Da bi bakteriocini BMK mogli biti upotrebljavani kao biokonzervansi, potrebno je da ispune nekoliko osnovnih uslova: soj koji sintetise bakteriocin mora biti okarakterisan kao bezbedan (GRAS); bakteriocin bi trebao da ima širok spektar delovanja koji uključuje i patogene bakterije, ili pak da bude specifičan za određenu bakteriju; mora biti temperaturno stabilan; da ni u kom slučaju ne ugrožava zdravlje ljudi ili životinja i mora delovati u niskim koncentracijama.

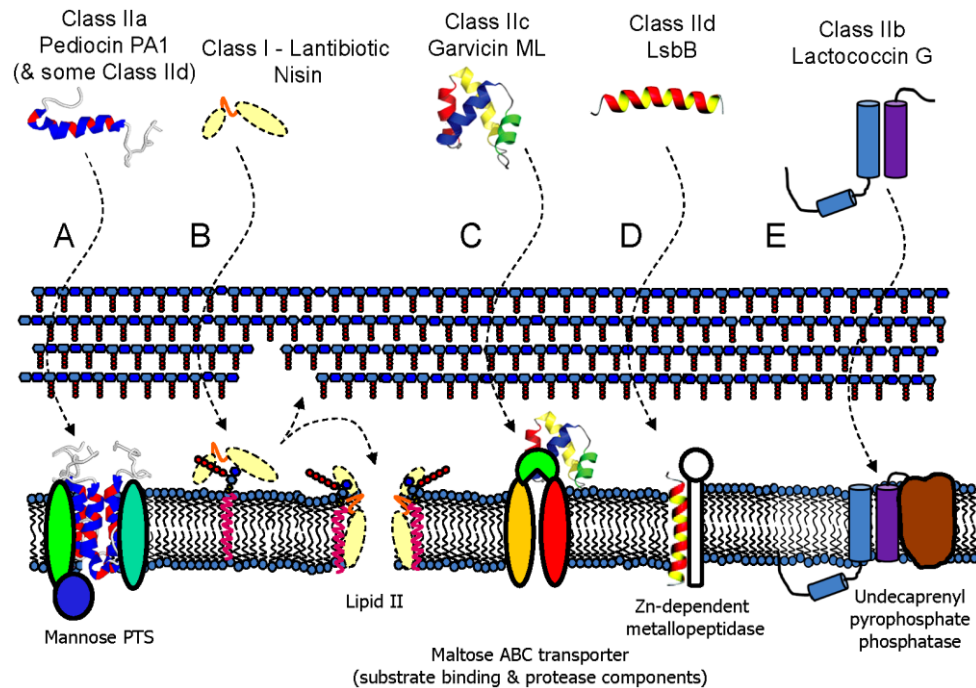
Pored primene bakteriocina u prehrambenoj industriji, bakteriocini kao antimikrobni molekuli, mogli bi se primenjivati i u kliničke svrhe. Pokazano je

da dvopeptidni bakteriocin lakticin 3147 u *in vitro* uslovima ispoljava antimikrobnu aktivnost prema *S. aureus* (MRSA), prema enterokokama (VRE), prema streptokokama (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. mutans*), *Clostridium botulinum* i *Propionibacterium acnes* (Galvin *et al.*, 1999).

2.9. NAJNOVIJA ISTRAŽIVANJA VEZANA ZA RECEPTORE BAKTERIOCINA

Poslednjih godina je sve veći broj studija koje se bave definisanjem mehanizama koje bakteriocini koriste prilikom delovanja na senzitivne ćelije. Ovo je rezultiralo otkrivanjem nekoliko novih mehanizama.

- Gabrielsen i saradnici su 2012. godine (Gabrielsen *et al.*, 2012) definisali maltoza ABC transporter kao receptor za cirkularni bakteriocin, garvicin ML koga proizvodi *Lactococcus garvieae* DCC43 (klasa IIc).
- Uzelac i saradnici su 2013. godine (Uzelac *et al.*, 2013) definisali YvjB protein (Zn-zavisna metalopeptidaza) kao receptor za LsbB bakteriocin koga proizvodi *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, a koji se sintetiše bez lider peptida (klasa IIId).
- Kjos i saradnici su 2014. godine (Kjos *et al.*, 2014) definisali UppP protein (defosforiliše undekaprenil pirofosfat u undekaprenil fosfat) koji ima ulogu receptora za laktokokcin G (Nissen-Meyer *et al.*, 1992), kao i za enterocin 1071 (Franz *et al.*, 2002; Balla *et al.*, 2000) i laktokokcin Q (Zendo *et al.*, 2006).



Slika 5: Predloženi model delovanja (ciljni molekuli na senzitivnoj ćeliji) različitih bakteriocina Gram-pozitivnih bakterija: (A) Podklasa IIa i neki bakteriocini podklase IIc koriste komponente man-PTS sistema; (B) Klasa I (lantibiotici) i laktokokcin 972 koriste lipid II komponentu; (C) garvicin ML (podklasa IIc) koristi maltoza ABC transporter; (D) LsbB bakteriocin (podklasa IIc) koristi YvjB protein (Zn-zavisna metalopeptidaza); (E) laktokokcin G (podklasa IIb) koristi UppP protein (Cotter, 2014)

3. CILJEVI RADA

1. Osnovni cilj ovog istraživanja odnosio se na definisanje mehanizma koji LsbB bakteriocin koristi prilikom delovanja na senzitivnu ćeliju. Pod ovim se podrazumevalo pre svega definisanje receptornog molekula preko koga se LsbB veže za senzitivnu ćeliju i ostvaruje antimikrobni efekat.

Kako bi se postavljeni cilj realizovao planirani su sledeći eksperimentalni pristupi:

- MNNG mutageneza BGMN1-596 soja senzitivnog na LsbB bakteriocin i selekcija rezistentnih mutanata
- Analiza razlika u fermentaciji šećera (API, Biolog test) između LsbB rezistentnih mutanata i divljeg soja BGMN1-596
- Konstruisanje kozmidne biblioteke soja BGMN1-596 (senzitivnog na LsbB bakteriocin)
- Komplementiranje rezistentnih mutanata kozmidnim klonovima
- Sekvenciranje komplementirajućeg kozmida i definisanje gena odgovornog za senzitivnost na LsbB bakteriocin
- Analiza gena odgovornog za senzitivnost na LsbB bakteriocin u svim mutantima
- Indukovanje senzitivnosti u prirodno rezistentnim sojevima ekspresijom gena odgovornog za senzitivnost na LsbB bakteriocin (heterologa ekspresija)
- Sekvenciranje celokupnih genoma sojeva BGMN1-596 i LsbB rezistentnih mutanata dobijenih MNNG mutagenezom i uporedna analiza sekvenci

2. Strukturno funkcionalna analiza LsbB bakteriocina podrazumevala je definisanje domenske strukture ovog bakteriocina, kao i regiona koji su direktno i indirektno uključeni u interakciju sa membranskim receptorom. Potom je planirana analiza pojedinačnih aminokiselina značajnih za interakciju bakteriocin/receptor.

Kako bi se postavljeni cilj realizovao planirani su sledeći eksperimentalni pristupi:

- Mesto specifična mutageneza amonokiselina na C-terminusu LsbB bakteriocina
- Zamena C-terminalnog alanina drugim aminokiselinama

3. Pod analizom regulacije ekspresije LsbB bakteriocina podrazumevalo se definisanje regiona na pMN5 plazmidu odgovornog za pojačanu ekspresiju LsbB bakteriocina u BGMN1-596T u odnosu na MG7284/pAZIL-lsbB.

Kako bi se postavljeni cilj realizovao planirani su sledeći eksperimentalni pristupi:

- “Knock-out” svih gena u operonu odgovornih za ekspresiju LsbB bakteriocina
- Kloniranje, heterologa ekspresija i “in-trans” efekat svakog od gena iz operona na ekspresiju LsbB bakteriocina (transkripcioni i translacioni nivo)

4. MATERIJAL I METODE

4.1. BAKTERIJSKI SOJEVI I PLAZMIDI KORIŠĆENI U RADU

Spisak sojeva, mutanata, komplementiranih mutanata i sojeva nosilaca različitih konstrukata korišćenih u ovom radu dat je u tabeli 1.

Tabela 1. Bakterijski sojevi korišćeni u radu

Sojevi korišćeni u radu	Karakteristike sojeva	Izvor soja ili referenca
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>		
IL1403	Derivat soja IL596 očišćen od plazmida, LsbB ^s	(Chopin <i>et al.</i> , 1984)
B464	Derivat soja IL1403 kod koga je deletiran man-PTS, LsbB ^s	(Diep <i>et al.</i> , 2007)
BGMN1-596	Derivat soja <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGMN1-5 očišćen od plazmida	(Gajic <i>et al.</i> , 1999)
BGMN1-596T	Derivat soja BGMN1-596 sa pMN5 plazmidom	(Gajic <i>et al.</i> , 1999)
BGMN1-596R2/12, 16, 22, 23, 27	LsbB ^r mutanti soja BGMN1-596 dobijeni MNNG mutagenezom	Ovo istraživanje
BGMN1-596R3/11, 17, 19, 21, 25	LsbB ^r mutanti soja BGMN1-596 dobijeni MNNG mutagenezom	Ovo istraživanje
BGMN1-596R3/19 pAZILcos/MN2	Komplementiran mutant BGMN1-596R3/19 kozmidom pAZILcos/MN2, LsbB ^s	Ovo istraživanje

BGMN1-596R3/19 pAZIL/ZnMP	Komplementiran mutant BGMN1-596R3/19 kozmidom pAZIL/ZnMP, LsbB ^s	Ovo istraživanje
BGMN1-596SR1	Spontani LsbB ^r mutant	Ovo istraživanje
BGMN1-596SR2	Spontani LsbB ^r mutant	Ovo istraživanje
BGMN1-596/pGhost9/ES	Derivat soja BGMN1-596 transformisan plazmidom pGhost9/ES	Ovo istraživanje
IL1403/ pGhost9/ES	Derivat soja IL1403 transformisan plazmidom pGhost9/ES	Ovo istraživanje
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>		
MG7284	Prt ^r , Lac ⁻ , Bac ^s , Fus ^r , Spc ^r	(Gasson, 1983)
MG7284/pAZIL-lsbB	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL-lsbB	Ovo istraživanje
MG7284/pAZIL/ZnMP	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL/ZnMP	Ovo istraživanje
MG7284/pAZIL/EX	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL-EX	Ovo istraživanje
MG7284/pNZ8150/l sbB	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pNZ8150/l sbB	Ovo istraživanje
MG7284/pNZ8150/l sbB pAZIL/PlsbB-lsbA	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidima pNZ8150/l sbB i pAZIL/PlsbB-lsbA	Ovo istraživanje
MG7284/pNZ8150/l sbB pAZIL/PlsbB-lsbX	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidima pNZ8150/l sbB i pAZIL/PlsbB-lsbX	Ovo istraživanje

MG7284/pNZ8150/l sb Bl pAZIL/Pl sb B-l sb Y	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidima pNZ8150/l sb B i pAZIL/Pl sb B-l sb Y	Ovo istraživanje
MG7284/pNZ8150/l sb Bl pAZIL/Pl sb B-l sb XY	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidima pNZ8150/l sb B i pAZIL/Pl sb B-l sb XY	Ovo istraživanje
MG7284/pNZ8150/l sb BlpAZIL/N	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidima pNZ8150/l sb B i pAZIL/N	Ovo istraživanje
MG7284/pNZ8150/lacZ1	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pNZ8150/lacZ1	Ovo istraživanje
MG7284/pNZ8150/Pl sb B-lacZ1	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pNZ8150/Pl sb B-lacZ1	Ovo istraživanje
MG7284/pNZ8150/Pl sb B-lacZ1l pAZIL/Pl sb B-l sb A	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidima pNZ8150/Pl sb B-lacZ1 i pAZIL/Pl sb B-l sb A	Ovo istraživanje
MG7284/pNZ8150/Pl sb B-lacZ1l pAZIL/Pl sb B-l sb X	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidima pNZ8150/Pl sb B-lacZ1 i pAZIL/Pl sb B-l sb X	Ovo istraživanje
MG7284/pNZ8150/Pl sb B-lacZ1l pAZIL/Pl sb B-l sb Y	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidima pNZ8150/Pl sb B-lacZ1 i pAZIL/Pl sb B-l sb Y	Ovo istraživanje
MG7284/pNZ8150/Pl sb B-lacZ1l pAZIL/Pl sb B-l sb XY	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidima pNZ8150/Pl sb B-lacZ1 i pAZIL/Pl sb B-l sb XY	Ovo istraživanje
MG7284/pNZ8150/Pl sb B-lacZ1l pAZIL/N	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidima pNZ8150/Pl sb B-lacZ1 i pAZIL/N	Ovo istraživanje

MG7284/pAZIL-LsbB-A23	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL-LsbB-A23	Ovo istraživanje
MG7284/pAZIL-LsbB-A24	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL-LsbB-A24	Ovo istraživanje
MG7284/pAZIL-LsbB-A25	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL-LsbB-A25	Ovo istraživanje
MG7284/pAZIL-LsbB-A26	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL-LsbB-A26	Ovo istraživanje
MG7284/pAZIL-LsbB-A27	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL-LsbB-A27	Ovo istraživanje
MG7284/pAZIL-LsbB-A29	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL-LsbB-A29	Ovo istraživanje
MG7284/pAZIL-LsbB-ΔA30	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL-LsbB-ΔA30	Ovo istraživanje
MG7284/pAZIL-LsbB-A30+A31	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL-LsbB-A30+A31	Ovo istraživanje
MG7284/pAZIL-LsbB-A30-V	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL-LsbB-A30-V	Ovo istraživanje
MG7284/pAZIL-LsbB-A30-G	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL-LsbB-A30-G	Ovo istraživanje
MG7284/pAZIL-LsbB-A30-S	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL-LsbB-A30-S	Ovo istraživanje
MG7284/pAZIL-LsbB-A30-P	Derivat soja MG7284 transformisan plazmidom pAZIL-LsbB-A30-P	Ovo istraživanje

Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei*

BGHN14	LsbB ^r soj	(Kojic <i>et al.</i> , 1991)
--------	-----------------------	------------------------------

BGHN14/pAZILSJ/ZnMP	Derivat soja BGHN14 transformisan plazmidom pAZILSJ/ZnMP	Ovo istraživanje
<i>Enterococcus faecalis</i>		
BGZLS10-27	LsbB ^r soj	Laboratorijska kolekcija LMM
BGZLS10-27/pAZIL/ZnMP	Derivat soja BGZLS10-27 transformisan plazmidom pAZIL/ZnMP	Ovo istraživanje
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (ø80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
HB101	F ⁺ <i>hsdS20 (rB⁻mB⁻) supE44 recA13 ara-14 proA2 4 rpsL20(Str^r) xyl-S mtl-ql galK2 lacY1 λ-</i>	(Boyer and Roulland-Dussoix, 1969)
EC101	JM101 koje nose <i>repA</i> gen pWV01 na hromozomu	(Law <i>et al.</i> , 1995)

* Bac^s, senzitivna na bakteriocin; Prt⁻, proteolitički neaktivan; Lac⁻, nema sposobnost fermentacije laktoze; LsbB^s i LsbB^r, senzitivnost odnosno rezistencija na LsbB bakteriocin; LMM, Laboratorija za molekularnu mikrobiologiju, IMGGI, Beograd

Spisak plazmida i kozmida korišćenih u ovom radu dat je u tabeli 2.

Tabela 2. Plazmidi i kozmidi koji su korišćeni u radu

Plazmidi	Karakteristike plazmida	Izvor plazmida
pMN5	Prirodni plasmid soja BGMN1-5	(Kojic <i>et al.</i> , 2006)
pAZIL	7109 bp, Em ^r , "shuttle cloning" vector	(Kojic <i>et al.</i> , 2011)
pAZIL-lsbB	pAZIL koji nosi <i>lsbB</i> gen	Ovo istraživanje
pAZIL/ZnMP	pAZIL koji nosi <i>yvjB</i> gen	Ovo istraživanje
pAZILSJ	pAZIL sa <i>ori</i> i <i>repA</i> sekvencom pSJ2-8	Laboratorijska kolekcija LMM
pAZILSJ/ZnMP	pAZILSJ koji nosi <i>yvjB</i> gen	Ovo istraživanje
pAZIL/EX	pAZIL koji nosi deo pMN5 plazmida (<i>EcoRI-XmnI</i>)	Ovo istraživanje
pAZIL/N	"Knock-out" <i>lsbB</i> gena u <i>NcoI</i> u pAZIL/EX	Ovo istraživanje
pAZIL/NE	"Knock-out" <i>lsbB</i> i <i>lmrB</i> gena u pAZIL/EX	Ovo istraživanje
pAZIL/EV	Deletant <i>lmrB</i> gena u pAZIL/EX	Ovo istraživanje
pAZIL/PlsbB	pAZIL koji nosi promotor <i>lsbB</i> gena	Ovo istraživanje

pAZIL/PlsbB-lsbA	pAZIL koji nosi <i>lsbA</i> gen pod <i>PlsbB</i>	Ovo istraživanje
pAZIL/PlsbB-lsbX	pAZIL koji nosi <i>lsbX</i> gen pod <i>PlsbB</i>	Ovo istraživanje
pAZIL/PlsbB-lsbY	pAZIL koji nosi <i>lsbY</i> gen pod <i>PlsbB</i>	Ovo istraživanje
pAZIL/PlsbB-lsbXY	pAZIL koji nosi <i>lsbXY</i> gene pod <i>PlsbB</i>	Ovo istraživanje
pAZIL-LsbB-A23	pAZIL koji nosi LsbB-A23	Ovo istraživanje
pAZIL-LsbB-A24	pAZIL koji nosi LsbB-A24	Ovo istraživanje
pAZIL-LsbB-A25	pAZIL koji nosi LsbB-A25	Ovo istraživanje
pAZIL-LsbB-A26	pAZIL koji nosi LsbB-A26	Ovo istraživanje
pAZIL-LsbB-A27	pAZIL koji nosi LsbB-A27	Ovo istraživanje
pAZIL-LsbB-A29	pAZIL koji nosi LsbB-A29	Ovo istraživanje
pAZIL-LsbB-ΔA30	pAZIL koji nosi LsbB-ΔA30	Ovo istraživanje
pAZIL-LsbB-A30+A31	pAZIL koji nosi LsbB-A30+A31	Ovo istraživanje
pAZIL-LsbB-A30-V	pAZIL koji nosi LsbB-A30-V	Ovo istraživanje
pAZIL-LsbB-A30-G	pAZIL koji nosi LsbB-A30-G	Ovo istraživanje

pAZIL-LsbB-A30-S	pAZIL koji nosi LsbB-A30-S	Ovo istraživanje
pAZIL-LsbB-A30-P	pAZIL koji nosi LsbB-A30-P	Ovo istraživanje
pNZ8150	Cm ^r	(Mierau and Kleerebezem, 2005)
pNZ8150/lacZ1	pNZ8150 koji nosi <i>lacZ1</i> gen	Ovo istraživanje
pNZ8150/PlsbB-lacZ1	pNZ8150 koji nosi <i>plsbB</i> i <i>lacZ1</i> gene	Ovo istraživanje
pNZ8150/lsbB	pNZ8150 koji nosi <i>lsbB</i> gen	Ovo istraživanje
pGhost9	Er ^r termosenzitivan vector	(Maguin <i>et al.</i> , 1996)
pGhost9/ES	pGhost9 koji nosi deo <i>yvjB</i> gena	Ovo istraživanje
pBluescript	Amp ^r , vektor za kloniranje	Stratagene
pBluescript/lacZ1	pBluescript koji nosi <i>lacZ</i> gen <i>EcoRI/HindIII</i> iz Tn5/lacZ1	Ovo istraživanje
p-GEM-T-Easy	3015 bp, Amp ^r , vektor za kloniranje PCR fragmenata	Promega
Kozmidi	Karakteristike kozmida	Izvor kozmida
pAZILcos	8194 bp; Emr ^r , "shuttle" kozmid vector	(Kojic <i>et al.</i> , 2011)
pAZILcos/MN2	pAZILcos koji nosi 40kb hromozomalne DNK soja BGMN1-596	Ovo istraživanje

pAZILcos/MN2-SI2	pAZILcos/MN2 sečen sa <i>SalI</i> enzimom	Ovo istraživanje
pAZILcos/MN2-Ps2	pAZILcos/MN2 sečen sa <i>PstI</i> enzimom	Ovo istraživanje
pAZILcos/MN2-Nc2	pAZILcos/MN2 sečen sa <i>NcoI</i> enzimom	Ovo istraživanje
pAZILcos/MN2-Sp9	pAZILcos/MN2 sečen sa <i>SpeI</i> enzimom	Ovo istraživanje

* Amp^r, rezistencija na ampicilin; Em^r, rezistencija na eritromicin; Cm^r, rezistencija na hloramfenikol; Km^r, rezistencija na kanamicin; Δ, delecija poslednje aminokiseline, alanina, u LsbB bakteriocinu

4.2. MEDIJUMI ZA OPTIMALAN RAST BAKTERIJA

Za rast sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* i *E. faecalis* korišćen je GM17 medium (M17 medijum (*Merck GmbH Darmstadt, Germany*) obogaćen sa 5 g/l D-glukoze). Za rast soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* korišćen je MRS medijum (*Merck GmbH Darmstadt, Germany*), dok je za rast sojeva *E. coli* korišćen LB (Luria-Bertani broth) medijum koji sadrži: tripton (10 g/l), ekstrakt kvasca (5 g/l) i NaCl (5 g/l). BMK su inkubirane na temperaturi od 30°C, dok su *E. coli* bakterije inkubirane na temperaturi od 37°C uz obaveznu aeraciju. Derivati BMK koji su nosili plazmide gajeni su na podlogama sa odgovarajućim antibioticima (eritromicin ili hloramfenikol, 10 µg/ml). Sojevi *E. coli* transformisani različitim vektorima gajeni su u LB medijumu sa odgovarajućim antibiotikom (eritromicin, ampicilin i hloramfenikol, 300 µg/ml, 100 µg/ml i 30 µg/ml, redom). Za selekciju kloniranih fragmenata (plavo-bela selekcija) u *E. coli* DH5α i EC101 korišćen je X-Gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil-b-d-galaktopiranozid) u koncentraciji od 20 µg/ml. Čvrste podloge su dobijene dodavanjem 1,5% agara, dok su "soft" podloge dobijene dodavanjem 0,7% agara u tečne medijume. Sojevi *E. coli* i BMK su čuvani u odgovarajućim medijumima za rast sa 15% glicerola na -80°C.

4.3. METODE RADA SA BAKTERIOCINIMA

Za detekciju i kvantifikaciju proizvodnje bakteriocina korišćeni su sledeći testovi: difuzioni test u bunarićima, test iskapavanja na "soft" agaru i dilucioni test u mikrotitar pločama.

4.3.1. Difuzioni test u bunarićima

Difuzioni test u bunarićima (u daljem tekstu "bakteriocinski test") rađen je tako što su najpre Petrijeve šolje sa tankom čvrstom podlogom prelivane sa 10 ml GM17 "soft" agara koji je inokulisan sa oko 10^5 - 10^6 ćelija indikatorskog soja/ml medijuma. U "soft" agaru su pravljene bunarići prečnika 5 mm u koje je dodato po 50 μ l prekonoćne kulture ćelija ili "supernatanta" (tečna faza nakon centrifugiranja prekonoćne kulture). Prisustvo bakteriocina je detektovano na osnovu pojave prozračne zone odgovarajućeg prečnika oko ivice bunarića, kao posledica inhibicije rasta soja senzitivnog na određeni bakteriocin (Lozo *et al.*, 2004). Prilikom izvođenja eksperimenata sa hemijski sintetisanim LsbB bakteriocinom (*ChinaPeptides Co., Ltd.*, Shanghai, China) korišćen je metod iskapavanja 10 μ l rastvorenog bakteriocina (LsbB se rastvara u didestilovanoj vodi) na Petrijeve šolje sa "soft" agarom koji je inokulisan sa oko 10^5 - 10^6 ćelija indikatorskog soja/ml medijuma. Zona inhibicije usled aktivnosti bakteriocina na senzitivne ćelije se vidi kao prosvetljenje u "soft" agaru na mestu iskapavanja bakteriocinskog preparata.

4.3.2. Dilucioni test u mikrotitar pločama

Test merenja bakteriocinske aktivnosti u mikrotitar pločama rađen je paralelno sa bakteriocinskim testom i korišćen je za kvantifikaciju proizvodnje bakteriocina. Postupak je izvođen tako što je u svaki bunarić u mikrotitar ploči (1-12) sipano po 100 μ l medijuma za optimalan rast senzitivnog soja. U prvi bunarić je dodato 100 μ l "supernatanta" prekonoćne kulture soja proizvođača bakteriocina (prethodno inkubiran 1 h na 80°C kako bi bile ubijene eventualno zaostale žive ćelije, dok je bakteriocin termostabilan). Nakon intenzivnog mešanja smeše iz prvog bunarića (200 μ l) preneto je 100 μ l i pomešano sa 100 μ l čistog medijuma u narednom bunariću. Potom je dobijena smeša izmešana i opet 100 μ l preneto u naredni bunarić sa čistim medijumom. Postupak je

ponovljen za 11 bunarića u mikrotitar ploči. U poslednjem bunariću se nalazio samo medijum - kontrola. Na ovaj način je u svakom bunariću bila duplo manja koncentracija bakteriocina od prethodnog. Nakon toga je u svih 12 bunarića dodata ista zapremina i koncentracija senzitivnog soja (prekonoćna kultura senzitivnog soja se razblaži 25 puta, a potom doda po 100 µl u svaki bunarić). Finalna zapremina u svakom bunariću je 200 µl. Ploče su inkubirane na optimalnoj temperaturi za rast senzitivnog soja i meren je OD ("Optimal Density") na 600 nm talasne dužine (OD₆₀₀) nakon 3, 4, 5, 6 i 16 h rasta (Holo *et al.*, 1991; Oppegard *et al.*, 2010).

