

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Petra ZADRAVEC

**PREDSTAVITEV RAZLIČIC ANTIGENA HEPATITISA A NA  
POVRŠINI REKOMBINANTE MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE**  
*Lactococcus lactis*

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DISPLAY OF ANTIGEN VARIETIES OF HEPATITIS A ON SURFACE  
OF RECOMBINANT LACTIC ACID BACTERIUM *Lactococcus lactis***

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju Odseka za biotehnologijo na Institutu Jožef Stefan.

Študijska komisija dodiplomskega študija oddelka za biotehnologijo je dne 16. 6. 2010 odobrila naslov diplomskega dela in za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Boruta Štruklja, somentorja dr. Aleša Berleca in recenzentko doc. dr. Polona Jamnik.

Mentor: prof. dr. Borut Štrukelj

Somentor: dr. Aleš Berlec

Recenzentka: doc. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Branka Javornik, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,  
Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Borut Štrukelj, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Član: dr. Aleš Berlec, Institut Jožef Stefan, Odsek za biotehnologijo

Član doc. dr. Polona Jamnik, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,  
Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 21. 7. 2010

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Petra ZADRAVEC

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 602.6:579.864:577.1.08+577.2.08(043)=163.6  
KG mlečnokislinske bakterije/*Lactococcus lactis*/hepatitis A/antigen hepatitis A/površinska predstavitev/nosilni proteini/  
AV ZADRAVEC, Petra  
SA ŠTRUKELJ, Borut (mentor)/BERLEC, Aleš (somentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  
LI 2010  
IN PREDSTAVITEV RAZLIČIC ANTIGENA HEPATITISA A NA POVRŠINI REKOMBINANTE MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE *Lactococcus lactis*  
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)  
OP XII, 84 str., 18 pregl., 35 sl., 2 pril., 72 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V prvem delu diplomske naloge je bil naš namen izraziti različice antigaena hepatitisa A v bakteriji *Lactococcus lactis* (*L. lactis*). Z metodami kloniranja smo pripravili laktkokne plazmide z vstavljenimi različicami genskih zapisov za antigen hepatitis A, ki smo jih nato izrazili s pomočjo z nizinom nadzorovanega sistema za izražanje v *L. lactis*. Izražanje različic antigaena hepatitisa A smo uspešno detektirali s pomočjo metod NaDS PAGE in prenosom Western. V drugem delu diplome smo se osredotočili na iskanje novih nosilnih proteinov za površinsko predstavitev na bakteriji *L. lactis* s pomočjo določanja površinskega proteoma *L. lactis* z masno spektrometrijo. Na površini *L. lactis* smo identificirali 56 proteinov in med njimi glede na število identificiranih peptidov in druge lastnosti izbrali 7 kandidatnih nosilnih proteinov za površinsko predstavitev na bakterijah. Vseh 7 genov za izbrane površinske proteine smo uspešno klonirali v laktkokne plazmide s histidinsko oznako na C-koncu gena. Nato smo proteine izrazili v *L. lactis* s pomočjo z nizinom nadzorovanega sistema in izražanje detektirali z NaDS PAGE in prenosom Western z uporabo protiteles proti histidinski oznaki protiteles. Količino izražanih proteinov na površini smo ovrednotili s pretočno citometrijo. Glede na uspešnost in količino izražanja smo za potencialni nosilni protein pri površinski predstavitvi izbrali bazični membranski protein A (BmpA). Njegovo primernost za površinsko predstavitev smo preverili z vključitvijo B domene stafilocoknega proteina A v genetski konstrukt in jo tudi dokazali. Sistem površinske predstavitve z BmpA nosilnim proteinom je bil manj učinkovit v primerjavi z že optimiziranim sistemom SP<sub>Usp45</sub>/AcmA. Z uporabo ostrih pogojev spiranja laktkoknih celic, ki so izražale BmpA v fuziji z B domeno, pa smo dokazali močnejšo vezavo na površino v primerjavi z nekovalentno vezavo preko LysM AcmA regije. Sistem z BmpA nosilnim proteinom zato predstavlja potencial za nadaljnji razvoj in optimizacijo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 602.6:579.864:577.1.08+577.2.08(043)=163.6
CX	lactic acid bacteria/ <i>Lactococcus lactis</i> /hepatitis A/antigen of hepatitis A/surface display/carrier proteins/
AU	ZADRAVEC, Petra
AA	ŠTRUKELJ, Borut (supervisor)/BERLEC, Aleš (co-advisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Program in Biotechnology
PY	2010
TI	DISPLAY OF ANTIGEN VARIETIES OF HEPATITIS A ON SURFACE OF RECOMBINANT LACTIC ACID BACTERIUM <i>Lactococcus lactis</i>
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XII, 84 p., 18 tab., 35 fig., 2 ann., 72 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	In the first part of graduation thesis we intended to express antigen varieties of hepatitis A in <i>Lactococcus lactis</i> ( <i>L. lactis</i> ). We have prepared lactococcal plasmids with gene constructs, coding for antigen varieties of hepatitis A inserts using cloning methods. Antigens were expressed using nisin-controlled expression in <i>L. lactis</i> . We have successfully detected expression of antigen varieties of hepatitis A using SDS PAGE and Western blot. In the second part of graduation thesis we have focused on the search for new carrier proteins for bacterial surface display. We have analysed <i>L. lactis</i> surface proteome using mass spectroscopy. We have identified 56 proteins on <i>L. lactis</i> surface. Among them, we have selected 7 candidate carrier proteins for bacterial surface display. We have cloned all seven candidate protein genes in lactococcal plasmids with histidine tag on their C-terminal. We have then expressed proteins in <i>L. lactis</i> using nisin-controlled expression. Expression was detected with SDS PAGE and Western blot using an antihistidine tag antibody. Amount of expressed protein on the surface was evaluated with flow cytometry. We have selected basic membrane protein A (BmpA) as a potential carrier protein for surface display on the basis of efficiency and amount. To test its suitability as a candidate carrier protein, hexa-histidine tag was replaced with B domain of staphylococcal protein A in the genetic construct. Surface display system with BmpA carrier protein was less successful in comparison to optimized SP <sub>Usp45</sub> /AcM <sub>A</sub> system. However, with stringent washing of lactococcal cells we have demonstrated stronger binding of covalent BmpA/B domain fusion in comparison to non-covalent LysM binding of AcM <sub>A</sub> to bacterial surface. BmpA therefore has a good potential for further studies and optimization.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XI</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA .....	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE .....	2
2.1.1 <i>Lactococcus lactis</i> .....	5
2.1.2 Gensko spremenjene mlečnokislinske bakterije .....	6
2.1.2.1 Sistemi za izražanje genov .....	6
2.1.2.1.1 NICE sistem	8
2.1.3 Uporaba GS MKB v prehrani .....	9
2.1.4 Uporaba GS MKB za terapevtske namene .....	11
2.1.4.1 Dostava cepiv (vakcinacija).....	11
2.1.4.2 Dostava proteinov s fiziološko vlogo .....	12
2.2 HEPATITIS A .....	13
2.2.1 Opis virusa .....	15
2.2.2 Flagelin .....	16
2.3 POVRŠINSKA PREDSTAVITEV NA BAKTERIJAH .....	17
2.3.1 Površinska predstavitev na bakteriji <i>Lactococcus lactis</i> .....	19
2.3.2 Določanje površinskega proteoma bakterij .....	21
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>23</b>
3.1 POTEK DELA .....	23
3.1.1 Potek dela za preverjanje izražanja različic antigaena hepatitisa A .....	23
3.1.2 Potek dela iskanja in vrednotenja novih nosilnih proteinov za površinsko predstavitev .....	24

3.2 MATERIALI.....	25
3.2.1 Bakterijske kulture.....	25
3.2.2 Plazmidi .....	25
3.2.2.1 pGEM®-T Easy Vector.....	26
3.2.2.2 pNZ8148.....	26
3.2.2.3 pSDLBA3b .....	27
3.2.3 Začetni oligonukleotidi.....	28
3.2.4 Encimi.....	29
3.2.5 Kemikalije .....	29
3.2.6 Gojišča in raztopine.....	30
3.2.7 Laboratorijska oprema in ostali materiali .....	32
3.3 METODE .....	33
3.3.1 Masna spektrometrija površinskih proteinov <i>L. lactis</i> .....	33
3.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....	35
3.3.3 Agarozna gelska elektroforeza .....	36
3.3.4 Čiščenje fragmentov DNK iz gela .....	36
3.3.5 Ligacija v plazmid pGEM®-T Easy .....	37
3.3.6 Transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> (DH5α) .....	37
3.3.7 PCR na osnovi kolonije .....	38
3.3.8 Priprava prekonočnih kultur .....	40
3.3.9 Izolacija plazmidne DNK (minipreparacija) .....	40
3.3.10 Določanje nukleotidnega zaporedja plazmidne DNK .....	41
3.3.11 Cepitev DNK s pomočjo restrikcijskih encimov.....	41
3.3.12 Ligacija izrezanih fragmentov DNK.....	42
3.3.13 Čiščenje ligacijske mešanice pred elektroporacijo .....	43
3.3.14 Priprava kompetentnih celic <i>L. lactis</i> za elektroporacijo .....	43
3.3.15 Elektroporacija kompetentnih celic <i>L. lactis</i> .....	44
3.3.16 Izražanje različic antiga hepatitis A in izbranih površinskih proteinov v/na <i>L. lactis</i> .....	45
3.3.17 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS.....	45
3.3.18 Prenos Western in detekcija proteinov s protitelesi.....	46
3.3.19 Pretočna citometrija izbranih površinskih proteinov in proteina llmg_1064 z dodano B domeno .....	48
<b>4 REZULTATI</b>	<b>50</b>
4.1 PREVERJANJE IZRAŽANJA RAZLIČIC ANTIGENA HEPATITISA A .....	50
4.1.1 Priprava plazmidov z vstavljenimi različicami antiga hepatitis A ....	50
4.1.2 Izražanje različic antiga hepatitis A v <i>L. lactis</i> .....	52

4.1.2.1 Rezultati NaDS PAGE in barvanja s Commassie brilliant modrim barvilom .....	52
4.1.2.2 Rezultati prenosa Western označenih različic antiga hepatitisa A s protitelesi proti HAV .....	53
<b>4.2 ISKANJE IN VREDNOTENJE NOVIH NOSILNIH PROTEINOV ZA POVRŠINSKO PREDSTAVITEV.....</b>	<b>54</b>
<b>    4.2.1 Rezultati masne spektrometrije .....</b>	<b>54</b>
4.2.1.1 Napoved in analiza površinskega proteoma <i>Lactococcus lactis</i> NZ9000 ... .....	54
4.2.1.2 Izbrani površinski proteini <i>Lactococcus lactis</i> NZ9000 .....	58
<b>    4.2.2 Priprava plazmidov z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine .</b>	<b>60</b>
<b>    4.2.3 Izražanje izbranih površinskih proteinov v <i>L. lactis</i> .....</b>	<b>63</b>
4.2.3.1 Rezultati NaDS PAGE in barvanja s Commassie brilliant modrim barvilom .....	64
4.2.3.2 Rezultati prenosa Western in označevanja s protitelesi.....	64
<b>    4.2.4 Površinska predstavitev izbranih površinskih proteinov na <i>L. lactis</i> .....</b>	<b>65</b>
<b>    4.2.5 Izbor najustreznejšega nosilnega proteina za površinsko predstavitev in določanje njegove funkcionalnosti z dodano B domeno .....</b>	<b>67</b>
4.2.5.1 Priprava plazmida pNZ-1064-B dom. ....	67
4.2.5.2 Izražanje llmg_1064 z dodano B domeno na površini <i>L. lactis</i> .....	68
4.2.5.3 Določanje funkcionalnosti nosilnega proteina llmg_1064 z dodano B domeno .....	69
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>71</b>
5.1 RAZPRAVA.....	71
5.2 SKLEPI .....	75
<b>6 POVZETEK</b>	<b>76</b>
<b>7 VIRI</b>	<b>78</b>

