

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Metoda ZORIČ PETERNEL

**AKTIVNOST BAKTERIOCINSKIH KOMPLEKSOV  
SEVOV *Lactobacillus gasseri* K7 IN *Lactobacillus gasseri*  
LF221 V RAZLIČNIH EKSPRESIJSKIH SISTEMIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOLOŠKIH IN BIOTEHNIŠKIH ZNANOSTI

Metoda ZORIČ PETERNEL

**AKTIVNOST BAKTERIOCINSKIH KOMPLEKSOV SEVOV  
*Lactobacillus gasseri* K7 IN *Lactobacillus gasseri* LF221 V RAZLIČNIH  
EKSPRESIJSKIH SISTEMIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**BACTERIOCIN COMPLEX ACTIVITY OF *Lactobacillus gasseri* K7  
AND *Lactobacillus gasseri* LF221 STRAINS IN DIFFERENT  
EXPRESSION SYSTEMS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2007

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti, s področja biotehnologije. Delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za mlekarstvo in Katedre za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, v norveškem laboratoriju Laboratory of Microbial Gene Technology (Department of Chemistry, Biotechnology and Food science, Norwegian University of Life Science) in v laboratoriju za Biotehnologijo Raziskovalnega odseka za Kemijo in Biokemijo na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Senat Univerze v Ljubljani je dne 10.5.2005 na osnovi sklepov senata Biotehniške fakultete potrdil odobritev neposrednega prehoda na doktorski študij s področja Biotehnologije in sprejel temo doktorske disertacije. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Irena Rogelj.

Mentorica:    prof. dr. Irena ROGELJ  
                    Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:    prof. dr. Peter RASPOR  
                    Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica:        prof. dr. Irena ROGELJ  
                    Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica:        prof. dr. Jagoda ŠUŠKOVIĆ  
                    Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Datum zagovora: 8. junij 2007

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorandka:  
Metoda ZORIČ PETERNEL

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

DK 579.6:579.22/26:577.2.08(043)=863

KG *Lactobacillus gasseri* K7 / *Lactobacillus gasseri* LF221 / bakteriocini / dvopeptidni bakteriocini / gassericini / heterologno izražanje / molekularno-biološke tehnike

AV ZORIČ PETERNEL, Metoda, univ. dipl. inž. živil tehnol.

SA ROGELJ, Irena (mentorica)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje: biotehnologija

LI 2007

IN AKTIVNOST BAKTERIOCINSKIH KOPLEKSOV SEVOV *Lactobacillus gasseri* K7 IN *Lactobacillus gasseri* LF221 V RAZLIČNIH EKSPRESIJSKIH SISTEMIH

TD Doktorska disertacija s področja biotehnologije

OP XVI, 138 s., 15 pregl., 35 sl., 13 pril., 201 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Seva *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221 sta humanega izvora, izkazujeta osnovne probiotične lastnosti in tvorita bakteriocine s širokim protimikrobnim spektrom. Proučevali smo bakteriocinski kompleks seva K7, ga primerjali z že opisanimi bakteriocini ter preverili obstojnost tvorbe in aktivnost v stresnih pogojih gojenja. Ugotavliali smo heterologno izražanje bakteriocinov sevov K7 in LF221 v sevih: *Lc. lactis* IL1403, *Ent. faecium* 2749, *E. coli* 2746 in 2747, *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup>, *Lc. lactis* K1, *E. coli* BL21 DE3pLysS in *Lc. lactis* NZ9000. Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali standardne metode molekularne biologije. Potrdili smo, da sev K7 tvori vsaj dva bakteriocina, gassericina K7 A in K7 B, katerih nukleotidni zaporedji smo shranili v gensko banko GenBank pod številkama EF392861 in AY307382. Ugotovili smo 100-odstotno identičnost gassericina K7 A z acidocinom LF221 A ter gassericina K7 B z acidocinom LF221 B in navzkrižno aktivnost homolognih podenot gassericina K7 B in gassericina T. Gassericina K7 A in K7 B smo uvrstili med dvopeptidne bakteriocine. Heterolognega izražanja aktivnih bakteriocinov sevov K7 in LF221 v izbranih gramnegativnih in grampozitivnih ekspresijskih sistemih nismo uspeli potrditi, kljub temu, da smo v transformantah potrdili prisotnost in nukleotidna zaporedja insertov. Izpostavljenost seva K7 povišani temperaturi gojenja ali mutagenom dejavnikom ni vplivala na sposobnost tvorbe in aktivnost bakteriocinov, se je pa spremenil plazmidni profil in povečala občutljivost za antibiotike. Probiotične lastnosti sevov K7 in LF221 ter širokospektralnost njunih bakteriocinov, ki so novi predstavniki dvopeptidnih bakteriocinov, obetajo številne možnosti uporabe, tako v živilski industriji (bio-konzervansi) kot farmaciji in biomedicini.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd

DC 579.6:579.22/.26:577.2.08(043)=863

CX *Lactobacillus gasseri* K7 / *Lactobacillus gasseri* LF221 / bacteriocins / two-peptide  
bacteriocins / gassericins / heterologous expression / molecular-biological techniques

AU ZORIČ PETERNEL, Metoda

AA ROGELJ, Irena (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and  
Biotechnical sciences: Biotechnology

PY 2007

TI BACTERIOCIN COMPLEX ACTIVITY OF *Lactobacillus gasseri* K7 AND *Lactobacillus gasseri* LF221 STRAINS IN DIFFERENT EXPRESSION SYSTEMS

DT Doctoral dissertation

NO XVI, 138 p., 15 tab., 35 fig., 13 ann., 201 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Strains *L. gasseri* K7 and *L. gasseri* LF221 are of human origin, fulfil basic probiotic requirements and produce bacteriocins with wide inhibitory spectrum. We studied closely bacteriocin complex of the K7 strain, compared it with already described bacteriocins and investigated stability of production and activity under stress conditions. We performed heterologous expression studies with bacteriocins of K7 and LF221 strains in *Lc. lactis* IL1403, *Ent. faecium* 2749, *E. coli* 2746 and 2747, *L. gasseri* LF221 bac<sup>+</sup>, *Lc. lactis* K1, *E. coli* BL21 DE3pLysS and *Lc. lactis* NZ9000 strains. Basic molecular biology tools and technics were used at experimental studies. We determined that K7 strain produces at least two bacteriocins, named gassericin K7 A and gassericin K7 B whose acquired nucleotide sequences were deposited at GenBank under accession numbers EF392861 and AY307382. We found out a 100-percent identity of gassericin K7 A to acidocin LF221 A and gassericin K7 B to acidocin LF221 B, respectively and crosswise activity of homological subunits of gassericin K7 B and gassericin T. Gassericins K7 A and K7 B were classified as two-peptide bacteriocins. We were not able to confirm heterologous production and activity of K7 and LF221 strains' bacteriocins in selected Gram-negative and Gram-positive expression systems although we confirmed the presence and nucleotide sequences of the inserts. Higher incubation temperature or presence of mutagenic agents did not effect the production or activity of K7 bacteriocins but caused increased antibiotic susceptibility and changes in plasmid profile. Probiotic properties of K7 and LF221 strains and production of bacteriocins with wide inhibitory spectra that are new members of the two-peptide bacteriocins, are very promising for applications in food industry (bio-conservans), pharmacy and biomedicine.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	II
Key words documentation	III
Kazalo vsebine	IV
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XII
Okrajšave in simboli	XIII
Simboli v aminokislinskih zaporedjih	XV
Simboli v nukleotidnih zaporedjih	XV
Genski kod	XVI
<b>1           UVOD</b>	<b>1</b>
1.1    UVOD	1
1.2    HIPOTEZE	2
<b>2           PREGLED OBJAV</b>	<b>4</b>
2.1    BAKTERIOCINI MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ	4
<b>2.1.1   Definicija bakteriocinov</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2   Razvrstitev bakteriocinov</b>	<b>4</b>
2.2    BAKTERIOCINI SKUPINE II	6
<b>2.2.1   Razdelitev bakteriocinov skupine II</b>	<b>6</b>
2.2.1.1   Dvopeptidni bakteriocini	7
<b>2.2.2   MKB, ki hkrati tvorijo več bakteriocinov</b>	<b>7</b>
2.3    BIOSINTEZA BAKTERIOCINOV SKUPINE II	8
<b>2.3.1   Organizacija bakteriocinskih genov</b>	<b>9</b>
2.3.1.1   Sinteza bakteriocinskega prepeptida (prekurzorja)	10
2.3.1.2   Imunost bakteriocinogene bakterije	10
2.3.1.3   Izločanje in aktivacija bakteriocinov	11
2.3.1.3.1   Vloga vodilnega zaporedja	11
2.3.1.3.2   Vloga dodatnega transportnega proteina	11
<b>2.3.2   Regulacija biosinteze bakteriocinov</b>	<b>12</b>
2.3.2.1   Trikomponentni regulatorni sistem	12
2.3.2.2   Feromoni in "quorum sensing" regulacija	12
2.4    NAČIN DELOVANJA BAKTERIOCINOV SKUPINE II	13
<b>2.4.1   Membranska aktivnost bakteriocinov in tvorba por</b>	<b>14</b>
2.4.1.1   Tvorba por	16
2.4.1.2   Delovanje dvopeptidnih bakteriocinov	16
2.4.1.3   Povezava med strukturo, funkcijo in delovanjem bakteriocinov	17
2.4.1.3.1   Vpletjenost receptorskih molekul	18

<b>2.4.2 Protimikrobní spekter bakteriocinov</b>	<b>18</b>
<b>2.5 HETEROLOGNA TVORBA BAKTERIOCINOV MKB</b>	<b>19</b>
<b>2.5.1 Izbera ekspresijskega sistema</b>	<b>19</b>
2.5.1.1 Gramnegativni ekspresijski sistemi (bakterija <i>Escherichia coli</i> )	20
2.5.1.2 Grampozitivni ekspresijski sistemi (bakterija <i>Lactococcus lactis</i> )	20
2.5.1.2.1 Ekspresijski sistem NICE	21
<b>2.5.2 Primeri heterologno izraženih bakteriocinov MKB</b>	<b>22</b>
2.5.2.1 Heterologna tvorba bakteriocinov MKB na osnovi izražanja matičnih genov	23
2.5.2.2 Heterologna tvorba bakteriocinov MKB s pomočjo izmenjave vodilnih peptidov in/ali ABC-procesno-transportnih sistemov	23
2.5.2.3 Heterologna tvorba bakteriocinov MKB s pomočjo splošnega sekretornega ( <i>sec</i> ) sistema	24
2.5.2.4 Heterologna tvorba bakteriocinov MKB z uporabo sistema NICE	24
2.5.2.5 Heterologna tvorba bakteriocinov MKB v kvasovkah	24
2.5.2.6 Heterologna tvorba bakteriocinov MKB v gramnegativnih bakterijah ( <i>E. coli</i> )	25
<b>2.6 UPORABA BAKTERIOCINOV MKB IN PERSPEKTIVE</b>	<b>25</b>
<b>2.6.1 Uporaba lantibiotikov</b>	<b>26</b>
<b>2.6.2 Uporaba nelantibiotikov</b>	<b>26</b>
<b>2.6.3 Omejitve uporabe bakteriocinov</b>	<b>27</b>
<b>2.7 BAKTERIOCINI SEVOV <i>L. gasseri</i> K7 in <i>L. gasseri</i> LF221</b>	<b>27</b>
<b>2.7.1 Probiotične in tehnološke lastnosti sevov K7 in LF221</b>	<b>27</b>
<b>2.7.2 Bakteriocinski kompleks seva LF221</b>	<b>28</b>
<b>2.7.3 Bakteriocinski kompleks seva K7</b>	<b>28</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>29</b>
<b>3.1 POTEK POSKUSOV</b>	<b>29</b>
<b>3.1.1 Določanje in analiza nukleotidnih zaporedij bakteriocinov sevov K7 in LF221</b>	<b>30</b>
<b>3.1.2 Izražanje bakteriocinov sevov K7 in LF221 v različnih ekspresijskih sistemih</b>	<b>32</b>
3.1.2.1 Izražanje gassericina K7 A in acidocina LF221 A v sevu <i>Lc. lactis</i> IL1403	34
3.1.2.2 Izražanje gassericina K7 A v sevu <i>Lc. lactis</i> K1	34
3.1.2.3 Izražanje gassericina K7 B in acidocina LF221 B v sevu <i>Lc. lactis</i> IL1403	35
3.1.2.4 Izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B v sevu <i>Ent. faecium</i> 2749	35
3.1.2.5 Izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B v sevih <i>E. coli</i> 2746 in <i>E. coli</i> 2747	36
3.1.2.6 Izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B v sevu <i>L. gasseri</i> LF221 bac <sup>-</sup>	36
3.1.2.7 Inducibilno izražanje posameznih podenot gassericina K7 A brez N-terminalnih vodilnih zaporedij, v sevih <i>E. coli</i> BL21 DE3 pLysS, <i>Lc. lactis</i> IL1403 in NZ9000	36
<b>3.1.3 Obstojnost seva K7 v različnih stresnih pogojih</b>	<b>38</b>
3.1.3.1 Karakterizacija matične kulture seva K7	39
3.1.3.2 Preverjanje obstojnosti lastnosti seva K7 v stresnih pogojih gojenja	39
<b>3.2 KEMIKALIJE IN OPREMA</b>	<b>39</b>
<b>3.2.1 Splošne kemikalije</b>	<b>39</b>
<b>3.2.2 Komercialni kompleti za izolacijo in čiščenje DNA</b>	<b>41</b>
3.2.2.1 Kompleti za izolacijo genomske in plazmidne DNA	41

3.2.2.2	Kompleti za čiščenje DNA iz agaroznega gela	41
3.2.2.3	Kompleti za čiščenje DNA neposredno iz reakcijskih mešanic za PCR	41
3.2.2.4	Označevalci velikosti	42
<b>3.2.3</b>	<b>Gojišča in antibiotiki</b>	<b>42</b>
3.2.3.1	Gojišča	42
3.2.3.2	Antibiotiki	44
<b>3.2.4</b>	<b>Encimi</b>	<b>45</b>
3.2.4.1	Restriktivne endonukleaze	45
3.2.4.2	Ostali encimi	45
<b>3.2.5</b>	<b>Začetni oligonukleotidi</b>	<b>47</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Laboratorijska oprema</b>	<b>49</b>
<b>3.3</b>	<b>BAKTERIJSKI SEVI IN PLAZMIDI</b>	<b>50</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Bakterijski sevi in pogoji gojenja</b>	<b>51</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Plazmidni vektorji in njihove lastnosti</b>	<b>53</b>
<b>3.4</b>	<b>METODE</b>	<b>58</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Izolacija genomske DNA</b>	<b>58</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Izolacija plazmidne DNA</b>	<b>58</b>
3.4.2.1	Izolacija plazmidne DNA iz bakterij <i>E. coli</i>	59
3.4.2.2	Izolacija plazmidne DNA iz laktobacilov	59
3.4.2.3	Izolacija plazmidne DNA iz laktokokov in enterokokov	60
3.4.2.4	Ugotavljanje koncentracije DNA	60
<b>3.4.3</b>	<b>Elektroforeza DNA na agaroznem gelu</b>	<b>61</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)</b>	<b>61</b>
3.4.4.1	PCR na osnovi kolonije	63
<b>3.4.5</b>	<b>Čiščenje in obdelava pomnožkov PCR</b>	<b>64</b>
3.4.5.1	Čiščenje pomnožkov PCR iz agaroznega gela	64
3.4.5.2	Čiščenje pomnožkov PCR neposredno iz reakcijskih mešanic PCR	64
3.4.5.3	Obdelava pomnožkov PCR ("blunt ending 3' and 5' overhangs")	64
3.4.5.4	Dodajanje A-repkov pomnožkom PCR ("A-tailing")	64
<b>3.4.6</b>	<b>Restriktija DNA</b>	<b>65</b>
3.4.6.1	Reakcije enojne restriktije	65
3.4.6.2	Reakcije dvojne restriktije	65
3.4.6.3	Obarjanje DNA z etanolom in koncentriranje	66
3.4.6.4	Defosforilacija plazmidnega vektorja	66
<b>3.4.7</b>	<b>Ligacija</b>	<b>66</b>
3.4.7.1	Kloniranje pomnožkov PCR	67
<b>3.4.8</b>	<b>Priprava kompetentnih celic</b>	<b>67</b>
3.4.8.1	Priprava kemijsko kompetentnih celic bakterij <i>E. coli</i>	67
3.4.8.2	Priprava elektro kompetentnih celic bakterij <i>E. coli</i>	67
3.4.8.3	Priprava elektro kompetentnih celic bakterij <i>Lc. lactis</i>	68
3.4.8.4	Priprava elektro kompetentnih celic bakterij <i>Ent. faecium</i>	68
3.4.8.5	Priprava elektro kompetentnih celic bakterij <i>L. gasseri</i>	68
<b>3.4.9</b>	<b>Transformacija bakterij</b>	<b>69</b>
3.4.9.1	Transformacija bakterij <i>E. coli</i> s topotnim šokom	69
3.4.9.2	Transformacija bakterij z elektrošokom (elektroporacija)	69
3.4.9.3	Iskanje pozitivnih transformant	70
<b>3.4.10</b>	<b>Konjugacija</b>	<b>70</b>
<b>3.4.11</b>	<b>Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja</b>	<b>71</b>
3.4.11.1	Priprava trajnih bakterijskih kultur	71
<b>3.4.12</b>	<b>Ugotavljanje izražanja bakteriocinov s pomočjo indikatorskega seva</b>	<b>71</b>
3.4.12.1	Spot test s kolonijami	71

3.4.12.2 Difuzijski test z brezceličnimi supernatanti	72
3.4.12.2.1 Obarjanje brezceličnih supernatantov z amonijevim sulfatom	72
3.4.12.2.2 Dializa brezceličnih supernatantov proti PEG	73
3.4.12.2.3 Liofilizacija brezceličnih supernatantov	73
3.4.12.3 Spot test z mešanimi kulturami	73
3.4.12.4 Preverjanje bakteriocinske aktivnosti supernatantov na mikrotiterskih ploščah	74
<b>3.4.13 Ugotavljanje morfoloških lastnosti in števila kolonijskih enot</b>	<b>74</b>
<b>3.4.14 Določanje profila fermentacije ogljikovih hidratov</b>	<b>74</b>
<b>3.4.15 Ugotavljanje občutljivosti za antibiotike</b>	<b>74</b>
<b>3.4.16 Analiza proteinov</b>	<b>74</b>
3.4.16.1 Izražanje podenot gassericina K7 A v bakterijah <i>E. coli</i> in <i>Lc. lactis</i> s pomočjo indukcije	75
3.4.16.2 Priprava celičnih lizatov	75
3.4.16.3 Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza (NaDS-PAGE)	75
<b>4 REZULTATI</b>	<b>77</b>
<b>4.1 UGOTAVLJANJE IN ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ BAKTERIOCINOV SEVOV K7 IN LF221</b>	<b>77</b>
<b>4.1.1 Nukleotidno zaporedje gassericina K7 A in manjkajoče nukleotidno zaporedje acidocina LF221 A na N-terminalnem koncu</b>	<b>77</b>
<b>4.1.2 Nukleotidno zaporedje gassericina K7 B in manjkajoče nukleotidno zaporedje acidocina LF221 B na N-terminalnem koncu</b>	<b>78</b>
<b>4.1.3 Analiza in primerjava nukleotidnih zaporedij bakteriocinov K7 in LF221</b>	<b>80</b>
4.1.3.1 Gassericin K7 A in acidocin LF221 A	80
4.1.3.2 Gassericin K7 B in acidocin LF221 B	82
4.1.3.3 N-terminalna vodilna zaporedja bakteriocinov sevov K7 in LF221	84
4.1.3.4 Razvrstitev gassericinov K7 A in K7 B med bakteriocine MKB	85
<b>4.2 IZRAŽANJE BAKTERIOCINOV SEVOV K7 IN LF221 V RAZLIČNIH EKSPRESIJSKIH SISTEMIH</b>	<b>86</b>
<b>4.2.1 Izražanje gassericina K7 A in acidocina LF221 A v sevu <i>Lc. lactis</i> IL1403</b>	<b>86</b>
<b>4.2.2 Izražanje gassericina K7 A v sevu <i>Lc. lactis</i> K1</b>	<b>89</b>
<b>4.2.3 Izražanje gassericina K7 B in acidocina LF221 B v sevu <i>Lc. lactis</i> IL1403</b>	<b>90</b>
<b>4.2.4 Izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B v sevu <i>Ent. faecium</i> 2749</b>	<b>91</b>
<b>4.2.5 Izražanje gassericina K7 A in K7 B ter acidocin LF221 B v sevih <i>E. coli</i> 2746 in <i>E. coli</i> 2747</b>	<b>92</b>
<b>4.2.6 Izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B v sevu <i>L. gasseri</i> LF221 bac</b>	<b>95</b>
<b>4.2.7 Inducibilno izražanje posameznih podenot gassericina K7 A brez N-terminalnih vodilnih zaporedij, v sevih <i>E. coli</i> BL21 DE3 pLysS, <i>Lc. lactis</i> IL1403 in <i>Lc. lactis</i> NZ9000</b>	<b>95</b>
4.2.7.1 Izražanje GasK7a in GasK7A v <i>E. coli</i> BL21 DE3 pLysS	95
4.2.7.2 Izražanje GasK7a in GasK7A v <i>Lc. lactis</i> IL1403 in <i>Lc. lactis</i> NZ9000	98
<b>4.3 OBSTOJNOST SEVA K7 V RAZLIČNIH STRESNIH POGOJIH</b>	<b>101</b>
<b>4.3.1 Lastnosti matične kulture seva K7</b>	<b>101</b>
<b>4.3.2 Lastnosti seva K7, gojenega v različnih stresnih pogojih</b>	<b>101</b>
4.3.2.1 Obstojnost plazmida v različnih stresnih pogojih	101
4.3.2.2 Sposobnost tvorbe bakteriocinov v različnih stresnih pogojih	103

4.3.2.3	Morfologija in število kolonijskih enot poskusnih vzorcev K7	103
4.3.2.4	Profili fermentacij ogljikovih hidratov po izpostavitvi različnim stresnim pogojem	104
4.3.2.5	Občutljivost seva K7 za antibiotike, po izpostavitvi različnim stresnim pogojem	104
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b>	<b>106</b>
5.1	RAZPRAVA	106
5.1.1	Določanje in analiza nukleotidnih zaporedij bakteriocinov sevov K7 in LF221	106
5.1.2	Kloniranje kodirajočih regij bakteriocinov sevov K7 in LF221 ter izražanje v različnih ekspresijskih sistemih	110
5.1.3	Obstojnost seva K7 pod različnimi stresnimi pogoji	116
5.2	SKLEPI	118
<b>6</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY)</b>	<b>119</b>
6.1	POVZETEK	119
6.2	SUMMARY	121
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>124</b>
<b>ZAHVALA</b>		
<b>PRILOGE (ANNEXES)</b>		

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1 Razdelitev bakteriocinov MKB (Nes in sod., 1996; 2000; Diep in Nes, 2002)	5
Preglednica 2 Uporabljeni antibiotiki in delovne koncentracije za posamezne vrste bakterij	44
Preglednica 3 Uporabljene restriktijske endonukleaze (restriktaze)	46
Preglednica 4 Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje genov gassericinov K7 A in K7 B ter acidocinov LF221 A in LF221 B	47
Preglednica 5 Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje strukturnih genov za posamezne podenote gassericina K7 A in acidocina LF221 A brez vodilnih zaporedij, z dodanimi restriktijskimi mesti	48
Preglednica 6 Univerzalni začetni oligonukleotidi s prijemališči na klonirnih in ekspresijskih plazmidnih vektorjih	49
Preglednica 7 Bakterijski sevi in njihove lastnosti	52
Preglednica 8 Klonirni in ekspresijski plazmidni vektorji in njihove lastnosti	53
Preglednica 9 Pogoji pomnoževanja DNA s PCR	62
Preglednica 10 Pogoji pomnoževanja DNA s PCR na osnovi kolonije	63
Preglednica 11 Pogoji elektroporacije za <i>E. coli</i> , laktokoke, enterokoke in laktobacile	70
Preglednica 12 Analiza 1143 bp nukleotidnega zaporedja DNA odseka <i>Dra</i> I/ <i>Hind</i> III, kodirajoče regije gassericina K7 A	81
Preglednica 13 Analiza 3276 bp nukleotidnega zaporedja DNA odseka <i>Ssp</i> I/ <i>Hind</i> III, kodirajoče regije gassericina K7 B	83
Preglednica 14 Poravnavo N-terminalnih aminokislinskih zaporedij vodilnih peptidov nekaterih dvopeptidnih bakteriocinov	85
Preglednica 15 Občutljivost matičnega seva K7 in seva K7 po štiridesetih precepljanjih v različnih stresnih pogojih, za antibiotike	105

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1 Shematski prikaz tvorbe bakteriocina skupine II (Ennahar in sod., 2000)	9
Slika 2 Shematski prikaz strukture modelnega bakteriocina podskupine IIa in možne interakcije z membrano tarčne celice (Ennahar in sod., 2000)	15
Slika 3 Model propada celice zaradi bakteriocinske tvorbe por (Garneau in sod., 2002)	17
Slika 4 Shematski prikaz genskega ekspresijskega sistema z nizinsko kontrolo (NICE) (Mierau in Kleerebezem, 2005)	22
Slika 5 Potek poskusov v doktorski disertaciji	29
Slika 6 Karakterizacija bakteriocinov sevov K7 in LF221	31
Slika 7 Izražanje bakteriocinov sevov K7 in LF221 v različnih ekspresijskih sistemih	33
Slika 8 Obstojnost seva K7 in tvorbe bakteriocinov v stresnih pogojih	38
Slika 9 Shematski prikaz plazmidnega vektorja pMG36e	54
Slika 10 Shematski prikaz plazmidnega vektorja pBluescript II KS(+) phagemid ( <a href="http://www.fermentas.com">http://www.fermentas.com</a> )	54
Slika 11 Shematski prikaz PCR-klonirnega plazmidnega vektorja pCR® 2.1-TOPO® ( <a href="http://www.invitrogen.com">http://www.invitrogen.com</a> )	55
Slika 12 Shematski prikaz ekspresijskih plazmidnih vektorjev pIL252 in pIL253	56
Slika 13 Shematski prikaz PCR-klonirnega plazmidnega vektorja pGEM®-T Easy ( <a href="http://www.promega.com">http://www.promega.com</a> )	57
Slika 14 Shematski prikaz inducibilnega ekspresijskega vektorja pET-28a(+) ( <a href="http://www.emdbiosciences.com">http://www.emdbiosciences.com</a> )	57
Slika 15 Shematski prikaz inducibilnega ekspresijskega vektorja pNZ8148 (Mierau in Kleerebezem, 2005)	58
Slika 16 Pomnožki PCR ligacijskih mešanic pBluescript-LF221 in pBluescript-K7, z začetnima oligonukleotidoma T7 in LF221Aup1	78
Slika 17 Pomnožki PCR ligacijskih mešanic pBluescript-LF221 in pBluescript-K7, z začetnima oligonukleotidoma T7 in LF221Bup1	79
Slika 18 Pomnožki PCR ligacijskih mešanic pBluescript-LF221 in pBluescript-K7, z začetnima oligonukleotidoma T7 in LF221B2	80
Slika 19 Shematski prikaz organizacije genov gassericina K7 A	82
Slika 20 Shematski prikaz organizacije genov gassericina K7 B	84
Slika 21 Operoni gassericinov K7 A in B ter acidocinov LF221 A in LF221 B, pomnoženi na genomski DNA sevov K7 in LF221	87
Slika 22 Plazmidna DNA transformant <i>Lc. lactis</i> IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7A(9) in <i>Lc. lactis</i> IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A(10)	88

	str.
Slika 23 Preverjanje prisotnosti in velikosti inserta v transformantah <i>Lc. lactis</i> IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7A(9) in <i>Lc. lactis</i> IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A(10) s PCR, z začetnima oligonukleotidoma pMG4 in 858-left	89
Slika 24 Preverjanje prisotnosti in velikosti inserta v transformantah <i>Lc. lactis</i> IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) in <i>Lc. lactis</i> IL1403 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) s PCR, z začetnima oligonukleotidoma pMG4 in B-3226up	91
Slika 25 Plazmidna DNA transformant <i>E. coli</i> 2746 in <i>E. coli</i> 2747 s konstrukti: pTOPO-pIL252-p32-K7A(11), pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) in pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3)	93
Slika 26 Preverjanje prisotnosti inserta v transformantah <i>E. coli</i> 2747 pTOPO-pIL252-p32-K7A(11), <i>E. coli</i> 2747 pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) in <i>E. coli</i> 2747 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) s PCR, z začetnimi oligonukleotidi PMG4/858-left oziroma pMG4/B-3226up	94
Slika 27 Pomnožene podenote gassericina K7 A brez N-terminalnih vodilnih zaporedij	96
Slika 28 Preverjanje prisotnosti in velikosti inserta v transformantah <i>E. coli</i> pET, s PCR na osnovi kolonije, z začetnima oligonukleotidoma promT7 in T7term	97
Slika 29 Plazmidna DNA transformant <i>E. coli</i> pET z domnevнимi konstrukti pET-gasK7a in pET-gasK7A	97
Slika 30 Pomnožki PCR na ligacijskih mešanicah "gasK7(a+A)", z začetnima oligonukleotidoma GA1+2-F-Nco in GA1+2-R-Xba	98
Slika 31 Preverjanje prisotnosti in velikosti inserta v transformantah <i>Lc. lactis</i> IL 1403 pNZ8148-gasK7(a+A), s PCR na osnovi kolonije, s kombinacijama začetnih oligonukleotidov pMSP-uni/GA1+2-R-Xba in GA1+2-F-Nco/GA1+2-R-Xba	99
Slika 32 Plazmidna DNA transformant <i>Lc. lactis</i> IL 1403 pNZ8148-gasK7(a+A)	99
Slika 33 Izražanje gassericina K7 A v sevu <i>Lc. lactis</i> NZ9000, po indukciji z nizinom	100
Slika 34 Plazmidna DNA matičnega seva K7 in seva K7 po tridesetih precepjanjih v različnih stresnih pogojih	102
Slika 35 Spot test seva K7, ki smo ga precepljali v različnih stresnih pogojih	103

## KAZALO PRILOG

- Priloga A Nukleotidno in izpeljano aminokislinsko zaporedje gassericina K7 A
- Priloga B Nukleotidno in izpeljano aminokislinsko zaporedje gassericina K7 B
- Priloga C Genomska DNA sevov K7 in LF221
- Priloga D Preverjanje transformant *E. coli* pTOPO-LF221A(*HindIII*) in *E. coli* pTOPO-K7A(*HindIII*)
- Priloga E Preverjanje transformant *E. coli* pMG-LF221A(*EcoRI/HindIII*) in *E. coli* pMG-K7A(*EcoRI/HindIII*)
- Priloga F Preverjanje transformant *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7A(9), *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7A(10) in *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-K7A(10)
- Priloga G Plazmidna DNA transkonjugante *Lc. lactis* K1-K7-4 in kontrolnih sevov
- Priloga H Preverjanje transformant *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7B(4) in *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-LF221B(4)
- Priloga I Preverjanje transformant *Ent. faecium* 2749 pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) in *Ent. faecium* 2749 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3)
- Priloga J Preverjanje transformant *E. coli* pGEM-GasK7a in *E. coli* pGEM-GasK7A
- Priloga K Plazmidna DNA transformant *E. coli* pET, s konstrukti pET-gasK7a in pET-gasK7A
- Priloga L Plazmidna DNA matičnega seva K7 in seva K7, gojenega v različnih stresnih pogojih
- Priloga M Profil fermentacije ogljikovih hidratov matičnega seva K7 in seva K7, gojenega v stresnih pogojih, po sistemu API 50 CH

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2D	dvodimenzionalen
3D	tridimenzionalen
ABC	ATP binding cassette (aktivni transport, vezan na energijo ATP)
ADP	adenozin difosfat
AK	aminokislina, aminokislinski ostanek
APS	amonijev persulfat
ATCC	American Type Culture Collection (Ameriška zbirka tipskih kultur)
ATP	adenozin trifosfat
BA	bakteriocinska aktivnost
BAP	Bacterial Alkaline Phosphatase (bakterijska alkalna fosfataza)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	bazni pari
BSA	Bovine Serum Albumin (goveji serumski albumin)
C.	<i>Clostridium</i>
CIP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase (telečja intestinalna alkalna fosfataza )
(k)Da	(kilo)dalton, enota za molekulsko maso proteinov
DNA	deoxyribonucleic acid (deoksiribonukleinska kislina)
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	etilendiamin-tetraacetat
Ent.	<i>Enterococcus</i>
EtBr	etidijev bromid
G+C	gvanin in citozin v DNA
GRAS	generally regarded as safe (splošno priznane kot varne - MKB)
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
HPK	histidine protein kinase (histidinska proteinska kinaza)
K7	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7
kbp	kilobazni pari
k.e.	kolonijska enota
L.	<i>Lactobacillus</i>
LAB	lactic acid bacteria (mlečnokislinske bakterije - MKB)
LB	gojišče Luria-Bertani za <i>E. coli</i>
Lc.	<i>Lactococcus</i>
LF221	<i>Lactobacillus gasseri</i> LF221
Li.	<i>Listeria</i>
LMGT	Laboratory of Microbial Gene Technology, Norwegian University of Life Science (Laboratorij za mikrobeno gensko tehnologijo)
M	molarnost (mol/l)
MKB	mlečnokislinske bakterije
MO	mikroorganizem
MRS	gojišče za laktobacile po De Man, Rogosa, Sharp
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCDO	National Collection of Dairy organisms, Reading, England (Nacionalna zbirka mlekarskih organizmov, Reading, Anglija)

NaDS	natrijev dodecil (lauril) sulfat
NaDS-PAGE	denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza
NEB	New England BioLabs
NICE	NIisin-Controlled gene Expression (system) (genski ekspresijski sistem z nizinsko kontrolo)
OD	optical density (optična gostota)
ORF ( <i>orf</i> )	open reading frame (odprt bralni okvir)
OTC	over-the-counter (drugs) (zdravila preko pulta)
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
PCR	polymerase chain reaction (verižna reakcija s polimerazo)
PBS	phosphate buffer saline (fosfatni pufer)
PEG	polietilen glikol
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA (naključno pomnoževanje polimorfne DNA z uporabo enega začetnega oligonukleotida)
RBS	ribosomal binding site (mesto vezave ribosoma, Shine-Dalgarno zaporedje)
RNA	ribonucleic acid (ribonukleinska kislina)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomalna ribonukleinska kislina)
rpm	rounds per minute (število vrtljajev v minutu)
RR	response regulator (odzivni regulator)
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>
T	temperatura
TEMED	N'N'N'N'-tetrametiletilendiamin
TRIS	tris[hidroksimetil] amino metan
U	unit (enota, encimska enota)
UV	ultravijoličen (-a svetloba)

## SIMBOLI V AMINOKISLINSKIH ZAPOREDJIH

<b>A</b>	alanin, Ala
<b>C</b>	cistein, Cis
<b>D</b>	asparaginska kislina, Asp
<b>E</b>	glutaminska kislina, Glu
<b>F</b>	fenilalanin, Phe
<b>G</b>	glicin, Gly
<b>H</b>	histidin, His
<b>I</b>	izoleucin, Ile
<b>K</b>	lizin, Lys
<b>L</b>	leucin, Leu
<b>M</b>	metionin, Met
<b>N</b>	asparagin, Asn
<b>P</b>	prolin, Pro
<b>Q</b>	glutamin, Glu
<b>R</b>	arginin, Arg
<b>S</b>	serin, Ser
<b>T</b>	treonin, Thr
<b>V</b>	valin, Val
<b>W</b>	triptofan, Trp
<b>Y</b>	tirozin, Tyr
<b>X</b>	katerakoli aminokislina
*	konec zaporedja

## SIMBOLI V NUKLEOTIDNIH ZAPOREDJIH

<b>A</b>	adenin
<b>C</b>	citozin
<b>G</b>	gvanin
<b>T</b>	timin
<b>N</b>	katerikoli nukleotid (A, T, G ali C)
-	vrzel
<b>Y</b>	C ali T
<b>R</b>	A ali G
<b>M</b>	A ali C
<b>K</b>	G ali T
<b>S</b>	G ali C
<b>W</b>	A ali T

### GENSKI KOD

Prvo mesto v kodonu (5')	Drugo mesto v kodonu				Tretje mesto v kodonu (3')
	T	C	A	G	
T	Phe	Ser	Tyr	Cys	<b>T</b>
	Phe	Ser	Tyr	Cys	<b>C</b>
	Leu	Ser	STOP	STOP	<b>A</b>
	Leu	Ser	STOP	Trp	<b>G</b>
C	Leu	Pro	His	Arg	<b>T</b>
	Leu	Pro	His	Arg	<b>C</b>
	Leu	Pro	Gln	Arg	<b>A</b>
	Leu	Pro	Gln	Arg	<b>G</b>
A	Ile	Thr	Asn	Ser	<b>T</b>
	Ile	Thr	Asn	Ser	<b>C</b>
	Ile	Thr	Lys	Arg	<b>A</b>
	Met	Thr	Lys	Arg	<b>G</b>
G	Val	Ala	Asp	Gly	<b>T</b>
	Val	Ala	Asp	Gly	<b>C</b>
	Val	Ala	Glu	Gly	<b>A</b>
	Val	Ala	Glu	Gly	<b>G</b>

## 1 UVOD

### 1.1 UVOD

V naravi najdemo številne ribosomske sintetizirane protimikrobnne peptide oziroma proteine, ki jih tvorijo tako prokariontski kot evkariontski organizmi. Čeprav protimikrobeni peptidi mikroorganizmov, rastlin, živali in celo človeka tvorijo izredno heterogeno skupino, imajo tudi nekaj skupnih značilnosti: pogosto so majhni (dolgi 20 do 60 aminokislinskih ostankov) in kationski ter hidrofobne ali amfifilne narave, ki jim omogoča permeabilno delovanje na tarčne celične membrane.

Med prokarionti najdemo protimikrobnne peptide najpogosteje med grampozitivnimi bakterijami, največjega zanimanja pa so deležni tisti, ki jih tvorijo mlečnokislinske bakterije (MKB). Le te človeka spremljajo že tisočletja, saj naseljujejo njegov prebavni, respiratorni in vaginalni trakt ter so kot naravna mikroflora prisotne v fermentiranih živilih. Zato so splošno priznane kot varne (GRAS) bakterije. Protimikrobnne proteine ali proteinske komplekse grampozitivnih in gramnegativnih bakterij, ki imajo sposobnost baktericidnega delovanja proti bakterijam iste ali sorodnih vrst, imenujemo bakteriocini.

Večino danes znanih bakteriocinov so identificirali v zadnjih 25 letih, zanimanje zanje pa še vedno narašča, saj imajo širok potencial uporabe, tako v prehrani ljudi in živali (pri zaviranju kvarljivcev in/ali patogene mikroflore, kot bio-konzervansi), kot tudi v farmacevtski industriji in biomedicini. Zaradi vse pogostejšega pojava odpornosti proti antibiotikom proučujejo izbrane bakteriocine tudi kot možno zamenjavo za nekatere antibiotike. Bakteriocini so, zaradi proteinske narave, zanimivi tudi z vidika splošnih bioloških in biokemijskih procesov, saj omogočajo proučevanje gostiteljevih obrambnih mehanizmov, membransko-proteinskih interakcij ter modifikacije in izločanja proteinov. Heterologna tvorba bakteriocinov v vrstah MKB pa ponuja možnost konstrukcije multibakteriocinogenih sevov z izbranim in točno določenim protimikrobnim spektrom, kar obeta še nova področja uporabe.

Med bakteriocini je gotovo najbolj poznan in široko komercialno uporabljen lantibiotik nizin, ki ga naravno tvorijo nekateri sevi laktokokov. Uporabljajo ga predvsem v živilsko-predelovalni industriji, bodisi kot (delno) očiščen pripravek, bodisi v obliki bakteriocinogenih sevov, ki sestavljajo starterske kulture. Hiter razvoj bio-kemijskih, mikrobioloških in molekularno-genetskih tehnik pa omogoča odkrivanje in karakterizacijo številnih novih bakteriocinov MKB, med katerimi so posebno zanimivi tisti s širokim protimikrobnim spektrom delovanja, ki poleg sorodnih vrst inhibirajo tudi patogene bakterije in kvarljivce.

Predmet našega proučevanja sta bila širokospektralna bakteriocinska kompleksa sevov *Lactobacillus gasseri* K7 in *Lactobacillus gasseri* LF221, ki sta zanimiva iz večih vidikov. Seva *L. gasseri* K7 (K7) in *L. gasseri* LF221 (LF221) sta humanega izvora (izolirana iz blata dojenčkov) in izkazujeta osnovne probiotične lastnosti. Seva sta odporna proti žolčnim solem in nizkim vrednostim pH, preživita simulirane pogoje prebavnega trakta, imata dobre *in vitro* sposobnosti vezave na modelne epitelne črevesne celice in črevesno sluz, kar jima omogoča preživetje v prebavnem traktu poskusnih živali (miši, prašič), ki ga začasno tudi poselita. Kljub temu, da pripadata isti vrsti, da sta oba humana izolata in imata zelo podoben protimikrobnii spekter, pa se razlikujeta v plazmidnem profilu, profilu RAPD, tvorbi bakteriocinov in rastnih značilnostih. Zaradi podobnega protimikrobnega spektra sevov LF221 in K7, smo želeli podrobnejše proučiti in opisati bakteriocinski kompleks seva K7 ter ga primerjati z že opisanim bakteriocinskim kompleksom seva LF221 in ostalimi okarakteriziranimi bakteriocini. Posamezne bakteriocine sevov K7 in LF221 smo želeli heterologno izraziti v izbranih grampozitivnih in gramnegativnih ekspresijskih sistemih ter preveriti sposobnost in obstojnost tvorbe bakteriocinov seva K7 v stresnih pogojih gojenja.

## 1.2 HIPOTEZE

V doktorski disertaciji smo preverjali naslednje hipoteze:

- Sev *L. gasseri* K7 tvori najmanj en bakteriocin, ki je strukturno podoben kateremu od bakteriocinov seva *L. gasseri* LF221, saj je bil sev K7 izoliran iz iste ekološke niše in pripada isti vrsti kot sev LF221, hkrati pa imata njuna bakteriocinska kompleksa podobne biokemijske lastnosti in spekter protimikrobine aktivnosti.
- Genske determinante bakteriocina(ov) seva K7 se ujemajo z genskimi determinantami posameznih bakteriocinov seva LF221 na nukleotidnem nivoju.
- Bakteriocin(a) seva K7 spada(ta) med dvopeptidne nelantibiotike, to je v podskupino bakteriocinov IIb.
- Zaradi različnih mehanizmov izločanja proteinov pri grampozitivnih in gramnegativnih bakterijah, v ekspresijskem sistemu *E. coli* ne bo prišlo do izločanja bakteriocinov sevov K7 oziroma LF221 v okolje, pričakujemo pa izražanje aktivnih bakteriocinov v grampozitivnem ekspresijskem sistemu *Lactococcus lactis*.
- Razlike v sposobnosti tvorbe bakteriocinov sevov K7 in LF221 se bodo v istem ekspresijskem organizmu najverjetneje potrdile z različnim izražanjem bakteriocinov. Tako bomo lahko ugotovili prispevek posameznega bakteriocina k skupni protimikrobiaktivnosti celotnega bakteriocinskega kompleksa seva K7 oziroma LF221.

- Genske determinante bakteriocina(ov) seva K7 se nahajajo na kromosому, zato bo sev ohranil sposobnost tvorbe bakteriocina(ov) tudi v stresnih pogojih.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BAKTERIOCINI MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ

Pod pojmom "bakteriocini" se skriva velika in raznolika skupina protimikrobnih proteinov oziroma peptidov, ki jih najdemo tako pri grampozitivnih kot pri gramnegativnih bakterijah. Posebne pozornosti pa so v zadnjih desetletjih deležni bakteriocini mlečnokislinskih bakterij, zaradi svoje možne uporabe kot varnih, naravnih "bio" aditivov in konzervansov, predvsem v živilski industriji.

#### 2.1.1 Definicija bakteriocinov

Bakteriocini so ribosomsko sintetizirani proteini, oziroma peptidi s protimikrobnim delovanjem, ki je običajno ozko usmerjeno proti sorodnim sevom iste vrste. Izraz "bakteriocin" se je sprva nanašal na opis visoko specifičnih proteinov oziroma proteinskih antibiotikov, podobnim kolicinom *E. coli*, za katere je značilna letalna biosinteza, baktericidno delovanje znotraj vrste, adsorpcja na specifične receptorje na površini občutljivih celic, relativno velika molekulska masa in nahajanje genov na plazmidih. Kasnejša definicija bakteriocinov se nanaša na proteine ali proteinske komplekse grampozitivnih in gramnegativnih bakterij, ki imajo sposobnost baktericidnega delovanja proti bakterijam iste ali sorodnih vrst (Tagg in sod., 1976; Montville in Bruno, 1995). Definicija v grobem velja še danes, le da je znanih vedno več bakteriocinov s širšim spektrom protimikrobnega delovanja, ki vključuje tudi nesorodne bakterije, celo iz patogenih vrst. Poimenovanje bakteriocinov je sorodno poimenovanju antibiotikov, saj jih sprva med sabo niso razločevali. Postopoma pa so odkrili številne razlike, ki so omogočile striktno ločevanje bakteriocinov od antibiotikov, čeprav v literaturi še vedno naletimo na zamenjave. Bakteriocini MKB se od antibiotikov ločijo po sintezi, načinu delovanja, protimikrobnem spektru, toksičnosti, mehanizmih odpornosti in imunosti gostiteljskega seva. Zaradi varne in učinkovite uporabe bakteriocinov, predvsem pri kontroli rasti tarčnih patogenih bakterij v hrani, imenujemo bakteriocine tudi bio(loške) konzervanse (Cleveland in sod., 2001).

#### 2.1.2 Razvrstitev bakteriocinov

Bakteriocini sestavljajo veliko in raznoliko skupino proteinskih snovi s protimikrobnim delovanjem, ki se med sabo razlikujejo po mestu nahajanja genskega zapisa, molekulski masi, biokemijskih lastnostih, strukturi, protimikrobnem spektru in načinu delovanja. Na podlagi predhodnih razdelitev in novih spoznanj, predvsem o bakteriocinih MKB, danes bakteriocine delimo v tri glavne skupine (preglednica 1), ki se še nadalje delijo v podskupine (Klaenhammer, 1993; Nes in sod., 1996; 2000; Diep in Nes, 2002; Eijsink in sod., 2002):

- Skupina I** Lantibiotiki: majhni peptidi (do 5 kDa), ki so podvrženi obsežnim post-translacijskim spremembam in vsebujejo neobičajno aminokislino lantionin in/ali  $\beta$ -metil-lantionin. Predstavniki: nizin, laktocin S, lacticin 481 in drugi.
- Skupina II** Nemodificirani, topotno obstojni bakteriocini: v to skupino spadajo do 10 kDa veliki, membransko aktivni proteini, ki ne vsebujejo lantionina (nelantibiotiki) in so podvrženi manjšim post-translacijskim spremembam, vključujejo pa pediocine, sakacine, karnobakteriocine, laktokokcine, laktacine, plantaricine in druge bakteriocine.
- Skupina III** Veliki, topotno občutljivi bakteriocini in bakteriolizini: njihove fizikalne lastnosti in način delovanja se precej razlikujejo od bakteriocinov iz skupin I in II, o njih vemo zelo malo, saj jih pri MKB redko najdemo.

Preglednica 1: **Razdelitev bakteriocinov MKB** (Nes in sod., 1996; 2000; Diep in Nes, 2002)

Table 1: **Classification of LAB bacteriocins**

Skupina	Podskupina	Predstavniki
I Lantibiotiki	Tip A, linearni peptidi Tip B, globularni peptidi	nizin A, laktocin S mersacidin
II Nemodificirani, topotno obstojni bakteriocini	IIa Pediocinom podobni bakteriocini IIb Dvopeptidni bakteriocini IIc Ostali bakteriocini	leukocin A, pediocin PA-1, sakacin P laktokokcin M, laktacin F, plantaricin S laktokokcina A in B, enterocin B
III Veliki, topotno občutljivi bakteriocini in bakteriolizini		helveticin J, enterolizin

Lantibiotike (skupina I) delimo v dve podskupini: tip A predstavlja linearni in kationski peptidi, ki so večinoma membransko aktivni, tip B pa globularni peptidi, ki so običajno hidrofobni in delujejo kot encimski inhibitorji sinteze celične stene, RNA ali DNA in jih med MKB ne najdemo. Vendar pa že poznamo bakteriocine z dvojnim načinom delovanja, na primer nizin, ki poleg tvorbe por lahko tudi inhibira sintezo celične stene. Zmešnjavo v razdelitvi lantibiotikov povzroča tudi odkritje nekaterih dvopeptidnih lantibiotikov, na primer citolizina in lacticina 3147, ki svojo maksimalno aktivnost dosežejo s kombiniranim delovanjem dveh različnih peptidov (McAuliffe in sod., 2001; Diep in Nes, 2002; Deegan in sod., 2006).

Skupino II bakteriocinov še nadalje delimo v vsaj dve veliki podskupini: IIa - pediocinom podobni bakteriocini in IIb - dvopeptidni bakteriocini, ki so podrobneje predstavljeni v poglavju 2.2.2.1.

## 2.2 BAKTERIOCINI SKUPINE II

Največ do sedaj opisanih in raziskanih bakteriocinov spada v skupino II, med majhne, toplotno stabilne in membransko aktivne nelantibiotike. Bakteriocinom skupine II je skupno, da nastajajo kot neaktivni prepeptidi (prekurzorji) s kratkim, 14-24 AK dolgim N-terminalnim vodilnim zaporedjem, ki ga proteolitični encimi med procesiranjem odcepijo na tipičnem mestu, običajno za dvema glicinskima ostankoma (na mestih -2 in -1), zrel bakteriocin pa se pri tem sprosti kot biološko aktivna molekula. Bakteriocini skupine II so močno kationski proteini z izoelektrično točko med 8 in 11. Vsebujejo veliko majhnih AK, kot sta glicin in alanin, prisotnost hidrofobnega in/ali amfifilnega področja pa povezujejo z njihovo membransko aktivnostjo (Klaenhammer, 1993; Abbe, 1995; Jack in sod., 1995; Nes in sod., 1996).

### 2.2.1 Razdelitev bakteriocinov skupine II

Zaradi naraščanja števila na novo odkritih bakteriocinov skupine II in njihove izredno heterogene narave, je razdelitev v podskupine oziroma podrazrede precej težavna in se stalno spreminja. Van Belkum in Stiles (2000) sta predlagala razdelitev, ki jo je delno zastavil že Jack s sod. (1995). Glede na strukturo in način delovanja, sta nelantibiotike razdelila v šest podskupin: IIa - cistibiotiki z dvema disulfidnima mostičkoma in ohranjenim motivom YGNGVXC, na primer pediocin PA-1 in enterocin A; IIb - cistibiotiki z enim disulfidnim mostičkom in ohranjenim motivom YGNGVXC, na primer leukocin A, sakacin P in enterocin P; IIc - cistibiotiki z enim disulfidnim mostičkom brez ohranjenega motiva YGNGVXC, na primer karnobakteriocin A in enterocin B; IId - tiolbiotiki, bakteriocini z enim ali brez cisteinskih ostankov in brez ohranjenega motiva YGNGVXC, na primer laktkokcin A in laktkokcin B; IIe - dvopeptidni bakteriocini, sestavljeni iz dveh ločenih peptidov, ki sta bodisi tipa E (enhancing - ojačevalna), kjer eden od peptidov okrepi protimikrobnou aktivnost drugega (laktacin F, termofilin 13) bodisi tipa S (synergistic - sinergistična), kjer peptida vsak zase nista aktivna, skupaj pa (laktkokcin G, brohocin C); IIIf - netipični bakteriocini, na primer ciklični, kot je gassericin A in bakteriocini brez vodilnega zaporedja.

Nes in Holo (2000) oziroma Diep in Nes (2002) pa ostajajo pri bolj splošni razdelitvi bakteriocinov skupine II, ki temelji na starejših razdelitvah (Klaenhammer, 1993; Nes in sod., 1996) in se je večinoma držijo tudi ostali avtorji (Eijsink in sod., 2002; Deegan in sod., 2006), zato jo bomo pri razvrstitvi naših bakteriocinov upoštevali tudi mi:

IIa - pediocinom podobni bakteriocini z močno protilisterijsko aktivnostjo in ohranjenim motivom YGNGVXCXK/NXXC na N-terminalnem delu zaporedja, na primer leukocin A, pediocin PA-1, sakacin P in številni drugi;

IIb - dvopeptidni bakteriocini, ki za svojo maksimalno aktivnost potrebujejo delovanje dveh različnih peptidov, ki vsak zase običajno nista, oziroma sta zelo slabo aktivna; (primeri: laktacin F, laktokokcin G, laktokokcin M);

IIc - ostali bakteriocini: ta podskupina je zelo heterogena, saj vanjo uvrščamo vse nelantibiotike, ki ne spadajo v prejšnje podskupine, na primer laktokokcina A in B, enterocin B, ciklični gassericin A in druge.

Diep in Nes (2002) poleg omenjenih prvih dveh podskupin II. skupine bakteriocinov (IIa in IIb) predlagata še podskupine: IIc - od *sec*-odvisni bakteriocini, na primer acidocin B, enterocin P; IId - bakteriocini brez vodilnega zaporedja, na primer enterocini L50, I in Q; IIe - ciklični bakteriocini, na primer gassericin A in IIIf - ostali bakteriocini.

### 2.2.1.1 Dvopeptidni bakteriocini

Dvopeptidni bakteriocini za svojo maksimalno protimikrobnou aktivnost potrebujejo delovanje dveh različnih peptidov, ki vsak zase običajno nista oziroma sta zelo slabo aktivna, skupaj pa. Med peptidoma ne najdemo podobnosti v primarni aminokislinski strukturi, na osnovi česar sklepajo, da izvirata iz dveh neodvisnih, verjetno različnih bakteriocinov. Pogosto so pri vsakem peptidu posebej prisotne amfifilne  $\alpha$ -helične strukture, ki so domnevno povezane z njihovo membransko aktivnostjo (tvorbo por). Izraz "dvopeptidni bakteriocin" uporabljam le za bakteriocine, katerih komplementarna peptida delujejo sinergistično in sta kodirana z dvema (sosednjima) genoma na istem operonu, na katerem se nahaja še gen za protein imunosti, ki je skupen za oba peptida (Jack in sod., 1995; Klaenhammer, 1995; Nes in sod., 1996; Cleveland in sod., 2001; Eijsink in sod., 2002; Garneau in sod., 2002).

### 2.2.2 MKB, ki hkrati tvorijo več bakteriocinov

Čeprav zaenkrat poznamo le del potenciala MKB za tvorbo bakteriocinov, so v zadnjem desetletju z genetskimi in biokemijskimi študijami odkrili, da veliko bakteriocinogenih bakterij tvori več kot en sam protimikroben peptid. Iz literaturnih virov pa je razvidno, da so razlike v številu in pestrosti bakteriocinov (glede na strukturo in značilnosti), ki jih tvorijo MKB, zelo velike (Casaus in sod., 1997; Tahara in sod., 1997; Anderssen in sod., 1998; Cintas in sod., 2000; Batdorj in sod., 2006). Hkratna tvorba večih bakteriocinov je verjetno pomemben element v sposobnosti tekmovanja z ostalimi MKB. Na primer, genska gruča plantaricina vsebuje pet strukturnih genov za bakteriocine E, F, J, K in N, katerih

izražanje uravnava isti regulatorni mehanizem. Dvokomponentna bakteriocina plantaricin EF in JK učinkujeta na različne celice, saj se način njunega delovanja rahlo razlikuje: prvi tvori kationsko selektivne pore, drugi pa anionsko selektivne pore. To je raziskovalce pripeljalo do pomembnega zaključka, da imajo različni bakteriocini iste bakterije proizvajalke lahko delno komplementaren protimikrobnii učinek, kar razširi spekter tarčnih celic in/ali poveča učinkovitost inhibicije tarčnih celic (Diep in sod., 1996; Anderssen in sod., 1998; Moll in sod., 1999b).

Podoben primer najdemo pri bakteriocinih sevov *Enterococcus faecium* T136 in *Enterococcus faecium* P21, ki tvorita (vsaj) dva bakteriocina s širokim in dokaj podobnim protimikrobnim spektrom: enterocin A, uvrščen v podskupino IIa - pediocinom podoben (po Nesu in sod. (1996)) in enterocin B, uvrščen v podskupino IIc med ostale bakteriocine (Casaus in sod., 1997; Herranz in sod., 2001). Pri proučevanju aktivnosti posameznega bakteriocina so sicer potrdili baktericidnost tako enterocina A kot enterocina B, hkrati pa opazili relativno visoko frekvenco odpornih tarčnih bakterij. Ko pa so občutljive seve izpostavili kombinaciji obeh enterocinov, težav s pojavom odpornih bakterij ni bilo več (število preživelih bakterij je drastično upadlo), kar so pripisali sinergističnemu delovanju bakteriocinov (Casaus in sod., 1997).

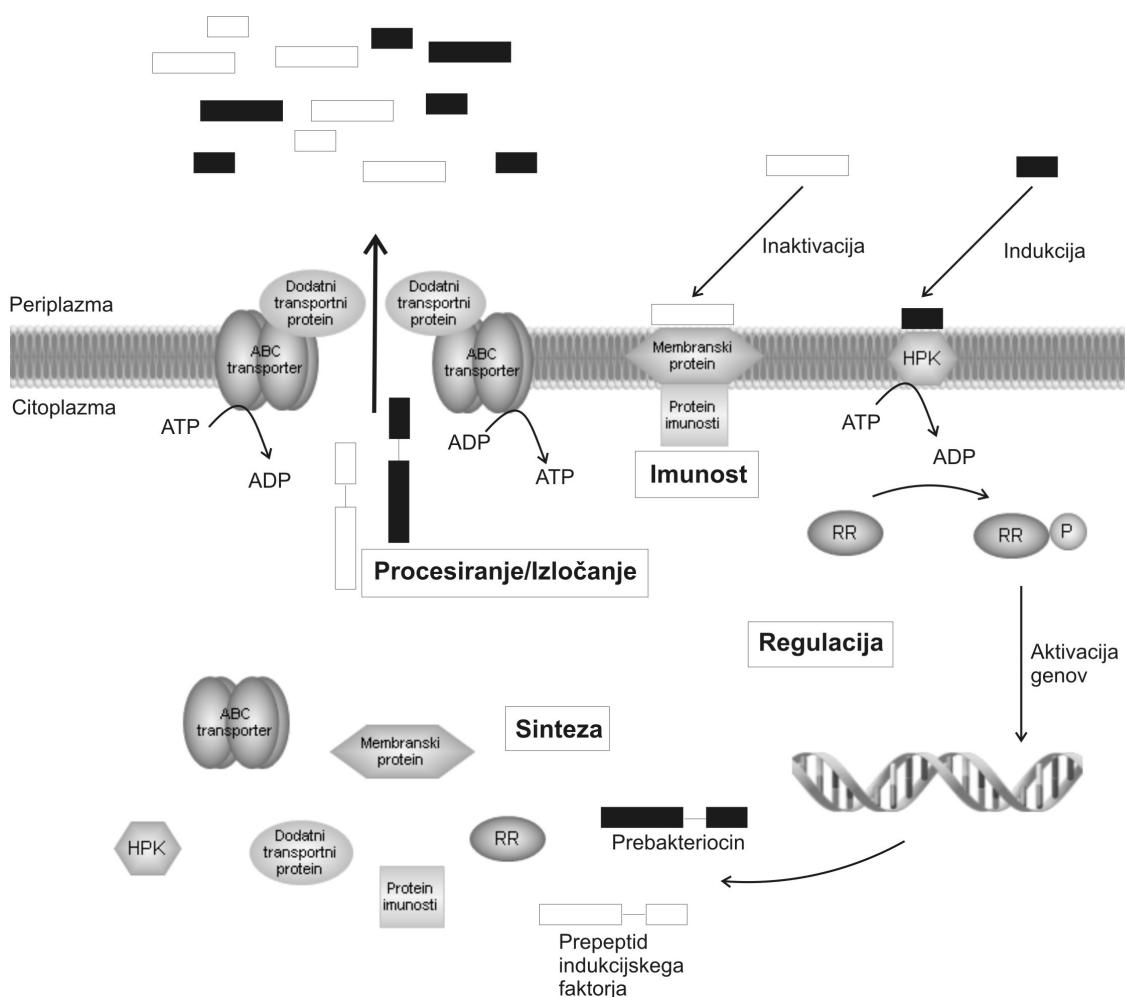
### 2.3 BIOSINTEZA BAKTERIOCINOV SKUPINE II

Bakteriocinogena bakterija mora biti poleg sinteze bakteriocina sposobna tudi izločiti bakteriocin v okolje in biti odporna proti njegovemu delovanju.

Geni za tvorbo, imunost in transport, oziroma izločanje bakteriocinov, se lahko nahajajo na bakterijskem kromosomu ali na plazmidu. V nekaterih primerih najdemo gruče genov za bakteriocinsko sintezo na mobilnih genetskih elementih, na primer na fagni DNA ali transpozonom podobnih elementih (Klaenhammer, 1993; Jack in sod., 1995; Nes in sod., 1996; Sablon in sod., 2000). To je lahko vzrok, da enake bakteriocine pogosto najdemo pri različnih bakterijskih vrstah ali celo rodovih. Na primer, sakacin P najdemo pri sevih *L. sakei* Lb706 in *L. curvatus* LTH1174, prisotnost genov, vpletenih v tvorbo sakacina P pa so zasledili še v številnih drugih sevih *L. sakei*, čeprav večina med njimi ne tvori omenjenega bakteriocina. V nekaterih primerih, ko bakterija tvori več bakteriocinov skupine II, lahko njihove genske determinante najdemo bodisi na različnih plazmidih (na primer pri *Ent. faecium* L50) bodisi na bakterijskem kromosomu in plazmidu (na primer pri *Carnobacterium piscola* LV17), bodisi v gručah na istem lokusu, kot na primer pri *L. plantarum* C11 (Worobo in sod., 1994; Anderssen in sod., 1998; Franz in sod., 2000a; Diep in Nes, 2002; Møretrø in sod., 2005).

### 2.3.1 Organizacija bakteriocinskih genov

Organizacija bakteriocinskih genov je na splošno dobro ohranjena. Poleg strukturnih bakteriocinskih genov so za tvorbo bakteriocina potrebne še genske determinante, ki so vpletene v imunost in transport, oziroma izločanje bakteriocina (ABC-transporter in dodatni protein, ki sodeluje pri transportu). Vsi ti geni so običajno organizirani v operonu podobne strukture v genskih gručah. Poleg tega za nelantibiotike večinoma velja, da se nahajajo geni imunosti neposredno za strukturnimi geni. Najverjetnejše zato, da bi zagotovili zaščito organizma, ki tvori bakteriocin, pred njegovimi lastnimi bakteriocini (Nes in sod., 1996). Na sliki 1 so shematsko prikazani celični procesi, ki so vpleteni v tvorbo bakteriocinov skupine II.



Slika 1: Shematski prikaz tvorbe bakteriocina skupine II. Regulacija (trikomponentni regulatorni sistem), sinteza, procesiranje, izločanje in imunost (Ennahar in sod., 2000).

Figure 1: Schematic overview of the suggested machinery for the production of class II bacteriocin. Three-component regulatory system, synthesis, processing, excretion and immunity.

### 2.3.1.1 Sinteza bakteriocinskega prepeptida (prekurzorja)

Večina bakteriocinov se sintetizira kot prepetid s kratkim (14-24 AK) N-terminalnim podaljškom (vodilnim zaporedjem), ki služi kot razpoznavni signal pri transportu bakteriocina. Serinska proteaza N-terminalne domene ABC-transportnega proteina ga med izločanjem z ABC-transportnim sistemom odcepi (procesiranje bakteriocinskega prepeptida), pri čemer postane bakteriocin biološko aktiven. Zreli oziroma aktivni bakteriocini skupine II, so običajno dolgi 36 do 57 AK in čeprav vpliv dolžine polipeptidne verige na protibakterijsko delovanje bakteriocina ni poznan, imajo nekateri bakteriocini s krajsimi verigami relativno širši protimikrobnii spekter kot bakteriocini z daljšimi verigami. Pri nelantibiotikih (z redkimi izjemami) in nekaterih lantibiotikih je N-terminalno vodilno zaporedje dvoglicinsko (mesto cepitve se nahaja ob dveh zaporednih glicinskih ostankih) in zelo ohranjeno. Nekateri bakteriocini so sintetizirani s sec-vodilnim peptidom, ki ga prepozna splošni bakterijski sekretorni (*sec*) sistem. Le redki bakteriocini pa so sintetizirani brez vodilnega zaporedja in pri takih tudi zelo malo vemo o načinu njihovega izločanja (Muriana in Klaenhammer, 1991; Jack in sod., 1995; Nes in sod., 1996; van Belkum in Stiles, 2000; Ennahar in sod., 2000; McAuliffe in sod., 2001; Diep in Nes, 2002).