4.3.3. Pripremanje bakteriocinskih šolja

U cilju selekcije mutanata (dobijenih MNNG mutagenom) rezistentnih na LsbB bakteriocin, pripremane su LsbB bakteriocinske šolje na sledeći način: prekonoćna kultura transformanta MG7284/pAZIL-lsbB je centrifugirana (5000 rpm, 10 min, klinička centrifuga 5804R), "supernatant" je potom inkubiran 1 h na 80°C kako bi se uništile eventualno zaostale ćelije. Uporedo je pripremljen koncentrovan GM17-agar medium ohlađen do 80°C u koji je dodat "supernatant" koji sadrži LsbB bakteriocin, pa su tako dobijene šolje sa različitom koncentracijom bakteriocina (60%, 70% i 80%) u zavisnosti od količine dodatog "supernatanta".

4.4. API I BIOLOG TEST

API 50 CH (*Bio-Merieux*, Montalieu-Vercieu, France) testom praćene su razlike u sposobnosti fermentacije 49 različitih ugljenih hidrata između polaznog soja BGMN1-596 i mutanata rezistentnih na LsbB bakteriocin dobijenih postupkom nasumične mutageneze soja BGMN1-596 primenom MNNG mutagena. Metoda je rađena po uputstvu proizvođača.

Pored API testa razlike u sposobnosti fermentacije različitih izvora ugljenika određivane su metodom Biolog (*Phenotype Micro-Arrays system*, Biolog, USA) po uputstvu proizvođača. Soj *Lc. lactis* (BGMN1-596 i mutanti rezistentni na LsbB bakteriocin) zasejani su na GM17 šolje. Kolonije su sakupljene sa šolje i resuspendovane u rastvoru IF-0a sa suplementima za rast i Biolog redoks bojom prema standardnom protokolu preporučenom za *Streptococcus* vrste. Po 100 μ l je odvajano u svaki bunarić sa različitim ugljenim hidratima (ploče PM1 i PM2). Šolje su inkubirane na 30°C u OmniLog inkubatoru, a kinetika respiracije je merena metodom kolorimetrije, odnosno redukcije tetrazolijum boje. Rezultati su prikupljani svakih 10 min tokom 72 h i analizirani Biolog softverom. PM1 i PM2 Biolog test kod bakterija određuje sposobnost korišćenja nekih od 190 komponenti kao izvore ugljenika.

4.5. METODE IZOLACIJE NUKLEINSKIH KISELINA IZ BAKTERIJA

4.5.1. Metoda izolacije hromozomalne DNK iz laktokoka

Hromozomalna DNK iz laktokoka izolovana je po modifikovanoj metodi koju su opisali Hopwood i saradnici (Hopwood *et al.*, 1985). Nakon dostizanja log faze rasta ($OD_{600} = 0,6-0,8$) ćelije su oborene centrifugiranjem (5000 rpm, 10 min, klinička centrifuga 5804R), a potom oprane u 500 μ l TEN pufera (50 mM Tris-HCl pH 8,10 mM EDTA pH 8,5 mM NaCl). Nakon pranja, ćelije su resuspendovane u 500 μ l PP pufera (0,5 M saharoze, 40 mM NH_4 -acetata, 10 mM Mg-acetata, pH 7) koji sadrži lizozim u finalnoj koncentraciji od 4 mg/ml i inkubirane 30 min na 37°C. Potom, u liziranu smešu je dodato 250 μ l 2% rastvora SDS-a (Sodium Dodecyl Sulfate) uz intenzivno mešanje na vorteks aparatu do smanjenja viskoziteta. Uklanjanje proteina rađeno je dodavanjem 250 μ l neutralnog rastvora fenol-hloroforma, a smeša je intenzivno mešana u trajanju od 30 sek i centrifugirana. Postupak prečišćavanja je ponavljan sve do

gubitka interfaze. Izdvojenoj gornjoj fazi dodata je 1/10 volumena 3 M rastvora Na-acetata i 1 volumen izopropanola, a potom je smeša lagano mešana i inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi. Ukupna DNK je taložena centrifugiranjem, a potom ispirana od viška soli dodavanjem hladnog etanola (75%, -20°C). Nakon centrifugiranja, DNK je sušena i resuspendovana u 100 µl bidestilovane vode. RNK iz uzorka je odstranjivana dodavanjem RNK-ze (1 mg/ml) i inkubacijom uzorka na 37°C u trajanju od 30 min. Ovako izolovana DNK je čuvana na temperaturi od -20°C.

4.5.2. Metoda izolacije plazmidne DNK iz *E. coli* (DH5α i EC101)

Za izolaciju plazmidne DNK iz transformisanih ćelija *E. coli* korišćena je modifikovana metoda "JET star" protokola (*JET star*, GENOMED GmbH, Lohne, Germany). Nakon dostizanja log faze rasta ćelija ($OD_{600} = 0,6-0,8$), 3 ml kulture *E. coli* je oboreno centrifugiranjem, a potom su ćelije oprane u 200 µl TEN pufera i resuspendovane u 200 µl E1 rastvora (50 mM Tris-HCl pH 8,10 mM EDTA pH 8) sa RNK-zom (finalne koncentracije 100 µg/ml). Potom je rađeno liziranje ćelija dodavanjem 200 µl rastvora E2 (200 mM NaOH, 1% SDS), uz lagano mešanje do homogenizacije lizata. Nakon homogenizacije rađena je neutralizacija dodavanjem 200 µl rastvora E3 (3,1 M K-acetat pH 5,5) uz intenzivno mešanje. Smeša je zatim centrifugirana, a dobijeni „supernatant“ je prebačen u nove mikrotube. Potom je dodato 200 µl smeše fenol-hloroforma uz intezivno mešanje u trajanju od 1 min. Nakon centrifugiranja gornja faza (DNK) je prenetu u nove mikrotube i precipitirana dodavanjem 0,7 volumena izopropanola, a potom opet centrifugirana. DNK je zatim oprana hladnim etanolom (75%, -20°C) i centrifugirana, a nakon toga sušena na 37°C do gubitka mirisa etanola. Finalno resuspendovanje uzoraka vršeno je u rastvoru RNK-ze (1 mg/ml), a smeša je potom inkubirana na 37°C u trajanju od 30 min.

Izolaciju plazmida iz *E. coli* koji su korišćeni za sekvenciranje rađena je pomoću „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) ili Thermo Scientific kitom po upustu proizvođača.

4.5.3. Metoda izolacije kozmidne DNK iz *E. coli* (HB101)

Kozmidna DNK iz *E. coli* (kozmidna biblioteka soja BGMN1-596) izolovana je prema metodi koju su opisali Anderson i McKay (Anderson and McKay, 1983). Nakon dostizanja log faze rasta ($OD_{600} = 0,6-0,8$), 500 ml ćelijske kulture je oboreno centrifugiranjem, a potom oprano u 5 ml TEN pufera. Nakon toga, ćelije su resuspendovane u 12,5 ml STE pufera (6,7% saharoza, 50 mM Tris-HCl pH 8,1 mM EDTA pH 8) i inkubirane na 37°C. Lizozim je dodat u finalnoj koncentraciji od 7 mg/ml, a potom je smeša inkubirana 10 min na 37°C. Nakon liziranja ćelija dodato je 3,15 ml rastvora 0,25 M EDTA i 50 mM Tris-HCl pH 8, kao i 0,9 ml 20% SDS. Smeša je intenzivno mešana na vorteks aparatu do smanjenja viskoziteta. Potom je sledila inkubacija 10 min na 37°C, a nakon toga i dodavanje 1 ml 3 M NaOH, i 1,65 ml 2 M Tris-HCl pH 7. Posle blagog homogenizovanja smeše dodato je 2,4 ml 5 M NaCl, a zatim je centrifugirana (10000 rpm, 30 min, 4°C, centrifuga Sorvall RC-5B, SS34 rotor). Dobijeni „supernatant“ je prenet u falkon epruvete, dodat je jedan volumen fenol-hloroforma, a zatim je smeša centrifugirana (5000 rpm, 15 min, 4°C, klinička centrifuga 5804R). Precipitacija DNK („supernatant“) vršena je dodavanjem 1 volumena izopropanola i inkubiranjem 24 h na 4°C. Nakon centrifugiranja (5000 rpm, 20 min, 4 °C, klinička centrifuga 5804R) DNK je ispirana hladnim etanolom (75%, -20°C, 20 ml), osušena i resuspendovana u rastvoru RNK-ze (100 µl, 10 mg/ml), a potom inkubirana na 37 °C u trajanju od 60 min.

4.5.4. Prečišćavanje totalne DNK u gradijentu CsCl

U okviru Anderson i McKay metode (Anderson and McKay, 1983), nakon izolacije kozmidne DNK, u ovaj rastvor dodat je čvrst CsCl (1 g CsCl / 1 ml DNK) i rastvor etidijum bromida (0,4 ml, koncentracije 10 mg/ml). Smeša je potom prenetu u epruvete, gde je razdvajanje plazmidne i hromozomalne DNK rađeno centrifugiranjem (45000 rpm, 60 h, + 4 °C, Beckman ultracentrifuga, rotor Ti50). Nakon centrifugiranja epruvete su izložene UV svetlu gde su se mogle uočiti dve fluorescentne trake: gornja, koja sadrži hromozomalnu DNK i donja, u kojoj se nalazi cirkularna forma kozmidne DNK. Traka kozmidne DNK je izvađena iz epruvete pomoću igle i šprica tako što je zid epruvete probušen ispod nivoa trake, a DNK traka je izvučena špricem. Iz dobijenog rastvora DNK etidijum bromid je ekstrahovan korišćenjem izoamil alkohola (u odnosu zapremina 1:1), a CsCl dijalizom, u 1000 puta većoj zapremini bidestilovane vode.

4.5.5. Metode izolacije plazmidne DNK iz laktokoka

Prirodni plazmid pMN5 iz laktokoka je izolovan po prethodno opisanoj proceduri (O'Sullivan and Klaenhammer, 1993). Za pranje taloga bakterijskih ćelija soja BGMN1-596T (dobijenog centrifugiranjem 10 ml logaritamske faze rasta kulture ($OD_{600} = 0,6-0,8$) korišćeno je 500 μ l TEN pufera, pH 8. Ćelije su potom resuspendovane u 200 μ l 25% rastvora saharoze sa lizozimom u finalnoj koncentraciji od 30 mg/ml. Nakon inkubiranja 30 min na 37°C, u smešu je dodato 400 μ l sveže napravljenog alkalnog rastvora SDS-a (3% SDS, 0,2 M NaOH), a potom je vršena inkubacija 7 min na sobnoj temperaturi uz konstantno lagano mešanje. Nakon dodavanja 300 μ l hladnog 3 M Na-acetata, pH 4,8, uzorak je inkubiran 10 min na -20°C, a potom centrifugiran. „Supernatantu“ je dodato 650 μ l izopropanola, a zatim je smeša opet centrifugirana. Dobijeni talog je nakon sušenja resuspendovan u 320 μ l vode, a

potom je dodato 350 μ l smeše fenol-hloroforma i 200 μ l 7,5 M NH_4 -acetata sa 0,5 mg/ml etidijum bromida. Ovako dobijena smeša je homogenizovana na vorteks aparatu, a potom centrifugirana. Gornja faza, DNK, prebačena je u nove mikrotube, a potom precipitirana dodavanjem hladnog etanola (96%, -20°C). Smeša je dobro promešana, i centrifugirana, a potom je sledilo ispiranje hladnim etanolom (75%, -20°C), centrifugiranje, a DNK je nakon odstranjivanja etanola sušena i resuspendovan u 20 μ l bidestilovane vode. RNK je odstranjena inkubacijom uzorka sa enzimom RNK-aza (1 mg/ml) na 37°C u trajanju od 30 min.

4.5.6. Metoda izolacije RNK iz laktokoka

Izolacija ukupne RNK iz soja MG7284/pAZIL/EX koja je korišćena za RT-PCR reakciju rađena je pomoću RNA kita po uputstvu proizvođača (*SV Total RNA Isolation System, Promega, USA*). Za potpuno uklanjanje zaostale DNK iz dobijenog uzorka korišćen je komercijalni (*DNA-freeTM Kit, Ambion, USA*) kit. Finalno, izolovana RNK proverena je na 1,2% formaldehid-agaroznom gelu.

4.6. METODE TRANSFORMACIJE BAKTERIJA PLAZMIDIMA

4.6.1. Priprema kompetentnih ćelija *E. coli*

Kompetentne *E. coli* (EC101 i DH5 α) ćelije transformisane plazmidima pripremljene su po modifikovanoj proceduri sa rubidijum hloridom (Hanahan, 1985). Nekoliko kolonija sveže izrasle kulture *E. coli* inokulisano je u LB medijumu (100 ml), koji je inkubiran na 37°C uz intenzivnu areaciju na 180 rpm, do optičke gustine kulture od $\text{OD}_{600} = 0,4$. Rast bakterijske kulture je zaustavljen inkubiranjem kulture 15 min na ledu. Nakon hlađenja bakterije su obarane iz medijuma, centrifugiranjem 10 min na 3000 rpm u kliničkoj centrifugi (5804R,

Eppendorf, Hamburg, Nemačka) na 4°C. „Supernatant“ je odlivan, a ćelije resuspendovane laganim mešanjem u istom volumenu prethodno ohlađenog 0,1 M CaCl₂ i inkubirane na ledu 15 min. Ćelije su zatim ponovo obarane centrifugiranjem na 3000 rpm, 10 min, a potom resuspendovane u 8 ml RF2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 15% glicerol, finalno pH 6,8). Suspenzija ćelija je podeljena u alikvotne od po 200 µl, koji su naglo zamrzavani u tečnom azotu, a zatim čuvani na -80°C.

4.6.2. Ligacija DNK fragmenata i transformacija *E. coli* (EC101 i DH5α) ćelija “Heat shock“

U cilju kloniranja DNK fragmenata u vektore za kloniranje, rađena je ligacija (spajanje) DNK fragmenta i vektora (Maniatis *et al.*, 1982) komplementarnim lepljivim krajevima u ligacionom puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 1 mM ATP) sa 1U T4 DNK ligaze (*Agilent Technologies*, SAD) u odgovarajućem odnosu u finalnoj zapremini od 20 µl i inkubiranjem 16 h na 16°C.

U 200 µl prethodno pripremljenih kompetentnih ćelija *E. coli* (EC101 i DH5α) dodavano je oko 200 ng plazmidne DNK ili prečišćene ligacione smeše (u zapremini do 20 µl). Nakon inkubacije od 60 min na ledu uz povremeno mešanje, ćelije su izlagane temperaturnom šoku (42°C) u trajanju od 90 sek, a zatim su inkubirane još 5 min na ledu. Posle temperaturnog šoka u ćelijske suspenzije je dodato 300 µl LB medijuma za regeneraciju, a smeša je zatim inkubirana 30 do 60 min u zavisnosti od ekspresije antibiotske rezistencije na 37°C, uz aeraciju. Nakon regeneracije, alikvoti smeše su utrljani na odgovarajuće čvrste selektivne LB podloge koje su inkubirane na 37°C do pojave transformanata.

4.6.3. Priprema elektrokompetentnih ćelija i transformacija sojeva metodom elektroporacije

Metodom elektroporacije transformisani su sojevi laktokoka, laktobacila i enterokoka u kojima se ispitivala ekspresija različitih gena. Za potrebe ovih eksperimenata pripremane su sveže elektrokompetentne ćelije laktokoka, laktobacila i enterokoka, a njihova priprema kao i sama elektroporacija rađena je prema modifikovanoj metodi koju su opisali Holo i Nes (Holo and Nes, 1989). Prekonoćna kultura laktokoka ili laktobacila je razblažena 100 puta u GM17 ili MRS medijumu sa 1% glicina. Kultura je inkubirana na 30°C do dostizanja log faze rasta, $OD_{600} = 0,2-0,6$. Talog bakterija iz 10 ml kulture je opran dva puta u 20 ml sterilne bidestilovane vode i finalno resuspendovan u 200 μ l vode. Nakon dodavanja 5 μ g plazmidne DNK, smeša je inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi, a zatim je promešana i prebačena u kivete za elektroporaciju (dijametra 0,2 cm). Elektropulsiranje bakterija je rađeno u GENE PULSER aparatu (*Eppendorf*, Hamburg, Nemačka) pri otporu od 200 Ω , gde su laktokoke i enterokoke podvrgnute električnom pulsu jačine 2,45 kV/cm, dok su laktobacili podvrgnuti pulsu jačine 1,25 kV/cm. U kivetu pulsiranih ćelija odmah je dodavan tečni GM17 ili MRS medijum u cilju regeneracije. Nakon toga smeša je inkubirana 2 h za laktokoke i enterokoke, odnosno 3 h za laktobacile na 30°C a zatim utrljana na GM17 ili MRS čvrste selektivne podloge sa odgovarajućim antibiotikom, i inkubirane na 30°C do pojave transformanata.

4.7. METODE LANČANE REAKCIJE POLIMERAZE (Polimerase Chain Reaction)

4.7.1. PCR metoda

Umnožavanje različitih DNK fragmenata (fragmenti totalne ili plazmidne DNK) PCR metodom rađeno je tako što je pripremljena reakciona smeša koja sadrži: 1 x reakcioni pufer KAPA *Taq* Buffer A sa 1,5 mM MgCl₂, u koji je dodata dNTP smeša (svaki dNTP po 200 μM), prajmeri (svaki po 2,5 μM) i 1U KAPA *Taq* DNA polimeraze (*Kapa Biosystems, Inc.*, Boston, MA, USA). Količina DNK uzorka (matrice) u eksperimentima bila je oko 1 ng.

PCR reakcije u kojoj su korišćeni prajmeri dizajnirani na osnovu sekvence određenog gena rađena je po sledećem programu: početna denaturacija 5 min na 94 °C, umnožavanje DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacija 30 sek na 94 °C; vezivanje prajmera 30 sek na različitim temperaturama (Tabela 3); polimerizacija lanaca, 30 sek na 72 °C; poslednji ciklus, polimerizacija 7 min na 72 °C.

Ovako dobijeni PCR produkti su nakon prečišćavanja propuštanjem kroz kolonice QIAquick PCR Purification KIT/250 (*QIAGEN GmbH*, Hilden, Nemačka) i sekvencirani u centru za sekvenciranje Macrogen, Amsterdam, Holandija. Sekvence su upoređivane uz pomoć NCBI baze podataka, "BLAST" programom (Altschul *et al.*, 1997) za pretraživanje homologe nukleotidne sekvence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

4.7.2. RT-PCR metoda

RT-PCR metoda je rađena kako bi se odredila dužina i smer iRNK koja se prepisuje u okviru eksperimenata analize regulacije LsbB bakteriocina.

Reverzna Transkripcija (RT) izvedena je u skladu sa uputstvima proizvođača enzima (*Thermo Scientific*). U izolat RNK (2 μg) dodato je 100 pmol

nasumičnih heksamera (*Thermo Scientific*), sterilna didestilovan voda do 12,5 μ l, i smeša je inkubirana 5 min na 65°C. Nakon toga smeša je ohlađena na ledu i dodate su sledeće komponente: 20 U RiboLock ribonukleaznog inhibitora (*Thermo Scientific*), 1 mM dNTP smeše (*Thermo Scientific*), 200 U reverzne transkriptaze i 1 \times reakcioni pufer, do konačne zapremine od 20 μ l. Reakcija je izvedena po sledećem programu: 10 min na 25°C, 60 min na 42°C i 10 min na 70°C. Kontrole bez reverzne transkriptaze uključene su radi provere odsustva kontaminacije genomskom DNK. Svi koraci reakcije izvođeni su u aparatu Gene AmpR System 2700 (*Applied Biosystems*).

Sintetisana cDNK korišćena je kao matrica u PCR reakcijama sa parovima prajmera prikazanim u tabeli 3. Ukupna zapremina PCR smeše iznosila je 30 μ l, a reakcija je sadržala 1 μ l 1/10 puta razblažene cDNK, 10 pmola svakog od prajmera, 1 U Kapa polimeraze (*Kapa Biosystems*), 1 \times TaqA pufer i 0,2 mM dNTP smeše (*Thermo Scientific*). PCR program dizajniran je u aparatu Gene AmpR PCR System 2700 (*Applied Biosystems*). Reakcija je izvedena po sledećem protokolu: Početna denaturacija DNK (94°C, 5 min). Umnožavanje DNK fragmenata vršeno je u 30 ciklusa: denaturacija (94°C, 30 sek), vezivanje prajmera (na različitim temperaturama (Tabela 3), 30 sek), sinteza produkata (72°C, 30 sek), sinteza nedovršenih produkata (72°C, 7 min). PCR produkti su provereni na 1% agaroznom gelu.

Tabela 3. Prajmeri korišćeni u radu

Naziv prajmera	Sekvence prajmera (5'-3')	Uzorak
UNI16SF	GAGAGTTTGATCCTGGC	(Jovicic <i>et al.</i> , 2009)
UNI16SR	AGGAGGTGATCCAGCCG	(Jovicic <i>et al.</i> , 2009)
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	plazmidi kod kojih je „polylinker“ u <i>lacZ</i> genu
M13F	GTAAAACGACGGCCAG	
F-lsbB	TAACGGATCCAATAGGGAAAATAG	pMN5 plazmid
R-lsbB	GCATAATAAAAACTGCAGCTATTG	
OFRF	GGCGTAAAAGATTCAGG	ukupna DNA BGMN1-596, BGMN1-596R2, BGMN1-596R3, BGMN1-596SR, IL1403 i MG7284
ORFR	GAAGGGTTGGTATAAGC	
PlsbBBamHIR	CGTAGGATCCTTTTCATAGG	pAZIL/EX
PlsbBEcoRIF	CTCCAAGAATTTCCTAAAAAATAGG	pAZIL/EX
LsbAPstIR	CAATAGCTGCAGTTTTTATTATG	pAZIL/EX
LsbABamHIF	GAATTAATAATGGATCCAATAATGAG	pAZIL/EX
LsbXPstIR	TTTGTACTGCAGTGTGGCC	pAZIL/EX
LsbXBamHIF	CCATGGGATCCTGGAAAAGC	pAZIL/EX
LsbYPstIR	GTATCTGCAGTTGGAACCTTGATGG	pAZIL/EX
LsbYBamHIF	CAATTGGATCCTATTGATTAGTC	pAZIL/EX

RT1	TCTATGCTCCAAAAAGCGCT	cDNK MG7284/pAZIL-EX
RT2	GGATATTTAAAATGATAATTGTAGG	cDNK MG7284/pAZIL-EX
RT3	TGACTAATCAATATGTTCC	cDNK MG7284/pAZIL-EX
RT4	TGTATCTTGATAGAAAGGAAG	cDNK MG7284/pAZIL-EX

*Sekvence koje prepoznaju restrikcioni enzimi su podvučene

4.8. METODE MUTIRANJA GENA

4.8.1. Metoda nasumične mutageneze

Nasumična mutageneza soja BGMN1-596 (senzitivan na LsbB) rađena je MNNG (*N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) mutagenom, kako bi se dobili mutanati rezistentni na LsbB bakteriocin. Rezistentni mutanti su analizirani kako bi se utvrdilo šta je to što doprinosi rezistenciji, odnosno koji je gen mutiran MNNG mutagenezom, što za posledicu dovodi do rezistencije soja na LsbB bakteriocin. Sveža kultura soja BGMN1-596 (1-2% inokulum) zasejana je u 50 ml GM17 medijuma i inkubirana do dostizanja log faze rasta ($OD_{600} = 0,2-0,6$). Čelije su potom oborene centrifugiranjem, a talog ćelija je opran dva puta 0,1 M rastvorom natrijum-fosfatnog (NaPi) pufera pH 7. Nakon drugog pranja ćelije su finalno resuspendovane u 4,1 ml istog pufera. Iz ovog rastvora je uzeto 100 μ l kako bi se odredio broj bakterija pre mutageneze. Preostala 4 ml su podeljena u četiri falkon tube od 15 ml (po 1 ml u svaku) i tretirani sa različitim koncentracijama MNNG rastvorenog u NaPi puferu (finalne koncentracije 100, 50, 25 i 12,5 μ g/ml MNNG). Smeša je inkubirana 1 h na 30°C. Nakon 1 h inkubacije tretirani uzorci su ponovo oprani dva puta u 0,1 M NaPi puferu pH 7. Finalno, ćelije su resuspendovane u 1,1 ml 0,1 M NaPi pufera i inkubirane 1 h na 30°C u cilju "fiksiranja" nastalih mutacija. Nakon toga je uzeto po 100 μ l za određivanje broja bakterija nakon mutageneze. Ostatak ćelija je pomešan sa sterilnim glicerolom u finalnoj koncentraciji od 15% i čuvano na -80°C. Koncentracija MNNG koja ostvari preživljavanje bakterija od 1 do 7% smatra se uspešnom i ti mutanti se koriste u daljem radu (Adelberg *et al.*, 1965).