## ZAHVALA

## PRILOGE

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Plazmidi, ki smo jih uporabili pri pripravi konstruktov .....	25
Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri pripravi plazmidov z vstavljenimi različicami antigaena HAV in geni za izbrane površinske proteine .....	28
Preglednica 3: Encimi in njihovi proizvajalci, uporabljeni v eksperimentalnem delu.....	29
Preglednica 4: Vse kemikalije in njihovi proizvajalci uporabljeni pri eksperimentalnem delu .....	29
Preglednica 5: Raztopine in gojišča uporabljeni pri eksperimentalnem delu .....	31
Preglednica 6: Laboratorijska oprema in ostali materiali uporabljeni pri praktičnem delu diplome .....	32
Preglednica 7: Šablone in začetni oligonukleotidi uporabljeni pri PCR mešanicah za različne namene .....	35
Preglednica 8: Pogoji za izvedbo PCR .....	36
Preglednica 9: Kombinacije začetnih oligonukleotidov uporabljeni pri PCR na osnovi kolonije in shematičen prikaz prileganja začetnih oligonukleotidov ter uporaba posamezne kombinacije. ....	38
Preglednica 10: Pogoji za izvedbo PCR na osnovi kolonije .....	40
Preglednica 11: Restriktivske mešanice za pripravo plazmidov z vstavljenimi geni za različice antigaena hepatitisa A .....	42
Preglednica 12: Restriktivske mešanice za pripravo plazmidov z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine s histidinsko oznako in dodatek B domene v pNZ-1064.....	42
Preglednica 13: Kombinacije fragmenta X in plazmida Y pri ligaciji za nastanek načrtovanega plazmida .....	43
Preglednica 14: Količine sestavin za pripravo koncentracijskega in separacijskega gela ..	46
Preglednica 15: Seznam in opis končnih pripravljenih plazmidov z vstavljenimi različicami antigaena HAV .....	51
Preglednica 16: Identificirani proteini na površini <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 .....	55
Preglednica 17: Izbrani površinski proteini <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 in njihove lastnosti .....	59
Preglednica 18: Seznam in opis končnih pripravljenih laktokoknih plazmidov z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine .....	63

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shema metabolizma ogljikovih hidratov homofermentativnih in heterofermentativnih MKB (Kandler, 1983) .....	3
Slika 2: Shema končne molekule nizina. (Mierau in Kleerebezem, 2005: 706). ....	8
Slika 3: Z nizinom kontrolirano izražanje genov(Mierau in Kleerebezem, 2005: 708).....	9
Slika 4: Sestava genoma hepatitisa A, HAV poliprotein in njegovi cepitveni produkti (Hadem in Manns, 2007: 164).....	15
Slika 5: Genski konstrukti za površinsko predstavitev v laktokokih (Ravnikar in sod., sprejeto v tisk: 11) .....	21
Slika 6: Potek dela za preverjanje izražanja različic antiga hepatitisa A.....	23
Slika 7: Potek dela iskanja in vrednotenja novih nosilnih proteinov za površinsko predstavitev.....	24
Slika 8: Prikaz plazmida pGEM®-T Easy .....	26
Slika 9: Prikaz plazmida pNZ8148.....	27
Slika 10: Prikaz plazmida pSDLBA3b.....	27
Slika 11: Princip ESI vira ionizacije (Eidhammer in sod., 2007: 72) .....	34
Slika 12: Shema prenosa Western .....	47
Slika 13: Prikaz prednjega in stranskega sisanja razpršene svetlobe pri interakciji s celico (BD Biosciences, 2000: 14).....	48
Slika 14: Pomnožitev gena za flagelin .....	50
Slika 15: Rezultati uvedbe restriktičnih mest Nco/Xba n a koncu HA.....	50
Slika 16: Rezultati PCR na osnovi kolonije za kolonije s plazmidi pGEM-HAV Nco/Xba in pGEM-FliC.....	50
Slika 17: Sheme konstruktov z različicami antiga hepatitisa A in plazmida pSDLBA3b .....	51
Slika 18: Rezultati NaDS PAGE izraženih različic antiga hepatitisa A v <i>L. lactis</i> s.....	52
Slika 19: Rezultati prenosa Western označenih celičnih lizatov izraženih različic antiga hepatitisa A v <i>L. lactis</i> s protitelesi proti HAV. ....	53
Slika 20: Sheme proteinov, ki so bili napovedani kot lipoproteini ali z membranskimi domenami .....	57

Slika 21: Uvedba histidinske oznake na koncu gena HAV in pomnožitve genov izbranih površinskih proteinov s PCR.....	60
Slika 22: Rezultati PCR na kolonijah za pGEM-HAV Nco/Xba His6 in pGEM-izbran površinski protein.....	61
Slika 23: Rezultati restrikcije plazmidov za pripravo plazmidov z vstavljenimi geni za llmg_0551, llmg_2020 in llmg_2232 z dodano histidinsko oznako. ....	62
Slika 24: Rezultati restrikcije plazmidov za pripravo plazmidov z vstavljenimi geni za llmg_2330, llmg_0168, llmg_1907 in llmg_1064 z dodano histidinsko oznako. ....	62
Slika 25: Sheme končnih laktokoknih plazmidov z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine z dodano histidinsko oznako .....	63
Slika 26: Rezultati NaDS PAGE analize izraženih izbranih površinskih proteinov. ....	64
Slika 27: Rezultati prenosa Western ločenih celičnih lizatov in gojišč izraženih površinskih proteinov s FITC označenimi protitelesi proti histidinski oznaki. ....	65
Slika 28: Rezultati označevanja celičnih lizatov izraženih površinskih proteinov s HRP označenimi protitelesi proti histidinski oznaki.....	65
Slika 29: Prikaz gostote laktokoknih celic glede na višino prednjega in stranskega sipanja .....	66
Slika 30: Povprečna intenziteta fluorescence laktokoknih celic z izraženim izbranim površinskim proteinom in dodano histidinsko oznako. ....	66
Slika 31: Rezultati restrikcije za pripravo plazmida pNZ-1064-B dom. ....	67
Slika 32: Rezultati PCR na osnovi kolonije za pNZ-1064-B dom. ....	68
Slika 33: Shema plazmida pNZ-1064- B dom. ....	68
Slika 34: Rezultati izražanja pNZ-1064-B dom. ....	69
Slika 35: Povprečna intenziteta fluorescence laktokoknih celic z izraženim konstruktom brez spiranja in s spiranjem s TBS+ pufrom. ....	70

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Določena nukleotidna zaporedja končnih laktokoknih konstruktov

Priloga B: Vsi zbrani podatki o sedmih izbranih površinskih proteinih

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

B dom.	B domena
BmpA	bazični membranski protein A (llmg_1064)
Bp	bazni par
CCS	ceramid karbamoil spermin
CTL	citotoksični limfociti T
DNK	deoksiribonukleinska kislina
F	sprednji začetni oligonukleotid (ang. forward)
FAO	Organizacija za prehrano in kmetijstvo
G-	gram negativen
g	merska enota za relativno centrifugalno silo (RCF)
G+	gram pozitiven
GI	gastrointestinalni trakt
GRAS	splošno priznani kot varni (ang. generally recognized as safe)
GSO	gensko spremenjeni organizmi
HAV	hepatitis A virus; v primeru naše raziskave del VP1-P2A poliproteina
IgX	imunoglobulin tipa X (X=A, G, E)
IL	interlevkin
INF- $\gamma$	interferon gama
kb	kilo bazni par
KVČB	kronična vnetna črevesna bolezen
LPS	lipopolisaharid
MCS	mutiplo mesto za kloniranje
MKB	mlečnokislinske bakterije
MS	masna spektrometrija
NICE	z nizinom nadzorovano izražanje (ang, Nisin-Controlled gene Expression)
OD <sub>600</sub>	optična gostota pri 600 nm
P	fosfat
R	obraten začetni oligonukleotid (ang. reverse)
RNK	ribonukleinska kislina
RPM	vrtljaji na minuto
SPA	stafilokokni protein A
SP <sub>Usp45</sub>	signalni peptid proteina Usp45
TLR	tollu-podobni receptor
T <sub>m</sub>	talilna temperatura
TNF- $\alpha$	dejavnik tumorske nekroze $\alpha$
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Parenteralna dostava cepiv lahko povzroča nevšečnosti, kot so bolečine in vnetja, neprijeten občutek in zahteva usposobljene ljudi za izvedbo. Največja nevarnost pri parenteralnih vnosih antigenov v organizem pa je nenadna anafilaktična reakcija, ki kljub veliki varnosti cepiv doseže razmerje 1:80:000 pri uveljavljenih cepivih. Tako je v svetu vedno bolj zaželena peroralna dostava cepiv, ki je prijetnejša, cenejša in enostavna ter s tem omogoča cepljenje prebivalstva v manj razvitih deželah. Hepatitis A je obolenje jeter, ki ga povzroča virus hepatitisa A iz družine Picornaviridae. Prenaša se večinoma fekalnooralno, pa tudi z neposrednim prenosom med osebama. Hepatitis A predstavlja zdravstveni problem predvsem v manj razvitih državah, kjer se letno okuži 10 milijonov ljudi. Zaradi varnosti in številnih dobrih lastnosti so za peroralno dostavo antigenov primerne mlečnokislinske bakterije, med njimi je široko uporabna bakterija *Lactococcus lactis*, ki bi jo lahko uporabili za dostavo antigenov virusa hepatitisa A.

Pri dostavi antigenov (vakcinaciji) je pomemben tudi sistem predstavitve na površini bakterij, ki je poleg tega uporaben tudi za rešetanje proteinskih knjižnic, vezavo toksinov in drugih škodljivih molekul. Za predstavitev na površini bakterij so že razviti različni načini, ki pa niso vedno učinkoviti. Zato je aktualno iskanje novih načinov površinske predstavitev, zlasti novih površinskih proteinov, ki bi se lahko uporabili kot nosilci za površinsko predstavitev.

### 1.2 CILJI RAZISKOVANJA

V diplomskem delu smo si zastavili naslednje cilje raziskovanja:

- pripraviti plazmide z vstavljenimi geni za različice antigena hepatitisa A,
- izraziti različice antigena hepatitisa A v *L. lactis* in preveriti uspešnost izražanja,
- določiti in analizirati površinski proteom bakterije *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000,
- izbrati potencialne nosilne proteine za površinsko predstavitev na bakteriji *L. lactis*,
- pripraviti plazmide z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine, označene s histidinsko oznako (His-Taq),
- izraziti površinske proteine v *L. lactis* in preveriti uspešnost izražanja,
- izbrati najustreznejši nosilni protein za površinsko predstavitev in preveriti njegovo funkcionalnost z dodano B domeno stafilocoknega proteina A.

### 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

V bakteriji *L. lactis* lahko izrazimo izbrane različice antigena hepatitisa A in izražanje tudi ustrezno detektiramo. Rekombinantne bakterije bodo v nadalnjem delu uporabne za peroralno vakcinacijo.

Na površini bakterije *L. lactis* se nahajajo proteini, ki bi lahko bili učinkoviti kandidati za nosilne proteine v sistemu bakterijske predstavitev na površini. Površinske proteine lahko identificiramo, kloniramo njihove gene, jih prekomerno izrazimo in vrednotimo njihovo učinkovitost pri površinskem izražanju.

## 2 PREGLED OBJAV

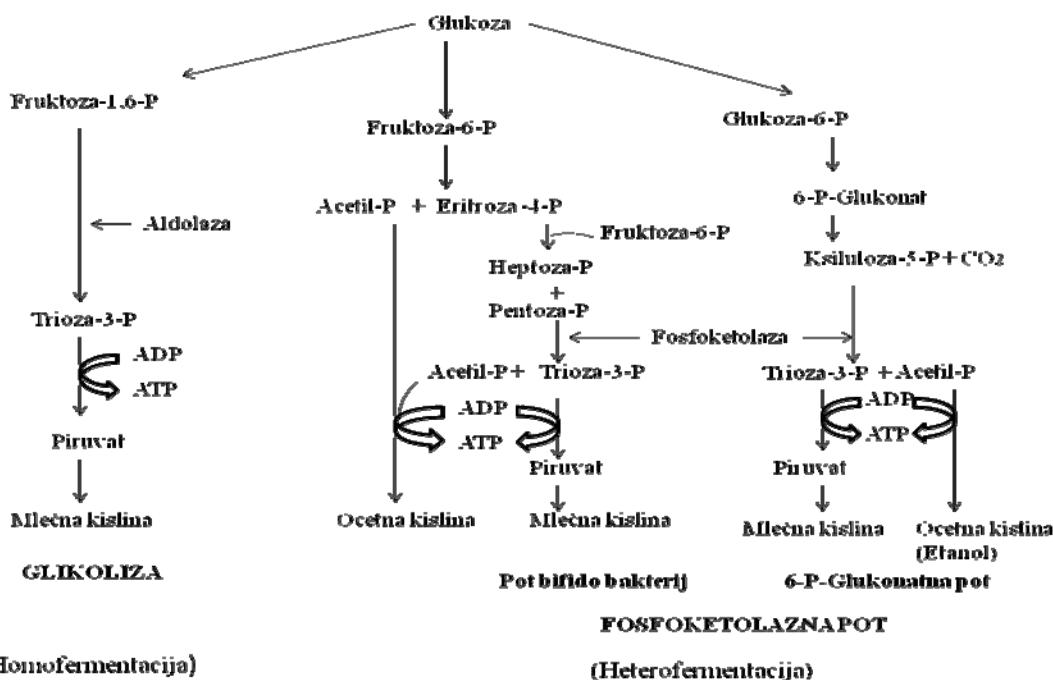
### 2.1 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE

Mlečnokislinske bakterije (MKB) že od nekdaj spremljajo človeka, saj predstavljajo pomembno komponento fermentiranih mlečnih, rastlinskih in živalskih proizvodov, ki so del prehrane ljudi že stoletja. MKB so bile odkrite v prehrani leta 1857 s Pasteurjem, leta 1873 je Lister izoliral prvo čisto bakterijsko kulturo *Bacterium lactis* iz mleka in leta 1890 sta istočasno Weigmann in Storch predstavila uporabo starterskih kultur za proizvodnjo sira in kislega mleka (Stiles in Holzapfel, 1997). S temi odkritji se je začela široka uporaba MKB in procesa fermentacije v industriji in danes so poleg kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*) industrijsko najpomembnejši mikroorganizmi.