### 2.3.1.2 Imunost bakteriocinogene bakterije

Bakteriocinogena bakterija se mora zaščititi pred delovanjem lastnega bakteriocina in to doseže s tvorbo proteinov imunosti. Gen imunosti je lociran v neposredni bližini strukturnega bakteriocinskega gena na istem operonu. Pri večini nelantibiotikov kodira en sam, membransko lociran protein (katerega večji del leži na citoplazemski strani membrane), ki zagotavlja popolno imunost. Kot bakteriocini sami, so tudi proteini imunosti kationski, veliki med ~50 in 250 AK, za izločanje pa ne potrebujete lastnega procesno-transportnega sistema (ki je potreben pri bakteriocinih, ki se izločajo z ABC-transportnim sistemom). Čeprav so podobnosti med proteini imunosti precej manjše od podobnosti med bakteriocini, večinoma velja, da imata bolj podobna bakteriocina tudi bolj podobna proteina imunosti, ki pa ne nudita navzkrižne imunosti za druge bakteriocine iste družine. Med proteini imunosti še niso odkrili ohranjenih regij, niti jasnega modela, kako naj bi varovali bakteriocinogene bakterije pred lastnimi bakteriocini. Verjetno pa je za zaščito potrebna interakcija z membrano, oziroma z določenim delom celične membrane na citoplazemski strani (Abee, 1995; Quadri in sod., 1995, 1997; Nes in sod., 1996; van Belkum in Stiles, 2000; Ennahar in sod., 2000; Sprules in sod., 2004). Proteini imunosti naj bi se "vmešavali" v bakteriocinsko induciranje tvorbe por iz notranjosti celice; v nekaterih *in vitro* poskusih so namreč ugotovili, da za bakteriocin občutljive celice niso postale imune ob dodatku proteina imunosti od zunaj, temveč le, če so vanje klonirali gen za imunost (Nes in Holo, 2000). V najnovejši študiji pa so Diep in sod. (2007) odkrili

povezavo med mehanizmom prepoznavanja bakteriocina in tarčne celice ter imunostjo bakteriocinogene celice. Dokazali so, da proteini imunosti nekaterih bakteriocinov skupine II (laktkokcina A in laktkokcina B) tvorijo močen kompleks z bakteriocinom in receptorskimi proteini v membrani tarčne celice. Vendar naj bi se kompleks tvoril le ob prisotnosti zrele bakteriocinske molekule, kar bakteriocinogeni celici zagotovi imunost pred delovanjem lastnega bakteriocina.

### 2.3.1.3 Izločanje in aktivacija bakteriocinov

Bakteriocini z dvoglicinskim N-terminalnim vodilnim zaporedjem se izločajo iz celice z aktivnim transportom, vezanim na energijo ATP, ki ga imenujemo ABC-transportni sistem. Pri transportu sodeluje transmembranski translokator, ki pripada družini ABC-transportnih proteinov (ABC-prenašalec) in dodatni transportni protein. Geni za ABC-transporterje se običajno nahajajo na istem operonu kot strukturni gen bakteriocina in gen imunosti. Hidrofobna regija transportnega proteina omogoča njegovo vključevanje v citoplazemskega membrano, na citoplazemskega regijo pa se vežejo molekule ATP (Nes in sod., 1996; van Belkum in Stiles, 2000; Ennahar, 2000; Sablon in sod., 2000).

#### 2.3.1.3.1 Vloga vodilnega zaporedja

ABC-transportni proteini nelantibiotikov nastajajo kot enoverižni polipeptidi z mestom za vezavo ATP na C-terminalnem koncu molekule, hidrofobno regijo, ki omogoča vezavo z membrano (na N-terminalnem koncu) in N-terminalnim podaljškom vodilnega zaporedja (dolgom ~150 AK), ki naj bi imel pomembno vlogo pri procesiranju nelantibiotikov. Proteolitični del ABC-transportnega proteina (na N-terminalnem koncu ABC-transporterja) se veže na bakteriocinski prepeptid, pri čemer hidroliza ATP povzroči strukturne spremembe transportnega proteina, temu pa sledi odcepitev vodilnega zaporedja bakteriocinskega prekurzorja in transport zrelega bakteriocina skozi citoplazemskega membrano. ABC-transportni proteini imajo torej dvojno vlogo: proteolitično in prenašalno (Håvarstein in sod., 1995; Nes in sod., 1996; Franke in sod., 1999; Cleveland in sod., 2001; Michiels in sod., 2001).

#### 2.3.1.3.2 Vloga dodatnega transportnega proteina

Pri procesiranju in izločanju nelantibiotikov iz celice poleg ABC-transporterjev sodelujejo še dodatni transportni proteini, ki so nujno potrebni, vendar njihova vloga oziroma mehanizem delovanja še nista povsem razjasnjena. Dolgi so okrog 470 AK, C-terminalna domena je obrnjena proti zunanjosti celice, N-terminalna domena pa proti citoplazmi in pritrjena na membrano (Nes in sod., 1996; Franke in sod., 1999; Sablon in sod., 2000).

### **2.3.2 Regulacija biosinteze bakteriocinov**

Pri večini bakterij, ki tvorijo bakteriocine, je njihova tvorba vezana na rastno fazo, v kateri se nahajajo celice. Pogosto je tvorba bakteriocinov omejena na srednjo ali pozno eksponentialno fazo do začetka stacionarne faze rasti (Kuipers in sod., 1998; Diep in Nes, 2002; Cotter in sod., 2005 a).

#### **2.3.2.1 Trikomponentni regulatorni sistem**

Veliko bakteriocinogenih bakterij uporablja za regulacijo izražanja genov, vpletenih v bakteriocinsko sintezo, trikomponentni regulatorni sistem, tako imenovano pot signalne transdukcije. Taka regulatorna mreža obsega tri komponente: izločeni peptid, ki služi kot feromon (indukcijski faktor), membransko locirano histidinsko proteinsko kinazo (HPK), ki služi kot receptor za feromon in odzivni regulator (RR), ki se po fosforilaciji s HPK specifično veže na regulatorne promotorje bakteriocinogenih operonov in aktivira izražanje genov (Diep in sod., 1995; Nes in sod., 1996; Nilsen in sod., 1998; Nes in Eijsink, 1999; van Belkum in sod., 2000; Diep in Nes, 2002; Eijsink in sod., 2002). Trikomponentni regulatorni sistem je shematsko prikazan na sliki 1.

Pri številnih sistemih so operoni, ki kodirajo gene, vpletene v tvorbo bakteriocinov, v določeni meri aktivirani na enak način (na osnovi indukcije), zato domnevajo, da so podvrženi splošnemu regulatornemu mehanizmu. Z analizo nukleotidnih zaporedij promotorskih regij teh operonov pogosto odkrijejo regulatorne značilnosti, na primer neposredne ponovitve, za katere so pri plantaricinu A in sakacinu P dokazali, da služijo kot mesta vezave odzivnih regulatorjev in so potrebna za aktivacijo genov (Diep in sod., 2001; Diep in Nes, 2002).

Genske determinante za HPK in RR so pogosto organizirane v obliki genskih parov in locirane sosedno od ostalih genov, vpletene v tvorbo bakteriocinov. Pri nelantibiotikih skupine II bakteriocinov, kot so plantaricini, sakacini, enterocini in karnobakteriocini, je genetska organizacija regulatornih genov zelo ohranjena. Genu za feromon vedno sledita analogna gena za HPK in RR v istem operonu, zato to ohranjeno gensko povezavo imenujemo trikomponentni regulatorni sistem (Nes in sod., 1996).

#### **2.3.2.2 Feromoni in "quorum sensing" regulacija**

Feromoni delujejo v neznatnih koncentracijah, od  $10^{-12}$  M do  $10^{-17}$  M. Z bakteriocini delijo nekatere fizikalno-kemijske lastnosti (so majhni, 19-26 AK in kationsko nabiti) in so celo sintetizirani podobno - kot prekurzorji z N-terminalnim, dvoglicinskim vodilnim peptidom, zato tudi uporabljajo iste poti izločanja, kot mnogi bakteriocini. Nekateri feromoni hkrati izkazujejo tudi bakteriocinsko aktivnost, oziroma so bakteriocini hkrati tudi feromoni (na

primer nizin, subtilin in plantaricin A) - v takem primeru govorimo o avtoindukciji. Dvojna funkcionalnost teh peptidov, skupaj z izredno podobno biosintezo in fizikalno-kemijskimi lastnostmi govorijo v prid domnevi, da so se bakteriocini in peptidni feromoni razvili iz skupnega prednika (Eijsink in sod., 1996; Kuipers in sod., 1998; Konings in sod., 2000; Eijsink in sod., 2002).

Domnevajo, da bakterije, kjer tvorba bakteriocina(ov) vključuje feromonsko regulacijo, v rastni medij konstantno izločajo majhno količino feromonov. Ko je dosežen določen koncentracijski prag, je to razpoznavni signal, da steče proces fosforilacije med feromonu analogno HPK in RR (vključno z avtofosforilacijo citoplazmatske domene HKP ter prenosom fosfatne skupine s HKP na analogno komponento RR), ki posledično sproži prepisovanje vseh operonov v bakteriocinskem lokusu, tudi regulacijskega. To vodi do avtoaktivacijske zanke, ki ojača gensko ekspresijo. Za tvorbo nekaterih bakteriocinov pa sama začetna (nizka) ekspresija feromonov ni zadostna, da bi dosegljala kritično koncentracijo, saj lahko bakterije proizvajalke dobro rastejo vse do stacionarne rastne faze, brez da bi se sprožila tvorba bakteriocina. Na podlagi številnih raziskav so ugotovili, da na ta proces vplivajo tudi dejavniki okolja, kot so vrednost pH, temperatura, sestavine gojišča in razpoložljivost kisika. Številne bakterije aktivno tvorijo bakteriocin(e) le znotraj določenega časovnega obdobja svoje rasti, nakar se tvorba preneha. Mehanizmi znižanja ravni, oziroma prenehanja tvorbe bakteriocinov, so zaenkrat še dokaj nepoznani, potek znižanja ravni tvorbe bakteriocina so na primer proučevali pri *L. plantarum* C11 (Kleerebezem in sod., 1997; Kuipers in sod., 1998).

S pomočjo določitve nukleotidnih zaporedij genomov bakteriocinogenih bakterij in kasnejšimi študijami transkriptomov, bomo poleg, zaenkrat poznanega trikomponentnega regulatornega sistema, morda odkrili vpleteneosti še drugih regulatornih sistemov, bodisi takih, ki uravnavajo le tvorbo bakteriocinov, bodisi takih, ki so del splošnih regulacijskih sistemov celičnih odgovorov na zunanje dražljaje (Quadri in sod., 1997; Diep in Nes, 2002; Eijsink in sod., 2002; Nes in Johnsborg, 2004).

## 2.4 NAČIN DELOVANJA BAKTERIOCINOV SKUPINE II

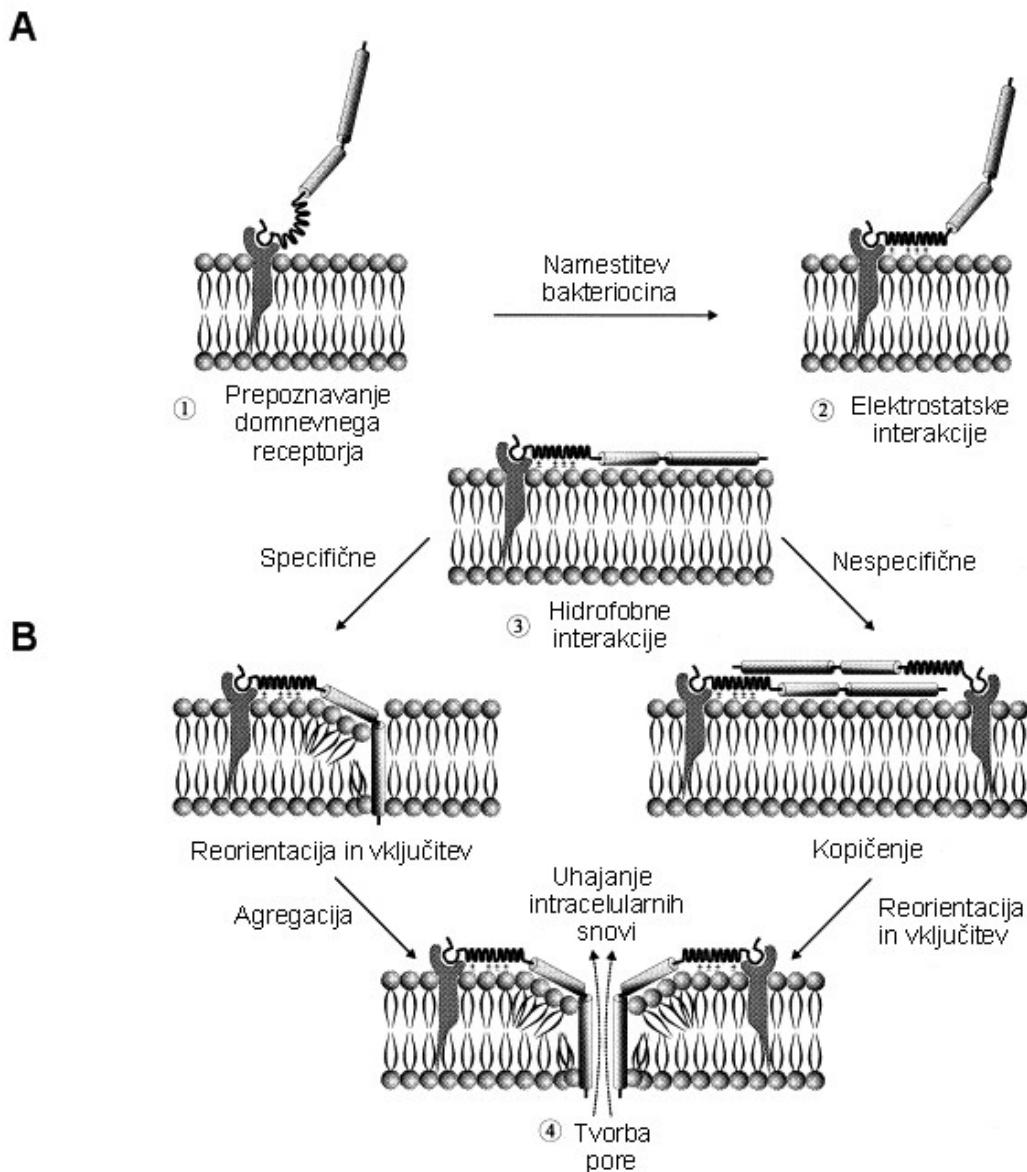
Bakteriocini iz skupine II so, tako kot ostali bakteriocini MKB, baktericidni peptidi, katerih delovanje temelji na tvorbi por v membrani občutljivega mikroorganizma. To povzroči ionsko neravnovesje, uhajanje nizkomolekularnih metabolitov (AK) in anorganskih fosfatov (ATP) iz celice, kar se posledično odraža na izgubi protonskega gradiента, ki povzroči delno ali popolno izgubo transmembranskega potenciala in/ali pH gradienta. Integriteta citoplazmatske membrane je tako uničena, tvorba energije in biosinteza proteinov oziroma nukleinskih kislin pa inhibirana ali celo ustavljena, kar

povzroči smrt celice (Bruno in Montville, 1993; Abee, 1995; Ennahar in sod., 2000; Sablon in sod., 2000; Cleveland in sod.; 2001).

#### **2.4.1 Membranska aktivnost bakteriocinov in tvorba por**

Bakteriocini so pozitivno nabite molekule s hidrofobnimi regijami. V prepoznavanje gostitelja in bakteriocina naj bi bili, predvsem pri bakteriocinah podskupine IIa (pediocinom podobni nelantibiotiki), vpleteni membransko vezani receptorji, oziroma receptorjem podobne molekule. Le ti naj bi se v začetnem koraku interakcij bakteriocina s tarčno membrano elektrostatsko povezali. Za nekatere bakteriocine, na primer laktkokcin A, so ti receptorji proteinske narave, pri nizinu (lantibiotik) pa gre za pripenjanje na tako imenovani lipid II. Po drugi hipotezi pa naj bi se funkcionalno povezali pozitivno nabiti polarni ostanki bakteriocina z negativno nabitimi fosfolipidnimi glavami celične membrane tarčne celice (van Belkum in sod., 1991b; Chikindas in sod., 1993; Abbe, 1995; Chen in sod., 1997; Brotz in sod., 1998; Cleveland in sod., 2001; Diep in Nes, 2002). Glede na kationsko naravo bakteriocinov podskupine IIa in visoko strukturno podobnost njihovih hidrofilnih N-terminalnih delov, ki naj bi bili vključeni v začetno vezavo, je zelo verjetno, da gre pri vseh bakteriocinah podskupine IIa za, do določene mere, enak tip funkcionalne vezave (Fimland in sod., 1998; Ennahar in sod., 2000).

Naslednji korak naj bi predstavljale hidrofobne interakcije med hidrofobnimi/amfifilnimi domenami C-terminalnega dela bakteriocina in acilnimi verigami membranskih lipidov, ki naj bi bile odločilnega pomena pri procesu tvorbe por. C-terminalni del bakteriocinov podskupine IIa, ki je bolj hidrofoben kot N-terminalni del, vsebuje domeno, ki naj bi bila vpletena v hidrofobne interakcije z membrano. Ta domena naj bi bila specifična in povezana tudi z določanjem vrstne specifičnosti v inhibitornem spektru delovanja bakteriocinov podskupine IIa (olajšane interakcije bakteriocina s tarčno membrano naj bi povečale njegovo učinkovitost). V nasprotju pa N-terminalna domena bakteriocina, ki je vpletena v elektrostatske interakcije z membransko površino, verjetno sodeluje na nespecifičen način. Po hidrofobnih interakcijah naj bi se bakteriocin reorientiral v energetsko ugodnejšo lego in preprosto vključil v membrano, čemur naj bi sledila agregacija in tvorba hidrofilnih por. Jedro por naj bi torej tvorile amfifilne strukture, s polarno stranjo obrnjeno proti centru kanalčka in nepolarno stranjo proti hidrofobni fazi fosfolipidnega dvosloja (Chen in sod., 1997; Chen in sod., 1998; Fimland in sod., 1996, 1998; Diep in Nes, 2002). Opisane membranske interakcije bakteriocinov podskupine IIa z membrano tarčne celice so shematsko prikazane na sliki 2.



Slika 2: Shematski prikaz strukture modelnega bakteriocina podskupine IIa in možne interakcije z membrano tarčne celice. (A) Možne intrakcije bakteriocinskih domen z membransko površino. (B) Vključitev bakteriocina v membrano in tvorba hidrofilnih por. Hidrofobna stran peptida je temneje, hidrofilna pa svetleje osenčena. (Ennahar in sod., 2000).

Figure 2: Schematic representation of the structure of a model class IIa bacteriocin and possible interaction with the target cell membrane. (A) Possible interactions of each domain with the membrane surface. (B) Bacteriocin insertion and formation of hydrophilic pores. The hydrophobic face of the peptide is shaded dark and hydrophilic face is shaded light.

#### 2.4.1.1 Tvorba por

Tvorba por je sicer splošna lastnost bakteriocinov, velikost, stabilnost in prevodnost nastalih por pa se močno razlikujejo od bakteriocina do bakteriocina. Za tvorbo por so potrebne interakcije med bakteriocinom in membrano tarčne celice. Na ta proces vsaj delno vplivajo elektrostatske interakcije med pozitivno nabitim peptidom in anionskimi lipidi, ki so razširjeni v membranah grampozitivnih bakterij (Montville in sod., 1995; Moll in sod., 1999b; Eijsink in sod., 2002).

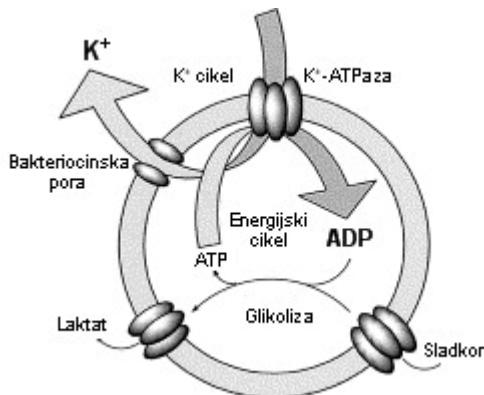
Bakteriocinske molekule destabilizirajo citoplazemsko membrano in s tem povečajo njeno prepustnost. Amfifilna struktura omogoča bakteriocinom, da se kot posamezne molekule vrvajo v celično membrano, kjer lahko pride do njihove oligomerizacije, po tako imenovanem mehanizmu valja in palice ("barrel-stave"). Pri tem procesu se snop  $\alpha$ -vijačnic v membrani orientira tako, da so hidrofobni deli obrnjeni navzven proti acilnim glavam membranskih lipidov, hidrofilni deli pa tvorijo notranjost pore. Ta privlačen mehanizem v nekaterih primerih sicer velja, vendar je verjetno preveč preprost, saj je stanje običajno bolj kompleksno. Zato se bolj nagibajo k tako imenovanem mehanizmu preproge ("wedge"), kjer naj bi se bakteriocinske molekule zbirale ob zunanji površini celične membrane in se vzdolžno orientirale. Ko se na nekem mestu nabere dovolj peptidnih (bakteriocinskih) molekul, pride zaradi delovanja bakteriocinov na fosfolipide do trenutnega zrušenja membranske strukture, kar ima za posledico trenutno lokalno prepustnost celične membrane (Ojcius in Young, 1991; Abee, 1995; Jack in sod., 1995; Montville in sod., 1995; Moll in sod., 1999b; Eijsink in sod., 2002; Garneau in sod., 2002).

Na vezavo bakteriocina na membrano in poznejšo tvorbo por, običajno vplivata tudi membranski potencial tarčne celice in vrednost pH. Membranski potencial domnevno olajša insercijo vezanega bakteriocina v membrano in lahko vpliva tudi na združevanje bakteriocinskih molekul. Občutljivost za bakteriocin je torej do neke mere odvisna tudi od fiziološkega stanja celice (Eijsink in sod., 2002).

#### 2.4.1.2 Delovanje dvopeptidnih bakteriocinov

Za dvopeptidne bakteriocine predvidevajo, da pri nastajanju por v membrani tarčnih celic sodelujeta obe komponenti - vsaka od njiju tvori določene amfifilne  $\alpha$ -helične strukture, ki sodelujejo pri prodiranju peptidov v membrano občutljive celice. Nastale pore so lahko substratno specifične, zato so nekateri bakteriocini kationsko oziroma anionsko specifični (Klaenhammer, 1993; Moll in sod., 1999a; Nes in Holo, 2000). Na primer, laktokokcin G tvori kationsko specifične pore, skozi katere iz celice selektivno iztekajo kalijevi ioni, ne pa tudi protoni, saj gradient pH ostane nespremenjen. Smrt celice nastopi zaradi izgube oziroma neučinkovitega vnosa kalija, ki se prenaša s pomočjo ATP, le tega pa zaradi povečane hidrolize v celici primanjkuje (slika 3). Tudi plantaricin EF izkazuje visoko

prevodnost za monovalentne katione, plantaricin JK pa tvori anionsko specifične pore, skozi katere iztekajo fosfatni ioni. Po drugi strani pa na primer laktacin F povzroča neselektivno iztekanje tako kalijevih, kot tudi fosfatnih ionov. Še vedno pa ne poznamo natančne sestave in razporeditve posameznih komponent v pori, niti ni zagotovo jasno, ali so v bakteriocinske interakcije vpletene tudi receptorjem podobne molekule (Abbe in sod., 1994; Moll in sod., 1996; Moll in sod., 1998; Moll in sod., 1999a; Diep in Nes, 2002; Garneau in sod., 2002).



Slika 3: Model propada celice zaradi bakteriocinske tvorbe por. (Garneau in sod., 2002).

Figure 3: Proposed model of cell killing by pore-forming bacteriocin.

#### 2.4.1.3 Povezava med strukturo, funkcijo in delovanjem bakteriocinov

Raziskovanje povezav med strukturo in funkcijo oziroma delovanjem bakteriocinov predstavlja velik izliv, saj o tem zaenkrat še bolj malo vemo. V razvoju je predvsem proučevanje bakteriocinov iz podskupine IIa (pediocinom podobni nelantibiotiki) in sicer v smislu primerjave njihovih protimikrobnih spektrov, aminokislinskih zaporedij in sekundarnih struktur, ki jih predvidevajo s pomočjo modelov. Namen raziskav je identifikacija regij, ki igrajo ključno vlogo v prepoznavanju in/ali baktericidnem delovanju teh peptidov. Za praktično vse poznane bakteriocine podskupine IIa domnevajo, da imajo strukturne lastnosti pomembno vlogo v vsaj enim izmed obih procesov (slika 2). To nakazuje kompleksno naravo bakteriocinsko-membranskih interakcij, saj proces tvorbe por vključuje celo serijo korakov prepoznavanja, vezave in vstavitev bakteriocina v tarčno membrano, v katerih sodelujejo različne domene in strukturne lastnosti bakteriocina (Daw in Falkiner, 1996; Moll in sod., 1999b; Ennahar in sod., 2000).

Pri biološki aktivnosti membransko aktivnih proteinov ima torej sekundarna struktura pomembno vlogo, saj na osnovi modelov predvidevajo, da gre pri številnih membransko aktivnih bakteriocinih za prisotnost amfifilnih  $\alpha$ -vijačnic ali  $\beta$ -plošč, ki tvorijo hidrofobno

in hidrofilno stran. Za dvopeptidne bakteriocine (na primer laktokokcin M, laktacin F), pri katerih je aktivnost odvisna od dopolnjevanja dveh molekul, model predvideva dvokomponentni poracijski kompleks (Klaenhammer, 1993; Kok in sod., 1993; Ennahar in sod., 2000; Sablon in sod., 2000; Garneau in sod., 2002). Vendar moramo biti pri modeliranju, oziroma napovedovanju struktur bakteriocinov skupine II previdni, saj so napovedi osnovane le na analizi poravnave zaporedij, ki je optimizirana za strukture topnih proteinov (kar bakteriocini niso), poleg tega pa ne upoštevajo kompleksnosti interakcij z membrano (Eijsink in sod., 2002).

Pri proučevanju peptidov dvopeptidnih bakteriocinov laktokokcina G in plantaricinov EF in JK so ugotovili, da so v vodnem okolju nestrukturirani, v hidrofobnem, membransko posnemajočem okolju pa pridobijo določen delež  $\alpha$ -heličnih struktur, kar sovpada z domnevo, da je negativni naboj membranskega fosfolipidnega dvsloja pomemben za induciranje struktur pozitivno nabitih bakteriocinskih peptidov. Opazili so, da je ob hkratnem dodatku obeh peptidov v hidrofobno okolje nastalo več heličnih struktur, kot je bila vsota heličnih struktur posameznih peptidov v istem okolju. Ti bakteriocini sodelujejo z membrano tarčne celice preko mehanizma valja in palice (poglavlje 2.4.1.1), ki privede do nereverzibilne propustnosti celične membrane in posledično do smrti tarčne celice (Nissen-Meyer in sod., 1992; Hauge in sod., 1998; Hauge in sod., 1999).

#### 2.4.1.3.1 Vpletjenost receptorskih molekul

Ena izmed glavnih dilem pri delovanju bakteriocinov vsekakor ostaja vprašanje, ali le ti delujejo preko receptorjev v tarčni celični membrani, ali ne, pri čemer se vprašanje nanaša še na značaj (proteinski, lipidni?) in specifičnost domnevnega receptorja. Nekateri bakteriocini skupine II, na primer laktokokcin A, potrebujejo za adsorpcijo na tarčno membrano prisotnost specifične receptorske molekule, pri drugih so ugotovili povezavo med aktivnostjo in stereospecifičnostjo kiralne tarčne molekule (receptorja); D-enantiomera leukocina A na primer, ni bila bakteriocinsko aktivna, L-enantiomera pa (Yan in sod., 2000). Morda interakcije bakteriocina z receptorsko molekulo le ojačajo njegovo delovanje, ni pa še pojasnjeno, katera bakteriocinska domena naj bi bila odgovorna za specifičnost vezave na lipid, protein oziroma drugo reaktivno skupino (Chen in sod., 1998; Montville in Chen, 1998; Nes in Holo, 2000; Eijsink in sod., 2002).

#### 2.4.2 Protimikrobní spekter bakteriocinov

Presenetljivo malo študij podrobno obravnava določanje spektra protimikrobine aktivnosti, komercialno sicer tako zanimivih bakteriocinov. Čeprav je pri večini objav, ki opisujejo izolacijo in karakterizacijo novih bakteriocinov, vključenih nekaj informacij o protimikrobnem spektru, te informacije običajno nimajo večjega pomena, saj testiranje vključuje le majhno število sevov. Poleg tega so tudi tehnike ugotavljanja protimikrobine

aktivnosti pogosto različne, tako da težko primerjamo dejansko aktivnost različnih bakteriocinov. Protimikrobní učinek je namreč v veliki meri lahko odvisen od različnih zunanjih dejavnikov, ki vključujejo tako znane kot neznane fizikalne, kemijske in prehransko-okoliške dejavnike (Blom in sod., 1997; Ennahar in sod., 2000; Nes in Holo, 2000).

Na splošno so vsi bakteriocini podskupine IIa (pediocinom podobni) zelo učinkoviti proti listerijam, praktično proti vsem več sto testiranim sevom. Koncentracije bakteriocinov, potrebnih za propad celic najbolj in najmanj občutljivega seva *Listeria monocytogenes*, pa se razlikujejo tudi stokratno ali več. Nekateri bakteriocini podskupine IIa, na primer enterocin-P, ki se, za razliko od ostalih bakteriocinov te podskupine, izloča s *sec*-odvisnim transportom, inhibirajo rast oziroma ubijajo tudi druge grampozitivne patogene bakterije iz vrst *Clostridium perfringens*, *Cl. botulinum* in *Staphylococcus aureus* (Cintas in sod., 1997; Eijsink in sod., 1998; Ennahar in sod., 2000; Nes in Holo, 2000; Nes in Johnsborg, 2004).

## 2.5 HETEROLOGNA TVORBA BAKTERIOCINOV MKB

Naravna tvorba in učinkovitost bakteriocinov sta v fermentiranih izdelkih pogosto omejeni s številnimi dejavniki, kot so: ozek protimikrobní spekter aktivnosti in nizka raven tvorbe bakteriocina, genska nestabilnost in regulatorni sistemi izražanja bakteriocina, slaba prilagoditev bakteriocinogenega seva okolju, kjer naj bi deloval (na primer živilu), inaktivacija bakteriocina in pojav odpornosti med tarčnimi bakterijami. Odličen način, s katerim lahko obidemo takšne ovire, je heterologno izražanje bakteriocinov.

Kloniranje in ekspresija bakteriocinskih genov v novih gostiteljskih sevih omogočajo tvorbo in celo povečano izražanje bakteriocinov ter olajšajo kontrolo regulacije izražanja bakteriocinskih genov. Glede na bakteriocin, ki nas zanima in glede specifičnosti okolja, kjer bo deloval, lahko na osnovi želenih lastnosti gostitelja izberemo različne "varne" seve MKB. Tako lahko konstruiramo na primer vrsti hrane prilagojene multibakteriocinogene seve MKB. Le ti hkrati tvorijo več bakteriocinov, vsakega z določenim območjem delovanja, kar poveča nabor tarčnih organizmov in zmanjšuje možnost razvoja odpornosti proti posameznemu bakteriocinu (Chikindas in sod., 1995; McCormick in sod., 1996; Ennahar in sod., 2000; Rodríguez in sod., 2003).

### 2.5.1 Izbira ekspresijskega sistema

Heterologne ekspresijske sisteme običajno uporabljamo za proučevanje funkcionalnosti rekombinantnih peptidov oziroma proteinov, za olajšanje oziroma pospeševanje transkripcijsko-translacijske kontrole rekombinantnega izražanja genov in za doseganje višjih nivojev tvorbe rekombinantnih proteinov glede na naravni sistem. Uporabni pa so

tudi pri analizi določenih mutacij v genskih gručah, s katerimi lahko ugotavljamo esencialnost genov za tvorbo bakteriocinov in imunosti nanje. Načrtovanje učinkovitega ekspresijskega sistema za tvorbo rekombinantnih proteinov je odvisno od številnih dejavnikov, ki vključujejo lastnosti in pogoje za rast celic, nivo izražanja, lokacijo končnega rekombinantnega produkta, posttranslacijske spremembe in regulacijo. Ekspresijski sistem tvorijo tako gostiteljske celice kot različni genetski elementi (transkripcijski in translacijski signali, regulatorni faktorji, geni, plazmidi), zato je lahko za uspešno ekspresijo želenega gena kritična izbira katerekoli komponente (Makrides, 1996; Rodríguez in sod., 2003).

#### 2.5.1.1 Gramnegativni ekspresijski sistemi (bakterija *Escherichia coli*)

Zaradi obsežne genetske karakterizacije in dobrega poznavanja bioloških procesov, je vrsta *E. coli* dolgo veljala za primarno izbiro prokariontskega gostiteljskega seva za kloniranje in ekspresijo heterolognih genov. Za gensko manipulacijo *E. coli* imamo na voljo široko paleto tehnik in orodij, zaradi česar ta organizem običajno predstavlja prvega gostitelja pri kloniranju različnih genov, vpletenih v biosintezo številnih bakteriocinov MKB. Seveda pa je malo verjetno, da bi bil en sam mikroorganizem primeren za vsako aplikacijo, saj so na primer že v rabi kodona velike razlike med *E. coli* (približno 50 odstotkov vsebnosti G+C) in kodirajočimi regijami LAB (približno 35 odstotkov vsebnosti G+C). Problemi lahko nastopijo tudi zaradi strukturnih lastnosti rekombinantnega genskega zaporedja, stabilnosti in translacijske učinkovitosti mRNA in ne nazadnje, zaradi potencialne toksičnosti rekombinantnega proteina za *E. coli*. Zaradi različne zgradbe oziroma organizacije celične membrane in stene pri gramnegativnih in grampozitivnih mikroorganizmih, lahko v ekspresijskem sevu *E. coli* manjkajo določeni sekretorni mehanizmi, ki so potrebni za učinkovito izločanje rekombinantnih proteinov v okolje (rastni medij). Heterologni proteini so lahko podvrženi tudi razgradnji s celičnimi proteazami. Pomembno dejstvo pri izbiri ekspresijskega organizma je tudi njegova varnost in sevi *E. coli* nimajo statusa GRAS tako kot MKB, saj so potencialno potogeni. Zato je za tvorbo rekombinantnih proteinov v živiski industriji zaželena uporaba alternativnih gostiteljskih organizmov (Billman-Jacobe, 1996; Makrides, 1996; Fuglsang, 2003; Rodríguez in sod., 2003).

Kljub opisanim omejitvam možnosti heterolognega izražanja bakteriocinov (in drugih proteinov) v *E. coli*, pa nekaj najnovejših študij opisuje uspešno tvorbo posameznih bakteriocinov v tej gramnegativni bakteriji (poglavlje 2.5.2.6).

#### 2.5.1.2 Grampozitivni ekspresijski sistemi (bakterija *Lactococcus lactis*)

Razvoj novejših molekularno bioloških orodij za gensko manipulacijo ter omejitve uporabe vrste *E. coli* kot gostiteljskega organizma, so vzpodbudili uporabo nekaterih vrst MKB, ki se pri heterolognem izražanju bakteriocinov pogosto izkažejo za bolj učinkovit ekspresijski

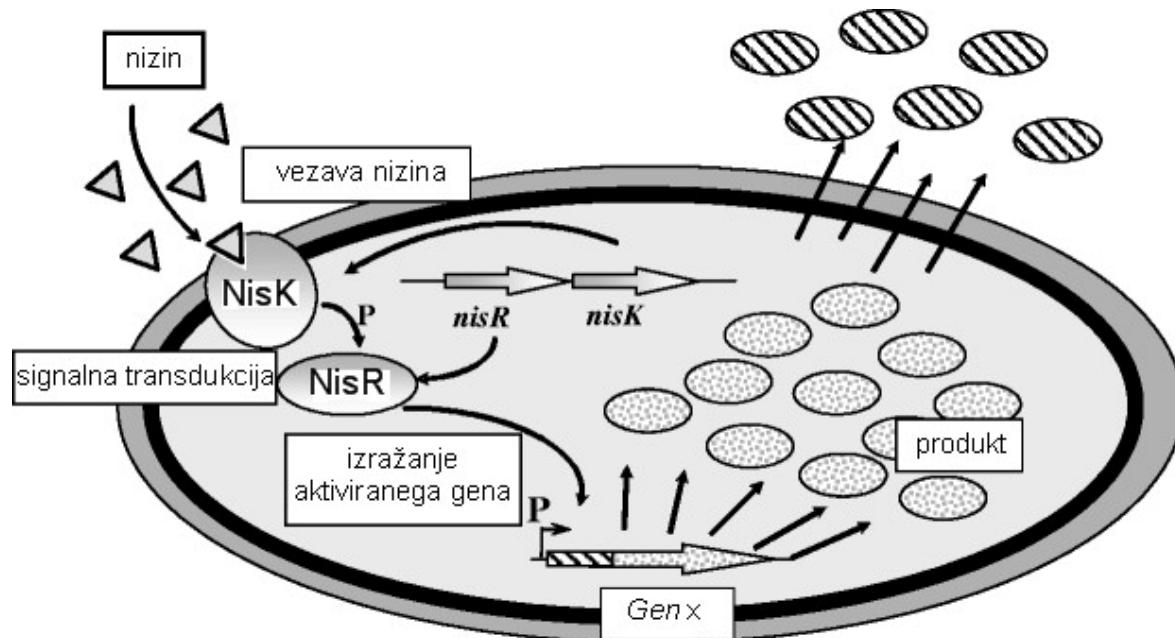
sistem. Ena izmed najbolj proučenih vrst MKB je *Lactococcus lactis*, za katero imamo na voljo učinkovita genetska orodja, vključno z dominantnimi selekciskimi markerji, ki so sprejemljivi za uporabo v živilski industriji. Nekateri sevi, na primer *Lc. lactis* IL1403, so se izkazali kot zelo uporabni zaradi genske stabilnosti in učinkoviti pri kontroli izražanja številnih bakteriocinov (van de Guchte in sod., 1989; de Ruyter in sod., 1996; Steele in sod., 1998; O'Keeffe in sod., 1999; Venema in sod., 1999; Rodríguez in sod., 2003). Nadaljnje raziskave izražanja genov v sevih MKB in njihov status GRAS bodo še povečale uporabnost MKB kot alternativnih gostiteljev za heterologno gensko ekspresijo, tudi za komercialno zanimive bakteriocine.

#### 2.5.1.2.1 Ekspresijski sistem NICE

Učinkovit in zelo obetajoč genski ekspresijski sistem, ki temelji na avtoregulacijskem mehanizmu biosinteze nizina v vrsti *Lc. lactis*, je tako imenovani sistem NICE (Nisin-Controlled gene Expression system). Ta sistem omogoča regulirano povečano tvorbo različnih metabolitov, encimov in drugih, predvsem za živilsko industrijo zanimivih proteinov v nekaterih grampozitivnih bakterijah, še posebno v vrsti *Lc. lactis*. Sistem je relativno poceni in ima tako imenovani status "food-grade" (varen za uporabo v živilski industriji) (Kuipers in sod., 1998; Zhou in sod., 2006). MKB so že pred odkritjem sistema NICE uspešno uporabljali za tvorbo velikih količin določenih proteinov in sicer z uporabo konstitutivnih promotorjev *Lc. lactis*. Vendar lahko nepretrgana prekomerna tvorba proteina vodi v njegovo znotrajcelično kopičenje, združevanje (agregacijo) ali razgradnjo v citoplazmi, kar je za celico smrtno (Makrides, 1996; Kuipers in sod., 1997; de Vos, 1999; Zhou in sod., 2006). Da bi obšli te probleme, so razvili inducibilne ekspresijske promotorje, s katerimi lahko kontroliramo izražanje genov z induktorjem, represorjem ali okoliškimi dejavniki, kot so vrednost pH, temperatura in ionska koncentracija. Najbolj opisan, uspešen in splošno uporaben ekspresijski sistem, z možnostjo kontrole izražanja genov v grampozitivnih bakterijah, je sistem NICE z nizinsko kontrolo (de Ruyter in sod., 1996; Kuipers in sod., 1998; Bryan in sod., 2000; Axelsson in sod., 2003).

Na sliki 4 je shematsko prikazano delovanje sistema NICE: membransko locirana histidinska kinaza (NisK) zazna nizin kot induksijski signal, se avtofosforilira, fosfatni ostanek se prenese do znotrajceličnega proteinskega regulatorja odgovora NisR, ki aktivira promoter NisA, ta pa sproži prepisovanje oziroma izražanje genov, ki se nahajajo navzdol od njega. Nizinski promotor nisA so izolirali in uporabili pri konstrukciji plazmidov, gena *nisR* in *nisK* pa vgradili v kromosome primernih gostiteljskih sevov grampozitivnih bakterij iz rodov *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* in še posebej *Lactococcus* (de Ruyter in sod., 1996; Neu in Henrich, 2003). Če torej izbrani gen kloniramo v plazmid navzdol od nizinskega promotorja in konstrukt transformiramo v sev nisRK, lahko izražanje kloniranega gena aktiviramo z dodatkom nizina v medij med log-

fazo rasti, preko dvokomponentnega regulatornega sistema. Produkt izraženega gena se lahko akumulira v celici ali izloči iz celice v medij, odvisno od prisotnosti signalnega zaporedja oziroma plazmidnega konstrukta (Kuipers in sod., 1997; Mierau in Kleerebezem, 2005).



Slika 4: **Shematski prikaz genskega ekspresijskega sistema z nizinsko kontrolo (NICE).** NisK predstavlja histidinsko proteinsko kinazo; NisR regulator odgovora; GenX tarčni gen, ki je kloniran za promotor *nisA* (Mierau in Kleerebezem, 2005).

Figure 4: **Schematic overview of the nisin-controlled gene expression system (NICE).** NisK indicates histidine-protein kinase; NisR, response regulator; GenX, target gene cloned behind the *nisA* promoter.

## 2.5.2 Primeri heterologno izraženih bakteriocinov MKB

Transport in izločanje večine bakteriocinov, heterologno izraženih v sevih MKB, poteka s pomočjo ABC-transportnega sistema. Le nekateri heterologno izraženi bakteriocini se izločajo s pomočjo splošnega sekretornega (*sec*) sistema (Franke in sod., 1999). Tvorba bakteriocinov MKB v heterolognih sistemih lahko temelji na izražanju matičnih genov, lahko gre za izmenjavo vodilnih peptidov in/ali ABC-procesno-transportnih sistemov, lahko pa bakteriocinom dodamo signalne peptide, ki jih prepozna splošni sekretorni (*sec*) sistem (Rodríguez in sod., 2003).

### 2.5.2.1 Heterologna tvorba bakteriocinov MKB na osnovi izražanja matičnih genov

O prvi uspešni heterologni tvorbi bakteriocina MKB poročata Joerger in Klaenhammer (1986, 1990), ki sta ozkospektralni helveticin J (predstavnik skupine III bakteriocinov), ki ga tvori *L. helveticus* 481, izrazila v sevu *L. johnsonii* NCK249. Laktocin S je lantibiotik, ki ga tvori *L. sakei* L45, biosintezo laktocina S pa so Skaugen in sod. (1999) dosegli v sevih *L. sakei* 790 in *L. plantarum* NC8. Acidocin B, ki ga tvori *L. acidophilus* M46, je tudi predstavnik lantibiotikov, s tipičnimi lastnostmi bakteriocinov I. skupine, ne vsebuje pa dvojnega glicinskega mesta procesiranja, zato menijo, da se procesira in izloča s splošnim sekrecijskim sistemom. Plazmid z geni za biosintezo acidocina B so uspešno prenesli v sev *L. plantarum* 80 in *L. fermentum* NCK127 (Van der Vossen in sod., 1994; Leer in sod., 1995). Pediocin PA-1 je nelantibiotik s širokim inhibitornim spektrom, zelo učinkovit proti sevom *Listeria monocytogenes*, ki v mlekarski industriji predstavlja velik problem. Tvorilo ga številni pediokoki, na primer *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 in *Pediococcus acidilactici* 347, ki jih najdemo v zelenjavnih in mesnih fermentiranih izdelkih, na rast v mleku oziroma mlečnih izdelkih pa so zelo slabo prilagojeni. Zato raziskovalci proučujejo možnosti heterologne tvorbe pediocina PA-1 v sevih MKB, ki so tipične za mleko in mlečne izdelke. Uspešno so ga izrazili že v številnih sevih, na primer v *P. pentosaceus* PPE1.2, *Lc. lactis* IL1403, *Lc. lactis* MM210, *Ent. faecalis* in *Str. thermophilus* ter nekaterih laktkokov, ki tvorijo nizin (Marugg in sod., 1992; Chikindas in sod., 1995; Buyong in sod., 1998; Coderre in Somkuti, 1999; Reviriego in sod., 2007). Heterologna tvorba enterocina A, inducibilnega nelantibiotika, ki ga tvorijo nekateri sevi *Ent. faecium* in je aktiven proti številnim listerijam, je privlačna predvsem zato, ker se zaradi možne patogenosti nekaterih sevov, v živilstvu izogibamo uporabi enterokokov. Enterocin A in njegov indukcijski faktor so izrazili v *Ent. faecalis* OG1X in *Lc. lactis* IL1403 (O'Keeffe in sod., 1999) V sevu *Lc. lactis* IL1403 so uspeli celo sočasno izraziti pediocin PA-1 in enterocin A (Martínez in sod., 2000). Tvorbo acidocina A iz skupine II bakteriocinov, ki ga tvori *L. acidophilus* TK9201 (starterski sev pri proizvodnji fermentiranega mleka), so dosegli v sevih *L. acidophilus* TK1-5 in *L. casei* TK9008 (Kanatani in sod., 1995).

### 2.5.2.2 Heterologna tvorba bakteriocinov MKB s pomočjo izmenjave vodilnih peptidov in/ali ABC-procesno-transportnih sistemov

S pomočjo izmenjave vodilnih peptidov in/ali ABC-procesno-transportnih sistemov so heterologno izrazili nekatere bakteriocine, kot so: lantibiotik nizin Z, ki ga tvorijo številni sevi laktkokov (Kuijpers in sod., 1993), dvopeptidni nelantibiotik laktacin F, ki ga naravno tvori *L. johnsonii* VPI 11088 (Quadri in sod., 1994; Worobo in sod., 1994), nelantibiotik leukocin A, ki ga tvori *Leuconostoc gelidum* UAL187 (van Belkum in Stiles, 1995), nelantibiotika laktkokcin A (van Belkum in sod., 1991b; Holo in sod., 1991) in sakacin A

(Holck in sod., 1992; Axelsson in Holck, 1995; Axelsson in sod., 1998). Z enako strategijo so uspeli v sevu *Lc. lactis* IL1403 izraziti tudi kolicin V, kar je bil prvi znan primer uspešne heterologne tvorbe bakteriocina gramnegativnega organizma v grampozitivnem ekspresijskem sevu (van Belkum in sod., 1997). Znanih pa je tudi nekaj primerov heterolognega izražanja večih bakteriocinov hkrati v istem sevu, na primer laktacina F in leukocina A v sevu *Lc. gelidum* UAL187-22 (Allison in sod., 1995), nizina A in pediocina PA-1 v *Lc. lactis* FI5876 (Dodd in sod., 1990).

#### 2.5.2.3 Heterologna tvorba bakteriocinov MKB s pomočjo splošnega sekretornega (*sec*) sistema

V nasprotju z bakteriocini MKB, se večina prokarionskih proteinov iz celic izloča s pomočjo splošnega sekretornega (*sec*) sistema. Z dodajanjem signalnih peptidov, ki jih prepozna ta sistem, so uspešno heterologno izrazili pediocin PA-1 (Miller in sod., 1998), divergicin A (Worobo in sod., 1995), brohocin-C (Bohaychuk in sod., 1999) in enterocin B ter kombinacijo enterocina B in karnobakteriocina A (Franz in sod., 1999), pa tudi kolicin V (McCormick in sod., 1999).

#### 2.5.2.4 Heterologna tvorba bakteriocinov MKB z uporabo sistema NICE

Sistem NICE je omogočil povečano izražanje bakteriocinv oziroma njihovih inženirskih različic z izboljšanimi lastnostmi, ter prenos genov, potrebnih za biosintezo bakteriocinov, v druge vrste. Horn s sod. (2004) je na primer v sevu *Lc. lactis* pod kontrolo nizinskega promotorja izrazil pediocin PA-1 in kolicin V, Straume s sod. (2006) pa regulator odgovora PlnC, ki je del signalnega transdukcijskega sistema regulacije tvorbe bakteriocinov v sevu *L. plantarum* C11.

#### 2.5.2.5 Heterologna tvorba bakteriocinov MKB v kvasovkah

Kvasovke, posebno iz vrst *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*, predstavljajo glavne gostiteljske organizme za izražanje visoko kakovostnih heterolognih proteinov v biofarmacevtskih, industrijskih in raziskovalnih aplikacijah. S kombinacijo dobro poznanih tehnik za molekularno manipulacijo prokariontov in pomočjo evkarionskih sistemov je Schoeman s sod. (1999) raziskal možnost kontrole kvarljivcev med fermentacijo s kvasovkami in sicer z ekspresijo pediocina PA-1 v *Saccharomyces cerevisiae*. Z odtisom northern in biološkim testom so v supernatantu kvasne kulture potrdili prisotnost heterolognega peptida v relativno nizki koncentraciji, saj se je večina bakteriocinskih molekul vezala na celice kvasovk. Pod kontrolo promotorja kvasovke so v prenosni vektor klonirali tudi plantaricin 423 in ga heterologno izrazili v *Saccharomyces cerevisiae* (van Reenen in sod., 2003).

### 2.5.2.6 Heterologna tvorba bakteriocinov MKB v gramnegativnih bakterijah (*E. coli*)

Večinoma gre za indukcijsko izražanje (fuzijskih) peptidov, ali pa umetno sintetiziranih bakteriocinskih genov, ki kodirajo zrele bakteriocine. Gene sintetizirajo na podlagi optimizacije kodona, ki je prilagojen vrsti *E. coli* (Ingham in sod., 2005). V ekspresijskih sevih *E. coli* so na primer uspešno izrazili pediocin PA-1 (Moon in sod., 2006), enterocin P (Gutiérrez in sod., 2005) in divercin V41 (Richard in sod., 2004).

## 2.6 UPORABA BAKTERIOCINOV MKB IN PERSPEKTIVE

Čeprav najdemo bakteriocine pri številnih grampozitivnih in gramnegativnih bakterijah, zadnjih 20 do 25 let intenzivno proučujejo predvsem bakteriocine MKB in njihovo kompeticijsko vlogo v različnih ekoloških nišah. Najbolj obetavna je njihova uporaba v živilstvu in pripravi krme, saj so naravni (bio)konzervansi.

Bakteriocine lahko vključimo v živila vsaj na tri načine: kot (delno) očiščen bakteriocinski pripravek, kot sestavino živila, ki smo jo predhodno fermentirali s sevi, ki tvorijo bakteriocin(e), ali z uporabo starterske kulture (pri fermentiranih izdelkih), ki tvori bakteriocin(e) *in situ* (Deegan in sod., 2005). Dodatek bakteriocinov oziroma bakteriocinogenih MKB, predstavlja učinkovit način borbe proti kvarljivcem in ostalim neželenim bakterijam ter podaljša kontrolo nad mikrofloro v živilu. Še posebno zanimiva in obetavna je kombinirana uporaba večih bakteriocinov, katerih interakcije prispevajo k dodatnemu oziroma sinergističnemu učinku (Ouwehand, 1998; de Vuyst in Vandamme, 1998).

Pretirana uporaba antibiotikov, predvsem v živinoreji in pripravi krme, je povzročila nastanek številnih rezistentnih sevov, zato se na vseh področjih trudijo zmanjšati njihovo uporabo. Odkritje širokospektralnih bakteriocinov je omogočilo (delno) nadomestitev antibiotikov v živinoreji in pripravi krme ter v živilski industriji, kjer je njihov glavni pomen bio-konzerviranje. V tehnologiji ovir lahko predstavljajo eno izmed možnih zamenjav za kemijske konzervanse, njihov dodatek pa omogoča tudi manj agresivne toplotne in fizikalno-kemijske postopke. To je pomemben kriterij za vse bolj ozaveščene potrošnike, ki želijo minimalno obdelana in varna živila brez umetnih dodatkov, s čim daljšo obstojnostjo (de Vuyst in Vandamme, 1998; Ennahar in sod., 1999; Diep in Nes, 2002; Hansen, 2002; Deegan in sod., 2005). Bakteriocini bi z usmerjanjem razvoja želene, oziroma preprečevanjem razvoja neželene mikroflore v določenem živilu, lahko služili tudi kot prenašalci za oblikovanje naravne imunosti živila (Cotter in sod., 2005a).

## 2.6.1 Uporaba lantibiotikov

Posebna struktura lantibiotikom zagotavlja številne uporabne lastnosti: dehidrirani AK ostanki z elektrofilnimi centri lahko hitro napadejo nukleofilne skupine v bakterijskih membranah, proteinih/encimih in DNA; tioesterski obroči, ki jih najdemo pri vseh lantibiotikih, stabilizirajo njihovo strukturo, zaradi česar so manj občutljivi za topoto in reducirajoče agense. Zaradi njihovih detergentom-podobnih lastnosti, ki izhajajo iz amfifilne narave, jih lahko uporabljamо kot emulgatorje pri oblikovanju zdravil ter kot pospeševalce njihove absorbcije. Obetavne rezultate pri preprečevanju adhezije in rasti določenih patogenih bakterij, na primer sevov vrste *Listeria monocytogenes*, kaže tudi uporaba lantibiotikov kot filmov (Bower in sod., 2001; Cotter in sod., 2005b).

Prototip lantibiotikov, nizin, je komercialno dostopen bakteriocin, ki ga uporablja v številnih postopkih konzerviranja, pa tudi v veterini in biomedicini (Kuipers in sod., 1998; Cheigh in sod., 2005). Njegovo široko uporabo omogoča sposobnost učinkovanja oziroma aktivnost v širokem območju različnih pogojev in s tem kontrola bakterijske rasti ali infekcije. Po tem se razlikuje od večine ostalih bakteriocinov, ki so bolj odvisni od dejavnikov okolja (Blom in sod., 1997; Cleveland in sod., 2001; Eijsink 2002). Nizin raziskujejo tudi kot možno nadomestilo za antibiotike. Ko so na primer pri infekciji miši s *Streptococcus pneumoniae* primerjali učinkovanje nizina s štirimi različnimi antibiotiki, je nizin učinkoval vsaj enakovredno testiranim antibiotikom in je celo uničil sev, odporen proti eritromicinu, tetraciklinu in kloramfenikolu (Goldstein in sod., 1998).

## 2.6.2 Uporaba nelantibiotikov

Komercialna uporaba nemodificiranih bakteriocinov skupine II (nelantibiotikov) je v industriji zaenkrat še precej omejena. Večinoma gre za prikrito (nenamerno) oziroma posredno uporabo bakteriocinov kot produktov naravno prisotne mikroflore ali uporabljenih starterskih kultur MKB v fermentiranih mlečnih, mesnih in zelenjavnih izdelkih. Izjema je pediocin PA-1, predstavnik podskupine IIa, ki izkazuje močno protilisterijsko aktivnost in ga uspešno uporablja pri konzerviraju mesa, sira in solat (Vandenbergh, 1993; Ennahar in sod., 2000; Deegan in sod., 2005). Kljub temu je uporaba bakteriocinogenih starterskih kultur, ki jih imenujemo tudi zaščitne starterske kulture, vse večja. Namenske njihove uporabe je zagotoviti mikrobiološko varnejše izdelke z daljšo obstojnostjo. Bakteriocinov skupine II še ne uporablja v izdelkih za osebno higieno (na primer zobnih pastah ali losijonih za telo) ali kot protimikrobne snovi v veterini in medicini. Regulativa na tem področju je namreč precej stroga in zavira uvajanje in uporabo novih bakteriocinov. Hkrati pa se moramo tudi zavedati, da bakteriocine kot protimikrobne proteine poznamo šele dobri dve desetletji in njihova doba šele prihaja (Nissen-Meyer in Nes, 1997; Nes in Holo, 2000; Hansen, 2002).

### **2.6.3 Omejitve uporabe bakteriocinov**

Čeprav imamo o številnih bakteriocinih že pravo bogastvo informacij, tako na biokemijskem kot genetskem nivoju, je še veliko neodkritega. Širšo uporabo v industrijskih pogojih sta zaenkrat dosegla le nizin in pediocin PA-1. Študije nekaterih ostalih bakteriocinov kažejo obetavne rezultate in so že blizu aplikativnemu nivoju. Vzroki za relativno malo komercialnih aplikacij bakteriocinov so predvsem njihov ozek inhibitorni spekter, ki je včasih nepredvidljiv in močno odvisen od okoliških pogojev, pojav proti bakteriocinom odpornih bakterijskih sevov, kar lahko povzroči podobne probleme kot jih že poznamo pri antibiotikih in ne nazadnje cena, saj dandanes (še) ni na voljo tehnologije, s katero bi proizvajali zadostne količine bakteriocinov za ceno, ki bi bila sprejemljiva za komercialno uporabo (Muriana, 1996; Helander in sod., 1997; Nes in Holo, 2000; Diep in Nes, 2002; Deegan in sod., 2005).

## **2.7 BAKTERIOCINI SEVOV *L. gasseri* K7 IN *L. gasseri* LF221**

Seva *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221 sta izolata iz blata dojenčkov in spadata v skupino *Lactobacillus acidophilus*, skupaj z *L. johnsonii* v DNA-homologno podskupino B skupine *L. acidophilus*. Oba seva izkazujeta osnovne probiotične lastnosti in tvorita bakteriocine s širokim spektrom protimikrobnega delovanja, ki poleg nekaterih sevov laktobacilov vključuje tudi seve drugih rodov. Razlikujeta pa se v nekaterih fenotipskih lastnostih (nivo in optimalni pogoji za rast in tvorbo bakteriocinov), genotipskih lastnostih (profil RAPD, vsebnost plazmidov) in stopnji vezave na celice Caco-2 (Rogelj in Matijašić, 2006).

### **2.7.1 Probiotične in tehnološke lastnosti sevov K7 in LF221**

Preučevana seva K7 in LF221 sta potencialna probiotika, saj izkazujeta osnovne *in vitro*, *ex vivo* in *in vivo* probiotične lastnosti, kot so: *in vitro* odpornost proti žolčnim solem in nizkim vrednostim pH ter preživetje simuliranih intestinalnih pogojev, sposobnost vezave na epitelne celice Caco-2 (Matijašić in sod., 1998; Matijašić in Rogelj, 2000; Matijašić in sod., 2003; Matijašić in sod., 2006), *ex vivo* sposobnost vezave na prašičji intestinalni epitelij (Matijašić in sod., 2006) ter *in vivo* naselitev in preživetje v prebavnem traktu miši in odstavljenih prašičkov (Rogelj in sod., 2002; Matijašić in sod., 2004).

Seva K7 in LF221 preživita postopek sušenja (z liofilizacijo in razprševanjem) in skladiščenja ter pri tem ohranita funkcionalne lastnosti in sposobnost tvorbe bakteriocinov, kar nakazuje možnost uporabe sevov za pripravo komercialnih probiotičnih oziroma bakteriocinskih pripravkov (Stojković, 2003). Možen oziroma primeren probiotični nosilec bakterij K7 in LF221 za vključitev v prehrano človeka pa bi bil lahko sir, saj oba seva preživita postopek izdelave in zorenja sira, brez negativnih vplivov na njegove senzorične lastnosti (Perko in sod., 2002).

### **2.7.2 Bakteriocinski kompleks seva LF221**

Bakteriocinski kompleks seva LF221 zavira predstavnike laktobacilov, laktokokov in pediokokov ter posamezne seve vrst *Clostridium spp.*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* in *Listeria innocua* (Matijašič in Rogelj, 1999). Matijašič in sod. (1998) so očistili in določili N-terminalno aminokislinsko zaporedje dveh bakteriocinov seva LF221 ter ju poimenovali acidocin LF221 A in acidocin LF221 B. Glede na osnovne biokemijske lastnosti in delno primarno strukturo sta bila oba bakteriocina najbolj podobna bakteriocinom skupine II. Čanžek Majhenič in sod. (2004) pa so določili 858 bp nukleotidnega zaporedja acidocina LF221 A, ki kodira nepopoln, 37 aminokislinskih ostankov (AK) dolg protein (domnevno komplementarno podenoto), 69 AK dolgo aktivno komponento in 90 AK dolg domnevni protein imunosti acidocina LF221 A. Določili so tudi 1772 bp nukleotidnega zaporedja acidocina LF221 B, ki poleg obeh podenot (75 oziroma 65 AK) in proteina imunosti (112 AK) acidocina LF221 B kodira tudi nepopoln, domnevni dodatni transportni protein acidocina LF221 B. Na osnovi analize in primerjave nukleotidnih zaporedij acidocinov LF221 A in LF221 B z nukleotidnimi zaporedji ostalih znanih bakteriocinov, so acidocina LF221 A in LF221 B uvrstili v podskupino IIe, skupine II bakteriocinov - med dvopeptidne nelantibiotike (Čanžek Majhenič, 2002; Čanžek Majhenič in sod. 2004).

### **2.7.3 Bakteriocinski kompleks seva K7**

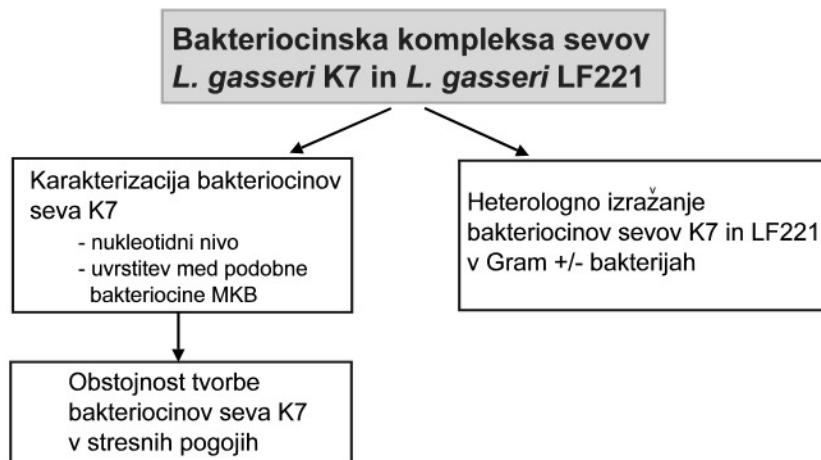
Bakteriocinski kompleks seva K7 poleg predstavnikov laktobacilov in pediokokov zavira še posamezne seve vrst *Clostridium tyrobutyricum*, *Cl. perfringens*, *Ent. faecalis* in *Listeria innocua* (Matijašič in Rogelj, 1999; Matijašič in Rogelj, 2000). Čanžek Majhenič in sod. (2003) navajajo, da se genski zapis za tvorbo bakteriocinov seva K7 najverjetnejše nahaja na njegovi genomske DNA. Z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za acidocin LF221 A oziroma LF221 B, so s PCR na genomske DNA seva K7 pomnožili kratka specifična fragmenta (84 bp z začetnimi oligonukleotidi za acidocin LF221 A in 70 bp z začetnimi oligonukleotidi za acidocin LF221 B) in jima določili nukleotidno zaporedje. Ugotovili so popolno ujemanje z nukleotidnima zaporednjema odgovarjajočih regij za acidocina LF221 A in B seva LF221. To nas je spodbudilo, da smo se lotili nadalnjih raziskav bakteriocinskega kompleksa seva K7 in primerjave bakteriocinov obeh sevov - K7 in LF221.

### 3 MATERIAL IN METODE

Objekt našega proučevanja so bili bakteriocini dveh sevov vrste *L. gasseri* (K7 in LF221), za katere so v predhodnih raziskavah ugotovili, da izkazujeta osnovne probiotične lastnosti in tvorita bakteriocine s širokim protimikrobnim spektrom (Matijašić in sod., 1998; Matijašić in Rogelj, 2000; Rogelj in sod., 2002; Matijašić in sod., 2003; Matijašić in sod., 2006).

#### 3.1 POTEK POSKUSOV

Skladno s postavljenimi hipotezami (poglavlje 1.2) smo načrtovali potek poskusov doktorskega dela, ki je v grobem predstavljen na sliki 5. Najprej smo želeli ugotoviti, koliko in katere bakteriocine tvori sev K7 - okarakterizirali smo jih na nukleotidnem nivoju in uvrstili med podobne bakteriocine MKB (poglavlje 3.1.1, slika 6). V naslednjem koraku smo bakteriocine sevov K7 in LF221 poskušali heterologno izraziti v osmih izbranih sevih grampozitivnih in gramnegativnih bakterij (poglavlje 3.1.2, slika 7). V samostojnem poskusu smo spremljali tudi obstojnost seva K7 in tvorbo bakteriocinov v stresnih pogojih gojenja (poglavlje 3.1.3, slika 8).