4.8.2. Metoda mesto specifične mutagenize

Metodom mesto specifične mutageneze, mutirane su aminokiseline na N-terminalnom kraju LsbB bakteriocina, u okviru eksperimenata strukturno

funkcionalne analize LsbB bakteriocina. U cilju tih eksperimenata konstruisani su prajmeri (Tabela 4) koji su u PCR reakciji ciljano dovodili do promena jednog ili više nukleotida na *lsbB* genu, a samim tim i do ciljanih promena aminokiselina. Svaka od aminokiselina je mutirana tako što je zamenjena alaninom kao neutralnom aminokiselinom. Takođe, isti princip je korišćen za konstrukciju mutacija na poslednjem alaninu C-terminusa LsbB bakteriocina. (a) Izvršena je delecija terminalnog alanina (LsbB- Δ A30); (b) Nakon terminalnog alanina dodat je još jedan alanin (LsbB-A30+A31); (c) Poslednji alanin je zamenjen drugim aminokiselinama, gde je izbor vršen tako da svaka od aminokiselina pripada različitoj grupi. Od alifatičnih aminokiselina zamene su vršene u glicin i valin, od hidroksilnih aminokiselina u serin, a od cikličnih aminokiselina u prolin (LsbB-A30-G, LsbB-A30-V, LsbB-A30-S, LsbB-A30-P, redom).

Kao matrica za sve PCR reakcije korišćen je konstrukt pAZIL/*lsbB*. Reakcija je postavljena po programu: početna denaturacija DNK (94°C, 5 min); umnožavanje DNK fragmenata vršeno je u 30 ciklusa: denaturacija (94°C, 30 sek), vezivanje prajmera (48°C, 30 sek), sinteza produkata (72°C, 30 sek), sinteza nedovršenih produkata (72°C, 7 min). "Forward" prajmer F-*lsbB* (Tabela 3) kombinovan je sa prajmerima dizajniranim tako da dovode do zamene pojedinačnih nukleotida (Tabela 4). Svi produkti PCR reakcije su klonirani u pGEM-T-Easy vektor (*Promega*), a potom preklonirani u pAZIL vektor u cilju transformacije soja MG7284 i ekspresije izmenjenog *lsbB* gena. pGEM-T-Easy-*lsbB* konstrukti sečeni su restrikcionim enzimima koji se nalaze u okviru prajmera (*EcoRI-EcoRV*), dok je pAZIL vektor sečen (*EcoRI-SmaI*) restrikcionim enzimima. Tačnost uvedenih promena u konstruktima je potvrđena sekvenciranjem, korišćenjem M13F i M13R prajmera. Nakon potvrde uvedenih mutacija, soj *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG7284 je transformisan dobijenim konstruktima, a bakteriocinska aktivnost ovako mutiranog LsbB bakteriocina testirana je standardnim testom sa bunarićima, gde su kao senzitivni sojevi korišćeni BGMN1-596 i IL1403.

Tabela 4. Prikaz prajmera korišćenih za mesto specifične mutacije

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5'-3')	Zamena amino kiselina	Naziv mutiranog LsbB
Prajmeri korišćeni za mutacije aminokiselina na C-terminusu LsbB bakteriocina			
R-lsbB-Y23/A23	TGATATCTTAAGCT <u>TGCT</u> CCACGTTCCC	Y→A	LsbB-A23
R-lsbB-P24/A24	TGATATCTTAAGCTTTTCC <u>AGCT</u> TCCC	P→A	LsbB-A24
R-lsbB-W25/A25	TGATATCTTAAGCTTTTCCACG <u>TGCC</u> CATGG	W→A	LsbB-A25
R-lsbB-E26/A26	TGATATCTTAAGCTTTTCCACGTTCC <u>CGCT</u> GGATAGCC	E→A	LsbB-A26
R-lsbB-R27/A27	TGATATCTTAAGCTTTTCCACGTTCCCAT <u>TGC</u> ATAGCC	R→A	LsbB-A27
R-lsbB-K29/A29	TGATATCTTAAGCTTTTCCACGTTCCCATGG <u>AGCG</u> CCGCC	K→A	LsbB-A29
Prajmeri korišćeni za mutacije terminalnog alanina C-terminusa LsbB bakteriocina			
R-lsbB-A30-Δ	TGATATCTTA <u>TTA</u> TTTTCCACGTTCCCATGG	ΔA30	
R-lsbB-A30+A31	TGATATCTTA <u>AGC</u> AGCTTTTCCACGTTCCCATGG	A31	
R-lsbB-A30-V	TGATATCTTA <u>AAC</u> TTTTCCACGTTCCCATGG	A→V	

R-IsbB-A30-G	TGATATCTTA <u>AC</u> TTTTCCACGTTCCCATGG	A→G
R-IsbB-A30-S	TGATATCTTA <u>AG</u> TTTTCCACGTTCCCATGG	A→S
R-IsbB-A30-P	TGATATCTTA <u>AGG</u> TTTTCCACGTTCCCATGG	A→P

*Sekvence koje prepoznaju restrikciona mesta su podvučene

*Mesta gde su zamenjeni nukleotidi su podvučena, iskošena i podebljana

4.9. KONSTRUISANJE KOZMIDNE BIBLIOTEKE

4.9.1. Parcijalna digestija DNK, kloniranje fragmenata u kozmid pAZILcos

Nakon izolacije hromozomalne DNK iz soja BGMN1-596, rađena je parcijalna digestija *EcoRI* restrikcionim enzimom na sobnoj temperaturi. Početna zapremina reakcione smeše bila je 600 μl (100 μl – oko 30 mikrograma visokomolekularne DNK, 60 μl 10 x *EcoRI* pufera, 435 μl didestilovane vode i 5 μl *EcoRI* enzima). Po 100 μl uzorka iz smeše vađeno je nakon vremenskih perioda od 2, 5, 10, 20, 30 i 40 minuta i mešano sa EDTA pH 8 u finalnoj koncentraciji 10 mM, a potom odmah inkubirano na ledu kako bi se zaustavila enzimski reakcija. Nakon zaustavljanja reakcija stepen digestije uzoraka je proveren na 1% agaroznom gelu. Uzorak u kojem je najveći broj *EcoRI* fragmenata veličine između 30 i 40 kb je korišćen za konstruisanje kozmidne biblioteke soja BGMN1-596.

Nakon prečišćavanja uzoraka, rađena je ligacija (*Agilent Technologies*, SAD) parcijalno isečene DNK i kozmida pAZILcos (prethodno isečenog *EcoRI* restrikcionim enzimom i defosforilisanog Antarktik fosfatazom, *Biolabs*). Ligaciona smeša (12 μl DNK, 4 μl pAZILcos, 1 μl ATP, 2 μl 10 x pufer i 1 μl ligaze) inkubirana je 16 h na 16°C.

4.9.2. Pakovanje kozmidne DNK u λ fage

Prilikom konstruisanja kozmidne biblioteke soja BGMN1-596, korišćen je kozmid pAZILcos, in-vitro ekstrakt λ faga i *E. coli* ćelije HB101, a metoda je rađena po uputstvu (*Gigapack III Packaging Extract, Packaging kit, Agilent Technologies*, SAD). Magnezijumske ćelije *E. coli* HB101 su pripremljene tako što je u 15 ml LB medijuma kome je dodat 10 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ i 0,2% rastvor maltose zasejana sveža kultura HB101 ćelija. Nakon dostizanja log faze rasta ($\text{OD}_{600} = 0,2-0,6$) ćelije su oborene laganim centrifugiranjem (1650 rpm, 10 min).

Nakon odbacivanja "supernatanta", ćelije su resuspendovane u 5 ml 10 mM MgSO₄ x 7 H₂O. Paralelno dok je rasla kultura HB101 ćelija, λ fagi (*Packaging kit, Agilent Technologies, SAD*) su pažljivo otapani, a odmah po otapanju dodato je 4 μl ligacione smeše kozmida i *EcoRI* parcijalno sečene hromozomalne DNK soja BGMN1-596. Smeša je inkubirana 2 h. Nakon toga je dodato 500 μl SM pufera (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄ x 7H₂O, 50 mM Tris HCl pH 7,5) i 20 μl hloroforma, a potom je smeša nežno promešana i kratko centrifugirana.

U sterilne mikrotube pomešano je 100 μl HB101 ćelija i 50 μl smeše faga i kozmida, a potom inkubirano 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon isteka vremena dodato je 200 μl LB medijuma radi regeneracije, a potom je usledila inkubacija od 1 h uz povremeno mešanje na 37°C. Smeša je zatim utrljana na šolje sa odgovarajućim antibiotikom (Em 300 μg/ml). Nakon 24 h dobijene kolonije su čuvane u LB medijumu sa glicerolom (finalno 15%) na -80°C.

4.10. SEKVENCIRANJE pAZILcos/MN2

U cilju bržeg spajanja i analiziranja sekvence pAZILcos/MN2, rađeni su deleciona analiza i prekloniranja, digestijom kozmida različitim restrikcionim enzimima: *EcoRI*, *HindIII*, *SmaI*, *SpeI*, *NcoI*, *PstI*, *SalI*, *BamHI*, *EcoRV* i *XhoI*. Restrikcioni enzimi koji su izdvojili manje fragmente od interesa su *SmaI*, *SpeI*, *NcoI* i *PstI*. Nakon digestije kozmida (6 h) navedenim enzimima, rađena je religacija kozmida ili ligacija u pAZIL vektor (*Agilent Technologies, SAD*). *E. coli* DH5α ćelije, transformisane su ovim ligacionim smešama, a dobijeni transformanti su analizirani, kako bi se potvrdilo prisustvo kloniranih fragmenata.

Vektori izolovani iz *E. coli* korišćenjem „QIAprep Spin Miniprep Kit-a“, sekvencirani su u servisu za sekvenciranje (*Macrogen, Amsterdam, Nederland*). Dobijene sekvence su spajane pomoću DNA Strider programa a dobijeni geni upoređivani su u NCBI bazi podataka pomoću "BLAST" programa (Altschul *et*

al., 1997) za pretraživanje homologe nukleotidne sekvence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

4.11. „KNOCK-OUT“ *yvjB* GENA

U ovom eksperimentu korišćen je vektor pGhost9, čija je replikacija direktno zavisna od temperature rasta ćelija. Ovaj plazmid se normalno replikuje na permisivnoj temperaturi (28 °C), dok se na nepermisivnoj temperaturi za replikaciju (iznad 37 °C) integriše u hromozom domaćina metodom homologe rekombinacije ili se gubi iz populacije (Maguin *et al.*, 1992). *yvjB* gen je inaktiviran u genomu soja BGMN1-596 i IL1403 metodom homologe integracije po prethodno opisanom protokolu (Maguin *et al.*, 1996), uz minimalne modifikacije. Fragment koji predstavlja deo *yvjB* gena (*EcoRI-ScaI*; 964 bp) kloniran je u pGhost9 vektor, gde je dobijen konstrukt pGhost9/ES. Sojevi senzitivni na LsbB, IL1403 i BGMN1-596, su transformisani ovim konstruktom, a ćelije su potom inkubirane 48 h na 28°C. Dobijeni transformanti su potom inkubirani na 37°C u trajanju od 48 h kako bi se zaustavila replikacija vektora i tako temperaturno regulisan vektor metodom homologe rekombinacije integrisao u hromozom. Dobijeni transformanti su u bakteriocinskim testovima korišćeni kao indikator sojevi. Kao kontrola u testovima, korišćeni su transformanti inkubirani na 28°C. Kao bakteriocin proizvođač korišćen je soj MG7284/pAZIL-lsbB.

4.12. SEKVENCIRANJE GENOMA BGMN1-596 i MNNG MUTANATA

Paralelno sa tehnikama kloniranja gena, rađeno je sekvenciranje genoma polaznog soja BGMN1-596 i po jednog mutanta iz kategorije R2 i R3 (dobijenih MNNG mutagenezom) u cilju analize razlika i sličnosti između genoma.

Genomske DNK, izolovane iz sojeva BGMN1-596 i mutanata dobijenih MNNG mutagenezom (BGMN1-596R2/23 i BGMN1-596R3/19) sekvencirane su u centru „Norwegian Sequencing Centre“ (sequencing.uio.no) korišćenjem „Illumina MiSeq instrument“ po preporuci proizvođača. Za svaki soj urađeno je po 1,5 miliona čitanja (2-250 bp po čitanju). Preliminarno sklapanje genoma rađeno je ABySS (Simpson *et al.*, 2009), gde je dobijeno 157 kontigova koji pokrivaju 2465230 bp. Razlika u genomu između polaznog soja i mutanata rađena je korišćenjem algoritma VAAL (“Broad Institute”) (Nusbaum *et al.*, 2009).

4.13. METODE ELEKTROFOREZE

4.13.1. Horizontalna elektroforeza DNK u agaroznom gelu

Gelovi su pravljani otapanjem agaroze u 1 x TAE puferu (40 mM Tris-acetat 1 mM EDTA) uz dodavanje etidijum bromida (0,5 µg/ml). Kao pufer za elektroforezu korišćen je 1 x TAE pufer. Korišćeni su 1% agarozni gelovi, a elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela. Veličine DNK fragmenata određivana je poređenjem sa poznatom veličinom fragmenata (standardi) na istom agaroznom gelu.

4.13.2. Gel elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE)

PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) je rađena u cilju potvrde dobijenih mutanata nakon MNNG mutageneze, kao i u cilju potvrde sličnosti

dobijenih "knock-out" mutanata u *yvjB* genu sa polaznim sojem. PFGE rađena je po metodi koju su opisali Kojić i saradnici (Kojic *et al.*, 2006). Pojedinačne kolonije sa GM17 podloge zasejane su u GM17 medijum i inkubirane na 30°C preko noći. Prekonoćna kultura je potom razblažena 100 puta u GM17 medijumu i inkubirana na 30°C do postizanja log faze rasta ($OD_{600} = 0,2-0,6$). Čelije dobijene obaranjem 1,5 ml prekonoćne kulture oprane su u 1 ml EET pufera (100 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM TRIS, pH 7,5-8), a potom je dodato 50 µl fenola. Smeša je homogenizovana i opet centrifugirana. Nakon toga fenol je izvučen sa dna mikrotube, a ostatak je centrifugiran, nakon čega je „supernatant“ odliven a čelije oprane u 50 µl EET pufera. Smeša je potom inkubirana 10 min na 42°C. Po isteku vremena, dodato je 50 µl 2% InCert (Lonza, Rockland, USA) agaroze istopljene i ohlađene na 42°C u 50 µl inkubirane smeše, dobro promešano i izliveno u kalupe koji su ostavljeni na 4°C kako bi se stegli. Nakon 10 min blokčići su izvučeni iz kalupa i preneti u 500 µl rastvora (EET pufer, 0,05% N-lauryl sarcosine, lizozim 4 mg/ml) i inkubirani 24 h na 37°C.

Nakon 24 h, rastvor sa lizozimom je odliven, a blokčići su inkubirani 24 h na 50°C u 500 µl rastvora (EET pufer, 0,5% SDS, 0,5 µg/ml proteinaza K). Kada su blokčići postali prozirni (nakon 24 h), rastvor je odliven, a dodato je 10 ml PMSF-a (phenylmethylsulfonyl fluoride) rastvorenog u vodi (0,5 mM). Smeša je mešana na sobnoj temperaturi 30 min, a potom je postupak ponovljen, odliven je prethodni rastvor, a dodato opet 10 ml rastvora PMSF. Nakon ponovnog mešanja 30 min na sobnoj temperaturi, prethodni rastvor je odliven, a dodato je 5 ml sterilne didestilovane vode, i ovaj postupak je takođe ponovljen dva puta. Nakon toga blokčići su podvrgnuti digestiji sa *SmaI* restrikcionim enzimom. Prvo su inkubirani 30 minuta u 1 x Tango puferu (300 µl) na sobnoj temperaturi, a potom 3 sata na 30°C u smeši (100 µl) kojoj je dodat *SmaI* enzim. Nakon 3 h inkubiranja, ceo rastvor je odliven a reakcija je zaustavljena dodavanjem 100 µl „STOP PFGE“ pufera (40% saharoza, 100 mM EDTA pH 8, brom fenol plavo). Za PFGE korišćen je 1,2% agarozni gel rastvoren u 0,5 x TBE puferu. Uslovi pod

kojima je tekla elektroforeza su konstantna jačina struje od 300 mA, trajanje pulsa od 8 sek u trajanju od 8 h i 18 sek u trajanju od 10 h.

4.14. DNK/DNK HIBRIDIZACIJA („SOUTHERN BLOT“)

4.14.1 Prenos DNK sa gela na najlonske membrane

Potvrda prisustva kozmida pAZILcos/MN2 u mutanatima BGMN1-596R3/19 i BGMN1-596R2/23 nakon PFGE rađena je metodom DNK/DNK hibridizacije. Nakon analize derivata BGMN1-596R3/19-pAZILcos/MN2 i BGMN1-596R2/23-pAZILcos/MN2 metodom PFGE, gel je izložen delovanju UV svetla (1 min), kako bi se izvršila dimerizacija timina, zatim je rađena denaturacija u denaturacionom puferu (1,5 M NaCl i 0,5 M NaOH) u trajanju od 20 min i neutralizacija 2 puta po 20 min u neutralizacionom puferu (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, finalno pH 7,5). DNK/DNK hibridizacija rađena po metodi koju je opisao Southern (Southern, 1975). Tretirani gel je postavljen na 3 MM papir, koji čini most između pufera u rezervoaru i gela, a koji su prethodno potopljeni u rastvor 20 x SSC pufera (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-citrat, finalno pH 7) tako da je strana sa rupicama za nanošenje DNK bila okrenuta na dole, a oko gela su postavljeni graničnici. Preko gela je postavljena najlonska membrana dimenzija kao i sam gel, a preko nje dva 3 MM papira navlažena u 20 x SSC puferu, pri čijem postavljanu je bilo važno ukloniti mehuriće vazduha. Na kraju je postavljen sloj upijajućeg papira debljine desetak centimetara i sve je opterećeno tegom od 1 kg. Transfer DNK je vršen 24 h u 20 x SSC puferu. Nakon 24 h najlonska membrana je dva puta potopljena u 5 x SSC pufer u trajanju od 2 min. Membrana je sušena na sobnoj temperaturi, dok je fiksiranje DNK za membranu rađeno pečenjem membrane 2 sata na 80 °C u pećnici.

4.14.2. Obeležavanje probe sa digoksigenin-dUTP-om

„DIG DNA Labeling and Detection Kit” (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) korišćen je za obeležavanje DNK probe. U 1 µg denaturisane probe kuvanjem (kozmid pAZILcos/MN2 izolovan Anderson i McKay metodom), dodata je smeša koja se sastoji od: 2 µl dNTP smeše za obeležavanje (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP i 0,65 mM dTTP i 0,35 mM DIG-11-dUTP, pH 7,5), 2 µl mešavine heksanukleotida (10 x koncentrovan) i „Klenow” enzim za obeležavanje (2 U/µl), a didestilovana voda je dodata do finalne zapremine od 15 µl. Ova smeša je inkubirana preko noći na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8. Pre hibridizacije proba je prvo precipitirana etanolom (96%, -20°C) kako bi se oslobodila od neugrađenih nukleotida, nakon čega je denaturisana kuvanjem 10 min na temperaturi od 100°C, a zatim prebačena na led do narednog koraka hibridizacije. Na ovaj način je dobijena neradioaktivno obeležena proba.

4.14.3. Neradiokativna DNK/DNK hibridizacija

Hibridizacija DNK sa neradioaktivno obeleženom probom rađena je na sledeći način: nakon pečenja membrana je pakovana u kesicu sa 10 ml hibridizacionog pufera (5 x SSC koji sadrži 0,1% N-lauril sarkozil, 0,02% SDS, 1% kazein) u kojoj je inkubirana 1 h na temperaturi od 65°C. Zatim je u kesicu dodato 1 ml svežeg hibridizacionog pufera na svakih 10 cm² površine membrane u koji je prethodno dodata neradioaktivno obeležena i denaturisana proba. Hibridizacija se odvijala 24 h na 65 °C. Membrana je nakon hibridizacije oprana dva puta po 15 min: prvo u rastvoru I (2 x SSC, 0,1% SDS) na sobnoj temperaturi, a zatim u rastvoru II (0,5 x SSC, 0,1% SDS) na 65°C.

„DIG DNA Labeling and Detection Kit” (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) korišćen je za detekciju hibrida. Pranje membrane i detekcija hibrida su vršeni po uputstvu proizvođača.

4.15. „KNOCK OUT“ *lsbB* i *lmrB* GENA

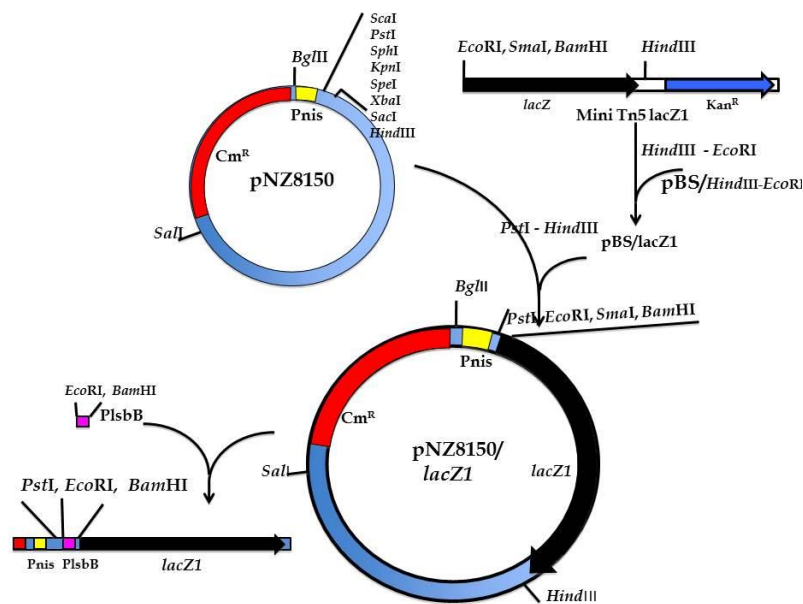
Kako bi se potvrdio značaj gena uključenih u ekspresiju *LsbB* bakteriocina, rađeni su „knock-out“ eksperimenti. Kao matrica za sve „knock-out“ eksperimente korišćen je konstrukt pAZIL/EX. “Knock-out” *lsbB* gena rađen je tako što je pAZIL/EX prvo sečen sa *NcoI* restrikcionim enzimom a potom obrađivan Klenow-im enzimom, gde su uneta još četiri nukleotida u *NcoI* mesto i na taj način izvršen “knock-out” gena. “Knock-out” *lmrB* gena rađen je tako što je nakon digestije pAZIL/EX sa *EcoRV* restrikcionim enzimom, vršena parcijalna digestija sa *ScaI* enzimom, koji se nalazi sa obe strane *EcoRV* restrikcionog mesta. Digestijom pAZIL/EX enzimima *NcoI/EcoRV* izvršen je “knock-out” *lsbB/lmrB* gena. Nakon digestija, izvršena je ligacija vektora, a ligacionim smešama su transformisane *E. coli* DH5 α ćelije. Dobijeni su konstrukti pAZIL/N, pAZIL/EV, pAZIL/NE, knock-out *lsbB*, *lmrB*, *lsbB/lmrB*, redom. Dobijenim konstruktima su transformisani sojevi MG7284 i IL1403, gde su transformanti korišćeni kao proizvođači bakteriocina u testovima, dok je kao senzitivni soj korišćen BGMN1-596.

4.16. KONSTRUISANJE VEKTORA - TRANSKRIPCIONE FUZIJE

U cilju analize nivoa transkripcije *lsbB* gena konstruisan je vektor pNZ8150/*lacZ1* gde je *lacZ1* gen kloniran u vektor pNZ8150. Transkripciona fuzija pNZ8150/*PlsbB-lacZ1* je konstruisana kloniranjem *PlsbB* promotora uzvodno od *lacZ* gena. Merenjem jačine aktivnosti *lacZ* indirektno je merena jačina promotora. Konstruisanje vektora za transkripcione fuzije rađeno je po sledećem postupku. *PlsbB* promotor je umnožen PCR metodom, gde je kao matrica korišćen plasmid pAZIL/EX, a kao prajmeri su korišćeni *PlsbBBamHIR* i *PlsbBEcoRIF* (Tabela 3). Nakon prečišćavanja, PCR produkt je kloniran u pGEM-T-Easy vektor.

lacZ1 gen je kloniran kao *EcoRI/HindIII* fragment iz pminiTn5 plazmida u pBluescript vektor. Nakon transformacije u *E. coli* DH5 α , selektovan je konstrukt pBluescript/*lacZ1* koji je sečen restrikcionim enzimima *PstI/HindIII*, a dobijeni fragment je kloniran u prethodno isečen pNZ8150 vektor (*PstI/HindIII*). *E. coli* EC101 ćelije su transformisane ligacionom smešom *PstI/HindIII* fragmenta i pNZ8150 vektora.

Promotor *PlsbB* je kao fragment *BamHI/EcoRI* prekloniran iz pGEM-T-Easy/*PlsbB* u pNZ8150/*lacZ1* konstrukt. Dobijeni konstrukt pNZ8150/*PlsbB-lacZ1* korišćen je u daljim eksperimentima. Transformacijom soja MG7284 ovim konstruktom dobijen je derivat MG7284/pNZ8150/*PlsbB-lacZ1* koji je kotransformisan konstruktima (pAZIL/*PlsbB-lsbA*, pAZIL/*PlsbB-lsbX*, pAZIL/*PlsbB-lsbY*, pAZIL/*PlsbB-lsbXY*) značajnim za definisanje regulacije ekspresije *LsbB* bakteriocina na transkripcionom nivou.