MKB spadajo med gram pozitivne bakterije in so skupina filogenetsko sorodnih organizmov. Mednje uvrščamo robove *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* in *Weisela* (Vandamme in sod., 1996). Zaradi uporabe v prehrani in vloge probiotika v človeškem gastrointestinalnem (GI) traktu se velikokrat rod *Bifidobacterium* uvršča med MKB, vendar genetsko spada med Aktinomicete (Vandamme in sod., 1996). MKB so anaerobni ali mikroaerofilni koki, bacili ali paličice, ki ne sporulirajo in nimajo encima katalaze. Te bakterije imajo nizko vsebnost GC (34-53 %) v genomu in skupne metabolne in fiziološke značilnosti. V naravi jih pogosto najdemo na razpadajočem rastlinskem materialu, v prehrani, veliko pa jih je del normalne bakterijske flore v ustih, prebavilih in vagine pri sesalcih. Njihova glavna skupna značilnost je tvorba mlečne kislina, po kateri so dobile tudi ime. Mlečna kislina predstavlja končni produkt metabolizma ogljikovih hidratov. Bakterije, ki tvorijo mlečno kislino kot edini produkt metabolizma sladkorjev, spadajo med homofermentativne mlečnokislinske bakterije. Fermentacija homofermentativnih MKB poteka po Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) poti za glikolizo (slika 1). Med homofermentativne MKB spadajo robovi *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* in nekateri laktobacili. Heterofermentativne MKB tvorijo zraven mlečne kislina še ocetno kislino, ogljikov dioksid in etanol. Heterofermentativna mlečnokislinska fermentacija poteka po dveh poteh, pot bifido bakterij in 6-P-glukonatna pot (slika 1). Pri 6-P-glukonatni poti kot končni produkt metabolizma ogljikovih hidratov nastajajo mlečna kislina, ocetna kislina, ogljikov dioksid in etanol, pri poti bifido bakterij pa nastajata mlečna kislina in ocetna kislina (Kandler, 1983). Med heterofermentativne MKB spadajo robovi *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisela*, *Carnobacterium* in preostali iz rodu *Lactobacillus*. Pri homofermentativni fermentaciji je najpomembnejši encim aldolaza, pri obeh heterofermentativnih poteh pa encim fosfoketolaza. Med rastjo MKB se mlečna kislina akumulira v rastnem gojišču in s tem znižuje pH gojišča, kar se že dolgo izkorišča za konzerviranje hrane. Rast MKB se ustavi pri pH štiri do pet, na kisel pH pa so relativno odporne. Večina jih ima podobno temperaturno toleranco in njihova rast se ustavi pri temperaturi višji od 45 °C ali nižji od 10 °C. MKB so avksotrofne za številne aminokisline in druga pomembna hranila, zato tudi v naravi rastejo v okolju, ki je bogato s hranili.

Med MKB je veliko vrst, ki so sposobne ribosomalne sinteze antibakterijskih proteinov ali peptidov, ki jih imenujemo bakteriocini. Bakteriocini pomagajo bakteriji preživeti v okolju

z drugimi mikroorganizmi, saj so ti toksični za ostale kompetitivne bakterije, MKB pa so odporne nanje. Bakteriocini MKB so uporabni za konzerviranje živil. Bakteriocine razdelimo glede na njihovo primarno strukturo na tri razrede. Razred I sestavlja postranslacijsko modificirani peptidi, ki jih imenujemo lantibiotiki. Najpomembnejši in največkrat opisan lantibiotik je nizin, ki ga proizvaja *Lactococcus lactis* in ima pomembno vlogo pri nadzorovanem izražanju proteinov v MKB, kar je podrobneje opisano v točki 2.1.2.1.1. Nizin spada v skupino amfifilnih kationskih lantibiotikov (lantibiotiki tipa A), ki imajo sposobnost tvorbe por v membrani že v mikromolarnih koncentracijah. Med lantibiotike tipa A spadajo še epidermin, pep5 in drugi. Nizin in epidermin že v nanomolarnih koncentracijah tvorita pore preko vezave na lipid II, ki je peptidoglikanski prekursor pri tvorbi celične stene. Med lantibiotike tipa B spadajo mersacidin, aktagardin in cinamicin, ki preko vezave na lipid II ali druge lipidne molekule ovirajo nadaljnje encimske reakcije sinteze celične stene. Razred II nemodificiranih bakteriocinov predstavlja kationski ali hidrofobni 20-40 AK dolgi peptidi, ki povečajo prepustnost membrane in s tem uhajanje molekul. Razred III bakteriocinov je razdeljen na tri podrazrede: IIa, IIb in IIc. V podrazredu IIa je več kot 20 bakteriocinov, ki imajo zelo podobno primarno strukturo in delujejo proti bakterijam *Listeria*. Mednje spadajo pediocin PA-1, bavaricin MN, divercin V41, mesentericin Y105, leucocin A in enterocin P. V podrazred IIb se uvrščajo dvo-peptidni bakteriocini, katerih aktivnost je odvisna od delovanja dveh različnih peptidov. Znani dvo-peptidni bakteriocini so lactacin F, plantaricin EF in JK ter lactococcin G. Podrazred IIc so skupina različnih peptidov, ki ne spadajo v podrazreda IIa in IIb. Razred III bakteriocinov predstavlja veliki bakteriocini, katerih delovanje še ni dobro poznano (Héchard in Sahl, 2002).



Slika 1: Shema metabolizma ogljikovih hidratov homofermentativnih in heterofermentativnih MKB (Kandler, 1983)

MKB imajo status GRAS (splošno priznani kot varni), ki so ga dobole zaradi dolgotrajne varne uporabe. Zaradi njihovega koristnega delovanja v prebavnem traktu, se velikokrat

dodajajo v prehrani kot probiotiki. Probiotike definirata FAO in WHO kot žive organizme, ki vneseni v telo s hrano v zadostni količini ugodno vplivajo na zdravje gostitelja. Študije funkcijsko genomike probiotikov nam omogočajo spoznavanje prebavnih funkcij probiotikov, kot so regulacija privzema mineralov, sluzne pregrade, funkcije celičnega epitelija, metabolizma ksenobiotikov in povečanje prirojenega imunskega odgovora (Walker in sod., 2006). Obstaja že nekaj dokazov, da nekateri probiotiki povečajo prebavljljivost lakteze, drugi preprečujejo posledice operacije kronične vnetne črevesne bolezni, veliko je učinkovitih pri otroškem nalezljivem gastroenteritisu in z antibiotiki povzročeno diarejo, prav tako stimulirajo prirojeno in celično imunost ter zmanjšajo vsebnost neugodnih metabolitov (Walker in sod., 2006; Schrezenmeir in de Vrese, 2001). Pojavlja pa se tudi vedno več novih opisov in nekaj dokazov o številnih drugih možnostih uporabe probiotikov, kot je preprečevanje rakastih obolenj, zmanjševanje holesterola v krvi, zmanjšanje simptomov alergije in druge (Schrezenmeir in de Vrese, 2001).

MKB imajo glavno vlogo v procesu proizvodnje fermentirane hrane kot starter kulture. Starter kulture so definirane kot pripravek ene ali več kultur živih organizmov z encimskim potencialom, ki v pogojih proizvodnje odločilno vplivajo na oblikovanje lastnosti izdelka. V preteklosti je proizvodnja fermentirane hrane potekala s spontano fermentacijo, ki so jo povzročili organizmi, ki so bili naravno prisotni na surovem materialu. Ker pri spontani fermentaciji prihaja do velikih razlik v kakovosti končnih produktov zaradi različnih mešanic mikrobnih združb in številnih primesi v surovem materialu, se je razvila v industriji fermentirane hrane uporaba starter kultur, ki povečajo hitrost procesa fermentacije, povečajo varnost izdelkov, zagotovijo večjo kakovost in stalnost izdelka, omogočajo predvidevanje kvalitete končnega produkta, lahko pa tudi povečajo prehrambno vrednost izdelkov. Spontana fermentacija in inokulacija z delom prejšnje uspešne fermentacije se še vedno uporablja za proizvodnjo kislega zelja in testa, predvsem pa se uporablja v manj razvitih državah, kjer predstavlja poceni in zanesljiv način konzerviranja hrane (Leroy in De Vuyst, 2004). Uporabo različnih MKB Leroy in De Vuyst (2004) naštevata pri naslednjih tipih fermentiranih produktov:

- mlečni produkti, kot so jogurt, kefir, trdi siri brez lukenj in z manjšimi luknjami, italijanski in švicarski tip sirov, maslo in fermentirano probiotično mleko;
- fermentirani mesni izdelki, kamor spadajo fermentirane klobase iz Evrope in ZDA;
- fermentirani ribji produkti,
- fermentirana zelenjava, kot so kislo zelje, fermentirane olive, kisle kumare, sojina omaka in druga fermentirana zelenjava;
- fermentirano žito, kjer je omenjena proizvodnja kislega testa,
- in alkoholne pijače, kot sta vino in riževo vino.

Zaradi vedno večjih zahtev potrošnikov o varnosti in kakovosti prehrane, kjer se predvsem omenja uživanje hrane, ki ima ugoden vpliv na zdravje in zmanjševanje uporabe aditivov v konzerviranju hrane, se je začela razvijati proizvodnja tako imenovane funkcionalne hrane. S tem se je začela tudi uporaba funkcionalnih starter kultur v proizvodnji fermentirane hrane, kjer so najbolj uporabne MKB zaradi njihovega probiotičnega delovanja, proizvodnje bakteriocinov in drugih molekul za konzerviranje ter številnih produktov, ki lahko izboljšajo organoleptične, tehnične in prehrambne vrednosti hrane (Leroy in De Vuyst, 2004).

### 2.1.1 *Lactococcus lactis*

*Lactococcus lactis* predstavlja modelno mlečnokislinsko bakterijo in eno najpomembnejših MKB v komercialni uporabi, saj se največkrat uporablja v raziskavah in pri proizvodnji mlečnih produktov. *L. lactis* je navadno izoliran iz rastlinskega materiala (Sandine in sod., 1972), čeprav ga največkrat najdemo v mlečnih produktih. V mlečni industriji se uporablja večinoma za proizvodnjo sirov, sirotke in kisle smetane, prav tako pa sodeluje pri fermentaciji rastlinskega materiala, kot je proizvodnja kislih kumaric in kislega zelja.

Predstavniki vrste *L. lactis* so gram pozitivne, mezofilne, nemobilne in fakultativno anaerobne bakterije. Prav tako niso patogeni, imajo obliko kokov, ne tvorijo spor in imajo homofermentativen metabolizem, kjer tvorijo večinoma L (+) mlečno kislino iz glukoze (Stiles in Holzapfel, 1997; Courtney, 1999). Njihova optimalna rast je pri temperaturi 30 °C. Pri pH 4,5 ali nižje je rast ovirana. Za rast ne potrebujejo kisika, vendar ga tolerirajo. V naravi jih najdemo v surovem mleku in rastlinskem materialu, ki je bogato z viri ogljika in dušika. V laboratoriju se za rast in razmnoževanje bakterij *L. lactis* uporablja gojišče M17, ki je nedefinirano. Obstajajo tudi definirana gojišča, ki večinoma vsebujejo glukozo, vitamine, minerale in številne aminokisline, saj je *L. lactis* avksotrofen za kar nekaj aminokislin. Poznani sta podvrsti *L. lactis* subsp. *lactis* in *cremoris*. *L. lactis* subsp. *lactis* raste pri temperaturi 40 °C in 4 % NaCl ter proizvaja amonijak iz arginina, kar ni značilno za *L. lactis* subsp. *cremoris*. Znotraj podvrste *L. lactis* subsp. *lactis* je biovarianta *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *dyacetilactis*, ki ima zmožnost metaboliziranja citrata, kjer kot glavni produkt nastaja diacetil, ki ima vonj po maslu. Ostali produkti citratnega metabolizma so ogljikov dioksid, ocetna kislina, mlečna kislina, mravljična kislina, acetoin in butandiol. Proizvodnja diacetila je še posebej pomembna pri proizvodnji sirotke. *L. lactis* proizvaja tudi bakteriocine, kjer je najbolj znan in najpomembnejši že omenjeni lantibiotik nizin, ki ima antimikrobnou aktivnost proti kvarljivcem hrane kot so *Listeria*, *Staphylococcus* in *Clostridium*. Nizin je edini bakteriocin, ki se uporablja kot aditiv v prehrani širom sveta (Courtney, 1999).