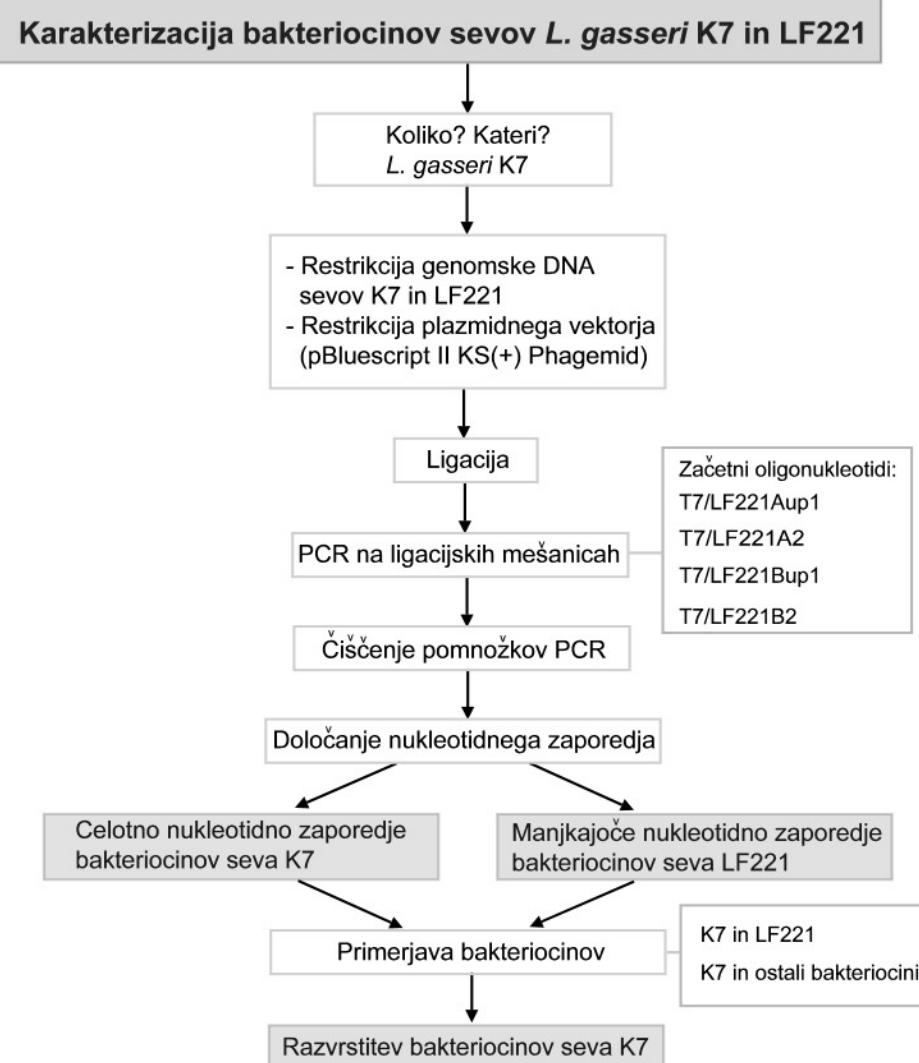
Slika 5: Potek poskusov v doktorski disertaciji.

Figure 5: Overview of the experiments in PhD thesis.

### 3.1.1 Določanje in analiza nukleotidnih zaporedij bakteriocinov sevov K7 in LF221

Potek karakterizacije bakteriocinov sevov K7 in LF221 je shematsko predstavljen na sliki 6. Matrična DNA za pomnoževanje kodirajočih regij bakteriocinov (genov za tvorbo gassericinov K7 A in K7 B ter acidocinov LF221 A in LF221 B) je bila genomska DNA sevov K7 in LF221. Nukleotidna zaporedja kodirajočih regij gassericinov K7 A in K7 B ter manjkajočih delov nukleotidnih zaporedij acidocinov LF221 A in LF221 B smo pridobili s kombinacijo PCR in tehnike pomikanja začetnih oligonukleotidov navzgor in navzdol od znanega nukleotidnega zaporedja. Najprej smo načrtovali začetna oligonukleotida "LF221Aup1" in "LF221Bup1", na N-terminalnem koncu že znanih nukleotidnih zaporedij acidocinov LF221 A in LF221 B (Čanžek Majhenič, 2002; Čanžek in sod., 2004). Genomsko DNA sevov K7 in LF221 smo v reakcijah enojnih restrikcij rezali z restriktazami *Cla*I, *Hind*III (lepljivi konci) in z *Rsa*I, *Hinc*II, *Ssp*I in *Dra*I (topi konci) ter ligirali v vektor pBluescript® II KS(+) Phagemid, ki smo ga rezali z ustrezno restriktazo (*Cla*I ali *Hind*III za ligacijo z lepljivimi konci in *Sma*I za ligacijo s topimi konci). Na ligacijskih mešanicah "rezan vektor pBluescript® II KS(+) Phagemid + rezana DNA K7 ali LF221" smo izvedli PCR s kombinacijo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za vektor in bakteriocin (T7/LF221Aup1 oziroma T7/LF221Bup1). Dobljene pomnožke smo pripravili za določanje nukleotidnega zaporedja in na podlagi pridobljenega nukleotidnega zaporedja načrtovali nov začetni oligonukleotid "LF221A2". Začetni oligonukleotid "LF221B2" pa smo načrtovali na osnovi ujemanja nukleotidnih zaporedij acidocina LF221 B in gassericina T (Kawai in sod., 2000; Čanžek Majhenič, 2002) in sicer dobrih 1000 nukleotidov višje ("upstream") od N-terminalnega konca že znanega nukleotidnega zaporedja acidocina LF221 B. Ponovno smo izvedli PCR na istih ligacijskih mešanicah, s kombinacijama začetnih oligonukleotidov: T7/LF221A2 in T7/LF221B2 ter dobljenim pomnožkom določili nukleotidna zaporedja.

Nukleotidna zaporedja kodirajočih regij gassericinov K7 A in K7 B ter acidocinov LF221 A in LF221 B smo analizirali in primerjali z že opisanimi bakteriocini v zbirkah, s programom BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Gassericina K7 A in K7 B smo uvrstili v že obstoječo skupino podobnih bakteriocinov.

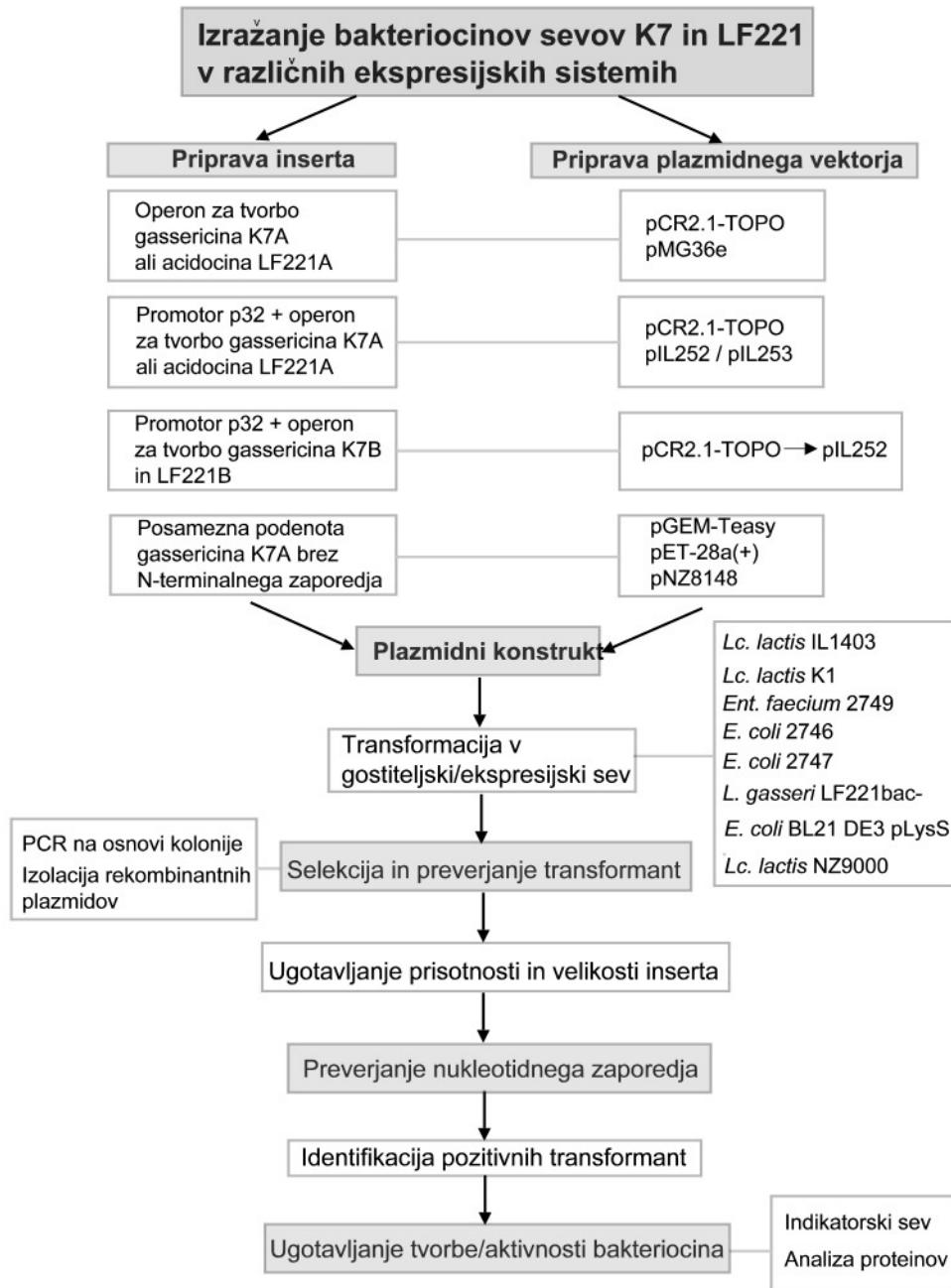


Slika 6: Karakterizacija bakteriocinov sevov K7 in LF221.

Figure 6: Characterization of the K7 and LF221 bacteriocins.

### **3.1.2 Izražanje bakteriocinov sevov K7 in LF221 v različnih ekspresijskih sistemih**

Bakteriocine sevov K7 in LF221 smo poskušali heterologno izraziti v osmih izbranih sevih grampozitivnih in gramnegativnih bakterij, da bi ugotovili prispevek posameznega bakteriocina k skupni protimikrobnii aktivnosti bakteriocinskega kompleksa seva K7 oziroma LF221. Za izražanje posameznih bakteriocinov smo pripravili več različnih plazmidnih konstruktov in jih transformirali v različne gostiteljske in ekspresijske seve (poglavlja 3.1.2.1 do 3.1.2.7). Pri transformantah, ki so vsebovale vstavljeni bakteriocinske gene s pravim nukleotidnim zaporedjem (pozitivne transformante), smo nadalje ugotavljali, ali je prišlo do želene tvorbe bakteriocinov. Tvorbo in aktivnost rekombinantnih proteinov smo preverjali s pomočjo indikatorskega seva *L. sakei* NCDO 2714, ki je občutljiv za bakteriocinska kompleksa sevov K7 in LF221 in/ali z analizo NaDS-PAGE. Na sliki 7 je shematsko prikazan potek poskusov heterolognega izražanja bakteriocinov sevov K7 in LF221.



Slika 7: Izražanje bakteriocinov sevov K7 in LF221 v različnih ekspresijskih sistemih.

Figure 7: Expression of the K7 and LF221 strains' bacteriocins.

### 3.1.2.1 Izražanje gassericina K7 A in acidocina LF221 A v sevu *Lc. lactis* IL1403

Sev *Lc. lactis* IL1403 pogosto uporabljajo za heterologno izražanje bakteriocinov MKB, zaradi genske stabilnosti in učinkovite kontrole izražanja. Zato smo ga tudi mi izbrali za heterologno tvorbo gassericina K7 A in acidocina LF221 A.

Genomsko DNA sevov K7 in LF221 smo rezali z restriktazo *HindIII* in ligirali v vektor pBluescript II KS(+) phagemid, rezan z isto restriktazo. Na ligacijskih mešanicah smo izvedli PCR s kombinacijo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za vektor in bakteriocin (T7/LF221A2). Očiščena pomnožka smo klonirali v vektor pCR®2.1-TOPO® in plazmidna konstrukta transformirali v celice *E. coli* TOP10. V izbranih transformantah smo preverili prisotnost plazmidnih konstruktov in vstavljenih insertov, ki smo jim določili tudi nukleotidna zaporedja. Nato smo izrezana inserta ligirali v vektor pMG36e in plazmidna konstrukta transformirali v celice *E. coli* TG1. Zopet smo preverili prisotnost in nukleotidno zaporedje vstavljenih insertov ter plazmidni konstrukt prenesli v sev *Lc. lactis* IL1403. V izbranih transformantah smo ugotavljali izražanje gassericina K7 A s pomočjo indikatorskega seva *L. sakei* 2714 (spot test s kolonijami).

Pripravili smo nova plazmidna konstrukta za izražanje gassericina K7 A in acidocina LF221 A. Na genomski DNA sevov K7 in LF221 smo s PCR (z začetnima oligonukleotidoma A-81down/858-left in DNA-polimerazo Platinum® Pfx) pomnožili operona za tvorbo gassericina K7 A oziroma acidocina LF221 A (struktturna gena za obe podenoti in gen za protein imunosti). Očiščene pomnožke PCR s topimi konci smo ligirali v vektor pMG36e, rezan z restriktazo *SmaI* in izvedli PCR na ligacijskih mešanicah z začetnima oligonukleotidoma pMG4/858-left. Na ta način smo operonu za tvorbo bakteriocina na 5' koncu dodali promotor p32, vektorja pMG36e. Očiščen pomnožek PCR smo klonirali v vektor pCR®2.1-TOPO® in konstrukt transformirali v celice *E. coli* TOP10. V izbranih transformantah smo preverili prisotnost insertov in preverjene plazmidne rezali z restriktazo *XbaI* ter jih ligirali v ekspresijska plazmidna vektorja pIL252 ("low copy") in pIL253 ("high copy"), rezana z *XbaI*. Posamezne ligacijske mešanice smo transformirali v celice *E. coli* TG1, preverili prisotnost in nukleotidno zaporedje insertov v plazmidnih konstruktih izbranih transformant ter jih prenesli v sev *Lc. lactis* IL1403. V izbranih transformantah smo preverjali izražanje gassericina K7 A z indikatorskim sevom *L. sakei* 2714 (spot testom s kolonijami; difuzijski test z brezceličnimi supernatanti, s skoncentriranimi in liofiliziranimi brezceličnimi supernatanti).

### 3.1.2.2 Izražanje gassericina K7 A v sevu *Lc. lactis* K1

Transformanto *Lc. lactis* IL1403 s plazmidnim konstruktom za tvorbo gassericina K7 A (promotor p32 in operon za tvorbo gassericina K7 A), ki je predstavljal akceptor, smo konjugirali s sevom *Lc. Lactis* K1, ki tvori laktkokcin A in je predstavljal donor (postopek

je opisan v poglavju 3.4.10). V izbranih transkonjugantah smo preverjali tvorbo laktkokcina A in gassericina K7 A s spot testi. Preverjena transformanta *Lc. lactis* IL1403, s plazmidnim konstruktom za tvorbo gassericina A (poglavlje 3.1.2.1), je predstavljala indikatorski sev za tvorbo laktkokcina A (saj je bila zanj občutljiva), sev *L. sakei* 2714, ki za laktkokcin A ni občutljiv, pa je predstavljal indikator za tvorbo gassericina K7 A, saj je občutljiv za bakteriocinski kompleks seva K7. V izbrani transkonjuganti *Lc. lactis* K1 smo preverili prisotnost in nukleotidno zaporedje vstavljenega fragmenta za tvorbo gassericina K7 A.

### 3.1.2.3 Izražanje gassericina K7 B in acidocina LF221 B v sevu *Lc. lactis* IL1403

Za izražanje gassericina K7 B in acidocina LF221 B v sevu *Lc. lactis* IL1403 smo pripravili podobna plazmidna konstrukta, kot za izražanje gassericina K7 A v istem sevu (poglavlje 3.1.2.1). Na genomski DNA sevov K7 in LF221 smo s PCR (z začetnima oligonukleotidoma BB-down/B-3226up in DNA-polimerazo Platinum® *Pfx*) pomnožili operona za tvorbo gassericina K7 B oziroma acidocina LF221 B (del gena za dodatni transportni protein, strukturalna gena za obe podenoti in gen za protein imunosti). Očiščene pomnožke PCR s topimi konci smo ligirali v vektor pMG36e, ki je prispeval promotor p32 na 5' koncu in nadaljevali s kloniranjem v plazmidni vektor pCR®2.1-TOPO® in transformacijo v celice *E. coli* TOP10. Izolirane plazmidne konstrukte smo ligirali s plazmidnim vektorjem pIL 252 in prenesli v sev *Lc. lactis* IL1403 (enako, kot je opisano za gassericin K7 A v poglavju 3.1.2.1). V izbranih transformantah smo preverjali izražanje gassericina K7 B in acidocina LF221 B z indikatorskim sevom *L. sakei* 2714 (spot test s kolonijami; difuzijski test z brezceličnimi supernatanti, s skoncentriranimi in liofiliziranimi brezceličnimi supernatanti).

### 3.1.2.4 Izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B v sevu *Ent. faecium* 2749

Zaradi poznanih transportnih in regulacijskih mehanizmov smo za heterologno izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B izbrali sev *Ent. faecium* 2749, ki tvori enterocina A in B. Plazmidne konstrukte z operoni za tvorbo gassericinov K7 A, K7 B ali acidocina LF221 B ter promotorjem p32, smo transformirali v sev *Ent. faecium* 2749 in v izbranih transformantah preverili prisotnost plazmidnih konstruktov in vstavljenih fragmentov (s PCR z začetnima oligonukleotidoma pMG4/858-left za gassericin K7 A, oziroma pMG4/B-3226up za gassericin K7 B in acidocin LF221 B). Določili smo še nukleotidno zaporedje rekombinantne DNA in v pozitivnih transformantah preverili izražanje bakteriocinov z indikatorskima sevoma *Ent. faecalis* 2708 in *L. sakei* 2714, ki sta občutljiva za enterocina A in B, ter z matičnim sevom K7, ki za enterocina A in B ni

občutljiv. Analizirali smo cone inhibicije rasti indikatorskih sevov v spot testih s kolonijami in difuzijskih testih z liofiliziranimi brezceličnimi supernatanti.

### 3.1.2.5 Izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B v sevih *E. coli* 2746 in *E. coli* 2747

Seva *E. coli* 2746 (divji tip) in *E. coli* 2747 sicer spadata med gramnegativne bakterije, vendar tvorita kocin V, ki je po svojih lastnostih in mehanizmih izločanja in procesiranja precej podoben bakteriocinom skupine II MKB. Zato smo plazmidne konstrukte za izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B (iste kot za izražanje v sevu *Ent. faecium* 2749), prenesli tudi v omenjena seva. Iz transformant *E. coli* 2747 smo izolirali plazmidne konstrukte za tvorbo posameznih bakteriocinov, preverili prisotnost insertov s PCR (z začetnima oligonukleotidoma pMG4/858-left za gassericin K7 A in pMG4/B-3226up za gassericin K7 B in acidocin LF221 B) in jim določili nukleotidna zaporedja. V pozitivnih transformantah smo preverili še tvorbo bakteriocinov z indikatorskim sevom *L. sakei* 2714, ki ni občutljiv za kolicin V, je pa občutljiv za bakteriocine sevov K7 in LF221 (spot test s kolonijami; difuzijski test z brezceličnimi supernatanti, ki smo jih tudi skoncentrirali z dializo in liofilizacijo).

### 3.1.2.6 Izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B v sevu *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup>

Za heterologno izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B smo izbrali tudi nebakteriocinogeno mutanto *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup>. Plazmidne konstrukte z operoni za tvorbo gassericinov K7 A, K7 B in acidocina LF221 B ter promotorjem p32, smo transformirali v sev *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup>. Iz izbranih transformant smo skušali izolirati plazmidne konstrukte, naredili pa smo tudi spot teste z indikatorskim sevom *L. sakei* 2714.

### 3.1.2.7 Inducibilno izražanje posameznih podenot gassericina K7 A brez N-terminalnih vodilnih zaporedij, v sevih *E. coli* BL21 DE3 pLysS, *Lc. lactis* IL1403 in NZ9000

Pripravili smo plazmidna konstrukta za inducibilno izražanje posameznih podenot gassericina K7 A v ekspresijskem sevu *E. coli* BL21 DE3 pLysS. Strukturna gena za komplementarno (GasK7a) in aktivno podeno (GasK7A), brez N-terminalnih vodilnih zaporedij, smo pomnožili s PCR (z DNA-polimerazo *Pfu*) na rekombinantnem plazmidnem konstraktu s preverjenim insertom za tvorba gassericina K7 A, ki smo ga pripravili za izražanje v sevu *Lc. lactis* IL1403 (poglavlje 3.1.2.1). Začetne oligonukleotide smo načrtovali na osnovi ugotovljenega nukleotidnega zaporedja gassericina K7 A in so vsebovali prepoznavna zaporedja za izbrane restriktaze. GasK7a smo pomnožili z začetnima oligonukleotidoma GA1-F-Nde/GA1-R-Xho, GasK7A pa z GA2-F-Nde/GA2-R-Xho. Očiščenim pomnožkom PCR smo dodali "A-repke" (poglavlje 3.4.5.4), zmes

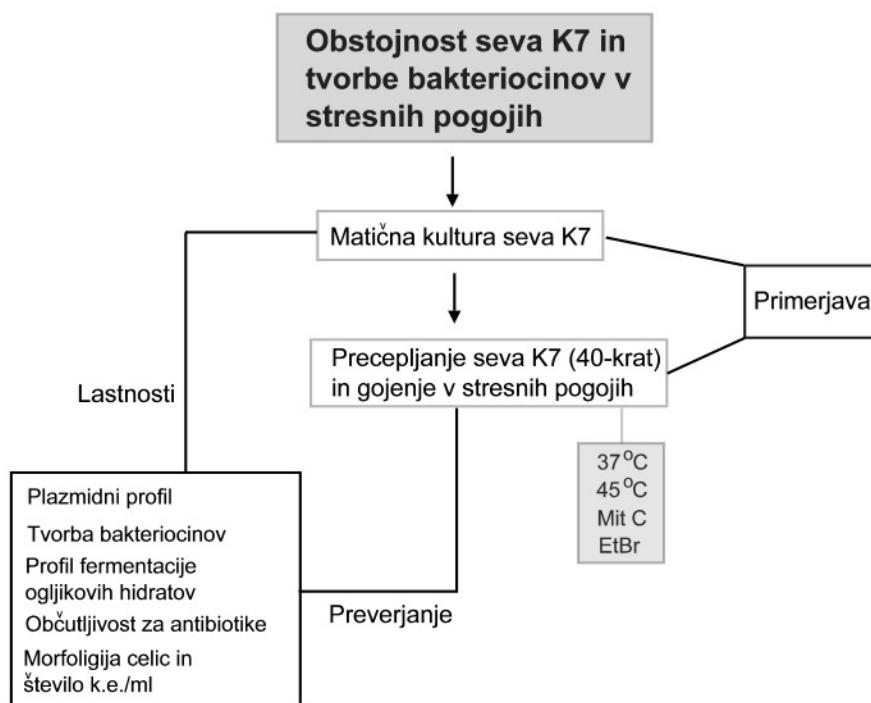
ligirali v PCR-klonirni vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy in transformirali v celice *E. coli* DH5α. V izbranih transformantah smo preverili prisotnost inserta s PCR na osnovi kolonije, z univerzalnima začetnima oligonukleotidoma za vektor (UniV/GemR). Iz 18-urnih kultur potencialno pozitivnih transformant (tistih, pri katerih smo dobili pomnožke PCR pričakovane velikosti) smo izolirali plazmidne konstrukte in določili nukleotidno zaporedje vstavljenih fragmentov za tvorbo GasK7a in GasK7A. Preverjena plazmidna konstrukta smo rezali z restriktazama *Nde*I in *Xho*I (za GasK7a) oziroma *Nde*I in *Eco*RI (za GasK7A), ligirali v ekspresijski vektor pET-28a(+) in transformirali v celice *E. coli* DH5α. V izbranih transformantah smo prisotnost inserta preverili s PCR na osnovi kolonije, z univerzalnima začetnima oligonukleotidoma za vektor pET-28a(+) (promT7/T7term). Iz 18-urnih kultur potencialno pozitivnih transformant smo izolirali rekombinantne plazmidne konstrukte, jih transformirali v ekspresijski sev *E. coli* BL21 DE3 pLysS in določili nukleotidno zaporedje vstavljenih fragmentov.

Podobno, kot za izražanje posameznih podenot gassericina K7 A v sevu *E. coli* BL21 DE3 pLysS, smo pripravili plazmidni konstrukt za inducibilno izražanje zrelega gassericina K7 A, s sistemom NICE, v ekspresijskem sevu *Lc. Lactis* NZ9000. S PCR smo pomnožili strukturna gena za GasK7a in GasK7A (z DNA-polimerazo *Pfu*, na preverjenem plazmidnem konstraktu za tvorbo gassericina K7 A, poglavje 3.1.2.1), brez N-terminalnih vodilnih zaporedij. GasK7a smo pomnožili z začetnima oligonukleotidoma GA1+2-F-Nco/GA1+2-R-Eco, GasK7A pa z GA1+2-F-Eco/GA1+2-R-Xba. Očiščena pomnožka PCR smo klonirali v PCR-klonirni vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy in transformirali v celice *E. coli* DH5α. Iz plazmidnih konstruktorjev izbranih transformant, s preverjenim nukleotidnim zaporedjem vstavljenih fragmentov, smo zopet pomnožili gena za GasK7a (z začetnima oligonukleotidoma GA1+2-F-Nco/GA1+2-R-Eco, z DNA-polimerazo *Pfu*) in GasK7A (z začetnima oligonukleotidoma GA1+2-F-Eco/GA1+2-R-Xba), ju očistili in rezali z restriktazo *Eco*RI. Rezani komponenti GasK7a in GasK7A smo ligirali skupaj, izvedli PCR na ligacijski mešanici z začetnima oligonukleotidoma GA1+2-F-Nco/GA1+2-R-Xba in očiščenim pomnožkom pričakovane velikosti določili nukleotidno zaporedje. Preverjenim očiščenim pomnožkom GasK7a+GasK7A smo dodali "A-repke", zmes ligirali v PCR-klonirni vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy in transformirali v celice *E. coli* DH5α. V izbranih transformantah smo ponovno preverili prisotnost inserta, s PCR na osnovi kolonije (z začetnima oligonukleotidoma UniV/Gem-R), izolirali rekombinantne plazmidne konstrukte in vstavljenim fragmentom določili nukleotidno zaporedje. Preverjen insert smo izrezali z restriktazama *Nco*I in *Xba*I, ligirali v ekspresijski vektor pNZ8148, ligacijsko mešanico oborili z etanolom in natrijevim acetatom, skoncentrirali na vakuumskem koncentratorju in jo transformirali v sev *Lc. Lactis* IL1403. V izbranih transformant smo prisotnost inserta preverili s PCR na osnovi kolonije, z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za vektor in insert (pMSP-uni/GA1+2-R-Xba). Iz potencialno pozitivnih transformant smo izolirali rekombinantne plazmidne konstrukte in jim določili nukleotidno

zaporedje. Plazmidni konstrukt s preverjenim insertom GasK7a+GasK7A in prazen plazmidni vektor pNZ8148 smo prenesli v ekspresijski sev *Lc. Lactis* NZ9000 in z 18-urnima kulturama izbranih transformant izvedli ekspresijo z indukcijo z nizinom (opisana v poglavju 3.4.16.1). Tvorbo zrelega gassericina K7 A smo ugotavljali v topnih in netopnih frakcijah celičnih lizatov induciranih in neinduciranih transformant. Aktivnost gassericina K7 A pa smo ugotavljali s pomočjo indikatorskega seva *L. sakei* 2747.

### 3.1.3 Obstojnost seva K7 v različnih stresnih pogojih

V poskusu smo skozi daljše časovno obdobje spremljali obstojnost seva K7 in sposobnost tvorbe bakteriocinov v različnih stresnih pogojih. Spremljali smo tudi plazmidni profil seva K7, preverili občutljivost seva za antibiotike (kloramfenikol, eritromicin, penicilin, rifampicin, tetraciklin, vankomicin) in določili profil fermentacije ogljikovih hidratov. Na sliki 8 je shematsko prikazan potek spremljanja obstojnosti seva K7 in tvorbe bakteriocinov v stresnih pogojih.



Slika 8: Obstojnost seva K7 in tvorbe bakteriocinov v stresnih pogojih.

Figure 8: Stability of the K7 strain and bacteriocin production under stress conditions.

### 3.1.3.1 Karakterizacija matične kulture seva K7

Zamrznjeno trajno kulturo *L. gasseri* K7 smo revitalizirali, preverili tvorbo in aktivnost bakteriocinov, prisotnost plazmida, določili število kolonijskih enot (k.e.), z barvanjem po Gramu preverili čistost kulture in morfologijo celic. Določili smo tudi profil fermentacije ogljikovih hidratov in preverili občutljivost za antibiotike.

### 3.1.3.2 Preverjanje obstojnosti lastnosti seva K7 v stresnih pogojih gojenja

Obstojnost lastnosti seva K7 (plazmidni profil, sposobnost tvorbe bakteriocinov, profil fermentacije ogljikovih hidratov, občutljivost za antibiotike, morfologijo in število celic) smo spremljali skozi 40 precepljanj pri različnih pogojih gojenja.

Preverjeno matično kulturo seva K7 smo nacepili v štirih paralelkah v tekoče gojišče MRS: prvo smo inkubirali pri 37 °C (K7/37 °C), drugo pri 45 °C (K7/45 °C), tretjo ob dodatku etidijevega bromida (30 µg/ml, inkubacija pri 37 °C: (K7/EtBr) in četrto ob dodatku mitomicina C (0,25 µg/ml, inkubacija pri 37 °C: (K7/mitC). Po 24-urni inkubaciji smo vse štiri kulture precepili v tekoče gojišče MRS (z dodatkom EtBr ali mitC) in jih ponovno inkubirali 24 h (pri 37 ali 45 °C). Vsako kulturo smo zaporedoma precepili 40-krat. Čistost posamezne kulture, morfologijo celic, število k.e. in tvorbo bakteriocinov smo preverjali vsakih deset precepljanj (poglavlji 3.4.12.1 in 3.4.13), vsakih petnajst precepljanj pa smo preverili prisotnost plazmidov (poglavlje 3.4.2.2), oziroma spremembo plazmidnega profila. Na koncu poskusa smo celicam iz vseh štirih kultur določili še profil fermentacije ogljikovih hidratov in občutljivost za antibiotike, na enak način kot matični kulturi seva K7 (poglavlji 3.4.14 in 3.4.15).

## 3.2 KEMIKALIJE IN OPREMA

Kemikalije, komercialni kompleti, gojišča, antibiotiki, encimi, začetni oligonukleotidi in laboratorijska oprema, ki smo jo uporabljali pri eksperimentalnem delu, so opisani v poglavjih 3.2.1 do 3.2.6.

### 3.2.1 Splošne kemikalije

- agarosa (Sigma, A-9539)
- 30-odstotni akrilamid/bis-akrilamid (Sigma, A-3574)
- 40-odstotni akrilamid/bis-akrilamid (Bio-Rad, 161-0148)
- amonijev acetat (Fluka BioChemika, 09688)
- amonijev sulfat (Fluka Chemika, 09980; Merck, 1.01217.1000)
- APS, amonijev persulfat (Bio-Rad, 161-0700; Gibco, 15523-012)
- biamonijev citrat (Merck, 1.01154.0500)
- bromfenol modro (Merck, 1.08122.0025; Serva, 15375)

- Coomasie Briliant Blue R-500 (Fluka, 27813)
- dikalijev hidrogen fosfat (Merck, 1.05101.1000)
- EDTA, etilendiaminotetraocetna kislina (Sigma, E-6635)
- etanol (Merck, 1.00983.2500)
- etidijev bromid (Sigma, E-1385)
- fenol (Sigma, P4557)
- glicerol (Merck 4094)
- glukoza (Kemika, 0705007)
- glicin (Sigma, G-8898; Merck, 1.04201.0250)
- izoamilni alkohol (Merck, 1.00978)
- izopropanol (Carlo Erba reagenti, 415154; Merck, 1.09634.1000)
- kloroform (Merck, 1.02445)
- klorovodikova kislina (Merck, 1.00317.1000)
- L-glutamin (Sigma, G-8540)
- IPTG, izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktosid (Sigma, I-6758)
- kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, 11123; Merck, 1.04873.0250)
- kalijev klorid (Merck, 1.04936)
- klorovodikova kislina (Merck, 1.00317)
- lizocim (Sigma, L-7651)
- magnezijev klorid heksahidrat (Merck, 1.05833)
- magnezijev sulfat (Merck, 5886.1000)
- manganov sulfat (Merck, 1.05941.0250)
- 2-merkaptoetanol (Sigma, M-7154)
- metanol (Merck, 1.06009)
- natrijev acetat (Merck, 1.06268.0250)
- NaDS, natrijev dodecil (lauril) sulfat (Sigma, L3771-25G)
- natrijev hidroksid (Merck, 1.06498)
- natrijev klorid (Merck, 1.06404)
- dinatrijev hidrogenfosfat (Merck, 1.06580)
- natrijev dihidrogenfosfat (Merck, 1.06346)
- nizin (Fluka, 72535)
- ocetna kislina (Fluka, 45731)
- PEG 8000; PEG 20000, polietilen glikol (Sigma, P-5413; Fluka, Chemika 81300)
- RNaza (Sigma, R-6513)
- saharoz (Kemika, 1800408)
- TEMED, N'N'N'N'-tetrametiletidiamin (Bio-Rad, 161-0800; Sigma, T-9281)
- TRIS, Trizma baza (Sigma, T-6066)

- Tween-80 (Biolife, 42120502)
- X-Gal, 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid (Promega, V3941)
- žveplova (VI) kislina ( Kemika, 18165, Merck, 1.09286)

### **3.2.2 Komercialni kompleti za izolacijo in čiščenje DNA**

S pomočjo navedenih komercialnih kompletov smo iz grampozitivnih in gramnegativnih bakterij izolirali genomsko in plazmidno DNA, ter jo čistili iz encimskih reakcijskih mešanic in agaroznih gelov.

#### **3.2.2.1 Kompleti za izolacijo genomske in plazmidne DNA**

Genomsko DNA smo iz sevov *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221 izolirali s pomočjo kompletov:

- Bacterial Genomic DNA Purification Kit (Edge BioSystems, 85171),
- Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120).

Plazmidno DNA smo iz transformant *E. coli*, laktobacilov, laktokokov in enterokokov izolirali s pomočjo kompletov:

- GenElute™ High Performance (HP) Plasmid Midiprep Kit (Sigma, NA0200-S),
- JETSTAR Plasmid Midiprep Kit (GENOMED, 210025),
- JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit (GENOMED, 400050),
- QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN; 27104),
- Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, A7100).

#### **3.2.2.2 Kompleti za čiščenje DNA iz agaroznega gela**

- JETQUICK Gel Extraction Spin Kit (GENOMED, 420050),
- QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, 28704),
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, A9280), komplet za ekstrakcijo in čiščenje DNA iz agaroznega gela in za čiščenje pomnožkov PCR neposredno iz reakcijske mešanice za PCR.

#### **3.2.2.3 Kompleti za čiščenje DNA neposredno iz reakcijskih mešanic za PCR**

- JETQUICK PCR Purification Spin Kit (GENOMED, 410050),
- QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, 28104), komplet za čiščenje fragmentov DNA neposredno iz reakcijskih mešanic PCR in drugih encimskih reakcij,
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, A9280), komplet za ekstrakcijo in čiščenje DNA iz agaroznega gela in za čiščenje pomnožkov PCR neposredno iz reakcijske mešanice za PCR.

### 3.2.2.4 Označevalci velikosti

Velikost pomnožkov PCR, izoliranih plazmidov in produktov DNA iz različnih encimskih reakcij, ter velikost proteinov v celičnih lizatih, smo določali s pomočjo primerjave s standardnimi označevalci velikosti:

- 1 Kb DNA ladder (GibcoBRL, 15615-016; Invitrogen, 15615-024; Fermentas, SM0318),
- 100 bp DNA ladder (Invitrogen, 15628-019),
- 100bp DNA ladder Plus (Fermentas, SM0321),
- Supercoiled DNA ladder (Invitrogen, 15622-012; Sigma, D 5292),
- Kaleidoscope Prestained Standard, proteinski standard za NaDS-PAGE (Bio-Rad, 161-0324).

### 3.2.3 Gojišča in antibiotiki

Uporabljali smo komercialna gojišča in gojišča, ki smo jih sestavili sami po standardnih recepturah (Sambrook in Russel, 2001). Pri poskusih heterolognega izražanja bakteriocinov smo gojiščem dodali antibiotike v ustreznih koncentracijah, glede na uporabljeno vrsto bakterije (preglednica 2).

#### 3.2.3.1 Gojišča

Vsa komercialna gojišča smo pripravili po navodilih proizvajalcev in jih avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Sestavljenim gojiščem smo pred avtoklaviranjem po potrebi umerili vrednost pH na priporočeno.

- Tekoče gojišče LB, Luria-Bertani - sestavljen, za en liter:
  - 10 g triptona (Biolife, 412290)
  - 5 g kvasnega ekstrakta (Biolife, 402275)
  - 10 g natrijevega klorida.
- Agar LB, Luria-Bertani - sestavljen gojišče, za en liter:
  - 10 g triptona
  - 5 g kvasnega ekstrakta
  - 10 g natrijevega klorida
  - 15 g bakteriološkega agarja (Biolife, 411030).
- Mehki agar LB: aseptično smo zmešali enaki količini steriliziranega tekočega gojišča in agarja LB.
- Agar Coli ID (bioMérieux, 42 017).

- Tekoče gojišče M 17, Terzaghi (Merck, 1.15029).
- Agar M 17, Terzaghi (Merck, 1.15108).
- Mehki agar M 17: aseptično smo zmešali enaki količini steriliziranega tekočega gojišča in agarja M 17.
- GM 17: gojišče M 17 (tekoče/agar) z 0,5-odstotno glukozo: osnovnemu gojišču M 17 smo aseptično dodali 40-odstotno glukozo do delovne koncentracije 0,5 %, ki smo jo predhodno sterilizirali preko 0,20 µm-skega filtra Minisart (Sartorius, 16534).
- SGM 17: tekoče gojišče M 17 z 0,5-odstotno glukozo in 0,5 M saharozo: osnovnemu gojišču M 17 smo aseptično dodali 40-odstotno glukozo do delovne koncentracije 0,5 % in 1 M saharozo do delovne koncentracije 0,5 M, ki smo ju predhodno sterilizirali preko 0,20 µm-skega filtra Minisart.
- Tekoče gojišče MRS po De Man, Rogosa, Sharpe (Merck 1.10661; Oxoid, CM359).
- Agar MRS po De Man, Rogosa, Sharpe (Merck 1.10660; Oxoid, CM0361B).
- Mehki agar MRS: aseptično smo zmešali enaki količini steriliziranega tekočega gojišča in agarja MRS.
- Agar MRS - modificirano sestavljeni gojišče, za en liter (vrednost pH 6,2-6,6):
  - 10 g mesnega ekstrakta (Biolife, 411125)
  - 5 g kvasnega ekstrakta
  - 2 g glukoze
  - 10 g bakteriološkega peptona (Biolife, 412259)
  - 2 g dikalijevega hidrogen fosfata
  - 5 g natrijevega acetata
  - 0,2 g magnezijevega sulfata
  - 0,05 manganovega sulfata
  - 2 g biamonijevega citrata
  - 1 ml Tween-a 80
  - 15 g bakteriološkega agarja.
- Tekoče gojišče MRSSM: tekoče gojišče MRS z dodatkom 0,5 M saharoze in 0,1 M magnezijevega klorida.

- SOC medij, za en liter (vrednost pH 7,0):
  - 20 g triptona
  - 5 g kvasnega ekstrakta
  - 0,5 g natrijevega klorida
  - 10 ml 250 mM kalijevega klorida.

Ohlajenemu steriliziranemu mediju smo dodali 20 ml/l sterilne 1 M glukoze, tik pred uporabo pa še 5 ml sterilnega 2 M magnezijevega klorida.

### 3.2.3.2 Antibiotiki

Antibiotik smo raztopili v destilirani vodi oziroma 96-odstotnemu etanolu, sterilizirali preko 0,20 µm-ski filter Minisart (Sartorius, 16534) in shranjevali pri -20 °C. Da smo dosegli želeno delovno koncentracijo antibiotika v gojišču, smo steriliziranemu gojišču aseptično dodali ustrezno količino založne raztopine antibiotika. V preglednici 2 so zbrani antibiotiki, ki smo jih uporabljali kot selekcijske faktorje pri izbiri transformant različnih vrst bakterij in pri ugotavljanju stabilnosti tvorbe bakteriocinov seva K7.

Preglednica 2: **Uporabljeni antibiotiki in delovne koncentracije za posamezne vrste bakterij**

Table 2: **Antibiotics and applied concentration used for different bacteria**

Antibiotik (proizvajalec)	Založna koncentracija	Delovna koncentracija	Vrsta bakterije
Ampicilin (Sigma, A-9393)	100 mg/ml, v vodi	100 µg/ml	<i>E. coli</i>
Eritromicin (Fluka BioChemika, 45673)	100 mg/ml, v etanolu; 10 mg/ml, v etanolu	150 µg/ml 20 µg/ml 10 µg/ml 1 µg/ml	<i>E. coli</i> <i>Ent. faecium</i> <i>Lc. lactis</i> <i>L. gasseri</i>
Kanamicin (Sigma, K-4000)	50 mg/ml, v vodi	50 µg/ml	<i>E. coli</i>
Kloramfenikol (Fluka BioChemika, 23275)	34 mg/ml, v etanolu	170 µg/ml 34 µg/ml 20 µg/ml 10 µg/ml	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>Lc. lactis</i>
Mitomicin (Sigma, 69824)	200 µg/ml, v vodi	0,25 µg/ml	<i>L. gasseri</i>

### 3.2.4 Encimi

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali različne restrikcijske endonukleaze (poglavlje 3.2.4.1, preglednica 3), DNA-polimeraze in nekatere druge encime (poglavlje 3.2.4.2).

#### 3.2.4.1 Restrikcijske endonukleaze

Restrikcijske endonukleaze (restriktaze) smo uporabljali v reakcijah restrikcije molekul DNA (genomske in plazmidne) oziroma njenih pomnožkov. Restrikcija je potekala 2h pri 37 °C, razen pri restriktazah *Sma*I in *Ssp*I, kjer je bila temperatura inkubacije 30 °C. Za tem smo restriktaze inaktivirali s toploto (20-minutna inkubacija pri 65 °C za vse uporabljene restriktaze, razen za *Bam*HI in *Pst*I, ki smo ju inaktivirali pri 80 °C). V preglednici 3 so po abecednem redu zbrane vse restriktaze, ki smo jih uporabljali v poskusih.

#### 3.2.4.2 Ostali encimi

Za pomnoževanje specifičnih fragmentov na genomski in plazmidni DNA smo uporabljali spodaj naštete polimeraze, v reakcijah ligacije smo uporabljali T4 DNA-ligazo, za defosforilacijo rezanih plazmidnih vektorjev pa bakterijsko alkalno fosfatazo.

- BAP, bakterijska alkalna fosfataza (Bacterial Alkaline Phosphatase; GibcoBRL, 18011-015)
- CIP, telečja intestinalna alkalna fosfataza (Calf Intestine Alkaline Phosphatase; Fermentas, EF0341; Finnzymes, F-201S)
- *Pfu* DNA-polimeraza (Promega, M7741)
- Phusion™ High-Fidelity DNA-polimeraza (Finnzymes, F-530S)
- Platinum® *Pfx* DNA-polimeraza (Invitrogen, 11708-021)
- Pwo DNA-polimeraza (Roche, 1 644 947)
- T4 DNA-polimeraza (Promega, M421A; NEB - New England BioLabs, M0203S)
- *Taq* DNA-polimeraza (Fermentas, EP0282; GibcoBRL, 18038-042; Promega, M1661; Roche, 1 146 165)
- T4 DNA-ligaza (Boehringer Mannheim, 481 220; Fermentas, EL0015; GibcoBRL, 15224-017; NEB, M0202S).

Preglednica 3: **Uporabljene restriktivne endonukleaze (restriktaze)**

Table 3: **Used restriction endonucleases (restrictases)**

Restriktaza	Pripadajoči pufer	Proizvajalec	Restriktivno mesto
<i>BamHI</i>	B Unique	Roche (220 612) Fermentas (ER0051)	5'...G <sup>↓</sup> GATCC...3' 3'...CCTAG <sub>↑</sub> G...5'
<i>ClaI</i> (= <i>Bsu15I</i> )	Y <sup>+</sup> /Tango	Fermentas (ER0141)	5'...AT <sup>↓</sup> CGAT...3' 3'...TAGC <sub>↑</sub> TA...5'
<i>DraI</i>	B <sup>+</sup>	Fermentas (ER0221)	5'...TTT <sup>↓</sup> AAA...3' 3'...AAA <sub>↑</sub> TTT...5'
<i>EcoRI</i>	O <sup>+</sup>	Fermentas (ER0271)	5'...G <sup>↓</sup> AATTC...3' 3'...CTTAA <sub>↑</sub> G...5'
<i>HincII</i> (= <i>HindII</i> )	Y <sup>+</sup> /Tango	Fermentas (ER0491)	5'...GTPy <sup>↓</sup> PuAC...3' 3'...CAPu <sub>↑</sub> PyTG...5'
<i>HindIII</i>	B R <sup>+</sup>	Roche (656 313) Fermentas (ER0501)	5'...A <sup>↓</sup> AGCTT...3' 3'...TTCGA <sub>↑</sub> A...5'
<i>NcoI</i>	Y <sup>+</sup> /Tango	Fermentas (ER0571)	5'...C <sup>↓</sup> CATGG...3' 3'...GGTAC <sub>↑</sub> C...5'
<i>NdeI</i>	O <sup>+</sup>	Fermentas (ER0581)	5'...CA <sup>↓</sup> TATG...3' 3'...GTAT <sub>↑</sub> AC...5'
<i>PstI</i>	O <sup>+</sup>	Fermentas (ER0611)	5'...CTGCA <sup>↓</sup> G...3' 3'...G <sub>↑</sub> ACGTC...5'
<i>RsaI</i>	Y <sup>+</sup> /Tango	Fermentas (ER1121)	5'...GT <sup>↓</sup> AC...3' 3'...CA <sub>↑</sub> TG...5'
<i>SmaI</i>	Y <sup>+</sup> /Tango	Fermentas (ER0661)	5'...CCC <sup>↓</sup> GGG...3' 3'...GGG <sub>↑</sub> CCC...5'
<i>SspI</i>	G Y <sup>+</sup> /Tango	Fermentas (ER0771)	5'... AAT <sup>↓</sup> ATT ...3' 3'... TTA <sub>↑</sub> TAA ...5'
<i>XbaI</i>	Y <sup>+</sup> /Tango	Fermentas (ER0681)	5'...T <sup>↓</sup> CTAGA...3' 3'...AGATC <sub>↑</sub> T...5'
<i>XhoI</i>	R <sup>+</sup>	Fermentas (ER0691)	5'...C <sup>↓</sup> TCGAG...3' 3'...GAGCT <sub>↑</sub> C...5'

### 3.2.5 Začetni oligonukleotidi

Začetne oligonukleotide smo načrtovali sami, na osnovi že znanega oziroma naknadno ugotovljenega nukleotidnega zaporedja (preglednici 4 in 5). Za pomnoževanje insertov iz plazmidnih vektorjev pa smo uporabljali standardne začetne oligonukleotide, ki so zbrani v preglednici 6. Založne raztopine uporabljenih začetnih oligonukleotidov smo pripravili in shranjevali po navodilih proizvajalca (Invitrogen).

Preglednica 4: **Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje genov gassericinov K7 A in K7 B ter acidocinov LF221 A in LF221 B**

Table 4: **Primers for amplification of gassericins' K7A and K7 B and acidocins' LF221 A and LF221 B genes**

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Lastnosti	Tarčna DNA
A-81 down	GCTAAATTAGTCACTTTCC	<sup>1</sup> F	
858-left	GCTGCCTACAGTCAATTAGA	<sup>2</sup> R	
BojA	TGGCGGATCAGTACAATGTG	F	Operon gassericina K7 A; operon acidocina LF221 A
LF221Aup1	TCTTCCACCTCCAGCTAACCA	R	
LF221A2	CTTCGTACTAAGATGAAGTTCGACCTT	R	
LF221Bup1	ACAACCGTTGGTTCAACACG	R	
B-3226up	GGAGAAAGTAGAAAAAGCAC	R	Operon gassericina K7 B; operon acidocina LF221 B
LF221B2	GAGTGCTGTCTGTAAACTCTCAGTC	R	
BBdown	GTCTCTTCGGTTGGCGTTGT	F	

<sup>1</sup>F..... "forward", začetni oligonukleotid, ki se na matrično DNA prilega v smeri 5'→3'

<sup>2</sup>R..... "reverse", začetni oligonukleotid, ki se na matrično DNA prilega v smeri 3'→5'

Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje strukturnih genov za posamezne podenote gassericina K7 A in acidocina LF221 A brez vodilnih zaporedij, z dodanimi restrikcijskimi mesti

Table 5: Primers with added specific restriction sites for amplification of structural genes of gassericin K7 A and acidocin LF221 subcomponents, without leading sequence

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Lastnosti	Tarčna DNA
GA1-F-Nde	TAACC <u>CATATGAAAAATTGGTGAGTTGCAAAG</u>	F, <i>Nde</i> I	
GA1-R-Xho	ACTT <u>CTCGAGTTATCTTCCACCTCCAG</u>	R, <i>Xho</i> I	Komplementarna podenota gassericina K7 A
GA1+2-F-Nco	TTAAC <u>CCATGGGAAAAATTGGTCAGTTGCAAAG</u>	F, <i>Nco</i> I	
GA1+2-R-Eco	ACTT <u>GAAATTCTTATCTTCCACCTCCAGC</u>	R, <i>Eco</i> RI	
GA2-F-Nde	TTC <u>CACATATGAACAAACGTAAATTGGGG</u>	F, <i>Nde</i> I	
GA2-R-Xho	TATT <u>CTCGAGCCCCGTATATACTATCTC</u>	R, <i>Xho</i> I	Aktivna podenota gassericina K7 A
GA1+2-F-Eco	ACA <u>AGAATTCAACAAACGTAAATTGGGGTAG</u>	F, <i>Eco</i> RI	
GA1+2-R-Xba	TATT <u>TCTAGACCCGTATATACTATCTC</u>	R, <i>Xba</i> I	

<sup>1</sup>F....."forward", začetni oligonukleotid, ki se na matrično DNA prilega v smeri 5'→3'

<sup>2</sup>R....."reverse", začetni oligonukleotid, ki se na matrično DNA prilega v smeri 3'→5'

\_\_\_\_\_restrikcijsko mesto

**Preglednica 6: Univerzalni začetni oligonukleotidi s prijemališči na klonirnih in ekspresijskih plazmidnih vektorjih**

Table 6: Universal primers of cloning and expression vectors

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Lastnosti	Tarčna DNA
pMG4	ATGGGTCGATCGAATTCTGGTC	<sup>1</sup> F	pMG36e
pMGSr	GTACAACCGGTACTAGCGACA	<sup>2</sup> R	
T7 (promT7)	AATACGACTCACTATAG	F	pBluescript® II; pCR®2.1-TOPO®; SK(+) phagemid;
T7term	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	R	pET-28a(+)
pMSP-uni	GTTAGATACAATGATTTCG	F	pNZ8148
M13	TGTAAAACGACGGCCAG	F	
M13r	CAGGAAACAGCTATGACC	R	pGEM®-T Easy
UniV	GTAAAACGACGCCAGT	F	
GemR	TACTCAAGCTATGCATCCAAC	R	

<sup>1</sup>F..... "forward", začetni oligonukleotid, ki se na matrično DNA prilega v smeri 5'→3'

<sup>2</sup>R..... "reverse", začetni oligonukleotid, ki se na matrično DNA prilega v smeri 3'→5'

### 3.2.6 Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema oziroma aparature (ter njihovi proizvajalci), ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu, so naštete po abecednem redu:

- avtoklav A-21 CA (Kambič)
- centrifuge mikrocentrifuga 5415 C (Eppendorf); mikro 22R (Hettich zentrifugen)
- digestorij Modelle 80 (Waldner)
- elektroforezni sistemi: Sub-Cell (Bio-Rad) za 2D agarozno gelsko elektroforezo; MiniProtean II (Bio-Rad) za NaDS-PAGE

- inkubatorji BT150 (Marijan Krokter); BTE-S Termo-medicinski aparati; Certomat HK (Braun Biotech); G25 New Brunswick Scientific; Sutjeska (Fabrika medicinskih uređaja i instrumenata, Beograd)
- mikroskop fazno-kontrastni (TOPIC-T, Ceti)
- mikrovalovna pećica 32 L (Bosch)
- naprava za PCR MyCycler (Bio-Rad, 10682); Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems)
- naprava za elektroporacijo Gene Pulser® (Bio-Rad)
- pH-meter MP220 (Mettler Toledo)
- sonifikator Sonifier W-450 (Branson)
- spektrofotometer 6505 UV/Vis Spectrophotometer (Jenway)
- tehtnice MM-541 (Tehnica Železniki)
- transiluminator Bio-Rad; Cole-Palmer 9184
- vakuumski koncentrator Speedvac (Savant)
- vakuumski sušilnik Eppendorf
- vodna kopel 0925095 MK (Marijan Krokter)
- zaščitna mikrobiološka komora M12 (Iskra PIO).

### 3.3 BAKTERIJSKI SEVI IN PLAZMIDI

Proučevana seva in sevi, ki smo jih uporabljali v poskusih heterolognega izražanja bakteriocinov, so zbrani v preglednici 7. Seve smo shranjevali v ustreznem gojišču z 20-odstotnim glicerolom, v tekočem dušiku oziroma pri -80 °C. V preglednici 8 pa so zbrani plazmidni vektorji.

### 3.3.1 Bakterijski sevi in pogoji gojenja

Seve rodu *Lactobacillus* smo gojili v tekočem ali na trdnem gojišču MRS pri temperaturi 37 °C (*L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221 in *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup>) oziroma 30 °C (*L. sakei* NCDO 2714). Za poskuse smo običajno uporabljali sveže 18-urne kulture z 1/10 (v/v) inokulumom.

- *L. gasseri* K7 je bil izoliran iz blata dojenčka na Katedri za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer je tudi shranjen. Sev *L. gasseri* LF221 (prej *L. acidophilus* LF221) pa so izolirali iz blata dojenčka na Inštitutu za mikrobiologijo Fakultete za agronomijo Katoliške univerze v Piacenzi v Italiji (Matijašić in Rogelj, 1997). Shranjen je v Zbirki industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za mlekarstvo pod številko ZIM BI50. Human izvor, tvorba bakteriocinov s širokim protimikrobnim spektrom, odpornost proti nizkim vrednostim pH in žolčnim solem, preživetje prehoda in naselitev prebavnega trakta poskusnih živali ter dobre *in vitro* sposobnosti vezave na celice Caco-2 promovirajo seva K7 in LF221 med probiotične seve (Matijašić in sod., 1998; Matijašić in sod, 1999).
- Pri enem od poskusov smo uporabili tudi mutanto seva LF221, ki ne tvori bakteriocinov: *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup> (LF221 bac<sup>-</sup>).
- *L. sakei* NCDO 2714 je shranjen v angleški zbirki organizmov iz mlečnih izdelkov (National Collection of Dairy Organisms, National Institute for Dairying, Reading, Velika Britanija). Uporabljali smo ga kot indikatorski sev za ugotavljanje tvorbe bakteriocinov, saj je zelo občutljiv za bakteriocinska kompleksa sevov K7 in LF221.

Seve vrst *Escherichia coli* (*E. coli*), *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*) in rodu *Enterococcus* (*Ent. faecium* in *Ent. faecalis*) smo uporabljali kot gostiteljske oziroma ekspresijske seve v poskusih kloniranja in izražanja bakteriocinov sevov K7 in LF221. Bakterije vrste *E. coli* smo gojili v tekočem ali na trdnem gojišču LB, ob stresanju 200 vrt./min, pri 37 °C; bakterije laktokokov in enterokokov smo gojili v tekočem ali na trdnem gojišču M 17 oziroma GM 17, pri 30°C. V gojišče smo dodali selekcijske faktorje - antibiotike, katerih vrsta in koncentracija je bila odvisna od uporabljenega plazmidnega vektorja (preglednici 2 in 8).

**Preglednica 7: Bakterijski sevi in njihove lastnosti**

**Table 7: Bacterial strains with relevant features**

Bakterijski sev	Lastnosti	Vir/proizvajalec
<i>Lactobacillus gasseri</i> K7	Izolat iz blata dojenčka s širokospetralnim bakteriocinskim kompleksom	Matijašić in sod., 1998
<i>Lactobacillus gasseri</i> LF221	Izolat iz blata dojenčka, tvori acidocina LF221 A in LF221 B	Matijašić in Rogelj, 1997
<i>Lactobacillus gasseri</i> LF221 bac <sup>-</sup>	Nebakteriocinogena mutanta seva LF221	Matijašić in Rogelj, 1997
<i>Lactobacillus sakei</i> NCDO 2714	Indikatorski sev, občutljiv za bakteriocinska kompleksa sevov K7 in LF221	zbirka NCDO <sup>1</sup>
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Klonirni gostiteljski sev, brez plazmidov	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Klonirni gostiteljski sev, brez plazmidov	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> TG1	Klonirni gostiteljski sev, brez plazmidov	LMGT <sup>3</sup>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 14763 ( <i>E. coli</i> 2746)	Divji tip, tvori kolicin V (colV)	zbirka ATCC <sup>2</sup>
<i>Escherichia coli</i> pHK22 colV ( <i>E. coli</i> 2747)	Tvori colV, vsebuje plazmid (9,4 kb)	Gilson in sod., 1987
<i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 pLysS	Gostiteljski sev, vsebuje plazmid za tvorbo LysS	Novagen
<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	Brez plazmida	Chopin in sod., 1984
<i>Lactococcus lactis</i> 2130	Tvori laktokokcin A (LcnA)	LMGT <sup>3</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> K1	Vsebuje plazmid (50 kb), tvori LcnA	LMGT <sup>3</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> NZ 9000	MG1363 <i>pepN::nisRK</i>	Kuipers in sod., 1998
<i>Enterococcus faecalis</i> LMGT 2708	Občutljiv za enterocina A in B	LMGT <sup>3</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LMGT 2749	Tvori enterocin A in enterocin B	LMGT <sup>3</sup>

<sup>1</sup>NCDO.....National Collection of Dairy Organisms, National Institute for Dairying, Reading, Velika Britanija

<sup>2</sup>ATCC.....American Type Culture Collection

<sup>3</sup>LMGT.....Laboratory of Microbial Gene Technology, Agricultural University of Norway

### 3.3.2 Plazmidni vektorji in njihove lastnosti

Pomnožke oziroma rezane fragmente DNA smo vstavljeni v različne klonirne in ekspresijske plazmidne vektorje, katerih osnovne lastnosti so zbrane v preglednici 8. Na slikah 9-15 pa so uporabljeni plazmidni vektorji še shematsko prikazani.

**Preglednica 8: Klonirni in ekspresijski plazmidni vektorji in njihove lastnosti**

**Table 8: Cloning and expression vectors with relevant features**

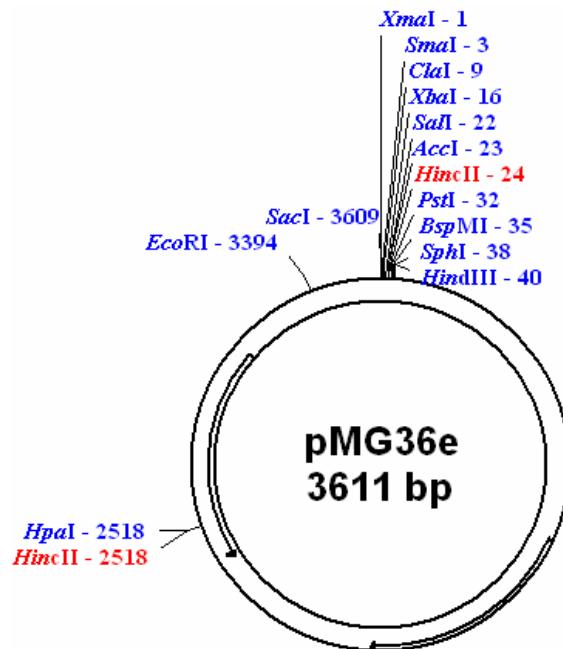
Vektor	Velikost in lastnosti	Vir/proizvajalec
pMG36e	Ekspresijski prenosljivi, p32, <sup>1</sup> Em <sup>r</sup> , 3611 bp	van de Guchte in sod., 1989
pBluescript® II KS+ phagemid	Klonirni, <sup>2</sup> Amp <sup>r</sup> , 2960 bp	Stratagene
pCR®2.1-TOPO®	PCR-klonirni, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , 3900 bp	Invitrogen
pIL252	Ekspresijski za <i>Lc. lactis</i> , low copy, Em <sup>r</sup> , 4698 bp	Simon in Chopin, 1988
pIL253	Ekspresijski za <i>Lc. lactis</i> , high copy, Em <sup>r</sup> , 4963 bp	Simon in Chopin, 1988
pGEM®-T Easy	PCR-klonirni, Amp <sup>r</sup> , 3015 bp	Promega
pET-28a(+)	Ekspresijski za <i>E. coli</i> , Kan <sup>r</sup> , 5369 bp	Novagen
pNZ8148	Inducibilni ekspresijski za <i>Lc. lactis</i> , Cam <sup>r</sup> , 3208 bp	Mierau in Kleerebezem, 2005

<sup>1</sup>Em<sup>r</sup>....."eritromycin resistance", gen za odpornost proti eritromicinu

<sup>2</sup>Amp<sup>r</sup>....."ampicillin resistance", gen za odpornost proti ampicilinu

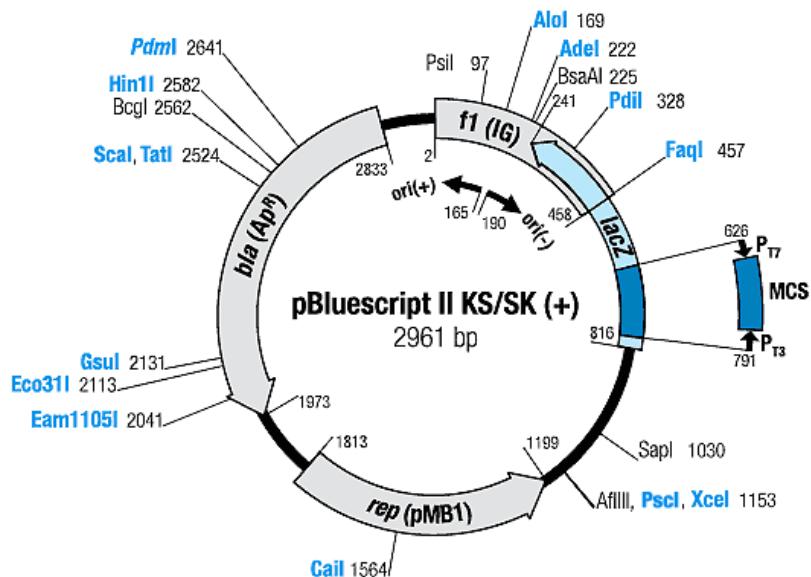
<sup>3</sup>Kan<sup>r</sup>....."kanamycin resistance", gen za odpornost proti kanamicinu

<sup>4</sup>Cam<sup>r</sup>....."chloramphenicol resistance", gen za odpornost proti kloramfenikolu



Slika 9: Shematski prikaz plazmidnega vektorja pMG36e.