Slika 6: Konstruisanje fuzionog vektora pNZ8150/*lacZ1*. Navedena su relevantna restrikciona mesta i njihove pozicije u plazmidu, pozicije relevantnih gena i njihova orijentacija

4.17. MERENJE β -GALAKTOZIDAZNE AKTIVNOSTI

Metodom merenja β -galaktozidazne aktivnosti indirektno je merena jačina *plsbB* promotora. Aktivnost β -galaktozidaze određena je po metodi koju je opisao Miller (Miller, 1972) uz određene modifikacije. Derivati koji su nosili plazmid sa *lacZ1* genom primarno su striklovani na GM17 čvrsti medijum kome je dodat X-gal (80 μ g/ml) u četiri puta većoj koncentraciji od uobičajne koja se koristi za plavo belu selekciju kod *E. coli*. Enzimska aktivnost je merena pri $OD_{600} = 1,5$. Nakon dostizanja eksponencijalne faze rasta ćelije su oborene centrifugiranjem, a potom resuspendovane u 500 μ l PP pufera kome je dodat lizozim u koncentraciji od 4 mg/ml. Reakciona smeša je inkubirana 30 min na 37°C. Nakon inkubacije ćelije su oborene centrifugiranjem, a potom resuspendovane u 500 μ l Z-pufera (60 mM $Na_2HPO_4 \times 7 H_2O$, 40 mM $NaH_2PO_4 \times H_2O$, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 50 mM β -mercaptoethanol). Nakon homogenizovanja smeši je dodato 40 μ l hloroforma i 20 μ l 1% rastvora SDS kako bi se ćelije lizirale, odnosno došlo do permeabilizacije membrane. Potom je smeša homogenizovana na vorteks aparatu oko 1 min. Nakon 5 min inkubacije na sobnoj temperaturi, smeši je dodato 200 μ l rastvora ONPG (*ortho*-nitrophenyl- β -galactoside) (4 mg/ml). Kao posledica reakcije β -galaktozidaze i ONPG dolazi do razvijanja žute boje, čiji je intenzitet proporcionalan količini β -galaktozidaze. Nakon nastanka žute boje reakcija je zaustavljena dodavanjem 250 μ l rastvora 1 M Na-karbonata. Nakon centrifugiranja smeše (13000 rpm, 1 min), gornji deo je prenet u kivete za spektrofotometar. Merena je apsorbancija na talasnoj dužini od 550 nm i 420 nm (A_{550} i A_{420}). β -galaktozidazna aktivnost se izražava u Miller-ovim jedinicama, a preračunava se kao $(522 \cdot A_{420} / (t \cdot v \cdot OD_{600}))$, gde je t vreme potrebno za nastanak žute boje u minutima, v je početna zapremina kulture u ml, i OD_{600} je optička gustina merena na talasnoj dužini od 600nm.

5. REZULTATI

5.1. MEHANIZAM DELOVANJA LsbB BAKTERIOCINA

5.1.1. Antimikrobna aktivnost bakteriocina soja BGMN1-596T

Na osnovu prethodnih rezultata, poznato je da prirodni izolat *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, poseduje pet plazmida, produkuje tri bakteriocina (LsbA, LsbB i laktokokcin B), kao i da se strukturni geni za sintezu bakteriocina LsbA i LsbB nalaze na plazmidu pMN5. Primenom subletalne temperature i subletalne koncentracije novobiocina (41°C, 10 µg/ml) BGMN1-5 je čišćen od plazmida (Kojic *et al.*, 2006), gde je dobijen derivat BGMN1-596, potpuno očišćen od plazmida. *Lc. lactis* BGMN1-596 je naknadno transformisan plazmidom pMN5 nakon čega je dobijen derivat BGMN1-596T (Gajic *et al.*, 2003; Kojic *et al.*, 2006).

BGMN1-596T, kao i svi sojevi laboratorijske kolekcije LMM, koji su okarakterisani kao producenti bakteriocina testirani su kako bi se definisalo da li njihovi bakteriocini koriste do sada poznate mehanizame delovanja na senzitivne ćelije. Selekcija je rađena na osnovu rezultata bakteriocinskog testa gde su kao indikator sojevi korišćeni *Lc. lactis* subsp. *lactis* IL1403 i njegov man-PTS "knock-out" derivat B464. Rezultati bakteriocinskih testova su pokazali da BGMN1-596T ispoljava podjednaku antimikrobnu aktivnost, odnosno formira istu veličinu zone (7 mm) prilikom delovanja na IL1403 kao i na B464, što je ukazalo na činjenicu da bakteriocini ovog soja ne koriste komponente man-PTS sistema kao receptore.

5.1.2. Kloniranje *lsbB* gena i njegova ekspresija u MG7284 soju

Kako bi se proučavao mehanizam delovanja LsbB bakteriocina, *lsbB* gen uz *PlsbB* promotor, kloniran je i eksprimiran u soju *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG7284. Strukturni gen za LsbB bakteriocin i njegov promotor je umnožen PCR metodom, gde je kao matrica korišćen pMN5 plazmid izolovan iz derivata

BGMN1-596T. U PCR reakciji korišćeni su prajmeri lsbBF i lsbBR (Tabela 3). PCR produkt je prečišćen i kloniran u pGEM-T-Easy vektor, a potom prekloniran u pAZIL vektor kao fragment (*Bam*HI-*Pst*II). Ovim konstruktom prvo su transformisane DH5 α ćelije, selektovani plazmid je sekvenciran, a potvrđenim konstruktom je transformisan soj MG7284. Dobijeni derivat MG7284/pAZIL-lsbB je u bakteriocinskom testu formirao manju zonu (5 mm) u odnosu na BGMN1-596T (7 mm), a u daljem radu je korišćen kao proizvođač LsbB bakteriocina, gde je ispitivan antimikrobni efekat na BGMN1-596. Rezultati ovog eksperimenta su pokazali da LsbB ima antimikrobni efekat na BGMN1-596, odnosno da MG7284/pAZIL-lsbB onemogućava rast senzitivnog soja u zoni od 5 mm, dok je nanošenjem kristala enzima pronaze E (Sigma) potvrđena bakteriocinska (proteinska) priroda LsbB (Slika 7). Pored senzitivnog soja BGMN1-596, korišćeni su i sojevi IL1403 i B464 gde je dodatno pokazano da LsbB bakteriocin ne koristi komponente man-PTS sistema kao ciljne receptore na senzitivnim ćelijama, što je karakteristično za neke bakteriocine klase II.



Slika 7. Bakteriocinski test. Indikator soj, BGMN1-596; bakteriocin proizvođači, BGMN1-596T i MG7284/pAZIL-lsbB. Kristal enzima "pronase E" korišćen je kako bi se potvrdila proteinska priroda bakteriocina

5.1.3. Mutageneza soja BGMN1-596 i analiza dobijenih mutanata

U cilju dobijanja mutanata rezistentnih na LsbB bakteriocin rađena je nasumična mutageneza LsbB senzitivnog soja MNNG mutagenom. Stepenn preživljavanja nakon mutageneze iznosio je 5% kod tretiranja ćelija sa 100 µg/ml MNNG-a, a mutanti dobijeni primenom ove koncentracije MNNG korišćeni su u daljim eksperimentima. Selekcija mutanata rađena je na bakteriocinskim šoljama različite koncentracije LsbB bakteriocina. Na čvrste podloge utrljano je po 100 µl razblaženog stoka mutanata 10^{-2} i 10^{-3} . Nakon 48 h inkubiranja dobijeno je ukupno 39 rezistentnih kolonija na GM17-LsbB šoljama. Svi dobijeni mutanati, pojedinačno, korišćeni su u bakteriocinskom testu kao senzitivni sojevi, dok su kao bakteriocin proizvođači korišćeni sojevi BGMN1-596T i MG7284/pAZIL-lsbB. Mutanti dobijeni nakon selekcije na bakteriocinskim šoljama (80% "supernatanta"-bakteriocina) podeljeni su u tri kategorije u zavisnosti od senzitivnosti na pomenute proizvođače LsbB bakteriocina.

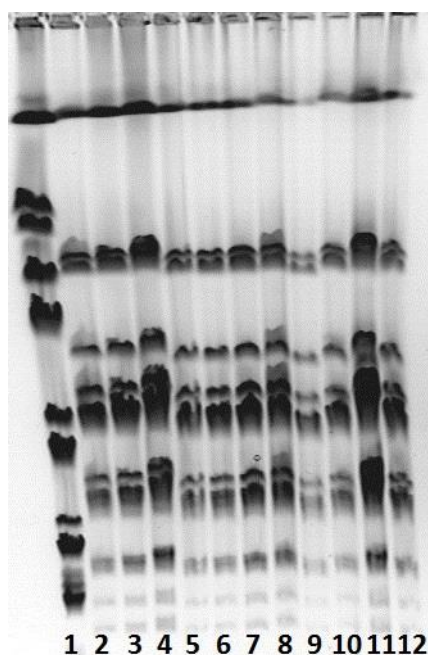
Kategorija I. Mutanti senzitivni na oba proizvođača bakteriocina (BGMN1-596T i MG7284/pAZIL-lsbB).

Kategorija II. Mutanti rezistentni na MG7284/pAZIL-lsbB, dok je zona koju BGMN1-596T formira na ovim mutantima znatno manja nego zona koju ostvaruje na polaznom soju BGMN1-596.

Kategorija III. Mutanti rezistentni na oba proizvođača bakteriocina (BGMN1-596T i MG7284/pAZIL-lsbB).

Dobijeno je 29 kolonija kategorije I (BGMN1-596R1) koje nisu dalje analizirane, s' obzirom da su selekcijom traženi rezistentni mutanti kod kojih se ispitivao uzrok rezistencije, odnosno tražio mutirani gen koji dovodi do nemogućnosti vezivanja bakteriocina za senzitivnu ćeliju koja nakon toga postaje rezistentna na LsbB bakteriocin. Selekcijom je dobijeno i pet kolonija

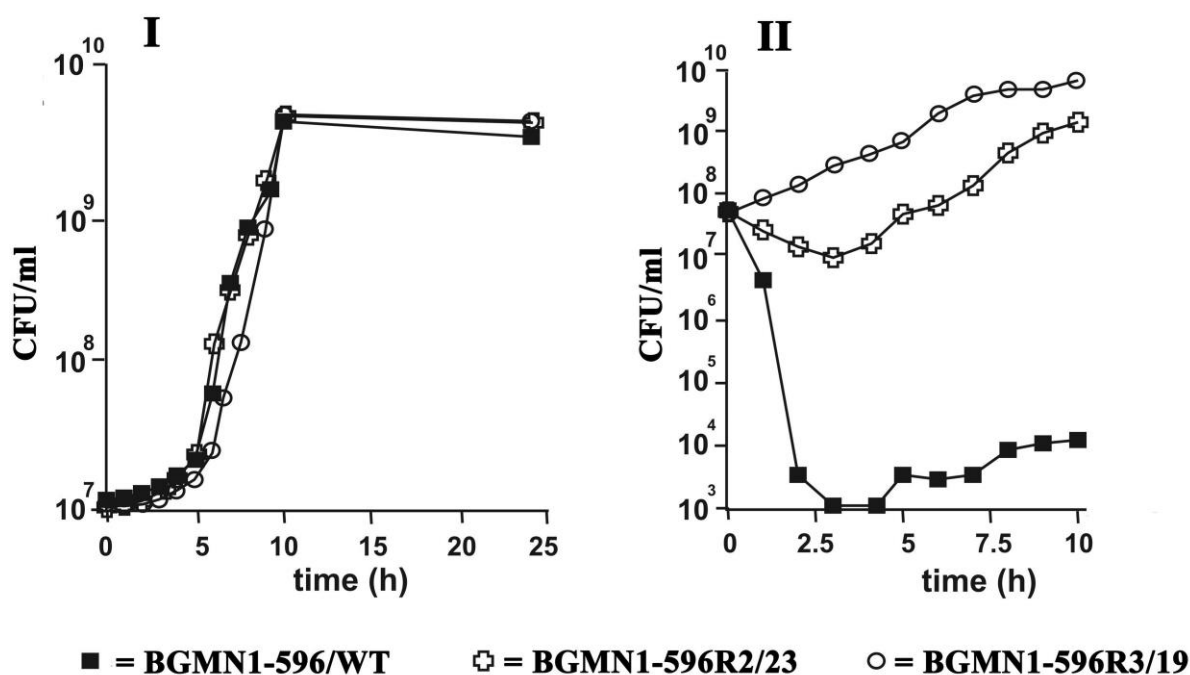
kategorije II (BGMN1-596R2/ 12, 16, 22, 23, 27) i pet kolonija kategorije III (BGMN1-596R3/ 11, 17, 19, 21, 25) koje su analizirane u daljim eksperimentima. U cilju eliminacije moguće kontaminacije sojem MG7284/pAZIL-lsbB tokom eksperimenata selekcije mutanata, odnosno potvrde da selektovani mutanati pripadaju polaznom soju BGMN1-596, rađena je PFGE, kojom je potvrđeno da su svih 10 mutanata, mutanti polaznog soja BGMN1-596 (Slika 8).



Slika 8: Prikaz rezultata PFGE. (1) MG7284; (2) BGMN1-596; (3-7) mutanti kategorije BGMN1-596R2; (8-12) mutanti kategorije BGMN1-596R3

Takođe, korišćenjem bakteriocinskog testa ukapavanja, gde se različitim koncentracijama sintetisanog LsbB bakteriocina (max 1 mg/ml – min 1 µg/ml) delovalo na mutante, uočene su razlike u toleranciji na LsbB bakteriocin između mutanata kategorija BGMN1-596R2 i BGMN1-596R3. Rezistentni mutanti kategorije III (BGMN1-596R3) rasli su na svim koncentracijama bakteriocina od 30 µg/ml do 1 mg/ml, dok su mutanti kategorije II (BGMN1-596R2) mogli da rastu do koncentracije bakteriocina od 62,5 µg/ml. Za razliku od njih, divlji soj BGMN1-596 može da raste samo na koncentraciji bakteriocina manjoj od 125

ng/ml. Rezultati testa u mikrotitar pločama pokazuju da prilikom rasta polaznog soja i mutanata, u GM17 medijumu nema razlike u samom rastu, dok pri dodatku sintetisanog LsbB bakteriocina (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), mutanti BGMN1-596R3 ostvaruju intenzivan rast, mutanti BGMN1-596R2 rastu sporije, dok je rast divljeg soja neprimetan (Slika 9). Takođe, tokom eksperimenata pri kojima je analiziran stepen tolerancije BGMN1-596 na LsbB bakteriocin dobijena su dva spontano rezistentna mutanta BGMN1-596SR1 i BGMN1-596SR2 koja su izolovana iz unutrašnjosti bakteriocinske zone. U bakteriocinskom testu, ova dva spontano rezistentna mutanta pokazuju nivo rezistencije, odnosno veličinu bakteriocinskih zona kao mutanti kategorije III (BGMN1-596R3).



Slika 9: Poređenje rasta divljeg soja BGMN1-596 i mutanata kategorije II (BGMN1-596R2/23) i kategorije III (BGMN1-596R3/19): I-bez prisustva LsbB bakteriocina; II-sa prisustvom 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LsbB bakteriocina

5.1.4. API i Biolog test

Kako bi se utvrdile eventualne razlike u fermentaciji šećera između polaznog soja BGMN1-596 i njegovih mutanata rezistentnih na LsbB bakteriocin, korišćeni su testovi bazirani na biohemijskim reakcijama, API i Biolog test. Princip ovog eksperimenta zasnivao se na sposobnosti fermentacije različitih ugljenih hidrata između divljeg soja i mutanata, gde je pretpostavka da je protein koji učestvuje u mehanizmu unosa nekog šećera koji ne fermentišu mutirani derivati, a fermentiše divlji soj potencijalni receptor za bakteriocin. Rezultati API testa su pokazali da nema ni jedne razlike u fermentaciji 49 šećera koji su korišćeni u prethodno opisanom protokolu.

Biolog testom koji koristi ploču od 190 različitih izvora ugljenika testirani su polazni soj BGMN1-596, kao i njegovi mutanti BGMN1-596R2 i BGMN1-596R3 (po jedan predstavnik iz svake grupe), kako bi se odredilo da li komponente transporta nekog drugog šećera mogu biti receptori za LsbB bakteriocin. U ovaj test takođe su uključeni i laktokokcin A i garvicin ML rezistentni mutant kao kontrole s obzirom da su receptori za ove bakteriocine uključeni u metabolizam šećera (man-PTS za laktokokcin A i maltoza-ABC transporter za garvicin ML). Kao što je i očekivano, mutant rezistentan na laktokokcin A, kao i mutant rezistentan na garvicin ML ne mogu da fermentišu glukozu odnosno maltozu, koji su supstrati odgovarajućih transportera. Kada se posmatraju LsbB rezistentni mutanti, između samih mutanata nisu pronađene razlike u fermentativnom profilu, dok su poređenjem mutanata i polaznog soja pronađene određene razlike u pogledu sposobnosti korišćenja različitih izvora ugljenika (Tabela 5). Ove razlike, kako se pokazalo nisu imale ulogu u rezistenciji LsbB mutanata.

Tabela 5: Prikaz izvora ugljenika koje polazni soj BGMN1-596 može koristiti, dok MNNG mutanti ne mogu

Ploče	Biolog testa	Izvor ugljenika
PM1		D-glukuronska kiselina
PM1		Timidin
PM1		α -keto buterna kiselina
PM1		Laktoza
PM1		β -metil-D-glukozid
PM1		Adenozin
PM1		D-celobioza
PM1		Inozin
PM1		N-acetil- β -D-manozamin
PM1		Metil-piruvat
PM2		Amigdalinalin
PM2		Gentiobioza
PM2		Turanoza
PM2		γ -ciklodekstrin

5.1.5. Kozmidna biblioteka soja BGMN1-596

Kozmidna biblioteka senzitivnog soja BGMN1-596 konstruisana je u cilju pretraživanja genoma i definisanja gena koji kodira protein odgovoran za senzitivnost ovog soja na LsbB bakteriocin. Konstruisanje biblioteke podrazumevalo je izolaciju hromozomalne DNK, kloniranje fragmenata u kozmid pAZILcos i pakovanje kozmidne DNK u λ fage, a potom transformaciju *E. coli* HB101. Dobijeno je 148 kozmidnih klonova, gde je svaki kozmidni klon nosio oko 40 kb upakovane hromozomalne DNK soja BGMN1-596. Izolovanom kozmidnom DNK iz HB101 ćelija transformisane su ćelije rezistentnih mutanata BGMN1-596R2 i BGMN1-596R3. U bakteriocinskom testu gde su kao senzitivni sojevi korićeni dobijeni transformanti selektovani su oni koji su postali ponovo senzitivni na LsbB bakteriocin. Na taj način je definisan kozmid pAZILcos/MN2 koji je komplementirao rezistentne mutante, odnosno povratio

senzitivnost na LsbB bakteriocin. Ovo je potvrđeno bakteriocinskim testovima, gde su BGMN1-596R3/19 pAZILcos/MN2 i BGMN1-596R2/23 pAZILcos/MN2 korišćeni kao indikator sojevi a kao bakteriocinski proizvođači korišćeni su sojevi BGMN1-596T i MG7284/pAZIL-lsbB. Ovim testom potvrđena je sposobnost vraćanja senzitivnosti na LsbB bakteriocin kod komplementiranih mutanata.



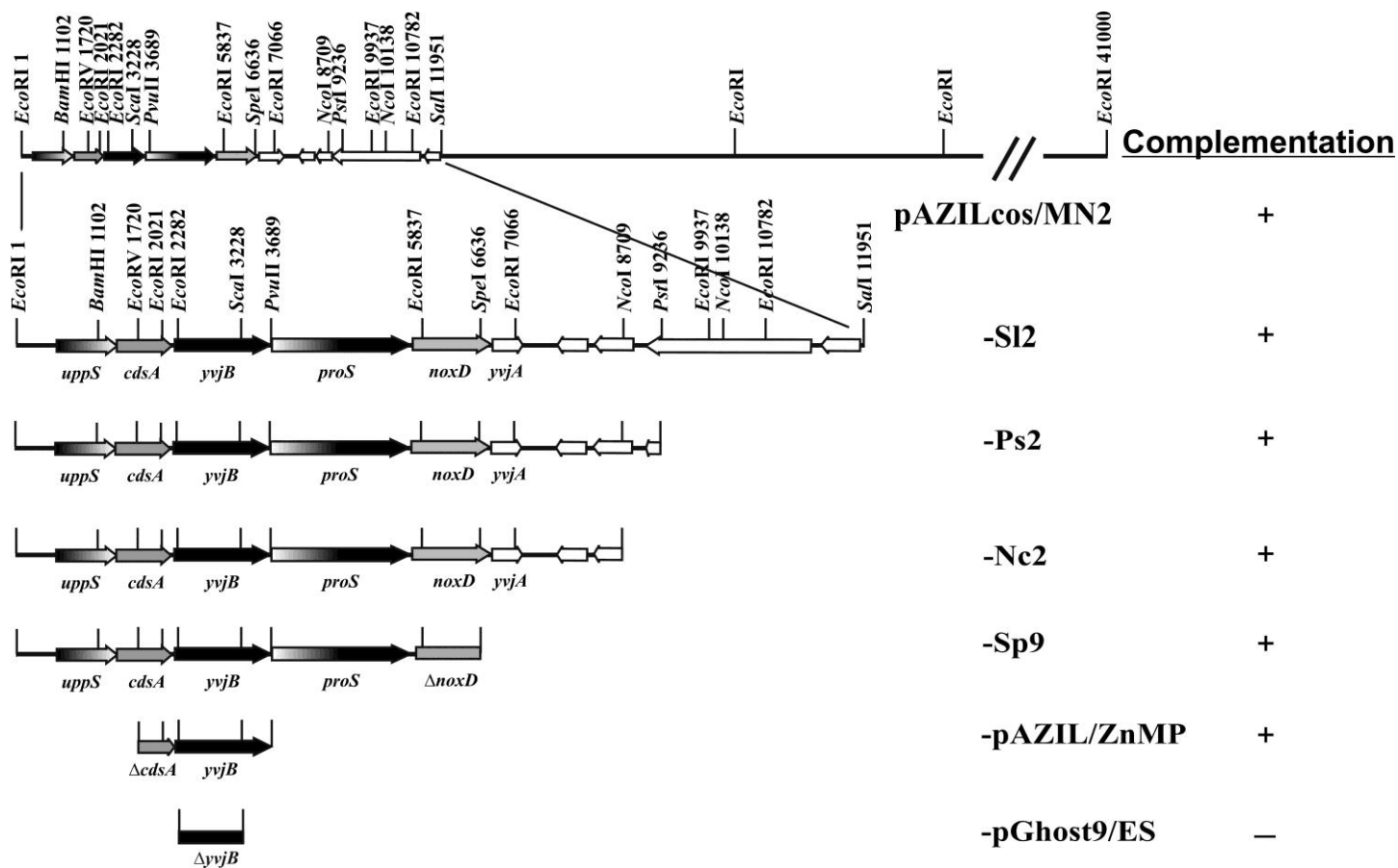
Slika 10. Komplementirani mutant BGMN1-596R3/19 kozmidom pAZILcos/MN2. Indikator soj, BGMN1-596R3/19 pAZILcos/MN2; bakteriocin proizvođači, (1) MG7284/pAZIL-lsbB; (2) BGMN1-596T

5.1.6. Komplementiranje rezistentnih mutanata manjim fragmentima pAZILcos/MN2

Uporedo sa sekvenciranjem kozmida pAZILcos/MN2 “primer walking” metodom, a u cilju bržeg definisanja najmanje genetičke jedinice koja može da komplemetira LsbB rezistente mutante, kozmid je sečen različitim restrikcionim enzimima (*EcoRI*, *HindIII*, *SmaI*, *SpeI*, *NcoI*, *PstI*, *SalI*, *BamHI*, *EcoRV* i *XhoI*), gde su enzimi *SmaI*, *SpeI*, *NcoI* i *PstI* izdvojili fragmente od interesa. Nakon digestije pAZILcos/MN2 rađena je ligacija kozmida, transformacija *E. coli* DH5α ćelija, nakon čega su selektovani kozmidi kojima su transformisani mutanti rezistentni na LsbB bakteriocin (BGMN1-596R2 i BGMN1-596R3). Dobijeni transformanti

su korišćeni u bakteriocinskom testu kao indikator sojevi, dok su BGMN1-596T i MG7284/pAZIL-lsbB korišćeni kao bakteriocin proizvođači.

Konstrukti koji su vratili senzitivnost (sečeni enzimima *Sma*I, *Spe*I, *Nco*I i *Pst*I), korišćeni su za mapiranje i sekvenciranje regiona kozmida pAZILcos/MN2 odgovornog za senzitivnost na bakteriocin. Najmanji DNK fragment koji je povratio senzitivnost mutantima, konstrukt Sp9, potpuno je sekvenciran, a analiza dobijenih sekvenci je pokazala da ovaj fragment kodira pet ORF-ova ("Open Reading Frame" - otvoreni okvir čitanja), od kojih je jedan nepotpun (*uppS*, *cdsA*, *yvjB*, *proS*, i skraćen *noxDV*) (Slika 11). U sledećem koraku kloniran je svaki gen pojedinačno u pAZIL vektor, a dobijenim konstruktima je potom transformisan rezistentni mutant BGMN1-596R3/19. Pokazano je da konstrukt pAZIL/ZnMP, koji nosi *yvjB* gen, u potpunosti vraća senzitivnost mutantima BGMN1-596R3/19 i BGMN1-596R2/23.