Sevi *L. lactis* vsebujejo en krožni kromosom in ponavadi več kopij plazmidov. Število kopij plazmidov se razlikuje, prav tako velikost in razporeditev elementov glede na sev. Večina plazmidov nosi zapis za pomembne industrijske lastnosti laktokokov, kot so metabolizem laktoze, proteoliza, aktivnost citratne permeaze, rezistenza na bakteriofage, produkcija bakteriocinov in polisaharidov in imunost. Z izgubo teh plazmidov lahko sevi izgubijo glavne produkcijske in uporabne lastnosti, ki jih ljudje izkoriščamo (Courtney, 1999). Leta 2001 so določili nukleotidno zaporedje celotnega genoma *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403, ki izvira iz seva IL594 (Bolotin in sod., 2001). Naslednji določen genom je bil genom bakterije *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 leta 2005 (Makarova in sod., 2006), čez dve leti pa mu je sledil genom *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, ki izvira iz seva NCDO712 (Wegmann in sod., 2007). Seva SK11 in MG1363 sta bila pripravljena z odstranitvijo plazmidov iz izvornih sevov, kar pomeni, da nimata sposobnosti proizvodnje laktoze in številnih drugih pomembnih produktov. S študijami primerjalne genomike so določili številne razlike in podobnosti med posameznimi sevi že določenih genomov *L. lactis* in med posameznimi MKB (Makarova in sod., 2006; Wegmann in sod., 2007). Vsi trije omenjeni sevi z določenim nukleotidnim zaporedjem so predstavljali seve iz mlekarstva, zato so pred kratkim Siezen in sod. (2010)

določili celotno nukleotidno zaporedje seva *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, ki je bil izoliran iz kalčkov zelenega mungo fižola, kateri se večinoma uporablja v kitajski kuhinji. Genom seva KF147 je zelo podoben genomu IL1403, vendar sev KF147 kodira veliko značilnosti, ki jih je pridobil z adaptacijo na rast na rastlinskih materialih, kot je zmožnost razgradnje rastlinskih polimerov in celične stene (Siezen in sod., 2010). Z odkrivanjem novih lastnosti različnih sevov in spoznavanja razlik med njimi, bomo lahko optimizirali številne procese fermentacije ali določili povsem nove kombinacije definiranih ali nedefiniranih mešanih kultur za proizvodnjo želenih fermentacijskih produktov (Van Hylckama Vlieg in sod., 2006).

Ker ima *L. lactis* priznan status GRAS in ni naravni prebivalec gastrointestinalnega trakta, vendar preživi pot skozi črevesje, se pojavlja vedno več raziskav uporabe *L. lactis* za peroralno imunizacijo, dostavo cepiv in drugih terapevtskih učinkovin ter metabolnega inženiringa. O tem je več povedano v poglavju gensko spremenjene mlečnokislinske bakterije.

### 2.1.2 Gensko spremenjene mlečnokislinske bakterije

Genetsko so bile MKB prvi organizem, v katerem je bila predstavljena genetska izmenjava materiala, saj je leta 1928 Griffith transformiral *Pneumococcus* v miših *in vivo* (Renault, 2002). Z razvojem tehnike elektroporacije je transformacija postala možna za večino MKB (Luchansky in sod., 1988). Zaradi velikega zanimanja in uporabnosti MKB bakterij v industriji se je močno povečal razvoj spremicanja metabolizma in genskega zapisa MKB z namenom izboljšanja industrijskih sevov. V ta namen so se razvili številni sistemi za kloniranje, pomnoževanje in izražanje genov v MKB. Prav tako so uvedli nove plazmidne vektorje za kloniranje, kjer je za prehransko uporabo pomembno, da plazmidi ne vsebujejo označevalcev za antibiotično rezistenco ali katerih drugih škodljivih komponent. Pri tem je tudi pomembno, da genski elementi plazmidov in vključeni geni bakterij izhajajo iz iste vrste, saj je tako možna uporaba homolognega sistema za kloniranje. Veliko sistemov za izražanje in kloniranje je bilo razvita v modelni MKB *Lactococcus lactis*, vendar je bila uporaba pozneje razširjena tudi na druge industrijsko zanimive MKB (Vos, 1999; Renault, 2002).

Gensko spremenjene (GS) MKB so zanimive za uporabo v prehrambeni industriji, v zadnjem času pa vedno bolj za terapevtske namene.

#### 2.1.2.1 Sistemi za izražanje genov

Sistemi za izražanje genov so bili razviti z namenom kontroliranega izražanja že poznanih ali novih kombinacij homolognih in heterolognih genov v MKB. Med razvitimi sistemi za izražanje genov ločimo konstitutivne sisteme in nadzorovane sisteme (Vos, 1999).

Konstitutivni sistemi za izražanje genov temeljijo na delovanju promotorjev, ki so del hišnih genov, ki se nenehno izražajo v času bakterijske rasti in razvoja, kar pomeni da ti sistemi omogočajo kontinuirno pridobivanje želenega produkta. Dobra lastnost konstitutivnih sistemov je, da za izražanje ne potrebujejo nobenih zunanjih dejavnikov za indukcijo izražanja, vendar imajo slabost, da je nivo izražanja večinoma nižji kot pri nadzorovanih sistemih (Berlec in Štrukelj, 2009; Vos, 1999). Ker nadzorovanih sistemov

ni mogoče vedno uspešno voditi v industrijskem merilu, so se začeli razvijati močnejši konstitutivni promotorji. Jensen in Hammer (1998) sta z uporabo knjižnice sintetičnih promotorjev ugotovila, da se lahko moč prokarionskih konstitutivnih promotorjev uravnava s spreminjanjem vmesnih zaporedij med promotorskimi elementi.

Nadzorovani sistemi za izražanje so odvisni od zunanjega dražljaja, ki inducira delovanje promotorjev in s tem prepisovanje genov ter izražanje proteinov. Izražanje z nadzorovanimi sistemi se velikokrat uporablja v laboratorijskem merilu, saj je indukcija izražanja močna in tako lahko pridobimo večje količine produkta. V večjem industrijskem merilu velikokrat ni mogoče uspešno voditi nadzorovanega sistema izražanja, še posebej če je zahtevan konstanten nivo produkcije (Renault, 2002). Izražanje proteinov se lahko inducira s številnimi zunanjimi dražljaji, ki so lahko fizikalni ali kemični. Med nadzorovanimi sistemi za izražanje genov v MKB je poznanih veliko različnih sistemov, pomembnejši so naslednji, ki so opisani v nadaljevanju (Vos, 1999):

- sistem za izražanje genov, ki je nadzorovan z ogljikovimi hidrati,
- sistem za izražanje genov, ki je nadzorovan z bakteriofagom  $\Phi 31$ ,
- sistem za izražanje genov, ki je nadzorovan s spremembami temperature,
- sistem za izražanje genov, ki je nadzorovan s spremembami pH in
- z nizinom nadzorovan sistem za izražanje (NICE sistem).

Sistemi za izražanje genov, ki so nadzorovani z ogljikovimi hidrati, so se razvili zaradi številnih študij uporabe ogljikovih hidratov MKB in njihove pomembnosti v industrijski fermentaciji. Večina genov, ki sodelujejo pri transportu in katabolizmu sladkorjev je organiziranih v operone, ki se močno izražajo in so kontrolirani s specifičnimi regulatorji na začetku transkripcije. S sladkorjem nadzorovani sistemi se razlikujejo med sabo po učinkovitosti, lokaciji genov in vrsti sladkorja, ki sproži izražanje. Najboljše je opisan sistem z *lac* operonom iz *L. lactis*, ki ima močan *lacA* promotor, kateri je kontroliran z avtoregulacijo LacR represorja. Indukcija izražanja se sproži z dodatkom lakteze, ki preko vmesne spojine inaktivira LacP represor.

Sistem za izražanje genov, ki je nadzorovan z bakteriofagom  $\Phi 31$ , temelji na delovanju promotorja laktokoknega bakteriofaga  $\Phi 31$ , ki ga inducira okužba z  $\Phi 31$ . Po okužbi pride do lize celic proizvodnega seva in s tem se sprosti produkt. Zaradi visoke inducibilnosti in hitre lize celic, je ta sistem poimenovan tudi eksplozivno izražanje.

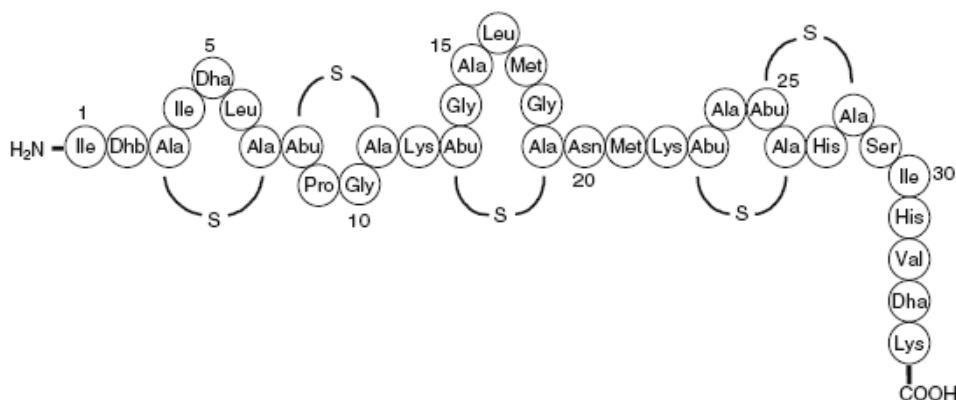
Pri sistemu za izražanje genov, ki je nadzorovan s spremembami temperature, sodelujeta  $P_1$  in  $P_2$  promotor, ki kontrolirata ekspresijo *rro* gena. Pri spremembah temperature na  $40^\circ\text{C}$  postane termolabilni represor Rro12 neaktivni, kar omogoči aktivacijo promotorja  $P_2$  in indukcijo izražanja genov. Sistem ni primeren za industrijsko uporabo, saj ga je v velikem merilu težko vzpostaviti, zraven pa vodi v indukcijo genov topotnega šoka.

Sistem za izražanje genov, ki je nadzorovan s spremembami pH, deluje na osnovi *gad* promotorja, ki je lahko inducirani s kloridom, glutamatom ali kislino. Promotor nadzoruje izražanje *gadCB* operona preko GadR proteina.

#### 2.1.2.1.1 NICE sistem

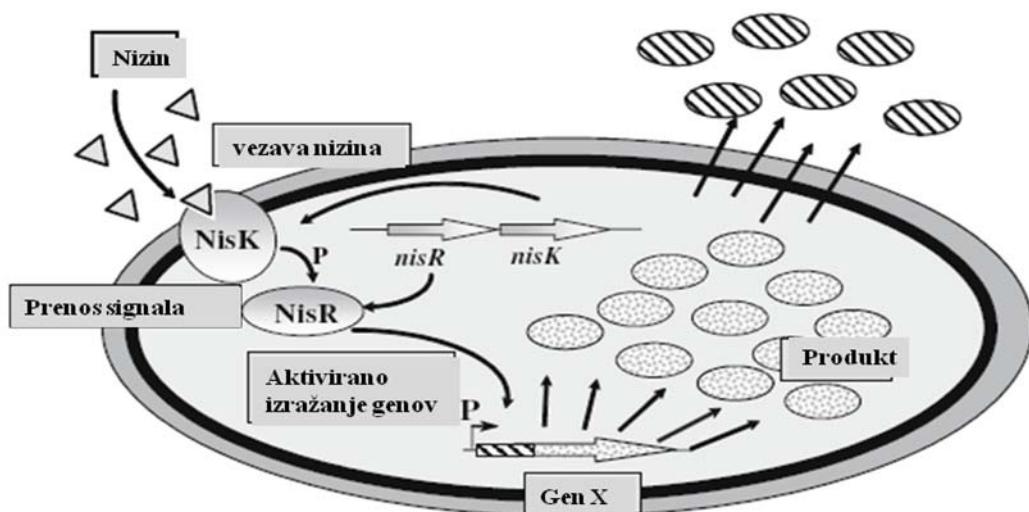
Z nizinom nadzorovani sistem za izražanje je najpogosteje in najpodrobneje opisani sistem za nadzorovan izražanje genov. NICE sistem je zanimiv zaradi njegove široke uporabe v laktokokih in drugih gram pozitivnih bakterijah, kjer se uporablja za prekomerno izražanje homolognih in heterolognih genov, za funkcionalne študije in proizvodnjo proteinov, metabolni inženiring, izražanje prokariontskih in evkariontskih membranskih proteinov, izločanje proteinov, izražanje genov s toksičnimi produkti, analizo pomembnih genov in za uporabo v širokem merilu (Mierau in Kleerebezem, 2005).