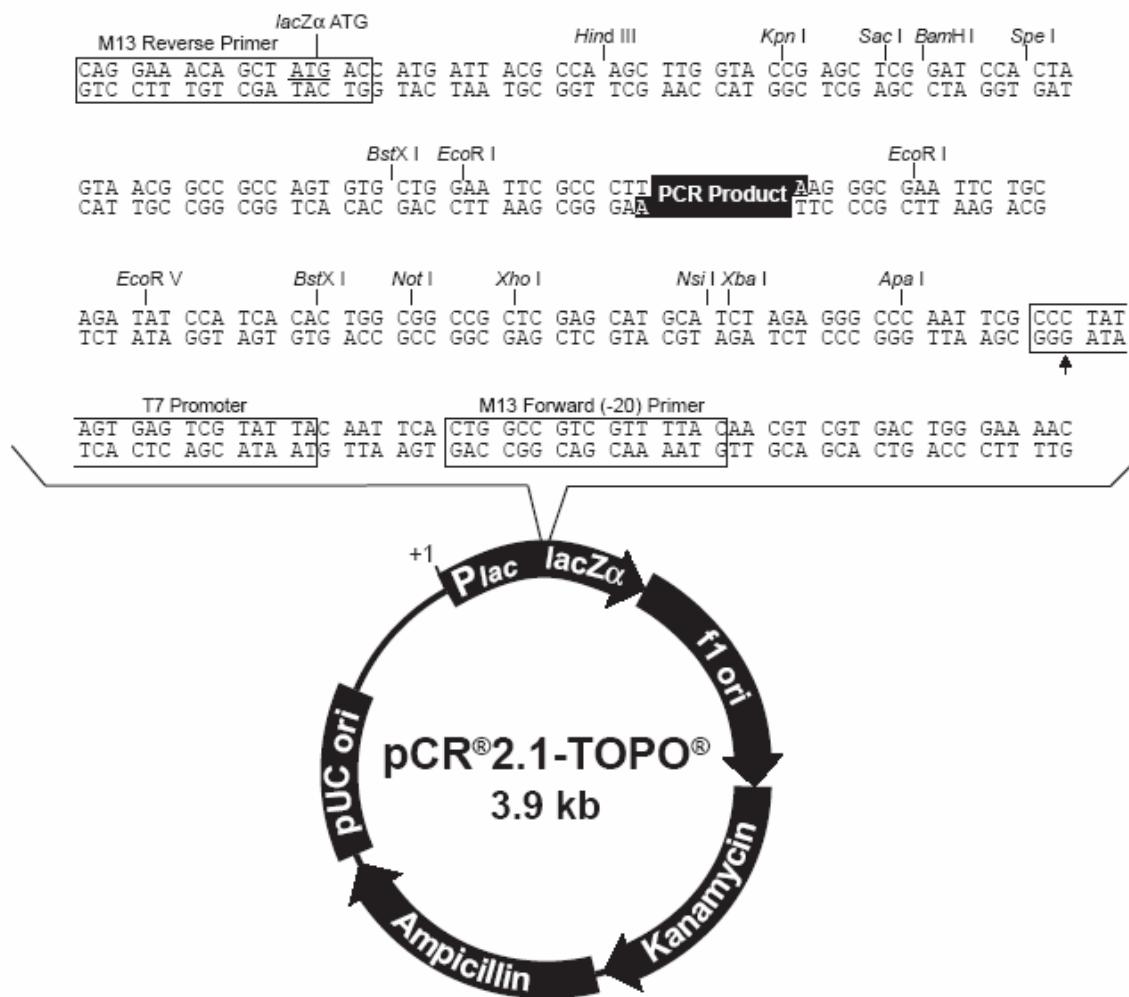
Figure 9: Plasmid vector pMG36e.



Slika 10: Shematski prikaz plazmidnega vektorja pBluescript II KS(+) phagemid.

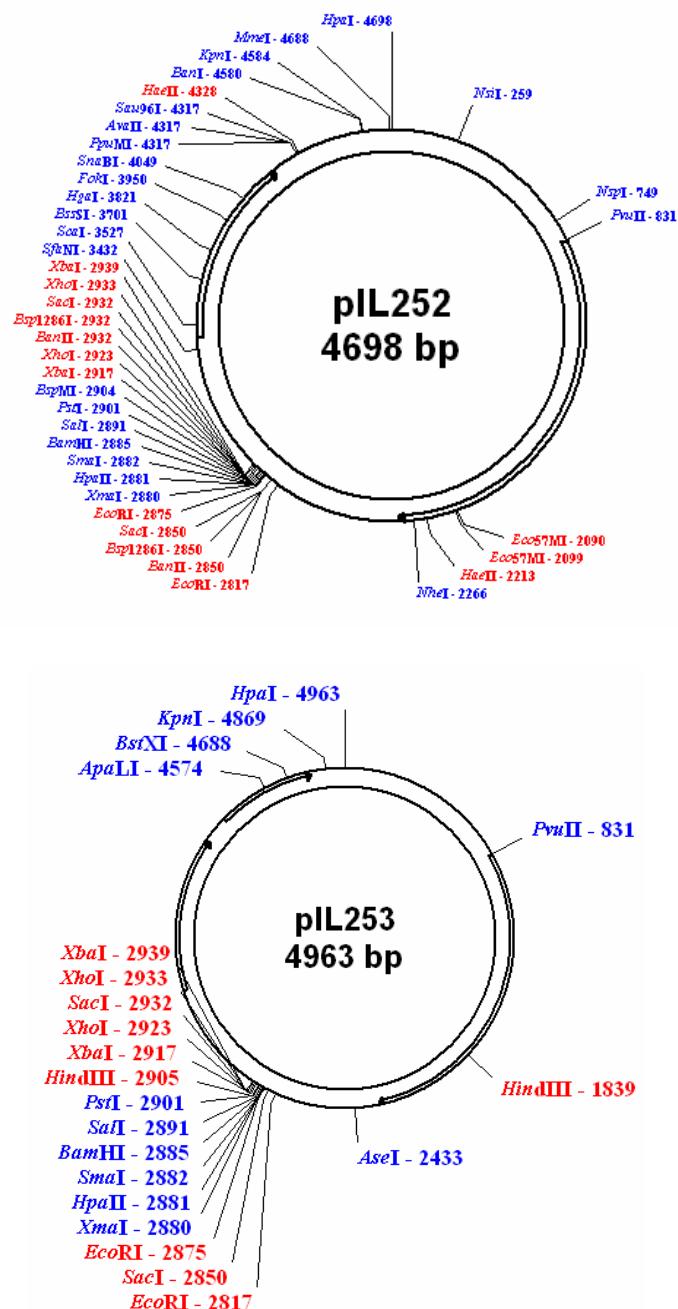
(<http://www.fermentas.com>)

Figure 10: Plasmid vector pBluescript II KS(+) phagemid.



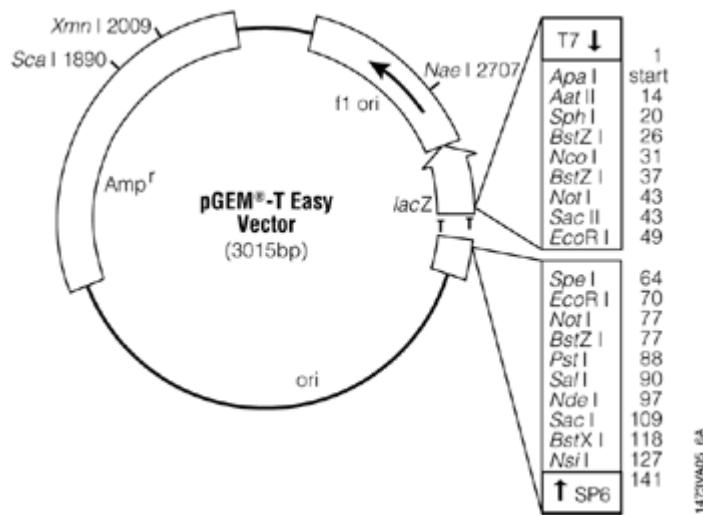
Slika 11: Shematski prikaz PCR-klonirnega plazmidnega vektorja pCR®2.1-TOPO®.  
[\(<http://www.invitrogen.com>\)](http://www.invitrogen.com)

Figure 11: PCR-cloning vector pCR®2.1-TOPO®.



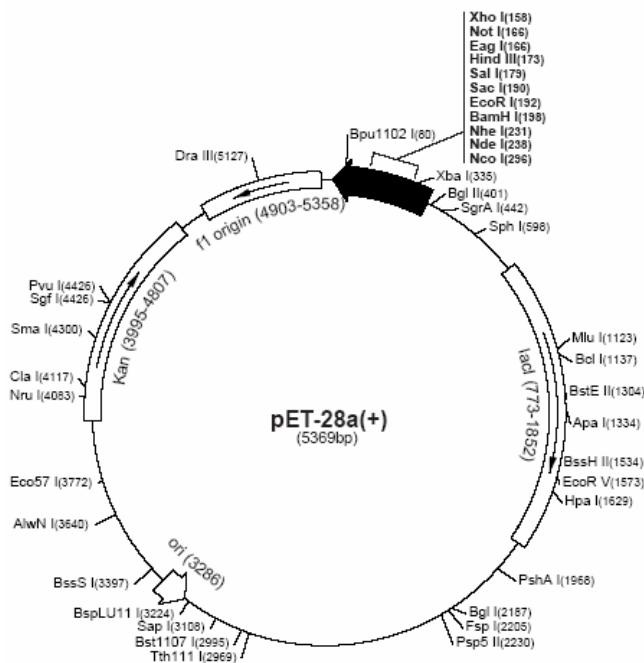
Slika 12: Shematski prikaz ekspresijskih plazmidnih vektorjev pIL252 in pIL253.

Figure 12: Expression vectors pIL252 and pIL253.



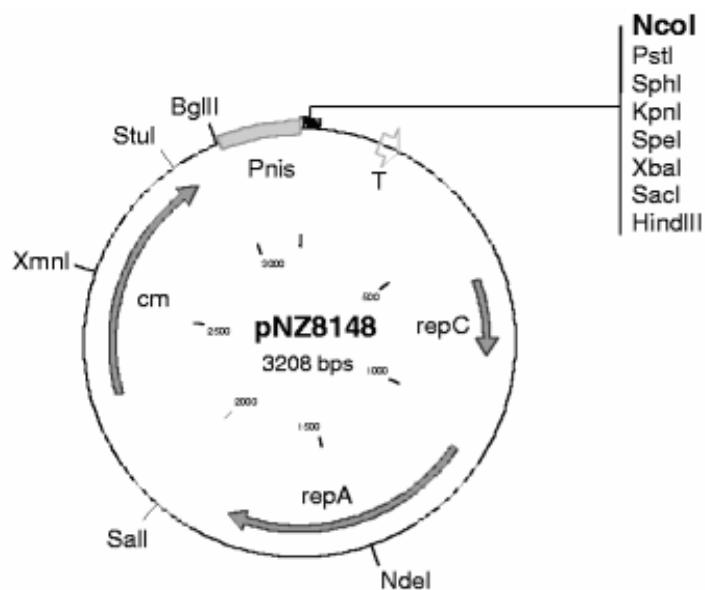
Slika 13: Shematski prikaz PCR-klonirnega plazmidnega vektorja pGEM®-T Easy.  
(<http://www.promega.com>)

Figure 13: Cloning vector pGEM®-T Easy.



Slika 14: Shematski prikaz inducibilnega ekspresijskega vektorja pET-28a(+).

Figure 14: Inducible expression vector pET-28a(+).  
(<http://www.emdbiosciences.com>)



Slika 15: Shematski prikaz inducibilnega ekspresijskega vektorja pNZ8148 (Miera u in Kleerebezem, 2005).

Figure 15: Inducible expression vector pNZ8148.

### 3.4 METODE

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali standardne molekularno-biološke in mikrobiološke tehnike in postopke (Sambrook in Russell, 2001) in različne komercialne komplete, ki so opisani v poglavju 3.2.2.

#### 3.4.1 Izolacija genomske DNA

Genomsko DNA smo iz sevov K7 in LF221 izolirali iz 18-urnih kultur, s pomočjo komercialnih kompletov "Bacterial Genomic DNA Purification Kit" in "Wizard® Genomic DNA Purification Kit" (Protokol za izolacijo genomske DNA iz grampozitivnih in gramnegativnih bakterij). Pri postopkih izolacije smo se držali originalnih navodil proizvajalca (Schoenfeld, 1995).

#### 3.4.2 Izolacija plazmidne DNA

Plazmidno DNA smo izolirali iz 18-urnih kultur sevov in transformant, za katere smo predvidevali, da vsebujejo plazmide oziroma vstavljenе plazmidne konstrukte. Ker univerzalnega postopka za izolacijo plazmidne DNA iz grampozitivnih bakterij ni, smo za vsako vrsto bakterij uporabili modificiran postopek alkalne lize (Sambrook in Russell,

2001) v kombinaciji s katerim od kompletov za izolacijo plazmidne DNA iz bakterij *E. coli*.

#### 3.4.2.1 Izolacija plazmidne DNA iz bakterij *E. coli*

Iz 18-urnih kultur transformant *E. coli* smo plazmidno DNA izolirali s pomočjo komercialnih kompletov "JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit", "QIAprep Spin Miniprep Kit" in "Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System". Plazmide smo izolirali po originalnih navodilih proizvajalcev (Birnboim in Doly, 1979; Ausubel in sod., 1999).

#### 3.4.2.2 Izolacija plazmidne DNA iz laktobacilov

Plazmidno DNA smo iz sevov K7 in LF221 ter transformant *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup> izolirali s pomočjo modificiranega postopka po Klaenhammerju (1984).

2 ml 18-urne kulture smo precepili v 10 ml tekočega gojišča MRS in inkubirali 2 h pri 37 °C, nakar smo celotno količino centrifugirali 10 min pri 6000 vrt./min. Celično usedlino smo sprali s 5 ml sterilne destilirane H<sub>2</sub>O, jo ponovno centrifugirali (10 min pri 6000 vrt./min) in usedlini dodali 1 ml "Cell suspension buffer" (CSB: 50 mM Tris-HCl, 8-odstotna saharoza; pH 8,0) z dodanim lizocimom (10 mg/ml CSB) ter premešali z vrtinčenjem. Suspenzijo smo prenesli v mikrocentrifugirko in jo po 1-urni inkubaciji na ledu centrifugirali 1 min pri 14000 vrt./min. Usedlini smo dodali 500 µl "Lysis solution" (LS: 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 3-odstotni SDS; pH 8,0), ki smo ji tik pred tem uravnali vrednost pH na 12,4 (z dodatkom 35 µl 3,0 N NaOH/ml LS), premešali z vrtinčenjem ter 30 min inkubirali pri 65 °C, da se je mešanica zbistrila, kar je bil znak lize celic. Lizat smo ohlajali 10 min pri sobni temperaturi, ga nevtralizirali z dodatkom 100 µl 2 M tris-HCl (pH 7,0) in 140 µl 5 M NaCl (pH 7,0) - vsakič premešali z vrtinčenjem in dodali še 400 µl fenola ter 400 µl kloroforma (pemešali z obračanjem). Po 5-minutnem centrifugiranju pri 12000 vrt./min smo supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko, mu dodali enako količino mešanice kloroforma in izoamilnega alkohola (razmerje kloroform:izoamilni alkohol je bilo 24:1), premešali z obračanjem in centrifugirali 5 min pri 12000 vrt./min. Zgornjo - vodno fazo, ki je vsebovala plazmidno DNA, smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 750 µl izopropanola, premešali z obračanjem in DNA obarjali preko noči pri -20 °C. Oborjeno plazmidno DNA smo centrifugirali 15 min pri 12000 vrt./min (pri 4 °C), usedlino sprali z 1 ml 70-odstotnega EtOH, jo dobro posušili pri sobni temperaturi in resuspendirali v 30 µl sterilne destilirane H<sub>2</sub>O (dH<sub>2</sub>O) z RNazo (10 µl/ml). Vse uporabljene raztopine smo pripravili vnaprej in jih shranjevali pri ustreznih temperaturah.

Iz transformant *L. gasseri* LF221bac<sup>-</sup> pTOPO-pIL252-p32-K7A(10)-11, *L. gasseri* LF221bac<sup>-</sup> pTOPO-pIL252-p32-K7B(4)-2 in *L. gasseri* LF221bac<sup>-</sup> pTOPO-pIL252-p32-LF221B(4)-3 smo plazmidno DNA skušali izolirati tudi s pomočjo komercialnih kompletov "GenElute™ High Performance (HP) Plasmid Midiprep Kit" in "JETSTAR Plasmid Midiprep Kit".

### 3.4.2.3 Izolacija plazmidne DNA iz laktokokov in enterokokov

Iz transformant laktokokov in enterokokov smo plazmidno DNA izolirali s pomočjo kompletov "QIAprep Spin Miniprep Kit" in "JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit" (Birnboim in Doly, 1979), pri čemer smo, namesto prvega koraka originalnega protokola, centrifugirali 3 ml 18-urne kulture laktokokov oziroma enterokokov (2 min pri 13000 vrt./min), usedlino sprali z 0,5 ml pufra "TES" (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA), jo ponovno centrifugirali (2 min pri 13000 vrt./min) ter usedlino resuspendirali v 250 µl pufra "GTE" (50 mM glukoza, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 8,0) z dodanim lizocimom (125 µl lizocima (40 mg/ml)/ml GTE) in RNaze (10 µl RNaze (10 mg/ml)/ml GTE). Mešanico smo premešali z vrtinčenjem in inkubirali pri 37 °C dokler ni potekla liza celic (10-15 min). Nadaljevali smo po originalnem protokolu za *E. coli* od drugega koraka dalje. Pufra TES in GTE ter založni raztopini lizocima in RNaze smo pripravili vnaprej in jih shranjevali pri priporočenih temperaturah.

Plazmidno DNA transformant laktokokov smo izolirali tudi s pomočjo kompleta "Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System" (Ausubel in sod., 1999), pri čemer smo delno modifircirali začetek postopka: 5 ml 18-urne kulture smo centrifugirali 10 min pri 3000 vrt./min, celični usedlini poleg 360 µl "Cell Resuspension Solution" dodali še 10 µl RNaze (10 mg/ml) in 30 µl lizocima (30 mg/ml), suspenzijo premešali z obračanjem in inkubirali 20-25 min pri 30 °C, da je potekla liza celic. Nadaljevali smo po originalnem protokolu za *E. coli* od tretjega koraka dalje.

### 3.4.2.4 Ugotavljanje koncentracije DNA

Koncentracijo izolirane genomske ali plazmidne DNA ter pomnožkov PCR smo ugotavljali spektrofotometrično pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm, pri čemer smo upoštevali, da optična gostota  $OD_{260} = 1$  ustreza koncentraciji 50 µg DNA/ml, za dvooverižno DNA. Čisti vzorci DNA imajo razmerje  $OD_{260}/OD_{280} \approx 1,8-2,0$ . Koncentracijo majhnih količin DNA v vzorcih smo ocenili s pomočjo agaroznega gela na osnovi primerjave intenzitete fluorescence, ki jo v svetlobi UV pri valovni dolžini 312 nm oddaja kompleks DNA-etidijev bromid neznane količine DNA, s kontrolo z znano koncentracijo DNA (Sambrook in Russell, 2001).

### **3.4.3 Elektroforeza DNA na agaroznem gelu**

Z agarozno gelsko elektroforezo smo preverjali količino in kakovost izolirane DNA, količino, velikost in specifičnost pomnožkov PCR. Uporabljali smo jo za ločevanje večjih delov DNA pred in po encimskih modifikacijah (restrikcija, ligacija), za preverjanje čistosti in kakovosti fragmentov DNA pred določanjem nukleotidnega zaporedja. Genomsko in plazmidno DNA smo običajno preverjali na 0,8-odstotnem agaroznem gelu, pomnožke PCR, restrikcijske produkte in očiščene dele DNA pa na 1 do 1,5-odstotnem agaroznem gelu.

Gel smo pripravili s segrevanjem agaroze v 1-kratnem pufru TAE, ki smo ga pripravili iz založne raztopine 50-kratnega pufra TAE (za 1 l 50-kratnega pufra TAE smo zmešali: 242 g Trizma baze, 57,1 g glacialne ocetne kislina, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) in dopolnili z dH<sub>2</sub>O do 1 l). Prepojili smo ga z etidijevim bromidom (do koncentracije 0,5 µg/ml), ki se vriva med bazne pare DNA, vzorce pa smo pred nanosom v žepke gelaobarvali in obtežili z dodatkom nanašalnega pufra. Ločevanje fragmentov DNA je potekalo pri napetosti 2 kV/cm, detekcija pa na UV-transiluminatorju na osnovi fluoresciranja DNA, ki jo v svetlobi UV pri valovni dolžini 312 nm oddaja kompleks DNA-etidijev bromid (Zimmermann in sod., 1998; Sambrook in Russel, 2001).

### **3.4.4 Pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)**

Matrično DNA za pomnoževanje celih operonov ali delov kodirajočih regij posameznih bakteriocinov je predstavljala genomska DNA sevov K7 in LF221 ali rekombinantna plazmidna DNA klonov. Za sestavljanje nekaterih plazmidnih konstruktov in pridobivanje manjkajočih nukleotidnih zaporedij acidocinov LF221 A in LF221 B, ter celotnih kodirajočih regij za gassericina K7 A in K7 B, pa smo PCR izvajali na ligacijskih mešanicah.

Mešanica za PCR (50 µl) je vsebovala:

10x PCR pufer (z ali brez MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
(25 mM MgCl <sub>2</sub> )	3 µl
10 µM dNTP-je	1,5 µl (2 µl)
100 µM (5 µM) začetni oligonukleotid 1	1,5 µl (2 µl)
100 µM (5 µM) začetni oligonukleotid 2	1,5 µl (2 µl)
matrično DNA	1-3 µl
DNA-polimerazo	0,5 µl (5 U)
dH <sub>2</sub> O	32,5-39 µl (do končnega volumna 50 µl)

Kadar smo s PCR preverjali transformante oziroma, kadar ni navedeno drugače, smo uporabili DNA-polimerazo *Taq*. Kadar pa smo pomnožke PCR uporabili za nadaljnje analize (kloniranje, določanje nukleotidnega zaporedja), smo uporabili DNA-polimerazo *Pfu*, Pwo ali Platinum® *Pfx*, s pripadajočimi 10-kratnimi PCR pufri. Če smo uporabili 10-kratni PCR pufer brez MgCl<sub>2</sub>, smo MgCl<sub>2</sub> dodali posebej v navedeni količini, če pa je 10-kratni PCR pufer že vseboval MgCl<sub>2</sub>, smo količino MgCl<sub>2</sub> nadomestili z vodo. V vseh reakcijah smo uporabljali sterilno destilirano vodo (dH<sub>2</sub>O), mešanico dNTP-jev (Fermentas, R0191; Finnzymes, F-560S) in začetne oligonukleotide, ki so navedeni v preglednicah 4, 5 in 6.

Za pomnoževanje DNA s PCR smo uporabili različne pogoje, ki so zbrani v preglednici 9. Spreminjali smo predvsem temperaturo vezave začetnih oligonukleotidov, ki je bila odvisna od kombinacije začetnih oligonukleotidov v mešanici PCR oziroma njihovih temperatur tališča; čas prepisovanja DNA (~1 min za vsakih 1000 pomnoženih bp) pa smo določili glede na pričakovano velikost pomnožkov PCR (Sambrook in Russel, 2001).

**Preglednica 9: Pogoji pomnoževanja DNA s PCR**

**Table 9: PCR conditions**

Faza	Temperatura	Čas	Število ciklov
Začetna denaturacija DNA	94 °C (95 °C)	3-5 min	1
Denaturacija DNA	94 °C (95 °C)	30 s - 1 min	
Vezava začetnih oligonukleotidov	50-55 °C	30 s	30
Prepisovanje DNA	72 °C	1-3 min	
Končno prepisovanje DNA	72 °C	5-10 min	1

### 3.4.4.1 PCR na osnovi kolonije

Kadar smo v krajšem času pri večjem številu zraslih transformant želeli preveriti prisotnost vstavljenega fragmenta DNA v plazmidnem konstraktu, smo izvedli PCR na osnovi kolonije - "colony PCR" (Lerner in Carter, 1995).

Mešanica za PCR (30 µl) je vsebovala:

10x PCR pufer (z ali brez MgCl <sub>2</sub> )	3 µl
(25 mM MgCl <sub>2</sub> )	3 µl
1,25 µM dNTP-je	2,5 µl
5 µM začetni oligonukleotid 1	1 µl
5 µM začetni oligonukleotid 2	1 µl
dH <sub>2</sub> O	14,5 µl
DNA-polimerazo <i>Taq</i>	0,1 µl (1 U) + 4,9 µl dH <sub>2</sub> O

Uporabljali smo kombinacijo začetnih oligonukleotidov vektor-bakteriocin, da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom. V reakcijsko mešanico brez DNA-polimeraze *Taq* smo s sterilnim zobotrebcem ali mikro-pipetnim nastavkom aseptično prenesli del zrasle kolonije s trdnega gojišča. Vzorce smo prenesli v napravo za PCR in izvedli reakcijo pomnoževanja DNA z vročim začetkom PCR ("hot start") pod pogoji, ki so predstavljeni v preglednici 10. Po začetni denaturaciji DNA smo prekinili reakcijo in vsakemu vzorcu dodali DNA-polimerazo *Taq*. Nato smo nadaljevali s pomnoževanjem po opisanih korakih. Podobno kot pri običajni PCR, smo temperaturo vezave začetnih oligonukleotidov določili glede na kombinacijo začetnih oligonukleotidov v mešanici PCR (njihovih temperatur tališča), čas prepisovanja DNA pa glede na pričakovano velikost pomnožkov PCR.

Preglednica 10: Pogoji pomnoževanja DNA s PCR na osnovi kolonije

Table 10: Colony PCR conditions

Faza	Temperatura	Čas	Število ciklov
Začetna denaturacija DNA	99 °C	10 min	1
Denaturacija DNA	95 °C	1 min	
Vezava začetnih oligonukleotidov	50-55 °C	30 s	30
Prepisovanje DNA	72 °C	1-3 min	
Končno prepisovanje DNA	72 °C	5 min	1

### 3.4.5 Čiščenje in obdelava pomnožkov PCR

Po pregledovanju z agarozno gelsko elektroforezo smo zanimive pomnožke PCR očistili in pripravili za nadaljnje korake.

#### 3.4.5.1 Čiščenje pomnožkov PCR iz agaroznega gela

Iz agaroznega gela smo čistili pomnožke PCR, kadar so se v reakciji pomnožili dodatni nespecifični pomnožki, pa tudi zato, da smo odstranili začetne oligonukleotide, nukleotide, DNA-polimerazo, soli, agarozo in etidijev bromid. Za čiščenje smo uporabljali komercialne komplete "JETQUICK Gel Extraction Spin Kit", "QIAquick Gel Extraction Kit" in "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" ter se držali originalnih navodil proizvajalcev.

#### 3.4.5.2 Čiščenje pomnožkov PCR neposredno iz reakcijskih mešanic PCR

V primerih, ko se je pomnožil samo en specifični pomnožek PCR, smo le tega čistili neposredno iz mešanice PCR, da smo odstranili začetne oligonukleotide, nukleotide, DNA-polimerazo in soli. Za čiščenje smo uporabljali komercialne komplete "JETQUICK PCR Purification Spin Kit", "QIAquick PCR Purification Kit" in "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" ter se držali originalnih navodil proizvajalcev (Vogelstein in Gillespie, 1979; Zimmermann in sod., 1998).

#### 3.4.5.3 Obdelava pomnožkov PCR ("blunt ending 3' and 5' overhangs")

Kadar smo za ligacijo potrebovali pomnožke PCR s topimi konci in jih z DNA-polimerazo Pwo ali *Pfx* nismo uspeli pridobiti, smo očiščene "*Taq*" pomnožke PCR obdelali z DNA-polimerazo T4, ki je štrleče konce pomnoženih molekul DNA spremenila v tope (Sambrook in Russel, 2001). Očiščenim "*Taq*" pomnožkom PCR (15,5 µl) smo dodali 1 µl mešanice dNTP-jev (100 µM), 2 µl 10x pufra DNA-polimeraze T4 in 1,5 µl DNA-polimeraze T4, mešanico inkubirali 5 min pri 37 °C (ali 1 h pri sobni temperaturi) in nato še 10 min pri 75 °C, da smo inaktivirali encim. Tako obdelane pomnožke PCR smo uporabljali v reakcijah ligacij s topimi konci (poglavlje 3.4.7).

#### 3.4.5.4 Dodajanje A-repkov pomnožkom PCR ("A-tailing")

Očiščenim pomnožkom PCR smo po potrebi dodali A-repke (Knoche in Kephart, 1999). Zmešali smo 7 µl očiščenega pomnožka PCR, 1 µl 10-kratnega pufra za DNA-polimerazo *Taq*, 1 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 10 mM dATP in 0,5 µl DNA-polimeraze *Taq* ter mešanico inkubirali 30 min pri 70 °C v aparatu za PCR. Nato smo mešanico uporabili v reakciji ligacije (poglavlje 3.4.7).

### 3.4.6 Restrikcija DNA

#### 3.4.6.1 Reakcije enojne restrikcije

Restriktijska mešanica (20 µl) je vsebovala:

10x pufer za restrikcijo	2 µl
restriktijsko endonukleazo	1-1,5 µl (5-10 U)
tarčno DNA	2-15 µl
dH <sub>2</sub> O	0-15 µl

Količina dodane restriktaze je bila običajno 10 U encima za 1 µg tarčne DNA. Tarčno DNA je predstavljala genomska DNA sevov K7 in LF221, pomnožki PCR, plazmidni vektorji ali rekombinantna plazmidna DNA transformant. Koncentracijo tarčne DNA smo ocenili na podlagi agaroznega gela ali spektrofotometrično (poglavlje 3.4.2.4) in določili potrebno količino za reakcijo. Restriktijski pufer (10-kratni) in pogoje inkubacije smo izbrali glede na uporabljeno restriktazo oziroma priporočila proizvajalca, običajno je restrikcija potekala 2 h pri 37 °C (preglednica 3). Če smo restriktijske fragmente (rezano DNA) uporabili v nadalnjih postopkih (ligacija, kloniranje), smo jih bodisi očistili iz agaroznega gela na enak način kot pomnožke PCR (poglavlje 3.4.5.1) bodisi oborili z etanolom in skoncentrirali (poglavlje 3.4.6.3).

#### 3.4.6.2 Reakcije dvojne restrikcije

Restriktijska mešanica (30 µl) je vsebovala:

10x pufer za restrikcijo	3 µl
restriktijsko endonukleazo 1	1-1,5 µl (5-10 U)
restriktijsko endonukleazo 2	1-1,5 µl (5-10 U)
tarčno DNA	2-15 µl
dH <sub>2</sub> O	9-23 µl

Kadar smo želeli tarčno DNA rezati z dvema restriktijskima endonukleazama hkrati, smo lahko izvedli reakcijo dvojne restrikcije, če sta bili uporabljeni restriktazi od istega proizvajalca, oziroma če smo našli ustrezni 10-kratni restriktijski pufer, primeren za obe restriktazi in če je bila optimalna temperatura restrikcije enaka za obe restriktazi. V primerih, ko to ni bilo mogoče, smo tarčno DNA najprej rezali z restriktazo 1 (z ustreznim 10-kratnim restriktijskim puferom in pod ustreznimi temperaturnimi pogoji) in restriktijske fragmente očistili iz agaroznega gela ali oborili z etanolom in koncentrirali (poglavlji 3.4.5 in 3.4.6.3). Nato smo očiščene restriktijske fragmente rezali še z restriktazo 2 (z ustreznim 10-kratnim restriktijskim puferom in pod ustreznimi temperaturnimi pogoji) in naprej postopali enako kot pri reakciji enojne restrikcije (poglavlje 3.4.6.1).

### 3.4.6.3 Obarjanje DNA z etanolom in koncentriranje

Da bi iz reakcijske mešanice odstranili soli, encime in druge reagente ter skoncentrirali DNA, smo mešanici dodali 1/10 volumna ledeno hladnega 3M NaOAc (pH 5,2) in 2,5 volumna ledeno hladnega 96-odstotnega EtOH, premešali z vrtinčenjem inobarjali DNA pri -20 °C najmanj 20 min. Nato smo mešanico centrifugirali 20 min pri 13200 vrt./min (pri 4 °C), odstranili supernatant in oborjeno DNA sprali z ledeno hladnim 70-odstotnim EtOH, ponovno centrifugirali 20 min pri 13200 vrt./min (pri 4 °C), odstranili supernatant ter oborjeno DNA dobro posušili (~30 min pri 37 °C) in raztopili v želeni količini dH<sub>2</sub>O (Sambrook in Russel, 2001).

### 3.4.6.4 Defosforilacija plazmidnega vektorja

V primerih, ko smo plazmidni vektor rezali z restriktazo, ki je naredila tope konce, smo ga pred ligacijo defosforilirali z alkalno fosfatazo (BAP ali CIP), da bi zmanjšali oziroma preprečili pojav religacije vektorja. Restriktijski mešanici (z rezanim vektorjem) smo dodali 10-kratni pufer BAP ali CIP (do delovne koncentracije 1-kratnega pufra) in 1-2 µl encima BAP ali CIP. Če smo dodali BAP, smo mešanico inkubirali 1h pri 65 °C, če pa smo dodali CIP, smo mešanico inkubirali 30 min pri 37 °C. Nato smo encim (alkalno fosfatazo BAP ali CIP) inaktivirali s toploto (inkubacija 15 min pri 85 °C) in defosforiliran rezan plazmidni vektor očistili s pomočjo agarozne gelske elektroforeze (opisano v poglavju 3.4.5.1) (Sambrook in sod., 1989).

## 3.4.7 Ligacija

Razmerje insert:vektor v ligacijski mešanici je bilo običajno 5:1 oziroma 10:1. Koncentracijo DNA (inserta in vektorja) smo določili bodisi na podlagi agaroznega gela bodisi spektrofotometrično (poglavje 3.4.2.4) in določili potrebno količino za reakcijo. Insert je predstavljala rezana genomska DNA sevov K7 in LF221, rezani pomnožki PCR kodirajočih regij bakteriocinov ali iz vektorjev izrezani fragmenti rekombinantne kodirajoče DNA. Kot vektor pa smo uporabili različne rezane plazmidne vektorje, ki so zbrani v preglednici 8. Inserte in vektorje smo pred ligacijo rezali z restriktijskimi endonukleazami in jih po potrebi očistili in skoncentrirali, kot je opisano v poglavju 3.4.6. Ligacija je običajno potekala čez noč pri 16 °C, ligacijska mešanica (20 µl) pa je vsebovala:

insert (rezan fragment DNA)	5 µl
vektor (rezan plazmid)	1-15 µl
10x ligacijski pufer	2 µl
DNA-ligazo T4	1 µl (1,5 U)
dH <sub>2</sub> O	7-11 µl

Po inkubaciji (čez noč pri 16 °C) smo del ligacijske mešanice prenesli (transformirali) v predhodno pripravljene kompetentne celice gostiteljskega seva (poglavlji 3.4.8 in 3.4.9), oziroma smo jo uporabili za PCR, preostalo ligacijsko mešanico pa smo shranili pri -20 °C.

### 3.4.7.1 Kloniranje pomnožkov PCR

Pomnožke PCR s topimi konci, kodirajočih regij bakteriocinov, ki smo jih želeli heterologno izraziti, smo najprej klonirali v PCR-klonirni plazmidni vektor pCR®2.1-TOPO® ali pGEM®-T Easy (preglednica 8) in konstrukte transformirali v bakterijo *E. coli*. Preverili smo nukleotidno zaporedje vstavljenih fragmentov in jih nato prenesli v ekspresijske plazmidne vektorje. Pri kloniranju smo se držali originalnih protokolov proizvajalcev kompletov "Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit" (Invitrogen, K2800-20) oziroma "PGem®-T Easy Vector System I" (Promega, A1360) (Knoche in Kephart, 1999).

## 3.4.8 Priprava kompetentnih celic

Za transformacijo bakterij (s topotnim šokom ali elektroporacijo) smo potrebovali kompetentne celice, ki smo jih bodisi dobili (komercialno pripravljene), bosi pripravili po opisanih protokolih.

### 3.4.8.1 Priprava kemijsko kompetentnih celic bakterij *E. coli*

Kemijsko kompetentne celice *E. coli* (seve: DH5α, TG1 in BL21 DE3 pLysS) smo uporabljali pri transformaciji s topotnim šokom ("heat-shock"), ki je opisana v poglavju 3.4.9.1. Pripravili smo jih po naslednjem postopku (Hanahan, 1983; Sambrook in Russell, 2001): 1 ml 18-urne kulture *E. coli*, ki smo jo gojili v tekočem gojišču LB (pri 37 °C in stresanju 200 vrt./min), smo precepili v 100 ml predhodno pripravljenega tekočega gojišča LB z 10 mM MgSO<sub>4</sub> in 0,2-odstotno glukozo ter gojili (pri 37 °C in 200 vrt./min) do OD<sub>600</sub> = 0,5. Nato smo kulturo ohladili na ledu (10 min), jo prelili v ohljene centrifugirke in centrifugirali 10 min pri 4000 vrt./min (pri 4 °C). Usedlino celic smo resuspendirali v 1 ml ledeno hladnega gojišča LB z 10 mM MgSO<sub>4</sub> in 0,2-odstotno glukozo in dodali še 5 ml predhodno pripravljenega ledeno hladnega gojišča LB s 36-odstotnim glicerolom, 12-odstotnim PEG in 12 mM MgSO<sub>4</sub>. Suspenzijo smo nežno premešali, inkubirali 10 min na ledu, jo razdelili v ohljene mikrocentrifugirke po 100 oziroma 520 µl ter takoj zamrznili v tekočem dušiku oziroma na -80 °C.

### 3.4.8.2 Priprava elektro kompetentnih celic bakterij *E. coli*

Elektro kompetentne celice *E. coli* (seve: DH5α, TG1, 2746 in 2747) smo uporabljali pri transformaciji z elektro-šokom (elektroporaciji), ki je opisana v poglavju 3.4.9.2. Pripravili smo jih po naslednjem postopku (Dower in sod., 1988; Tung in Chow, 1995): 1 ml 18-urne kulture *E. coli*, ki smo jo gojili v tekočem gojišču LB (pri 37 °C in stresanju 200 vrt./min),

smo precepili v 100 ml tekočega gojišča LB in gojili (pri 37 °C in 200 vrt./min) do OD<sub>600</sub> = 0,6. Nato smo kulturo ohladili na ledu (30 min), jo prelili v ohlajene centrifugirke in centrifugirali 15 min pri 4000 g (pri 4 °C). Usedlino celic smo dvakrat sprali s 50 ml ledeno hladnega 10-odstotnega glicerola in nato resuspendirali v 200 µl predhodno pripravljenega ledeno hladnega medija GYT (10-odstotni (v/v) glicerol, 0,125-odstotni (w/v) kvasni ekstrakt, 0,25-odstotni (w/v) tripton). Suspenzijo smo nežno premešali in razdelili v ohlajene mikrocentrifugirke po 50 µl ter takoj zamrznili v tekočem dušiku oziroma na -80 °C.

#### 3.4.8.3 Priprava elektro kompetentnih celic bakterij *Lc. lactis*

Elektro kompetentne celice *Lc. lactis* (seva: IL 1403 in NZ9000) smo uporabljali pri elektroporaciji (poglavlje 3.4.9.2). Pripravili smo jih po naslednjem postopku (Holo in Nes, 1995): 50 µl 18-urne kulture laktokokov, ki smo jih gojili v tekočem gojišču GM 17, smo nacepili v 5 ml tekočega gojišča GM 17 in gojili do OD<sub>600</sub> = 0,5-0,8. Celice (kulturo) smo 100-kratno razredčili s tekočim gojiščem SGM 17 z gradientom glicina (100 µl kulture v 10 ml predhodno pripravljenega SGM 17 z 1,6-2,4-odstotnim glicinom) in inkubirali pri 30 °C 12-16 h, do OD<sub>600</sub> = 0,2-0,7. Nato smo kulturo ohladili na ledu, jo prelili v ohlajene centrifugirke in centrifugirali 5 min pri 5000 g (pri 4 °C). Usedlino celic smo dvakrat sprali s 5 ml ledeno hladne 0,5 M saharoze in nato resuspendirali v 320 µl ledeno hladne 0,5 M saharoze. Suspenzijo smo nežno premešali in razdelili v ohlajene mikrocentrifugirke po 40 µl ter takoj zamrznili v tekočem dušiku oziroma na -80 °C.

#### 3.4.8.4 Priprava elektro kompetentnih celic bakterij *Ent. faecium*

V poskusu, ki je opisan v poglavju 3.1.2.4, smo uporabljali predhodno pripravljene elektro kompetentne celice *Ent. faecium* (sev: 2749), ki smo jih dobili iz norveškega laboratorija Laboratory of Microbial Gene Technology (Department of Chemistry and Biotechnology, Norwegian University of Life Science).

#### 3.4.8.5 Priprava elektro kompetentnih celic bakterij *L. gasseri*

V poskusu, ki je opisan v poglavju 3.1.2.6, smo uporabljali elektro kompetentne celice *L. gasseri* (mutant LF221 bac<sup>-</sup>). Pripravili smo jih po naslednjem postopku (Aukrust in sod., 1995): 18-urno kulturo laktobacilov (ki smo jih gojili v tekočem gojišču MRS pri 37 °C) smo razredčili v 100 ml predhodno pripravljenega tekočega gojišča MRS z gradientom glicina (1,2-2-odstotni glicin), do OD<sub>600</sub> = 0,25. Kulturo smo inkubirali do OD<sub>600</sub> = 0,6, jo ohladili na ledu, prelili v ohlajene centrifugirke in centrifugirali 5 min pri 1500 g (pri 4 °C). Usedlino celic smo dvakrat sprali s 100 ml SM (952 mM sahariza, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O), resuspendirali v 1 ml SM, razdelili v ohlajene mikrocentrifugirke po 50 oziroma 100 µl in takoj zamrznili v tekočem dušiku oziroma na -80 °C.

### 3.4.9 Transformacija bakterij

Kompetentne celice grampozitivnih in gramnegativnih bakterij smo transformirali s toplotnim šokom ali z elektroporacijo, nakar smo iskali pozitivne transformante in jih preverili, če vsebujejo plazmidni konstrukt z vstavljenim fragmentom.

#### 3.4.9.1 Transformacija bakterij *E. coli* s toplotnim šokom

Kemijsko kompetentne celice *E. coli* (predhodno pripravljene po postopku, opisanem v poglavju 3.4.8.1 ali komercialno pripravljene *E. coli* TOP10) smo odtalili na ledu. 100 µl celic smo prenesli v ohlajeno mikrocentrifugirko, dodali 1-15 µl ohlajene ligacijske mešanice oziroma plazmida, ki smo ga želeli transformirati, nežno premešali in inkubirali 15-30 min na ledu. Nato smo celice izpostavili toplotnemu šoku: inkubirali smo jih 30 s pri 42 °C v vodni kopeli, takoj za tem prenesli na led za 5 min, nakar smo dodali 1 ml tekočega gojišča LB in celice inkubirali 1 h pri 37 °C, ob stresanju 200 vrt./min. Različne volumne bakterijske suspenzije smo nato enakomerno razmazali po predhodno pripravljenih ploščah s trdnim gojiščem LB in seleksijskimi faktorji za rast transformant (različni antibiotiki v različnih koncentracijah, odvisno od transformiranega plazmidnega konstrukta - glej preglednici 2 in 8, pri "modro-belem" testu pa še IPTG in X-Gal). Plošče smo inkubirali čez noč pri 37 °C in naslednji dan izbrali transformante za nadaljnje preverjanje (poglavlje 3.4.9.3) (Sambrook in Russell, 2001).

#### 3.4.9.2 Transformacija bakterij z elektrošokom (elektroporacija)

Elektro kompetentne celice *E. coli*, laktokokov, enterokokov ali laktobacilov (predhodno pripravljene, poglavja 3.4.8.2-3.4.8.5) smo odtalili na ledu in 20 (*E. coli*) oziroma 45 µl µl suspenzije celic (laktokokov, enterokokov ali laktobacilov) prenesli v ohlajeno mikrocentrifugirko. Dodali smo 1-5 µl ohlajene ligacijske mešanice oziroma plazmida, ki smo ga želeli transformirati, nežno premešali in mešanico previdno prenesli v ohlajeno kiveto ter odstranili morebitne zračne mehurčke. Nato smo celice izpostavili elektrošoku - pogoji za posamezne vrste bakterij so zbrani v preglednici 11. Po elektrošoku smo vsebino iz kivete nemudoma prenesli v mikrocentrifugirko, dodali 1 ml medija SOC (za *E. coli*), SGM 17 (za laktokoke in enterokoke) ali MRSSM (za laktobacile) in celice inkubirali 1 h pri 37 °C, ob stresanju 200 vrt./min (*E. coli*), 2 h pri 30 °C (laktokoki, enterokoki) oziroma pri 37 °C (laktobacili). Nato smo enakomerno razmazali različne volumne bakterijske suspenzije po predhodno pripravljenih ploščah s trdnim gojiščem LB (*E.coli*), GM 17 (laktokoki, enterokoki) ali MRS (laktobacili) in seleksijskimi faktorji za rast transformant (različni antibiotiki v različnih koncentracijah, preglednici 2 in 8). Plošče smo inkubirali čez noč oziroma 24-72 ur pri 37 °C (*E. coli*, laktobacili) ali pri 30 °C (laktokoki, enterokoki) in nato izbrali transformante za nadaljnje preverjanje (poglavlje 3.4.9.3) (Dower in sod., 1988; Aukrust in sod., 1995; Holo in Nes, 1995; Tung in Chow, 1995).

#### Preglednica 11: Pogoji elektroporacije za *E. coli*, laktokoke, enterokoke in laktobacile

Table 11: Conditions used for electroporation of *E. coli*, lactococci, enterococci and lactobacilli

	<i>E. coli</i>	Laktokoki, enterokoki	Laktobacili
Napetost	1,8 kV	2,0 kV	1,5 kV
Kapaciteta	25 µF	25 µF	25 µF
Upornost	200 Ω	200 Ω	800 Ω
Realni čas	4-5 ms	4-5 ms	10 ms
Kiveta	1 mm	2 mm	2 mm

#### 3.4.9.3 Iskanje pozitivnih transformant

Pri zraslih kolonijah (transformantah) smo želeli ugotoviti, ali vsebujejo vstavljen insert v plazmidnem konstraktu in, ali je prišlo do izražanja rekombinantne DNA oziroma proteinov. Prisotnost in velikost inserta smo ugotavljali na dva načina: direktno s PCR na osnovi kolonije (poglavje 3.4.4.1), ali pa s PCR na izolirani rekombinantni plazmidni DNA (poglavje 3.4.4). Za preverjanje smo vedno izbrali posamezne kolonije, jih nacepili v 5-10 ml ustreznega tekočega gojišča z ustreznim antibiotikom, inkubirali preko noči in naslednji dan izolirali plazmidno DNA (poglavje 3.4.2) ter jo preverili s PCR (poglavje 3.4.4) in/ali restrikcijo (poglavje 3.4.6). Insertom potencialno pozitivnih transformant (tistih, ki so vsebovale ustrezeno velik plazmidni konstrukt in/ali pomnožek PCR) smo določili nukleotidno zaporedje. Pozitivne klone smo nadalje preverili s spot testi s kolonijami, z brezceličnimi (skoncentriranimi) supernatanti in/ali z mešanimi kulturami (poglavje 3.4.12) in pri nekaterih poskusih tudi analizirali proteine z NaDS-PAGE (poglavje 3.4.16).

#### 3.4.10 Konjugacija

3 ml sveže, ~10-urne kulture *Lc. Lactis* K1 (donor, tvori LcnA) in *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A-4 (akceptor) smo centrifugirali 2 min pri 13000 vrt./min, usedlini celic dvakrat sprali z 0,9-odstotno raztopino NaCl (da smo odstranili bakteriocina) in resuspendirali v 3 ml 0,9-odstotne raztopine NaCl. Nato smo suspenzijo celic akceptorja razredčili 1000-krat oziroma 10000-krat z 0,9-odstotno raztopino NaCl in zmešali celice donorja in razredčenega akceptorja v različnih razmerjih (1000:1, 100:1, 10:1, 1:1 in 1:10). Po 10 µl pripravljenih mešanic donor-akceptor ter čiste kulture donorja in akceptorja smo nanesli na plošči s trdnim gojiščem GM 17 (z dodanim eritromicinom 10 µg/ml) in ju

inkubirali 24 h pri 30 °C. Zrastle transkonjugante in kontroli (donor in akceptor) smo odtisnili na novo ploščo GM 17 z eritromicinom (10 µg/ml) in jih hrkati nacepili še v tekoče gojišče GM 17 z eritromicinom (10 µg/ml) (Sambrook in sod., 1989).

### **3.4.11 Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja**

Ko smo našli kolonijo (transformanto), ki je vsebovala vstavljen fragment DNA v plazmidnem konstraktu (potencialno pozitivna transformanta), smo želeli preveriti, ali se nukleotidno zaporedje rekombinantne DNA ujema z nukleotidnim zaporedjem osnovne (matične) DNA. Reakcije določanja nukleotidnega zaporedja kloniranih fragmentov oziroma pomnožkov PCR genomske DNA so za nas izvedli v norveškem laboratoriju Laboratory of Microbial Gene Technology (Department of Chemistry, Biotechnology and Food science, Norwegian University of Life Science) in v švicarskem podjetju Microsynth.

Dobljena nukleotidna zaporedja kodirajočih regij gassericinov K7 A in K7 B ter acidocinov LF221 A in LF221 B smo analizirali in primerjali z že opisanimi bakteriocini v zbirkah, s programom BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Nukleotidni zaporedji gassericina K7 A in K7 B smo shranili v gensko banko GenBank.

#### **3.4.11.1 Priprava trajnih bakterijskih kultur**

Pozitivne klone (z določenim oziroma preverjenim nukleotidnim zaporedjem) smo trajno shranili. Klon smo nacepili v 5 ml ustreznega tekočega gojišča (z ustreznim antibiotikom), inkubirali čez noč pri ustrezni temperaturi in nato 18-urno kulturo centrifugirali 5 min pri 5000 vrt./min. Usedlino celic smo resuspendirali v 0,6 ml ustreznega gojišča z 20-odstotnim glicerolom, nežno premešali, razdelili v dva alikvota, prenesli v epruvete za zamrzovanje in takoj zamrznili v tekočem dušiku oziroma pri -80 °C (Sambrook in sod., 1989).

### **3.4.12 Ugotavljanje izražanja bakteriocinov s pomočjo indikatorskega seva**

Pozitivne transformante (s PCR potrjenim vstavljenim insertom in/ali določenim nukleotidnim zaporedjem) smo preverili, ali tvorijo bakteriocin(e). Tvorbo in protimikrobnou aktivnost posameznega bakteriocina smo ugotavljali pri izbranih transformantah (bodisi pri kolonijah bodisi v brezceličnih supernatantih 18-urnih kultur) s pomočjo indikatorskega seva *L. sakei* NCDO 2714, ki je občutljiv tako za bakteriocinski kompleks seva K7 kot tudi za bakteriocinski kompleks seva LF221.

#### **3.4.12.1 Spot test s kolonijami**

Potencialno pozitivne transformante smo precepili v ustrezna gojišča brez antibiotikov (10 ml) in jih čez noč inkubirali pri ustreznih pogojih rasti. Nato smo po 1 µl 18-urne kulture

transformante nacepili na ustrezeno trdno gojišče brez antibiotika in ploščo inkubirali čez noč pri optimalnih pogojih rasti testirane transformante. Naslednji dan smo ploščo s kolonijami prelili z indikatorskim sevom *L. sakei* 2714 (100 µl 18-urne kulture *L. sakei* 2714 smo vcepili v 4 ml mehkega gojišča MRS) in jo inkubirali 24 h pri 30 °C. Opazovali smo cone zaviranja rasti indikatorskega seva in na ta način pri posameznih transformantah posredno ugotavliali tvorbo aktivnih bakteriocinov (bakteriocinsko aktivnost). Pozitivno kontrolo je predstavljal matični sev (K7 in/ali LF221), ki je močno zaviral rast indikatorskega seva *L. sakei* 2714, negativno pa gostiteljski sev brez transformiranega konstrukta, ki rasti indikatorskega seva ni zaviral (Tagg, 1976). Kadar smo uporabili drug indikatorski sev, je to navedeno.

#### 3.4.12.2 Difuzijski test z brezceličnimi supernatanti

Posamezne transformante smo precepili v ustrezena gojišča brez antibiotikov (10 ml) in jih inkubirali 18 h pri ustreznih pogojih rasti. 18-urne kulture smo centrifugirali 20 min pri 11000 vrt./min (pri 4 °C), supernatante po potrebi nevtralizirali z 0,1 N NaOH in jih filtrirali preko 0,45 µm-skih filtrov Minisart, da smo popolnoma odstranili bakterijske celice. Nato smo različne količine tako pripravljenih brezceličnih supernatantov nanesli na predhodno pripravljene plošče z indikatorskim sevom *L. sakei* 2714 (ustrezeno trdno gojišče smo prelili s 4 ml mehkega gojišča MRS z vcepljenim *L. sakei* 2714 - 100 µl 18-urne kulture. Plošče smo dobro osušili v zaščitni mikrobiološki komori, jih inkubirali 24 h pri 30 °C in odčitali rezultat - izmerili cone zaviranja rasti indikatorskega seva. Pozitivno kontrolo je predstavljal brezcelični supernatant matičnega seva (K7 in/ali LF221), negativno pa brezcelični supernatant gostiteljskega seva brez transformiranega konstrukta. Supernatante kontrol smo pripravili na enak način kot supernatante transformant (Mayr-Harting in sod., 1972; Harris in sod., 1989).

V nekaterih poskusih smo pred testiranjem z indikatorskim sevom brezcelične supernatante transformant še delno očistili in skoncentrirali, kar je opisano v poglavjih 3.4.12.2.1-3.4.12.2.3.

#### 3.4.12.2.1 Obarjanje brezceličnih supernatantov z amonijevim sulfatom

Brezceličnemu supernatantu transformante (10 ml) smo dodali 4 g amonijevega sulfata ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ) in suspenzijo mešali na ledu, dokler se  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  ni popolnoma raztopil. Nato smo raztopino centrifugirali 15 min pri 10000 vrt./min (pri 4 °C), odlili supernatant in oborjeno usedlino resuspendirali v 250 µl dH<sub>2</sub>O (Sambrook in Russel, 2001). Tako skoncentriran (40x) brezcelični supernatant transformante smo inkubirali 10 min pri 80 °C in nato preverili bakteriocinsko aktivnost, kot je opisano v poglavju 3.4.12.2.

### 3.4.12.2.2 Dializa brezceličnih supernatantov proti PEG

Dializne vrečke, ki zadržijo molekule z maso večjo od 10000 Da, smo pred dializo prekuhali (20 min v vreli dH<sub>2</sub>O), dobro sprali pod tekočo vodo (20 min) in nazadnje še z dH<sub>2</sub>O. Čez noč smo jih namakali v dH<sub>2</sub>O pri 4 °C. V 10 cm dolgo dializno vrečko smo prenesli 15 ml brezceličnega supernatanta, jo zavozlali na obeh straneh, položili v petrijevo ploščo in posipavali s PEG 20000 (polietilen glikolom), dokler je le ta vezal vodo, ki je iz vzorca prehajala skozi dializno membrano. Nato smo odstranili PEG, zunanjost dializne vrečke temeljito sprali z dH<sub>2</sub>O in vsebino iztisnili v mikrocentrifugirko ter notranjost vrečke sprali še s 500 µl dH<sub>2</sub>O. Tako smo dobili približno 700 µl skoncentriranega brezceličnega supernatanta transformante, ki smo ga po toplotni obdelavi (10 min pri 80 °C) preverili za bakteriocinsko aktivnost, kot je opisano v poglavju 3.4.12.2.

### 3.4.12.2.3 Liofilizacija brezceličnih supernatantov

18-urne kulture transformant (v 11 ml ustreznega gojišča brez antibiotikov) smo centrifugirali 15 min pri 8000 g (pri 4 °C) in supernatante prefiltrirali preko 45 µm-skih filtrov Minisart (da smo odstranili vse bakterijske celice) v sterilne stekleničke za liofilizacijo. Vzorce smo za 24 h zamrznili pri -20 °C in jih nato sušili v vakuumskem sušilniku pri tlaku, nižjem od 1 mm Hg in temperaturi -60 °C, dokler v liofilizatu nismo dosegli približno 5-odstotne vlage. Liofilizate (liofilizirane supernatante) smo rehidrirali (raztopili) v 200 µl dH<sub>2</sub>O in preverili njihovo bakteriocinsko aktivnost, kot je opisano v poglavju 3.4.12.2.

### 3.4.12.3 Spot test z mešanimi kulturami

Pri preverjanju nekaterih transformant smo sočasno ugotavljali tvorbo oziroma aktivnost obeh bakteriocinov posameznega seva. Želeli smo ugotoviti, ali morda prisotnost enega bakteriocina inducira izražanje drugega in obratno. Pri spot testu s kolonijami (poglavje 3.4.12.1) smo skupaj nacepili po 1 µl 18-urne kulture transformante s plazmidnim konstruktom za bakteriocin A (gassericin K7 A ali acidocin LF221 A) in 1 µl 18-urne kulture transformante s plazmidnim konstruktom za bakteriocin B (gassericin K7 B ali acidocin LF221 B). Pri difuzijskem testu z brezceličnimi supernatanti (poglavje 3.4.12.2) pa smo na predhodno pripravljeni ploščo z indikatorskim sevom *L. sakei* 2714 na isto mesto nanesli pripravljen brezcelični supernatant transformante s plazmidnim konstruktom za bakteriocin A in brezcelični supernatant transformante s plazmidnim konstruktom za bakteriocin B. Naprej smo postopali enako, kot je že opisano v poglavjih 3.4.12.1 in 3.4.12.2. Pozitivno kontrolo je predstavljal matični sev (K7 in/ali LF221), negativno pa gostiteljska seva brez transformiranih konstruktov za bakteriocina A in/ali B (Tagg, 1976).

#### 3.4.12.4 Preverjanje bakteriocinske aktivnosti supernatantov na mikrotiterskih ploščah

Bakteriocinsko aktivnost supernatantov 12- oziroma 18-urnih kultur nekaterih transformant smo določali s pomočjo mikrotiterskih plošč, kot so opisali Holo s sod. (1991) in Matijašić s sod. (1998).

#### 3.4.13 Ugotavljanje morfoloških lastnosti in števila kolonijskih enot

Iz 18-urne kulture seva K7 in seva K7, ki smo ga gojili v stresnih pogojih (poglavje 3.1.3), smo pripravili preparat in ga pobarvali po Gramu (po originalnih navodilih proizvajalca kompleta "Color Gram 2", bioMérieux, REF 55 542). S (fazno-kontrastnim) mikroskopskim pregledom smo ugotavliali čistost in morfološke lastnosti kulture.

Iste vzorce (kulture) smo razredčili  $10^6$ - do  $10^9$ -krat in po 1 ml razredčine razmazali na trdno gojišče MRS. Po 24-urni inkubaciji pri  $37\text{ }^\circ\text{C}$  ( $45\text{ }^\circ\text{C}$ ), smo prešeli zrastle kolonije in z upoštevanjem faktorja razredčitve določili število kolonijskih enot (k.e.) v 1 ml izhodne kulture.

#### 3.4.14 Določanje profila fermentacije ogljikovih hidratov

Profile fermentacij ogljikovih hidratov seva K7 in seva K7 po precepljanju v različnih stresnih pogojih gojenja (poglavje 3.1.3), smo določili s sistemom API 50 CHL (držali smo se originalnega postopka iz navodil proizvajalca bioMérieux). Podatke smo obdelali s programom "Apiweb® stand alone v 1.1.0", ki je posamezne vzorce uvrstil v ustreznou skupino.

#### 3.4.15 Ugotavljanje občutljivosti za antibiotike

Občutljivost za antibiotike smo preverjali z metodo difuzije v agarju z diskami in sicer s komercialnimi testi BBL™ Sensi-Disc™ (Becton, Dickinson and Company). Ravnali smo se po navodilih proizvajalca: s trdnega gojišča MRS smo izbrali 3-5 kolonij, jih prenesli v 5 ml tekočega gojišča MRS, inkubirali pri ustreznem T do motnosti 0,5 po McFarlandu in razmazali po ploščah z agarjem MRS. Na osušene plošče smo nanesli diske, prepojene z različnimi antibiotiki. Po 18-urni inkubaciji pri  $37\text{ }^\circ\text{C}$  smo odčitali rezultat - izmerili cone zaviranja rasti okrog diskov, jih primerjali s standardi in določili občutljivost (Charteris in sod., 1998).

#### 3.4.16 Analiza proteinov

V poskusu izražanja posameznih podenot gassericina K7 A z indukcijo (z IPTG v *E. coli* oziroma z nizinom v laktokokih) smo poleg spot testov in difuzijskih testov s kulturami oziroma njihovimi brezceličnimi supernatanti, analizirali še proteine v celičnih lizatih.

### 3.4.16.1 Izražanje podenot gassericina K7 A v bakterijah *E. coli* in *Lc. lactis* s pomočjo indukcije

Posamezne podenote gassericina K7 A, brez signalnih zaporedij, smo poskusili izraziti v ekspresijskih sevih *E. coli* BL21 DE3 pLysS, *Lc. lactis* IL1403 in *Lc. lactis* NZ9000. 18-urno kulturo, s plazmidnim konstruktom za posamezno podenoto gassericina K7 A (komplementarno GasK7a oziroma aktivno GasK7A), smo razredčili 1:100 s svežim gojiščem (1 ml 18-urne kulture v 100 ml tekočega gojišča oziroma 100 µl kulture v 10 ml gojišča) in gojili v dveh paralelkah pri ustreznih pogojih, do OD<sub>600</sub> = 0,5-1,0. Kulture *E. coli* smo inducirali z 1 mM IPTG ter inkubirali 3 h pri 37 °C (ob stresanju 200 vrt./min), kulture laktkokov pa smo inducirali z nizinom (40 ng/ml) ter inkubirali 3 h pri 30 °C. Druge paralelke nismo inducirali in je predstavljalna negativno kontrolo. Nato smo kulturam izmerili OD<sub>600</sub> (končna OD<sub>600</sub>), jih ohladili na ledu, prelili v centrifugirke in centrifugirali 10 min pri 5000 g (pri 4 °C). Supernatante smo zavrgli, če so vsebovali antibiotike oziroma shranili za kasnejše analize, če v gojišče nismo dodali antibiotika, usedline celic pa smo dvakrat sprali s fosfatnim pufrom (100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> z vrednostjo pH 7,0) in na koncu resuspendirali v fosfatnem pufru do OD<sub>600</sub> približno enake končni OD<sub>600</sub>. Suspenzije celic smo do nadalnjih analiz zamrznili pri -20 °C (Studier, 1991).

### 3.4.16.2 Priprava celičnih lizatov

Suspenzije zamrznjenih celic smo odtalili na ledu in sonificirali s 30-odstotno amplitudo: 30-sekundni sonifikaciji je sledila 45-sekundna pavza. Postopek smo ponovili petkrat za vsak vzorec, ki je bil ves čas na ledu. Odvzeli smo alikvote liziranih celic za kasnejšo analizo proteinov in suspenzije centrifugirali 20 min pri 11000 vrt./min (pri 4 °C). Odvzeli smo alikvote resuspendirane usedline celic za kasnejšo analizo, supernatante pa smo prenesli v nove centrifugirke in ponovno centrifugirali 20 min pri 11000 vrt./min (pri 4 °C), da smo odstranili morebiti še prisotne celice. Tudi v dvakrat centrifugiranih supernatantih smo analizirali prisotne proteine (Dubendorff in Studier, 1991).

### 3.4.16.3 Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza (NaDS-PAGE)

Vzorec (11 µl odvzetega alikvota posamezne frakcije celičnega lizata) smo zmešali s 4 µl 4-kratnega nanašalnega pufra (1 ml 0,5 M tris-HCl (pH 6,8), 1,6 ml 10-odstotnega NaDS, 0,8 ml glicerola, 0,4 ml 2-merkaptoetanola, 0,4 ml 1-odstotnega bromfenol modrega in 3,8 ml dH<sub>2</sub>O) v volumskem razmerju 3:1 (vzorec:pufer), dodali 1 µl 1 M DTT in proteine v vzorcu denaturirali 5 minut pri 100 °C. Vzorce in obarvan standard velikosti (Kaleidoscope Prestained Standard) smo nanesli v žepke predhodno pripravljenega poliakrilamidnega gela. Poliakrilamidne gele smo pripravili po standardnem postopku (Laemmli, 1970). Pripravili smo dvofazni (različno zamrežen) pokončni poliakrilamidni gel. Spodnji, ločevalni (12-odstotni) gel smo pripravili tako, da smo zmešali (za 10 ml): 3 ml 40-

odstotne (m/v) raztopine akrilamida, 4,34 ml dH<sub>2</sub>O, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) in 0,1 ml 10-odstotnega NaDS. Polimerizacijo smo sprožili z dodatkom 50 µl 10-odstotnega APS in 10 µl TEMED-a. Gel smo vlili med plošči, razmaknjeni 0,75 mm, počakali, da se je strtil (polimeriziral), nato nanj nalili 4-odstotni koncentracijski gel, ki smo ga pripravili (5 ml) iz: 0,5 ml 40-odstotnega akrilamida, 3,175 ml dH<sub>2</sub>O, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) in 50 µl 10-odstotnega NaDS (polimerizacijo smo sprožili z dodatkom 25 µl 10-odstotnega APS in 5 µl TEMED-a) in vanj vstavili glavniček s 15 žepki. Ko se je gel strtil, smo ga vpeli v aparaturo za elektroforezo in prelili z elektroforeznim pufrom (za 1 l: 3 g TRIS, 14,4 g glicina, 1 g NaDS, pH 8,3), odstranili glavniček in v žepke nanesli predhodno pripravljene denaturirane proteinske vzorce in standard velikosti. Elektroforeza je potekala 1 h pri konstantnem toku 30 mA in napetosti 200 V. Po končani elektroforezi smo proteine barvali 1h z 0,2-odstotno raztopino barvila Coomassie Brilliant Blue R-250 (v 20-odstotni (v/v) ocetni kislini). Nato smo gel spirali z večkratno zamenjavo raztopine za razbarvanje (30-odstotni (v/v) etanol, 10-odstotna (v/v) ocetna kislina), ga posušili in fotografirali.