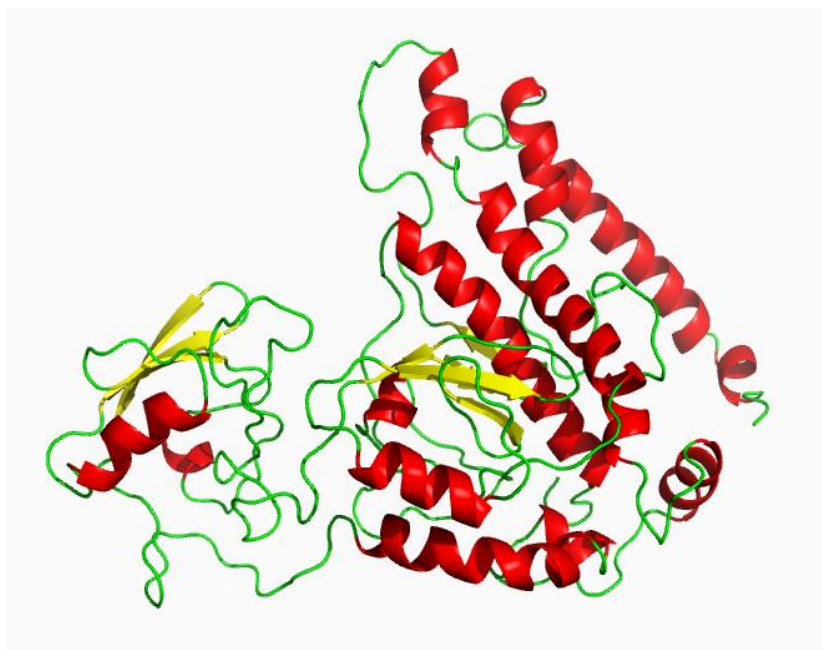


Slika 11. Linearna mapa gena kozmida pAZILcos/MN2. Prikaz klonova korišćenih za homologu i heterologu ekspresiju *yvjB* gena. Prikazana su relevantna restrikciona mesta, kao i veličina i orijentacija gena (Uzelac *et al.*, 2013)

Gen *yvjB* kodira YvjB protein, Zn-zavisnu metalopeptidazu čija je proteinska sekvenca predstavljena u daljem tekstu, a 3D struktura je prikazana na slici 12. Ovaj gen/protein predstavlja najmanju genetičku jedinicu sposobnu da povрати senzitivnost rezistentnim mutantima.

Proteinska sekvenca YvjB BGMN1-596:

```
LIETLITFIIIFGIIVAIHEYGHLWWAKRSGILVREYAVGMGPKIFAHQAKDGTLYAIRILPLGGY  
VRLAGWGDDKTEIKKGQAASLVVSKSEVVNPEAENSVSNI VRRINLSEHVELEEAI PMLITEY  
DFEKELFIEGEVFGEIKRYSVDHDA TIIEDGTEVRIAPLDVQYQSAGVFHKMLTNFGGPLNNF  
ILGIIAFIVLTFVQGGVPSTTNAIGQVEKGT PAYNAGLKAGDKIEAVNGTKTADWNNVVTEIS  
GSKGKELKLEVSRSKGSETLSVTPKKMDGSYRVGIMQSMKTGFFDKITGGFVQAGQSATAIFK  
ALGSLIARPSLDKLGGPVAIYQLSGQAARAGFPAIVYLLAMLSINLGIVNLFPIPVLDGGKIVL  
NIEAIRGKALSQEKESIITMVG VVFMLVLFVAVTWNDILRAFVN
```



Slika 12. Predviđena sekundarne strukture YvjB proteina. Korišćen program Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0

5.1.7. Komplementiranje LsbB rezistentnih mutanata konstruktom pAZIL/ZnMP

Kao što je ranije navedeno, samo je konstrukt pAZIL/ZnMP koji nosi *yvjB* gen komplementirao mutante rezistentne na LsbB bakteriocin. Sam pAZIL/ZnMP dobijen je prekloniranjem *yvjB* gena iz Sp9 kao fragment *PvuII/EcoRV* u pAZIL vektor prethodno sečen *SmaI* restrikcionim enzimom. Na taj način kloniran je nešto širi okvir gena od 1969 bp, dok je sam *yvjB* gen veličine od 1284 bp. Transformacijom mutanata BGMN1-596R3/19 dobijen je derivat (BGMN1-596R3/19 pAZIL/ZnMP), koji je u bakteriocinskim testovima korišćen kao indikator soj. Kao bakteriocin proizvođači korišćeni su derivati BGMN1-596T i MG7284/pAZIL-lsbB. Rezultati ovog testa pokazuju da konstrukt pAZIL/ZnMP, odnosno *yvjB* gen, komplementira rezistentni mutant BGMN1-596R3/19. Nakon ovog eksperimenta, svi mutanti II i III kategorije, kao i spontano rezistentni mutanti BGMN1-596SR1 i BGMN1-596SR2 su transformisani ovim konstruktom gde je kod svih mutanata vraćena senzitivnost na LsbB bakteriocin.

5.1.8. Komparativna analiza DNK sekvence *yvjB* gena

Paralelno sa eksperimentima kloniranja gena, rađeno je i poređenje sekvenciranih genoma soja BGMN1-596 i po jednog LsbB rezistentnog mutanta iz svake kategorije (BGMN1-596R2/23 i BGMN1-596R3/19) u cilju identifikovanja mutiranog gena koji dovodi do rezistencije na LsbB bakteriocin. Rezultati dobijeni poređenjem genoma pokazuju da se kod oba mutanta javljaju mutacije u *yvjB* genu ali su one različite kako u pogledu pozicije (lokalizacije) tako i strukturno. Pored mutacija u *yvjB* genu nasumičnom mutagenozom MNNG mutagenom, mutirano je još nekoliko gena (Tabela 6).

Tabela 6: Prikaz mutiranih gena po kontigovima u BGMN1-596R2/23 i BGMN1-596R3/19 u odnosu na BGMN1-596

Kontig	BGMN1-596R2/23	BGMN1-596R3/19
Kontig 409	Kodon 188 GGU(G)→AGU(S) <i>yvjB</i> gen	Kodon 248 TGG(W) →TAG(STOP) <i>yvjB</i> gen
Kontig 427	Kodon 177 CAC(H) →AAC(N) <i>gyrB</i> gen	Kodon 177 CAC(H) →AAC(N) <i>gyrB</i> gen
Kontig 434	Delecija 34 bp, <i>rpoA</i> gen	Delecija 34 bp, <i>rpoA</i> gen
Kontig 435	Kodon 284 CGC(R)→CAC(H) <i>rpoD</i> gen	Kodon 284 CGC(R)→CAC(H) <i>rpoD</i> gen
Kontig 440	Tihe mutacije, predikcija Glimmer	Tihe mutacije, predikcija Glimmer

U YvjB proteinu (Zn-zavisna metalopeptidaza) mutanta BGMN1-596R3/19 uočen je STOP kodon na poziciji 248, dok je veličina celog proteina 428 ak. Kod mutanta BGMN1-596R2/23, u istom proteinu mutageneza je dovela do aminokiselinske zamene na poziciji 188. Kako bi se analizirali i ostali mutanti (kategorija BGMN1-596R2, BGMN1-596R3 i BGMN1-596SR), *yvjB* gen je umnožen PCR metodom korišćenjem hromozomalne DNK pomenutih mutanata kao matrice i prajmera ORFF i ORFR (Tabela 3). Rezultati ove analize su pokazali da su u svim mutantima rezistentnim na LsbB prisutne mutacije u *yvjB* genu. Sve promene u YvjB proteinu kod ostalih mutanata prikazane su u tabeli 7.

Tabela 7. Prikaz pozicije i vrsta mutacija u YvjB proteinu LsbB rezistentnih mutanata

Naziv mutanata	Lokacija mutacije u <i>yvjB</i> genu	Veličina proteina
MNNG mutant		
BGMN1-596R2		
BGMN1-596R2/12	Gly → Ser (188)	428
BGMN1-596R2/16	Gly → Ser (188), Phe → Leu (414), Val → Gly (415), Asn → Lys (428)	428

BGMN1-596R2/22	Gly → Ser (188), Phe → Leu (414), Val → Gly (415), Asn → Met (428)	428
BGMN1-596R2/23	Gly → Ser (188)	428
BGMN1-596R2/27	Gly → Ser (188), Phe (TTT) → STOP kodon TAA (414)	413
BGMN1-596R3		
BGMN1-596R3/11	Gln (CAA) → STOP kodon TAA (172)	171
BGMN1-596R3/17	Gln (CAA) → STOP kodon TAA (172)	171
BGMN1-596R3/19	Trp (TGG) → STOP kodon TAG (248)	247
BGMN1-596R3/21	Pozicija 558 – delecija C, STOP kodon TGA (570)	189
BGMN1-596R3/25	Gly (CAA) → STOP kodon TAA (172)	171
Spontani mutant		
BGMN1-596SR		
BGMN1-596SR1	Trp (TGG) → STOP kodon TAG (26)	25
BGMN1-596SR2	Trp (TGG) → STOP kodon TAG (248)	247

U YvjB proteinima, svih mutanata BGMN1-596R2 došlo je do aminokiselinske zamene na poziciji 188 (zamena glicina serinom), gde protein ostaje iste veličine kao i protein u soju BGMN1-596 (428 ak). YvjB protein mutanta BGMN1-596R2/27, takođe ima i STOP kodon na poziciji 414, gde daje okrnjen protein od 413 ak. Svi YvjB proteini mutanata grupe BGMN1-596R3 imaju STOP kodon na različitim pozicijama, što dovodi do ekspresije okrnjenog YvjB proteina.

Uzimajući u obzir rezultate dobijene nakon ekspresije kloniranog gena i sekvenciranjem genoma, dobijene su jasne indikacije da je *yvjB* gen (YvjB protein) odgovoran za senzitivnost soja BGMN1-596 na LsbB bakteriocin, kao i to da je upravo ovaj membranski protein receptor za LsbB, bakteriocin podklase IId.

5.1.9. "Knock-out" *yvjB* gena

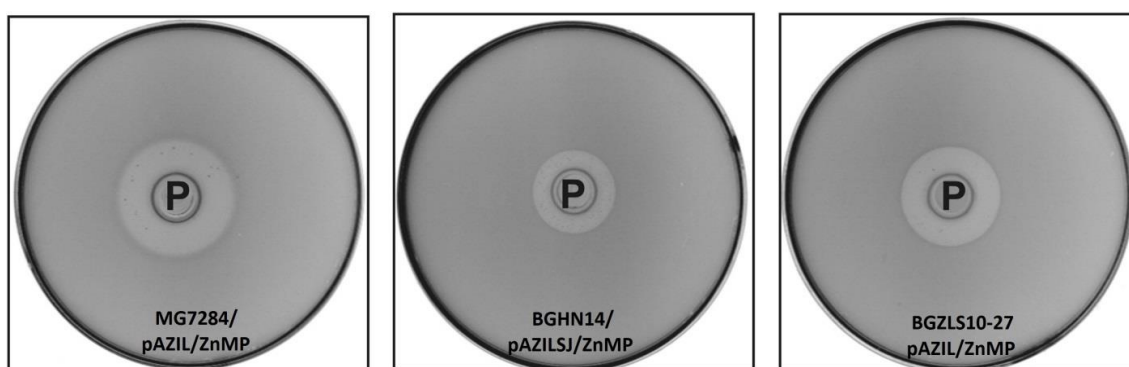
"Knock-out"-om *yvjB* gena u sojevima BGMN1-596 i IL1403, senzitivnim na LsbB bakteriocin, potvrđena je ispravnost dosadašnjih zaključaka. Za ovaj eksperiment korišćen je konstrukt pGhost9/ES koji sadrži temperaturno nestabilan replikon i deo *yvjB* gena koji se homologom rekombinacijom na 37°C integriše u ciljni gen u hromozomu. Analizirani sojevi BGMN1-596 i IL1403 transformisani su ovim konstruktom, a rezultati pokazuju da su transformanti koji su rasli na temperaturi od 28°C (kontrola), senzitivni na LsbB bakteriocin, dok su transformanti koji su rasli na 37°C postali rezistentni na LsbB bakteriocin. Ovim je potvrđeno da inaktivacija *yvjB* gena u soju senzitivnom na LsbB bakteriocin dovodi do rezistencije na ovaj bakteriocin.

5.1.10. Heterologa ekspresija *yvjB* gena

Kako bi se ispitalo da li je *yvjB* gen odgovoran za senzitivnost na LsbB bakteriocin samo kod određenih sojeva ili rodova bakterija, *yvjB* gen je kloniran u heterologe predstavnike BMK koji su prirodno rezistentni na LsbB bakteriocin. U ovim eksperimentima su korišćena tri soja, kao predstavnici različitih rodova: *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG7284, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* HN14 i *E. faecalis* BGZLS10-27. Kako se plasmid pAZIL replikuje u laktokokama i enterokokama MG7284 odnosno BGZLS10-27, za transformaciju ova dva soja korišćen je konstrukt pAZIL/ZnMP, dok je za transformaciju BGHN14 korišćen konstrukt pAZILSJ/ZnMP (pAZIL koji u sebi sadrži "origin" replikacije pSJ2-8 plazmida koji je aktivan u laktobacilima) (Kojic *et al.*, 2010). Transformanti ovih sojeva u kojima je eksprimiran *yvjB*_{BGMN1-596} postali su senzitivni na LsbB bakteriocin (Slika 13).

Da bi se ustanovilo koje razlike u *yvjB* genu između senzitivnih i rezistentnih sojeva dovode do drugačije strukture YvjB proteina i do rezistencije na LsbB urađeno je poređenje sekvenci ovog gena iz LsbB senzitivnih sojeva

BGMN1-596 i IL1403 sa sekvencom *yvjB* gena u LsbB rezistentnim sojevima: MG7284, BGZLS10-27 i BGHN14. Nakon izolovanja hromozomalne DNK ovih sojeva, metodom PCR reakcije umnožen je *yvjB* gen, gde su korišćeni prajmeri ORFR i ORFF (Tabela 3). Rezultati sekvenciranja nedvosmisleno pokazuju da postoje značajne razlike u sekvencama ovog gena u različitim sojevima/rodovima (npr. 31 razlika na aminokiselinskom nivou između MG7284 i BGMN1-596). Razlike postoje kako između sojeva prirodno rezistentnih na LsbB bakteriocin međusobno, tako i poređenjem sa sekvencama gena u senzitivnim sojevima BGMN1-596 i IL1403, dok između sojeva BGMN1-596 i IL1403 postoji samo jedna aminokiselinska razlika, što ukazuje na važnost strukture YvjB proteina u pogledu senzitivnosti ćelija na LsbB bakteriocin.



Slika 13. Prirodno rezistentni sojevi MG7284, BGHN14 i BGZLS10-27, nakon transformacije sa pAZIL/ZnMP, postaju senzitivni na LsbB bakteriocin, što je potvrđeno bakteriocinskim testom.

Indikator sojevi, MG7284/pAZIL/ZnMP; BGHN14/ pAZILSJ/ZnMP; BGZLS10-27/pAZIL/ZnMP; Bakteriocin proizvođač, (P) MG7284/pAZIL-lsbB

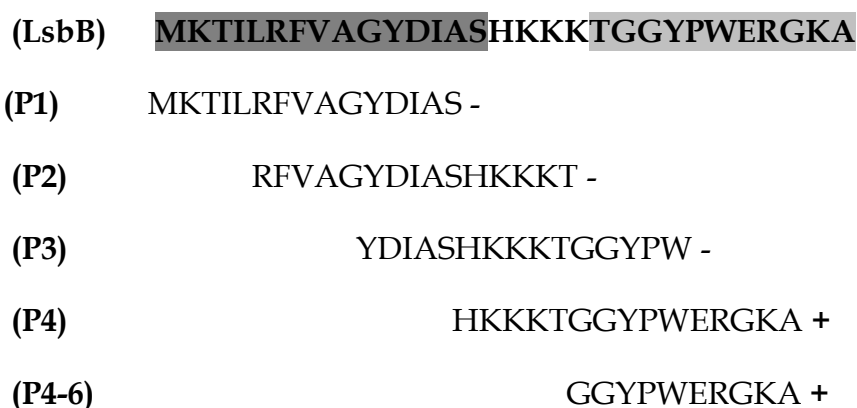
5.2. LsbB BAKTERIOCIN - INTERAKCIJA SA RECEPTOROM

Nakon što je u prethodnim istraživanjima pokazano da LsbB bakteriocin zahteva prisustvo membranskog receptora, YvjB proteina (Zn-zavisna metalopeptidaza) da bi ispoljio svoje antimikrobno delovanje, dalja istraživanja bila su usmerena na strukturu samog bakteriocina, odnosno definisanje domena koji je uključen u vezivanje bakteriocina za receptor.

Sintetisana su najpre četiri peptida koja su sadržala različite domene LsbB bakteriocina, od kojih se svaki sastojao od 15 aminokiselina, pri čemu su se oni međusobno poklapali sa pomerajem. Domeni označeni sa P1 (1-15 ak), P2 (6-20 ak), P3 (11-25 ak) i P4 (16-30) su ispitivani kako bi se utvrdila njihova potencijalna kompeticija sa celim LsbB bakteriocinom za aktivna mesta na receptoru (Slika 14), odnosno sposobnost blokiranja antimikrobne aktivnosti celog bakteriocina. Sintetisani peptidi P1, P2 i P3 nisu uspeali da zaštite IL1403 i BGMN1-596 od antimikrobnog delovanja LsbB bakteriocina, dok je peptid P4, koji sadrži poslednjih 15 ak (16-30 ak) uspeo da inhibira antimikrobnu aktivnost LsbB bakteriocina, odnosno smatra se da se ovaj peptid vezao za aktivna mesta na receptoru indikator soja (BGMN1-596 i IL1403) i na taj način inhibirao aktivnost naknadno dodatog LsbB bakteriocina. Kako bi se dalje ispitaio značaj ovih ostataka, sintetisani su manji peptidi od po 10 aminokiselina u okviru peptida P4, koji se međusobno preklapaju. Samo je peptid P4-6 koji sadrži poslednjih 10 aminokiselina (GGYPWERGKA) uspeo da blokira aktivnost LsbB odnosno da zaštiti ćelije senzitivnih sojeva od antimikrobnog delovanja LsbB bakteriocina. Rezultati takođe pokazuju da je peptid P4-6 mnogo manje potentan nego P4 (oko 200 puta). Na osnovu ovih eksperimenata može se zaključiti da je C-terminalni region LsbB bakteriocina odgovoran za vezivanje bakteriocina za receptor (Ovchinnikov *et al.*, 2014).

Kako bi se odredio najkraći deo (domen) LsbB bakteriocina koji vezivanjem za aktivna mesta na receptoru ima sposobnost zaštite ćelije od LsbB bakteriocina, dizajnirani su i sintetisani peptidi u okviru P4-6: PC-8

(YPWERGKA), PC-7 (PWERGKA), PC-6 (WERGKA), PC-5 (ERGKA) i PC-4 (RGKA). Pokazano je da PC-8 ima slični potencijal kao P4-6, dok PC-7 i PC-6 imaju 5 odnosno 25 puta manji potencijal blokiranja LsbB bakteriocina. PC-5 i PC-4 ne mogu da spreče delovanje LsbB bakteriocina na senzitivne sojeve.



Slika 14. Prikaz različitih regiona LsbB bakteriocina koji su testirani; + peptidi koji se mogu vezati za receptor LsbB bakteriocina; peptidi koji se ne mogu vezati za receptor LsbB bakteriocina (Ovchinnikov *et al.*, 2014)

5.2.1. Mutacije aminokiselina na C-terminusu LsbB bakteriocina

Kako je potvrđeno da poslednjih 10 aminokiselina C-terminalnog kraja (P4-6) blokira vezivanje LsbB bakteriocina za receptor (Ovchinnikov *et al.*, 2014), takođe da je PC-6 (WERGKA) najmanji peptid koji ima sposobnost blokiranja LsbB bakteriocina, rađene su zamene aminokiselina mestospecifičnom mutagenezom na LsbB bakteriocinu (Tabela 8), u cilju određivanja značaja svake aminokiseline u vezivanju za receptor. Rezultati testova pokazuju da mutirani peptid PA-3 kod koga je mesto specifičnom mutagenezom triptofan (W) zamenjen alaninom (A) (LsbB-A25) ne ispoljava bakteriocinsku aktivnost na senzitivne ćelije (izostanak zone inhibicije u bakteriocinskom testu). Svi ostali peptidi (PA-1, PA-2, PA-4, PA-5 i PA-6)

ispoljavaju zone inhibicije delovanjem na senzitivni soj BGMN1-596, što pokazuje da oni i dalje poseduju sposobnost vezivanja za receptor na membrani senzitivne ćelije (Slika 15).



Slika 15. Rezultati bakteriocinskog testa. Indikator soj, BGMN1-596; bakteriocin proizvođači-derivati koji produkuju mutirane LsbB bakteriocine, (1, 2) MG7284/pAZIL-LsbB-A23, (3, 4, 5, 6) MG7284/pAZIL-LsbB-A24, (7, 8) MG7284/pAZIL-LsbB-A25, (9, 10) MG7284/pAZIL-LsbB-A26, (11, 12) MG7284/pAZIL-LsbB-A27, (13, 14) MG7284/pAZIL-LsbB-A29, (15) BGMN1-596T, (16) MG7284/pAZIL-lsbB

Tabela 8. Prikaz peptida nastalih mesto specifičnom mutagenezom *lsbB* gena

Naziv mutiranog LsbB	Sekvenca proteina	Naziv proteina
LsbB	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYPWERGKA	LsbB
LsbB-A23	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGAPWERGKA	PA-1
LsbB-A24	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYAWERGKA	PA-2
LsbB-A25	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYPAERGKA	PA-3
LsbB-A26	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYPWARGKA	PA-4
LsbB-A27	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYPWEAGKA	PA-5
LsbB-A29	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYPWERGAA	PA-6

*Mesto aminokiselinske zamene alaninom je podebljano

5.2.2. Mutacije na C-terminalnom alaninu LsbB bakteriocina

Značaj poslednje aminokiseline LsbB bakteriocina, kao i dužine samog bakteriocina prilikom vezivanja za receptor vidi se iz rezultata koji pokazuju da mutirani bakteriocin gubi aktivnost kada se izvrši delecija poslednje aminokiseline ili doda još jedan alanin, takođe, ukoliko se alanin zameni cikličnom amino kiselinom dolazi do neaktivnosti takvog bakteriocina (izostanak zone inhibicije u bakteriocinskom testu). Međutim, ukoliko se alanin zameni aminokiselinama iz iste grupe (alifatične aminokiseline), ili serinom (hidroksilna grupa) bakteriocinska aktivnost je potpuna (Slika 16).



Slika 16. Rezultati bakteriocinskog testa. Indikator soj, BGMN1-596; bakteriocin proizvođači-derivati koji produkuju LsbB bakteriocin mutiran na terminalnom alanine, (1, 2) MG7284/pAZIL-LsbB- Δ A30; (3, 4) MG7284/pAZIL-LsbB-A30+A31; (5, 6) MG7284/pAZIL-LsbB-A30-V; (7, 8) MG7284/pAZIL-LsbB-A30-G; (9, 10) MG7284/pAZIL-LsbB-A30-S; (11, 12) MG7284/pAZIL-LsbB-A30-P; (13) BGMN1-596T; (14) MG7284/pAZIL-lsbB

Tabela 9. Prikaz peptida nastalih mesto specifičnom mutagenozom krajnjih nukleotida *lsbB* gena

Naziv mutiranog LsbB	Sekvenca proteina	Naziv proteina
LsbB	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYPWERGKA	LsbB
LsbB-ΔA30	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYPWERGK-	PA-Δ
LsbB-A30+A31	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYPWERGKAA	PA-AA
LsbB-A30-V	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYPWERGKV	PA-V
LsbB-A30-G	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYPWERGKG	PA-G
LsbB-A30-S	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYPWERGKS	PA-S
LsbB-A30-P	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYPWERGKP	PA-P

* Mesto aminokiselinske zamene je podebljano

5.3. REGULACIJA EKSPRESIJE LsbB BAKTERIOCINA

Analiza regulacije ekspresije LsbB bakteriocina odnosila se na karakterizaciju gena (regiona pMN5 plazmida) uključenog u pojačanu ekspresiju LsbB bakteriocina u derivatu BGMN1-596T u odnosu na derivat MG7284/pAZIL-*lsbB*.