Nizin je 34 aminokislin dolg antimikrobn peptid, ki je sestavljen iz mnogih nenavadnih aminokislin in petih cikličnih struktur (slika 2). Nizin nastane tako, da se najprej na ribosому sintetizira nizinski prekurzor, ki je nato podvržen številnim post-translacijskim modifikacijam, kot je dehidracija serinskih in treoninskih aminokislinskih ostankov in tvorba tioesterskih mostičkov, ki jih imenujemo lantionini.



Slika 2: Shema končne molekule nizina. Dhb-dehidrobutirat, Dha-dehidroalanin, Ala-S-Ala-lantionin, Abu-S-Ala-β-metil lantionin (Mierau in Kleerebezem, 2005: 706).

Biosinteza nizina kodira skupina enajstih genov *nisABTCIPRKFEG*, od katerih prvi gen *nisA* kodira prekurzor za sintezo nizina. Geni *nisB*, *nisC*, *nisP* in *nisT* uravnavajo sintezo peptidov, ki so vključeni v modifikacijo, translokacijo in procesiranje nizina do končne oblike, geni *nisI*, *nisF*, *nisE* in *nisG* pa so sodelujejo pri zagotavljanju neodzivnosti gostitelja na nizin. V regulaciji izražanja skupine nizinskih genov sta vključena gena *nisR* in *nisK*, ki spadata v družino bakterijskih dvo-komponentnih regulatornih sistemov. NisK je histidinska protein-kinaza, ki je zasidrana v membrani in deluje kot receptor za vezavo zrelega nizina. Ob vezavi nizina na NisK se sproži proces avtofosforilacije NisK in fosfat se prenese na regulator odziva *nisR*. Aktiviran *nisR* sproži aktivacijo promotorjev  $P_{nisA}$  in  $P_{nisF}$ , ki sprožita prepisovanje genov za sintezo nizina. V primeru, da za promotorjem  $P_{nisA}$  vstavimo kateri drugi gen (gen X), se bo sprožilo izražanje gena X in nastajal bo želen produkt (slika 3). Izražanje želenega gena se lahko inducira že z dodatkom subinhibitornih koncentracij nizina (0,1-5 ng/mL) v gojišče. V skupini nizinskih genov je še tretji promotor  $P_{nisR}$ , ki konstitutivno usmerja izražanje genov *nisK* in *nisR* ter nanj ne vplivajo zunanji dejavniki (Kuipers in sod., 1995; Mierau in Kleerebezem, 2005).



Slika 3: Z nizinom kontrolirano izražanje genov (Mierau in Kleerebezem, 2005: 708)

Za uporabo z nizinom nadzorovanega sistema za izražanje genov so bili razviti številni gostiteljski sevi in plazmidi. Za pripravo gostiteljskega seva sta bila iz skupine nizinskih genov izolirana gena *nisR* in *nisK* in vstavljeni v *pepN* gen na kromosomu *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363, ki ne vsebuje skupine nizinskih genov. S tem so ustvarili sev NZ9000, ki je največkrat uporabljen gostiteljski sev za NICE sistem. Med pogosteje uporabljene gostiteljske seve spadajo še NZ9700, ki se velikokrat uporablja kot sev za proizvodnjo nizina, NZ9800, ki je gostiteljski sev za NICE sistem, NZ3900, ki je gostiteljski sev za NICE sistem za uporabo v prehrani, in NZ9000 htrA, ki je gostiteljski sev za izločanje proteinov. Plazmidi so bili pripravljeni za translacijsko in transkripcijsko fuzijo in za znotrajcelično proizvodnjo ali izločanje proteinov. Največkrat uporabljen plazmid za translacijsko fuzijo je pNZ8048, iz katerega sta se pozneje razvila pNZ8148 in pNZ8150. Pri plazmidu pNZ8148 lahko s PCR pomnožen gen direktno kloniramo pod nizinski promotor preko NcoI restrikcijskega mesta, pri pNZ8150 pa preko ScaI restrikcijskega mesta. Plazmid pNZ8021 se uporablja za translacijsko fuzijo, plazmid pNZ8110 pa za izločanje proteinov, preko signalne sekvence Usp45 za izločanje proteinov (Kuipers in sod., 1998; Mierau in Kleerebezem, 2005; De Ruyter in sod., 1996).

Zaradi široke in enostavne uporabe je bil NICE sistem za izražanje genov prenesen tudi na druge gram pozitivne bakterije iz rodov *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* in *Leuconostoc*. Za optimizacijo novih sistemov je predvsem pomembna lokacija *nisRK* genov in količina nizina za indukcijo. *NisRK* gena sta lahko locirana na istem plazmidu kot promotor *nisA* ali na drugem plazmidu ali pa na kromosому (Mierau in Kleerebezem, 2005).

### 2.1.3 Uporaba GS MKB v prehrani

Gensko spremenjanje MKB v prehrani lahko imenujemo tudi metabolni inženiring MKB, saj gre večinoma za spremenjanje proizvodnje primarnih in sekundarnih metabolitov z namenom izboljšanja lastnosti hrane. Razvoj metabolnega inženiringa MKB lahko

razdelimo v dve večji veji, prva je razvoj starter kultur za fermentacijo hrane, druga pa razvoj celičnih tovarn za proizvodnjo kemikalij, vitaminov in sekundarnih metabolitov (Berlec in Štrukelj, 2009).

Na nivoju DNK spadajo med genetsko spremenjene mikroorganizme (GSO) tisti sevi, ki so bili pridobljeni s kontroliranimi genetskimi spremembami, kamor se uvrščajo enojne substitucije baznih parov, mutacije, vstavljanje genov v kromosome in izrez genov iz kromosomov. V primeru, da so sevi pridobljeni z naravnimi procesi samo-kloniranja, transdukcije ali konjugacije, takšni sevi niso upoštevani kot GSO. Za izboljšanje fermentirane hrane se v metabolnem inženiringu MKB pogosto uporablajo metode direktne mutageneze (Sybesma in sod., 2006).

Gensko spreminjanje MKB v prehrani se uporablja za izboljšanje lastnosti hrane, kot so vonj in okus, struktura, mineralna vrednost in rok trajanja. Primeri uporabe GS MKB za izboljšanje lastnosti hrane so opisani v nadaljevanju (Berlec in Štrukelj, 2009; Renault, 2002; Sybesma in sod., 2006).

Za izboljšanje stabilnosti vonja in okusa sirotke je bil razvit sev *L. lactis* z neaktiviranim genom *aldB*, ki kodira gen za encim  $\alpha$ -acetolaktat karboksilaza. Ta encim je odgovoren za pretvorbo  $\alpha$ -acetolaktata v acetoin. V primeru, da je encim neaktivен se poveča količina  $\alpha$ -acetolaktata, ki se nato v procesu kemijske oksidacije pretvorí v diacetil, ki daje sirotki vonj in okus.

Za spreminjanje lastnosti hrane so tudi uporabne GS MKB, ki imajo povečano proteolitično aktivnost. Za povečanje proteolitične aktivnosti sevov so vstavili v *L. lactis* gene, ki kodirajo peptidaze PepN, PepX, PepC in PepI iz visoko proteolitičnega *L. helveticus* ali PepI, PepL, PepW in PepG iz *L. delbrueckii*, in jih prekomerno izrazili. Takšni sevi so uporabni pri zorenju sirov, saj peptidolitični encimi skrajšajo procese zorenja sirov in omogočajo proizvodnjo sirov z izboljšanimi lastnostmi, kot je na primer sir z nizko vsebnostjo maščob. Proses zorenja sira izboljša tudi razgradnja aminokislin, ki je pospešena s povečano proizvodnjo  $\alpha$ -ketoglutarata. Na povečano proizvodnjo  $\alpha$ -ketoglutarata pa vpliva prekomerno izražanje gena *gdh*, ki kodira encim glutamat dehidrogenazo in je iz bakterije *Peptoniphilus asaccharolyticus*.

Pomembna lastnost hrane je njena struktura. Z namenom izboljšanja strukture hrane so vnesli v *L. lactis* celotno skupino genov, ki kodirajo proizvodnjo eksopolisaharidov, iz drugih MKB. Izražanje eksopolisaharidov je vplivalo na viskoznost in strukturo fermentiranih produktov.

Kot primer izboljšanja mineralnih lastnosti hrane se največkrat omenja prekomerno izražanje riboflavina (vitamin B2) ali folata v GS MKB *L. lactis*. Z vnosom celotne skupine genov, ki kodirajo sintezo riboflavina ali folata, pod močan promotor, so dosegli prekomerno izražanje genov in koncentracijo produkta zvišali na 8 mg/L.

Pri fermentaciji hrane pride velikokrat do okužbe z bakteriofagi ali drugimi škodljivi bakterijami, kar povzroči lizo starter kultur in ustavitev procesa fermentacije. Proti okužbi z bakteriofagi so bili razviti sevi odporni na fage, ki delujejo z različnimi procesi zaviranja

razvoja bakteriofagov. Proti okužbi mlečnih starter kultur z drugimi gram pozitivnimi bakterijami so se razvile starter kulture, ki prekomerno izražajo prehransko uporaben lantibiotik, kot je nizin.

Možnih in znanih je še veliko primerov izkoriščanja GS MKB za uporabo v prehrani, vendar zaradi splošnega negativnega javnega mnenja o uporabi GSO v prehrani ostajajo taki primeri le predmet raziskav in so še daleč od industrijske uporabe. Javno mnenje o uporabi GS MKB za terapevtske namene pa je veliko bolj pozitivno, saj smo ljudje veliko bolj sprejemljivi do novosti, ki so povezane z našim zdravjem in preprečevanjem bolezni. Primeri uporabe GS MKB v terapevtske namene so opisani v naslednjem poglavju.

#### **2.1.4 Uporaba GS MKB za terapevtske namene**

GS MKB za terapevtske namene so uporabne kot dostavnici sistemi biološko aktivnih makromolekul v organizem. Njihov namen je dostava biološko aktivnih molekul v organizem preko sluznic, kjer je največkrat tarča sluznica prebavil, zanimiva pa je še nosna in vaginalna sluznica. MKB so primerne kot dostavnici sistemi zaradi preživetja pri prehodu skozi prebavni trakt in njihove splošno znane dolgotrajne varne uporabe. Ker preživijo pot skozi prebavni trakt, so dobri kandidati za peroralno dostavo biološko aktivnih molekul. Nekateri laktobacili so naravni prebivalci prebavnega trakta in imajo sposobnost kolonizacije prebavnih sluznic, kar laktokoki niso zmožni. Učinkovitost dostave bioloških molekul je odvisna od uporabe ustreznegata seva, nivoja izražanja biološke molekule in od načina izražanja, kjer se lahko produkt izrazi znotraj celice, se izloči iz celice ali pa se veže na površino celice (Berlec in Štrukelj, 2009). Dostavo bioloških molekul z GS MKB lahko razdelimo na dostavo cepiv in dostavo proteinov s fiziološko vlogo (Berlec in Štrukelj, 2008).

##### **2.1.4.1 Dostava cepiv (vakcinacija)**

Zaradi številnih nevšečnosti, ki jih povzroča parenteralna dostava cepiv, je danes zaželena peroralna dostava cepiv, ki ima veliko prednosti v primerjavi s parenteralno. Peroralna dostava cepiv je relativno poceni, lahko se razširi v večjem merilu, je primerna za vse ljudi, predvsem pa za manj razvite revne države, kjer ni dovolj usposobljenega osebja za parenteralno dostavo in kjer je tudi največ okužb ljudi z nevarnimi organizmi. Peroralno vakcinacijo podpira tudi dejstvo, da se prva obrabna linija pred patogeni nahaja v človeškem črevesju, ki predstavlja tudi največji imunološki organ. Dokazano je, da se več kot 60 % vseh dnevno proizvedenih protiteles izloči v prebavni trakt. Peroralna imunizacija na začetku povzroči lokalni imunski odgovor, kar pomeni, da se sproži izločanje IgA protiteles iz epitelija v lumen prebavnega trakta, hkrati pa se lahko sproži tudi sistemski imunski odziv in s tem proizvodnja IgG protiteles. Oba imunska odziva učinkujeta na uspešno uničenje in odstranitev patogenov iz telesa (Berlec in Štrukelj, 2008; Pouwels in sod., 1998).