## 4 REZULTATI

Izhajajoč iz načrtovanih poskusov doktorskega dela (slika 5) smo najprej okarakterizirali bakteriocinski kompleks seva K7 na nukleotidnem nivoju. V naslednjem sklopu eksperimentov smo bakteriocine sevov K7 in LF221 poskušali heterologno izraziti v osmih izbranih sevih grampozitivnih in gramnegativnih bakterij. V zadnjem poskusu pa smo ugotavljali še obstojnost seva K7 in tvorbe bakteriocinov v stresnih pogojih gojenja.

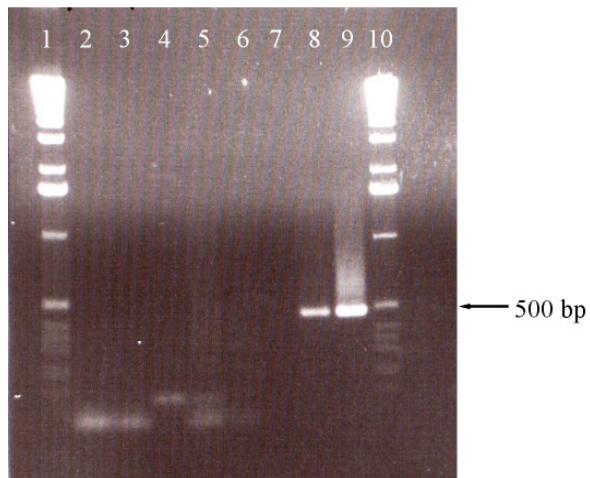
### 4.1 UGOTAVLJANJE IN ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ BAKTERIOCINOV SEVOV K7 IN LF221

Za primerjavo in nadaljnje proučevanje bakteriocinskih kompleksov sevov K7 in LF221 smo potrebovali celotno nukleotidno zaporedje kodirajočih regij posameznih bakteriocinov. Najprej smo določili celotno nukleotidno zaporedje gassericina K7 A in na N-terminalnem koncu dopolnili manjkajoči del nukleotidnega zaporedja acidocina LF221 A. Nato smo določili še celotno nukleotidno zaporedje gassericina K7 B in na N-terminalnem koncu dopolnili manjkajoči del nukleotidnega zaporedja acidocina LF221 B. Matrična DNA za pomnoževanje kodirajočih regij bakteriocinov je bila genomska DNA sevov K7 in LF221 (priloga C).

#### 4.1.1 Nukleotidno zaporedje gassericina K7 A in manjkajoče nukleotidno zaporedje acidocina LF221 A na N-terminalnem koncu

Izmed pomnožkov PCR na ligacijskih mešanicah "rezan vektor pBluescript® II KS(+) Phagemid + rezana DNA K7 ali LF221" (poglavlje 3.1.1) smo očistili ~500 bp velika pomnožka "pBluescript-LF221(*Sma*I/*Dra*I)" in "pBluescript-K7(*Sma*I/*Dra*I)" (slika 16, stolpca 8 in 9) ter jima določili nukleotidno zaporedje.

Dobljena nukleotidna zaporedja smo primerjali z 858 nukleotidov že znanega nukleotidnega zaporedja acidocina LF221 A (številka GenBank AY295874; Čanžek Majhenič in sod., 2004). Določili smo 285 bp nukleotidnega zaporedja na N-terminalnem koncu za acidocin LF221 A (odsek "*Dra*I/*Bam*HI") in 398 bp nukleotidnega zaporedja za gassericin K7 A (odsek "*Dra*I-LF221Aup1"), ki je bilo 100-odstotno identično nukleotidnemu zaporedju acidocina LF221 A. Na genomski DNA seva K7 smo z začetnima oligonukleotidoma BojA in 858-left pomnožili 722 bp kodirajoče regije gassericina K7 A in ji določili nukleotidno zaporedje, ki je bilo 100-odstotno identično nukleotidnemu zaporedju odgovarjajoče regije acidocina LF221 A.



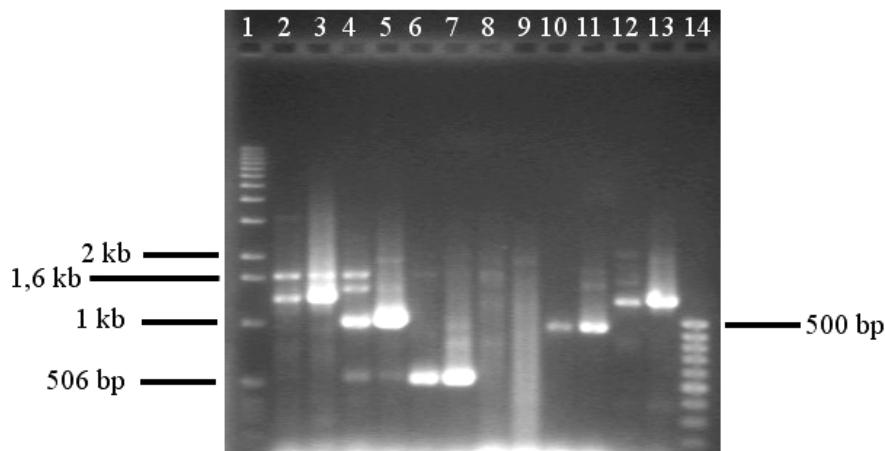
**Slika 16: Pomnožki PCR ligacijskih mešanic pBluescript-LF221 in pBluescript-K7, z začetnima oligonukleotidoma T7 in LF221Aup1.** Stolca 1 in 10: označevalec velikosti 1 kb, stolci 2-9: pomnožki PCR ligacijskih mešanic pBluescript-LF221 oziroma pBluescript-K7; stolpec 2: LF221(*Clal*), stolpec 3: K7(*Clal*), stolpec 4: LF221(*RsaI*), stolpec 5: K7(*RsaI*), stolpec 6: LF221(*SspI*), stolpec 7: K7(*SspI*), stolpec 8: LF221(*DraI*), stolpec 9: K7(*DraI*).

**Figure 16: PCR products of ligation mixtures pBluescript-LF221 and pBluescript-K7 using T7 and LF221Aup1 primers.** Lanes 1 and 10: 1 kb DNA ladder, lanes 2-9: ligation mixtures PCR products of pBluescript-LF221 and pBluescript-K7, respectively; lane 2: LF221(*Clal*), lane 3: K7(*Clal*), lane 4: LF221(*RsaI*), lane 5: K7(*RsaI*), lane 6: LF221(*SspI*), lane 7: K7(*SspI*), lane 8: LF221(*DraI*), lane 9: K7(*DraI*).

Celotno nukleotidno zaporedje gassericina K7 A, dolgo 1143 bp in izpeljano aminokislinsko zaporedje, je predstavljeno v prilogi A. Shranili smo ga v gensko banko GenBank pod številko EF392861. Zaporedje gassericina K7 A smo podrobneje analizirali v poglavju 4.1.3.1.

#### 4.1.2 Nukleotidno zaporedje gassericina K7 B in manjkajoče nukleotidno zaporedje acidocina LF221 B na N-terminalnem koncu

Podobno strategijo ugotavljanja nukleotidnega zaporedja, kot za gassericin K7 A, smo ubrali tudi za gassericin K7 B. Izmed pomnožkov PCR na ligacijskih mešanicah "pBluescript-K7" in "pBluescript-LF221" (poglavlje 3.1.1) smo očistili ~1,3 kb velika fragmenta "pBluescript-LF221(*SmaI/DraI*)" in "pBluescript-K7(*SmaI/DraI*)" (slika 17, stolca 12 in 13) ter jima določili nukleotidno zaporedje. Določili smo 1258 bp N-terminalnega nukleotidnega zaporedja gassericina K7 B (odsek "DraI-LF221Bup1") in acidocina LF221 B, ki sta bili 100-odstotno identični na nukleotidnem nivoju, 98-100-odstotno pa sta bili identični tudi z že objavljenim nukleotidnim zaporedjem gassericina T (številka GenBank AB029612; Kawai in sod., 2000).

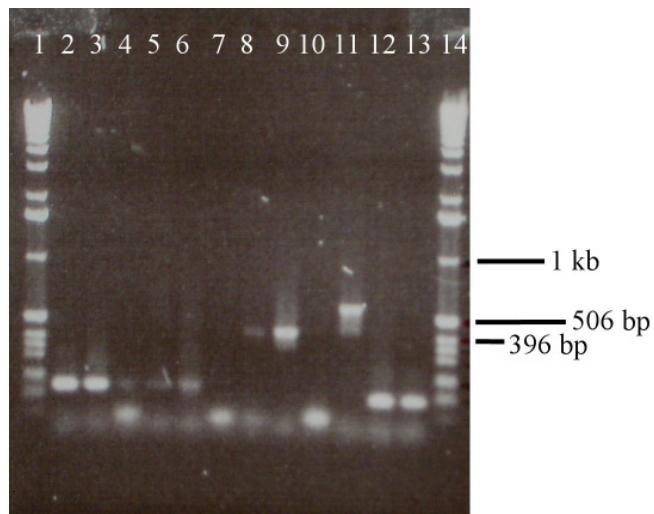


**Slika 17: Pomnožki PCR ligacijskih mešanic pBluescript-LF221 in pBluescript-K7, z začetnima oligonukleotidoma T7 in LF221Bup1.** Stolpec 1: označevalec velikosti 1 kb, stolpec 14: označevalec velikosti 100 bp, stolci 2-13: pomnožki ligacijskih mešanic pBluescript-LF221 oziroma pBluescript-K7; stolpec 2: LF221(*Hind*III), stolpec 3: K7(*Hind*III), stolpec 4: LF221(*Clal*), stolpec 5: K7(*Clal*), stolpec 6: LF221(*Hinc*II), stolpec 7: K7(*Hinc*II), stolpec 8: LF221(*Rsa*I), stolpec 9: K7(*Rsa*I), stolpec 10: LF221(*Ssp*I), stolpec 11: K7(*Ssp*I), stolpec 12: LF221(*Dra*I), stolpec 13: K7(*Dra*I).

**Figure 17: PCR products of ligation mixtures pBluescript-LF221 and pBluescript-K7 using T7 and LF221Bup1 primers.** Lane 1: 1 kb DNA ladder, lane 14: 100 bp DNA ladder, lanes 2-13: ligation mixtures PCR products of pBluescript-LF221 and pBluescript-K7, respectively; lane 2: LF221(*Hind*III), lane 3: K7(*Hind*III), lane 4: LF221(*Clal*), lane 5: K7(*Clal*), lane 6: LF221(*Hinc*II), lane 7: K7(*Hinc*II), lane 8: LF221(*Rsa*I), lane 9: K7(*Rsa*I), lane 10: LF221(*Ssp*I), lane 11: K7(*Ssp*I), lane 12: LF221(*Dra*I), lane 13: K7(*Dra*I).

Na istih ligacijskih mešanicah smo izvedli še PCR z začetnima oligonukleotidoma T7/LF221B2, ter pomnožkom "pBluescript-LF221(*Sma*I/*Rsa*I)" in "pBluescript-K7 (*Sma*I/*Rsa*I)", velikosti ~500 bp, in "pBluescript-K7(*Sma*I/*Ssp*I)", velikosti ~600 bp (slika 18, stolci 8, 9 in 11) določili nukleotidna zaporedja.

Dobljeni nukleotidni zaporedji odsekov "*Rsa*I-LF221B2" gassericina K7 B in acidocina LF221 B sta bili 100-odstotno identični, ~100 bp je bilo identično tudi z N-terminalnim začetnim delom že objavljenega nukleotidnega zaporedja gassericina T (številka GenBank AB029612; Kawai in sod., 2000). Določili smo skupno 492 bp N-terminalnega nukleotidnega zaporedja gassericina K7 B oziroma acidocina LF221 B (odsek "*Rsa*I-LF221B2" prispeva 339 nukleotidov in odsek "*Ssp*I/*Rsa*I" 153 nukleotidov).



**Slika 18: Pomnožki PCR ligacijskih mešanic pBluescript-LF221 in pBluescript-K7, z začetnima oligonukleotidoma T7 in LF221B2.** Stolca 1 in 14: označevalec velikosti 1 kb, stolci 2-13: pomnožki ligacijskih mešanic pBluescript-LF221 oziroma pBluescript-K7; stolpec 2: LF221(*HindIII*), stolpec 3: K7(*HindIII*), stolpec 4: LF221(*ClaI*), stolpec 5: K7(*ClaI*), stolpec 6: LF221(*HincII*), stolpec 7: K7(*HincII*), stolpec 8: LF221(*RsaI*), stolpec 9: K7(*RsaI*), stolpec 10: LF221(*SspI*), stolpec 11: K7(*SspI*), stolpec 12: LF221(*DraI*), stolpec 13: K7(*DraI*).

**Figure 18: PCR products of ligation mixtures pBluescript-LF221 and pBluescript-K7 using T7 and LF221B2 primers.** Lanes 1 and 14: 1 kb DNA ladder, lanes 2-13: ligation mixtures PCR products of pBluescript-LF221 and pBluescript-K7, respectively; lane 2: LF221(*HindIII*), lane 3: K7(*HindIII*), lane 4: LF221(*ClaI*), lane 5: K7(*ClaI*), lane 6: LF221(*HincII*), lane 7: K7(*HincII*), lane 8: LF221(*RsaI*), lane 9: K7(*RsaI*), lane 10: LF221(*SspI*), lane 11: K7(*SspI*), lane 12: LF221(*DraI*), lane 13: K7(*DraI*).

Celotno nukleotidno zaporedje gassericina K7 B, dolgo 3276 bp in izpeljano aminokislinsko zaporedje, je predstavljeno v prilogi B. Shranili smo ga v gensko banko GenBank pod številko AY307382. Zaporedje gassericina K7 B smo podrobneje analizirali v poglavju 4.1.3.2.

#### 4.1.3 Analiza in primerjava nukleotidnih zaporedij bakteriocinov K7 in LF221

Ugotovljeni nukleotidni zaporedji gassericinov seva K7 smo analizirali in primerjali z nukleotidnima zaporedjema acidocinov seva LF221 in ostalimi opisanimi bakteriocini MKB. Gassericina seva K7 smo uvrstili v (pod)skupino podobnih bakteriocinov MKB.

##### 4.1.3.1 Gassericin K7 A in acidocin LF221 A

V preglednici 12 so zbrani rezultati analize 1143 bp nukleotidnega zaporedja odseka *DraI/HindIII*, kodirajoče regije gassericina K7 A (priloga A) in primerjave z nukleotidnimi zaporedji bakteriocinov v bazi podatkov NCBI.

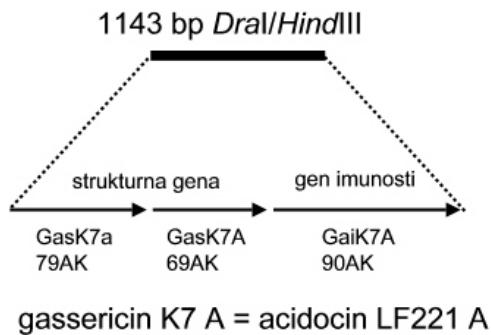
Preglednica 12: **Analiza 1143 bp nukleotidnega zaporedja DNA odseka *DraI/HindIII*, kodirajoče regije gassericina K7 A**

Table 12: **DNA sequence analysis of the 1143 bp *DraI/HindIII* fragment of the gassericin K7 A gene region**

ORF (protein)	Mesto v nukleotidnem zaporedju	Število kodirajočih aminokislin	Rezultati primerjave BLAST	
			Homologni protein (številka v banki)	% homologije
<i>orfA1</i> (GasK7a)	162-401	79	Acd221α' (AY295874)	100
<i>orfA2</i> (GasK7A)	401-610	69	Acd221A (AY295874) BrcB (AF075600) LcnN (483242) SakT <sub>β</sub> (AY206863) ThmB (U93029)	100 52 39 37 32
<i>orfA3</i> (GaiK7A)	614-886	90	Aci221A (AY295874)	100

1143 bp nukleotidnega zaporedja vsebuje tri popolne odprte bralne okvire (ORF): *orfA1*, *orfA2* in *orfA3*, ki kodirajo 79 aminokislinskih ostankov (AK) dolgo domnevno komplementarno podenoto gassericina K7 A (GasK7a), 69 AK dolgo aktivno podenoto gassericina K7 A (GasK7A) in 90 AK dolg domnevni protein imunosti (GaiK7A). Tako komplementarna (GasK7a) kot tudi aktivna podenota (GasK7A) gassericina K7 A sta sestavljeni iz dvoglicinskega N-terminalnega vodilnega peptida (15 AK pri GasK7a oziroma 16 AK pri GasK7A) in bakteriocinskega prekurzorja (64 AK pri GasK7a oziroma 53 AK pri GasK7A). Domnevna možna mesta vezave ribosoma na komplementarno podenoto, aktivno podenoto in protein imunosti gassericina K7 A se nahajajo na mestih 231 za GasK7a (GGAGG), 387 za GasK7A (GGAGG) in 604 za GaiK7A (GAGA) (priloga A). Na sliki 19 je shematsko prikazana organizacija genov gassericina K7 A.

1143 bp nukleotidnega zaporedja kodirajoče regije gassericina K7 A smo primerjali z nukleotidnimi zaporedji bakteriocinov v bazi podatkov NCBI. Ugotovili smo 100-odstotno identičnost vseh treh odprtih bralnih okvirov gassericina K7 A in odgovarjajočih regij acidocina LF221 A (delni *orfA1* komplementarne podenote Acd221α', *orfA2* aktivne podenote Acd221A in *orfA1* proteina imunosti Aci221A) ter delno ujemanje aktivne podenote GasK7A s proteini BrcB (52 %), LcnN (39 %), SakT<sub>β</sub> (37 %) in ThmB (32 %), ki skupaj s proteini BrcA, LcnM, SakT<sub>α</sub> in ThmA tvorijo dvopeptidne bakteriocine brohocin C, laktkokcin MN, sakacin T in termofilin 13.



Slika 19: Shematski prikaz organizacije genov gassericina K7 A.

Figure 19: Scheme of gassericin K7 A genes.

#### 4.1.3.2 Gassericin K7 B in acidocin LF221 B

V preglednici 13 so zbrani rezultati analize 3276 bp nukleotidnega zaporedja odseka *SspI/HindIII*, kodirajoče regije gassericina K7 B (priloga B) in primerjave z nukleotidnimi zaporedji bakteriocinov v bazi podatkov NCBI.

3276 bp nukleotidnega zaporedja vsebuje šest popolnih odprtih bralnih okvirov (ORF): *orfB1*, ki kodira 465 AK dolg domnevni, od ATP odvisni transportni protein gassericina K7 B (ORFB1); *orfB2*, ki kodira 197 AK dolg domnevni dodatni transportni protein (ORF2); *orfB3*, ki kodira 75 AK dolgo komplementarno podenoto gassericina K7 B (GasK7b); *orfB4*, ki kodira 65 AK dolgo aktivno podenoto gassericina K7 B (GasK7B), *orfB5*, ki kodira 112 AK dolg domnevni protein imunosti (GaiK7B) in *orfBhip*, ki kodira 33 AK dolg hipotetični protein. Obe podenoti gassericina K7 B (GasK7b in GasK7B) sta sestavljeni iz dvoglicinskega N-terminalnega vodilnega peptida (18 AK pri GasK7b oziroma 17 AK pri GasK7B) in bakteriocinskega prekurzorja (57 AK pri GasK7b oziroma 48 AK pri GasK7B). Domnevna možna mesta vezave ribosoma na genu za komplementarno podenoto, aktivno podenoto in protein imunosti gassericina K7 B se nahajajo na mestih 2359 za GasK7b (AGGAGG), 2559 za GasK7B (AGGGAA) in 2815 za GaiK7B (AGAGA) (priloga B). Na sliki 20 je shematsko prikazana organizacija genov gassericina K7 B.

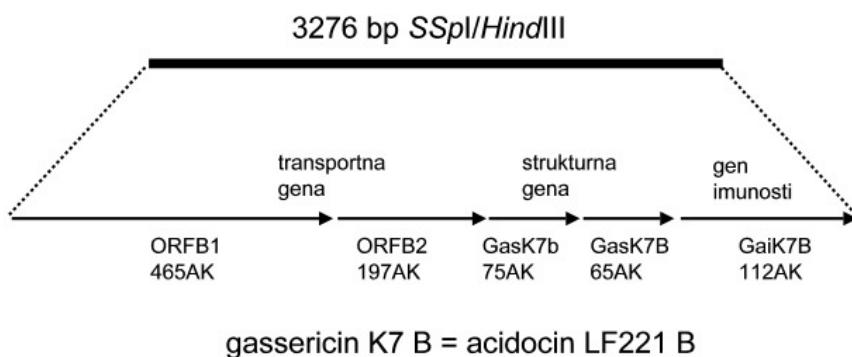
**Preglednica 13: Analiza 3276 bp nukleotidnega zaporedja DNA odseka *SspI/HindIII*, kodirajoče regije gassericina K7 B**

**Table 13: DNA sequence analysis of the 3276 bp *SspI/HindIII* fragment of the gassericin K7 B gene region**

<i>orf</i> (protein)	Mesto v nukleotidnem zaporedju	Število kodirajočih aminokislin	Rezultati primerjave BLAST	
			Homologni protein (številka v banki)	% homologije
<i>orfB1</i>	70-1467	465	ORF1 (AB029612)	98
			AmyT (AM403502)	83
			AbptT (AF408405)	69
			BrcT (AF075600)	46
<i>orfB2</i>	1478-2071	197	ORFB1' (AY297947)	100
			ORF2 (AB029612)	99
			ORF1 (P29470)	77
			AmyA (AM403502)	56
<i>orfBhip</i>	2139-2240	33	ORFB2 (AY297947)	100
			ORF3 (AB029612)	100
<i>orfB3</i> (GasK7b)	2373-2600	75	Acd221β (AY297947)	100
			GatA (AB029612)	100
			LafA (M57961)	62
			AmyLα (AM403502.1)	55
			SakT <sub>a</sub> (AY206863)	35
<i>orfB4</i> (GasK7B)	2610-2807	65	Acd221B (AY297947)	100
			GatX (AB029612)	98
			LafX (M57961)	55
			AmyLβ (AM403502)	38
<i>orfB5</i> (GaiK7B)	2823-3164	112	Aci221B (AY297947)	100
			ORF6 (AB029612)	100
			ORFZ (M57961)	34

3276 bp nukleotidnega zaporedja kodirajoče regije gassericina K7 B smo primerjali z nukleotidnimi zaporedji bakteriocinov v bazi podatkov NCBI. Ugotovili smo 100-odstotno identičnost petih odprtih bralnih okvirov (*orf*) gassericina K7 B (*orfB2*, *orfB3*, *orfBhip*, *orfB4* in *orfB5*) z odgovarjajočimi regijami acidocina LF221 B (delni *orfB1* domnevnega dodatnega transportnega proteina, *orfB2* hipotetičnega proteina, *orfB3* komplementarne podenote Acd221β, *orfB4* aktivne podenote Acd221B in *orfB5* proteina imunosti Aci221B); 98 do 100-odstotno identičnost vseh šestih odprtih bralnih okvirov gassericina

K7 B s proteini gassericina T (ORF1, ORF2, ORF3, GatA, GatX in ORF6) in delno ujemanje *orfB1* gassericina K7 B z od ATP-odvisnimi transportnimi proteini AbpT (69 %), AmyT (83 %) in BrdT (46 %), bakteriocinov ABP-118, amilovorina L in brohocina C; delno ujemanje *orfB2* gassericina K7 B z dodatnimi transportnimi proteini nekaterih laktobacilov; delno ujemanje *orfB3*, *orfB4* in *orfB5* gassericina K7 B s proteini LafA (62 %), LafX (55 %) in ORFZ (34 %), ki tvorijo laktacin F in protein imunosti laktacina F ter delno ujemanje komplementarne in aktivne podenote gassericina K7 B z AmyL $\alpha$  (55 %) in AmyL $\beta$  (38 %) amilovorina L in delno ujemanje komplementarne podenote GasK7b s SakT $\alpha$  (35 %) sakacina T.



Slika 20: **Shematski prikaz organizacije genov gassericina K7 B.**

Figure 20: **Scheme of gassericin K7 B genes.**

#### 4.1.3.3 N-terminalna vodilna zaporedja bakteriocinov sevov K7 in LF221

Ker smo pri analizi izpeljanih aminokislinskih zaporedij gassericinov K7 A in K7 B ter acidocinov LF221 A in LF221 B ugotovili prisotnost dveh glicinskih ostankov na mestih -1 in -2 glede na mesto procesiranja, smo N-terminalna vodilna zaporedja primerjali z vodilnimi zaporedji nekaterih dvopeptidnih bakteriocinov, s katerimi so posamezni bakteriocini sevov K7 in LF221 (delno) homologni. Prisotnost ohranjenih hidrofobnih AK na mestih -4(V ali I), -7(L) in -12(V ali L) ter hidrofilnih AK na mestih -8(Q, E ali T), -9(C, N, E ali H) in -11(N, S ali E) smo ugotovili pri vseh vodilnih zaporedjih posameznih podenot gassericinov K7 A in K7 B ter acidocinov LF221 A in LF221 B, kar je značilnost N-terminalnih vodilnih zaporedij skupine II bakteriocinov, dvoglicinskega tipa. Poravnava N-terminalnih aminokislinskih zaporedij vodilnih peptidov nekaterih dvopeptidnih bakteriocinov je prikazana v preglednici 14.

**Preglednica 14: Poravnava N-terminalnih aminokislinskih zaporedij vodilnih peptidov nekaterih dvopeptidnih bakteriocinov**

Table 14: Alignment of the N-terminal leader peptides of some two-peptide bacteriocins

Protein	Vodilno zaporedje	Številka v genski banki
GasK7a	<b>MKVΛNECQLQTVVGG</b>	EF392861
Acd221α	<b>MKVΛNECQLQTVVGG</b>	AY295874
GasK7A	<b>MIEKVSKNEΛSRIYGG</b>	EF392861
Acd221A	<b>MIEKVSKNEΛSRIYGG</b>	AY295874
BrcB	<b>MKKELLNKNEΛMSRIIYG</b>	AF075600
LcnN	MKKDEANTFKEYSSS <b>FAIVTDEELENINGS</b>	483242
SakT <sub>β</sub>	<b>MKTANIKLLTNQEΛMIEIFGG</b>	AY206863
ThmB	<b>MKQYNGFEVLHHELDΛLANVTGG</b>	U93029
GasK7b	<b>MKNFNTΛSFETΛANIIVGG</b>	AY307382
Acd221β	<b>MKNFNTΛSFETΛANIIVGG</b>	AY297947
GatA	<b>MKNFNTΛSFETΛANIIVGG</b>	AB029612
LafA	<b>MKQFNYΛSHKDΛAVVVGG</b>	M57961
AmyLα	<b>MSKGEVΛNEDEΛTAVVGG</b>	AM403502.1
SakT <sub>α</sub>	<b>MKNVQSLΛSKEEΛLVLVVGG</b>	AY206863
GasK7B	<b>MALKTΛEKHEΛRNVMGG</b>	AY307382
Acd221B	<b>MALKTΛEKHEΛRNVMGG</b>	AY297947
GatX	<b>MALKTΛEKHEΛRNVMGG</b>	AB029612
LafX	<b>MKLNDKEΛLSKIIVGG</b>	M57961
AmyLβ	<b>MKQLNSEQΛLQNIIYG</b>	AM403502
Ohranjen motiv	MK.....-- <b>LS--EL--I--GG</b> *---*○-○○*---*	

\* ..... hidrofobna AK

○ ..... hidrofilna AK

#### 4.1.3.4 Razvrstitev gassericinov K7 A in K7 B med bakteriocine MKB

Glede na tipično zaporedje genov genske gruče, potrebne za tvorbo bakteriocina skupine II (sliki 19 in 20), na osnovi ugotovljenih homologij gassericinov K7 A in K7 B z dvopeptidnimi bakteriocini (preglednici 12 in 13), in ohranjenega motiva N-terminalnih vodilnih zaporedij posameznih podenot gassericinov K7 A in K7 B (preglednica 14), smo oba bakteriocina seva K7 uvrstili med dvopeptidne bakteriocine, v podskupino bakteriocinov IIb po Nesu in sod. (1996) ter Diepu in Nesu (2002).

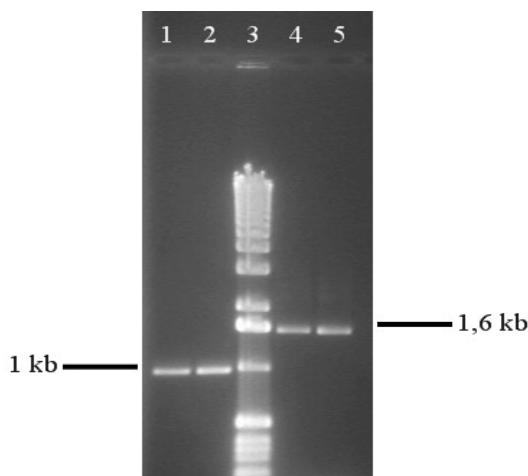
## 4.2 IZRAŽANJE BAKTERIOCINOV SEVOV K7 IN LF221 V RAZLIČNIH EKSPRESIJSKIH SISTEMIH

V naslednjem sklopu eksperimentov smo bakteriocine sevov K7 in LF221 poskušali heterologno izraziti v sedmih izbranih sevih grampozitivnih in gramnegativnih bakterij. Za izražanje posameznih bakteriocinov smo pripravili več različnih plazmidnih konstruktorjev in jih transformirali v različne gostiteljske oziroma ekspresijske seve (slika 7) ter ugotavliali, ali je prišlo do želene tvorbe bakteriocinov.

### 4.2.1 Izražanje gassericina K7 A in acidocina LF221 A v sevu *Lc. lactis* IL1403

Plazmidna konstrukta pTOPO-K7A(*HindIII*) in pTOPO-LF221A(*HindIII*), z vstavljenima operonoma za tvorbo gassericina K7 A oziroma acidocina LF221 A (~0,9 kb velika fragmenta, ki sta vsebovala struktorna gena za posamezni podenoti in gen za protein imunosti gassericina K7 A ali acidocina LF221 A), smo transformirali v celice *E. coli* TOP10. V izoliranih plazmidnih konstruktih transformant (priloga D1) smo preverili prisotnost in velikost insertov (priloga D2). Insertoma transformant *E. coli* pTOPO-K7A(*HindIII*)-1 in *E. coli* pTOPO-LF221A(*HindIII*)-2 smo določili še nukleotidno zaporedje, ki je bilo identično odgovarjajočim regijam gassericina K7 A in acidocina LF221 A. Zato smo iz obeh plazmidov izrezali ~0,9 kb velika fragmenta *EcoRI/HindIII*, ju vstavili v vektor pMG36e in transformirali v celice *E. coli* TG1. Izolirali smo štiri plazmidne konstrukte pMG-LF221A(*EcoRI/HindIII*) in K7A(*EcoRI/HindIII*) (priloga E1), v katerih smo preverili prisotnost in velikost inserta (priloga E2). Samo transformanta *E. coli* pMG-K7A(*EcoRI/HindIII*)-5 je vsebovala insert z nukleotidnim zaporedjem, ki je bilo identično gassericinu K7 A, zato smo ta plazmid vstavili v sev *Lc. lactis* IL1403 in preverili izražanje gassericina K7 A s pomočjo indikatorskega seva *L. sakei* 2714 (spot test s kolonijami). Cona zaviranja rasti se je pojavila samo okrog pozitivne kontrole - matičnega seva *L. gasseri* K7, ki tvori gassericina A in B. Izbrane transformante rasti indikatorskega seva niso zavirale, torej do izražanja gassericina K7 A ni prišlo oziroma bakteriocin ni bil aktivен.

Pripravili smo nova plazmidna konstrukta za izražanje gassericina K7 A in acidocina LF221 A v sevu *Lc. lactis* IL1403. Pomnožena operona za tvorbo gassericina K7 A in acidocina LF221 A, velikosti ~1 kb (slika 21, stolpca 1 in 2), smo vstavili v vektor pMG36e in s PCR na ligacijskih mešanicah operonu za tvorbo gassericina K7 A dodali promotor p32 na 5' koncu. Za acidocin LF221 A pomnožkov PCR na ligacijski mešanici kljub večkratnim ponovitvam nismo uspeli dobiti.

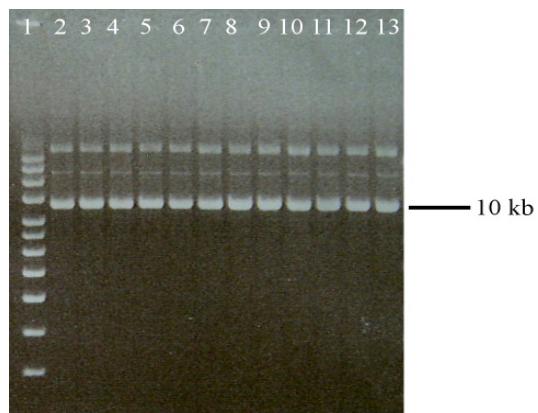


**Slika 21: Operoni gassericinov K7 A in B ter acidocinov LF221 A in B, pomnoženi na genomski DNA sevov K7 in LF221.** Stolpca 1 in 2: pomnožka PCR gassericina K7 A in acidocina LF221 A (z začetnima oligonukleotidoma A-81 down/858-left), stolpec 3: označevalec velikosti 1 kb, stolpca 4-5: pomnožka PCR gassericina K7 B in acidocina LF221 B (z začetnima oligonukleotidoma BBdown/B-3226up).

**Figure 21: PCR products of gassericins K7 A in B and acidocins LF221 A in B operons on genomic DNA of K7 and LF221 strains.** Lanes 1 and 2: PCR products of gassericin K7 A and acidocin LF221 A (using primers A-81 down/858-left), lane 3: 1 kb DNA ladder, lanes 4-5: PCR products of gassericin K7 B and acidocin LF221 B (using primers BBdown/B-3226up).

Očiščen pomnožek "p32-gasK7A", velikosti ~1,2 kb, smo vstavili v vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> in konstrukt transformirali v celice *E. coli* TOP10. Fragment pričakovane velikosti ~1,2 kb, ki je vseboval promotor p32 in operon za tvorbo gassericina K7 A, sta vsebovala dva plazmida: pTOPO-p32-K7A-9 in pTOPO-p32-K7A-10, pri katerih smo zato preverili prisotnost in velikost inserta s PCR. Izbrali smo začetna oligonukleotida, specifična za vektor in bakteriocin (pMG4/858-left) ter določili nukleotidni zaporedji insertov, ki sta bili identični nukleotidnemu zaporedju gassericina K7 A. Plazmid pTOPO-p32-K7A-9 smo ligirali v vektor pIL253, plazmid pTOPO-p32-K7A-10 pa v vektorja pIL252 in pIL253 ter plazmidne konstrukte vstavili v celice *E. coli* TG1. Izolirali smo po pet plazmidov transformant *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7A(9), *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7A(10) in *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-K7A(10) (priloga F1 in F2), ki so bili pričakovano veliki ~10 kb in so vsebovali ~1,2 kb velike inserte (priloga F3). Transformante *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-K7A(10) so vsebovale še ~5 kb velike plazmide, katerih funkcije ne poznamo. Insertoma iz plazmidov pTOPO-pIL253-p32-K7A(9)-1 in pTOPO-pIL252-p32-K7A(10)-11 smo določili nukleotidno zaporedje, ki je bilo identično z nukleotidnim zaporedjem gassericina K7 A. Zato smo ta dva plazmida vstavili v sev *Lc. Lactis* IL1403, izolirali tri plazmide transformant *Lc. Lactis* IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7A(9) in 9 plazmidov transformant *Lc. Lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A(10) (slika 22) ter prisotnost in velikost insertov preverili s PCR (slika 23). Vsi izolirani plazmidni konstrukti so bili ustrezne velikosti (~10 kb) in prav tako vsi pomnožki PCR (~1,2 kb). Transformantama

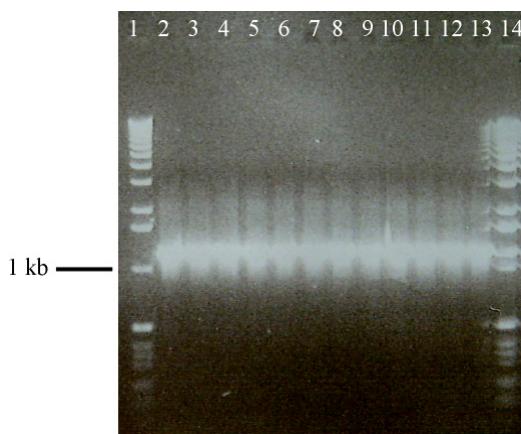
*Lc. Lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A(10)-4 in pTOPO-pIL253-p32-K7A(10)-1 smo določili nukleotidni zaporedji, ki sta bili identični z nukleotidnim zaporedjem gassericina K7 A.



Slika 22: **Plazmidna DNA transformant *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7A(9) in *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A(10).** Stolpec 1: označevalec velikosti supercoiled DNA ladder, stolpci 2-4: plazmidna DNA transformant *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7A(9) 1-3, stolpci 5-13: plazmidna DNA transformant *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A(10) 1-9.

Figure 22: **Plasmid DNA of *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7A(9) and *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A(10) transformants.** Lane 1: supercoiled DNA ladder, lanes 2-4: plasmid DNA of *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7A(9) transformants 1-3, lanes 5-13: plasmid DNA of *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A(10) transformants 1-9.

Izražanje gassericina K7 A smo v sevu *Lc. lactis* IL1403 preverili s pomočjo indikatorskega seva *L. sakei* 2714 (spot test s kolonijami ter difuzijski test z brezceličnimi supernatanti in s skoncentriranimi brezceličnimi supernatanti, oborjenimi z amonijevim sulfatom). Izrazita cona zaviranja rasti indikatorskega seva *L. sakei* 2714 s premerom ~11 mm se je pojavila samo okrog pozitivnih kontrol - matičnih sevov *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221, ki tvorita gassericina K7 A in B oziroma acidocina LF221 A in B. Okrog testiranih transformant je bila cona le ~1 mm. Ker smo tudi okoli negativne kontrole (sev *Lc. lactis* IL1403), opazili tanko cono (~1 mm), con okoli testiranih transformant nismo mogli označiti kot pozitivni rezultat. Zato smo zaključili, da do izražanja gassericina K7 A najverjetneje ni prišlo oziroma bakteriocin ni bil aktiven.



**Slika 23: Preverjanje prisotnosti in velikosti inserta v transformantah *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7A(9) in *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A(10) s PCR, z začetnima oligonukleotidoma pMG4 in 858-left.** Stolpca 1 in 14: označevalec velikosti 1 kb, stolpci 2-4: pomnožki PCR transformant *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7A(9) 1-3, stolpci 5-13: pomnožki PCR transformant *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A(10) 1-9.

**Figure 23: PCR products of inserts of *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7A(9) and *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A(10) transformants using primers pMG4 and 858-left.** Lanes 1 and 14: 1 kb DNA ladder, lanes 2-4: PCR products of *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7A(9) transformants 1-3, lanes 5-13: PCR products of *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A(10) transformants 1-9.

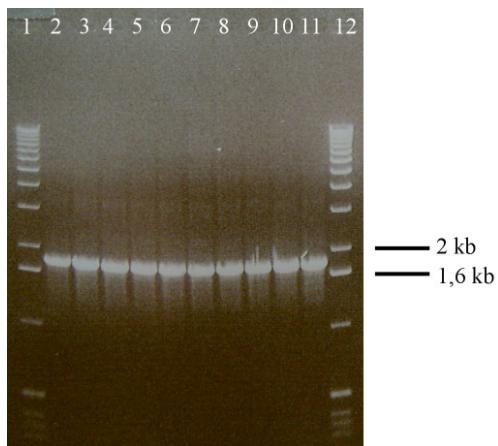
#### 4.2.2 Izražanje gassericina K7 A v sevu *Lc. lactis* K1

Sev *Lc. Lactis* K1, ki tvori laktokokcin A, smo zaradi podobnega transportnega sistema, kot ga predvidoma uporabljajo bakteriocini seva K7, uporabili kot donor v konjugaciji s preverjeno transformanto *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A-4 (poglavlje 3.4.10), ki je vsebovala plazmidni konstrukt z operonom za tvorbo gassericina K7 A in promotorjem p32 in je predstavljala akceptor. Transkonjugante so zrasle pri razmerju donor:akceptor 10:1 (pri 1000-kratni razredčitvi akceptorja) oziroma 100:1 (pri 10000-kratni razredčitvi akceptorja). V desetih transkonjugantah smo preverili tvorbo laktokokcina A in gassericina K7 A. Prelili smo jih s transformanto *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A-5, ki je, zaradi svoje občutljivosti za laktokokcin A, za transkonjugante predstavljala indikatorski sev za tvorbo laktokokcina A. Izraziti coni zaviranja rasti (s premerom ~2 cm) sta se pojavili okrog transkonjugante *Lc. lactis* K1-K7A-4 in okrog pozitivne kontrole - donorja *Lc. lactis* K1, ki je matični proizvajalec laktokokcina A. Transkonjuganto *Lc. lactis* K1-K7A-4 in kontrole smo prelimi še z indikatorskim sevom *L. sakei* 2714, ki za laktokokcin A ni občutljiv (je pa občutljiv za bakteriocinski kompleks seva K7). Cona zaviranja rasti seva *L. sakei* 2714 je nastala samo okrog matičnega seva *L. gasseri* K7, okrog transkonjugante *Lc. lactis* K1-K7A-4 pa ne. Transkonjuganta *Lc. lactis* K1-K7A-4 je torej tvorila laktokokcin A, gassericina K7 A pa

najverjetneje ne, oziroma le ta ni bil aktiven. Iz transkonjugante *Lc. lactis* K1-K7A-4 smo izolirali plazmid pričakovane velikosti, ~10 kb (priloga G) in vstavljenemu insertu določili tudi nukleotidno zaporedje, ki je bilo identično nukleotidnemu zaporedju gassericina K7 A.

#### 4.2.3 Izražanje gassericina K7 B in acidocina LF221 B v sevu *Lc. lactis* IL1403

Za izražanje gassericina K7 B in acidocina LF221 B v sevu *Lc. lactis* IL1403 smo pripravili podobna plazmidna konstrukta, kot za izražanje gassericina K7 A v istem sevu. Operona za tvorbo gassericina K7 B in acidocina LF221 B (ki sta vsebovala del gena za dodatni transportni protein, strukturna gena za obe podenoti in gen za protein imunosti), velikosti ~1,6 kb (slika 21, stolpca 4 in 5), smo ligirali v vektor pMG36e in jima na 5' koncu dodali promotor p32. Fragmenta "p32-gasK7B" in "p32-acidLF221B", velikosti ~1,8 kb smo ligirali v vektor pCR® 2.1-TOPO® in vstavili v celice *E. coli* TOP10, iz katerih smo izolirali pet plazmidov pričakovane velikosti ~5,7 kb, ki so vsebovali tudi inserte pričakovane velikosti, ~1,8 kb (prisotnost in velikost vstavljenih fragmentov smo preverili s PCR, z začetnima oligonukleotidoma pMG4/B-3226up). Insertoma v plazmidih pTOPO-p32-K7B-4 in pTOPO-p32-LF221B-4 smo določili nukleotidni zaporedji, ki sta bili identični z nukleotidnim zaporedjem gassericina K7 B oziroma acidocina LF221B, zato smo ju ligirali v vektor pIL252 in vstavili v celice *E. coli* TG1. Izolirali smo sedem plazmidov transformant *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-K7B(4) in tri plazmide transformant *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-LF221B(4) (priloga H1), ki so bili pričakovane velikosti, ~10 kb in so vsebovali ~1,8 kb velike inserte (priloga H2). Večina transformant je vsebovala še ~5,5 kb velike plazmide, katerih funkcije ne poznamo. Insertoma v plazmidih pTOPO-pIL252-p32-K7B(4)-2 in pTOPO-pIL252-p32-LF221B(4)-3 smo določili nukleotidni zaporedji, ki sta bili identični nukleotidnima zaporedjema gassericina K7 B in acidocina LF221 B. Zato smo oba plazmida vstavili v sev *Lc. Lactis* IL1403, izolirali po pet plazmidov transformant *Lc. Lactis* IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7B(2) in *Lc. Lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) in preverili prisotnost insertov s PCR, z začetnima oligonukleotidoma pMG4/B-3226up (slika 24). Vsi izolirani plazmidni konstrukti so bili ustrezne velikosti (~10 kb) in so vsebovali inserte, velike ~1,8 kb. Insertoma transformant *Lc. Lactis* IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7B(2)-1 in *Lc. Lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3)-1 smo določili nukleotidni zaporedji, ki sta bili identični z nukleotidnim zaporedjem gassericina K7 B oziroma acidocina LF221 B.



**Slika 24: Preverjanje prisotnosti in velikosti inserta v transformantah *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) in *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) s PCR, z začetnima oligonukleotidoma pMG4 in B-3226up.** Stolpca 1 in 12: označevalec velikosti 1 kb, stolpci 2-6: pomnožki PCR transformant pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) 1-5, stolpci 7-11: pomnožki PCR transformant pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) 1-5.

**Figure 24: PCR products of inserts of *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) and *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) transformants using primers pMG4 and B-3226up.** Lanes 1 and 12: 1 kb DNA ladder, lanes 2-6: PCR products of pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) transformants 1-5, lanes 7-11: PCR products of pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) transformants 1-5.

Izražanje gassericina K7 B in acidocina LF221 B smo v sevu *Lc. lactis* IL1403 preverili s pomočjo indikatorskega seva *L. sakei* 2714 (spot test s kolonijami in difuzijski test z brezceličnimi in liofiliziranimi brezceličnimi supernatanti). Izrazita cona zaviranja rasti indikatorskega seva s premerom ~10 mm se je pojavila samo okrog pozitivnih kontrol - matičnih sevov *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221, ki tvorita gassericina K7 A in B oziroma acidocina LF221 A in B. Okrog testiranih transformant pa je bila cona le ~2 mm, ravno tako tudi okrog negativne kontrole (sev *Lc. lactis* IL1403). Zato con okoli testiranih transformant nismo mogli označiti kot pozitivni rezultat in smo zaključili, da do izražanja gassericina K7 B in acidocina LF221 B najverjetneje ni prišlo oziroma bakteriocina nista bila aktivna.

#### 4.2.4 Izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B v sevu *Ent. faecium* 2749

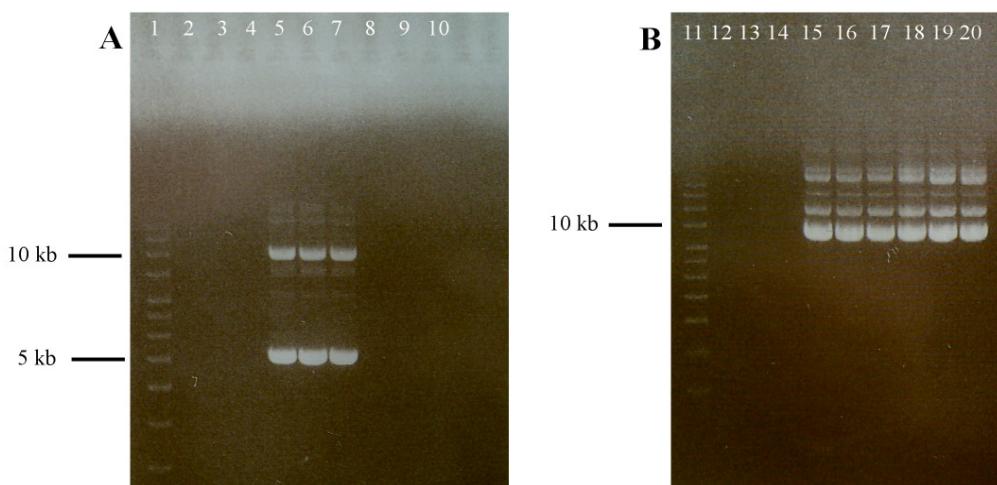
Zaradi poznanih transportnih in regulacijskih mehanizmov, smo za heterologno izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 A izbrali sev *Ent. faecium* 2749, ki tvori enterocina A in B in je občutljiv za bakteriocinska kompleksa sevov K7 in LF221. V sev smo vstavili plazmidne konstrukte s preverjenimi inserti (operoni za tvorbo gassericinov K7 A, K7 B in acidocina LF221 B, z dodanim promotorjem p32), ki smo jih pripravili že za izražanje omenjenih bakteriocinov v sevu *Lc. lactis* IL1403: pTOPO-pIL252-p32-

K7A(10)-11, pTOPO-pIL252-p32-K7B(4)-2 in pTOPO-pIL252-p32-LF221B(4)-3. S plazmidnim konstruktom za tvorbo gassericina K7 A (pTOPO-pIL252-p32-K7A(11)) nismo dobili nobene transformante, iz transformant *Ent. faecium* 2749 pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) in *Ent. faecium* 2749 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) pa smo izolirali po 5 plazmidov, ki so bili veliki ~10 kb (priloga I1) in preverili prisotnost in velikost insertov, ki so bili veliki ~1,8 kb (priloga I2). Insertoma iz plazmidov transformant *Ent. faecium* 2749 pTOPO-pIL252-p32-K7B(2)-1 in *Ent. faecium* 2749 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(2)-1 smo določili nukleotidni zaporedji, ki sta bili identični z nukleotidnim zaporedjem gassericina K7 B oziroma acidocina LF221 B.

Izražanje gassericina K7 B in acidocina LF221 B smo preverili s pomočjo indikatorskih sevov *Ent. faecalis* 2708 in *L. sakei* 2714, ki sta občutljiva za enterocina A in B (spot test s kolonijami in difuzijski test z liofiliziranimi brezceličnimi supernatanti). Pojavile so se izrazite cone zaviranja rasti s premerom ~20 mm, kar je pomenilo, da transformante tvorijo enterocina A in B. Vzporedno pa smo transformante oziroma njihove supernatante prelili še z matičnim sevom *Ent. faecium* 2749, ki je občutljiv za bakteriocinska kompleksa sevov K7 in LF221 - v tem primeru sta se coni zaviranja rasti (~15 mm) pojavili samo okrog pozitivnih kontrol - matičnih sevov *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221, ki tvorita gassericina K7 A in B oziroma acidocina LF221 A in B. Okrog testiranih transformant pa je bila cona le ~3 mm, ravno tako tudi okrog negativne kontrole (sev *Ent. faecium* 2749), zato smo zaključili, da do izražanja gassericina K7 B in acidocina LF221 B najverjetneje ni prišlo, oziroma bakteriocina nista bila aktivna.

#### **4.2.5 Izražanje gassericina K7 A in K7 B ter acidocin LF221 B v sevih *E. coli* 2746 in *E. coli* 2747**

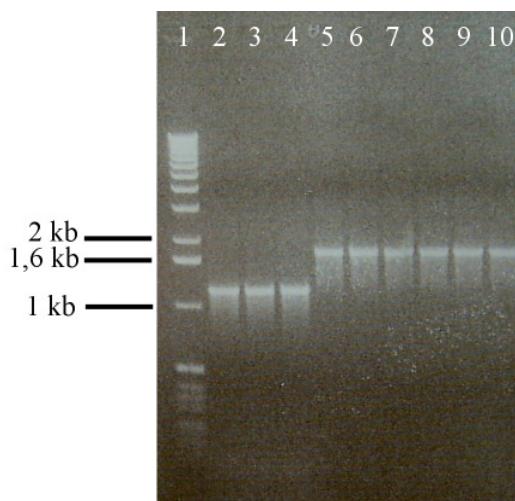
Seva *E. coli* 2746 (divji tip) in *E. coli* 2747 tvorita kocin V, ki je po svojih lastnostih in mehanizmih izločanja in procesiranja precej podoben bakteriocinom skupine II MKB, kamor spadajo tudi bakteriocini sevov K7 in LF221. Zato smo plazmidne konstrukte z operoni za izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B, z dodanim promotorjem p32 (iste, kot za izražanje v sevih *Lc. lactis* IL1403 in *Ent. faecium* 2749: pTOPO-pIL252-p32-K7A(10)-11, pTOPO-pIL252-p32-K7B(4)-2 in pTOPO-pIL252-p32-LF221B(4)-3) vstavili v omenjena seva. Rekombinantne plazmide, ki so bili pričakovane velikosti, ~10 kb, smo uspeli izolirati le iz transformant *E. coli* 2747, iz transformant *E. coli* 2746 pa ne (sliki 25A in 25B). Pri transformantah s plazmidnimi konstruktmi z insertom za tvorbo gassericina K7 A, so na gelu opazne še dodatne lise, najmočnejše pri velikosti ~5 kb (slika 25A, stolpci 5-7), katerih funkcije ne poznamo.



Slike 25A in B: **Plazmidna DNA transformant *E. coli* 2746 in *E. coli* 2747 s konstrukti: pTOPO-pIL252-p32-K7A(11), pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) in pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3).** Stolpca 1 in 11: označevalec velikosti supercoiled DNA ladder, stolpci 2-4: plazmidna DNA transformant *E. coli* 2746 K7A(11) 1-3, stolpci 5-7: plazmidna DNA transformant *E. coli* 2747 K7A(11) 1-3, stolpci 8-10: plazmidna DNA transformant *E. coli* 2746 K7B(2) 1-3, stolpci 12-14: plazmidna DNA transformant *E. coli* 2746 LF221B(3) 1-3, stolpci 15-17: plazmidna DNA transformant *E. coli* 2747 LF221B(3) 1-3, stolpci 18-20: plazmidna DNA transformant *E. coli* 2747 K7B(2) 1-3.

Figures 25A and B: **Plasmid DNA of *E. coli* 2746 and *E. coli* 2747 transformants, carrying pTOPO-pIL252-p32-K7A(11), pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) and pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) constructs.** Lanes 1 and 11: supercoiled DNA ladder, lanes 2-4: plasmid DNA of transformants *E. coli* 2746 K7A(11) 1-3, lanes 5-7: plasmid DNA of transformants *E. coli* 2747 K7A(11) 1-3, lanes 8-10: plasmid DNA of transformants *E. coli* 2746 K7B(2) 1-3, lanes 12-14: plasmid DNA of transformants *E. coli* 2746 LF221B(3) 1-3, lanes 15-17: plasmid DNA of transformants *E. coli* 2747 LF221B(3) 1-3, lanes 18-20: plasmid DNA of transformants *E. coli* 2747 K7B(2) 1-3.

Prisotnost in velikost insertov smo preverili v vseh izoliranih plazmidih transformant *E. coli* 2747 (slika 26). Pri transformantah *E. coli* 2747 K7A(11) 1-3 so bili pomnožki veliki ~1,2 kb (slika 26, stolpci 2-4), pri transformantah *E. coli* 2747 LF221B(3) 1-3 in *E. coli* 2747 K7B(2) 1-3 pa ~1,8 kb (slika 26, stolpci 5-10). Insertom iz plazmidov transformant *E. coli* 2747 pTOPO-pIL252-p32-K7A(11)-1, *E. coli* 2747 pTOPO-pIL252-p32-K7B(2)-2 in *E. coli* 2747 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3)-3 smo določili nukleotidna zaporedja, ki so bila identična z nukleotidnimi zaporedji gassericina K7 A, gassericina K7 B oziroma acidocina LF221 B.



**Slika 26: Preverjanje prisotnosti inserta v transformantah *E. coli* 2747 pTOPO-pIL252-p32-K7A(11), *E. coli* 2747 pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) in *E. coli* 2747 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) s PCR, z začetnimi oligonukleotidi pMG4/858-left oziroma pMG4/B-3226up.** Stolpec 1: označevalec velikosti 1 kb, stolci 2-4: pomnožki PCR transformant *E. coli* 2747 K7A(11) 1-3, stolci 5-7: pomnožki PCR transformant *E. coli* 2747 LF221B(3) 1-3, stolci 8-10: pomnožki PCR transformant *E. coli* 2747 K7B(2) 1-3.

**Figure 26: PCR products of inserts of *E. coli* 2747 pTOPO-pIL252-p32-K7A(11), *E. coli* 2747 pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) and *E. coli* 2747 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) transformants using primers pMG4/858-left and pMG4/B-3226up, respectively.** Lane 1: 1 kb DNA ladder, lanes 2-4: PCR products of *E. coli* 2747 K7A(11) transformants 1-3, lanes 5-7: PCR products of *E. coli* 2747 LF221B(3) transformants 1-3, lanes 8-10: PCR products of *E. coli* 2747 K7B(2) transformants 1-3.

Izražanje gassericinov K7 A in B ter acidocina LF221 B smo preverili s pomočjo indikatorskega seva *L. sakei* 2714 (spot test s kolonijami, difuzijski test z brezceličnimi supernatanti in s skoncentriranimi brezceličnimi supernatanti, oborjenimi z amonijevim sulfatom; dializiranimi proti PEG; liofiliziranimi, ter spot test z mešanimi kulturami). Izrazite cone zaviranja rasti indikatorskega seva *L. sakei* 2714 s premerom ~10 mm so se pojavljale okrog pozitivnih kontrol - matičnih sevov *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221, ki tvorita gassericina K7 A in B oziroma acidocina LF221 A in B. Okrog testiranih transformant pa so bile cone zaviranja rasti le ~1-2 mm, bodisi neizrazite bodisi z zabrisanim robom, primerljive s conami okrog negativne kontrole (sev *E. coli* 2747). Bakteriocinsko aktivnost skoncentriranih brezceličnih supernatantov smo preverili tudi na mikrotiterskih ploščah, kjer zopet ni prišlo do zaviranja rasti indikatorskega seva *L. sakei* 2714. Zato predvidevamo, da do izražanja gassericinov K7 A in B in acidocina LF221 B najverjetneje ni prišlo oziroma bakteriocina nista bila aktivna.

#### **4.2.6 Izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B v sevu *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup>**

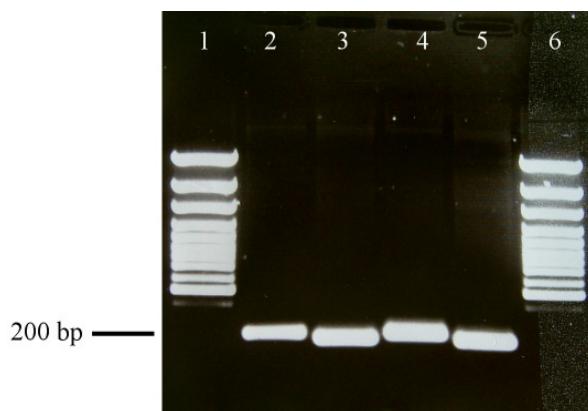
Za izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B smo izbrali tudi nebakteriocinogeno mutanto *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup>, v katero smo vstavili plazmidne konstrukte z operoni za izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B, z dodanim promotorjem p32 (iste kot v poglavjih: 4.2.2/4.2.3, 4.2.4 in 4.2.5): pTOPO-pIL252-p32-K7A(10)-11, pTOPO-pIL252-p32-K7B(4)-2 in pTOPO-pIL252-p32-LF221B(4)-3. Iz transformant *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup> nismo uspeli izolirati vstavljenih plazmidnih konstruktov, čeprav smo za izolacijo plazmidne DNA uporabili različne postopke (modificirano klasično metodo in komercialne komplete; poglavje 3.4.2.2). Kljub temu smo naredili spot teste s kolonijami, ki smo jih prelili z indikatorskim sevom *L. sakei* 2714, vendar transformante *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup> njegove rasti niso zavirale. Zato sklepamo, da transformacija konstruktov za gassericina A in B ter acidocin B v nebakteriocinogeno mutanto *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup> ni bila uspešna.

#### **4.2.7 Inducibilno izražanje posameznih podenot gassericina K7 A brez N-terminalnih vodilnih zaporedij, v sevih *E. coli* BL21 DE3 pLysS, *Lc. lactis* IL1403 in *Lc. lactis* NZ9000**

Pripravili smo plazmidne konstrukte za inducibilno izražanje posameznih podenot gassericina K7 A, da bi izrazili zrel bakteriocin.

##### **4.2.7.1 Izražanje GasK7a in GasK7A v *E. coli* BL21 DE3 pLysS**

Strukturna gena za komplementarno (GasK7a) in aktivno (GasK7A) podeno gassericina K7 A, brez N-terminalnih vodilnih zaporedij, smo pomnožili na preverjenem rekombinantnem plazmidu pTOPO-p32-K7A-10 (poglavje 4.2.1). Pomnožke, velike ~200 bp (slika 27), smo ligirali v vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy in prenesli v celice *E. coli* DH5α.

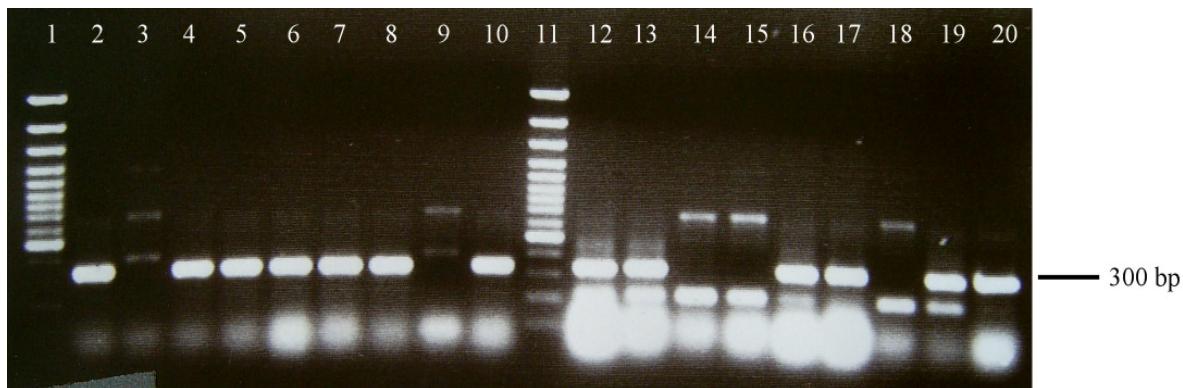


**Slika 27: Pomnožene podenote gassericina K7 A brez N-terminalnih vodilnih zaporedij.** Stolpcu 1 in 6: označevalec velikosti 100 bp Plus, stolci 2-5: pomnožki PCR podenot gassericina K7 A; stolpec 2: gasK7a, stolpec 3: gasK7A, stolpec 4: gasK7a+A(a), stolpec 5: gasK7a+A(A).

**Figure 27: Amplified components of gassericin K7 A without N-terminal leader sequences.** Lanes 1 and 6: 100 bp DNA ladder Plus, lanes 2-5: PCR products of gassericin K7 A components; lane 2: gasK7a, lane 3: gasK7A, lane 4: gasK7a+A(a), lane 5: gasK7a+A(A).

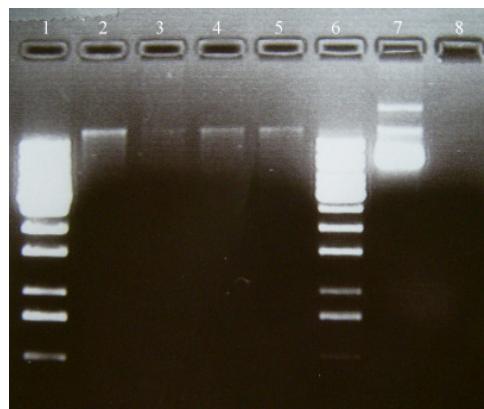
S PCR na osnovi kolonije smo preverili vsebnost in velikost insertov v transformantah (priloga J1) in iz transformant *E. coli* pGEM-gasK7a-1, -2 in *E. coli* pGEM-gasK7A-4, ki so vsebovale inserte, velike ~400 bp (~200 bp je prispeval insert in ~200 bp vektor), izolirali plazmide (priloga J2) pričakovane velikosti, ~3,5 kb. Insertoma iz plazmidov pGEM-gasK7a-1 in pGEM-gasK7A-4 smo določili nukleotidno zaporedje, ki je bilo identično nukleotidnemu zaporedju genov za GasK7a oziroma GasK7A. Zato smo ju ligirali v vektor pET-28a(+) in vstavili v celice *E. coli* DH5 $\alpha$ . S PCR na osnovi kolonije smo preverili vsebnost in velikost insertov v transformantah *E. coli* pET-gasK7a(1) in *E. coli* pET-gasK7A(4) (slika 28) in izolirali plazmidne konstrukte (priloga K), za katere smo ugotovili, da ne vsebujejo vstavljenih genov za GasK7a oziroma GasK7A.