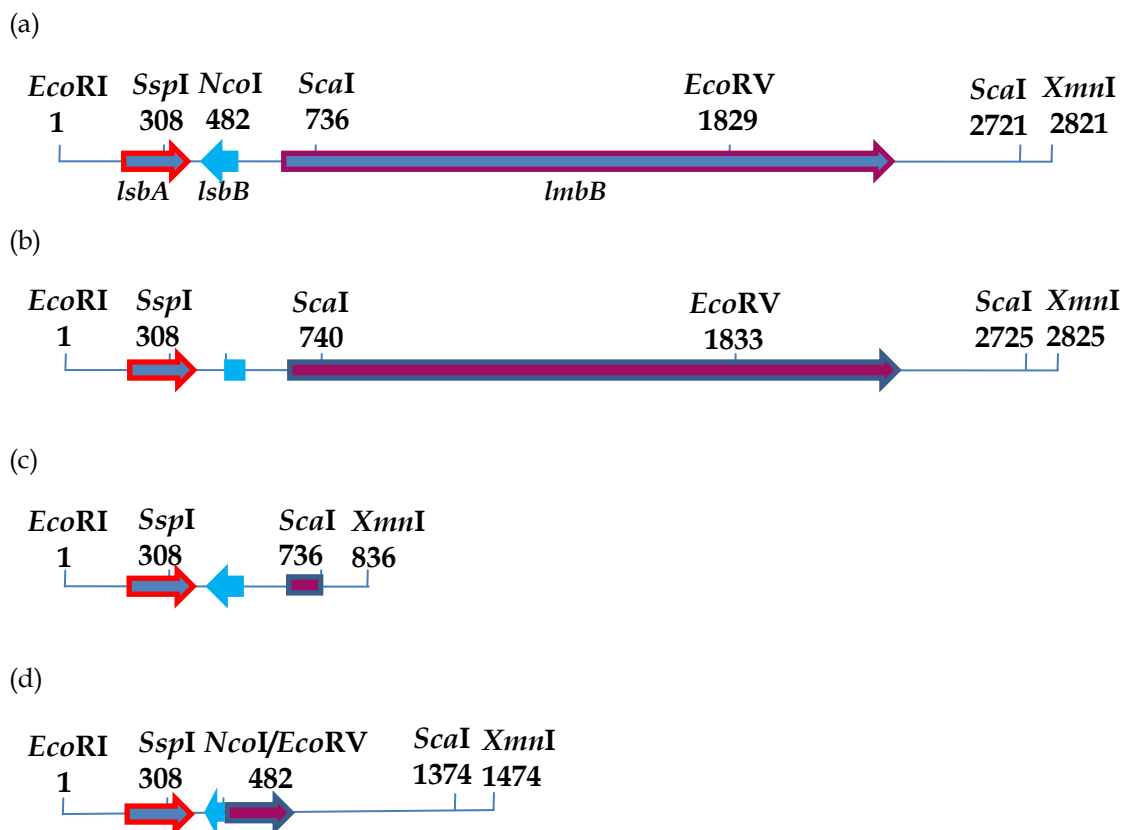
Tokom bakteriocinskih testova pri kojima su kao bakteriocin proizvođači korišćeni BGMN1-596T i MG7284/pAZIL-*lsbB*, uočene su razlike u veličini zona (7 mm odnosno 5 mm) koje bakteriocini ovih sojeva formiraju kao posledica inhibicije rasta senzitivnog soja BGMN1-596. Prethodna istraživanja su pokazala da soj BGMN1-5 nosi gene za sintezu tri bakteriocina, i da su dva (*lsbA* i *lsbB*) na pMN5 plazmidu. Razlika u veličini zona između ova dva bakteriocin proizvođača se može objasniti ako se uzme u obzir prisustvo drugog bakteriocina (LsbA) (*lsbA* nije prisutan u klonu pAZIL-*lsbB*).

5.3.1. BGMN1-596T sintetiše samo LsbB bakteriocin

Nemogućnost ekspresije LsbA bakteriocina, kao i odsustvo zone inhibicije prilikom korišćenja sintetisanog LsbA peptida, razlozi su analiziranja ovog gena, odnosno bakteriocina metodama molekularne genetike. Kako bi se pokazalo da LsbA nema bakteriocinsku prirodu bilo je potrebno izvršiti "knock-out" različitih gena na pMN5 plazmidu. Rađen je "knock-out" *lsbB* i *lmrB* gena pojedinačno, kao i "knock-out" oba gena istovremeno (*lsbB/lmrB*). Derivat MG7284/pAZIL/EX u bakteriocinskom testu formira zonu iste veličine kao BGMN1-596T (7 mm), zbog čega se smatra da pAZIL/EX sadrži sve potrebne gene kao i pMN5 za ekspresiju bakteriocina koji formira zonu od 7 mm. "Knock-out" eksperimenti su iz tog razloga rađeni na konstruktima pAZIL/EX nakon čega su dobijeni odgovarajući konstrukti pAZIL/N, pAZIL/EV, pAZIL/NE ("knock-out" *lsbB*, *lmrB*, i *lsbB/lmrB*). Mape dobijenih konstrukata prikazane su na slici 17.

Transformacijom MG7284 i IL1403 ovim konstruktima, dobijeni su derivati MG7284/pAZIL-N i IL1403/pAZIL-N za *lsbB* "knock-out"; MG7284/pAZIL-NE i IL1403/pAZIL-NE za "knock-out" *lsbB/lmrB*; dok je za "knock-out" *lmrB* gena dobijen derivat MG7284/pAZIL-EV. Transformacijom IL1403 sa pAZIL/EV nisu dobijeni transformanti što je i očekivano, s obzirom da IL1403 nema ni jedan od Lmr proteina (LmrP ili LmrB) koji bi obezbedili imunost IL1403 na LsbB bakteriocin. Svi dobijeni derivati korišćeni su u bakteriocinskim testovima kao bakteriocin proizvođači dok je kao senzitivni soj korišćen BGMN1-596.

Rezultati pokazuju da "knock-out" *lsbB*, a takođe i *lsbB/lmrB* gena dovodi do izostanka bakteriocinske aktivnosti, što je dokaz da LsbA nema bakteriocinsku prirodu. "Knock-out" *lmrB* gena ne dovodi do promene aktivnosti bakteriocina, derivat MG7284/pAZIL-EV ispoljava istu veličinu zone inhibicije kao i BGMN1-596T (7 mm), jer se LsbB bakteriocin može transportovati i drugim Lmr proteinom prisutnim u soju MG7284 (LmrP).



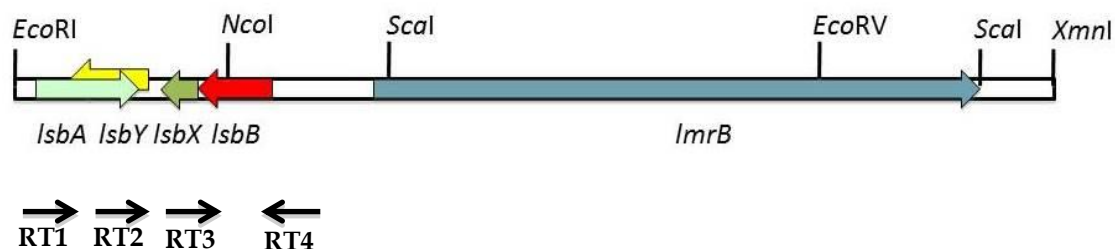
Slika 17: Restrikciona mapa konstrukata: (a) PAZIL/EX; (b) pAZIL/N; (c) pAZIL/EV; (d) pAZIL/NE. Navedena su relevantna restrikciona mesta i njihove pozicije u konstrukt, pozicije relevantnih gena i njihova orijentacija

5.3.2. Region pMN5 plazmida odgovoran za ekspresiju LsbB bakteriocina

Na osnovu prethodnih rezultata zaključeno je da LsbA nema bakteriocinsku, tj. antimikrobnu aktivnost prema soju BGMN1-596, kao i to da povećana bakteriocinska zona soja BGMN1-596T u odnosu na MG7284/pAZIL-lsbB nije posledica prisustva LsbA. Dalje je pretpostavljeno da je povećana ekspresija LsbB bakteriocina posledica uticaja određenog (nizvodnog) regiona (gena) u odnosu na *lsbB* gen na pMN5 plazmidu. S obzirom da MG7284/pAZIL-EV obezbeđuje istu veličinu bakteriocinske zone kao i BGMN1-596T posmatran je region na pMN5 plazmidu od *EcoRI* (1 bp) do *ScaI*

(740 bp) restrikcionog mesta, i analiziran uticaj potencijalnih gena u okviru ovog regiona na povećanje ekspresije LsbB bakteriocina.

Definisani su potencijalni geni: *lsbA*, *lsbX*, *lsbY*, *lsbXY* (Slika 18) i analiziran uticaj svakog od njih na povećanje ekspresije LsbB gena.



Slika 18. Potencijalni geni i njihova orijentacija u pMN5 plazmidu (pAZIL/EX). Prikaz pozicije i orijentacije prajmera RT1, RT2, RT3 i RT4

Analiziran je uticaj potencijalnih gena na transkripcionom i zbirnom (transkripcionom i translacionom nivou). Eksperiment analize transkripcionog i translacionog nivoa regulacije rađen je tako što je svaki od gena kloniran nizvodno od promotora *PlsbB*. Ovaj promotor je umnožen PCR metodom iz pMN5 plazmida, kloniran u pGEM-T-Easy vektor a potom prekloniran u pAZIL vektor kao *EcoRI/BamHI* fragment. Nakon analize klonova, dobijen je pAZIL/*PlsbB*, gde su pod promotorom *PlsbB* naknadno uklonirani pojedinačni potencijalni geni kao *BamHI/PstI* fragmenti. Svi potencijalni geni su umnoženi PCR metodom iz pMN5 plazmida, klonirani u pGEM-T-Easy vektor, a potom preklonirani u pAZIL/*PlsbB*. Derivat MG7284/pNZ8150-*lsbB* u kome je eksprimiran samo *LsbB* bakteriocin transformisan je konstruktima pAZIL/*PlsbB-lsbA*, pAZIL/*PlsbB-lsbX*, pAZIL/*PlsbB-lsbY*, pAZIL/*PlsbB-lsbXY* i pAZIL/*N*, gde su dobijeni derivati MG7284/pNZ8150/*lsbB*||pAZIL/*PlsbB-lsbA*, MG7284/pNZ8150/*lsbB*||pAZIL/*PlsbB-lsbX*,

MG7284/pNZ8150/l**sbB**||pAZIL/Pl**sbB**-l**sbY**,
 MG7284/pNZ8150/l**sbB**||pAZIL/Pl**sbB**-l**sbXY**
 MG7284/pNZ8150/l**sbB**||pAZIL/N, redom. Svi ovi derivati su u bakteriocinskom testu korišćeni kao bakteriocin proizvođači, a veličina zone je poređena sa kontrolnim derivatom MG7284/pNZ8150-l**sbB**, kao i sa BGMN1-596T. Kako bi se proverila mogućnost ekspresije antimikrobne komponente nekog od definisanih gena (*lsbA*, *lsbX*, *lsbY*, *lsbXY*), MG7284 je transformisan konstruktima (pAZIL/Pl**sbB**-l**sbA**, pAZIL/Pl**sbB**-l**sbX**, pAZIL/Pl**sbB**-l**sbY**, pAZIL/Pl**sbB**-l**sbXY**), a dobijeni transformanti su korišćeni u bakteriocinskom testu kao kontrola (potencijalni bakteriocin proizvođači), gde ni jedan od njih nije ispoljio antimikrobnu aktivnost na BGMN1-596 koji je u ovim testovima korišćen kao indikator soj.

Rezultati ovog eksperimenta pokazuju da nema razlike u veličini zona između MG7284/pNZ8150-l**sbB** i svih dobijenih derivata, osim derivata MG7284/pNZ8150/l**sbB** pAZIL/N koji dovodi do povećanja zone, odnosno, zona je iste veličine kao zona BGMN1-596T.

5.3.3. Analiza transkripcionog nivoa regulacije ekspresije L**sbB**

Uporedo sa eksperimentima analize transkripcionog i translacionog nivoa regulacije ekspresije L**sbB** bakteriocina, rađena je analiza pojedinačnih gena na transkripcionom nivou. Analiziran je uticaj svakog gena na jačinu ekspresije promotora *PlsbB*, a jačina samog promotora je indirektno merena na osnovu količine eksprimiranog enzima β -galaktozidaze.

Derivat MG7284/pNZ8150/Pl**sbB**-lacZ koji nosi fuzioni vektor pNZ8150/Pl**sbB**-lacZ, transformisan je konstruktima pAZIL/Pl**sbB**-l**sbA**, pAZIL/Pl**sbB**-l**sbX**, pAZIL/Pl**sbB**-l**sbY**, pAZIL/Pl**sbB**-l**sbXY** i pAZIL/N. Merena je aktivnost β -galaktozidaze za sve dobijene derivate, gde su kao kontrole korišćeni derivati MG7284/pNZ8150/Pl**sbB**-lacZ i MG7284/pNZ8150/lacZ.

Rezultati pokazuju da konstrukt MG7284/pNZ8150/PlsbB-lacZII pAZIL/N dovodi do 4 puta veće aktivnosti β -galaktozidaze u odnosu na MG7284/pNZ8150/PlsbB-lacZI, dok pojedinačni potencijalni geni nisu pokazali uticaj na aktivnost promotora *PlsbB*.

U okviru analize gena odgovornih za regulaciju povećane ekspresije LsbB bakteriocina, važno je bilo definisati na RNK nivou, koja je dužina i smer iRNK koja se prepisuje. RNK je izolovana iz MG7284/pAZIL-EX, a RT-PCR metodom dobijena je cDNK gde su za umnožavanje fragmenata korišćeni prajmeri navedeni u tabeli 3 (RT1-RT4; RT2-RT4; RT3-RT4), dok je prikaz pozicije prajmera predstavljen na slici 18. Rezultati pokazuju da se transkripcija sa *PlsbB* promotora ne zaustavlja nakon prepisivanja *lsbB* gena već ide sve do *EcoRI* restrikcionog mesta. Takođe rezultati ukazuju da se transkripcija odvija i u suprotnom smeru sa nepoznatog promotora.

6. DISKUSIJA

6.1. MEHANIZAM DELOVANJA LsbB BAKTERIOCINA

Imajući u vidu višestruki značaj i veoma široku primenu BMK, izučavanje antimikrobnih komponenti koje oni produkuju ima veliki značaj kako sa fundamentalnog tako i sa aplikativnog stanovišta. Poznavanje strukture bakteriocina i mehanizma delovanja je od suštinskog značaja u cilju njihove potencijalne primene kao konzervanasa ili lekova.

Jedna od osnovnih karakteristika bakteriocina jeste da su veoma potentni i aktivni u malim (nanomolarnim) koncentracijama. Sa druge strane, kako bi se ispoljilo antimikrobno delovanje peptida produkovanih od strane eukariotskih ćelija (npr. defensins ili LL-37) potrebne su znatno veće koncentracije (mikromolarne), na osnovu čega se može zaključiti da su bakteriocini i do 1000 puta potentniji u odnosu na ove komponente (Morgan *et al.*, 2005; Diep *et al.*, 2007). Smatra se da osnovni razlog ovako velike potentnosti bakteriocina leži u njihovoj specifičnoj interakciji sa receptorima na membrani senzitivne ćelije, dok antimikrobne komponente eukariotskih organizama intereaguju nespecifično. Ovo je pre svega pokazano kod bakteriocina klase II koji se vezuju za različite receptore na membrani ćelija. Mehanizam delovanja bakteriocina klase II, koji obuhvataju bakteriocine slične pediocinu (podklasa IIa), dvopeptidne bakteriocine (IIb), cirkularne bakteriocine (IIc) kao i linearne bakteriocine koji nemaju sličnosti sa pediocinima (IId) (Cotter *et al.*, 2013) ogleda se u vezivanju bakteriocina za membranski locirane proteine, što je preduslov za ispoljavanje antimikrobnog delovanja.

LsbB, bakteriocin izučavan u ovom radu spada u IId podgrupu bakteriocina. To je mali (30 ak) bakteriocin, koga produkuje prirodni izolat *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5. Ovaj bakteriocin ima uzak spektar antimikrobnog delovanja (Gajic *et al.*, 2003) koji se ogleda u antimikrobnoj aktivnosti prema vrstama, blisko srodnim proizvođaču bakteriocina, pre svega laktokokama, a sam rezultat je u korelaciji sa definicijom bakteriocina da su to mali, ribozomalno sintetisani peptidi ili proteini koji imaju uzak spektar

antimikrobne aktivnosti koja je ograničena na blisko srodne vrste i prema kojoj soj proizvođač ima mehanizam specifične samozaštite (Jack *et al.*, 1995).

Mehanizam delovanja LsbB bakteriocina se ne dovodi u vezu sa man-PTS mehanizmom koga koriste mnogi bakteriocini klase II (Bieler *et al.*, 2006; Diep *et al.*, 2007), što je pokazano API i Biolog testovima gde se vidi da nema razlike u profilu fermentacije ponuđenih komponenti između polaznog soja BGMN1-596 i LsbB mutanata dobijenih MNNG mutagenom. Mehanizam delovanja LsbB bakteriocina (Uzelac *et al.*, 2013) razlikuje se od mehanizama kojim drugi bakteriocini ove grupe deluju na senzitivne ćelije, što je i očekivano, s' obzirom da se ovde radi o veoma raznovrsnoj grupi bakteriocina za koje se ne može navesti jedinstveni mehanizam delovanja (Heng *et al.*, 2007). Danas se zna da laktokokcin A i laktokokcin B slično bakteriocinima podklase IIa koriste man-PTS komponente kao membranske receptore. Raznovrsnost ove grupe uočava se i u mehanizmu delovanja laktokokcina 972 (lcn972) koji je prvi identifikovani ne-lantibiotik koji specifično intereaguje sa lipid II komponentom (Martinez *et al.*, 2008). Laktokokcin Q, koji spada u bakteriocine koji se sintetišu bez lider peptida, ne zahteva prisustvo receptora, a mehanizam delovanja koji koristi zasniva se na depolarizaciji membrane ciljne ćelije (Yoneyama *et al.*, 2008; Yoneyama *et al.*, 2009).

U ovom doktoratu, predstavljena je nova i efikasna strategija koja uključuje rad sa rezistentnim mutantima, komplementiranje mutanata kozmidnim klonom, sekvenciranje genoma, analizu metabolizma, a sve u cilju definisanja mehanizma delovanja LsbB bakteriocina. Ono što je važno istaći jeste da kombinacija analize rezistentnih mutanata, sekvenciranje genoma, i različitih molekularnih metoda kloniranja može biti veoma moćan pristup u identifikovanju potencijalnih receptora. Potpuno ili delimično LsbB rezistentni mutanti BGMN1-596R3, BGMN1-596SR i BGMN1-596R2 komplementirani su kozmidnim klonom pAZILcos/MN2 koji nosi deo genoma LsbB senzitivnog soja BGMN1-596. Ovaj kozmid je delimično sekvenciran, a urađena je kompjuterska analiza sekvence kojom je utvrđeno postojanje četiri (i jedan

skraćen) otvorena okvira čitanja (ORF, „Open Reading Frame“), potencijalno odgovorna za komplementiranje mutanata (Slika 11). Analizom ORF-ova BLAST programom (Altschul *et al.*, 1997) za svih pet ORF-ova konstatovan je visok stepen homologije sa genima *uppS*, *cdsA*, *yvjB*, *proS*, i skraćen *noxDV*, od kojih se *yvjB* pokazao kao gen od interesa (Uzelac *et al.*, 2013). Metodom sekvenciranja i analize genoma divljeg soja i LsbB mutanata (Simpson *et al.*, 2009, Nusbaum *et al.*, 2009) između ostalih, potvrđene su mutacije i u *yvjB* genu (Tabela 6). Kombinovanjem navedenih metodoloških pristupa sigurno je da će mnogi receptori bakteriocina biti otkriveni u narednim godinama.

yvjB gen kodira membranski protein, YvjB (Zn-zavisna metalopeptidaza), receptor za LsbB bakteriocin (Uzelac *et al.*, 2013). U literature do danas nije pokazano učešće ovog membranskog proteina u interakciji bilo kog bakteriocina sa senzitivnom ćelijom.

„Knock-out“-om *yvjB* gena metodom homologe rekombinacije, senzitivni sojevi (BGMN1-596 i IL1403) kod kojih je inaktiviran *yvjB* gen postaju rezistentan na LsbB bakteriocin. Metoda temperaturnog „shift“-a korišćena u ovom eksperimentu pokazala se veoma efikasna, što je u korelaciji sa brojnim radovima vezanim za praćenje genskih funkcija, gde je pokazano da se visoka efikasnost temperaturnog „shift“-a postiže kod različitih vrsta (*Lc. lactis*, *E. faecalis* i *S. thermophilus*) (Maguin *et al.*, 1996).

Značaj ovog proteina pokazan je nepotpunom ili potpunom rezistencijom senzitivnih ćelija na LsbB bakteriocin nakon različitih tipova mutacija u *yvjB* genu. Slično, Gravesen i saradnici su (Gravesen *et al.*, 2002) pokazali da su kod osam nezavisno izolovanih sojeva *Listeria monocytogenes* rezistentnih na četiri bakteriocina podklase IIa, među kojima pediocin PA-1 i plantaricin A, nađene mutacije u *mpt* operonu za koji se kasnije i pokazalo da je man-PTS subjedinica (IIC) receptor ovih bakteriocina. Različiti stepeni rezistencije na LsbB bakteriocin prisutni su između različitih grupa mutanata, gde je veća rezistencija prisutna kod mutanata kod kojih je YvjB protein skraćen, u odnosu na mutante kod kojih je došlo samo do aminokiselinskih

zamena u YvjB proteinu (Tabela 7). Na osnovu dosadašnjih rezultata veruje se da skraćene forme YvjB membranskog proteina ne mogu služiti kao receptori za LsbB jer su strukturno deficientne. Sa druge strane molakularnu osnovu rezistencije na LsbB bakteriocin kod mutanata kod kojih je došlo do aminokiselinskih zamena teže je objasniti. Postoji nekoliko mogućih objašnjenja kako supstitucija jedne aminokiseline drugom utiče na razliku u fenotipu u pogledu rezistencije na bakteriocin. Supstitucija aminokiselina može da izazove strukturne promene, tako da relevantan domen proteina postaje nedostupan ili manje dostupan za interakciju sa LsbB bakteriocinom. Takođe, aminokiselina glicin, na poziciji 188 može imati značajnu ulogu u samom aktivnom mestu na receptoru. Nekonverzovana supstitucija glicina u serin koji je hidrofilniji i veće molekulske mase možda može da ometa vezivanje LsbB bakteriocina. Takođe, glicin može direktno dovesti do formiranja pora u ćelijskoj membrani (Bednarczyk *et al.*, 2002) a nekonverzovana supstitucija u toj aminokiselini možda može dovesti do blokiranja formiranja pora, i na taj način indukovati rezistenciju kod sojeva. Važno je napomenuti značaj glicina na poziciji 188, jer je glicin upravo na ovoj poziciji, u potpunosti očuvan (konzerviran) u 7947 od 8451 sekvenci u Pfam familiji PF02163 (peptidaze M50). Sa druge strane je značajno da genom soja *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG7284 (Gasson, 1983) koji je prirodno rezistentan na LsbB bakteriocin takođe sadrži *yvjB* gen koji kodira YvjB protein iste dužine (428 ak), i pokazuje relativno visok nivo homologije (93% identičnosti; 397 od 428 ak) sa YvjB proteinom u LsbB senzitivnim sojevima BGMN1-596 i IL1403 (Altschul *et al.*, 1997). Analizom sekvence *yvjB* gena, nađeno je da je u okolini glicina kod sva tri soja ova sekvenca identična, na osnovu čega se takođe može pretpostaviti i da je rezlika u nekoj/nekim drugim aminokiselinama (31 razlika) između YvjB proteina kod sojeva BGMN1-596 i IL1403 sa jedne strane i MG7284 sa druge strane ključna za rezistenciju bakterije na LsbB bakteriocin.

Bakteriocini klase II su brojni i raznovrsni u pogledu aminokiselinske sekvence, strukture i fizičko-hemijskih osobina, pa se iz tog razloga i veruje da

prepoznaju različite receptore na senzitivnim ćelijama (Heng *et al.*, 2007). Slično, bakterijske ćelije sadrže raznovrsne membranske proteine koji su uključeni u različite aktivnosti membrane, uključujući transport ili razmenu aktivnih komponenti kao što su soli, šećeri, različiti izvori energije, komunikaciju među bakterijama, funkcionalnu strukturu, itd. Upravo iz tog razloga, sasvim je razumljivo da bilo koji od ovih proteina može biti potencijalni receptor za bakteriocine.

Najpotentniji receptori za bakteriocine klase IIa nađeni su u vrstama *Listeria* i *Streptococcus*, pa su ove vrste i visoko senzitivne na bakteriocine klase IIa. Uključenost man-PTS u vezivanje bakteriocina klase IIa za senzitivnu ćeliju pokazano je heterologom ekspresijom man-PTS iz *Listeria monocytogenes* (*mptC*) u prirodno rezistentnom soju *Lc. lactis*, koji je postao senzitivan na bakteriocine klase IIa (Ramnath *et al.*, 2004). Na sličan način pokazano je da heterologom ekspresijom *yvjB* iz *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-596, prirodno rezistentni sojevi *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG7284, *E. faecalis* BGZLS10-27 i *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14 postaju senzitivni na LsbB bakteriocin (Slika 13).

Značaj definisanja i analize membranskih receptora najbolje je opisan definisanjem man-PTS receptora koje koriste neki od bakteriocina klase II. Naime, PTS receptori su prisutni kod ćelija prokariota, ali ne i kod eukariotskih ćelija. Ova jedinstvenost ih čini potencijalnim ciljnim molekulima za razvoj novih antimikrobnih komponenti (lekova), koji bi bili usmereni protiv patogenih bakterija bez bojazni delovanja takvih komponenti na ćelije čoveka.