MKB so ugoden kandidat za peroralno dostavo cepiv, saj imajo status GRAS, lahko povečajo imunski odziv, kar lahko zmanjša število ponovitev imunizacij, in nekateri laktobacili lahko kolonizirajo dele sluznice, kar lahko inducira lokalni imunski odziv. Njihova prednost je še, da nekaj sevov laktobacilov velja za probiotične kulture, kar pomeni, da imajo ugoden vpliv na zdravje (Pouwels in sod., 1998).

Dostava cepiv z MKB je možna tako s kolonizirajočimi kot nekolonizirajočimi bakterijami. Če želimo kontinuirano sintezo antigena na površini sluznice prebavnega trakta, moramo za dostavo cepiva uporabiti kolonizirajoče laktobacile. Če pa uporabimo za dostavo cepiv laktokoke, ki ne kolonizirajo prebavnega trakta, bomo z njimi dosegli visok nivo izražanja antigena, vendar le za nek določen čas, saj na primer laktokoki potujejo skozi črevesje človeka tri dni. Kateri sistem predstavitve antigenov je boljši za doseganje višje imunogenosti antigena za posamezen primer ne moremo vnaprej napovedati. Za oba načina predstavitve antigenov je bilo ugotovljeno, da delujeta dobro pri sistemski in nosni poti. Pri izbiri kolonizirajočih sevov za dostavo cepiv v človeka moramo biti posebej pozorni na njihovo varnost in metabolne ter fiziološke značilnosti (Mercenier in Granette, 2000). Zaradi možnosti prilagoditve na antigen v primeru kolonizirajočih bakterij je *L. lactis* najugodnejši in najpogostejsi kandidat za peroralno dostavo cepiva, čeprav se veliko raziskav opravlja na učinkovitejših laktobacilih (Berlec in Štrukelj, 2008).

V raziskavah MKB kot nosilcev za cepiva so bile kot modelne bakterije uporabljenе *Streptococcus gordonii*, ki je kolonizirajoča bakterija, *Lactobacillus ssp.*, kjer so ene vrste kolonizirajoče, druge pa ne, in *Lactococcus lactis*, ki je nekolonizirajoča bakterija. Večina vseh raziskav je bila opravljena na laboratorijskih miših. Predstavitev različnih antigenov z omenjenimi MKB je lahko potekala skozi oralne poti, nosne ali vaginalne. Antigeni so lahko usmerjeni proti različnim bakterijskim in virusnim patogenom ter tudi proti praživalim (*Plasmodium falciparum*). Največ študij je bilo opravljenih na modelnem antigenu fragmentu C tetanus toksina, ki je 47 kDa velik polipeptid z močno imunogenostjo. V študijah so dokazali, da rekombinante bakterije *L. lactis* in *Lb. plantarium*, ki izražajo fragment C tetanus toksina in so vstavljeni v miši preko oralnih ali nosnih poti, povzročijo izločanje IgA protiteles in IgG protiteles ter s tem zaščitijo miši pred smrtno zaradi okužbe s tetanus toksinom. Učinkovitost imunskega odziva na tetanus toksin lahko povečamo s hkratnim izražanjem interleukinov (IL), kot sta IL-2 in IL-6. Rekombinanta bakterija *S. gordonii*, v katero je bil vstavljen gen za površinski protein M6 iz *S. pyogenes*, kolonizira oralne in vaginalne poti in tako lahko inducira lokalni in sistemski odziv proti heterolognim antigenom, ki se zraven M6 izrazijo na površini bakterije. Omenjena bakterija je zanimiva za uporabo vaginalne imunizacije proti spolno prenosljivim boleznim, kot so HIV, okužba s papiloma virusom in kandidoze. Primeri uporabe GS MKB za dostavo cepiv so še zaščita pred rotavirusi, pred okužbo s kolera toksinom B, pred brucelozami, pred kariesom, pred okužbami s *Streptococcus pneumoniae*, pred malarijo, pred koronavirusom, pred enterotoksigeno *E. coli* in drugimi boleznimi (Berlec in Štrukelj, 2008; Mercenier in Granette, 2000; Renault, 2002).

#### 2.1.4.2 Dostava proteinov s fiziološko vlogo

Z dostavo proteinov s fiziološko vlogo v MKB lahko ciljamo na različne bolezni prebavnega trakta, metabolnih okvar ali alergijskih reakcij (Berlec in Štrukelj, 2009; Berlec in Štrukelj, 2008).

Najpogostejsa tarča dostave proteinov v prebavni trakt je kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB), kamor se uvrščata Crohnova bolezen in ulcerozni kolitis. Za obe bolezni je značilno kronično vnetje črevesne sluznice, le da je pri Cronhovi bolezni lahko prizadeta sluznica celotnega prebavnega trakta, pri ulceroznem kolitisu pa le sluznica debelega

črevesja. Kljub številnim raziskavam še vedno ni poznan vzrok KVČB, vendar predvidevajo, da je rezultat medsebojnega vpliva genetskih in okoljskih dejavnikov (Berlec in Štrukelj, 2009). Z študijami o delovanju citokinov, so ugotovili, da ima IL-10 pomembno funkcijo kot imunoregulator v prebavnem traktu, kar pomeni da ima zmožnost spremenjanja imunskega odziva in s tem posledično lahko zmanjša vnetni odziv, ki nastane zaradi KVČB. V ta namen se je razvil sistem za dostavo IL-10, ki so ga prekomerno izražale in izločale bakterije *L. lactis*. Sistem je bil uspešno testiran na miših modelih kolitisa (Steidler in sod., 2000). Za uporabo pri ljudeh je bil nato razvit sev *L. lactis*, ki so mu zamenjali gen za timidilat sintazo (*thyA*) s sintetičnim človeškim genom za IL-10. GS bakterije *L. lactis* brez gena *thyA* niso sposobne preživetja brez timina in timidina, kar pomeni, da ne preživijo v naravi, preživijo pa v prebavnem traktu (Steidler in sod., 2003). Uporabnost gensko spremenjenih *L. lactis*, ki so izražale človeški IL-10 in niso preživele v naravi, so preverili v fazi I klinične študije, ki je potekala na desetih ljudeh z Crohnovo boleznjijo. Zdravljenje pacientov je bilo uspešno, saj so zasledili zmanjšanje simptomov bolezni in le nekaj manjših stranskih učinkov (Braat in sod., 2006). Ta študija predstavlja prvi primer klinične študije z uporabo GS MKB kot živih dostavnih sistemov. Drugi primer GS MKB za lajšanje vnetja pri KVČB je *L. lactis*, ki je sposoben vezave TNF $\alpha$ , ki je vnetni citokin prisoten pri KVČB (Ravnikar in sod., sprejeto v tisk)

GS MKB kot dostavni sistemi proteinov s fiziološko vlogo bi se lahko uporablja tudi za zdravljenje alergijskih imunskega odzivov. Pri alergični reakciji imunski sistem začne proizvajati imunoglobuline IgE, ki se vežejo na mastocite in bazofilce preko receptorja. Nato te celice sprostijo citokine in histamin, ki povzročijo vnetje in so odgovorni za klinične znake alergijske reakcije (Berlec in Štrukelj, 2009). Primer uporabe MKB za zmanjšanje alergijske reakcije je rekombinantna bakterija *Laktobacillus johnsonii*, ki na površini izraža fragment variabilne regije protitelesa (scFv) proti IgE, ali IgE mimotop, ki stimulira tvorbo IgG proti IgE. Ugotovili so, da imunizacija miši z rekombinatnim *Lb. johnsonii* skozi kožo ali nos, inducira sistemski IgG odgovor proti človeškim IgE protitelesom (Scheppeler in sod., 2005).

Zanimiv je tudi potencial GS MKB za popravljanje metabolnih napak, med katerimi se velikokrat omenja laktozna intoleranca, saj bi lahko z bakterijskim encimom laktazo nadomeščali okvarjeni človeški encim. Drug primer dostave encimov za popravljanje metabolnih napak, je dostava encima lipaze z *L. lactis* pri pankreasni insuficienci, ki se pojavi, če trebušna slinavka ne proizvaja dovolj prebavnih encimov (Renault, 2002).

## 2.2 HEPATITIS A

Hepatitis A je akutna infekcijska bolezen, ki jo povzroča hepatitis A virus (HAV). HAV se prenosa preko fekalno-oralnih poti, največkrat preko kontaminirane vode in neposrednega prenosa med osebami, lahko pa tudi preko kontaminirane hrane, neprekuhane hrane in uporabe drog z injekcijskim ali drugačnim vnosom. Virus je prisoten v celotnem svetu in povzroča približno 1,5 milijona kliničnih primerov hepatitis A na leto. Pogosteje se pojavlja v deželah s slabimi sanitarnimi in higieniskimi pogoji, kot so Afrika, Azija, centralna in južna Amerika. V teh deželah se največ infekcij zgodi že v zgodnjem otroštvu, vendar je pri otrocih pod šest let infekcija običajno asimptomatska, razvije se le 10 % primerov zlatenice. Okužba pri starejših otrocih in odraslih je navadno simptomatska, kjer

se razvijejo številni simptomi in v 70 % primerov tudi zlatenica. Na področju z visokim nivojem okužbe s HAV navadno ne pride do simptomatske okužbe, saj se večina ljudi že v otroštvu sreča z boleznijo in razvije odpornost na njo. Na področjih z nizko endemičnostjo za hepatitis A, kot so nordijske države, Evropa, ZDA, Avstralija in Japonska, se okužba s hepatitisom A pojavlja zlasti pri najstnikih in odraslih rizičnih skupin, kamor spadajo homoseksualni moški in uporabniki drog, in osebah, ki veliko potujejo na območja z visoko in srednjo endemičnostjo. Če pride do večje okužbe ljudi na nekem območju, lahko bolezen povzroči velike ekonomske in socialne izgube zaradi daljše odsotnosti ljudi iz služb, šol in vsakodnevnega življenja (WHO, 2000).

Klinična okužba s HAV povzroča različne simptome, kjer v končni fazi lahko pride do zlatenice, akutne odpovedi jeter in morebitne smrti. Inkubacijska doba po okužbi s HAV traja 15 do 45 dni, ki ji nato sledi pojav prvih resnejših simptomov, kot so vročina, slabo počutje, anoreksijska slabost, želodčne bolečine, utrujenost in kašljanje. Po enem ali dveh tednih razvoja resnejših simptomov lahko pride do nastopa zlatenice in pojava temnega urina. Pojav zlatenice in umrljivost pacientov je večja pri starejših ljudeh. Večina bolnikov bolezen preboli v nekaj tednih ali največ dveh mesecih. Okužba s HAV nima kronične faze in ne povzroča kroničnega hepatitisa (Hadem in Manns, 2007).

Diagnoza za hepatitis A se lahko postavi v času akutne bolezni z dokazovanjem prisotnosti protiteles IgM proti HAV. Raven IgM protiteles proti HAV doseže vrh med akutno in začetno fazo okrevanja. Pri 75 % pacientov po šestih mesecih nastopa okužbe ni več možno zaznati IgM protiteles proti HAV. Po okužbi s HAV so v odgovor s protitelesi vključena tudi protitelesa IgA in IgG proti HAV. IgG protitelesa proti HAV dosežejo vrh med fazo okrevanja in ostanek teh protiteles lahko detektiramo v serumu še po mnogih letih od okužbe. Za merjenje IgM in IgG protiteles proti HAV obstaja veliko testov, med katerimi je najuporabnejši test imunoanalize s kompetitivno inhibicijo (HAVAB) in bolj občutljiv radioimunofokusirajoči inhibicijski test (RIFIT). Imunološki odgovor na okužbo s HAV vključuje tako humorali kot celični imunski odgovor, čeprav o zadnjem v primerjavi z hepatitism B in C ni veliko znanega. Možen mehanizem celičnega odgovora na okužbo s HAV bi naj vseboval prenos citotoksičnih T celic in celic ubijalk iz periferije v jetra, aktivacijo CD8+ citotoksičnih T limfocitov (CTL) preko MHC I kompleksa okuženih jetrnih celic s HAV in posledično izločanje interferona gama (INF- $\gamma$ ), ki dodatno stimulira T celični imunski odziv in bi naj imel direktne protivirusne lastnosti (Hadem in Manns, 2007).