Zato smo skušali pridobiti nove "pozitivne" transformante s PCR na osnovi kolonije, s kombinacijami začetnih oligonukleotidov, specifičnih za vektor in bakteriocin (da bi se izognili lažno pozitivnim pomnožkom). Vedno smo dobili pomnožke pričakovane velikosti, ko pa smo nato transformante nacepili v tekoče selektivno gojišče (LB s kloramfenikolom), transformante bodisi niso zrasle, bodisi iz prekonočnih kultur nismo uspeli izolirati plazmidne DNA. (slika 29). Zato smo ponovili ligacijo genov za GasK7a in GasK7A v vektor pET-28a(+) in prenos konstruktorjev v celice *E. coli* DH5 $\alpha$ , vendar tudi pri teh transformantah nismo uspeli izolirati plazmidov, četudi je velikost pomnožkov PCR nakazovala prisotnost inserta v plazmidnem konstruktu. Nasprotno pa smo iz transformant, kjer nismo dobili ustrezno velikih pomnožkov PCR, izolirali plazmidne konstrukte, ki niso vsebovali insertov za GasK7a oziroma GasK7A. Konstruktov pET-GasK7a in pET-GasK7A nismo uspeli pridobiti.



Slika 28: Preverjanje prisotnosti in velikosti inserta v transformantah *E. coli* pET, s PCR na osnovi kolonije, z začetnima oligonukleotidoma promT7 in T7term. Stolpca 1 in 11: označevalec velikosti 100 bp Plus, stolpci 2-10: pomnožki PCR transformant *E. coli* pET-gasK7a 1-9, stolpci 12-20: pomnožki PCR transformant *E. coli* pET-gasK7A 1-9.

Figure 28: Colony PCR products of inserts of *E. coli* pET transformants, using primers promT7 and T7term. Lanes 1 and 11: 100 bp DNA ladder Plus, lanes 2-10: PCR products of *E. coli* pET-gasK7a 1-9 transformants, lanes 12-20: PCR products of *E. coli* pET-gasK7A 1-9 transformants.

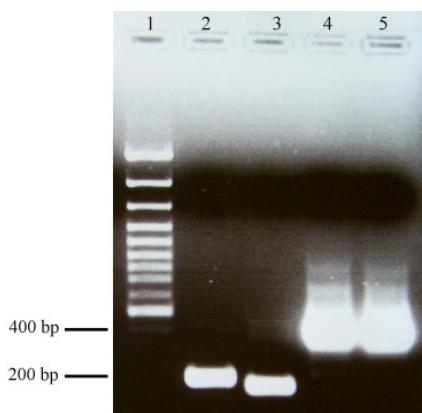


Slika 29: Plazmidna DNA transformant *E. coli* pET z domnevnnimi konstrukti pET-gasK7a in pET-gasK7A. Stolpca 1 in 6: označevalec velikosti 1 kb, stolpci 2-5: plazmidna DNA transformant *E. coli* pET-gasK7a-1, -2, -3, -4; stolpci 7-8: plazmidna DNA transformant *E. coli* pET-gasK7A-5, -6.

Figure 29: Plasmid DNA of *E. coli* pET transformants, supposedly carrying constructs pET-gasK7a and pET-gasK7A. Lanes 1 and 6: 1 kb DNA ladder, lanes 2-5: plasmid DNA of *E. coli* pET-gasK7a-1, -2, -3, -4 transformants; lanes 7-8: plasmid DNA of *E. coli* pET-gasK7A-5, -6 transformants.

#### 4.2.7.2 Izražanje GasK7a in GasK7A v *Lc. lactis* IL1403 in *Lc. lactis* NZ9000

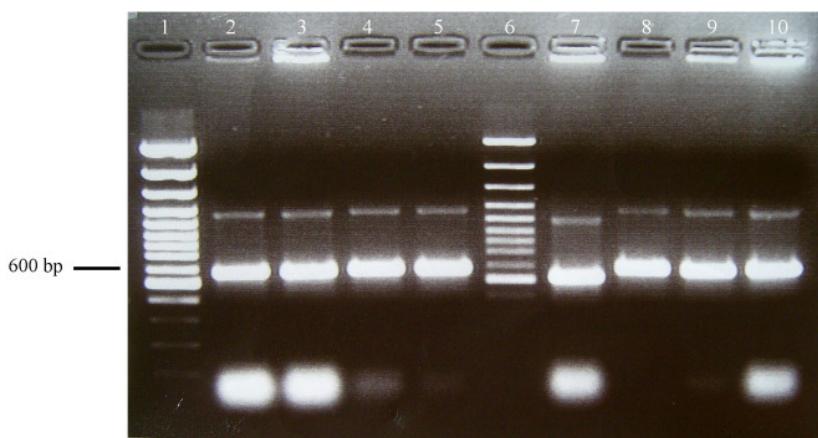
Za inducibilno izražanje zrelega gassericina K7 A s sistemom NICE, v ekspresijskem sevu *Lc. Lactis* NZ9000, smo pripravili plazmidni konstrukt pGEM-GasK7(a+A), z genoma za obe podenoti gassericina K7 A, brez N-terminalnih vodilnih zaporedij (poglavlje 3.1.2.7). Pomnožke, velike ~200 bp (slika 27, stolpca 4 in 5), smo ligirali v vektor pGEM®-T Easy in vstavili v celice *E. coli* DH5 $\alpha$ . Na rekombinantnih plazmidih pGEM-gasK7a+A(a)-1 in pGEM-gasK7a+A(A)-2, s preverjenima insertoma (identično nukleotidno zaporedje z genom za GasK7a oziroma GasK7A), smo pomnožili posamezni podenoti gassericina K7 A (z začetnima oligonukleotidoma GA1+2-F-Nco/GA1+2-R-Eco GasK7a, z začetnima oligonukleotidoma GA1+2-F-Eco/GA1+2-R-Xba pa GasK7A). Očiščene pomnožke smo ligirali skupaj in na ligacijski mešanici s PCR pomnožili ~400 bp velika fragmenta "GasK7(a+A)" (slika 30, stolpca 4 in 5), ju ligirali v vektor pGEM®-T Easy in prenesli v celice *E. coli* DH5 $\alpha$ .



Slika 30: **Pomnožki PCR na ligacijskih mešanicah "gasK7(a+A)", z začetnima oligonukleotidoma GA1+2-F-Neo in GA1+2-R-Xba.** Stolpec 1: označevalec velikosti 100 bp Plus, stolpca 2-3: pozitivni kontroli; stolpec 2: komplementarna podenota gasK7a, stolpec 3: aktivna podenota gasK7A; stolpcia 4-5: pomnožki PCR na ligacijskih mešanicah gasK7(a+A).

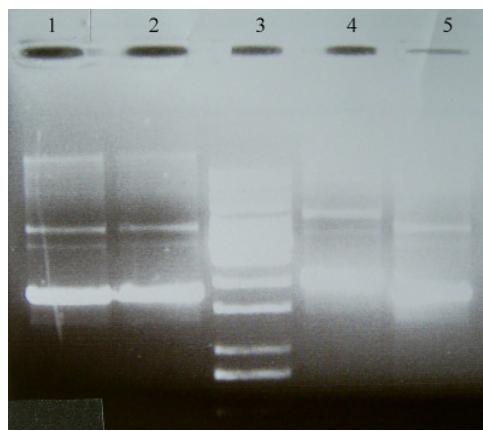
Figure 30: **PCR products of "gasK7a+A" ligation mixtures, using primers GA1+2-F-Nco and GA1+2-R-Xba.** Lane 1: 100 bp DNA ladder Plus, lanes 2-3: positive controls; lane 2: complemental factor gasK7a, lane 3: active factor gasK7A; lanes 4-5: PCR products of gasK7(a+A) ligation mixtures.

Preverjen insert smo iz plazmida *E. coli* pGEM-gasK7(a+A)-4 izrezali z restriktazama *NcoI* in *XbaI*, ligirali v ekspresijski vektor pNZ8148 in prenesli v sev *Lc. Lactis* IL1403. S PCR na osnovi kolonije smo preverili prisotnost in velikost insertov (slika 31), ki so bili veliki ~600 bp (~400 bp je prispeval insert in ~200 bp vektor). Izolirali smo le en plazmid (pNZ8148-gasK7(a+A)-4) z vstavljenim insertom, z ustreznim nukleotidnim zaporedjem (slika 32, stolpec 4). Zato smo ta plazmidni konstrukt in prazen plazmidni vektor pNZ8148 prenesli v ekspresijski sev *Lc. lactis* NZ9000.



**Slika 31: Preverjanje prisotnosti in velikosti inserta v transformantah *Lc. lactis* IL 1403 pNZ8148-gasK7(a+A), s PCR na osnovi kolonije, s kombinacijama začetnih oligonukleotidov pMSP-uni/GA1+2-R-Xba in GA1+2-F-Nco/GA1+2-R-Xba.** Stolpca 1 in 7: označevalec velikosti 100 bp Plus, stolpci 2-4 in 8-10: pomnožki PCR transformant *Lc. lactis* IL 1403 pNZ8148-gasK7(a+A) z začetnima oligonukleotidoma pMSP-uni/GA1+2-R-Xba, stolpci 5-6 in 11-12: pomnožki PCR transformant *Lc. lactis* IL 1403 pNZ8148-gasK7(a+A) z začetnima oligonukleotidoma GA1+2-F-Nco/GA1+2-R-Xba.

**Figure 31: Colony PCR products of inserts of *Lc. lactis* IL 1403 pNZ8148-gasK7(a+A) transformants, using combination of primers pMSP-uni/GA1+2-R-Xba and GA1+2-F-Nco/GA1+2-R-Xba.** Lanes 1 and 7: 100 bp DNA ladder Plus, lanes 2-4 and 8-10: PCR products of *Lc. lactis* IL 1403 pNZ8148-gasK7(a+A) transformants, using primers pMSP-uni/GA1+2-R-Xba; lanes 5-6 and 11-12: PCR products of *Lc. lactis* IL 1403 pNZ8148-gasK7(a+A) transformants, using primers GA1+2-F-Nco/GA1+2-R-Xba.

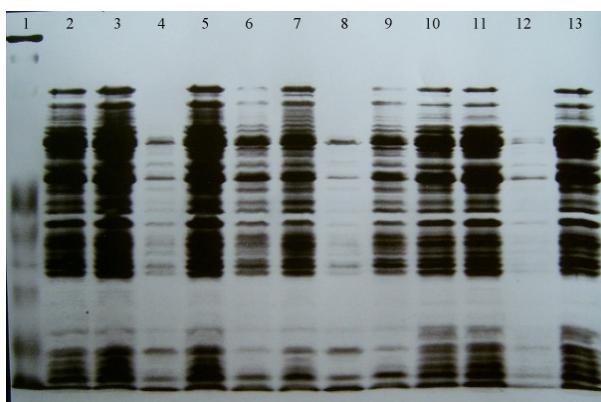


**Slika 32: Plazmidna DNA transformant *Lc. lactis* IL 1403 pNZ8148-gasK7(a+A).** Stolpec 1: pNZ8148-gasK7(a+A)-1, stolpec 2: pNZ8148-gasK7(a+A)-2, stolpec 3: označevalec velikosti 1 kb, stolpec 4: pNZ8148-gasK7(a+A)-4, stolpec 5: pNZ8148-gasK7(a+A)-10.

**Figure 32: Plasmid DNA of *Lc. lactis* IL 1403 pNZ8148-gasK7(a+A) transformants.** Lane 1: pNZ8148-gasK7(a+A)-1, lane 2: pNZ8148-gasK7(a+A)-2, lane 3: 1 kb DNA ladder, lane 4: pNZ8148-gasK7(a+A)-4, lane 5: pNZ8148-gasK7(a+A)-10.

Z 18-urnima kulturama pozitivnih transformant *Lc. lactis* NZ9000-pNZ8148-1 in *Lc. lactis* NZ9000-pNZ8148-gasK7(a+A)-4-2 smo izvedli ekspresijo z indukcijo z nizinom (opisana v poglavju 3.4.16.1).

Tvorbo zrelega gassericina K7 A smo ugotavljali v topnih in netopnih frakcijah celičnih lizatov, induciranih in neinduciranih transformant *Lc. lactis* NZ9000-pNZ8148-1 in *Lc. lactis* NZ9000-pNZ8148-gasK7(a+A)-4-2. Na poliakrilamidni gel (slika 33) smo nanesli vzorce celičnih lizatov: suspenzije celic (slika 33, stolpci 2-5), resuspendirane usedline centrifugiranih celičnih lizatov - netopne frakcije liziranih celic (slika 33, stolpci 6-9) in dvakrat centrifugirane supernatante celičnih lizatov - topne frakcije liziranih celic (slika 33, stolpci 10-13). Inducirano kulturo *Lc. lactis* NZ9000-pNZ8148-gasK7(a+A)-4-2 smo označili z "GA-ind.", neinducirano kulturo (kontrolo) z "GA-neind.", inducirano kulturo *Lc. lactis* NZ9000-pNZ8148-1 z "NZ-ind." in neinducirano kulturo (kontrolo) z "NZ-neind."



Slika 33: **Izražanje gassericina K7 A v sevu *Lc. lactis* NZ9000, po indukciji z nizinom.** Stolpec 1: označevalec velikosti Prestained Caleidoscopic Standard, stolpci 2-5: suspenzije liziranih celic: stolpec 2: GA-ind., stolpec 3: GA-neind., stolpec 4: NZ-ind., stolpec 5: NZ-neind.; stolpci 6-9: netopne frakcije liziranih celic: stolpec 6: GA-ind., stolpec 7: GA-neind., stolpec 8: NZ-ind., stolpec 9: NZ-neind; stolpci 10-13: topne frakcije liziranih celic: stolpec 10: GA-ind., stolpec 11: GA-neind., stolpec 12: NZ-ind., stolpec 13: NZ-neind.

**Figure 33: Expression of gassericina K7 in *Lc. lactis* NZ9000 strain after nisin induction.** Lane 1: Prestained Caleidoscopic Standard, lanes 2-5: lysed cells suspension: lane 2: GA-ind., lane 3: GA-neind., lane 4: NZ-ind., lane 5: NZ-neind.; lanes 6-9: insoluble fractions of lysed cells: lane 6: GA-ind., lane 7: GA-neind., lane 8: NZ-ind., lane 9: NZ-neind.; lanes 10-13: soluble fractions of lysed cells: lane 10: GA-ind., lane 11: GA-neind., lane 12: NZ-ind., lane 13: NZ-neind.

Med induciranimi in neinduciranimi vzorci (kontrolami) nismo opazili razlik v izražanju najmanjših proteinov posameznih frakcij celičnih lizatov (na dnu gela). Izražanje gassericina K7 A z indukcijo z nizinom smo preizkusili še v tekočem gojišču GM 17 brez dodanega antibiotika. Aktivnost gassericina K7 A pa smo ugotavljali s pomočjo

indikatorskega seva *L. sakei* 2747 (difuzijski test z brezceličnimi supernatanti in posameznimi frakcijami celičnih lizatov), vendar nikjer ni prišlo do zaviranja rasti indikatorskega seva, razen pri pozitivni kontroli - matičnem sevu K7.

#### 4.3 OBSTOJNOST SEVA K7 V RAZLIČNIH STRESNIH POGOJIH

V poskusu smo skozi daljše časovno obdobje spremljali obstojnost seva K7 in sposobnost tvorbe bakteriocinov v različnih stresnih pogojih. Spremljali smo tudi plazmidni profil seva K7, preverili občutljivost seva za antibiotike (kloramfenikol, eritromicin, penicilin, rifampicin, tetraciklin, vankomicin) in določili profil fermentacije ogljikovih hidratov.

##### 4.3.1 Lastnosti matične kulture seva K7

Bakteriocinski kompleks seva K7 (gassericina K7 A in K7 B) močno zavira rast seva *L. sakei* 2714, zato smo ta sev uporabljali kot indikatorski sev pri ugotavljanju tvorbe oziroma aktivnosti bakteriocinov. Cone zaviranja rasti (pri spot testih s kolonijami ali supernatanti) so imele premer od 10-15 mm in oster ali zabrisan rob, odvisno od gojišča, ki smo ga uporabljali za rast K7 (komercialno MRS gojišče, modificirano sestavljeni gojišče MRS). Celice, ki smo jih pobarvali po Gramu, so bile dolge, zadebeljene, modro-vijolične palčke, ki so se povezovale v skupke. Po 24-urni inkubaciji ustrezno razredčene 18-urne kulture, pri 37 °C na trdnem gojišču MRS, smo v 1 ml določili  $\sim 1,2 \times 10^9$  k.e.

Profil fermentacije ogljikovih hidratov po sistemu API 50 CHL je predstavljen v prilogi M ("K7-mat." je matična kultura seva K7). Podatke smo obdelali s programom "Apiweb® stand alone v 1.1.0", ki je sev uvrstil v skupino *Lactobacillus acidophilus* 1.

Na podlagi primerjave izmerjenih premerov cone zaviranja rasti (v mm) z objavljenimi (Charteris in sod., 1998), smo ugotovili, da je matični sev K7 občutljiv za eritromicin, rifampicin, tetraciklin in vankomicin, za kloramfenikol in penicilin pa je srednje občutljiv. (preglednica 15).

Plazmidna in genomska DNA seva K7 sta prikazani na sliki 34 (stolpca 2 in 3).

##### 4.3.2 Lastnosti seva K7, gojenega v različnih stresnih pogojih

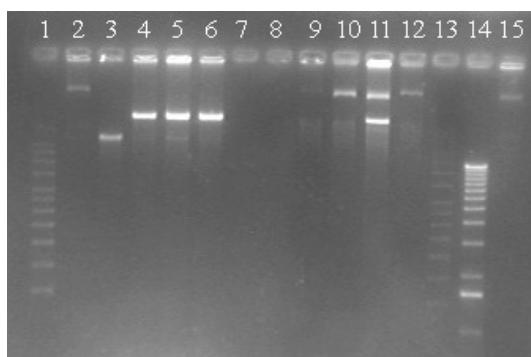
Sev K7 smo precepljali in paralelke izpostavljeni različnim stresnim dejavnikom; temperturnim (K7/37 °C, K7/45 °C) in mutagenim (K7/EtBr, K7/mitC).

###### 4.3.2.1 Obstojnost plazmida v različnih stresnih pogojih

Po petnajstih, tridesetih in štiridesetih precepljanjih smo izolirali plazmidno DNA. Iz vsakega vzorca (K7/37 °C, K7/45 °C, K7/EtBr, K7/mitC) smo DNA vsakič izolirali iz treh

paralelk - včasih je bila rast katere izmed paralelk zelo slaba, posledično je lisa na sliki zelo šibka (malo izolirane DNA). Poleg plazmidov, enako velikih kot plazmid matičnega seva, so na sliki vidni še dodatne, manjše lise, ki so pri nekaterih vzorcih precej močno izražene (prilogi L1 in L2). Na sliki 34 je predstavljen plazmidni profil po tridesetih precepljanjih - manjši plazmidi so najmočneje izraženi pri vzorcu K7/37 °C, kjer plazmida pričakovane velikosti sploh ni videti (stolpci 4-6), pri vzorcih K7/mitC in K7/EtBr pa so, poleg plazmidov pričakovane velikosti, vidne še dodatne lise. Sev, ki smo ga gojili pri 45 °C (K7/45 °C), ni zrasel. Ob koncu poskusa, po štiridesetih precepljanjih, je plazmid pričakovane velikosti (enak velikosti plazmida matičnega seva K7) povsem izginil pri vseh vzorcih, zato pa smo povsod, razen pri sevu K7, ki smo ga gojili pri 45 °C, izolirali manjši plazmid (priloga L2).

Plazmidni profil se je tekom poskusa torej spremenjal pri vseh tretiranjih seva K7, zato vpliva temperature (37 oziroma 45 °C) in mutagenega dejavnika (etidijev bromid oziroma mitomicin C) ne moremo izključiti.

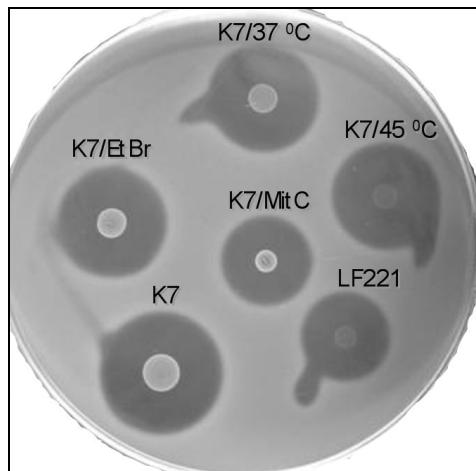


Slika 34: **Plazmidna DNA matičnega seva K7 in seva K7 po tridesetih precepljanjih v različnih stresnih pogojih.** Stolpca 1 in 13: označevalec velikosti supercoiled DNA ladder, stolpec 2: plazmidna DNA seva K7, stolpec 3: genomska DNA seva K7, stolpci 4-12: plazmidna DNA precepljenih poskusnih paralelk K7; stolpci 4-6: K7/37 °C, stolpci 7-9: K7/EtBr, stolpci 10-12: K7/mitC, stolpec 14: označevalec velikosti 1 kb, stolpec 15: plazmidna DNA seva K7.

Figure 34: **Plasmid DNA of parental K7 strain and of treated K7 after thirty subculturing.** Lanes 1 and 13: supercoiled DNA ladder, lane 2: plasmid DNA of K7 strain, lane 3: genomic DNA of K7 strain, lanes 4-12: plasmid DNA of subcultured and treated K7; lanes 4-6: K7/37 °C, lanes 7-9: K7/EtBr, lanes 10-12: K7/mitC, lane 14: 1 kb DNA ladder, lane 15: plasmid DNA of K7 strain.

#### 4.3.2.2 Sposobnost tvorbe bakteriocinov v različnih stresnih pogojih

Sposobnost tvorbe bakteriocinov smo preverjali vsakih deset precepljanj s pomočjo indikatorskega seva *L. sakei* 2714 (spot testi s kolonijami). Cone zaviranja rasti indikatorskega seva so imele premer ~10-15 mm, oster ali zabrisan rob in so se pojavile, ne glede na pogoje, pri katerih smo gojili sev K7 (K7/37 °C, K7/45 °C, K7/EtBr, K7/mitC) ter okrog kontrolnih sevov LF221 in K7. Nebakteriocinogena mutanta LF221 bac<sup>-</sup> ni inhibirala rasti indikatorskega seva *L. sakei* 2714 (slika 35). Vsakič smo preverili še ~70 kolonij vsake poskusne paralelke K7, ki smo jih izbrali s plošč MRS, na katere smo predhodno razmazali ustrezeno razredčene 18-urne kulture za določanje k.e. Tudi okrog teh kolonij so se pojavile cone zaviranja rasti indikatorskega seva *L. sakei* 2714. Precepljanje, temperaturni oziroma mutageni dejavnik na tvorbo gassericinov K7 A in B niso imeli vpliva.



**Slika 35: Spot test seva K7, ki smo ga precepljali v različnih stresnih pogojih.** Cone zaviranja rasti indikatorskega seva *L. sakei* 2714 okrog kolonij K7/37 °C, K7/45 °C, K7/EtBr, K7/mitC in kontrolnih sevov: LF221, LF221 bac<sup>-</sup> in matični sev K7.

**Figure 35: Spot test of the K7 strain subcultured under different stress conditions.** Inhibition zones of indicator strain *L. sakei* 2714 around colonies of K7/37 °C, K7/45 °C, K7/EtBr, K7/mitC and control strains: LF221, LF221 bac<sup>-</sup> and parental strain K7.

#### 4.3.2.3 Morfologija in število kolonijskih enot poskusnih vzorcev K7

Celice K7/37 °C in K7/45 °C, ki smo jih pobarvali po Gramu, so bile zelo podobne celicam matične kulture K7 - dolge, zadebeljene, velike modro-vijolične palčke, ki so se povezovale v daljše skupke v vzporednih linijah, celice K7/EtBr so bile v primerjavi s celicami matične kulture K7 krajše modro-vijolične palčke, celice K7/mitC pa precej tanje in krajše kot celice matične kulture.

Po 24-urni inkubaciji ustrezeno razredčene 18-urne kulture, pri 37/45 °C na trdnem gojišču MRS, smo v 1 ml K7/37 °C določili  $\sim 1,2\text{-}1,8 \times 10^9$  k.e., v 1 ml K7/45 °C  $\sim 1,4 \times 10^6$  k.e., v 1 ml K7/EtBr  $\sim 9,1 \times 10^8\text{-}1,2 \times 10^9$  k.e. in v 1 ml K7/mitC  $\sim 2\text{-}3,6 \times 10^8$  k.e. Precepljanje, temperaturni oziroma mutageni dejavniki so negativno vplivali na število zraslih kolonij (k.e./ml) pri poskusnih paralelkah K7/45 °C, K7/EtBr in K7/mitC.

#### 4.3.2.4 Profili fermentacij ogljikovih hidratov po izpostavitvi različnim stresnim pogojem

Profile fermentacij ogljikovih hidratov tretiranih vzorcev K7 (K7/37 °C, K7/45 °C, K7/EtBr, K7/mitC) smo določili ob koncu poskusa, po štiridesetih precepljanjih, s sistemom API 50 CHL in so predstavljeni v prilogi M. Podatke smo obdelali s programom "Apiweb® stand alone v 1.1.0", ki je vse tretirane poskusne paralelke K7 uvrstil v skupino *Lactobacillus acidophilus* 1. Precepljanje, temperaturni oziroma mutageni dejavnik so imeli določen vpliv na fermentacijo nekaterih ogljikovih hidratov. Razlike v fermentaciji ogljikovih hidratov med matičnim sevom K7 in kulturami K7, izpostavljenimi stresnim pogojem, so se pojavile pri fermentaciji manoze (substrat številka 13), ki sta jo matični sev K7 in K7/EtBr fermentirala, ostali vzorci pa le delno fermentirali, N-acetyl-glukozamina (št. 22) in amigdalina (št. 23), ki ju K7/45 °C ni fermentiral, za razliko od ostalih vzorcev, ki so ju vsaj delno fermentirali, pri fermentaciji arbutina (št. 24), ki ga je matični sev K7 fermentiral, vse poskusne paralelke K7 pa le delno fermentirale, salicina (št. 26), ki ga je v celoti fermentiral le K7/mitC, celobioze (št. 27), ki sta jo matični sev K7 in K7/EtBr delno fermentirala, ostali vzorci pa popolnoma, laktoze (št. 29), ki sta jo delno fermentirala matični sev K7 in K7/45 °C, ostali vzorci pa popolnoma, trehaloze (št. 32), ki so jo fermentirali vsi vzorci, razen K7/mitC, ki jo je fermentiral delno in D-turanoze (št. 40), ki jo je K7/mitC delno fermentiral, ostali vzorci pa sploh ne.

#### 4.3.2.5 Občutljivost seva K7 za antibiotike, po izpostavitvi različnim stresnim pogojem

Občutljivost seva K7 za antibiotike po precepljanju in gojenju v različnih stresnih pogojih, smo določili ob koncu poskusa s komercialnim testom BBL™ Sensi-Disc™. Na podlagi primerjave izmerjenih premerov con zaviranja rasti (v mm) z objavljenimi (Charteris in sod., 1998), smo določili odpornost proti oziroma občutljivost za posamezni antibiotik. Rezultati, ki so zbrani v preglednici 15, nakazujejo trend povečane občutljivosti za antibiotike pri paralelkah seva K7, gojenih v stresnih pogojih (K7/37 °C, K7/45 °C, K7/EtBr, K7/mitC), v primerjavi z matičnim sevom K7. To je še posebej opazno pri kloramfenikolu in penicilinu, za katera je matični sev K7 srednje občutljiv (za penicilin je srednje občutljiv tudi K7/EtBr), tretirane paralelke K7 pa so nanju postale občutljive (večja cona zaviranja rasti). Za eritromicin, rifampicin, tetraciklin in vankomicin je občutljiv tako matični sev K7 kot tudi vse tretirane poskusne paralelke seva K7, pri katerih so se cone zaviranja rasti še povečale.

**Preglednica 15: Občutljivost matičnega seva K7 in seva K7 po štiridesetih precepljanjih v različnih stresnih pogojih, za antibiotike**

**Table 15: Antibiotic susceptibility of parental K7 strain and of K7 strain subcultured forty times under stress conditions**

	Kloramfenikol		Eritromicin		Penicilin		Rifampicin		Tetraciklin		Vankomicin	
	Cona (mm)	Obč. (mm)	Cona (mm)	Obč. (mm)	Cona (mm)	Obč. (mm)	Cona (mm)	Obč. (mm)	Cona (mm)	Obč. (mm)	Cona (mm)	Obč. (mm)
K7-mat.	17	MS	24	S	22	MS	20	S	24	S	19	S
K7/37 °C	26	S	30	S	30	S	27	S	20	S	21	S
K7/45 °C	27	S	31	S	33	S	28	S	31	S	21	S
K7/EtBr	23	S	27	S	25	MS	23	S	27	S	18	S
K7/mitC	34	S	28	S	35	S	23	S	28	S	24	S

Obč....občutljivost

R....."resistant", odporen proti testiranem antibiotiku

MS..."moderate susceptible", srednje občutljiv za testiran antibiotik

S....."susceptible", občutljiv za testiran antibiotik

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 RAZPRAVA

Seva *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221 sta predstavnika grampozitivnih mlečnokislinskih bakterij, ki naseljujejo različne ekološke niše, med drugim tudi človeški gastrointestinalni, vaginalni in respiratorni trakt. Oba sta bila izolirana iz blata dojenčkov in spadata v DNA-homologno podskupino B1 skupine *L. acidophilus*. Tvorba protimikrobnih snovi, med katere spadajo tudi bakteriocini, ima pri preživetju in tekmovanju bakteriocinogene bakterije z ostalimi mikroorganizmi v istem okolju, zelo pomembno vlogo. Je tudi eden izmed kriterijev pri ugotavljanju probiotičnih lastnosti sevov MKB, zato smo želeli podrobnejše proučiti in opisati bakteriocinski kompleks seva K7, za katerega že vemo, da izkazuje številne probiotične lastnosti. Njegov širokospektralni bakteriocinski kompleks poleg predstavnikov laktobacilov in pediokokov vključuje še posamezne seve vrst *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. Perfringens*, *Ent. faecalis* in *Li. inocua*, kar pri bakteriocinah MKB ni prav pogosto, zato obeta različne možnosti aplikacij (Matijašić in sod., 1998; Matijašić in Rogelj, 2000; Matijašić in sod., 2003; Matijašić in sod., 2006). Bakteriocinski kompleks seva K7 smo tudi primerjali z ostalimi znanimi (podobnimi) bakteriocini in z že opisanim bakteriocinskim kompleksom seva *L. gasseri* LF221. Sev LF221 je izolat iz iste ekološke niše in se od seva K7 razlikuje v nekaterih fenotipskih lastnostih (nivo in optimali pogoji za rast in tvorbo bakteriocinov, količina tvorjenih bakteriocinov), genotipskih lastnostih (profil RAPD, vsebnost plazmidov) in stopnji vezave na celice Caco-2 (Matijašić in sod., 1998; Matijašić in Rogelj, 1999; Čanžek Majhenič, 2002; Čanžek Majhenič in sod., 2004).

#### 5.1.1 Določanje in analiza nukleotidnih zaporedij bakteriocinov sevov K7 in LF221

Za nekatere seve MKB je znano, da tvorijo več kot en sam bakteriocin, na primer sev *L. plantarum* LPCO10 tvori plantaricina S in T (Jiménez-Díaz in sod., 1993), *L. gasseri* JCM 2124 tvori štiri peptide, aktivne proti sorodnim laktobacilom (Tahara in sod., 1997), sev *Ent. faecium* L50 tvori enterocine L50, P in Q (Cintas in sod., 2000), seva *Ent. faecium* T136 in *Ent. faecium* P21 tvorita enterocina A in B (Casaus in sod., 1997; Herranz in sod., 2001), sev *L. plantarum* C11 plantaricina EF in JK (Anderssen in sod., 1998; Moll in sod., 1999a), sev *Ent. faecalis* BFE 1071 enterocina 1071A in 1071B (Balla in sod., 2000), sev *Ent. durans* enterocina A5-11A in A5-11B (Batdorj in sod., 2006). Tudi za sev *L. gasseri* K7 smo ugotovili, da tvori vsaj dva bakteriocina, ki smo ju poimenovali gassericin K7 A in gassericin K7 B in sta izjemno podobna že opisanima acidocinoma LF221 A in LF221 B seva *L. gasseri* LF221 (Čanžek Majhenič, 2002; Čanžek Majhenič in sod., 2004). Predvidevali smo, da se geni za tvorbo bakteriocinov seva K7 nahajajo na kromosому, saj je Čanžek Majhenič s sod. (2003) z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za acidocin LF221 A oziroma LF221 B, na genomski DNA seva K7, s PCR pomnožila kratka

fragmenta dolžine 84 oziroma 70 bp, katerih nukleotidni zaporedji sta se popolnoma ujemali z odgovarjajočima regijama acidocinov LF221 A in LF221 B. Domnevno smo potrdili tako, da smo določili celotni nukleotidni zaporedji kodirajočih regij gassericinov K7 A in K7 B seva K7, pomnoženih s PCR na genomski DNA seva K7.

Za gassericin K7 A smo skupno določili 1143 bp nukleotidnega zaporedja (odsek *Dra*I/*Hind*III) kodirajoče regije na genomski DNA seva K7 in ga shranili v gensko banko GenBank pod številko EF392861 (priloga A). Z analizo nukleotidnega zaporedja gassericina K7 A smo ugotovili prisotnost treh odprtih bralnih okvirov: *orfA1* kodira 79 aminokislinskih ostankov (AK) dolgo, komplementarno podenoto gassericina K7 A (GasK7a), ki je sestavljena iz 15 AK N-terminalnega vodilnega peptida dvoglicinskega tipa in iz 64 AK bakteriocinskega prekurzorja; *orfA2* kodira 69 AK dolgo aktivno podenoto gassericina K7 A (GasK7A), ki jo tudi sestavlja N-terminalni vodilni peptid dvoglicinskega tipa (16 AK) in bakteriocinski prekurzor (53 AK); *orfA3* pa kodira 90 AK dolg, domnevni protein imunosti (GaiK7A).

Določili smo tudi 285 bp novega, N-terminalnega nukleotidnega zaporedja acidocina LF221 A (odsek *Dra*I/*Bam*HI), navzgor od že znanega, 858 bp nukleotidnega zaporedja odseka *Bam*HI/*Hind*III acidocina LF221 A, ki je shranjen pod številko GenBank AY295874. S tem smo dopolnili nepopoln ORFA1, za katerega je Čanžek Majhenič (2002) ugotovila, da kodira 37 AK dolg peptid. Določili smo dodatnih 42 AK in ugotovili, da je tudi komplementarna podenota acidocina LF221 A (Acd221α) sestavljena iz 15 AK N-terminalnega vodilnega peptida (dvoglicinskega tipa) in 64 AK bakteriocinskega prekurzorja, tako kot komplementarna podenota GasK7a.

S programom BLAST smo primerjali nukleotidno oziroma izpeljano aminokislinsko zaporedja kodirajoče regije gassericina K7 A z zaporedji bakteriocinov v bazi podatkov NCBI (preglednica 12). Ugotovili smo identičnost vseh treh odprtih bralnih okvirov gassericina K7 A (*orfA1*, *orfA2* in *orfA3*) in odgovarjajočih regij acidocina LF221 A (delni *orfA1*' komplementarne podenote Acd221α, *orfA2* aktivne podenote Acd221A in *orfA3* proteina imunosti Aci221A). Tudi na novo ugotovljeno nukleotidno zaporedje acidocina LF221 A (285 bp) je bilo identično odgovarjajoči regiji gassericina K7 A. Ugotovili smo še delno ujemanje aktivne podenote GasK7A s proteini BrcB (52 %), LcnN (39 %), SakT<sub>β</sub> (37 %) in ThmB (32 %), ki skupaj s proteini BrcA, LcnM, SakT<sub>α</sub> in ThmA tvorijo dvopeptidne bakteriocine brohocin C (McCormick in sod., 1998), laktokokcin MN (van Belkum in sod., 1991a), sakacin T (Vaughan in sod., 2003) in termofilin 13 (Marciset in sod., 1997).

Za gassericin K7 B smo določili skupaj 3276 bp nukleotidnega zaporedja (odsek *Ssp*I/*Hind*III) kodirajoče regije na genomski DNA seva K7, ki smo ga shranili v gensko

banko GenBank pod številko AY307382 (priloga B). Z analizo nukleotidnega zaporedja gassericina K7 B smo ugotovili prisotnost šestih popolnih odprtih bralnih okvirov: *orfB1* kodira 465 AK dolg, domnevni, od ATP odvisni transportni protein gassericina K7 B (ORFB1); *orfB2* kodira 197 AK dolg, domnevni dodatni transportni protein (ORFB2); *orfBhip* kodira 33 AK dolg hipotetični protein, *orfB3* kodira 75 AK dolgo komplementarno podenoto gassericina K7 B (GasK7b), ki je sestavljena iz 18 AK N-terminalnega vodilnega peptida dvoglicinskega tipa in 57 AK bakteriocinskega prekurzorja; *orfB4* kodira 65 AK dolgo aktivno podenoto gassericina K7 B (GasK7B), ki je sestavljena iz 17 AK N-terminalnega vodilnega peptida dvoglicinskega tipa in 48 AK bakteriocinskega prekurzorja; *orfB5* kodira 112 AK dolg, domnevni protein imunosti (GaiK7B).

Določili smo tudi 1504 bp novega, N-terminalnega nukleotidnega zaporedja acidocina LF221 B (odsek *SspI/EcoRI*), navzgor od že znanega, 1772 bp nukleotidnega zaporedja odseka *EcoRI/HindIII* acidocina LF221 B, ki je shranjen pod številko GenBank AY297947. S tem smo izpopolnili nepopoln ORFB1', za katerega je Čanžek Majhenič (2002) ugotovila, da kodira 188 AK dolg peptid; določili smo dodatnih 9 AK in ugotovili, da je celoten protein dolg 197 AK in ima domnevno vlogo dodatnega transportnega proteina. Navzgor od tega proteina pa se nahaja še 465 AK dolg, domnevni, od ATP-odvisni transportni protein acidocina LF221 B.

S programom BLAST smo 3276 bp nukleotidnega zaporedja kodirajoče regije gassericina K7 B primerjali z nukleotidnimi zaporedji bakteriocinov v bazi podatkov NCBI (preglednica 13). Kot že za gassericin K7 A smo, presenetljivo, tudi za gassericin K7 B ugotovili identičnost vseh petih odprtih bralnih okvirov (*orfB2*, *orfBhip*, *orfB3*, *orfB4* in *orfB5*) in odgovarjajočih regij acidocina LF221 B (delni *orfB1'* domnevnega dodatnega transportnega proteina, *orfB2* hipotetičnega proteina, *orfB3* komplementarne podenote Acd221β, *orfB4* aktivne podenote Acd221B in *orfB5* proteina imunosti Aci221B), ki so ga opisali Čanžek Majhenič in sod. (2004). Tudi na novo ugotovljeno nukleotidno zaporedje acidocina LF221 B (1504 bp) je bilo identično odgovarjajoči regiji gassericina K7 B. Ugotovili smo zelo visok odstotek identičnosti (98 do 100 %) vseh šestih odprtih bralnih okvirov gassericina K7 B z geni za proteine gassericina T (ORF1, ORF2, ORF3, GatA, GatX in ORF6), ki ga je opisal Kawai s sod. (2000). Zanimivo pa je, da je (ne)aktivnost homolognih podenot gassericina K7 B in gassericina T navzkrižno homologna: komplementarna podenota gassericina K7 B (GasK7b) je homologna z aktivno podenoto gassericina T (GatA), aktivna podenota gassericina K7 B (GasK7B) pa s komplementarno podenoto gassericina T (GatX). Proteini GasK7b, GasK7B in GaiK7B gassericina K7 B se delno ujemajo še s proteini LafA (62 %), LafX (55 %) in ORFZ (34 %), ki tvorijo obe komponenti laktacina F in njegov protein imunosti (Fremaux in sod., 1993); posamezni podenoti gassericina K7 B (GasK7b in GasK7B) se delno ujemata tudi s proteinoma

AmyL $\alpha$  (55 %) in AmyL $\beta$  (38 %), ki tvorita amilovorin L (de Vuyst in sod., 2004); komplementarna podenota gassericina K7 B (GasK7b) se 35-odstotno ujema s podenoto sakacina T (SakT $\alpha$ ) (Vaughan in sod., 2003). Zanimivo in izredno nenavadno je, da je ena podenota sakacina T (SakT $\beta$ ) homologna z aktivno podenoto gassericina K7 A (GasK7A), druga podenota sakacina T (SakT $\alpha$ ) pa s komplementarno podenoto gassericina K7 B (GasK7b). Podobnega opisa navzkrižne homolognosti podenot različnih bakteriocinov v literaturi nismo zasledili. Domnevni, od ATP-odvisni transportni protein gassericina K7 B (ORFB1) je homologen s številnimi domnevнимi, od ATP-odvisnimi transportnimi proteini, na primer z ORF1 (98 %) gassericina T (Kawai in sod., 2000), z AmyT (83 %) amilovorina L (de Vust in sod., 2004), z AbpT (69 %) bakteriocina ABP-118 (Flynn in sod., 2002) in z BrcT (46 %) brohocina C (McCormick in sod., 1998). Domnevni dodatni transportni protein gassericina K7 B (ORFB2) pa je homologen nekaterim domnevnim dodatnim transportnim proteinom, na primer ORF2 (99 %) gassericina T (Kawai in sod., 2000) in AmyA (56 %) amilovorina L (de Vust in sod., 2004). Hipotetični protein gassericina K7 B (ORFBhip) je identičen ORFB2 acidocina LF221 B in ORF3 gassericina T, ki je domnevni regulator ekspresije (Kawai in sod., 2000).

Pri vseh štirih bakteriocinih sevov K7 in LF221 je zaporedje genov genske gruče, potrebne za tvorbo bakteriocina, tipično za skupino II bakteriocinov (Jack in sod., 1995; Nes in sod., 1996): strukturnima genoma (za obe podenoti posameznega bakteriocina) navzdol sledi gen za domnevni protein imunosti, ki je skupen za obe podenoti in se nahaja na istem operonu. Navzgor od omenjenih treh genov se pri gassericinu K7 B in acidocinu LF221 B nahajata še gen za domnevni dodatni transportni protein in gen za domnevni, od ATP-odvisni transportni protein (sliki 19 in 20), ki sodeluje pri procesiranju prebakteriocina. Med procesiranjem se N-terminalni vodilni peptid odcepi od bakteriocinskega prepeptida in sicer na tipičnem mestu, za dvema glicinskima ostankoma. Večina bakteriocinov skupine II, pa tudi nekaj lantibiotikov, vsebuje vodilno zaporedje dvoglicinskega tipa, z ohranjenim motivom MK.....L<sup>-12</sup> S<sup>-11</sup> - K<sup>-9</sup> E<sup>-8</sup> L<sup>-7</sup> - - I<sup>-4</sup> - G<sup>-2</sup> G<sup>-1</sup>, ki služi kot mesto procesiranja prebakteriocina (Håvarstein in sod., 1994; Nes in sod., 1996; Nes in Johnsborg, 2004). Tudi vodilna zaporedja gassericinov K7 A in K7 B ter acidocinov LF221 A in LF221 B so dvoglicinskega tipa, z ohranjenim mestom procesiranja ob dveh glicinskih ostankih na mestih -1 in -2 ter ohranjenimi hidrofobnimi AK na mestih -4(V ali I), -7(L), -12(V ali L) in hidrofilnimi AK na mestih -8(Q, E ali T), -9(C, N, E ali H) in -11(N, S ali E). Ko smo primerjali vodilna zaporedja bakteriocinov sevov K7 in LF221 z vodilnimi zaporedji podobnih dvopeptidnih bakteriocinov (preglednica 14), smo povsod ugotovili prisotnost tipičnega ohranjenega motiva, zato z veliko verjetnostjo predvidevamo, da vsi štirje bakteriocini naših sevov K7 in LF221 spadajo v skupino II bakteriocinov.

Na podlagi analize nukleotidnih in izpeljanih aminokislinskih zaporedij, značilnosti N-terminalnih vodilnih zaporedij ter ugotovljenih homologij gassericina K7 A (100 % z acidocinom LF221 A; 52 % z brohocinom C; 39 % z laktokokcinom N; 37 % s sakacinom T in 32 % s termofilinom 13) in gassericina K7 B (100% z acidocinom LF221 B; 98 % z gassericinom T; 55 % z laktacinom F in 38 % z amilovorinom L) z dvopeptidnimi bakteriocini, smo gassericina K7 A in K7 B uvrstili med dvopeptidne bakteriocine, v podskupino IIb po Nesu in sod. (1996) ter Diepu in Nesu (2002).

Glede na ugotovljeni nukleotidni zaporedji gassericinov K7 A in K7 B ter primerjavo z nukleotidnimi zaporedji acidocinov LF221 A in LF221 B, bi lahko rekli, da je gassericin K7 A identičen acidocinu LF221 A, gassericin K7 B pa acidocinu LF221 B. Podobne primere, da dva (ali več) sevov iste oziroma sorodnih vrst MKB tvorita enak(e) bakteriocin(e), najdemo tudi v literaturi, na primer: seva *L. reuteri* LA6 in *L. gasseri* LA39, ki so ju izolirali iz blata (istega) dojenčka, tvorita gassericin A (Kawai in sod., 2001, 2004). Sev *L. amylovorus* DCE 471 tvori amilovorin L471 (Callewaert in sod., 1999), za katerega se je izkazalo, da je glede na aminokislinsko zaporedje identičen laktobinu A, ki ga tvori sev *L. amylovorus* LMG P-13139 (Contreras in sod., 1997), od njega pa se razlikuje v protimikrobnem spektru. Tudi enterocina A sevov *Ent. faecium* P21 in *Ent. faecium* CTC429 sta na prvi pogled identična, šele s primerjavo večjih regij so odkrili strukturne razlike v operonih obeh bakteriocinov, ki se sicer nekoliko razlikujeta v protimikrobnih aktivnostih (Herranz in sod., 2001). Seva *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221 sta bila izolirana iz iste ekološke niše (blata dojenčkov), zato niti ni presenetljivo, da tvorita bakteriocine z enakim aminokislinskim zaporedjem, se pa njuna bakteriocinska kompleksa razlikujeta v spektru protimikrobine aktivnosti in količini tvorbe bakteriocinov (Matijašić in Rogelj, 1997; Matijašić in sod., 1999; Matijašić in Rogelj, 2000). Zato predvidevamo, da gre najverjetneje za razlike na nivoju regulacije tvorbe gassericinov seva K7 in acidocinov seva LF221. Potrebna bi bila analiza in primerjava še večjih odsekov DNA, navzgor in navzdol od zaenkrat znanih kodirajočih regij bakteriocinov sevov K7 in LF221, da bi odkrili njihove regulatorne regije in potrdili te domneve.

### **5.1.2 Kloniranje kodirajočih regij bakteriocinov sevov K7 in LF221 ter izražanje v različnih ekspresijskih sistemih**

Gassericina K7 A in K7 B ter acidocina LF221 A in LF221 B smo žeeli heterologno izraziti z izbranimi ekspresijskimi sistemi, da bi ugotovili prispevek posameznega bakteriocina k skupni protimikrobiaktivnosti bakteriocinskih kompleksov sevov K7 in LF221. To bi nam pomagalo tudi pri iskanju vzrokov za razlike v njunih protimikrobnih spektrih in količini tvorbe bakteriocinov. O gassericinih, njihovem protimikrobnem delovanju in heterologni tvorbi je na splošno malo znanega; Kawai s sod. (1998, 2001, 2004) je opisal ciklični gassericin A seva *L. gasseri* LA39 in dvopeptidni gassericin T seva

*L. gasseri* SBT2055 (Kawai in sod., 2000), s katerim sta gassericin K7 B in acidocin LF221 B sevov *L. gasseri* K7 in LF221 98 do 100-odstotno identična. Opisana sta še bakteriocina seva *L. gasseri* JCM 2124 (Tahara in sod., 1997) in bakteriocin seva *L. gasseri* KT7 (Zhu in sod., 2000). Zaradi skopih informacij o heterolognem izražanju gassericinov, smo ekspresijske sisteme izbrali na podlagi heterologne tvorbe podobnih bakteriocinov MKB iz skupine II ali na podlagi sorodnosti sevov. Predvidevali smo, da se bo bakteriocin, ki smo ga želeli heterologno izraziti, procesiral in izločil iz celice s pomočjo heterolognega transportno-sekrecijskega sistema. Zato smo za heterologno izražanje bakteriocinov sevov K7 in LF221 najprej izbrali sev *Lc. lactis* IL1403, v katerem so izrazili že številne bakteriocine MKB, na primer: enterocin A (O'Keeffe in sod., 1999; Martínez in sod., 2000), divergin A (van Belkum in sod., 1997), leukocin A (van Belkum in Stiles, 1995) in pediocin PA-1 (Chikindas in sod., 1995; Horn in sod., 1998; Martínez in sod., 2000) ter kolicin V gramnegativne vrste *E. coli* (McCormick in sod., 1999).

Za posamezne bakteriocine smo pripravili več plazmidnih konstruktov. Transformante *Lc. lactis* IL1403 s konstruktom, ki je vseboval vstavljen operon za tvorbo gassericina K7 A (strukturna gena za obe podenoti in gen za imunost proti gassericinu K7 A), niso zavirale rasti indikatorskega seva *L. sakei* 2714, ki je občutljiv za bakteriocinska kompleksa sevov K7 in LF221. Zato smo v naslednjem poskusu operonu za tvorbo gassericina K7 A dodali promotor p32 ekspresijskega prenosljivega vektorja pMG36e, ki ga pogosto uporabljajo pri kloniranju in izražanju bakteriocinov, ali z njihovo tvorbo povezanih proteinov (van de Guchte in sod., 1989; Franke in sod., 1999; Franz in sod., 2000b; Rodríguez in sod., 2003). Fragment smo vstavili v "low copy" in "high copy" ekspresijska vektorja za laktokoke, pIL252 in pIL253 (Simon in Chopin, 1988), ter gassericin K7 A skušali izraziti v sevu *Lc. lactis* IL1403. Podobno strategijo kot za gassericin K7 A, smo uporabili tudi pri kloniranju in izražanju gassericina K7 B in acidocina LF221 B. Pripravili smo "low copy" plazmidna konstrukta, ki sta vsebovala promotor p32 in operon za tvorbo gassericina K7 B ali acidocina LF221 B (del gena za dodatni transportni protein, strukturna gena za obe podenoti bakteriocina in gen za imunost proti gassericnu K7 B ali acidocinu LF221 B). Pri transformantah *Lc. lactis* IL1403 s konstruktmi za tvorbo gassericina K7 A, gassericina K7 B in acidocina LF221 B, smo opazili cone zaviranja rasti indikatorskega seva *L. sakei* 2714, vendar so bile prešibke, da bi jih lahko šteli kot pozitivni rezultat. Po nevtralizaciji supernatantov transformant so se cone zaviranja rasti indikatorskega seva še zožile. Zato con okoli testiranih transformant nismo mogli označiti kot pozitivni rezultat, temveč smo jih pripisali delovanju mlečne kisline. Sklepamo, da do izražanja gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B v sevu *Lc. lactis* IL1403 najverjetneje ni prišlo, oziroma z uporabljenimi testi za preverjanje izražanja nismo zaznali bakteriocinske aktivnosti. Transformanto z "low copy" plazmidnim konstruktom, ki je vseboval promotor p32 in operon za tvorbo gassericina K7 A smo konjugirali s sevom *Lc. lactis* K1, ki tvori laktkokcin A. Predvidevali smo, da bo transportni sistem laktkokcina A primeren tudi za

izločanje gassericina A, dobili pa smo transkonjuganto, ki je tvorila le laktokokcin A, ne pa tudi gassericina K7 A.

Transportni in regulacijski mehanizem seva *Ent. faecium* 2749, ki tvori enterocina A in B, smo želeli uporabiti za izražanje gassericina K7 A, gassericina K7 B in acidocina LF221 B. Uporabili smo plazmidne konstrukte, ki smo jih pripravili za izražanje omenjenih bakteriocinov že v sevu *Lc. lactis* IL1403. Transformante *Ent. faecium* 2749 s konstrukti za tvorbo gassericina K7 A, gassericina K7 B in acidocina LF221 B so tvorile le enterocina A in B, izražanja bakteriocinov sevov K7 in LF221 pa nismo uspeli potrditi. Možno je, da so transformante tvorile samo enterocina A in B, ali pa gassericin K7 A, gassericin K7 B in acidocin LF221 A niso bili aktivni.

Naslednji možni kandidat za heterologno izražanje gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B je bil sev *E. coli* 2747, ki sicer spada med gramnegativne bakterije in tvori kolicin V, ki pa se od ostalih kolicinov precej razlikuje in je po svojih lastnostih bolj podoben bakteriocinom skupine II grampozitivnih bakterij (kamor smo uvrstili tudi bakteriocine sevov K7 in LF221). Prebakteriocin kolicina V namreč vsebuje N-terminalni vodilni peptid dvoglicinskega tipa, ki je vpletен v transport z ABC-transportnim sistemom in se odcepi med procesiranjem (Håvarstein in sod., 1994; van Belkum in sod., 1997; McCormick in sod., 1999). Upali smo, da se bodo bakteriocini sevov K7 in LF221 lahko izražali in bili aktivni v sevu *E. coli* 2747, zaradi podobnih mehanizmov izločanja in procesiranja. Vendar pa so transformante *E. coli* 2747 s plazmidnimi konstruktmi za gassericin K7 A, gassericin K7 B in acidocin LF221 B le minimalno zavirale rast indikatorskega seva *L. sakei* 2714. Cone zaviranja rasti so bile približno enake coni zaviranja rasti okoli negativne kontrole. Tudi po koncentriranju supernatantov cone zaviranja rasti niso bile večje, po nevtralizaciji pa so se celo zožile, zato smo inhibicijo pripisali delovanju mlečne kisline. Tudi v ekspresijskem sistemu *E. coli* 2747 nismo uspeli potrditi heterolognega izražanja gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B.

Kot zelo obetajoč ekspresijski sistem za izražanje bakteriocinov sevov K7 in LF221 smo izbrali nebakteriocinogeno mutanto *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup>, da bi obšli (morebitne) težave z izločanjem in procesiranjem bakteriocinov. Vendar iz transformant LF221 bac<sup>-</sup> nismo uspeli izolirati plazmidnih konstruktov, s katerimi bi potrdili (vsaj) prisotnost vstavljenih fragmentov za tvorbo gassericinov K7 A in K7 B ter acidocina LF221 B. Vzrok za nizko število transformant bi lahko bil v slabi transformabilnosti oziroma nizki elektrokompetentnosti uporabljenega seva. O podobnih težavah pri uporabi izolatov laktobcilog za heterologno ekspresijo poročajo tudi drugi avtorji (Klaenhammer, 1993; Kanatani in sod., 1995; Klaenhammer, 1998; Mason in sod., 2005).

Z drugačno strategijo in istim ciljem - izraziti (vsaj en) zrel oziroma protimikrobnou aktiven bakteriocin v inducibilnem heterolognem ekspresijskem sistemu, smo sestavili nove plazmidne konstrukte, z vstavljenimi geni za posamezne podenote gassericina K7 A (ali acidocina LF221 A), brez N-terminalnih vodilnih zaporedij, da bi izključili problematični dejavnik procesiranja bakteriocina. V gramnegativnih ekspresijskih sevih vrste *E. coli* so na podlagi umetno sintetiziranih bakteriocinskih genov (z uporabo genskega koda, prilagojenega vrsti *E. coli*) že izrazili nekatere bakteriocine podskupine II, brez proteinov imunosti in z uporabo alternativnih sekretornih zaporedij, na primer pediocin PA-1 (Horn in sod., 1998; Miller in sod., 1998), brochocin-C (McCormick in sod., 1999) in piskolin 126 (Ingham in sod., 2005). V našem poskusu smo v nekaterih transformantah *E. coli* DH5 $\alpha$ , ki so zrasle na trdnem selekcijskem gojišču, s PCR potrdili prisotnost vstavljenih fragmentov za komplementarno (GasK7a) in aktivno (GasK7A) podenoto gassericina K7 A (slika 28). V tekočem gojišču pa iste transformante niso (ali so zelo slabo) zrasle, zato iz njih nismo mogli izolirati plazmidnih konstruktov (slika 29), da bi z določitvijo nukleotidnega zaporedja potrdili prisotnost vstavljenih fragmentov za tvorbo GasK7a in GasK7A. Nasprotno pa smo iz transformant, pri katerih nismo dobili ustrezno velikih pomnožkov PCR, izolirali plazmidne konstrukte, ki pa niso vsebovali insertov za GasK7a ali GasK7A, oziroma nukleotidna zaporedja genov za GasK7a in GasK7A niso bila prava. Dobljeni rezultati nakazujejo možno (delno) izražanje rekombinantnih peptidov GasK7a in GasK7A, četudi izražanja v *E. coli* nismo inducirali. Morda sta bili heterologno tvorjeni podenoti gassericina K7 A (GasK7a in GasK7A) za izbrani sev *E. coli* DH5 $\alpha$  toksični, saj je znano, da so peptidi oziroma proteini grampozitivnih MKB, za celice *E. coli* lahko toksični (Rodríguez in sod., 2003), vendar tega nismo dokazali. Na nekoliko podobne težave so naleteli pri heterologni ekspresiji enterocina A, kjer so transformante *Lc. lactis* IL1403 tvorile bakteriocin le na trdnem gojišču, v tekočem pa ne, kar so pripisali potrebi po prisotnosti indukcijskega faktorja enterocina A (O'Keeffe in sod., 1999).

Iz plazmidnih konstruktov, ki sta vsebovala posamezni podenoti gassericina K7 A, brez N-terminalnih vodilnih zaporedij (GasK7a ali GasK7A), smo sestavili plazmidni konstrukt, ki je vseboval obe podenoti gassericina K7 A (GasK7a in GasK7A), brez N-terminalnih vodilnih zaporedij. Za izražanje zrelega gassericina K7 A v ekspresijskem sevu *Lc. lactis* NZ9000 smo uporabili inducibilen ekspresijski sistem NICE, ki temelji na avtoregulacijskem mehanizmu biosinteze nizina (de Ruyter in sod., 1996; Mierau in Kleerebezem, 2005). S tem sistemom so v sevih *Lc. lactis* pod kontrolo nizinskega promotorja nisA uspešno izrazili pediocin PA-1 in kolicin V (Horn in sod., 2004). Izražanje oziroma prisotnost podenot gassericina K7 A smo ugotavljali z NaDS-PAGE v topnih in netopnih frakcijah celičnih lizatov induciranih in neinduciranih transformant. Med induciranimi in neinduciranimi vzorci (kontrolami) nismo zaznali razlik v izražanju najmanjših proteinov posameznih frakcij celičnih lizatov, kamor bi sodil gassericin K7 A. Transformante *Lc. lactis* NZ9000 s konstruktom, ki je vsebovala vstavljeni geni za gasK7a

in gasK7A, tudi niso zavirale rasti indikatorskega seva *L. sakei* 2714. Zato sklepamo, da se gassericin K7 A ob indukciji z nizinom bodisi ni izrazil, bodisi bakteriocina zaradi nizkega izražanja nismo zaznali.

Niti v gramnegativnih sevih *E. coli* 2746 in 2747, *E. coli* BL21 DE3 pLysS, niti v grampozitivnih sevih *Lc. lactis* IL1403, *Lc. lactis* K1, *Lc. lactis* NZ9000, *Ent. faecium* 2749 in *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup> nismo potrdili izražanja aktivnih gassericinov K7 A in K7 B oziroma acidocinov LF221 A in LF221 B. Vzrok neizražanja bakteriocinov v uporabljenih ekspresijskih sistemih se lahko skriva v regulaciji tvorbe gassericinov K7 in acidocinov LF221. Tvorba posameznega bakteriocina je lahko regulirana s prisotnostjo drugega bakteriocina istega seva ("quorum sensing" regulacija) in poleg sinteze prebakteriocina vključuje še njegov transport, procesiranje in izločanje ter imunost celice proti delovanju lastnega bakteriocina (Nes in sod., 1996; Sablon in sod., 2000; Diep in sod., 2001; Eijsink in sod., 2002). Morda gre v našem primeru za sinergistično oziroma komplementarno delovanje, ne le obeh peptidov posameznega dvopeptidnega bakteriocina, kot je običajno in že dolgo znano za vse dvopeptidne bakteriocine (van Belkum in sod., 1991a; Nissen-Meyer in sod., 1992; Allison in sod., 1994; Diep in sod., 1996; Balla in sod., 2000; Cintas in sod., 2000; Nes in Holo, 2000), temveč tudi obeh bakteriocinov posameznega seva (K7 ali LF221). Komplementarno delovanje je poznano na primer za enterocina A in B seva *Ent. Faecium* T136 (Casaus in sod., 1997) ter dvopeptidna plantaricina EF in JK seva *L. plantarum* C11 (Anderssen in sod., 1998; Moll in sod., 1999a) in nekatere druge bakteriocine.

Težave so se verjetno pojavile tudi pri procesiranju in/ali izločanju bakteriocinov iz celic, pri čemer se od sintetiziranega prebakteriocina odcepi N-terminalni vodilni peptid, ki je vpletен tako v transport kot aktivacijo bakteriocinske molekule. Pri procesiranju in izločanju nelantibiotikov sodelujeta ABC-transportni protein in dodatni transportni protein, kar je značilno za vse bakteriocine iz skupine II, ki se izločajo s pomočjo lastnih ABC-transportnih mehanizmov (Nes in sod., 1996; van Belkum in Stiles, 2000; Ennahar in sod., 2000). Pri poskusih izražanja bakteriocinov sevov K7 in LF221 smo v plazmidne konstrukte večinoma vstavili le fragmente s strukturnimi geni in genom za imunost proti dotednjemu bakteriocinu. Za gassericin K7 A in acidocin LF221 A nukleotidnega zaporedja transportnih proteinov še ne poznamo, pri gassericinu K7 B in acidocinu LF221 B pa se gena za domnevni, od ATP-odvisni protein in domnevni dodatni transportni protein nahajata navzgor od strukturnih genov obeh podenot bakteriocinov. Možno je, da oba gassericina seva K7 oziroma acidocina seva LF221 za transport, procesiranje in izločanje iz celic uporabljata skupen sistem. V nekaterih ekspresijskih študijah so na primer dosegli heterologno tvorbo večih različnih bakteriocinov, ki so uporabljali transportni sistem istega bakteriocina, ali pa je zamenjava signalnih (vodilnih) zaporedij omogočila heterologno tvorbo bakteriocina, ki je uporabljal transportni sistem gostiteljskega bakteriocina ali

splošni (*sec*) transportni sistem (Allison in sod., 1995; McCormick in sod., 1996; van Belkum in sod., 1997; Ennahar in sod., 2000).

Možno je tudi, da je prišlo do tvorbe bakteriocina, vendar je bila njegova količina premajhna in zato prisotnosti in/ali protimikrobne aktivnosti s testi, ki smo jih uporabili, nismo zaznali. S problemom (pre)nizke ravni tvorbe bakteriocinov oziroma drugih proteinov v MKB se srečujejo tudi drugi (van de Guchte in sod., 1989). Še bolj splošen problem pa predstavlja nezmožnost potrditve izražanja bakteriocinov (Ingham in sod., 2005), ki jih zaradi majhne velikosti na poliakrilamidnem gelu težko določimo. Zato v primeru, kadar ne detektiramo protimikrobne aktivnosti, ni jasno, ali peptid ni aktiven, ali ni prišlo do njegovega izražanja. Takim situacijam bi se lahko izognili, če bi imeli na voljo ustreznega protitelesa, s katerimi bi nedvoumno identificirali izražanje želenega proteina. Za bakteriocine sevov K7 in LF221, ki smo jih proučevali, pa protiteles še nimamo. Detekcija, potrditev in točna kvantifikacija heterologno izraženega bakteriocina, so glavne težave pri raziskovanju in aplikaciji bakteriocinov MKB. Različni biološki testi imajo vsak svoje pomanjkljivosti, največkrat pa se uporablajo: test difuzije v agarju (časovno potraten, subjektivna interpretacija rezultatov), imunološke metode (visoka cena) in merjenje optične gostote - mikrotiterske plošče (časovno in materialno potratno, nizka ponovljivost) (Turcotte in sod., 2004).