6.2. STRUKTURNO FUNKCIONALNA ANALIZA LsbB BAKTERIOCINA

Strukturno funkcionalnom analizom LsbB bakteriocina definisan je domen kojim bakteriocin intereaguje sa receptorom na membrani senzitivne ćelije. Tehnikama CD (Circular Dichroism) i NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spektroskopije utvrđeno je da se LsbB bakteriocin sastoji od tri

funkcionalno različita domena (Slika 14) (Ovchinnikov *et al.*, 2014). Analiziranjem pojedinačnih domena LsbB bakteriocina utvrđeno je da je deo bakteriocina koji se vezuje za receptor lociran na C-terminusu peptida. Sintetisani peptid koji sadrži 10 poslednjih aminokiselina na C-terminusu sposoban je da zaštiti senzitivnu ćeliju od LsbB bakteriocina. Pretpostavlja se da sintetisan peptid koji predstavlja skraćen LsbB bakteriocin (C-trminus) kompetira sa celim LsbB bakteriocinom za isti domen receptora na senzitivnoj ćeliji, interaguje sa aktivnim mestom i na taj način onemogućava vezivanje LsbB bakteriocina. Ovim se sprečava inhibitorno delovanje bakteriocina na senzitivnu ćeliju a sam peptid ne može da izazove smrt ćelije. Najmanji fragment koji još može da blokira delovanje LsbB bakteriocina predstavlja 8 poslednjih aminokiselima C-terminalnog domena. Pretpostavlja se da sintetisani peptidi različitih domena LsbB bakteriocina (osim C-terminalnog domena) nisu direktno uključeni u vezivanje bakteriocina za receptor, već samo za inicijalnu i nespecifičnu interakciju između pozitivno naelektrisanog bakteriocina i negativno naelektrisanog fosfolipidnog sloja membrane. Za specifičnu interakciju između receptora i bakteriocina odgovorno je poslednjih 8 aminokiselina C-terminalnog domena (YPWERGKA) (Ovchinnikov *et al.*, 2014). Predloženi mehanizam vezivanja LsbB bakteriocina donekle podseća na model predložen za plantaricin A gde se peptid feromon vezuje za membranski lociran protein histidin kinazu uključenu u „quorum sensing“ regulaciju bakteriocinskog lokusa (Diep *et al.*, 1995). Slično kao i LsbB bakteriocin, plantaricin A je mali peptid (26 ak), bez N-terminalne lider sekvence i sa jakim katjonskim C-terminusom (Kristiansen *et al.*, 2005). Struktura LsbB bakteriocina dosta se razlikuje od strukture dobro okarakterisanih bakteriocina klase IIa (Nissen-Meyer *et al.*, 2009) koji se vezuju za membranske komponente man-PTS sistema, gde je pokazano da je receptor-vezujući domen ovih bakteriocina takođe na C-terminusu (Haugan *et al.*, 2011). Zanimljivo je da laktokokcin A i B koji nisu bakteriocini slični pediocinu takođe koriste man-PTS komponente prilikom vezivanja za senzitivnu ćeliju, međutim

i ovi bakteriocini kao i LsbB se strukturno razlikuju od bakteriocina klase IIa. Oni se razlikuju i po tome što je njihov spektar delovanja znatno uži i ograničen pre svega na laktokokalne ćelije, za razliku od bakteriocina sličnih pediocinu čiji je spektar delovanja znatno širi, i ovi bakteriocini ne deuju na laktokokalne ćelije (Kjos *et al.*, 2011). Ova visoka specifičnost je najverovatnije posledica razlike u sekvenci laktokokalnog i ne-laktokokalnog man-PTS.

Aminokiseline C-terminalnog domena LsbB bakteriocina su mutacijama menjane u alanin (Tabela 8), a na osnovu rezultata dobijenih ovim eksperimentima zapaža se da su alanin na poziciji 30 (A30), kao i triptofan na poziciji 25 (W25), neophodni za ispoljavanje antimikrobne aktivnosti LsbB bakteriocina, odnosno za vezivanje LsbB bakteriocina za membranski receptor. Kako su oba ostatka (A30 i W25) hidrofobna sasvim je razumljivo njihovo postojanje u hidrofobnoj sredinu bilo u okviru receptora ili lipida membrane.

Značaj triptofana prilikom vezivanja bakteriocina za membranu pokazan je i kod nekih bakteriocina sličnih pediocinu, gde se ovaj aminokiselinski ostatak nalazi u sličnoj poziciji kao u LsbB bakteriocinu (Fimland *et al.*, 2002; Rihakova *et al.*, 2009).

Analizom aminokiselinskih sekvenci različitih bakteriocina, primećeno je da je triptofan deo konzervirane sekvence, **KxxxGxxWE** koji je nađen u svim peptidima sličnim LsbB: EntQ, EntK1, EntEJ97, EntEJ97T-HP i duracin 41D-HP (Tabela 10). Ovchinnikov i saradnici (Ovchinnikov *et al.*, 2014) predlažu da se ovaj motiv naziva „**konsenzus bakteriocina sličnih LsbB**“. Na osnovu sličnosti nukleotidne sekvence na njihovom C-terminusu može se pretpostaviti da svi oni prepoznaju isti receptor na membrani. Ova pretpostavka je takođe podržana činjenicom da skraćeni peptidi (C-terminalni domeni) koji predstavljaju poslednjih 20 aa kod Ent EJ97 (EntEJ97T-HP) i Ent K1 imaju sposobnost da blokiraju antimikrobnu aktivnost LsbB bakteriocina (Ovchinnikov *et al.*, 2014).

Tabela 10. Prikaz aminokiselinske sekvence bakteriocina sličnih LsbB (Ovchinnikov *et al.*, 2014)

Bakteriocini		
Aminokiselinska sekvenca	Naziv	Dužina
MGVYRYLELNCFEI RVYSLVGHVI SVK LTY EI AWFN KHGCYPWEI PRCYHW	duracin 41D-HP	55
MLAKI KAM KKFPNPYTLAK LTY EI NMYQ QYGRYPWERPVA	EntEJ97	44
MLAKI KAM KKFTPYPYTLAK LTY EI NMYQ QYGRYPWERPVA	EntEJ97T-HP	44
MKFKFNPTGTI VIK LTY EI AWFN KHGYYPWEI PRC	EntK1	37
MNFLKNGI AWMIA ELQAYIK KYGCLPWEKI SC	EntQ	34
MKTI LIF VAY DI ASHK KTGYPWERGKA	LsbB	30
X Xx GxxPWE	Konsenzus	
: * *** .		

Alanin na poziciji 30 (A30), takođe je neophodan za vezivanje bakteriocina za receptor jer se njegovom delecijom ili pak insercijom još jednog alanina gubi bakteriocinska aktivnost LsbB, na osnovu čega se pretpostavlja da je za vezivanje bakteriocina za receptor bitna i dužina samog peptida. Zapaža se da alanin na ovoj poziciji može biti zamenjen aminokiselinama iz iste grupe (alifatične aminokiseline) a da aktivnost bakteriocina ostane nepromenjena, dok prilikom zamena sa aminokiselinama drugih grupa aktivnost se ili gubi ili je čak i jača. Dalja istraživanja na ovu temu su definitivno neophodna kako bi se razumela uključenost pojedinačnih aminokiselina prilikom vezivanja bakteriocina za receptor.

Iako LsbB bakteriocin deli sa drugim LsbB-sličnim bakteriocinima visok stepen homologije u domenu odgovornom za interakciju sa receptorom, može se primetiti da se inhibitorni spektar delovanja LsbB znatno razlikuje od pomenutih bakteriocina. Naime, on je usmeren pre svega na laktokokalne ćelije (Gajic *et al.*, 2003), za razliku od enterocina (EntQ, EntEJ97 i EntK1) koji imaju znatno širi spektar delovanja koji između ostalog uključuje i laktokokalne ćelije (neobjavljeni rezultati za enterocin K1) (Galvez *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000).

Primećeno je takođe da postoji sličnost u YvjB proteinu (receptor za LsbB) kod sojeva *Enterococcus*, *Pediococcus* i *Lactobacillus* koji su senzitivni na EntQ, EntEJ97 i EntK1 (ali ne i na LsbB). Ovi proteini dele homologiju sa laktokokalnim YvjB u opsegu od 46 do 54% identičnosti. Poslednjih godina rađena su istraživanja na man-PTS receptoru i njegovoj specifičnosti kod pojedinih sojeva (Kjos *et al.*, 2011). Slično, kao buduća istraživanja mogu se navesti analiza YvjB homologa, kako bi se odgovorilo na pitanje da li mogu služiti kao receptori za ove bakteriocine, ili pak definisati njihovu specifičnost.

Skoro svi bakteriocini koji se sintetišu bez lider peptida su mali, postranslaciono nemodifikovani peptidi, koji se mogu hemijski sintetisati, strukturno analizirati i na kojima se mogu vršiti mutacije u cilju različitih analiza. Ovakvi pristupi mogu pružiti odgovore vezane za interakciju

bakteriocina sa njihovim receptorima, a na taj način i definisati mehanizam koji oni koriste za ulazak u senzitivnu ćeliju. Takođe, proučavanje specifičnosti receptora za određene bakteriocine je od velikog značaja jer može da pomogne boljem razumevanju biološkog i evolucionarnog aspekta, ali takođe može da pomogne dizajniranju lekova koji će delovati na tačno definisane targete ili pak da ovakva istraživanja poboljšaju potencijal određenih lekova.

6.3. REGULACIJA EKSPRESIJE LsbB BAKTERIOCINA

Regulacija ekspresije LsbB bakteriocina analizirana je kako na transkripcionom tako i na zbirnom (transkripcionom i translacionom) nivou, gde na osnovu dosadašnjih rezultata nije moguće zaključiti da li se regulacija ostvaruje na translacionom ili transkripcionom nivou. Pokazano je i da region odgovoran za povećanu ekspresiju LsbB bakteriocina bilo „in-cis“ ili „in-trans“ mora biti u „cis-konstalaciji“ sa *lsbB* genom. Regulacija ekspresije većine bakteriocina kontrolisana je na transkripcionom nivou „quorum sensing“ mehanizmom, a najviše je rađeno na bakteriocinima klase IIa (Risoen *et al.*, 1998; Risoen *et al.*, 2001). Pokazano je da razlika u veličini zone koju formiraju sojevi BGMN1-596T (7 mm) i MG7284/pAZIL-lsbB (5 mm) nije posledica prisustva LsbA bakteriocina iako poseduje fizičko-hemijske karakteristike bakteriocina BMK (veličina, molekulska masa, izoelektrična tačka) (Klaenhammer, 1993). Molekularnim metodama „knock-out“-a određenih gena pokazano je da je razlika u veličini zona posledica pojačane ekspresije LsbB bakteriocina koja je regulisana u okviru regiona (*EcoRI/Scal*) na pMN5 plazmidu.

7. ZAKLJUČCI

7.1. MEHANIZAM DELOVANJA LsbB BAKTERIOCINA

1. LsbB bakteriocin eksprimiran u *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG7284 pokazuje istu bakteriocinsku aktivnost (inhibitorno delovanje) na senzitivne sojeve *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-596 i IL1403 kao i na polazni soj koji poseduje pMN5 plazmid. Proteinska priroda LsbB potvrđena je delovanjem enzima pronaza E na ovaj bakteriocin.
2. LsbB, bakteriocin podklase IId, ne koristi komponente man-PTS sistema kao ciljne receptore na membrani senzitivne ćelije, niti druge receptore uključene u metabolizam šećera ispitivanih testovima API i Biolog.
3. MNNG mutagenezom LsbB senzitivnog soja BGMN1-596, i selekcijom na šoljama koje su saržale LsbB bakteriocin (supernatant kulture MG7284/pAZIL-lsbB) uspešno su dobijene dve značajne kategorije mutanata: BGMN1-596R2 i BGMN1-596R3. Selekcijom na hemijski sintetisanom LsbB bakteriocinu dobijena je još jedna kategorija spontano rezistentnih mutanata BGMN1-596SR. Mutanti BGMN1-596R3 i BGMN1-596SR se razlikuju od mutanata BGMN1-596R2 u pogledu senzitivnosti na LsbB bakteriocin: mutanti BGMN1-596R3 i BGMN1-596SR su u potpunosti rezistentni na LsbB proizvođače BGMN1-596T i MG7284/pAZIL-lsbB, dok je mutant BGMN1-596R2 rezistentan na delovanje MG7284/pAZIL-lsbB, a senzitivan na BGMN1-596T, ali znatno manje.
4. Konstruisanjem kozmidne biblioteke BGMN1-596, izdvojen je kozmid pAZILcos/MN2, koji ima sposobnost komplementiranja LsbB rezistentnih mutanata. Sekvenciranjem kozmida, definisana su četiri potencijalna gena, a kloniranjem pojedinačnih gena i eksprimiranjem u rezistentnim mutantima izdvojen je *yvjB* gen koji kodira YvjB protein (Zn-zavisna metalopeptidaza), potencijalni receptor za LsbB bakteriocin. Mutanti sve tri kategorije, transformisani vektorom pAZIL/ZnMP koji nosi samo *yvjB* povratili su senzitivnost na LsbB bakteriocin. Takođe, ekspresijom *yvjB* gena u sojevima prirodno rezistentnim na LsbB bakteriocin: *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG7284,

Lb. paracasei subsp. *paracasei* HN14 i *E. faecalis* BGZLS10 oni postaju senzitivni na LsbB bakteriocin.

5. "Knock-out" *yvjB* gena u LsbB senzitivnim sojevima BGMN1-596 i IL1403, dovodi do rezistentije na LsbB bakteriocin, što je još jedna potvrda prethodno dobijenih rezultata.

6. Analizom sekvence *yvjB* gena kod svih kategorija mutanata, može se objasniti zašto postoje fenotipske razlike između mutanata kategorija BGMN1-596R3 i BGMN1-596SR sa jedne strane i BGMN1-596R2 sa druge strane. Kod prve dve kategorije mutanata analizom *yvjB* gena utvrđeno je postojanje jednog ili više STOP kodona, koji dovode do sinteze nekompletnih i najverovatnije nefunkcionalnih YvjB proteina, a kao posledica toga javlja se protein koji ne može služiti kao receptor i soj postaje rezistentan na bakteriocin. Kod mutanata kategorije BGMN1-596R2 pojavljuju se samo aminokiselinske zamene od kojih je uvek prisutna zamena glicina u serin na poziciji 188, međutim protein ostaje neizmenjen u pogledu dužine. Ovakva forma YvjB proteina najverovatnije ima umanjenju funkciju ali još uvek aktivnu pa je posledica smanjena senzitivnost soja na LsbB bakteriocin, odnosno smanjena zona u bakteriocinskom testu.

7. Mutanti kategorije BGMN1-596R3 i BGMN1-596SR pokazuju izuzetno visoku rezistenciju na LsbB bakteriocin (preko 1 mg/ml), mutanti kategorije BGMN1-596R2 pokazuju rezistenciju na svega 62,5 µg/ml LsbB-a, dok je senzitivni soj BGMN1-596 osetljiv već na koncentraciju od 125 ng/ml LsbB-a.

7.2. STRUKTURNO FUNKCIONALNA ANALIZA LsbB BAKTERIOCINA

1. Korišćenjem metoda CD i NMR spektroskopije, LsbB bakteriocin (MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYPWERGKA) je strukturno podeljen na tri domena, N-terminalni domen (MKTILRFVAGYDIAS), centralni domen (HKKK) i C-terminalni domen (TGGYPWERGKA).

2. Poslednjih 8 aminokiselina u LsbB su ključne za specifičnu interakciju sa YvjB receptorom. Analizom četiri sintetisana peptida u okviru LsbB bakteriocina, može se zaključiti da je peptid P4 (HKKKTGGYPWERGKA) sposoban da zaštiti senzitivnu ćeliju od inhibitornog delovanja LsbB bakteriocina. Smatra se da ovaj region kompetetira sa LsbB bakteriocinom za aktivna mesta na receptoru, odnosno da je C-terminalni domen uključen u interakciju LsbB bakteriocina sa receptorom. Najmanji sintetisani peptid koji poseduje sposobnost zaštite ćelije od delovanja LsbB bakteriocina sastoji se od osam poslednjih aminokiselina C-terminalnog domena.
3. C-terminalni domen je odgovoran za specifičnu interakciju sa receptorom, dok su druga dva domena najverovatnije odgovorna za nespecifično prepoznavanje receptora na membrani ćelije.
4. Ključna aminokiselina za interakciju LsbB bakteriocina sa receptorom je triptofan na poziciji 25 (W25). Analizom pojedinačnih aminokiselina na C-terminusu, može se zaključiti da zamenom bilo koje od poslednjih osam aminokiselina alaninom, LsbB bakteriocin ostaje aktivan, osim kada je u pitanju triptofan na poziciji 25 (W25). Ovakav bakteriocin gubi svoju aktivnost, odnosno sposobnost vezivanja za receptor na membrani ćelije.
5. Analizom samog kraja LsbB bakteriocina (terminalne aminokiseline), može se zaključiti da je alanin na poziciji 30 takođe od ključnog značaja, s obzirom da se zamenom sa određenim aminokiselinama potpuno gubi aktivnost bakteriocina. Takođe adicijom još jednog alanina ili delecijom poslednjeg alanina, gubi se aktivnost bakteriocina na osnovu čega se može zaključiti da je i dužina samog bakteriocina ključna prilikom vezivanja za receptor i ostvarivanja antimikrobne aktivnosti.

7.3. REGULACIJA EKSPRESIJE LsbB BAKTERIOCINA

1. "Knock-out" *lsbB* i *lmrB* gena, kao i "knock-out" oba gena istovremeno, potvrđuje da LsbA nije bakteriocin, odnosno ne ispoljava antimikrobnu aktivnost na sojeve BGMN1-596 i IL1403.
2. Razlika u veličini zone koje u bakteriocinskim testovima stvaraju BGMN1-596T i MG7284/pAZIL-*lsbB* nije posledica prisustva LsbA bakteriocina, već je posledica regulacije: povećane ekspresije LsbB bakteriocina.
3. Povećana ekspresija LsbB bakteriocina regulisana je sa pMN5 plazmida. Region koji uključuje regulator nalazi se u okviru *EcoRI/ScaI* restrikcionih mesta na plazmidu nizvodno od *lsbB* gena. Da bi regulatorni elementi ispoljili svoju aktivnost moraju se eksprimirati u "in-cis" poziciji u odnosu na *lsbB* gen.

Zaključak celokupnog istraživanja:

Mehanizam delovanja, strukturno funkcionalna analiza i regulacija ekspresije LsbB, bakteriocina podklase IId koga proizvodi prirodni izolat Lc. lactis BGMN1-5, analizirani su u okviru ovog istraživanja.

Analizom mehanizma delovanja LsbB bakteriocina pokazano je da ovaj bakteriocin koristi YvjB protein (Zn-zavisna metalopeptidaza) kao ciljni molekul prilikom vezivanja za senzitivnu ćeliju. Ovim je prvi put pokazano da se neki bakteriocin vezuje za ovaj membranski protein, a samim tim definisan je i jedan novi mehanizam delovanja bakteriocina. Pored toga, pokazano je da je C-terminalni domen LsbB bakteriocina uključen u direktnu interakciju sa receptorom, kao i to da je aminokiselina triptofan (W25) neophodna za aktivnost bakteriocina. Rezultatima ovog rada, pokazano je i da soj BGMN1-596T proizvodi samo jedan bakteriocin, LsbB i da se region koji uključuje regulator LsbB nalazi u okviru EcoRI/ScaI na pMN5, prirodnom plazmidu soja Lc. lactis BGMN1-5.

8. LITERATURA

- Adelberg, E., Mandel, M., Chen, G. C. C. 1965. Optimal conditions for mutagenesis by *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18: 788-795.
- Allison, G. F., Fremaux, C., Klaenhammer, T. R. 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 176: 2235-2241.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Altena, K., Guder, A., Cramer, C., Bierbaum, G. 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2565-2571.
- Anderson, D. G., McKay, L. L. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 549-552.
- Asaduzzaman, S. M., Nagao, J., Iida, H., Zendo, T., Nakayama, J., Sonomoto, K. 2009. Nukacin ISK-1, a bacteriostatic lantibiotic. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53: 3595-3598.
- Axelsson, L. T., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J., Lindgren, S. E. 1989. Production of broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 2: 131-136.
- Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L. S., Hugas, M., Gariga, M., Nes, I. F. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1676-1682.
- Babasaki, K., Takao, T., Shimonishi, Y., Kurahashi, K. 1985. Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J. Biochem.* 98: 585-603.
- Balla, E., Dicks, L. M. T., Toit, M. Du., Van Der Merwe, M. J., Holzapfel, W. H. 2000. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin

- 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1298-1304.
- Bednarczyk, P., Szewczyk, A., Dolowy, K. 2002. Transmembrane segment M2 of glycine receptor as a model system for the pore-forming structure of ion channels. *Acta Biochim. Pol.* 49: 869-875.
- Belguesmia, Y., Madi, A., Sperandio, D., Merieau, A., Feuilloy, M., Prevost, H., Drider, D., Connil, N. 2010. Growing insights into safety of bacteriocins: case of enterocin S37. *Res. Microbiol.* 162: 159-163.
- Benmechernene, Z., Inmaculada, F-No., Kihal, M., Bohme, K., Calo-Mata, P., Barros-Velazquez, J. 2013. Recent Patents on Bacteriocins: Food and Biomedical Applications. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 7: 66-73.
- Beukes, M., Bierbaum, G., Sahl, H. G., Hastings, J. W. 2000. Purification and partial characterization of a murein hydrolase, millericin B, produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 23-28.
- Bieler, S., Silva, F., Soto, C., Belin, D. 2006. Bactericidal activity of both secreted and nonsecreted microcin E492 requires the mannose permease. *J. Bacteriol* 188: 7049-7061.
- Bonelli, R. G., Wiedemann, I., Sahl, H. G. 2006. Lantibiotics in *Handbook of Biological Active Peptides*. p: 97-105. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Boyer, H. W., Roulland-Dussoix, D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
- Breukink, E., de Kruijff, B. 2006. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 5: 321-332.
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., Van der Donk, W.A. 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.* 105: 633-684.
- Chen, H., Hoover, D. G. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety.* 2: 82-100.

- Cho, H. S., Pelton, J. G., Yan, D., Kustu, S., Wemmer, D. E. 2001. Phosphoaspartates in bacterial signal transduction. *Curr Opin. Struct. Biol.* 11: 679-684.
- Chopin, A., Chopin, M. C., Moillo-Batt, A., Langella, P. 1984. Two plasmid determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid.* 11: 260-263.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Havarstein, L. S., Hernandez, P. E., Nes, I. F. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microb.* 63: 4321-4330.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Henardez, P. E., Nes, I. F., Havarstein, L. S. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180: 1988-1994.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Herranz, C., Havarstein, L. S., Holo, H., Henardez, P. E., Nes, I. F. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182: 6806-6814.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, P. R. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 777-788.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. 2013. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 95-105.
- Cotter, P. D. 2014. An 'Upp'-turn in bacteriocin receptor identification. *Mol. Microbiol.* 92: 1159-1163.
- Cuozzo, S. A., Sesma, F., Palacios, J. M., de Ruiz Holgado, A. P., Raya, R. R. 2000. Identification and nucleotid sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705, a two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL 705. *FEMS Microbiol. Lett.* 185: 157-161.

- Cuozzo, S. A., Castellano, P., Sesma, F. J., Vignolo, G. M., Raya, R. R. 2003. Differential roles of the two component peptides of lactocin 705 in antimicrobial activity. *Curr. Microbiol.* 46: 180-183.
- Dalet, K., Briand, C., Cenatiempo, Y., Hechard, Y. 2000. The *rpoN* gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.* 41: 441-443.
- Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P., Hechard, Y. 2001. European Listeria Genome Consortium. A sigma (54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiol.* 147: 3263-3269.
- Delves-Broughton, J. 2005. Nisin as a food preservative. *Food Australia.* 57: 525-527.
- Diep, D. B., Havarstein, L. S., Nes, I. F. 1995. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Microbiol.* 18: 631-639.
- Diep, D. B., Havarstein, L. S., Nes, I. F. 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* 178: 4472-4483.
- Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., Nes, I. F. 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 2384-2389.
- De Kwaadsteniet, M., Fraser, T., van Reenen, C. A., Dicks, L. M. T. 2006. Bacteriocin T8, a novel Class IIa *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4761-4766.
- De Vuyst, L., Vandamme, E. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. p: 539. Blackie London, United Kingdom.

- de Vuyst, L., Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microb. Biotech.* 13: 194-199.
- Earnshaw, R. G. 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. ed. Wood, B. J. B. p: 211-232. Elsevier Applied Science, London and New York. 19-436.
- Eijsink, V. G., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B., Nes, I. F. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3275-3281.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 85-106.
- Faye, T., Brede, D. A., Langsrud, T., Nes, I. F., Holo, H. 2002. An antimicrobial peptide is produced by extracellular processing of a protein from *Propionibacterium jensenii*. *J. Bacteriol.* 184: 3649-3656.
- Field, D., Hill, C., Cotter, P. D., Ross, R. P. 2010. The dawning of a 'Golden era' in lantibiotic bioengineering. *Mol. Microbiol.* 78: 1077-1087.
- Fimland, G., Jack, R., Jung, G., Nes, I. F., Nissen-Meyer, J. 1998. The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center toward the C terminus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 5057-5060.
- Fimland, G., Eijsink, V. G., Nissen-Meyer, J. 2002. Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. *Biochemistry.* 41: 9508-9515.
- Flynn, S., van Sinderen, D., Thornton, G. M., Holo, H., Nes, I. F., Collins, J. K. 2002. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiol.* 148: 973-984.