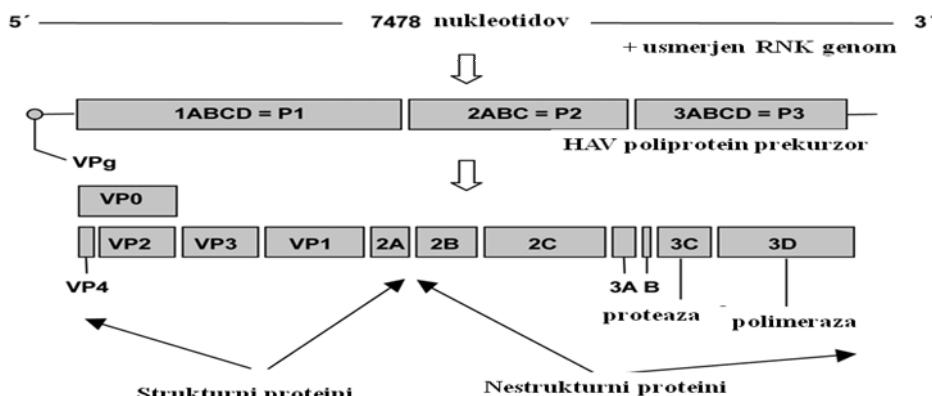
Proti hepatitisu A ne obstajajo specifična protivirusna zdravila, zato se pred okužbo lahko zaščitimo le preventivno z dobro osebno higieno, še posebej z umivanjem rok in pitjem čiste vode. Najučinkovitejša preventiva je cepljenje proti HAV, ki je zelo priporočena za ljudi, ki potujejo na območja z visoko endemičnostjo hepatitisa A. Prvo cepivo proti HAV so leta 1992 predstavili v podjetju SmithKline Beecham z imenom Havrix®. Cepivo je bilo licencirano v Ameriki leta 1995. Drugo cepivo proti HAV je bilo VAQTA® od podjetja Merck in je bilo licencirano leta 1996. Obe cepivi vsebujeta s formalinom inaktivirane delce virusa, ki so jih proizvedli v okuženih človeških diploidnih fibroblastih in so bili nato adsorbirani na aluminijev hidroksid. Obe cepivi imata podobno imunogenost in sta dobro tolerirani, razlika je v tem, da je cepivo VAQTA pripravljeno brez sredstva za konzerviranje, Havrix pa vsebuje 2-fenoksietanol. Cepljenje z omenjenima cepivoma je

predvideno v enem odmerku, ki mu po 6-12 mesecih sledi ojačevalni odmerek, ki poveča nivo zaščitnih protiteles in s tem podaljša imunost na dobo 15-20 let. Leta 2001 je FDA licencirala kombinirano cepivo za hepatitis A in B imenovano Twinrix® za uporabo pri ljudeh starejših od 18 let. Cepljenje s tem cepivom poteka v treh dozah in sicer prvi sledi druga po enem mesecu in tretja po šestih mesecih. Učinkovitost in varnost cepiva Twinrix je primerljiva s cepivoma Havrix in VAQTA. Razvilo se je tudi kandidatno cepivo z živim oslabljenim virusom HAV, ki je lahko rastel v celični kulturi. Uporaba se je razširila le na Kitajskem (Hadem in Manns, 2007).

Zaradi parenteralne aplikacije omenjenih cepiv se pojavlja vedno več zanimanja za razvoj peroralnega cepiva proti hepatitisu A ali za dostavo cepiva preko drugih sluznic, kjer je možen še intranasalni (skozi nos) in intrarektalni vnos (skozi danko). Mitchell in Galun (2003) sta z uporabo cepiva Havrix dokazala, da lahko že relativno majhne doze HAV antigaena apliciranega intrarektalno v miši, inducirajo močnejši sistemski in lokalni imunski odziv proti HAV v primerjavi s paranternalno dostavo cepiva. Ker cepivo Havrix zaradi aluminijevega hidroksida ni primerno za sluznično imunizacijo, so Mitchell in sod. (2006) razvili nov sistem za sluznično imunizacijo proti HAV, kjer so kot molekulo za stimuliranje imunskega odziva (adjuvant) dodali sintetične oligonukleotide, ki so vsebovali nemetilirane citozine-fosfat-gvanine (CpGs) in jih v lipidne nosilce. Lipidni nosilci so bili sestavljeni iz ceramid karbamoil spermina (CCS) v kombinaciji s holesterolom. V raziskavi so dokazali, da CCS/holesterol nosilec sam ali v kombinaciji s sintetičnimi oligonukleotidi poveča imunski odgovor Balb/c miši na HAV, ki je bil dostavljen intranasalno ali intrarektalno (Mitchell in sod., 2006).

### 2.2.1 Opis virusa

Virus hepatitisa A spada v družino virusov Picornaviridae in predstavlja edino vrsto rodu *Hepatovirus*. HAV ima obliko ikozaedra, nima lipidne ovojnico, v premeru meri 27 nm in vsebuje 7,5 kb dolg genom v obliki pozitivno usmerjene enovijačne ribonukleinske kisline (RNK). Genom HAV je sestavljen iz 5' netranslacijskega dela v dolžini 734 baz, sledi mu dolg odprt bralni okvir, ki kodira poliprotein z 2227 aminokislinami (AK), in na 3' koncu se nahaja nekodirajoča regija, ki se konča s polimerom adenilne kisline v dolžini 40-80 nukleotidov. Na 5' koncu ima virion HAV kovalentno pripet VPg protein, ki je velik 2,5 kDa (slika 4) (Hadem in Manns, 2007; Previsani in Lavanchy, 2000).



Slika 4: Sestava genoma hepatitisa A, HAV poliprotein in njegovi cepitveni produkti (Hadem in Manns, 2007: 164)

Poliprotein hepatitisa A ima molekulsko maso 250 kDa. V življenjskem ciklusu virusa se poliprotein proteolitično razcepi na strukturne in nestrukturne proteine. Za proteolitično cepitev je odgovorna virusna proteaza 3C. Iz domene P1 ali P1-2A nastanejo po postranslacijskem proteolitičnem razcepu kapsidni proteini VP0, VP3, VP1 ali VP1-2A. Nestrukturni proteini so iz domene P2 in P3. Kapsida HAV vsebuje 60 kopij VP1 (30-33 kDa), VP2 (24-30 kDa) in VP3 (21-28 kDa) proteinov. Genomska podvojitev virusa se pojavi izključno v citoplazmi okuženih hepatocit in v mehanizem podvojitve je vključena od RNK odvisna RNK polimeraza (Hadem in Manns, 2007; Previsani in Lavanchy, 2000).

S številnimi študijami so raziskovali antigensko strukturo intaktnega virona hepatitisa A. Z uporabo monoklonskih protiteles so detektirali številne antigenske epitope na površini viriona HAV. Na začetku so predvidevali, da se večina antigenskih epitopov nahaja znotraj strukturnih proteinov HAV (Hadem in Manns, 2007). Pri raziskavi odkrivanja antigenskih epitopov poliproteina HAV je Khudyakov in sod. (1999) uporabil set 237 prekrivajočih sintetičnih peptidov, ki so prekrivali skoraj celoten poliprotein. S pomočjo sintetičnih peptidov so identificirali 42 antigenskih domen na poliproteinu, od tega jih je bilo 19 med strukturnimi proteini in 22 med nestrukturnimi proteini, ena domena pa je pokrivala spoj med VP1 in P2A proteinom. Med vsemi domenami so odkrili 5 imunodominantnih domen, ki so bile določene glede na širino in moč njihove imunoreaktivnosti. Prva domena je bila znotraj VP2 proteina, druga je obsegala C-terminalni del VP1 proteina in celoten P2A protein, tretja domena vključuje C-terminalni del P2C proteina in N-terminalno polovico P3A proteina, četrta je skoraj celoten P3B protein, peta pa obsega C-terminalni del P3C proteina in N-terminalno polovico P3D proteina. Zanimivost, ki so jo odkrili je, da štiri imunodominantne domene izhajajo iz malih HAV proteinov in obsegajo mesta proteinske cepitve HAV proteinov. S tem so dokazali, da so antigenski epitopi prisotni tudi na nestrukturnih proteinih. V omenjeni študiji so še dokazali, da je najbolj imunoreaktivna domena 2, ki pokriva del VP1 in celoten P2A protein. Tudi mi smo pri eksperimentalnem delu izbrali to domeno kot antigen hepatitisa A s potencialno uporabnostjo pri cepljenju in jo poimenovali HAV antigen.

### 2.2.2 Flagelin

Z namenom povečanja imunogenosti hepatitisa A smo naredili različico antiga za HAV, ki smo mu dodali gen za flagelin.

V današnjem času je dobro poznano, da bi naj vsako uspešno cepivo zraven zaščitnega antiga vsebovalo tudi dober adjuvant, ki učinkovito aktivira prirojeni imunski sistem in s tem okrepi antigen specifični imunski odgovor. Dokazano je bilo, da tollu-podobni receptorji (TLR), ki so skupina proteinov z glavno vlogo v prirojenem imunskem sistemu, ne igrajo vloge samo v prirojenem imunskem sistemu, ampak tudi v sledečem antigen odvisnem odgovoru. Oba sistema skupaj sta odločilna pri zaščiti pred infekcijskimi boleznimi. Pokazalo se je, da je veliko adjuvantov ligandov za tollu-podobne receptorje. Mnoge med njimi se preizkuša eksperimentalno ali v kliničnih raziskavah pri oblikovanju cepiv. Med te adjuvante spadajo komponente proteinov, lipidov, ogljikovih hidratov in nukleinskih kislin ter tudi flagelin (Ishii in Akira, 2007).

Flagelin je bakterijski površinski protein, ki je široko prisoten in dobro ohranjen znotraj bakterijskih vrst. Murthy in sod. (2003) in drugi raziskovalci so dokazali, da se očiščen flagelin iz *Salmonella dublin* ali rekombinant flagelin iz *Salmonella muenchen* veže na toll receptor TLR5 in s tem aktivira celično translokacijo NF-κB in z mitogenom aktivirano proteinsko kinazo, kar povzroči izražanje citokinov, kemokinov in encimov za sintezo protivnetnih prostih radikalov v *in vivo* in v *in vitro* pogojih. Med citokine, ki se začnejo izražati po vezavi flagelina na TLR5 receptor, spadajo dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in IL-6, med kemokine pa IL-8 (Murthy in sod., 2003). Flagelin inducira podoben protivnetni odgovor kot lipopolisaharidi (LPS), vendar je flagelin veliko bolj učinkovit in inducira široko razširjen oksidativni stres v večini organizmov (Liaudet in sod., 2002). Zaradi teh lastnosti je flagelin lahko uporabljen kot adjuvant pri oblikovanju novih cepiv proti infekcijskim boleznim (Honko in sod., 2006).

Divji tip flagelina iz *S. muenchen* je sestavljen iz treh funkcionalnih domen in 505 AK. Aminokisline 1-172 predstavljajo N-konec flagelina, od 172-418 AK je hipervariabilna regija flagelina in C-konec flagelina sestavlja AK 418-505. N in C konca flagelina sta med gram negativnimi bakterijami dobro ohranjena (Murthy in sod., 2003). S pomočjo analize kristalne strukture flagelina (Samatey in sod., 2001) so Murthy in sod., (2003) shematsko predstavili terciarno strukturo flagelina in možno vezavo na TLR5 receptor. Potrdili so, da sta N in C konca flagelina tista, ki vplivata na protivnetno aktivnost flagelina, hipervariabilna regija pa ima le vlogo pri stabilizaciji terciarne strukture in ne vpliva na vezavo flagelina na TLR5. Končna ugotovitev je bila, da je N motiv tisti, ki se poveže s TLR5 receptorjem na površini celice in tako povzroči protivnetno aktivnost (Murthy in sod., 2003).

### 2.3 POVRŠINSKA PREDSTAVITEV NA BAKTERIJAH

Celična površinska predstavitev omogoča predstavitev peptidov in proteinov na površini mikrobnih celic s pomočjo fuzije s sidrnimi motivi. Sidrne motive lahko imenujemo tudi nosilni proteini, protein, ki ga želimo predstaviti na površini, pa potniški protein (Lee in sod., 2003). Prvo poročilo o predstavitvi tujih proteinov na bakterijah s pomočjo genetske fuzije z nosilnim proteinom so leta 1986 objavili Freudl in sod. (1986) in Charbit in sod. (1986). Fuzija potniškega proteina z nosilnim proteinom lahko poteka preko N-konca, C-konca ali tako imenovane metode sendviča. Učinkovitost površinske predstavitev je tako odvisna od lastnosti nosilnega proteina, potniškega proteina, gostiteljskih celic in metode fuzije (Lee in sod., 2003).