Lahko, da je v katerem od uporabljenih ekspresijskih sistemov prišlo do tvorbe želenega bakteriocina (gassericina K7 A in K7 B ali acidocina LF221 A in LF221 B), vendar se le ta ni pravilno procesiral in zato ni bil protimikrobno aktivен. Aktivnost prebakteriocina in zrelega (procesiranega) laktkokicina G ter njegovih posameznih podenot so proučevali Håvarstein in sod. (1995) in ugotovili, da kombinacije podenot, ki so se razlikovale od originalne, niso bile, ali pa so bile slabše aktivne (zaradi prisotnosti N-terminalnega vodilnega zaporedja ali nepravilnega procesiranja posameznih podenot laktkokicina G). Mehanizmi izločanja in aktivacije bakteriocinov iz podskupine IIb, kamor smo uvrstili vse štiri bakteriocine sevov K7 in LF221, namreč še vedno niso povsem pojasnjeni. Večinoma gre za modelne študije, ki pa se od dejanskega stanja lahko precej razlikujejo.

Zaradi številnih vzrokov, ki lahko vplivajo na heterologno izražanje bakteriocinov MKB, predstavlja izbira učinkovitega ekspresijskega sistema največji problem, saj za nobenega ne moremo z gotovostjo trditi in predvideti, ali bo ustrezan za izražanje želenega bakteriocina. Zanimiv in v tem trenutku morda obetavnejši sistem predstavlja izražanje umetno sintetiziranih bakteriocinskih genov (s kodonom prilagojenim *E. coli* ali kateri drugi izbrani vrsti heterolognega ekspresijskega sistema), ki kodirajo zrele bakteriocine - ta izziv nas čaka v prihodnosti.

### 5.1.3 Obstojnost seva K7 pod različnimi stresnimi pogoji

Tvorba bakteriocinov je lahko precej nestabilna lastnost, še posebej, če se genski zapisi zanjo nahajajo na plazmidu ali na mobilnih genetskih elementih (Klaenhammer, 1993; Nes in sod., 1996; Sablon in sod., 2000). Laktobacili redko vsebujejo več plazmidov, sevi vrste *L. gasseri* pogosto vsebujejo velik, linearni plazmid, vendar funkcije večine izmed njih še niso poznane (Roussel in sod., 1993; Klaenhammer, 1995). Sev *L. gasseri* K7 poleg genomske DNA vsebuje tudi plazmidno DNA, zato smo že leli ugotoviti, kako obstojen je in, kako obstojna je tvorba njegovih bakteriocinov v stresnih pogojih gojenja. Pogoji gojenja (temperatura: 37 °C/45 °C oziroma prisotnost mutagenega dejavnika: EtBr/mitC) in konstantno precepljanje seva K7 so vplivali na spremembo plazmidnega profila. Poleg plazmidov pričakovane velikosti, smo po petnajstih in tridesetih precepljanjih v plazmidnem profilu (na gelu) opazili še dodatne, precej močno izražene lise pri vseh pogojih gojenja (K7/37 °C, K7/45 °C, K7/EtBr in K7/mitC). Na koncu poskusa, po štiridesetih precepljanjih, je plazmid, enak velikosti plazmida matičnega seva K7, izginil, izolirali pa smo nekoliko manjši plazmid, razen pri sevu K7, ki smo ga gojili pri 45 °C, kjer plazmidne DNA nismo uspeli izolirati. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi van der Vossen in sod. (1994), ki so izgubo plazmida seva *L. acidophilus* M46, inkubiranega pri 44 °C, pripisali termoobčutljivemu načinu replikacije plazmida.

Morfologija celic seva K7, ki smo ga precepljali pri 37 °C in pri 45 °C, se v primerjavi s celicami matičnega seva K7 ni spremenila. Celice seva K7, ki smo ga gojili ob prisotnosti etidijevega bromida, so bile v primerjavi s celicami matične kulture K7 krajše in bolj kokoidne oblike, celice seva K7, ki smo ga gojili ob prisotnosti mitomicina C, pa so postale tanjše in krajše. Precepljanje, temperaturni oziroma mutageni dejavniki pa so negativno vplivali na število zraslih kolonij (k.e./ml) povsod, razen pri sevu K7, ki smo ga gojili pri 37 °C ( $\sim 1,5 \times 10^9$  k.e./ml). Pri sevu K7, ki smo ga gojili pri 45 °C, je število k.e. najbolj padlo in sicer na  $\sim 1,4 \times 10^6$  k.e./ml; pri sevu K7, ki smo ga gojili ob prisotnosti EtBr, se je število k.e. zmanjšalo na  $\sim 1 \times 10^9$  k.e./ml; pri sevu K7, ki smo ga gojili ob prisotnosti mitomicina C, pa na  $\sim 2,8 \times 10^8$  k.e./ml.

Na tvorbo bakteriocinov (gassericinov K7 A in K7 B) precepljanje, izpostavljenost višji temperaturi (45 °C) ali mutagenim dejavnikom (EtBr, mit.C) niso vplivali. Cone zaviranja rasti indikatorskega seva *L. sakei* 2714, ki je občutljiv za bakteriocinski kompleks seva K7, so se pojavile ne glede na pogoje, pri katerih smo gojili sev K7 in so bile po velikosti enake conam okrog matičnega seva K7 (slika 35). Z izvedenim poskusom smo torej potrdili obstojnost kromosomsko lociranih genskih determinant za tvorbo bakteriocinov pri sevu K7. V podobnem poskusu (Daeschel in sod., 1990) z različnimi mutagenimi dejavniki niso uspeli pridobiti nebakteriocinogene mutante, se je pa spremenil plazmidni profil matičnega seva *L. plantarum* C-11, ki proizvaja plantaricin A.

Gojenje seva K7 v stresnih pogojih (K7/37 °C, K7/45 °C, K7/EtBr, K7/mitC) pa je povzročilo povečano občutljivost za antibiotike, glede na matični sev K7. Na podlagi primerjave izmerjenih premerov con zaviranja rasti (v mm) z objavljenimi (Charteris in sod., 1998), smo ugotovili srednjo občutljivost matičnega seva K7 za kloramfenikol in penicilin (za penicilin je srednje občutljiv tudi K7/EtBr) in občutljivost za ostale antibiotike (eritromicin, rifampicin, tetraciklin in vankomicin). Po štiridesetih precepljanjih seva K7, gojenega v stresnih pogojih, so se cone zaviranja rasti še povečale, kar nakazuje povečano občutljivost za vse testirane antibiotike. Za preverjanje občutljivosti laktobacilov za antibiotike še ni na voljo enotnega sistema, čeprav je ta kriterij eden izmed ključnih pri preverjanju probiotičnih sevov. Bakterijski sevi, ki jih uporabljamo v starterskih kulturah ali kot probiotike, so namreč lahko gostitelji genov za odpornost proti različnim antibiotikom, ki se lahko prenesejo v druge seve MKB in/ali (potencialno) patogene bakterije v črevesju (Danielsen in Wind, 2003; Zhou in sod., 2005). Zaradi uporabe različnih metod in neizdelanih kriterijev za določanje občutljivosti (odpornosti) za antibiotike, je otežkočena tudi primerjava rezultatov med različnimi študijami oziroma med izolati različnega izvora, na primer med laktobacili iz človeškega gastrointestinalnega trakta in kliničnimi izolati laktobacilov (Salminen in sod., 2006).

Razlike v fermentaciji ogljikovih hidratov med matičnim sevom K7 in sevom K7, gojenim v stresnih pogojih, so se pojavile pri fermentaciji manoze, N-acetyl-glukozamina, amigdalina, arbutina, salicina, celobioze, laktoze, trehaloze in D-turanoze (priloga M). Vendar pa je profil fermentacije ogljikovih hidratov še vedno odgovarjal skupini *Lactobacillus acidophilus* 1. Predstavniki vrste *L. gasseri*, ki je sestavni del človekovega gastrointestinalnega trakta, skupaj z zelo sorodno vrsto *L. johnsonii*, spadajo v homologno podskupino *L. acidophilus* 1 (Johnson in sod., 1980; Klaenhammer, 1998). O posameznih sevih vrste *L. gasseri* in njihovi protimikrobní aktivnosti še ni na voljo veliko informacij, čeprav predstavniki omenjene vrste izkazujejo številne probiotične lastnosti. Zato karakterizacija bakteriocinov seva *L. gasseri* K7 (gassericina K7 A in K7 B), primerjava z že opisanima acidocinoma LF221 A in LF221 B seva *L. gasseri* LF221 (Čanžek Majhenič in sod., 2004) in poskusi njihove heterologne tvorbe pomembno prispevajo k (s)poznavanju protimikrobnega potenciala vrste *L. gasseri* ter k odkrivanju posebnosti dvopeptidnih bakteriocinov MKB. Bakteriocini sevov K7 in LF221 s svojim širokim protimikrobnim spektrom obtajajo številne možnosti uporabe, bodisi v obliki očiščenih pripravkov kot bio-konzervansi, bodisi kot del farmacevtskih pripravkov v terapevtske namene. Seva *L. gasseri* K7 in LF221 pa sta zaradi svojega humanega izvora in številnih probiotičnih lastnosti aplikativno zanimiva, tako v prehranski industriji (funkcionalna hrana) kot farmacevtski industriji (zdravila OTC).

## 5.2 SKLEPI

- Sev *L. gasseri* K7 tvori (najmanj) dva bakteriocina, gassericin K7 A in gassericin K7 B, ki sta strukturno podobna bakteriocinoma seva *L. gasseri* LF221, acidocinu LF221 A in acidocinu LF221 B.
- Geni za tvorbo gassericinov K7 A in K7 B se nahajajo na kromosому seva K7 in so identični genom za tvorbo acidocinov LF221 A in LF221 B na nukleotidnem nivoju: 1143 bp nukleotidnega zaporedja gassericina K7 A se ujema s 1143 bp nukleotidnega zaporedja acidocina LF221 A in 3276 bp nukleotidnega zaporedja gassericina K7 B se ujema s 3276 bp nukleotidnega zaporedja acidocina LF221 B.
- Nukleotidni zaporedji gassericina K7 A (1143 bp) in gassericina K7 B (3276 bp) smo shranili v gensko banko GenBank pod številkama EF392861 oziroma AY307382.
- Na podlagi ugotovljenih lastnosti nukleotidnih zaporedij gassericinov K7 A in K7 B ter njunih homologij z dvopeptidnimi bakteriocini sklepamo, da bakteriocina seva K7 spadata med nelantibiotike in sicer v podskupino IIb, med dvopeptidne nelantibiotike.
- Bakteriocinska kompleksa sevov K7 in LF221 se razlikujeta od do sedaj opisanih. Predvsem je zanimiva navzkrižna aktivnost homolognih podenot gassericina K7 B (acidocina LF221 B) in gassericina T ter navzkrižna homolognost podenot bakteriocinov obeh sevov s podenotama sakacina T.
- Heterolognega izražanja aktivnih gassericinov K7 A in K7 B oziroma acidocinov LF221 A in LF221 B nismo uspeli potrditi v osmih izbranih gramnegativnih in grampozitivnih ekspresijskih sistemih, kljub dejству, da smo v transformantah potrdili prisotnost vstavljenih fragmentov s pravim nukleotidnim zaporedjem.
- Tvorba bakteriocinov seva K7 je stabilna lastnost seva, tudi pri gojenju skozi daljše časovno obdobje v stresnih pogojih.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Med veliko in raznoliko skupino ribosomsko sintetiziranimi protimikrobnimi proteinov prokariontov so največje pozornosti deležni bakteriocini grampozitivnih MKB, ki imajo sposobnost baktericidnega delovanja proti bakterijam iste ali sorodnih vrst. V zadnjem času pa odkrivamo vedno več bakteriocinov s širšim protimikrobnim spektrom, ki inhibirajo tudi nesorodne bakterije, celo nekatere patogene bakterije. Zato zanimanje zanje narašča, saj imajo širok potencial uporabe kot bio-konzervansi, predvsem v prehrani ljudi in živali, pa tudi v farmacevtski industriji in biomedicini. Bakteriocini MKB se med sabo razlikujejo po mestu nahajanja genskega zapisa, molekulski masi, biokemijskih lastnosti, strukturi, protimikrobnem spektru in načinu delovanja. Različnim delitvam je skupna razvrstitev bakteriocinov v tri velike skupine: I lantibiotiki (nizin), II topotno obstojni, membransko aktivni nelantibiotiki (pediocin PA-1) in III ostali bakteriocini. Za nas so bili najbolj zanimivi dvopeptidni bakteriocini, ki tvorijo podskupino IIb. Le ti za svojo maksimalno aktivnost potrebujejo delovanje dveh različnih peptidov (podenot), ki delujeta sinergistično in sta kodirana z dvema sosednjima strukturnima genoma na istem operonu. Običajno jima sledi še gen za protein imunosti, skupen za oba peptida, ki bakteriocinogeno celico ščiti pred delovanjem lastnega bakteriocina. Posamezni podenoti nastaneta kot neaktivna prepeptida z N-terminalnim vodilnim zaporedjem, ki je večinoma dvoglicinskega tipa in se med procesiranjem odcepi. Pri aktivaciji (procesiranju) in izločanju bakteriocina iz celice sodeluje ABC-transportni protein in dodatni transportni protein. Delovanje bakteriocinov temelji na tvorbi por v membrani občutljivega mikroorganizma, ki povzroči povečano prepustnost membrane, ionsko neravnovesje in posledično smrt celice. Pri dvopeptidnih bakteriocinih v tem procesu sodelujejo obe podenoti. Predmet našega proučevanja sta bila širokospektralna bakteriocinska kompleksa sevov *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221, ki sta humanega izvora in izkazujeta osnovne probiotične lastnosti. Razlikujeta se v plazmidnem profilu, profilu RAPD, tvorbi bakteriocinov in rastnih značilnostih. Zaradi podobnih protimikrobnih spektrov obeh sevov smo podrobnejše proučili bakteriocinski kompleks seva K7, preverili njegovo obstojnost tvorbe in aktivnost v stresnih pogojih ter bakteriocine seva K7 primerjali z že opisanimi bakteriocini seva LF221 in ostalimi v bazah podatkov. Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali standardne metode molekularne biologije. Potrdili smo, da sev K7 tvori vsaj dva bakteriocina, gassericina K7 A in K7 B, ki smo jima določili nukleotidni zaporedji in ju shranili v gensko banko GenBank pod številkama EF392861 (gassericin K7 A) in AY307382 (gassericin K7 B). Z analizo nukleotidnih zaporedij genov za tvorbo gassericinov K7 A in K7 B in primerjavo z nukleotidnim zaporedjem genov za tvorbo acidocinov LF221, smo ugotovili 100-odstotno identičnost. Ugotovili smo tudi 98 do 100-odstotno identičnost gassericina K7 B z gassericinom T ter različne odstotke homologij.

gassericinov K7 A in K7 B z nekaterimi dvopeptidnimi bakteriocini (preglednici 12 in 13). Posebno zanimivo je odkritje navzkrižne aktivnosti homolognih podenot gassericina K7 B in gassericina T. Zelo nenavadno pa je tudi, da je ena podenota sakacina T (SakT $\beta$ ) homologna z aktivno podenoto gassericina K7 A (GasK7A), druga podenota sakacina T (SakT $\alpha$ ) pa s komplementarno podenoto gassericina K7 B (GasK7b). Na podlagi ugotovljenih homologij in tipičnih lastnosti N-terminalnih vodilnih zaporedij posameznih podenot gassericinov K7 A in K7 B (preglednica 14), smo oba uvrstili med dvopeptidne bakteriocine, v podskupino IIb. V nadaljevanju smo želeli bakteriocine sevov K7 in LF221 heterologno izraziti v izbranih gramnegativnih in grampozitivnih ekspresijskih sistemih, da bi ugotovili prispevek posameznega bakteriocina k skupni protimikrobnii aktivnosti bakteriocinskega kompleksa in morda olajšali kontrolo regulacije izražanja bakteriocinov, z namenom povečati njihovo tvorbo. Zaradi pomanjkanja informacij o heterolognem izražanju gassericinov, smo ekspresijske sisteme izbrali na osnovi študij o heterologni tvorbi drugih bakteriocinov MKB iz skupine II. Za posamezne bakteriocine smo pripravili več različnih plazmidnih konstruktov. Tvorbo gassericina K7 A, gassericina K7 B in acidocina LF221 B smo ugotavliali v gostiteljskih sevih *Lc. lactis* IL1403 (pogosto uporabljen za heterologno ekspresijo bakteriocinov MKB), *Ent. faecium* 2749 (tvori enterocina A in B), *E. coli* 2746 in 2747 (tvorita kolicin V) in *L. gasseri* LF221 bac<sup>-</sup> (nebakteriocinogena mutanta seva *L. gasseri* LF221). Izražanje gassericina K7 A smo ugotavliali še v sevu *Lc. lactis* K1 (tvori laktkokcin A), izražanje posameznih podenot gassericina K7 A pa v sevih *E. coli* BL21 DE3 pLysS in *Lc. lactis* NZ9000, z uporabo inducibilnega sistema NICE. Tvorbo in aktivnost rekombinantnih proteinov smo preverjali s pomočjo indikatorskega seva *L. sakei* 2714, ki je občutljiv za bakteriocinska kompleksa sevov K7 in LF221, in/ali z analizo NaDS-PAGE. V nobenem izmed omenjenih uporabljenih sevov nismo uspeli potrditi heterolognega izražanja aktivnih bakteriocinov sevov K7 in LF221, kljub dejству, da smo v transformantah potrdili prisotnost vstavljenih fragmentov s pravim nukleotidnim zaporedjem. Za to je možnih več vzrokov, ki se lahko skrivajo v regulaciji njihove tvorbe (vključuje tako sintezo, kot tudi transport, procesiranje in izločanje posameznega bakteriocina ter imunost nanj). Lahko je prišlo do napak v tvorbi ali izločanju posameznega bakteriocina iz celice, do neaktivnosti bakteriocina ali prenizke ravni tvorbe, da bi lahko potrdili in kvantificirali njegovo izražanje. Preverjali smo še obstojnost in aktivnost bakteriocinskega kompleksa seva K7 skozi daljše časovno obdobje v stresnih pogojih gojenja. Ugotovili smo, da izpostavljenost seva K7 povišani temperaturi gojenja (45 °C) ali mutagenim dejavnikom (etidijevemu bromidu ali mitomicinu C) ne vpliva na sposobnost tvorbe in aktivnost bakteriocinov. V stresnih pogojih gojenja pa se nekoliko spremenijo morfologija celic, plazmidni profil in profil fermentacije ogljikovih hidratov, zmanjša se število k.e. v 1 ml kulture in poveča občutljivost za antibiotike. Vrsta *L. gasseri* spada, kljub številnim predstavnikom s probiotičnimi lastnostmi, med manj raziskane vrste MKB. Bakteriocini sevov K7 in LF221 so novi predstavniki dvopeptidnih

bakteriocinov (podskupina IIb), saj se razlikujejo od do sedaj opisanih. Predvsem je zanimivo odkritje navzkrižnih aktivnosti in homologij, ki je morda povezano s širokospektralnostjo bakteriocinskih kompleksov sevov K7 in LF221. Podobnega primera v literaturi nismo zasledili, zato predstavlja izziv nadalnjih raziskav. Opis bakteriocinov seva *L. gasseri* K7 (gassericina K7 A in K7 B), primerjava z acidocinoma LF221 A in LF221 B seva *L. gasseri* LF221 ter številni poskusi njihove heterologne ekspresije v gramnegativnih in grampozitivnih bakterijah, pa dajejo nove iztočnice za odkrivanje mehanizmov in razumevanja delovanja dvopeptidnih bakteriocinov ter posledično spoznavanja protimikrobnega potenciala vrste *L. gasseri*.

## 6.2 SUMMARY

Among large and heterogeneous group of ribosomally synthesized prokaryotic antimicrobial peptides, bacteriocins produced by Gram-positive lactic acid bacteria (LAB) draw our attention the most. They act bacteriocidic towards closely related strains though a large number of bacteriocins with wide inhibitory spectrum that include even pathogens has been characterized in recent years. Increasing interest in such compounds is due to their preservative potential in food and feed industry as bio-conservans and possible applications in pharmaceutical industry and biomedicine. LAB bacteriocins differ in location of their genetic determinants, molecular mass, biochemical properties, structure, inhibitory spectrum and way of action. Many different classifications of LAB bacteriocins are known but they are commonly divided in three classes: I lantibiotics (nisin), II heat stable, membrane active non-lantibiotics (pediocin PA-1) and III the rest of bacteriocins. Our great attention has been focused mostly on subclass IIb which consists of two-peptide bacteriocins. Activity of the two-peptide bacteriocins depends on synergistic action of two individual peptides. Structural genes of complementary peptides are located on the same operon, followed by a dedicated immunity gene, coding for only one immunity protein that protect the bacteriocinogenic cell. Both peptides are synthesized as inactive prepeptides with an N-terminal leader sequence that is usually of double-glycine type and is cleaved during processing. Dedicated ABC-transport protein and accessory protein are required for transport, processing and secretion of the mature bacteriocin. The two-peptide bacteriocins predominantly act by forming pores in the target cell membrane, causing dissipation and leaking of the cell membrane which leads to the death of the cell. Our study deals with wide inhibitory bacteriocin complexes of two *L. gasseri* strains: *L. gasseri* K7 and *L. gasseri* LF221 which are of human origin and fulfil basic probiotic requirements. Strains differ in plasmid and RAPD profiles, bacteriocin production and growth characteristics. Due to their similar inhibitory spectra we examined closely bacteriocin complex of the K7 strain and compared it with already described bacteriocins of the LF221 strain and other known bacteriocins. Besides we investigated stability of production and activity of K7 bacteriocins under stress conditions. The standard molecular biology tools and techniques

were used at experimental studies. We confirmed that K7 strain produces at least two bacteriocins, named gassericin K7 A and gassericin K7 B. The acquired nucleotide sequences of both bacteriocins were deposited at GenBank under accession numbers EF392861 for gassericin K7 A and AY307382 for gassericin K7 B respectively. Analysis and BLAST search of the gassericins' K7 A and K7 B genes revealed a 100-percent identity to the acidocins' LF221 A and LF221 B genes. Further search revealed 98 to 100 percent identity of gassericin K7 B genes to gassericin T genes and also some other minor homologies of gassericins K7 A and K7 B with two-peptide bacteriocins (tables 12 and 13). Particularly interesting was the discovery of crosswise activity of homological subunits of gassericin K7 B and gassericin T. It is very unusual also that one subunit of sakacin T (SakT $\beta$ ) is homological to the active subunit of gassericin K7 A (GasK7A) and the other one (SakT $\alpha$ ) is homological to the complementary subunit of gassericin K7 B (GasK7b). On the basis of homologies discovered and typical characteristics of the N-terminal leader peptides of gassericins' K7 A and K7 B subunits (table 14) we classified both gassericins as two-peptide bacteriocins, belonging to the subclass IIb. In order to find out how much does a single bacteriocin contribute to the entire inhibitory spectra of the K7 or LF221 bacteriocin complexes and to facilitate the control of bacteriocin gene expression to achieve the higher production levels, we continued research on K7 gassericins and LF221 acidocins with heterologous expression studies. Due to the low information available on heterologous expression of gassericins, selection of the used expression systems was based on heterologous production studies of other class II bacteriocins from LAB. We made different plasmid constructs for each of the K7 and LF221 bacteriocin. Heterologous production and activity of gassericin K7 A, gassericin K7 B and acidocin LF221 B was investigated in the following host strains: *Lc. lactis* IL1403 which is often used for heterologous expression of the LAB bacteriocins, *Ent. faecium* 2749 which produces enterocins A and B, *E. coli* 2746 and 2747 which are colicin V producers and *L. gasseri* LF221 bac $^+$  which is a nonbacteriocinogenic mutant of *L. gasseri* LF221 strain. Expression of gassericin K7 A was studied too in *Lc. lactis* K1 strain which is a lactococcin A producer. In *E. coli* BL21 DE3 pLysS and *Lc. lactis* NZ9000 strains we tried to express subunits of gassericin K7 A by using an inducible nisin-controlled gene expression system (NICE). Production and activity of recombinant proteins were checked by an *L. sakei* 2714 indicator strain (which is sensitive to bacteriocin complexes of K7 and LF221 strains) and/or by NaDS-PAGE analysis. In spite of the fact that transformants contained inserts of correct nucleotide sequences we were not able to confirm the heterologous expression of bacteriocins of K7 and LF221 strains in none of the strains used. There are many possible reasons why - it could be due to the regulation of bacteriocins which includes synthesis, transport, processing, secretion and immunity. Errors in synthesis or secretion could be the cause of inactivity of bacteriocin produced or the level of production was too low to confirm and quantify the expression of bacteriocin.

We were investigating stability of production and activity of K7 bacteriocins during longer period of subculturing under different stress conditions and found out that higher incubation temperature (45 °C) or presence of mutagenic agents (ethidium bromide or mytomycin C) had no influence on the production or activity of K7 bacteriocins. On the other hand we noticed minor morphological changes, reduced number of colony units in 1 ml of the culture, increased antibiotic susceptibility and changes in plasmid and carbohydrate fermentation profiles. *L. gasseri* spp., consisting of many potential probiotic strains, is not a very much studied group of LAB. Bacteriocins of K7 and LF221 strains differ from other known bacteriocins and are new representatives of the two-peptide bacteriocins (subclass IIb). Above all things the discoveries of crosswise activities and homologies are very surprising which could be connected to the wide inhibitory spectra of K7 and LF221 bacteriocin complexes. We have not found a similar case in the literature, therefore it is a challenge for the future research. Characterization of the *L. gasseri* K7 strains' bacteriocins (gassericins K7 A and K7 B), comparison with acidocins LF221 A and LF221 B of the *L. gasseri* LF221 strain and many attempts of the heterologous expression of both strains' bacteriocins in Gram-negative and Gram-positive bacteria are giving new starting-points to find out and understand the mechanisms of acting of the two-peptide bacteriocins and of the *L. gasseri* spp. antimicrobial potential in general.

## 7 VIRI

- Abbe T., Klaenhammer T.R., Letellier L. 1994. Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1006-1013
- Abbe T. 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiology Letters*, 129: 1-10
- Allison G.E., Fremaux C., Klaenhammer T.R. 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactaci F operon. *Journal of Bacteriology*, 176: 2235-2241
- Allison G.E., Ahn C., Stiles M.E., Klaenhammer T.R. 1995. Utilization of the leucocin A export system in *Leuconostoc gelidum* for production of a *Lactobacillus* bacteriocin. *Fems Microbiology Letters*, 131: 87-93
- Anderssen E.L., Diep D.B., Nes I.F., Eijsink V.G.H., Nissen-Meyer J. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricin EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2269-2272
- Aukrust T.W., Brurberg M.B., Nes I.F. 1995. Transformation of *Lactobacillus* by electroporation. V: Electroporation Protocols for Microorganisms. Nickoloff J.A. (ed.). New York, Humana Press Inc.: 201-208
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 1999. Short protocols in molecular biology, 4<sup>th</sup> ed. John Wiley & Sons: loč. pag.
- Axelsson L., Holck A. 1995. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *Journal of Bacteriology*, 177: 2125-2137
- Axelsson L., Katla T., Bjornslett M., Eijsink V.G.H., Holck A. 1998. A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiological Letters*, 168: 137-143
- Axelsson L., Lindstad G., Naterstad K. 2003. Development of an inducible gene expression system for *Lactobacillus sakei*. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 115-120
- Balla E., Dicks L.M.T., du Toit M., 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1298-1304
- Batdorj B., Dalgalarondo M., Choiset Y., Pedroche J., Métro F., Prévost H., Chobert J.-M., Haertlé T. 2006. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 4: 837-848
- van Belkum M.J., Hayema B.J., Jeeninga R.E., Kok J., Venema G. 1991a. Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 492-498

- van Belkum M.J., Kok J., Venema G., Holo H., Nes I.F., Konings W.N., Abeel T. 1991b. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *Journal of Bacteriology*, 173: 7934-7941
- van Belkum M.J., Stiles M.E. 1995. Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3573-3579
- van Belkum M.J., Worobo R.W., Stiles M.E. 1997. Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 23: 1293-1301
- van Belkum M.J., Stiles M.E. 2000. Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Natural Product Reports*, 17: 323-335
- Billman-Jacobe H., 1996. Expression in bacteria other than *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 7: 499-504
- Birnboim H.C., Doly J. 1979. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7: 1513-1522
- Blom H., Katla T., Hagen B.F., Axelsson L. 1997. A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 38: 103-109
- Bohaychuk V.M., Franz C.M.A.P., van Belkum M.J., Stiles M.E. McMullen L.M. 1999. Heterologous expression of brochochin-C in *Carnobacterium* spp. V: Abstracts of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. FEMS, Veldhoven, The Netherlands, p. C54-C54
- Bower C.K., Bothwell M.K., McGuire J. 2001. Lantibiotics as surface active agents for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 22, 4: 259-265
- Brotz H., Josten M., Wiedemann I., Schneider U., Gotz F., Bierbaum G., Sahl H.G. 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular Microbiology*, 30: 317-327
- Bruno M.E.C., Montville T.J. 1993. Common mechanistic action of bacteriocin from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 3003-3010
- Bryan E.M., Bae T., Kleerebezem M., Dunny G.M. 2000. Improved vectors for nisin-controlled expression in Gram-positive bacteria. *Plasmid*, 44: 183-190
- Buyong N., Kok J., Luchansky J.B. 1998. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4842-4845
- Callewaert R., Holo H., Devreese B., van Beeumen J., Nes I.F., de Vuyst L. 1999. Characterization and production of amylovorin L471, a bacteriocin purified from *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 by a novel three-step method. *Microbiology*, 145: 2559-2568

- Casaus P., Nilsen T., Cintas L.M., Nes I.F., Hernández P.E., Holo H. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143: 2287-2294
- Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, 61: 1636-1643
- Cheigh C.I., Pyun Y.R. 2005. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnology Letters*, 27: 1641-1648
- Chen Y., Shapira R., Eisenstein M., Montville T.J. 1997. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 524-531
- Chen Y., Ludescher R.D., Montville T.J. 1998. Influence of lipid composition on pediocin PA-1 binding to phospholipids vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3530-3532
- Chikindas M.L., Garcia-Garcera M.J., Driessen A.J., Ledeboer A.M., Nissen-Meyer J., Nes I.F., Abee T., Konings W.N., Venema G. 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 3577-3584
- Chikindas M.L., Venema K., Ledeboer A.M., Venema G., Kok J. 1995. Expression of lactocin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Letters of Applied Microbiology*, 21: 183-189
- 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., Håvarstein L.S., Hernández 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4321-4330
- Cintas L.M., Casaus P., Herranz C., Håvarstein L.S., Holo H., Hernández 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. *Journal of Bacteriology*, 182: 6806-6814
- Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1-20
- Coderre P.E., Somkuti G.A. 1999. Cloning and expression of the pediocin operon in *Streptococcus thermophilus* and other lactic fermentation bacteria. *Current Microbiology*, 39: 295-301
- Contreras B.G.L., de Vuyst L., Devreese B., Busanyova K., Raymaeckers J., Bosman F., Sablon E., Vandamme E.J. 1997. Isolation, purification, and amino acid sequence of lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 13-20
- Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. 2005a. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 777-788

- Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. 2005b. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutical potential. *Current Protein and Peptide Science*, 6: 61-75
- Čanžek Majhenič A. 2002. Klasifikacija bakteriocinov seva *Lactobacillus gasseri* LF221 na osnovi genskega zapisa. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 80 str.
- Čanžek Majhenič A., Matijašić B.B., Rogelj I. 2003. Chromosomal location of the genetic determinants for bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Journal of Dairy Research*, 70: 199-203
- Čanžek Majhenič A., Venema K., Allison G.E., Matijašić B.B., Rogelj I., Klaenhammer T.R. 2004. DNA analysis of the genes encoding acidocin LF221 A and acidocin LF221 B, two bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 705-714
- Daeschel M.A., McKenney M.C., McDonald L.C. 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiology*, 7, 2: 91-98
- Danielsen M., Wind A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 1-11
- Daw M.A., Falkiner F.R. 1996. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*, 27, 6: 467-479
- Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C., Ross P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 9: 1058-1071
- Diep D.B., Håvarstein L.S., Nes I.F. 1995. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *L. plantarum* C11. *Molecular Microbiology*, 18: 631-639
- Diep D.B., Håvarstein L.S., Nes I.F. 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology*, 178: 4472-4483
- Diep D.B., Johnsborg O., Risøen P.A., Nes I.F. 2001. Evidence for dual functionality of the operon *plnABCD* in the regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum*. *Molecular Microbiology*, 41: 633-644
- Diep D.B., Nes I.F. 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Current Drug Targets*, 3: 107-122
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 7: 2384-2389
- Dodd H.M., Horn N., Gasson M.J. 1990. Analysis of the genetic determinant for the production of the peptide antibiotic nisin. *Journal of General Microbiology*, 136: 555-566
- Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16: 6127-6145

- Dubendorff J.W., Studier F.W. 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of Molecular Biology*, 219, 1: 45-49
- Eijsink V.G.H., Brurberg M.B., Middelhoven P.H., Nes I.F. 1996. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *Journal of Bacteriology*, 178, 8: 2232-2237
- Eijsink V.G.H., Skeie M., Middelhoven P.H., Brurberg M.B., Nes I.F. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3275-3281
- Eijsink V.G.H., Axelsson L., Diep D.B., Håvarstein L.S., Holo H., Nes I.F. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological welfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 639-654
- Ennahar S., Sonomoto K., Ishizaki A. 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87: 705-716
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 85-106
- Finland G., Blingsmo O.R. Sletten K., Jung G., Nes I.F., Nessen-Meyer J. 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3313-3318
- Finland G., Jack R., Jung G., Nes I.F., Nessen-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. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 5057-5060
- 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. *Microbiology*, 148, 4: 973-84
- Franke C.M., Tiemersma J., Venema G., Kok J. 1999. Membrane topology of the lactococcal bacteriocin ATP-binding cassette transporter protein LcnC. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 8484-8490
- Franz C.M.A.P., Worobo R.W., Quadri L.E.N., Schillinger U., Holzapfel W.H., Vederaas J.C., Stiles M.E. 1999. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2170-2178
- Franz C.M.A.P., van Belkum M., Worobo R.W., Vederaas J.C., Stiles M.E. 2000a. Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity gene confers cross-protection to enterocin B. *Microbiology*, 146: 621-631
- Franz C.M.A.P., Stiles M.E., van Belkum M.J. 2000b. Simple method to identify bacteriocin induction peptides and to auto-induce bacteriocin production at low cell density. *FEMS Microbiology Letters*, 186: 181-185
- Fremaux C., Ahn C., Klaenhammer, T.R. 1993. Molecular analysis of the lactacin F operon. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 11: 3906-3915

- Fuglsang A. 2003. Lactic acid bacteria as prime candidates for codon optimization. Biochemical and Biophysical Research Communications, 312: 285-291
- Garneau S., Martin N.I., Vedera J.C. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Biochimie, 84: 577-592
- Gilson L., Mahanty H.K., Kolter R. 1987. Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. Journal of Bacteriology, 169, 6: 2466-2470
- Goldstein B.P., Wei J., Greenberg K., Novick R. 1998. Activity of nisin against *Streptococcus pneumoniae*, in vitro, a mouse infection model. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 42: 277-280
- Gutiérrez J., Criado R., Citti R., Martín M., Herranz C., Nes I.F., Cintas L.M., Hernández P.E. 2005. Cloning, production and functional expression of enterocin P, a *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*. International Journal of Food Microbiology, 103: 239-250
- van de Guchte M., van der Vossen J.M.B.M., Kok J., Venema G. 1989. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 55, 1: 224-228
- Hanahan D. 1998. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Journal of Molecular Biology, 166: 557-580
- Hansen E.B. 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. International Journal of Food Microbiology, 78: 119-131
- Harris L.J., Daeschel M.A., Stiles M.E., Klaenhammer T.R. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 52: 3784-3787
- Hauge H.H., Nissen-Meyer J.J., Nes I.F., Eijsink V.G.H. 1998. Amphiphilic  $\alpha$ -helices are important structural motifs in the  $\alpha$  and  $\beta$  peptides that constitute the bacteriocin lactococcin G. Enhancement of helix formation upon  $\alpha$ - $\beta$  interaction. European Journal of Biochemistry
- Hauge H.H., Mantzilas D., Eijsink V.G., Nissen-Meyer J.J. 1999. Membrane-mimicking entities induce structuring of the two-component bacteriocins plantaricin E/F and plantaricin J/K. Journal of Bacteriology, 181: 740-747
- Helander I.M., von Wright A., Mattila-Sandholm T.-M. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. Trends in Food Science & Technology, 8: 146-150
- Herranz C., Caus P., Mukhopadhyay S., Martínez J.M., Rodríguez J.M., Nes I.F., Hernández P.E., Cintas L.M. 2001. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. Food Microbiology, 18: 115-131
- Holck A., Axelsson L., Birkeland S.-E., Aukrust T., Blom H. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. Journal of Genetic Microbiology, 138: 2715-2720

- 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. *Journal of Bacteriology*, 173, 12: 3879-3887
- Holo H., Nes I.F. 1995. Transformation of *Lactococcus* by electroporation. V: *Electroporation Protocols for Microorganisms*. Nickoloff J.A. (ed.). New York, Humana Press Inc.: 195-199
- Horn N., Martínez M.I., Martínez J.M., Hernández P.E., Gasson M.J., Rodríguez J.M., Dodd H.M. 1998. Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcin A secretory apparatus. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 818-823
- Horn N., Fernández A., Dodd H.M., Gasson M.J., Rodríguez J.M. 2004. Nisin-controlled production of pediocin PA-1 and colicin V in nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 8: 5030-2
- Håvarstein L.S., Holo H., Nes I.F. 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequence with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 140: 2383-2389
- Håvarstein 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. *Molecular Microbiology*, 16: 229-240
- Ingham A.B., Sproat K.W., Tizard M.L.V., Moore R.J. 2005. A versatile system for the expression of nonmodified bacteriocins in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 676-683
- Jack R.W., Tagg J.R., Ray B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59, 2: 171-200
- Jiménez-Díaz R., Rios-Sánchez R.M., Desmazeaud M., Ruiz-Barba J.L., Piard J.C. 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 5: 1416-1424
- 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. *Journal of Bacteriology*, 167: 439-446
- Joerger M.C., Klaenhammer T.R. 1990. Cloning, expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *Journal of Bacteriology*, 172: 6339-6347
- Johnson J.L., Phelps C.F., Cummins C.S., London J., Gasser F. 1980. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30: 53-68
- Kanatani K., Oshimura M., Sano K. 1995. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1061-1067
- Kawai Y., Saito T., Suzuki M., Itoh T. 1998. Sequence analysis by cloning of the structural gene of gassericin A, a hydrophobic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62, 5: 887-892

- Kawai Y., Saitoh B., Takahashi O., Kitazawa H., Saito T., Nakajima H., Itoh T. 2000. Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, 10: 2201-2208
- Kawai Y., Ishii Y., Arakawa K., Uemura K., Kitazawa H., Saito T., Itoh T. 2001. *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. *Food Microbiology*, 18, 4: 407-415
- Kawai Y., Ishii Y., Arakawa K., Uemura K., Saitoh B., Nishimura J., Kitazawa H., Yamazaki Y., Tateno Y., Itoh T., Saito T. 2004. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5: 2906-2911
- Klaenhammer T.R. 1984. A general method for plasmid isolation in lactobacilli. *Current Microbiology*, 10: 23-28
- Klaenhammer T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 39-86
- Klaenhammer T.R. 1995. Genetics of intestinal lactobacilli. *International Dairy Journal*, 5: 1019-1058
- Klaenhammer T.R. 1998. Functional activities of *Lactobacillus* probiotics: genetic mandate. *International Dairy Journal*, 8: 497-505
- Kleerebezem M., Quadri L.E., Kuipers O.P., de Vos W.M. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones two-component signal-transduction system in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 24: 895-904
- Knoche K., Kephart D. 1999. Cloning blunt-end Pfu DNA polymerase-generated PCR fragments into pGEM-T vector systems. Promega notes, 71: 1 str.
- Kok J., Holo H., van Belkum M.J., Haandrikman A.J., Nes I.F. 1993. Non-nisin bacteriocins in lactococci: biochemistry, genetics and mode of action. V: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Hoover D., Steenson L (eds.). New York, Academic Press, inc.: 121-150
- Konings W.N., Kok J., Kuipers O.P., Poolman B. 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Current Opinion in Microbiology*, 3: 276-282
- Kuipers O.P., Rollema H.S., de Vos W.M., Siezen J. 1993. Biosynthesis and secretion of a precursor of nisin Z by *Lactococcus lactis*, directed by the leader peptide of the homologous lantibiotic subtilin from *Bacillus subtilis*. *FEBS Letters*, 330: 23-27
- Kuipers O.P., de Ruyter P.G.G.A., Kleerebezem M., de Vos W.M. 1997. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends in Biotechnology*, 15: 135-140
- Kuipers O.P., de Ruyter P.G.G.A., Kleerebezem M., de Vos W.M. 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in LAB. *Journal of Biotechnology*, 64: 15-21
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

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*. *Microbiology*, 141: 1629-1635

Lerner C.G., Carter C.D. 1995. PCR colony screening using the scintillation proximity assay to detect inserts in cloning vectors. *Biotechniques*, 19, 6: 914-917

Makrides S.C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 60: 512-538

Marciset O., Jeronimus-Stratingh M.C., Mollet B., Poolman B. 1997. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 14277-14284

Marugg J.D., González C.F., Kunka B.S. Ledebuur A.M., Pucci M.J., Toonen M.Y. Walker S.A., Zoetmulder L.C.M., Vandenberghe P.A. 1992. Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2360-2367

Martínez J.M., Kok J., Sanders J.W. Hernández P.E. 2000. Heterologous co-production of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3543-3549

Mason C.K., Collins M.A., Thompson K. 2005. Modified electroporation protocol for Lactobacilli isolated from the chicken crop facilitates transformation and the use of a genetic tool. *Journal of Microbiological Methods*, 60: 353-363

Matijašić B.B., Rogelj I. 1997. Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221 - production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Process Biochemistry*, 33, 3: 345-352

Matijašić B.B., Rogelj I., Nes I.F., Holo H. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 606-612

Matijašić B.B., Rogelj I. 1999. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli isolated from cheese and baby faeces. *Food Technology and Biotechnology*, 37, 2: 93-100

Matijašić B.B., Rogelj I. 2000. *Lactobacillus* K7 - a new candidate for a probiotic strain. *Food Technology and Biotechnology*, 38: 113-119

Matijašić B.B., Narat M., Zorič M. 2003. Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 cells. *Food Technology and Biotechnology*, 41, 1: 83-88

Matijašić B.B., Stojković S., Salobir J., Malovrh Š., Rogelj I. 2004. Evaluation of the *Lactobacillus gasseri* K7 and LF221 strains in weaned piglets for their possible probiotic use and their detection in the faeces. *Animal Research*, 53: 35-44

Matijašić B.B., Narat M., Peternel M.Z., Rogelj I. 2006. Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion in vitro on Caco-2 cells and ex vivo on pigs' jejunal tissue. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 92-96

- Mayr-Harting A., Hedges A.J., Berkeley R.C.W. 1972. Methods for studying bacteriocins. V: Methods in microbiology. Norris J.R., Ribbons D.W. (eds.). London, Academic Press, 315-422
- McAuliffe O., Ross R.P., Hill C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiology Reviews, 25: 285-308
- McCormick J.K., Worobo R.W. Stiles M.E. 1996. Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway. Applied and Environmental Microbiology, 62: 4095-4099
- McCormick J.K., Poon A., Sailer M., Gao Y., Roy K.L., McMuller L.M., Vedera J.C., Stiles M.E., van Belkum M. 1998. Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C, an antitbotulinal, two-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754. Applied and Environmental Microbiology, 64, 12: 4757-4766
- McCormick J.K., Klaenhammer T.R., Stiles M.E. 1999. Colicin V can be produced by lactic acid bacteria. Letters of Applied Microbiology, 29: 37-41
- Michiels J., Dirix G., Vanderleyden J., Xi C. 2001. Processing and export of peptide pheromones and bacteriocins in Gram-negative bacteria. Trends in Microbiology, 9, 4: 164-168
- Mierau I., Kleerebezem M. 2005. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 68: 705-717
- Miller K.W., Schamber R., Chen Y., Ray B. 1998. Production of active chimeric pediocin PA-1 in *Escherichia coli* in the absence of processing and secretion genes from *Pediococcus pap* operon. Applied and Environmental Microbiology, 64: 14-20
- Moll G.N., Ubbink-Kok T., Hildeng-Hauge H., Nissen-Meyer J., Nes I.F., Konings W.N., Driessen A.J. 1996. Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two component bacteriocin. Journal of Bacteriology, 178: 600-605
- Moll G.N., Hildeng-Hauge H., Nissen-Meyer J., Nes I.F., Konings W.N., Driessen A.J. 1998. Mechanistic properties of the two-component bacteriocin lactococcin G. Journal of Bacteriology, 180: 96-99
- Moll G.N., van den Akker E., Hauge H.H., Nissen-Meyer J., Nes I.F., Konings W.N., Driessen A.J.M. 1999a. Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. Journal of Bacteriology, 181: 4848-4852
- Moll G.N., Konings W.N., Driessen A.J.M. 1999b. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. Antonie van Leeuwenhoek, 76: 185-198
- Montville T.J., Bruno M.E.C. 1995. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. International Journal of Food Microbiology, 24: 53-74
- Montville T.J., Chen Y. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. Applied Microbiology and Biotechnology, 50: 511-519

- Moon G.S., Pyun Y.R., Kim W.J. 2006. Expression and purification of a fusion-typed pediocin PA-1 in *Escherichia coli* and recovery of biologically active pediocin PA-1. International Journal of Food Microbiology, 108: 136-140
- Mørerød T., Naterstad K., Wang E., Aesen I.M., Chaillou S., Zagorec M., Axelsson L. 2005. Sakacin P non-producing *Lactobacillus sakei* strains contain homologues of the sakacin P gene cluster. Research in Microbiology, 156: 949-960
- Muriana P.M., Klaenhammer T.R. 1991. Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. Journal of Bacteriology, 173: 1779-1788
- Muriana P.M. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. Journal of Food Protection, 56: 54-63
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. 2006. BLAST, Bethesda, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>: 1 str.
- Nes I.F., Diep D.B., Håvarstein L.S., Brurberg M.B., Eijsink V., Holo H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 70: 113-128
- Nes I.F., Eijsink V. 1999. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. V: Cell-cell signaling in bacteria. Danny G.M., Winan S.C. (eds.). Washington D.C., ASM Press, USA, Inc.: 175-192
- Nes I.F., Holo H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. Biopolymers (Peptide Science), 55: 50-61
- Nes I.F., Johnsborg O. 2004. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. Current Opinion in Biotechnology, 15: 100-104
- Neu T., Henrich B. 2003. New thermosensitive delivery vector and its use to enable nisin-controlled gene expression in *Lactobacillus gasseri*. Applied and Environmental Microbiology, 69, 3: 1377-1382
- Nilsen T., Nes I.F., Holo H. 1998. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. Journal of Bacteriology, 180: 1848-1854
- Nissen-Meyer J., Holo H., Håvarstein L.S., Sletten K., Nes I.F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. Journal of Bacteriology, 174: 5686-5692
- Nissen-Meyer J., Nes I.F. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanisms of action. Archives of Microbiology, 167: 67-77
- Ojcius D.M., Young J.D.E. 1991. Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? Trends in Biochemistry Science, 16: 225-229
- O'Keeffe T., Hill C., Ross R.P. 1999. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. Applied and Environmental Microbiology, 65, 4: 1506-1515

- Ouwehand A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. V: Lactic acid bacteria. Salminen, S., von Wright, A. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 139-160
- Perko B., Matijašić B.B., Rogelj I. 2002. Development of a probiotic semi-hard cheese - optimisation of the technological process. V: Proceedings of the 4th Croatian Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists - Central European Meeting, October 3-5, 2001, Opatija, Croatia. Tipalo B. (ed.). Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology: 196-200
- Quadri L.E.N., Sailer M., Roy K.L., Vedera J.C., Stiles M.E. 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV 17B. The Journal of Biological Chemistry, 269: 12204-12211
- Quadri L.E., Sailer M., Terebiznik M.R., Roy K.L., Vedera J.C., Stiles M.E. 1995. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and the expression of carnobacteriocin B2 and BM1. Journal of Bacteriology, 177: 1144-1151
- Quadri L.E., Kleerebezem M., Kuipers O.P., de Vos W.M., Roy K.L., Vedera 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. Journal of Bacteriology, 179: 6163-6171
- van Reenen C.A., Chikindas M.L., van Zyl W.H., Dicks L.M.T. 2003. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology, 81: 29-40
- Reviriego C., Fernández L., Kuipers O.P., Kok J., Rodríguez J.M. 2007. Enhanced production of pediocin PA-1 in wild nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains of dairy origin. International Dairy Journal, 17: 574-577
- Richard C., Drider D., Elmorjani K., Marion D., Prévost H. 2004. Heterologous expression and purification of active diphericin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a Synthetic gene in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 186, 13: 4276-4284
- Rodríguez J.M., Martínez M.I., Horn N., Dodd H.M. 2003. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 80: 101-116
- Rogelj I., Matijašić B.B., Čanžek Majhenič A., Stojković S. 2002. The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. International Journal of Food Microbiology, 76: 83-91
- Rogelj I., Matijašić B.B. 2006. *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7 - from isolation to application. Biologia, Bratislava, 61: 761-769
- Roussel Y., Colmin C., Simonet J.M., Decaris B. 1993. Strain characterization, genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group (Hansen and Mocquot). Journal of Applied Bacteriology, 74: 549-556
- de Ruyter P.G.G.A., Kuipers O.P., de Vos W.M. 1996. Controlled gene expression system for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. Applied and Environmental Microbiology, 62, 10: 3662-3667

- Sablon E., Contreras B., Vandamme E. 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 68: 21-60
- Salminen M.K., Rautelin H., Tynkkynen S., Poussa T., Saxelin M., Valtonen V., Järvinen A. 2006. *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. *Clinical Infectious Diseases*, 42: 35-44
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: loč. pag.
- Sambrook J., Russel D.W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. 3<sup>rd</sup> edition. Vol. 1-3. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: loč. pag.
- Schoeman H., Vivier M.A., du Toit M., Dicks L.M.T., Pretorius I.S. 1999. The development of bacterial yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15: 647-656
- Schoenfeld T. 1995. DNA purification: effects of bacterial strains carrying the *endA1* genotype on DNA quality isolated with Wizard plasmid purification systems. *Promega Notes*, 53, 12
- Simon D., Chopin A. 1988. Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie*, 70: 559-566
- Skaugen M., Christie V.H., Nes I.F. 1999. Biosynthesis of the lantibiotic lactocin S: heterologous expression of a two-operon gene cluster encoding regulatory, biosynthetic, and immunity functions. V: Proceedings of the 6th symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, September 19-23, 1999, Veldhoven, The Netherlands. Springer, FEMS, p. C86
- Sprules t., Kawulka K.E., Vedera J.C. 2004. NMR solution structure of ImB2, a protein conferring immunity to antimicrobial activity of the type IIa bacteriocin, carnobacteriocin B2. *Biochemistry*, 43, 37: 11740-11749
- Steele J.L. 1998. Genetics and metabolism of starter cultures. V: Applied dairy microbiology. 1<sup>st</sup> ed. Marth E.H., Steele J.L. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 173-194
- Stojković S. 2003. Preživetje in učinkovitost sevov *Lactobacillus gasseri* K7 in LF221 v različnih okoljskih razmerah. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 133 str.
- Straume D., Axelsson L., Nes I.F., Diep D.B. 2006. Improved expression and purification on the correctly folded response regulator PlnC from lactobacilli. *Journal of Microbiology Methods*, 67, 2: 193-201
- Studier F.W. 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of Molecular Biology*, 219, 1: 37-44
- Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40, 3: 722-756

- Tahara T., Yoshioka S., Utsumi R., Kanatani K. 1997. Isolation and partial characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* JCM 2124. FEMS Microbiology Letters, 148: 97-100
- Tung W.L., Chow K.C. 1995. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. Trends in Genetics, 11: 128-129
- Turcotte C., Lacroix C., Kheadr E., Grignon L., Fliss I. 2004. A rapid turbidometric bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. International Journal of Food Microbiology, 90: 283-293
- Vandenberghe P.A., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiology Reviews, 12: 221-239
- Vaughan A., Eijsink V.G.H., van Sinderen D. 2003. Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. Applied and Environmental Microbiology, 69, 12: 7194-7203
- Venema G., Kok J., Sinderen D., 1999. From DNA sequence to application: possibilities and complications. Antonie van Leeuwenhoek, 76: 3-23
- Vogelstein B., Gillespie D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proceedings of National Academy of Science USA, 76: 615-619
- de Vos W.M. 1999. Gene expression systems for lactic acid bacteria. Current Opinion in Microbiology, 2: 289-295
- Van der Vossen J.M.B.M., van Herwijnen M.H.M., Leer R.J., ten Brink B., Pouwels P.H., Huis in't Veld J.H.J. 1994. Production of acidocin B, a bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* M46 is a plasmid encoded trait: plasmid curing, genetic marking by in vivo plasmid integration, and gene transfer. FEMS Microbiology Letters, 116: 333-340
- de Vuyst L., Vandamme E.J. 1998. Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. V.: Bacteriocins of lactic acid bacteria. De Vuyst L., Vandamme E.J. (eds.). London, Blackie Academic & Professional, Inc.: 1-11
- de Vuyst L., Avonts L., Neysens P., Hoste B., Vancanneyt M., Swings J., Callewaert R. 2004. The lactobin A and amylovorin L471 encoding genes are identical, and their distribution seems to be restricted to the species *Lactobacillus amylovorus* that is of interest for cereal fermentations. International Journal of Food Microbiology, 90, 1: 93-106
- Worobo R.W., Henkel T., Sailer M., Roy K.L., Vederas J., Stiles M.E. 1994. Characteristics and genetic determinants of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. Microbiology, 140: 517-526
- Worobo R.W., van Belkum M.J., Sailer M., Roy K.L., Vederas J., Stiles M.E. 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. Journal of Bacteriology, 177: 3143-3149

Yan L.Z., Gibbs A.C., Stiles M.E., Wishart D.S., Vedera J.C. 2000. Analogues of bacteriocins: antimicrobial specificity and interactions of leucocin A with its enantiomer, carnobacteriocin B2, and truncated derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43: 4579-4581

Zhou J.S., Pillidge C.J., Gopal P.K., Gill H.S. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 211-217

Zhou X.X., Li W.F., Ma G.X., Pan Y.J. 2006. The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements. *Biotechnology Advances*, 24: 285-295

Zhu W.M., Liu W., Wu D.Q. 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 877-886

Zimmermann M., Beeck J., Wolf K. 1998. Minimizing the exposure to UV light when extracting DNA from agarose gels. *Biotechniques*, 25: str. 586

## ZAHVALA

Mentorici, prof. dr. Ireni Rogelj za to, da me je vzela pod svoj krov ter ves čas študija in dela budno spremljala, navdajala z idejami in optimizmom, kadar je le tega primanjkovalo.

Prof. dr. Jagodi Šušković in prof. dr. Petru Rasporju za hiter pregled in koristne nasvete pri oblikovanju doktorske disertacije.

Prostovoljnima delovnima mentoricama, dr. Andreji Čanžek Majhenič in dr. Bojani Bogovič Matijašić, ki sta in še vedno nesebično delita svoje znanje, nasvete in življenjske izkušnje, da delo dobi nove dimenzije.

Norvežanom, še posebej prof. Ingolfu Nesu, Helgeju Holu in Zhianu, kjer je teoretično znanje začelo dobivati svojo praktično noto.

Çağli, Qing, Manju in drugim svetovljanim, ki so s svojimi iskricami krajšali in polepšali včasih kar predolge delovne urice v laboratoriju.

Alešu Berlecu z IJS-ja in Tadeju Čepeljniku z Mikrobiologije, za pomoč pri delu in strokovne nasvete.

Vsem bivšim in zdajšnjim sodelavkam in sodelavcem, tako Katedre kot tudi Laboratorija za mlekarstvo, ki ste nemalokrat priskočili na pomoč ter cimrom in cimram, s katerimi smo se in se še kalimo v potrpežljivosti, pa tudi v veselih in sproščenih trenutkih.

Moji primarni, sekundarni in terciarni družini - brez starševskih korenin in bratovskega zaledja bi se že zdavnaj posušila. Hvala vama, mladi poganjek Lenart, ki me s svojo nesebično ljubeznijo in iskrivimi nasmehi vsak dan znova napolnjuješ in osrečuješ ter ljubi Luka, ki me poleg tega tudi podpiraš in prizemljuješ.

Vsem, ki vas nisem omenila, pa ste tudi prispevali kamenček, dva ali še več v moj življenjski mozaik, da sem danes tukaj in to, kar sem.

Hvala!

## PRILOGE (ANNEXES)

Priloga A: **Nukleotidno in izpeljano aminokislinsko zaporedje gassericina K7 A.** Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov so obarvana temno sivo; imena restrikta so nad njihovimi restriktijskimi mesti; kodirajoča AK zaporedja komplementarne in aktivne podenote ter proteina imunosti gassericina K7 A so obarvana svetlo sivo - začetni metionini in stop-kodoni kodirajočih regij so označeni krepko rdeče; mesti dvojnega glicina sta označeni krepko; domnevna možna mesta vezave ribosomov so podčrtana, domnevna promotorska regija pa označena z modro v nukleotidnem zaporedju.

Annex A: **Gassericin K7 A nucleotide and deduced aminoacid sequence.** Nucleotide sequences of primers are dark grey; restriction names are written above the restriction sites; aminoacid coding regions of complemental subunit, active subunit and immunity protein of gassericin K7 A are light grey - metionins at the start and stop-codons at the end of coding regions are red bold; double glycine sites are bold; putative ribosome binding sites are underlined and putative promoters are blue in the nucleotide sequence.

	DraI	LF221A2	
1	<b>AAATCTT</b> AGA ATTAGATAAT TAAAAAAGGT CGAAACTTCA TCTTAGTACG		
	K S * N * I I K K G R N F I L V R		Frame 1
	N L R I R * L K K V E T S S * Y E		Frame 2
	I L E L D N * K R S K L H L S T		Frame 3
	A-81down		
51	<b>AAGTTTCGAC</b> CCTTTTTAGT TATATTTTAA <b>GCTAAATTAG</b> TCAC	TTTTCC	
	S F D P F * L Y F K L N * S L F L		Frame 1
	V S T L F S Y I L S * I S H F S		Frame 2
	K F R P F L V I F * A K L V T F P		Frame 3
101	<b>TCTTAAGA</b> TT <b>TATT</b> TTTTTA GTAAACTATA AAAAATATA <b>AAGAAAAGGA</b>		
	L R F I F L V N Y K K I * R K G		Frame 1
	S * D L F F * * T I K K Y K E K D		Frame 2
	L K I Y F F S K L * K N I K K R I		Frame 3
	HincII		
151	<b>TATAAACAAA</b> CATGAAAGTA TAAACGAGT <b>GTCAACTACA</b> AACCGTCGTT		
	Y K Q T * K Y * T S V N Y K P S L		Frame 1
	I N K H E S I K R V S T T N R R W		Frame 2
	* T N <b>M</b> K V L N E C Q L Q T V V		Frame 3
201	<b>GGTGGAAAAAA</b> ATTGGTCAGT TGCAAAGTGC GGAGGAACAA TTGGTACTAA		
	V E K I G Q L Q S A E E Q L V L I		Frame 1
	W K K L V S C K V R R N N W Y *		Frame 2
	<b>G</b> G K N W S V A K C G G T I G T N		Frame 3
	BamHI		
251	<b>TATAGCTATT</b> GGTGCATGGA GAGGTGCACG GGCTGGATCC TTTTTGGTC		
	* L L V H G E V H G L D P F L V		Frame 1
	Y S Y W C M E R C T G W I L F W S		Frame 2
	I A I G A W R G A R A G S F F G Q		Frame 3
301	<b>AGCCAGTTTC</b> TGTAGGAACAA GGTGCACTAA TCGGTGCAAG TGCTGGTGCA		
	S Q F L * E Q V H * S V Q V L V Q		Frame 1
	A S F C R N R C T N R C K C W C N		Frame 2
	<b>P</b> V S V G T G A L I G A S A G A		Frame 3

Nadaljevanje priloge A: Nukleotidno in izpeljano aminokislinsko zaporedje gassericina K7 A.

	Boja	LF221Aup1	
351	<b>ATGGCGGAT CAGTACAATG TGTGGGCTGG TTAGCTGGAG GTGGAAGATA</b>		
	L A D Q Y N V W A G * L E V E D N		Frame 1
	W R I S T M C G L V S W R W K I		Frame 2
	I G G S V Q C V G W L A G G G R *		Frame 3
401	<b>ATGATCGAAA AAGTTTCTAA AAATGAACTA AGCCGGATAT ATGGTGAA</b>		
	D R K S F * K * T K P D I W W K		Frame 1
	M I E K V S K N E L S R I Y G G N		Frame 2
	* S K K F L K M N * A G Y M V E T		Frame 3
451	<b>CAACGTAAT TGGGGTAGTG TTGCAGGATC ATGTGGTAA GGTGCAGTAA</b>		
	Q R K L G * C C R I M W * R C S N		Frame 1
	N V N W G S V A G S C G K G A V M		Frame 2
	T * I G V V L Q D H V V K V Q *		Frame 3
501	<b>TGGAAATATA TTTCGGAAT CCCATATTAG GGTGCGCTAA CGGAGCTGCA</b>		
	G N I F R E S H I R V R * R S C N		Frame 1
	E I Y F G N P I L G C A N G A A		Frame 2
	W K Y I S G I P Y * G A L T E L Q		Frame 3
551	<b>ACATCATTTG TTCTACAAAC TGCTAGTGGA ATATATAAAA ATTATCAAA</b>		
	I I G S T N C * W N I * K L S K		Frame 1
	T S L V L Q T A S G I Y K N Y Q K		Frame 2
	H H W F Y K L L V E Y I K I I K K		Frame 3
601	<b>AAAGAGATAG TATATGACGG GAATATGGAT AGTAATTATT AGTATTATTG</b>		
	K E I V Y D G N M D S N Y * Y Y C		Frame 1
	K R * Y M T G I W I V I I S I I V		Frame 2
	R D S I * R E Y G * * L L V L L		Frame 3
651	<b>TGCTTTCAAT AATTATCACC AATATAGTAG CTCTAATACA GACACTATTA</b>		
	A F N N Y H Q Y S S S N T D T I T		Frame 1
	L S I I I T N I V A L I Q T L L Y		Frame 2
	C F Q * L S P I * * L * Y R H Y Y		Frame 3
	SspI		
701	<b>CATAAGAAAA ATGAAAAATA TTATTTTGAT AAACTTTTG GAGCCTATGC</b>		
	* E K * K I L F * * I F W S L C		Frame 1
	H K K N E K Y Y F D K S F G A Y A		Frame 2
	I R K M K N I I L I N L L E P M Q		Frame 3
751	<b>AGGTAAAAAT AATCCAAAAT ATCTGTTAA TAATGTTGAA CATCATGATT</b>		
	R * K * S K I S V * * C * T S * F		Frame 1
	G K N N P K Y L F N N V E H H D F		Frame 2
	V K I I Q N I C L I M L N I M I		Frame 3
801	<b>TTTCCATGT ATTTTATCG TATTTATTT GCTCATATAT TCCATTATA</b>		
	F P C I L S V F Y L L I Y S I Y R		Frame 1
	F H V F Y Q Y F I C S Y I P F I		Frame 2
	F S M Y F I S I L F A H I F P H L *		Frame 3
851	<b>GATGTCATTT TTTGGTTCTT AGGTTCAATT TGGTAATAAT CAAAAAAGGT</b>		
	C H F L V L R F N L V I I K K G		Frame 1
	D V I F W F L G S I W * * S K K V		Frame 2
	M S F F G S * V Q F G N N Q K R S		Frame 3

Nadaljevanje priloge A: Nukleotidno in izpeljano aminokislinsko zaporedje gassericina K7 A.