- Franke, C. M., Leenhouks, K. J., Haandrikman, A. J., Kok, J., Venema, G., Venema, K. 1996. Topology of LcnD, a protein implicated in the transport of bacteriocins from *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. 178: 1766-1769.
- Franz, C. M., Grube, A., Herrmann, A., Abriouel, H., Starke, J., Lombardi, A., Tauscher, B., Holzapfel, W. H. 2002. Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2550-2554.
- Fujiwara, T., Hoshino, T., Ooshima, T., Sobue, S., Hamada, S. 2000. Purification, characterization, and molecular analysis of the gene encoding glucosyltransferase from *Streptococcus oralis*. Infect. Immun. 68: 2475-2483.
- Gabrielsen, C., Brede, D. A., Hernandez, P. E., Nes, I. F., Diep, D. B. 2012. The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high-level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML. Antimicrob. Agents Chemother. 56: 2908-2915.
- Gajic, O., Kojic, M., Banina, A., Topisirovic, L. 1999. Characterization of natural isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, a strain producing two bacteriocins, cell wall-associated proteinase and showing clumping phenotype. Arch. Biol. Sci. 51: 69-78.
- Gajic, O., Buist, G., Kojic, M., Topisirovic, L., Kuipers, O. P., Kok, J. 2003. Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. J. Biol. Chem. 278: 34291-34298.
- Galvez, A., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Valdivia, E. 1991. Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. J. Bacteriol. 173: 886-892.

- Galvez, A., Valdivia, E., Abriouel, H., Camafeita, E., Mendez, E., Martinez-Bueno, M., Maqueda, M. 1998. Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. Archives of microbiol. 171: 59-65.
- Galvin, M., Hill, C., Ross, R. P. 1999. Lacticin 3147 displays activity in buffer against gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. Lett. Appl. Microbiol. 28: 355-358.
- Garneau, S., Martin, N. I., Vederas, J. C. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Biochimie. 84: 577-592.
- Gasson, M. J. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. J. Bacteriol. 154: 1-9.
- Gong, X., Martin-Visscher, L. A., Nahirney, D., Vederas, J. C., Duszyk, M. 2009. The circular bacteriocin, carnocyclin A, forms anion-selective channels in lipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta. 1788: 1797-1803.
- Gravesen, A., Ramnath, M., Rechinger, K. B., Andersen, N., Jansch, L., Hechard, Y., Hastings, J. W., Knochel, S. 2002. High level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. Microbiol. 148: 2361-2369.
- Guder, A., Wiedemann, I., Sahl, H. G. 2000. Posttranslationally modified bacteriocins-the lantibiotics. Biopolymers. 55: 62-73.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Hanahan, D. 1985. DNA Cloning (Glover, D.M., ed) IRL Press, Oxford, 1: 109.
- Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E., Klaenhammer, T. R. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 52: 384-387.
- Hastings, J. W., Sailor, M., Johnson, K., Roy, L., Vederas, J. C., Stiles, M. E. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. J. Bacteriol. 173: 7491-7500.

- Haugen, H. S., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. 2011. Mutational analysis of residues in the helical region of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 1966-1972.
- Havarstein, L. S., Diep, D. B., Nes, I. F. 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* 16: 229-240.
- Hechard, Y., Derijard, B., Letellier, F., Cenatiempo, Y. 1992. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2725-2731.
- Hechard, Y., Pelletier, C., Cenatiempo, Y., Frere, J. 2001. Analysis of sigma (54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiol.* 147: 1575-1580.
- Hechard, Y., Sahl, H. G. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie.* 84: 545-557.
- Heng, N. C. K., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., Tagg, J. R. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: *Bacteriocins: ecology and evolution*. eds. Riley, M.A., Chavan, M. p: 45-92. Springer. Berlin.
- Hickey, R. M., Twomey, D. P., Ross, R. P., Hill, C. 2003. Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiol.* 149: 655-664.
- Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S. E., Aukrust, T. and Blom, H. 1992a. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gener. Microbiol.* 138: 2715-2720.
- Holo, H., Nes, I. F. 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3119 -3123.

- Holo, H., Nilssen, O., Nes, I. F. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173: 3879–3887.
- Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S., Nes, I. F. 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiol.* 147: 643–651.
- Hopwood, D. A., Bibb, J. M., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, K. M., Smith, C. P., Ward, J. M., Schrempf, H. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. Norwich, UK, The John Innes Foundation.
- Huhne, K., Axelsson, L., Holck, A., Krockel, L. 1996. Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sake* strains. *Microbiol.* 142: 1437-1448.
- Huttunen, E., Noro, K., Yang, Z. N. 1995. Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. *Int. Dairy J.* 5: 503-513.
- Hyde, A. J., Parisot, J., McNichol, A., Bonev, B. B. 2006. Nisin-induced changes in *Bacillus* morphology suggest a paradigm of antibiotic action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 19896–19901.
- Islam, M. R., Nishie, M., Nagao, J., Zendo, T., Keller, S., Nakayama, J., Kohda, D., Sahl, H. G., Sonomoto, K. 2012. Ring A of nukacin ISK-1: a lipid II-binding motif for type-A(II) lantibiotic. *J. Am. Chem. Soc.* 134: 3687–3690.
- Jack, R. W., Tagg, J. R., Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 171-200.
- Jay, J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 525-532.
- Jimenez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J. L., Cathcart, D. P., Holo, H., Nes, I. F., Sletten, K. H., Warner, P. J. 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10,

- the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4459-4463.
- Joerger, M. C., Klaenhammer, T. R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* 167: 439-446.
- Johnsen, L., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. 2005a. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.* 280: 9243-9250.
- Johnsen, L., Dalhus, B., Leiros, I., Nissen-Meyer, J. 2005b. Angstroms crystal structure of EntA-im: a bacterial immunity protein conferring immunity to the antimicrobial activity of the pediocinlike bacteriocin enterocin A. *J. Biol. Chem.* 280: 19045-19050.
- Jovicic, B., Begovic, J., Lozo, J., Topisirovic, L., Kojic, M. 2009. Dynamics of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Arch. Biol. Sci.* 61: 159-164.
- Kalmokoff, M. L., Banerjee, S. K., Cyr, T., Hefford, M. A., Gleeson, T. 2001. Identification of a new plasmid-encoded sec-dependent bacteriocin produced by *Listeria innocua* 743. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4041-4047.
- Kanatani, K., Tahara, T., Oshimura, M., Sano, K., Umezawa, C. 1995. Cloning and nucleotide sequencing of the gene for acidocin 8912, a bacteriocin from *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 384-386.
- Kandler, O., Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 9th edition. p. 1063-1065. Baltimore (MD): Williams & Wilkins.
- Kawai, Y., Saito, T., Kitazawa, H. and Itoh, T. 1998. Gassericin A, an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C-terminal ends. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 2438-2440.

- Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J., Saito, T. 2004. The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5: 393–398.
- Kjos, M., Salehian, Z., Nes, I. F., Diep, D. B. 2010. An extracellular loop of the mannose phosphotransferase 1 system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *J. Bacteriol.* 192: 5906-5913.
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D. J., Holo, H., Cintas, L. M., Snipen, L., Hernandez, P. E., Nes, I. F., Diep, D. B. 2011. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiol.* 157: 3256-3267.
- Kjos, M., Salehian, Z., Nes, I. F., Diep, D. B. 2011. Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 3335–3342.
- Kjos, M., Oppegard, C., Diep, D. B., Nes, I. F., Veening, J. W., Nissen-Meyer, J., Kristensen, T. 2014. Sensitivity to the two-peptide bacteriocin lactococcin G is dependent on UppP, an enzyme involved in cell-wall synthesis. *Mol. Microbiol.* 92: 1177-1187.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-85.
- Kleerebezem, M., Hugenholtz, J. 2003. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 232-237.
- Knerr, P. J., van der Donk, W. A. 2012. Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annu. Rev. Biochem.* 81: 479-505.
- Kojic, M., Fira D., Banina, A., Topisirovic, L. 1991. Characterization of the cell wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1753–1757.
- Kojic, M., Strahinic, I., Topisirovic, L. 2005. Proteinase PI and lactococcin A genes are located on the largest plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* S50. *Can. J. Microbiol.* 51: 305-314.

- Kojic, M., Strahinic, I., Fira, D., Jovcic, B., Topisirovic, L. 2006. Plasmid content and bacteriocin production by five strains of *Lactococcus lactis* isolated from semi-hard homemade cheese. *Can. J. Microbiol.* 52: 1110–1120.
- Kojic, M., Lozo, J., Jovcic, B., Strahinic, I., Fira, D., Topisirovic, L. 2010. Construction of a new shuttle vector and its use for cloning and expression of two plasmid-encoded bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8. *Int. J. Food Microbiol.* 140: 117-124.
- Kojic, M., Jovcic, B., Strahinic, I., Begovic, J., Lozo, J., Veljovic, K., Topisirovic, L. 2011. Cloning and expression of a novel lactococcal aggregation factor from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1. *BMC Microbiol.* 11: 265. doi: 10.1186/1471-2180-11-265.
- Kristiansen, P. E., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J. 2005. Structure and mode of action of the membrane-permeabilizing antimicrobial peptide pheromone plantaricin A. *J. Biol. Chem.* 280: 22945-22950.
- Law, J., Buist, G., Haandrikman, A., Kok, J., Venema, G., Leenhouts, K. 1995. A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J. Bacteriol.* 177: 7011–7018.
- Leer, R. J., van der Vossen, J. M. B. M., van Giezen, M., van Noort, J. M., Pouwels, P. H. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol.* 141: 1629-1635.
- Lozo, J., Vukasinovic M., Strahinic, I., Topisirovic, L. 2004. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. *J. Food Prot.* 67: 2727–2734.
- Maguin, E., Duwat, P., Hege, T., Ehrlich, D., Gruss, A. 1992. New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 174: 5633-5638.
- Maguin, E., Prevost, H., Ehrlich, S. D., Gruss, A. 1996. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 178: 931–935.

- Maldonado, A., Ruiz-Barba, J. L., Jimenez-Diaz, R. 2003. Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 383-389.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Maqueda, M., Galvez, A., Bueno, M. M., Sanchez-Barrena, M. J., Gonzalez, C., Albert, A., Rico, M., Valdivia, E. 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5: 399-416.
- Martinez, B., Fernandez, M., Suarez, J. E. and Rodrigez, A. 1999. Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiol.* 145: 3155-3161.
- Martinez, B., Bottiger, T., Schneider, T., Rodriguez, A., Sahl, H. G., Wiedemann, I. 2008. Specific interaction of the unmodified bacteriocin lactococcin 972 with the cell wall precursor lipid II. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4666-4670.
- Martin-Visscher, L. A., van Belkum, M. J., Garneau-Tsodikova, S., Whittal, R. M., Zheng, J., McMullen, L. M., Vederas, J. C. 2008. Isolation and characterization of carnocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4756-4763.
- Martin-Visscher, L. A., Gong, X., Duszyk, M., Vederas, J. C. 2009. The three-dimensional structure of carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif. *J. Biol. Chem.* 284: 28674-28681.
- Marugg, J. D., Gonzalez, C. F., Kunka, B. S., Ledebor, A. M., Pucci, M. J., Toonen, M. Y., Walker, S. A., Zoetmulder, L. C., Vandenberg, P. A. 1992. Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in

- production of pediocin PA-1, bacteriocin from *Pediococcus acidilacticus* PAC10. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2360-2367.
- Masuda, Y., Ono, H., Kitagawa, H., Ito, H., Mu, F., Sawa, N., Zendo, T., Sonomoto, K. 2011. Identification and characterization of leucocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 8164–8170.
- McAuliffe, O., Hill, C., Ross, R. P. 2000. Each peptide of the two-component lantibiotic lactacin 3147 requires a separate modification enzyme for activity. *Microbiol.* 146: 2147–2154.
- McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 285-308.
- McClerren, A. L., Cooper, L. E., Quan, C., Thomas, P. M., Kelleher, N. L., van der Donk, W. A. 2006. Discovery and in vitro biosynthesis of haloduracin, a two-component lantibiotic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 17243–17248.
- Metivier, A., Pilet, M. F., Dousset, X., Sorokine, O., Anglade, P., Zagorec, M., Picard, J. C., Marion, D., Cenatiemp, Y., Fremaux, C. 1998. Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiol.* 144: 2837-2844.
- Michaela, S., Reinhard, W., Gerhard, K., Christine, M. E. 2009. Cultivation of anaerobic and facultatively anaerobic bacteria from spacecraft-associated clean rooms. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3484-3491.
- Mierau, I., Kleerebezem, M. 2005. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 705-717.
- Miller, J. H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Miller, K. W., Ray, P., Steinmetz, T., Hanekamp, T., Ray, B. 2005. Gene organization and sequences of pediocin AcH/PA-1, production operons in *Pediococcus* and *Lactococcus* plasmids. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 52-62.
- Morgan, S. M., O'Connor, P. M., Cotter, P. D, Ross, R. P., Hill, C. 2005. Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic lactacin 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 2606-2611.
- Motlagh, A. M., Bhunia, A. K., Szostek, F., Hansen, T. R., Johnson, M. C., Raz, B. 1992. Nucleotid and amino acid sequence of pap-gene (pediocin Ach production) in *Pediococcus acidilactici* H. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 45-48.
- Nagao, J., Asaduzzaman, S. M., Aso, Y., Okuda, K., Nakayama, J., Sonomoto, K. 2006. Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm. *J. Biosci. Bioeng.* 102: 139-149.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antoine Van Leeuwenhoek.* 70: 113-128.
- Nes, I. F., Eijsink, V. G. H. 1999. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum sensing mechanisms. In: *Cell-cell signalling in bacteria.* eds. Dunny, G. M., Winans, S.C. p: 175-192. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Nes, I. F., Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers.* 55: 50-61.
- Netz, D. J., Sahl, H. G., Marcelino, R., dos Santos, N. J., de Oliveira, S. S., Soares, M. B., do Carmo de Freire Bastos, M. 2001. Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 311: 939-949.
- Nieto-Lozano, J. C., Meyer, J. N., Sletten, K., Pelaz, C., Nes, I. F. 1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1985-1990.

- Nishie, M., Nagao, J., Sonomoto, K. 2012. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol. Sci.* 17: 1-16.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L. S., Sletten, K., Nes, I. F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174: 5686-5692.
- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegard, C., Haugen, H. S., Kristiansen, P. E. 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10: 19-37.
- Nissen-Meyer, J., Oppegard, C., Rogne, P., Haugen, H. S., Kristiansen, P. E. 2010. Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2: 52-60.
- Nusbaum, C., Ohsumi, T. K., Gomez, J., Aquadro, J., Victor, T. C., Warren, R. M., Hung, D. T., Birren, B. W., Lander, E. S. 2009. Sensitive, specific polymorphism discovery in bacteria using massively parallel sequencing. *Nat. Methods.* 6: 67-69.
- Oppegard, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P. E., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 210-219.
- Oppegard, C., Rogne, P., Kristiansen, P. E., Nissen-Meyer, J. 2010. Structure analysis of 636 the two-peptide bacteriocin lactococcin G by introducing D-amino acid residues. *Microbiol.* 156: 1883-1889.
- Okuda, K., Aso, Y., Nakayama, J., Sonomoto, K. 2008. Cooperative transport between NukFEG and NukH in immunity against the lantibiotic nukacin ISK-1 produced by *Staphylococcus warneri* ISK-1. *J. Bacteriol.* 190: 356-362.

- O'Sullivan, D. J., Klaenhammer, T. R. 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* ssp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2730-2733.
- Ovchinnikov, K., Kristiansen, P. E., Uzelac, G., Topisirovic, L., Kojic, M., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Diep, D. B. 2014. Defining the structure and receptor binding domain of the leaderless bacteriocin LsbB. *J. Biol. Chem.* doi: 10.1074/jbc.M114.579698.
- Postma, P. W., Langelier, J. W., Jacobson, G.R. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 543-594.
- Quadri, L. E., Kleerebezem, M., Kuipers, O. P., de Vos, W. M., Roy, K. L., Vederas, J. C., Stiles, M. E. 1997. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* 179: 6163-6171.
- Ramnath, M., Beukes, M., Tamura, K., Hastings, J. W. 2000. Absence of a putative 653 mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-654 resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3098-3101.
- Ramnath, M., Arous, S., Gravesen, A., Hastings, J. W., Héchar, Y. 2004. Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiol.* 150: 2663-2668.
- Rea, M. C., Sit, C. S., Clayton, E., O'Connor, P. M., Whittal, R. M., Zheng, J., Vederas, J. C., Ross, R. P., Hill, C. 2010. Thuricin CD, a postrationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 9352-9357.
- Rea, M. C., Ross, R. P., Cotter, P. D., Hill, C. 2011. Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In: *Prokaryotic antimicrobial peptides from*

- genes to applications eds. Drider, D., Rebuffat, S. p: 29-53. Springer New York Dordrecht Heidelberg London.
- Rihakova, J., Petit, V. W., Demnerova, K., Prevost, H., Rebuffat, S., Drider, D. 2009. Insights into structure-activity relationships in the C-terminal region of divercin V41, a class IIa bacteriocin with high-level antilisterial activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 1811-1819.
- Risoen, P. A., Havarstein, L. S., Diep, D. B., Nes, I. F. 1998. Identification of the DNA-binding sites for two response regulators involved in control of bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Gen. Genet.* 259: 224-232.
- Risoen, P. A., Johnsberg, O., Diep, D. B., Hamoen, L., Venema, G., Nes, I. F. 2001. Regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* depends on a conserved promoter arrangement with consensus binding sequence. *Mol. Genet. Genomics.* 265: 198-206.
- Robichon, D., Gouin, E., De'barbouille, M., Cossart, P., Cenatiempo, Y., Hechard, Y. 1997. The *rpoN* (s54) gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 179: 7591-7594.
- Rodriguez, J. M., Martinez, M. I., Kok, J. 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42: 91-121.
- Sahl, H. G., Jack, R. W., Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.* 230: 827-853.
- Sang, Y., Blecha, F. 2008. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Anim. Health Res. Rev.* 9: 227-235.
- Sanchez, J., Diep, D. B., Herranz, C., Nes, I. F., Cinitas, L. M. and Hernandez, P. E. 2007. Amino acid and nucleotid sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 227-236.

- Sanz, B., Selgas, D., Parejo, I., Ordonez, J. A. 1988. Characteristics of lactobacilli isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 199-205.
- Sawa, N., Zendo, T., Kiyofuji, J., Fujita, K., Himeno, K., Nakayama, J., Sonomoto, K. 2009. Identification and characterization of lactocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 1552-1558.
- Simmonds, R. S., Simpson, W. J., Tagg, J. R. 1997. Cloning and sequence analysis of zooA, a *Streptococcus zooepidemicus* gene encoding a bacteriocin-like inhibitory substance having a domain structure similar to that of lysostaphin. *Gene.* 189: 255-261.
- Simpson, J. T., Wong, K., Jackman, S. D., Schein, J. E., Jones, S. J. M., Birol, I. 2009. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome. Res.* 19: 1117-1123.
- Skaugen, M., Cintas, L. M., Nes, I. F. 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. In: *Genetics of lactic acid bacteria.* eds. Wood, B.J.B., Warner, P.J. p: 225-260. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Snyder, A. B., Worobo, R. W. 2014. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *J. Sci. Food Agric.* 94: 28-44.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Stein, T., Heinzmann, S., Dusterhus, S., Borchert, S., Entian, K. D. 2005. Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes *spalFEG* in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. *J. Bacteriol.* 187: 822-828.
- Sulavik, M. C., Clewell, D. B. 1996. Rgg is a positive transcriptional regulator of the *Streptococcus gordonii* gtfG gene. *J. Bacteriol.* 178: 5826-5830.
- Tahara, T., Oshimura, M., Umezawa, C. and Kanatani, K. 1996. Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1132, a two-component

- bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM1132. Appl. Environ. Microbiol. 62: 130-135.
- Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., Ike, Y. 1996. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. J. Bacteriol. 178: 3585-3593.
- Twomey, D., Ross, R. P., Ryan, M., Meaney, B., Hill, C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: Structure, function, and applications. Anton. Van Leeuw. 82: 165-185.
- Uzelac, G., Kojic, M., Lozo, J., Aleksandrzak-Piekarczyk, T., Gabrielsen, C., Kristensen, T., Nes, I. F., Diep, D. B., Topisirovic, L. 2013. A Zn-dependent metallopeptidase is responsible for sensitivity to LsbB, a class II leaderless bacteriocin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5. J. Bacteriol. 195: 5614-5621.
- Valdes-Stauber, N., Scherer, S. 1994. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3809-3814.
- van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Jeeninga, R. E., Kok, J., Venema, G. 1991a. Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. Appl. Environ. Microbiol. 57: 492-498.
- van Belkum, M. J., Visscher, L. A., Vederas, J. C. 2011. Structure and genetics of circular bacteriocins. Trends Microbiol. 19: 411-418.
- van der Meer, Jr., Polman, J., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., Kuipers, O. P., de Vos, W. M. 1993. Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. J. Bacteriol. 175: 2578-2588.
- van Wely, K. H. M., Swaving, J., Freudl, R. and Driessen, A. J. M. 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 25: 437-454.

- Varcamonti, M., Nicastrò, G., Venema, G., Kok, J. 2001. Proteins of the lactococcal A secretion system: *lcnD* encodes two in-frame proteins. FEMS Microbiol. Lett. 204: 259-263.
- Wescombe, P. A., Tagg, J. R. 2003. Purification and characterization of streptin, a type A1 lantibiotic produced by *Streptococcus pyogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2737-2747.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., Sahl, H. G. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. J. Biol. Chem. 276: 1772-1779.
- Willey, J. M., van der Donk, W. A. 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. Annu. Rev. Microbiol. 61: 477-501.
- Wirawan, R. E., Swanson, K. M., Kleffmann, T., Jack, R. W., Tagg, J. R. 2007. Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. Microbiol. 153: 1619 -1630.
- Worobo, R. W., van Belkum, M. J., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C., Stiles, M. E. 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. J. Bacteriol. 177: 3143-3149.
- Xie, L., Miller, L. M., Chatterjee, C., Averin, O., Kelleher, N. L., van der Donk, W. A. 2004. Lacticin 481: In vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity. Science. 303: 679-681.
- Yoneyama, F., Imura, Y., Ichimasa, S., Fujita, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., Sonomoto, K. 2008. Lacticin Q, a lactococcal bacteriocin, causes high-level membrane permeability in the absence of specific receptors. Appl. Environ. Microbiol. 75: 538-541.
- Yoneyama, F., Imura, Y., Ohno, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., Sonomoto, K. 2009. Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q. Antimicrob. Agents. Chemother. 53: 3211-3217.

- Zendo, T., Koga, S., Shigeri, Y., Nakayama, J., Sonomoto, K. 2006. Lactococcin Q, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3383-3389.
- Zendo, T. 2013. Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 893-899.

BIOGRAFIJA AUTORA

Gordana S. Uzelac je rođena 03.08.1986. godine u Šibeniku, Republika Hrvatska. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Prehrambena tehnologija biljnih proizvoda upisala je 2004. godine, a diplomirala 16.07.2009. godine sa prosečnom ocenom 8,78 (osam sedamdeset osam) u toku studija, i ocenom 10 (deset) na diplomskom radu „Antimikrobna i antioksidativna svojstva piva sa dodatkom ekstrakta matičnjaka“.

Doktorske akademske studije na istom fakultetu upisala je školske 2009/10. godine, smer Prehrambena tehnologija, uža naučna oblast istraživanja Tehnološka mikrobiologija. U zvanje istraživača saradnika prvi put je izabrana 25.11.2010. godine odlukom naučnog veća Poljoprivrednog fakulteta, a reizabrana je 21.10.2013. godine odlukom naučnog veća Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.

U periodu od 01.01.2011. do 31.12.2011. godine bila je angažovana na projektu Razvoj novih inkapsulisanih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenti hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti" br. 046010. Od 01.01.2012. godine zaposlena je na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), u laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju (LMM), i radi na projektu „ Izučavanje gena i molekularnih mehanizama u osnovi probiotske aktivnosti bakterija mlečne kiseline izolovanih sa područja Balkana“ br. 173019.

Autor je i koautor šest radova sa ISI liste objavljenih u uglednim inostranim časopisima (dva rada iz doktorske disertacije) i devet saopštenja na domaćim i međunarodnim kongresima.

Dobitnik je FEMS stipendije za mlade naučnike u 2014. godini, kao i Arturo Falasci (ICGEB) stipendije u 2014. godini.

Član je udruženja mikrobiologa Srbije od 2009. godine.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Gordana Uzelac

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije 5/09

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom: KARAKTERIZACIJA BAKTERIOCINA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE I MEHANIZMI DELOVANJA NA SENZITIVNE ĆELIJE

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena doktorska disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Prilog 2.

**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE
VERZIJE DOKTORSKE DISERTACIJE**

Ime i prezime autora Gordana Uzelac

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije 5/09

Studijski program Prehrambena tehnologija

Naslov doktorske disertacije KARAKTERIZACIJA BAKTERIOCINA
BAKTERIJA MLEČNE KISELINE I MEHANIZMI DELOVANJA NA
SENZITIVNE ĆELIJE

Mentori prof. dr Zorica Radulović; dr Milan Kojić

Potpisani/a Gordana Uzelac

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

KARAKTERIZACIJA BAKTERIOCINA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE I MEHANIZMI DELOVANJA NA SENZITIVNE ĆELIJE

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na kraju).

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

1. **Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo** - nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo** - nekomercijalno - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo** - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo** - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo** - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira

pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.