901 **CGAAACTTCA TCTTAGTACG AAGTTTCGAC CTTTTTTTAT TTCAAATTAT**  
R N F I L V R S F D L F L F Q I I Frame 1  
E T S S \* Y E V S T F F Y F K L F Frame 2  
K L H L S T K F R P F F I S N Y Frame 3

951 **TTTTATTGCT TCCACGCTGC ATCAAATTT GCTTTACCTG CTTTAATTG**  
F I A S T L H Q I L L Y L L \* F D Frame 1  
L L L P R C I K F C F T C F N L Frame 2  
F Y C F H A A S N F A L P A L I \* Frame 3

1001 **ATTATCAACA TTTTGACCAT TCTTAGCTGC ATACAAAATC TTAGCCATAA**  
Y Q H F D H S \* L H T K S \* P \* Frame 1  
I I N I L T I L S C I Q N L S H N Frame 2  
L S T F \* P F L A A Y K I L A I I Frame 3

858-left

1051 **TTGGATCTAA TTGACTGTAG GCAGCGTTTG AGTTCTTAGC TACTGGAATA**  
L D L I D C R Q R L S S \* L L E Y Frame 1  
W I \* L T V G S V \* V L S Y W N T Frame 2  
G S N \* L \* A A F E F L A T G I Frame 3  
HindIII

1101 **CTGTACAAGT GTTTCATAGC CCCTTCTAAC TTAGCTGGAA GCT**  
C T S V S \* P L L T \* L E A ? ? ? Frame 1  
V Q V F H S P F \* L S W K ? ? ? Frame 2  
L Y K C F I A P S N L A G S ? ? ? Frame 3

**Priloga B: Nukleotidno in izpeljano aminokislinsko zaporedje gassericina K7 B.** Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov so obarvana temno sivo; imena restrikta so nad njihovimi restrikcijskimi mesti; kodirajoča AK zaporedja od ATP odvisnega transportnega proteina, dodatnega transportnega proteina, komplementarne in aktivne podenote ter proteina imunosti gassericina K7 B so obarvana svetlo sivo - začetni metionini in stop-kodoni kodirajočih regij so označeni krepko rdeče; mesti dvojnega glicina sta označeni krepko; domnevna možna mesta vezave ribosomov so podprtana, domnevni promotorski regiji pa označeni z modro v nukleotidnem zaporedju.

**Annex B: Gassericin K7 B nucleotide and deduced aminoacid sequence.** Nucleotide sequences of primers are dark grey; restriction names are written above the restriction sites; aminoacid coding regions of ATP-dependent transport protein, accessory protein, complemental factor, active factor and immunity protein of gassericin K7 B are light grey - metionins at the start and stop-codons at the end of coding regions are red bold; double glycine sites are bold; putative ribosome binding sites are underlined and putative promotors are blue in the nucleotide sequence.

	SSpI	METODA-F	
1	<b>CCCATTTAG GTCAAAGATT AAGTATTGAT CTAATCTGC GATACATCAG</b>		
	P I L G Q R L S I D L N L R Y I R P F * V K D * V L I * I C D T S G H F R S K I K Y * S K S A I H Q		Frame 1 Frame 2 Frame 3
51	<b>GCATATTTT GAATTACCA TGGAATTCTT TGTAACAAGA AGAACGGGTG</b>		
	H I F E L P <b>M</b> E F F V T R R T G E I F L N Y Q W N S L * Q E E R V A Y F * I T N G I L C N K K N G *		Frame 1 Frame 2 Frame 3
101	<b>AAATTACTTC GCGTTTTCT GATGCAAGTA GAATTATTGA CGCTTTGGCA</b>		
	I T S R F S D A S R I I D A L A K L L R V F L M Q V E L L T L W Q N Y F A F F * C K * N Y * R F G K		Frame 1 Frame 2 Frame 3
	RsaI		
151	<b>AGTACAGTTA TTTCGCTCTT CTTAGACCTC TCAATTGTGA TTGTGATGGG</b>		
	S T V I S L F L D L S I V I V M G V Q L F R S S * T S Q L * L * W D Y S Y F A L L R P L N C D C D G		Frame 1 Frame 2 Frame 3
201	<b>ATTAGTCTTA GCAGCACAAA ATATGACATT ATTTGGGATT ACACGTGTTAG</b>		
	L V L A A Q N M T L F G I T L L A * S * Q H K I * H Y L G L H C * I S L S S T K Y D I I W D Y T V S		Frame 1 Frame 2 Frame 3
251	<b>CTTTGCCTAT TTATGCAGTT GTAATTCTAG GTTTACTAA AAAGTTGAA</b>		
	L P I Y A V V I L G F T K K F E L C L F M Q L * F * V L L K S L K F A Y L C S C N S R F Y * K V * K		Frame 1 Frame 2 Frame 3
301	<b>AAACTAAATA ACGAACAAAT GGAAAGTAAT GCTGTTTGA GTTCTTCAGT</b>		
	K L N N E Q M E S N A V L S S V N * I T N K W K V M L F * V L Q L T K * R T N G K * C C F E F F S		Frame 1 Frame 2 Frame 3

Nadaljevanje priloge B: Nukleotidno in izpeljano aminokislinsko zaporedje gassericina K7 B.

		DraI HindIII	
351	<b>TATTGAAGAT ATTCAAGGAA TTGAAACTAT TAAAGCTTTA AATAGTGAGA</b>		
	I E D I Q G I E T I K A L N S E N L K I F K E L K L L K L * I V R Y * R Y S R N * N Y * S F K * * E		Frame 1 Frame 2 Frame 3
401	<b>ATACAAGATA TAGAAGAAC GACAGTCAGT TTGTAGATTAA CTTAAAGAAAG</b>		
	T R Y R R I D S Q F V D Y L K K I Q D I E E S T V S L * I T * R S Y K I * K N R Q S V C R L L K E V		Frame 1 Frame 2 Frame 3
	LF221B2		
451	<b>TCATTTAAAT ATAGTAAGAC TGAGAGTTTA CAGACAGCAC TCAAGACATT</b>		
	S F K Y S K T E S L Q T A L K T F H L N I V R L R V Y R Q H S R H L I * I * * D * E F T D S T Q D I		Frame 1 Frame 2 Frame 3
501	<b>TATTCAATTAA TCTCTTAATG TAATTGTTCT TTGGGTTGGT GCAAAGATTG</b>		
	I Q L S L N V I V L W V G A K I V F N Y L L M * L F F G L V Q R L Y S I I S * C N C S L G W C K D C		Frame 1 Frame 2 Frame 3
551	<b>TAATGCAAGG ACAATTGAGC ATTGGTCAGT TAATGACGTT CAATGCATTG</b>		
	M Q G Q L S I G Q L M T F N A L * C K D N * A L V S * * R S M H C N A R T I E H W S V N D V Q C I A		Frame 1 Frame 2 Frame 3
601	<b>CTGGCATATT TCATTGATCC CTTGCAAAGT ATTATTAATT TACAACCGCG</b>		
	L A Y F I D P L Q S I I N L Q P R W H I S L I P C K V L L I Y N R D G I F H * S L A K Y Y * F T T A		Frame 1 Frame 2 Frame 3
	ClaI		
651	<b>ACTTCAATCA GCTAGTGTG CTCAAAATCG ATTAAATGAG GTCTATCAAG</b>		
	L Q S A S V A Q N R L N E V Y Q V F N Q L V L K I D * M R S I K T S I S * C C S K S I K * G L S S		Frame 1 Frame 2 Frame 3
701	<b>TAAAAAGTGA ATTCAATCAG AAGGCTACTA TTGAAGATCG TAAGCTCCTA</b>		
	K S E F N Q K A T I E D R K L L * K V N S I R R L L L K I V S S * K K * I Q S E G Y Y * R S * A P R		Frame 1 Frame 2 Frame 3
	SspI		
751	<b>GAAGGAAATA TTGAATATAA GAATGTGGAT TATAGCTATG GTTATGGCAC</b>		
	E G N I E Y K N V D Y S Y G Y G T K E I L N I R M W I I A M V M A Q R K Y * I * E C G L * L W L W H		Frame 1 Frame 2 Frame 3
801	<b>AGATGTCTTA AAAGATATTA ATCTCAAAT TAGCCAGGGC GAAAAATTAA</b>		
	D V L K D I N L K I S Q G E K L T M S * K I L I S K L A R A K N * R C L K R Y * S Q N * P G R K I N		Frame 1 Frame 2 Frame 3

Nadaljevanje priloge B: Nukleotidno in izpeljano aminokislinsko zaporedje gassericina K7 B.

851	<b>CGATTGTTGG AATGAGTGGT TCTGGAAAAT CTACGATGGT TAAGTTGTTA</b>																																																					
	<table border="0"> <tr> <td>I</td><td>V</td><td>G</td><td>M</td><td>S</td><td>G</td><td>S</td><td>G</td><td>K</td><td>S</td><td>T</td><td>M</td><td>V</td><td>K</td><td>L</td><td>L</td> </tr> <tr> <td>R</td><td>L</td><td>L</td><td>E</td><td>*</td><td>V</td><td>V</td><td>L</td><td>E</td><td>N</td><td>L</td><td>R</td><td>W</td><td>L</td><td>S</td><td>C</td><td>*</td> </tr> <tr> <td>D</td><td>C</td><td>W</td><td>N</td><td>E</td><td>W</td><td>F</td><td>W</td><td>K</td><td>I</td><td>Y</td><td>D</td><td>G</td><td>*</td><td>V</td><td>V</td><td>S</td> </tr> </table>	I	V	G	M	S	G	S	G	K	S	T	M	V	K	L	L	R	L	L	E	*	V	V	L	E	N	L	R	W	L	S	C	*	D	C	W	N	E	W	F	W	K	I	Y	D	G	*	V	V	S	Frame 1		
I	V	G	M	S	G	S	G	K	S	T	M	V	K	L	L																																							
R	L	L	E	*	V	V	L	E	N	L	R	W	L	S	C	*																																						
D	C	W	N	E	W	F	W	K	I	Y	D	G	*	V	V	S																																						
		Frame 2																																																				
		Frame 3																																																				
901	<b>GTAGATTCT TTTGCCAAG TAAAGGTCA G GTTACATTAA ATGGACATGC</b>																																																					
	<table border="0"> <tr> <td>V</td><td>D</td><td>F</td><td>F</td><td>S</td><td>P</td><td>S</td><td>K</td><td>G</td><td>Q</td><td>V</td><td>T</td><td>L</td><td>N</td><td>G</td><td>H</td><td>A</td> </tr> <tr> <td>*</td><td>I</td><td>S</td><td>F</td><td>R</td><td>Q</td><td>V</td><td>K</td><td>V</td><td>R</td><td>L</td><td>H</td><td>*</td><td>M</td><td>D</td><td>M</td><td>Q</td> </tr> <tr> <td>R</td><td>F</td><td>L</td><td>F</td><td>A</td><td>K</td><td>*</td><td>R</td><td>S</td><td>G</td><td>Y</td><td>I</td><td>K</td><td>W</td><td>T</td><td>C</td><td></td> </tr> </table>	V	D	F	F	S	P	S	K	G	Q	V	T	L	N	G	H	A	*	I	S	F	R	Q	V	K	V	R	L	H	*	M	D	M	Q	R	F	L	F	A	K	*	R	S	G	Y	I	K	W	T	C		Frame 1	
V	D	F	F	S	P	S	K	G	Q	V	T	L	N	G	H	A																																						
*	I	S	F	R	Q	V	K	V	R	L	H	*	M	D	M	Q																																						
R	F	L	F	A	K	*	R	S	G	Y	I	K	W	T	C																																							
		Frame 2																																																				
		Frame 3																																																				
	NdeI																																																					
951	<b>AACAAGTGAG ATTGATAAGC ATACGTTGCG GTCATATGT AATTATGTAC</b>																																																					
	<table border="0"> <tr> <td>T</td><td>S</td><td>E</td><td>I</td><td>D</td><td>K</td><td>H</td><td>T</td><td>L</td><td>R</td><td>S</td><td>Y</td><td>V</td><td>N</td><td>Y</td><td>V</td><td>P</td> </tr> <tr> <td>Q</td><td>V</td><td>R</td><td>L</td><td>I</td><td>S</td><td>I</td><td>R</td><td>C</td><td>G</td><td>H</td><td>M</td><td>*</td><td>I</td><td>M</td><td>Y</td><td></td> </tr> <tr> <td>N</td><td>K</td><td>*</td><td>D</td><td>*</td><td>*</td><td>A</td><td>Y</td><td>V</td><td>A</td><td>V</td><td>I</td><td>C</td><td>K</td><td>L</td><td>C</td><td>T</td> </tr> </table>	T	S	E	I	D	K	H	T	L	R	S	Y	V	N	Y	V	P	Q	V	R	L	I	S	I	R	C	G	H	M	*	I	M	Y		N	K	*	D	*	*	A	Y	V	A	V	I	C	K	L	C	T	Frame 1	
T	S	E	I	D	K	H	T	L	R	S	Y	V	N	Y	V	P																																						
Q	V	R	L	I	S	I	R	C	G	H	M	*	I	M	Y																																							
N	K	*	D	*	*	A	Y	V	A	V	I	C	K	L	C	T																																						
		Frame 2																																																				
		Frame 3																																																				
1001	<b>CTCAAACCTCC ATATATCTTT TCTGGAACAG TTAAAGAGAA TTTGTTGTTA</b>																																																					
	<table border="0"> <tr> <td>Q</td><td>T</td><td>P</td><td>Y</td><td>I</td><td>F</td><td>S</td><td>G</td><td>T</td><td>V</td><td>K</td><td>E</td><td>N</td><td>L</td><td>L</td><td>L</td> </tr> <tr> <td>L</td><td>K</td><td>L</td><td>H</td><td>I</td><td>S</td><td>F</td><td>L</td><td>E</td><td>Q</td><td>L</td><td>K</td><td>R</td><td>I</td><td>C</td><td>C</td><td>*</td> </tr> <tr> <td>S</td><td>N</td><td>S</td><td>I</td><td>Y</td><td>L</td><td>F</td><td>W</td><td>N</td><td>S</td><td>*</td><td>R</td><td>E</td><td>F</td><td>V</td><td>V</td><td>R</td> </tr> </table>	Q	T	P	Y	I	F	S	G	T	V	K	E	N	L	L	L	L	K	L	H	I	S	F	L	E	Q	L	K	R	I	C	C	*	S	N	S	I	Y	L	F	W	N	S	*	R	E	F	V	V	R	Frame 1		
Q	T	P	Y	I	F	S	G	T	V	K	E	N	L	L	L																																							
L	K	L	H	I	S	F	L	E	Q	L	K	R	I	C	C	*																																						
S	N	S	I	Y	L	F	W	N	S	*	R	E	F	V	V	R																																						
		Frame 2																																																				
		Frame 3																																																				
	ECORV																																																					
1051	<b>GGTTGTAGGC CAGATATCAC TGAAGAAGAT GTAATAAAGG CTTGTCAAAT</b>																																																					
	<table border="0"> <tr> <td>G</td><td>C</td><td>R</td><td>P</td><td>D</td><td>I</td><td>T</td><td>E</td><td>E</td><td>D</td><td>V</td><td>I</td><td>K</td><td>A</td><td>C</td><td>Q</td><td>I</td> </tr> <tr> <td>V</td><td>V</td><td>G</td><td>Q</td><td>I</td><td>S</td><td>L</td><td>K</td><td>K</td><td>M</td><td>*</td><td>*</td><td>R</td><td>L</td><td>V</td><td>K</td><td>L</td> </tr> <tr> <td>L</td><td>*</td><td>A</td><td>R</td><td>Y</td><td>H</td><td>*</td><td>R</td><td>R</td><td>C</td><td>N</td><td>K</td><td>G</td><td>L</td><td>S</td><td>N</td><td></td> </tr> </table>	G	C	R	P	D	I	T	E	E	D	V	I	K	A	C	Q	I	V	V	G	Q	I	S	L	K	K	M	*	*	R	L	V	K	L	L	*	A	R	Y	H	*	R	R	C	N	K	G	L	S	N		Frame 1	
G	C	R	P	D	I	T	E	E	D	V	I	K	A	C	Q	I																																						
V	V	G	Q	I	S	L	K	K	M	*	*	R	L	V	K	L																																						
L	*	A	R	Y	H	*	R	R	C	N	K	G	L	S	N																																							
		Frame 2																																																				
		Frame 3																																																				
1101	<b>TGCTGAGATT GACCAAGAAA TAGCTAATCT ACCTTTGCAA TTTGAAACAA</b>																																																					
	<table border="0"> <tr> <td>A</td><td>E</td><td>I</td><td>D</td><td>Q</td><td>E</td><td>I</td><td>A</td><td>N</td><td>L</td><td>P</td><td>L</td><td>Q</td><td>F</td><td>E</td><td>T</td><td>K</td> </tr> <tr> <td>L</td><td>R</td><td>L</td><td>T</td><td>K</td><td>K</td><td>*</td><td>L</td><td>I</td><td>Y</td><td>L</td><td>C</td><td>N</td><td>L</td><td>K</td><td>Q</td><td></td> </tr> <tr> <td>C</td><td>*</td><td>D</td><td>*</td><td>P</td><td>R</td><td>N</td><td>S</td><td>*</td><td>S</td><td>T</td><td>F</td><td>A</td><td>I</td><td>*</td><td>N</td><td>K</td> </tr> </table>	A	E	I	D	Q	E	I	A	N	L	P	L	Q	F	E	T	K	L	R	L	T	K	K	*	L	I	Y	L	C	N	L	K	Q		C	*	D	*	P	R	N	S	*	S	T	F	A	I	*	N	K	Frame 1	
A	E	I	D	Q	E	I	A	N	L	P	L	Q	F	E	T	K																																						
L	R	L	T	K	K	*	L	I	Y	L	C	N	L	K	Q																																							
C	*	D	*	P	R	N	S	*	S	T	F	A	I	*	N	K																																						
		Frame 2																																																				
		Frame 3																																																				
	HincII																																																					
1151	<b>AATTAGATGA AAATGCCAAA ATTTTATCTG GTGGACAAAA ACAAAAGGTTA</b>																																																					
	<table border="0"> <tr> <td>L</td><td>D</td><td>E</td><td>N</td><td>A</td><td>K</td><td>I</td><td>L</td><td>S</td><td>G</td><td>G</td><td>Q</td><td>K</td><td>Q</td><td>R</td><td>L</td> </tr> <tr> <td>N</td><td>*</td><td>M</td><td>K</td><td>M</td><td>P</td><td>K</td><td>F</td><td>Y</td><td>L</td><td>V</td><td>D</td><td>K</td><td>N</td><td>K</td><td>G</td><td>*</td> </tr> <tr> <td>I</td><td>R</td><td>*</td><td>K</td><td>C</td><td>Q</td><td>N</td><td>F</td><td>I</td><td>W</td><td>W</td><td>T</td><td>K</td><td>T</td><td>K</td><td>V</td><td>N</td> </tr> </table>	L	D	E	N	A	K	I	L	S	G	G	Q	K	Q	R	L	N	*	M	K	M	P	K	F	Y	L	V	D	K	N	K	G	*	I	R	*	K	C	Q	N	F	I	W	W	T	K	T	K	V	N	Frame 1		
L	D	E	N	A	K	I	L	S	G	G	Q	K	Q	R	L																																							
N	*	M	K	M	P	K	F	Y	L	V	D	K	N	K	G	*																																						
I	R	*	K	C	Q	N	F	I	W	W	T	K	T	K	V	N																																						
		Frame 2																																																				
		Frame 3																																																				
	SmaI																																																					
1201	<b>ACTATTGCC C GGGCATTACT ATCTCCTGCA AAGGTATTTA TTTTTGATGA</b>																																																					
	<table border="0"> <tr> <td>T</td><td>I</td><td>A</td><td>R</td><td>A</td><td>L</td><td>L</td><td>S</td><td>P</td><td>A</td><td>K</td><td>V</td><td>F</td><td>I</td><td>F</td><td>D</td><td>E</td> </tr> <tr> <td>L</td><td>L</td><td>P</td><td>G</td><td>H</td><td>Y</td><td>Y</td><td>L</td><td>L</td><td>Q</td><td>R</td><td>Y</td><td>L</td><td>F</td><td>L</td><td>M</td><td>K</td> </tr> <tr> <td>Y</td><td>C</td><td>P</td><td>G</td><td>I</td><td>T</td><td>I</td><td>S</td><td>C</td><td>K</td><td>G</td><td>I</td><td>Y</td><td>F</td><td>*</td><td>*</td><td></td> </tr> </table>	T	I	A	R	A	L	L	S	P	A	K	V	F	I	F	D	E	L	L	P	G	H	Y	Y	L	L	Q	R	Y	L	F	L	M	K	Y	C	P	G	I	T	I	S	C	K	G	I	Y	F	*	*		Frame 1	
T	I	A	R	A	L	L	S	P	A	K	V	F	I	F	D	E																																						
L	L	P	G	H	Y	Y	L	L	Q	R	Y	L	F	L	M	K																																						
Y	C	P	G	I	T	I	S	C	K	G	I	Y	F	*	*																																							
		Frame 2																																																				
		Frame 3																																																				
1251	<b>AGTAACAAGT GGCTTAGATA CAATTACTGA GAAGAAAGTG ATTGATAATT</b>																																																					
	<table border="0"> <tr> <td>V</td><td>T</td><td>S</td><td>G</td><td>L</td><td>D</td><td>T</td><td>I</td><td>T</td><td>E</td><td>K</td><td>K</td><td>V</td><td>I</td><td>D</td><td>N</td><td>L</td> </tr> <tr> <td>*</td><td>Q</td><td>V</td><td>A</td><td>*</td><td>I</td><td>Q</td><td>L</td><td>L</td><td>R</td><td>R</td><td>K</td><td>*</td><td>L</td><td>I</td><td>I</td><td></td> </tr> <tr> <td>S</td><td>N</td><td>K</td><td>W</td><td>L</td><td>R</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>*</td><td>E</td><td>E</td><td>S</td><td>D</td><td>*</td><td>*</td><td>F</td> </tr> </table>	V	T	S	G	L	D	T	I	T	E	K	K	V	I	D	N	L	*	Q	V	A	*	I	Q	L	L	R	R	K	*	L	I	I		S	N	K	W	L	R	Y	N	Y	*	E	E	S	D	*	*	F	Frame 1	
V	T	S	G	L	D	T	I	T	E	K	K	V	I	D	N	L																																						
*	Q	V	A	*	I	Q	L	L	R	R	K	*	L	I	I																																							
S	N	K	W	L	R	Y	N	Y	*	E	E	S	D	*	*	F																																						
		Frame 2																																																				
		Frame 3																																																				
1301	<b>TGATGAAGCT AAAGGATAAG ACAATTATCT TTATTGCGCA TCGACTAGCA</b>																																																					
	<table border="0"> <tr> <td>M</td><td>K</td><td>L</td><td>K</td><td>D</td><td>K</td><td>T</td><td>I</td><td>I</td><td>F</td><td>I</td><td>A</td><td>H</td><td>R</td><td>L</td><td>A</td> </tr> <tr> <td>*</td><td>*</td><td>S</td><td>*</td><td>R</td><td>I</td><td>R</td><td>Q</td><td>L</td><td>S</td><td>L</td><td>L</td><td>R</td><td>I</td><td>D</td><td>*</td><td>Q</td> </tr> <tr> <td>D</td><td>E</td><td>A</td><td>K</td><td>G</td><td>*</td><td>D</td><td>N</td><td>Y</td><td>L</td><td>Y</td><td>C</td><td>A</td><td>S</td><td>T</td><td>S</td><td>N</td> </tr> </table>	M	K	L	K	D	K	T	I	I	F	I	A	H	R	L	A	*	*	S	*	R	I	R	Q	L	S	L	L	R	I	D	*	Q	D	E	A	K	G	*	D	N	Y	L	Y	C	A	S	T	S	N	Frame 1		
M	K	L	K	D	K	T	I	I	F	I	A	H	R	L	A																																							
*	*	S	*	R	I	R	Q	L	S	L	L	R	I	D	*	Q																																						
D	E	A	K	G	*	D	N	Y	L	Y	C	A	S	T	S	N																																						
		Frame 2																																																				
		Frame 3																																																				

Nadaljevanje priloge B: Nukleotidno in izpeljano aminokislinsko zaporedje gassericina K7 B.

1351	<b>ATTGCAGAAC GGGCAGACAA GGTAGTTGTA ATTGATCATG GTCAAATAGT</b>	
	I A E R A D K V V V I D H G Q I V	
	L Q N G Q T R * L * L I M V K * L	
	C R T G R Q G S C N * S W S N S	Frame 1
		Frame 2
		Frame 3
1401	<b>TGAAGAAGGC AGCCACAGCG AATTGATGAG TAAGCATGGT TTTTACTATG</b>	
	E E G S H S E L M S K H G F Y Y D	
	K K A A T A N * * V S M V F T M	
	* R R Q P Q R I D E * A W F L L *	Frame 1
		Frame 2
		Frame 3
1451	<b>ACTTAGTGAA GGGATAGGTG AGTACAGATG GATGCAAAAG AGTATGAAAG</b>	
	L V K G * V S T D G C K R V * K	
	T * * R D R * V Q M D A K E Y E S	
	L S E G I G E Y R W M Q K S M K V	Frame 1
		Frame 2
		Frame 3
1501	<b>TACAGAATTC TATTCTATA AGTTCAAGAA TTTCTCGACA ATGATTATTA</b>	
	Y R I L F L * V Q E F L D N D Y Y	
	T E F Y S Y K F K N F S T M I I I	
	Q N S I P I S S R I S R Q * L L	Frame 1
		Frame 2
		Frame 3
1551	<b>TTCCAGCCGC TATTTTGTT CTACTTTAT TTATTGGATC TTTTTTGCT</b>	
	S S R Y F C S T F I Y W I F F C C	
	P A A I F V L L L F I G S F F A	
	F Q P L F L F Y F Y L L D L F L L	Frame 1
		Frame 2
		Frame 3
	BB-down	LF221Bup1
1601	<b>GTTAGACAGA GTACAGTCTC TTCGGTTGGC GTTGTGAAAC CAACGGTTGT</b>	
	* T E Y S L F G W R C * T N G C	
	V R Q S T V S S V G V V E P T V V	
	L D R V Q S L R L A L L N Q R L *	Frame 1
		Frame 2
		Frame 3
1651	<b>AATTAATCAG AAAAATGTTA GCTATGATGA GGGACAAGTC GTTACAAAAC</b>	
	N * S E K C * L * * G T S R Y K T	
	I N Q K N V S Y D E G Q V V T K H	
	L I R K M L A M M R D K S L Q N	Frame 1
		Frame 2
		Frame 3
1701	<b>ATGGTCAAAA ATGGTAGCT CATGTTGATC AAGATAGTGG GATTAGTTA</b>	
	W S K M G S S C * S R * W D * F N	
	G Q K W V A H V D Q D S G I S L	
	M V K N G * L M L I K I V G L V *	Frame 1
		Frame 2
		Frame 3
1751	<b>ATGCCCTGTTA TGAAAGCTAA AGGAAAAGTG AGGATTGTTA CCTATGTGCC</b>	
	A C Y E S * R K S E D C Y L C A	
	M P V M K A K G K V R I V T Y V P	
	C L L * K L K E K * G L L P M C P	Frame 1
		Frame 2
		Frame 3
1801	<b>CACTAATAAAA ATCTCGTCTA TTAAGAAGGG GCAGAAGTTA AACTTTCTG</b>	
	H * * N L V Y * E G A E V K L F C	
	T N K I S S I K K G Q K L N F S V	
	L I K S R L L R R G R S * T F F L	Frame 1
		Frame 2
		Frame 3
1851	<b>TACCTACAGT AGACGGCTTG AATAGTAGAT TAACTGGTAA GGTAAAGGAG</b>	
	T Y S R R L E * * I N W * G K G D	
	P T V D G L N S R L T G K V K E	
	Y L Q * T A * I V D * L V R * R R	Frame 1
		Frame 2
		Frame 3

Nadaljevanje priloge B: Nukleotidno in izpeljano aminokislinsko zaporedje gassericina K7 B.

1901	<b>ATGGTGT</b> <b>TTT ATCCAATAAA TGTGAACAAG CAAAGTATGT ATGAAGTTAT</b>	
	W C L S N K C E Q A K Y V * S Y	Frame 1
	I G V Y P I N V N K Q S M Y E V I	Frame 2
	L V F I Q * M * T S K V C M K L F	Frame 3
1951	<b>TTCGATTGCC AAAGTTAGTG ATATAAATGT TAAGTACGGA ATGCAAGGTA</b>	
	F D C Q S * * Y K C * V R N A R *	Frame 1
	S I A K V S D I N V K Y G M Q G N	Frame 2
	R L P K L V I * M L S T E C K V	Frame 3
2001	<b>ATGCCACAAT AGTGACAGGT CGTAGCACAT ATTTTAACTA TTTTTTAGAT</b>	
	C H N S D R S * H I F * L F F R *	Frame 1
	A T I V T G R S T Y F N Y F L D	Frame 2
	M P Q * * Q V V A H I L T I F * I	Frame 3
2051	<b>AAGGTATTGA ATAAAAGATA AATTTGATAG AATAAAAAT TAAAATTGTA</b>	
	G I E * K I N L I E * K I K I L	Frame 1
	K V L N K R * I * * N K K L K F Y	Frame 2
	R Y * I K D K F D R I K N * N F I	Frame 3
2101	<b>TTAATCTAAA GATAAAAATA TAAGTGAATA AAAAAGAGAT GTTAGATAAG</b>	
	L I * R * K Y K * I K K R C * I R	Frame 1
	* S K D K N I S E * K R D V R * E	Frame 2
	N L K I K I * V N K K E M L D K	Frame 3
2151	<b>AATATTGATT TGCAAAGAGC AATATTCAT ATAAGCAAG ATATTAATT</b>	
	I L I C K E Q Y F I * S K I L I C	Frame 1
	Y * F A K S N I S Y K A R Y * F	Frame 2
	N I D L Q R A I F H I K Q D I N L	Frame 3
2201	<b>GTATTCTGTA GTGTATGGAT TTAAATTGCC TGAAACTTAA TTTTGGGAAC</b>	
	I L * C M D L N C L K L N F G N	Frame 1
	V F C S V W I * I A * N L I L G T	Frame 2
	Y S V V Y G F K L P E T * F W E R	Frame 3
2251	<b>GAATTTGGAT AAAATATACT GTTTGGTTA GTAAGTAAGC AATATTAATC</b>	
	E F G * N I L F W L V S K Q Y * S	Frame 1
	N L D K I Y C F G * * V S N I N P	Frame 2
	I W I K Y T V L V S K * A I L I	Frame 3
2301	<b>CATAAAAAA ATAAATTGTT TTTTATAGTA GGCTAAATAT ATAAAGATTA</b>	
	I * K I N C F L * * A K Y I K I I	Frame 1
	Y K K * I V F Y S R L N I * R L	Frame 2
	H I K N K L F F I V G * I Y K D Y	Frame 3
2351	<b>TTAATTATAG GAGGTCTTTA TTATGAAAAA TTTTAATACA TTATCATTG</b>	
	N Y R R S L L * K I L I H Y H L	Frame 1
	L I I G G L Y Y E K F * Y I I I I *	Frame 2
	* L * E V F I M K N F N T L S F E	Frame 3
2401	<b>AAACATTGGC TAACATAGTT GGTGGGAGAA ATAATTGGC TGCTAATATA</b>	
	K H W L T * L V G E I I G L L I *	Frame 1
	N I G * H S W W E K * L G C * Y R	Frame 2
	T L A N I V G G R N N W A A A N I	Frame 3

Nadaljevanje priloge B: Nukleotidno in izpeljano aminokislinsko zaporedje gassericina K7 B.

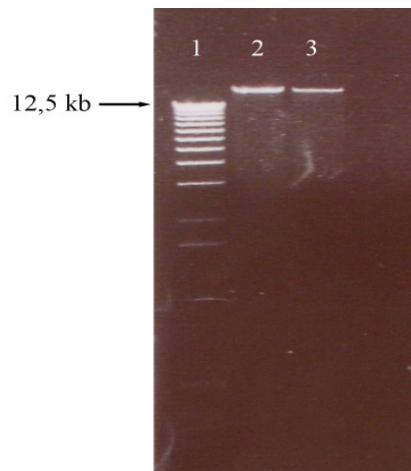
2451	<b>GGTGGAGTAG GTGGAGCGAC AGTCGCTGGA TGGGCTCTTG GAAATGCAGT</b>	
	V E * V E R Q S L D G L L E M Q F	Frame 1
	W S R W S D S R W M G S W K C S	Frame 2
	G G V G G A T V A G W A L G N A V	Frame 3
2501	<b>TTGCGGTCCCT GCTTGTGGCT TTGTTGGAGC ACACTATGTT CCAATAGCAT</b>	
	A V L L V A L L E H T M F Q * H	Frame 1
	L R S C L W L C W S T L C S N S M	Frame 2
	C G P A C G F V G A H Y V P I A W	Frame 3
2551	<b>GGCCTGGCGT AACGGCAGCT ACTGGTGGAT TCGGAAAGAT AAGAAAGTAG</b>	
	G L A * R Q L L V D S E R * E S R	Frame 1
	G W R N G S Y W W I R K D K K V G	Frame 2
	A G V T A A T G G G F G K I R K *	Frame 3
2601	<b>GGAATTAATA TGGCTTTAAA AACATTAGAA AAACATGAAT TAAGAAATGT</b>	
	E L I W L * K H * K N M N * E M *	Frame 1
	N * Y G F K N I R K T * I K K C	Frame 2
	G I N M A L K T L E K H E L R N V	Frame 3
2651	<b>AATGGGTGGA ACAAGTGGG GGAATGCTGT AATAGGAGCT GCTACGGGAG</b>	
	W V E T S G G M L * * E L L R E	Frame 1
	N G W K Q V G E C C N R S C Y G S	Frame 2
	M G G N K W G N A V I G A A T G A	Frame 3
2701	<b>CTACTCGCGG AGTAAGTTGG TGCAAGGAGAT TCGGACCATG GGGATGACT</b>	NcoI
	L L A E * V G A E D S D H G E * L	Frame 1
	Y S R S K L V Q R I R T M G N D C	Frame 2
	T R G V S W C R G F G P W G M T	Frame 3
2751	<b>GCCTGTGCGT TAGGAGGTGC TGCAATTGGA GGATATCTGG GATATAAGAG</b>	EcoRV
	P V R * E V L Q L E D I W D I R V	Frame 1
	L C V R R C C N W R I S G I * E	Frame 2
	A C A L G G A A I G G Y L G Y K S	Frame 3
2801	<b>TAATTAATTT ATAT<u>AGAGAT</u> TTATGTTATT CTTTGTAACT ATTATTAATG</b>	
	I N L Y R D L C Y S L * L L L M	Frame 1
	* L I Y I E I Y V I L C N Y Y * C	Frame 2
	N * F I * R F M L F F V T I I I N V	Frame 3
2851	<b>TAATACTTTT TTTAGGTAAC TTGTATCAA CGGGCTTTAA TTATTTAAC</b>	
	* Y F F * V T C I K R A L I I L T	Frame 1
	N T F F R * L V S N G L * L F * L	Frame 2
	I L F L G N L Y Q T G F N Y F N	Frame 3
2901	<b>TTAATCAAT TGCAAGCACT TTTACTAACT ATTTTTCTTA TTGTTACTGT</b>	
	L I N C K H F Y * L F F L L L L *	Frame 1
	* S I A S T F T N Y F S Y C Y C	Frame 2
	F N Q L Q A L L L T I F L I V T V	Frame 3

Nadaljevanje priloge B: **Nukleotidno in izpeljano aminokislinsko zaporedje gassericina K7 B.**

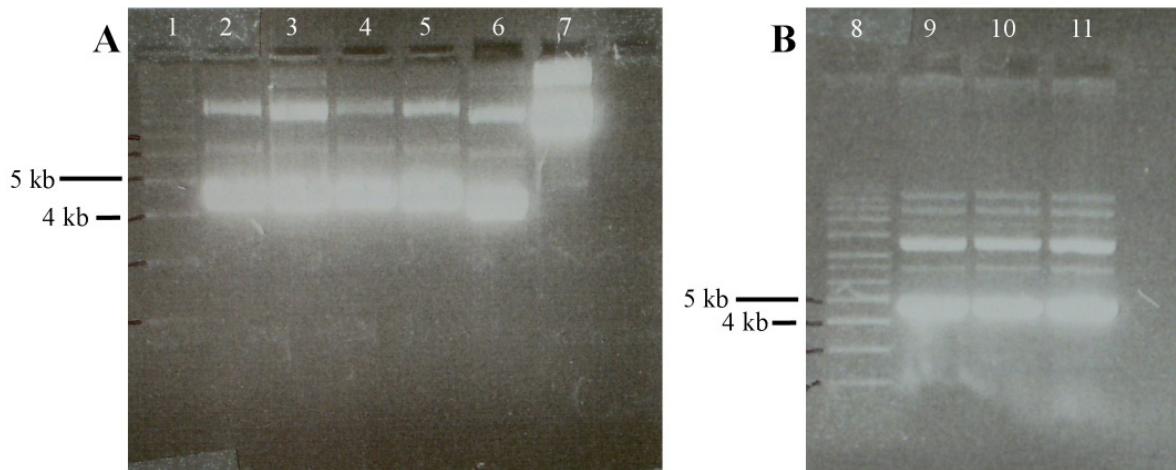
2951	<b>AATAGTTATC GCTATTAATA AAAAATTAGA AAGAGGTTAT GATCTTCCTT</b>	
	* L S L L I K N * K E V M I F L	Frame 1
	N S Y R Y * * K I R K R L * S F F	Frame 2
	I V I A I N K K L E R G Y D L S F	Frame 3
3001	<b>TTTTTGCACT TTATTTGTAT TGGCCAATTT ATGTTTTGGA AGTTAAATTA</b>	
	F L H F I C I G Q F M F L K L N Y	Frame 1
	F C T L F V L A N L C F * S * I I	Frame 2
	F A L Y L Y W P I Y V F E V K L	Frame 3
3051	<b>TATAATTCAA CAAATTATAA AGATGGAATA GAATTTGGG TTTATTTCGT</b>	
	I I Q Q I I K M E * N F G F I S Y	Frame 1
	* F N K L * R W N R I L G L F R	Frame 2
	Y N S T N Y K D G I E F W V Y F V	Frame 3
3101	<b>ACTAATTTG GCCATATCGT TTGTAATAGG AAAAATATTA AAAAGAACATCA</b>	
	* F W P Y R L * * E K Y * K E S	Frame 1
	T N F G H I V C N R K N I K K N H	Frame 2
	L I L A I S F V I G K I L K R I I	Frame 3
3151	<b>TAAGAAAGTA ATAATAAAAC TGAAAGTACT AAATTAGTTT TTGAATGACT</b>	
	* E S N N K T E S T K L V F E * L	Frame 1
	K K V I I K L K V L N * F L N D *	Frame 2
	R K * * N * K Y * I S F * M T	Frame 3
	B-3226up	
3201	<b>GATTTAGTGC TTTTTCTACT TTCTCCTTTA TTTAAGTAAA TATGAAAATC</b>	
	I * C F F Y F L L Y L S K Y E N L	Frame 1
	F S A F S T F S F I * V N M K I	Frame 2
	D L V L F L L S P L F K * I * K S	Frame 3
	HindIII	
3251	<b>TAATAGATTT ACTTAATGTT AAGCTT</b>	
	I D L L N V K L ? ? ? ? ? ? ? ?	Frame 1
	* * I Y L M L S ? ? ? ? ? ? ? ?	Frame 2
	N R F T * C * A ? ? ? ? ? ? ? ?	Frame 3

Priloga C: **Genomska DNA sevov K7 in LF221.** Stolpec 1: označevalec velikosti 1 kb, stolpec 2: genomska DNA K7, stolpec 3: genomska DNA LF221.

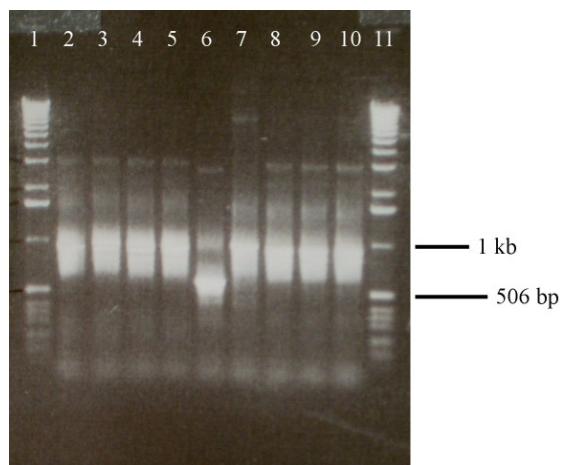
Annex C: **K7 and LF221 genomic DNA.** Lane 1: 1 kb DNA ladder, lane 2: K7 genomic DNA, lane 3: LF221 genomic DNA.



Priloga D: Preverjanje transformant *E. coli* pTOPO-LF221A(*HindIII*) in *E. coli* pTOPO-K7A(*HindIII*).  
Annex D: Verifying of *E. coli* pTOPO-LF221A(*HindIII*) and *E. coli* pTOPO-K7A(*HindIII*) transformants.



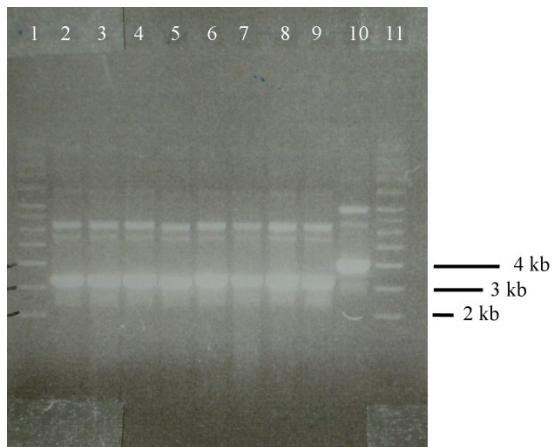
D1 in D2: Plazmidna DNA transformant *E. coli* pTOPO-LF221A(*HindIII*) in *E. coli* pTOPO-K7A(*HindIII*). Stolpca 1 in 8: označevalec velikosti supercoiled DNA ladder, stolpci 2-7: plazmidna DNA transformant LF221A(*HindIII*) 1-6, stolpci 9-11: plazmidna DNA transformant K7A(*HindIII*) 1-3.



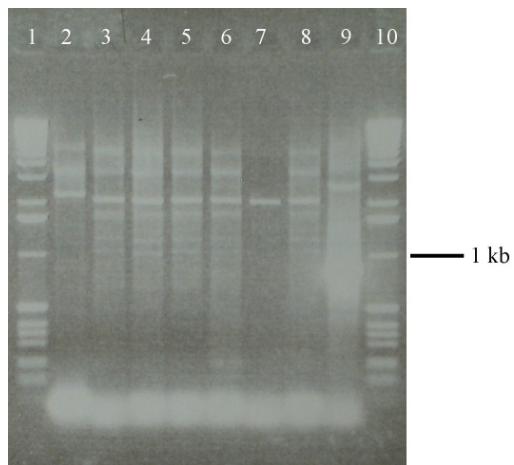
D3: Preverjanje prisotnosti in velikosti inserta v transformantah *E. coli* pTOPO-LF221A(*HindIII*) in K7A(*HindIII*) s PCR, z začetnima oligonukleotidoma T7 in LF221A2. Stolpca 1 in 11: označevalec velikosti 1 kb, stolpci 2-7: pomnožki PCR transformant LF221A(*HindIII*) 1-6, stolpci 8-10: pomnožki PCR transformant K7A(*HindIII*) 1-3.

Priloga E: Preverjanje transformant *E. coli* pMG-LF221A(*EcoRI/HindIII*) in *E. coli* pMG-K7A(*EcoRI/HindIII*).

Annex E: Verifying of *E. coli* pMG-LF221A(*EcoRI/HindIII*) and *E. coli* pMG-K7A(*EcoRI/HindIII*) transformants.



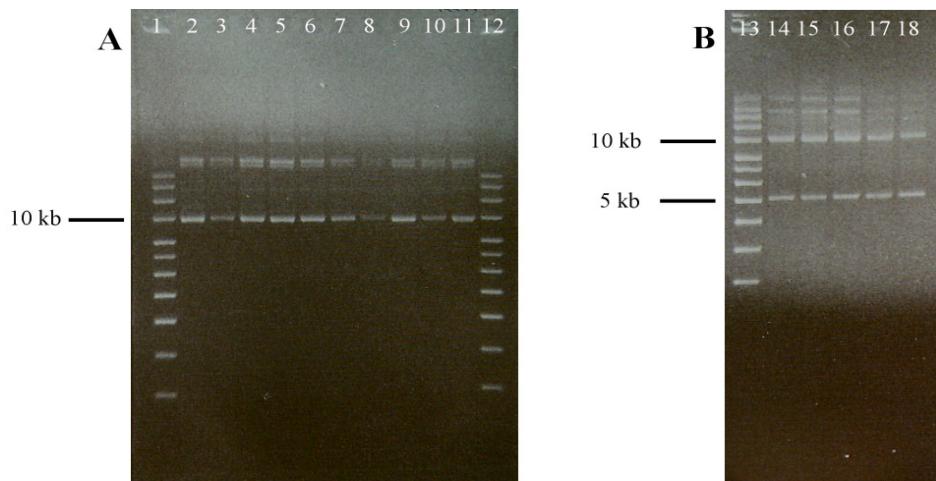
E1: Plazmidna DNA transformant *E. coli* pMG-LF221A(*EcoRI/HindIII*) in *E. coli* pMG-K7A(*EcoRI/HindIII*). Stolca 1 in 11: označevalec velikosti supercoiled DNA ladder, stolci 2-5: plazmidna DNA transformant LF221A(*EcoRI/HindIII*) 1-4, stolci 6-10: plazmidna DNA transformant K7A(*EcoRI/HindIII*) 1-5.



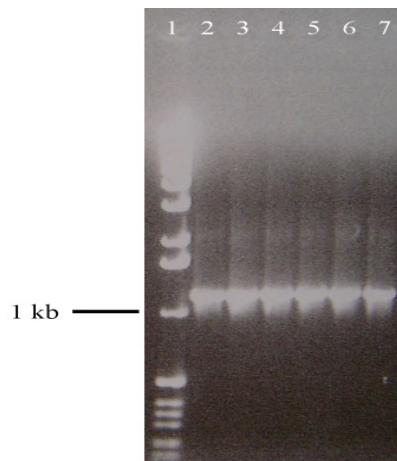
E2: Preverjanje prisotnosti in velikosti inserta v transformantih *E. coli* pMG-LF221A(*EcoRI/HindIII*) in *E. coli* pMG-K7A(*EcoRI/HindIII*) s PCR, z začetnima oligonukleotidoma pMGSr in LF221A2. Stolca 1 in 10: označevalec velikosti 1 kb, stolci 2-5: pomnožki PCR transformant LF221A(*EcoRI/HindIII*) 1-4, stolci 6-9: pomnožki PCR transformant K7A(*EcoRI/HindIII*) 1, 2, 4 in 5.

Priloga F: Preverjanje transformant *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7A(9), *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7A(10) in *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-K7A(10).

Annex F: Verifying of *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7A(9), *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7A(10) and *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-K7A(10) transformants.



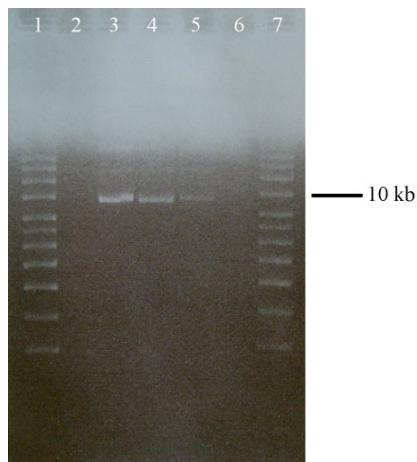
F1: Plazmidna DNA transformant *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7A(9), *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7A(10) in *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-K7A(10). Stolpci 1, 12 in 13: označevalec velikosti supercoiled DNA ladder, stolpcji 2-6: plazmidna DNA transformant *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7A(9) 1-5, stolpcji 7-11: plazmidna DNA transformant *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7A(10) 6-10, stolpcji 14-18: plazmidna DNA transformant *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-K7A(10) 11-15.



F2: Preverjanje prisotnosti in velikosti inserta v transformantah *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7A(9), *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7A(10) in *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-K7A(10) s PCR, z začetnima oligonukleotidoma pMG4 in 858-left. Stolpec 1: označevalec velikosti 1 kb, stolpcji 2-3: pomnožki PCR transformant pIL253-p32-K7A(9)-1 in -3, stolpcji 4-5: pomnožki PCR transformant pIL253-p32-K7A(10)-8 in -9, stolpcji 6-7: pomnožki PCR transformant pIL252-p32-K7A(10)-11 in -12.

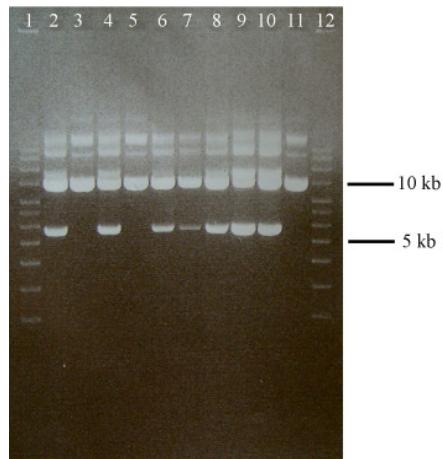
Priloga G: **Plazmidna DNA transkonjugante *Lc. lactis* K1-K7-4 in kontrolnih sevov.** Stolpcu 1 in 7: označevalec velikosti supercoiled DNA ladder, stolpec 2: plazmidna DNA donorja *Lc. lactis* K1, stolpec 3: plazmidna DNA transkonjugante *Lc. lactis* K1-K7-4, stolpec 4: plazmidna DNA klona *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7A(4), stolpec 5: plazmidna DNA klona *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A(5), stolpec 6: plazmidna DNA seva *Lc. lactis* IL1403.

Annex G: **Plasmid DNA of *Lc. lactis* K1-K7-4 transconjugant and of control strains.** Lanes 1 and 7: supercoiled DNA ladder, lane 2: plasmid DNA of donor *Lc. lactis* K1, lane 3: plasmid DNA of transconjugant *Lc. lactis* K1-K7-4, lane 4: plasmid DNA of clone *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL253-p32-K7A(4), lane 5: plasmid DNA of clone *Lc. lactis* IL1403 pTOPO-pIL252-p32-K7A(5), lane 6: plasmid DNA of strain *Lc. lactis* IL1403.

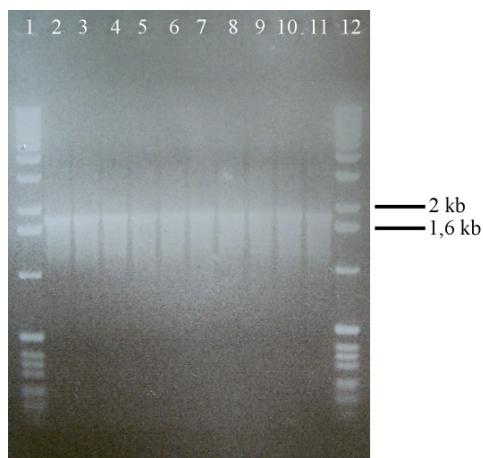


**Priloga H: Preverjanje transformant *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7B(4) in *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-LF221B(4).**

**Annex H: Verifying of *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-K7B(4) and *E. coli* pTOPO-pIL253-p32-LF221B(4)K7 and LF221 transformants.**



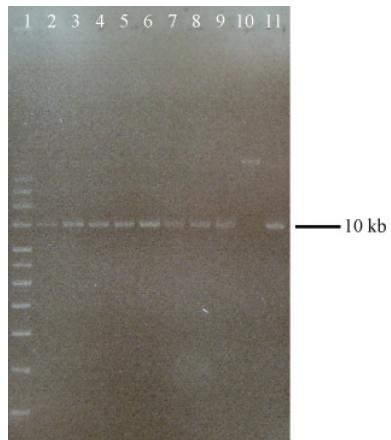
**H1: Plazmidna DNA transformant *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-K7B(4) in *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-LF221B(4).** Stolpca 1 in 12: označevalec velikosti supercoiled DNA ladder, stolpci 2-8: plazmidna DNA transformant *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-K7B(4) 1-7, stolpci 9-11: plazmidna DNA transformant *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-LF221B(4) 1-3.



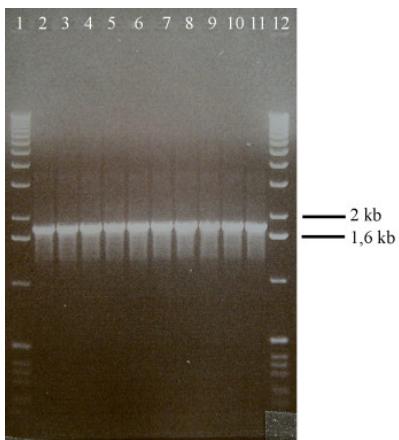
**H2: Preverjanje prisotnosti in velikosti inserta v transformantah *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-K7B(4) in *E. coli* pTOPO-pIL252-p32-LF221B(4) s PCR, z začetnima oligonukleotidoma pMG4 in B-3226up.** Stolpca 1 in 12: označevalec velikosti 1 kb, stolpci 2-8: pomnožki PCR transformant pIL252-p32-K7B(4) 1-7, stolpci 9-11: pomnožki PCR transformant pIL252-p32-LF221B(4) 1-3.

Priloga I: Preverjanje transformant *Ent. faecium* 2749 pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) in *Ent. faecium* 2749 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3).

Annex I: Verifying of *Ent. faecium* 2749 pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) and *Ent. faecium* 2749 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) transformants.



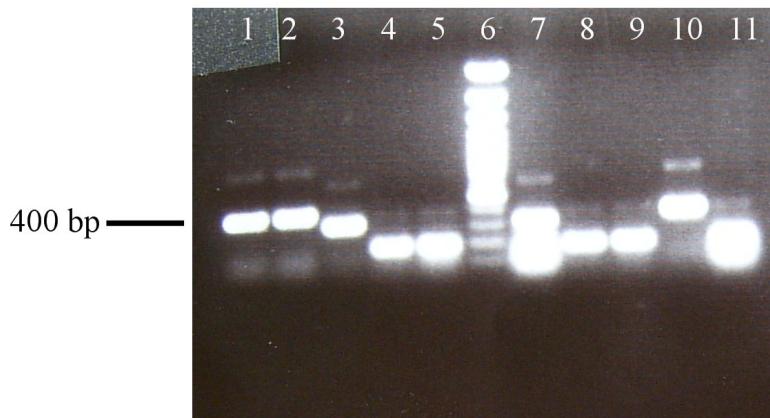
I1: Plazmidna DNA transformant *Ent. faecium* 2749 pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) in *Ent. faecium* 2749 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3). Stolpec 1: označevalec velikosti supercoiled DNA ladder, stolpci 2-6: plazmidna DNA transformant pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) 1-5, stolpci 7-11: plazmidna DNA transformant pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) 1-5.



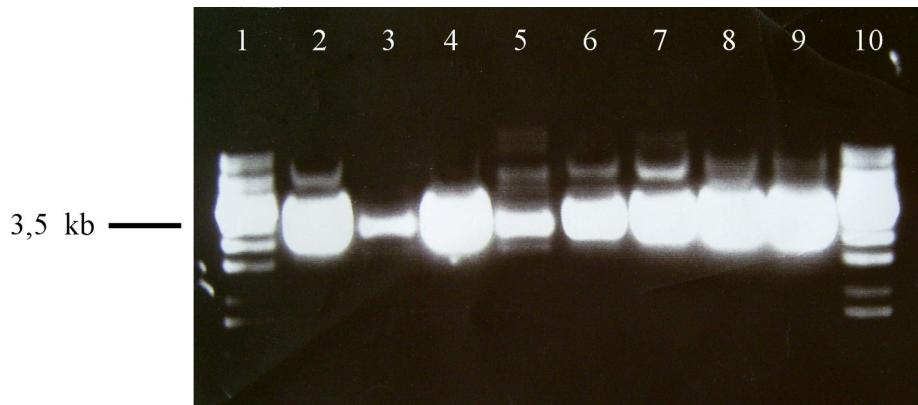
I2: Preverjanje prisotnosti in velikosti inserta v transformantah *Ent. faecium* 2749 pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) in *Ent. faecium* 2749 pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) s PCR, z začetnima oligonukleotidoma pMG4 in B-3226up. Stolca 1 in 12: označevalec velikosti 1 kb, stolci 2-6: pomnožki PCR transformant pTOPO-pIL252-p32-K7B(2) 1-5, stolci 7-11: pomnožki PCR transformant pTOPO-pIL252-p32-LF221B(3) 1-5.

Priloga J: Preverjanje transformant *E. coli* pGEM-GasK7a in *E. coli* pGEM-GasK7A.

Annex J: Verifying of *E. coli* pGEM-GasK7a and *E. coli* pGEM-GasK7A transformants.



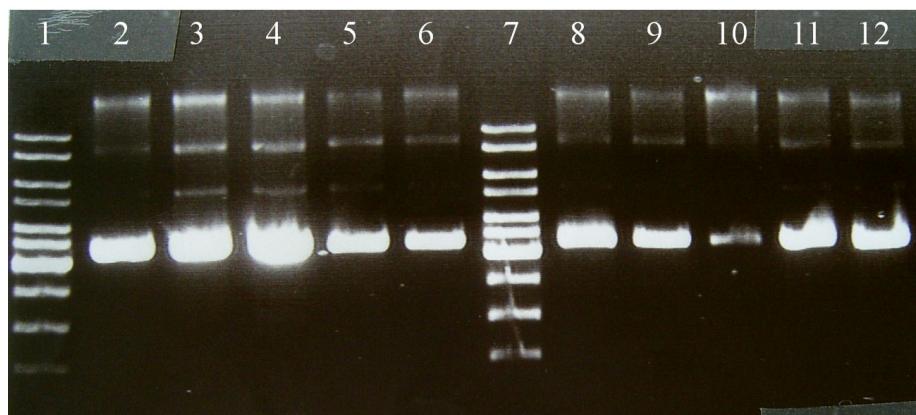
J1: Preverjanje prisotnosti in velikosti inserta v transformantah *E. coli* pGEM, s PCR na osnovi kolonije, z začetnima oligonukleotidoma UniV in GemR. Stolpci 1-5: pomnožki PCR transformant *E. coli* pGEM-gasK7a 1-5, stolpec 6: označevalec velikosti 100 bp Plus, stolpcji 7-11: pomnožki PCR transformant *E. coli* pGEM-gasK7A 1-5.



J2: Plazmidna DNA transformant *E. coli* pGEM s konstrukti pGEM-gasK7a, pGEM-gasK7A, pGem-gasK7a+A(a) in pGEM-gasK7a+A(A). Stolpca 1 in 10: označevalec velikosti 1 kb, stolpca 2-3: plazmidna DNA *E. coli* pGEM-gasK7a-1, -2; stolpec 4: plazmidna DNA *E. coli* pGEM-gasK7A-4, stolpcia 5-6: plazmidna DNA *E. coli* pGEM-gasK7a+A(a)-1, -4; stolpcji 7-9: plazmidna DNA *E. coli* pGEM-gasK7a+A(A)-2, -3, -5.

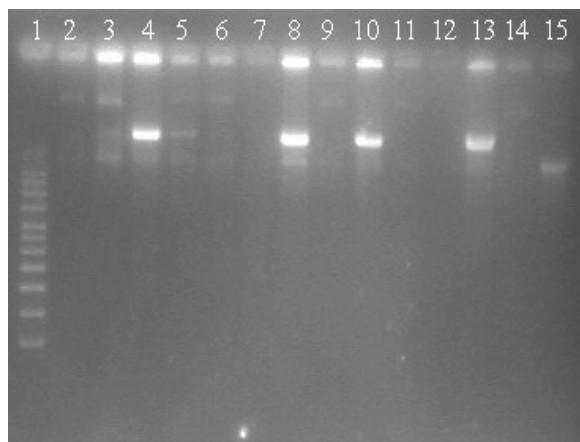
Priloga K: **Plazmidna DNA transformant *E. coli* pET s konstruktmi pET-gasK7a in pET-gasK7A.** Stolpca 1 in 7: označevalec velikosti 1 kb, stolpci 2-6: plazmidna DNA transformant *E. coli* pET-gasK7a-1, -3, -4, -5, -6, stolpci 8-12: plazmidna DNA transformant *E. coli* pET-gasK7A-1, -2, -5, -6, -8.

Annex K: **Plasmid DNA of *E. coli* pET transformants, carrying constructs pET-gasK7a and pET-gasK7A.** Lanes 1 and 7: 1 kb DNA ladder, lanes 2-6: plasmid DNA of *E. coli* pET-gasK7a-1, -3, -4, -5, -6 transformants, lanes 8-12: plasmid DNA of *E. coli* pET-gasK7A-1, -2, -5, -6, -8 transformants.

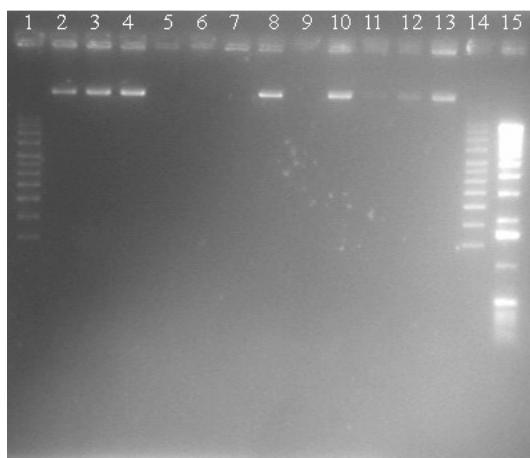


**Priloga L: Plazmidna DNA matičnega seva K7 in seva K7, gojenega v različnih stresnih pogojih.**

**Annex L: Plasmid DNA of parental K7 strain and of K7 strain subcultured under different stress conditios.**



**L1: Plazmidna DNA matičnega seva K7 in seva K7, po petnajstih precepljanjih v različnih stresnih pogojih.** Stolpec 1: označevalec velikosti supercoiled DNA ladder, stolpci 2-13: plazmidna DNA precepljenih poskusnih paralelk K7; stolpci 2-4: K7/37 °C, stolpci 5-7: K7/45 °C, stolpci 8-10: K7/EtBr, stolpci 11-13: K7/mitC, stolpec 14: plazmidna DNA seva K7, stolpec 15: genomska DNA seva K7.



**L2: Plazmidna DNA matičnega seva K7 in seva K7, po štiridesetih precepljanjih v različnih stresnih pogojih.** Stolpca 1 in 14: označevalec velikosti supercoiled DNA ladder, stolpci 2-13: plazmidna DNA precepljenih poskusnih paralelk K7; stolpci 2-4: K7/37 °C, stolpci 5-7: K7/45 °C, stolpci 8-10: K7/EtBr, stolpci 11-13: K7/mitC, stolpec 15: označevalec velikosti 1 kb.

**Priloga M: Profil fermentacije ogljikovih hidratov matičnega seva K7 in seva K7, gojenega v stresnih pogojih, po sistemu API 50 CH.**

**Annex M: Carbohydrate fermentation profile of parental K7 strain and of treated K7 according to API 50 CHL system.**

Substrat	K7-mat.	K7/37 °C	K7/45 °C	K7/EtBr	K7/mit C
0: kontrola	-	-	-	-	-
1: glicerol	-	-	-	-	-
2: eritriol	-	-	-	-	-
3: D-arabinoza	-	-	-	-	-
4: L-arabinoza	-	-	-	-	-
5: riboza	-	-	-	-	-
6: D-ksiloza	-	-	-	-	-
7: L-ksiloza	-	-	-	-	-
8: adonitol	-	-	-	-	-
9: β-metil-D-ksilozid	-	-	-	-	-
10: galaktoza	+	+	+	+	+
11: glukoza	+	+	+	+	+
12: fruktoza	+	+	+	+	+
13: manoza	+	?	?	+	?
14: sorboza	-	-	-	-	-
15: ramnoza	-	-	-	-	-
16: dulcitol	-	-	-	-	-
17: inozitol	-	-	-	-	-
18: manitol	-	-	-	-	-
19: sorbitol	-	-	-	-	-
20: α-metil-D-manozid	-	-	-	-	-
21: α-metil-D-glukozid	-	-	-	-	-
22: N-acetyl-glukozamin	+	?	-	?	?
23: amigdalin	?	?	-	?	?
24: arbutin	+	?	?	?	?
25: eskulin	+	+	+	+	+
26: salicin	?	?	?	?	+
27: celobioza	?	+	+	?	+
28: maltoza	+	+	+	+	+
29: lakoza	?	+	?	+	+
30: melbioza	-	-	-	-	-
31: saharoza	+	+	+	+	+
32: trehaloza	+	+	+	+	?
33: inulin	-	-	-	-	-
34: melezitoza	-	-	-	-	-
35: rafinoza	-	-	-	-	-
36: škrob	?	?	?	?	?
37: glikogen	-	-	-	-	-
38: ksilitol	-	-	-	-	-
39: gentobioza	+	+	+	+	+

Nadaljevanje priloge M: **Profil fermentacije ogljikovih hidratov matičnega seva K7 in seva K7, gojenega v stresnih pogojih, po sistemu API 50 CH.**

Substrat	K7-mat.	K7/37 °C	K7/45 °C	K7/EtBr	K7/mit C
40: D-turanoza	-	-	-	-	?
41: D-liksoza	-	-	-	-	-
42: D-tagatoza	-	-	-	-	-
43: D-fukoza	-	-	-	-	-
44: L-fukoza	-	-	-	-	-
45: D-arabitol	-	-	-	-	-
46: L-arabitol	-	-	-	-	-
47: glukonat	-	-	-	-	-
48: 2-keto-glukonat	-	-	-	-	-
49: 5-keto-glukonat	-	-	-	-	-

+...fermentira

-...ne fermentira

?...delno fermentira (barva indikatorja se je delno spremenila)

---