Površinska predstavitev na bakterijah je široko uporabna v biotehnologiji in industriji. Največ raziskav poteka na področju uporabe za razvoj novih cepiv, kjer se omenja možnost uporabe za dostavo živih bakterijskih cepiv in določanje epitopov s pomočjo površinske predstavitev peptidnih knjižnic. Drugi načini uporabe so še (Lee in sod, 2003; Samuelson in sod., 2002):

- proizvodnja poliklonskih protiteles v živalih z izražanjem antigenov na površini bakterij,
- študije interakcij med proteini, razvoj novih diagnostičnih orodij, ustvarjanje delov za imunočiščenje in afinitetna vezava molekul s površinsko predstavitevijo delov protiteles ali različnih vezavnih proteinov,

- rešetanje peptidnih knjižnic predstavljenih na površini mikrobov,
- odstranjevanje škodljivih kemikalij, kovin in ksenobiotikov s celimi celičnimi biokatalizatorji ali bioadsorbenti, ki razgradijo škodljive snovi ali pa jih vežejo,
- proizvodnja biosenzorjev s površinsko predstavitevijo encimov, receptorjev ali drugih signalno občutljivih komponent za industrijske ali okoljske namene in
- za detekcijo AK sprememb v tarčnih proteinih po mutagenezi.

Pri površinski predstavitev na bakterijah so znanstveniki uporabili naravno prisotne površinske proteine kot nosilce tujih molekul za predstavitev na površini celic, saj imajo lasten mehanizem izločanja iz celice in pritrditve na površino. Dobre lastnosti nosilnega proteina so: da ima učinkovit signalni peptid ali transportni signal, ki omogoča prenos fuzijskega proteina skozi notranjo membrano; da ima močno sidrno strukturo, ki onemogoča ločitev fuzijskega proteina na površini celic; da je kompatibilen s sekvenco proteina, ki jo vstavimo; da je odporen na razgradnjo s proteazami, ki so prisotne v gojišču ali periplazemskem prostoru. Vsak tip nosilnih proteinov ima drugačne lastnosti in je lahko uporaben za specifično aplikacijo (Lee in sod., 2003).

Potniški proteini za predstavitev na površini bakterij so izbrani glede na želeno uporabo, vendar moramo upoštevati, da lahko vplivajo na proces prenosa fuzijskega proteina in s tem na končen rezultat površinske predstaviteve. Pri tem moramo biti pozorni na strukturo potniškega proteina, saj so ugotovili, da lahko sekundarna struktura proteina vpliva na prenos proteina skozi zunanjo membrano. Večje število hidrofobnih ali nabitih ostankov lahko povzroči neučinkovito izločanje v bakterijah (Lee in sod., 2003).

Izbira gostiteljskega seva je prav tako pomembna za površinsko predstavitev na bakterijah. Dober gostiteljski sev mora biti kompatibilen s potniškim proteinom, imeti mora nizko aktivnost zunajceličnih proteaz, njegovo gojenje mora biti enostavno in ne sme prihajati do lize celic. Za rešetanje peptidnih knjižnic izraženih na površini so najbolj primerni gostiteljski sevi iz gram negativnih (G-) bakterij kot je *E. coli*. Gram pozitivne (G+) bakterije kot gostiteljski sevi za površinsko predstavitev so bolj uporabne kot celi celični biokatalizatorji ali bioadsorbenti, saj imajo debelo celično steno, veliko pa se uporabljujo tudi za razvoj novih cepiv (Lee in sod., 2003).

Pri gram negativnih bakterijah so se razvili številni sistemi za površinsko predstavitev in večina je osnovanih na zunanjih membranskih proteinih kot nosilnih proteinih za površinsko predstavitev. Med pomembnejše nosilne proteine v G- bakterijah spadajo tudi lipoproteini, avtotransporterji, izločeni proteini, proteini S-sloja in podenote površinskih priveskov bakterij, kot so biček in fimbriji. Pomemben sistem, ki je osnovan na zunanjih membranskih proteinih, je Lpp-OmpA sistem, ki je sestavljen iz signalne sekvence in prvih devetih AK N-konca lipoproteina Lpp iz *E. coli* in ostankov zunanjega membranskega proteina (OmpA) *E. coli*. Lpp del je odgovoren za primerno lokalizacijo v zunanji membrani, OmpA pa skrbi za prenos tujih proteinov, združenih z nosilnim proteinom na C-koncu, preko zunanje membrane. Primera lipoproteina kot nosilnega proteina za površinsko predstavitev sta s peptidoglikanom povezan lipoprotein (PAL) iz *E. coli* in ledeni nukleacijski protein (INP) iz *Pseudomonas syringae*. Pri prvem se potniški protein priključi preko N-konca, pri drugem pa preko C-konca. Zunajcelični encim polulunaza iz *Klebsiella pneumoniae* je primer nosilnega proteina, ki se izloči iz celic, vendar je nekaj

časa prijet na površino celične stene. Največkrat uporabljena strategija za površinsko predstavitev v G- bakterijah je tako imenovana sendvič fuzija, ki je bila uporabljena v primeru predstavitev z nosilnimi proteini, kot so podenote bakterijskih bičkov in fimbrij ter proteini S-sloja (Lee in sod., 2003; Samuelson in sod., 2002).

Gram pozitivne bakterije imajo debelo celično steno ter več kot 100 poznanih površinskih proteinov, od katerih je veliko takih, ki imajo ohranjene lastnosti za sidranje v celično steno. Za uspešno premestitev skozi celično membrano in pritrditev (sidranje) na celično steno naj bi imel vsak površinski protein signalni peptid na N-koncu in sortirni signal za celično steno na C-koncu (Samuelson in sod., 2002). Signalni peptid vsebuje regijo na N-koncu, ki vsebuje številne pozitivno nabite AK, centralno hidrofobno jedro in hidrofilno cepitveno regijo z motivom, ki ga prepozna signalna peptidaza (Ravn, 2003). Sortirni signal je sestavljen iz ohranjenega LPXTG motiva, hidrofobnega dela in kratkega pozitivno nabitega ostanka. LPXTG motiv prepozna encim sortaza, ki razcepi vez med treoninom in glicinom in omogoča kovalentno povezavo treonina na AK celične stene. Hidrofobni del ima vlogo spajanja membrane, pozitivno nabit ostanek pa skrbi, da ne pride do izločanje polipeptidne verige v gojišče. Uporaba mehanizmov sidranja in sortiranja površinskih proteinov v celični steni za površinsko predstavitev heterolognih proteinov v G+ bakterijah se je široko razširila. Med najbolj poznanimi sidrnimi proteini v celični steni G+ bakterij je Protein A iz *S. aureus*, ki je bil uporabljen v številnih študijah kot nosilni protein za površinsko predstavitev heterolognih proteinov. Protein A vsebuje signalni peptid na N-koncu in sortirni signal z LPXTG motivom na C-koncu. Nosilna proteina, ki še izkoriščata sortirni signal za pritrditev na površino v G+ bakterijah sta še M6 površinski protein iz streptokokov tipa A in zunajcelična proteinaza PrtP vezana na celično steno *L. lactis*. Kot nosilni proteini za površinsko predstavitev v G+ bakterijah se uporabljajo tudi sidrnii proteini celične membrane in nekateri proteini povezani s celično površino, med katerimi so tudi proteini z S-sloju homolognimi motivi (Lee in sod., 2003; Samuelson in sod., 2002).

### 2.3.1 Površinska predstavitev na bakteriji *Lactococcus lactis*

Za površinsko predstavitev heterolognih proteinov na *L. lactis* se prav tako uporabljajo že poznani mehanizmi celičnega sidranja in sortiranja površinskih proteinov. Pri tem lahko uporabimo že pozan ali na novo odkrit nosilni površinski protein, ki ima učinkovit signalni peptid za izločanje in sortirni signal za pritrditev na površino, ali pa naredimo nov sistem, v katerega vključimo nek učinkovit signalni peptid za izločanje iz celic in nek mehanizem za pritrditev na površino. V *L. lactis* je poznana uporaba že omenjenih M6 in PrtP nosilnih proteinov za površinsko predstavitev heterolognih proteinov, vendar so pri obeh sistemih zasledili napake v sidranju proteinov, zato so razvili in še vedno razvijajo nove sisteme za površinsko predstavitev v *L. lactis*.

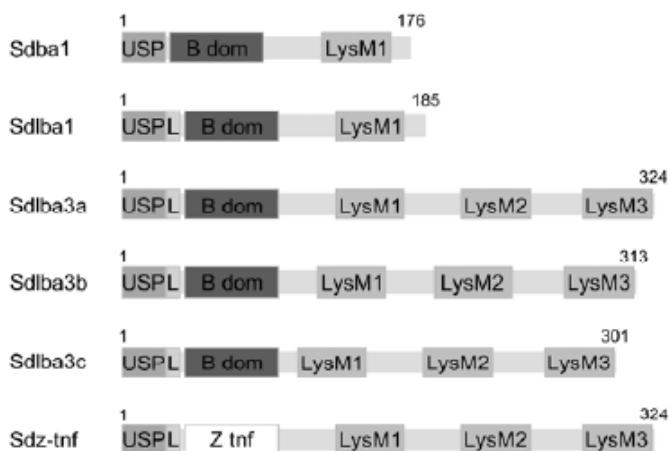
Za izločanje heterolognih proteinov iz celic *L. lactis* se najpogosteje uporablja signalni peptid proteina Usp45 ( $SP_{Usp45}$ ), ki je neidentificiran 45 kDa velik protein, katerega *L. lactis* intenzivno izloča iz celic. Gen za Usp45 je kodiran na kromosomu *L. lactis* in ima odprt bralni okvir dolžine 1383 bp, ki kodirajo protein velikosti 461 AK, od tega 27 AK sestavlja signalni peptid za izločanje (Van Asseldonk in sod., 1990). Učinkovitost  $SP_{Usp45}$  so Van Asseldonk in sod. (1993) preverili tako, da so signalni peptid proteinaze Prtp

zamenjali z 27 AK dolgim SP<sub>Usp45</sub>. Ugotovili so, da se izločanje proteinaze poveča z uporabo SP<sub>Usp45</sub> v primerjavi z izločanjem z lastnim signalnim peptidom PrtP. V raziskavi so dokazali tudi, da je SP<sub>Usp45</sub> uporaben tudi za izločanje proteinov v G- bakterijah kot je *Bacillus stearothermophilus* in *E. coli*, v kateri je zmožen izločanja tudi v krajši obliki (19 in 20 AK) (Van Asseldonk in sod., 1993). Učinkovitost izločanja proteinov z SP<sub>Usp45</sub> so še dodatno povečali z dodatkom sinteznega propeptida LEISSTCDA, ki mora biti v nevtralni ali kisli obliki, saj bazični propeptid močno zmanjša izločanje (Le Loir in sod., 2001). V *L. lactis* so odkrili med drugimi tudi signalni peptid SP310, ki je ima visok nivo izločanja proteinov, vendar je ta nivo še vedno manjši od izločanja SP<sub>Usp45</sub> (Ravn, 2003).

Pri površinski predstavitvi proteinov v *L. lactis* je za pritrđitev na površino uporabna N-acetilmuraminidaza AcmA iz *L. lactis*. Avtolizin AcmA je peptidoglikanska hidrolaza, ki ima vlogo pri celični delitvi in je odgovorna za lizo celic v stacionarni fazni rasti (Buist in sod., 1995). Polipeptid AcmA sestavlja 437 AK v velikosti 46 kDa in je iz treh domen. Prva domena je signalna sekvenca na N-koncu, druga je aktivna domena in na C-koncu je membransko sidro. Ugotovili so, da se v tretji domeni na C-koncu nahajajo tri ponovljene regije (LysM domene) v velikosti 45 kDa, ki so odgovorne za nekovalento pritrđitev AcmA na celično steno. Regije so med sabo ločene z nehomolognimi sekvencami, ki so bogate s serinskim, treoninskimi in asparaginskimi ostanki. Za pritrđitev na površino je dovolj že ena LysM domena (Buist, 1997). Uporabnost ene domene AcmA za pritrđitev na površino je bila tudi potrjena z uspešno površinsko predstavitevijo kapsidnega proteina VP1 enterovirusa 71 na površini *L. lactis*, *Lactobacillus plantarum* in *Bacillus sphaericus* (Raha in sod., 2005).

Z fuzijo SP<sub>Usp45</sub> z dodanim propeptidom LEISSTCDA, funkcionalne B domene in AcmA proteina so Ravnikar in sod. (sprejeto v tisk) pripravili laktkokne konstrukte za površinsko predstavitev v *L. lactis* z različnim številom LysM domen in različno dolžino sekvence, ki je ločevala izražen protein in AcmA protein (slika 5). Učinkovitost površinske predstaviteve B domene (B dom.) na površini *L. lactis* so ovrednotili z merjenjem intenzitete fluorescence s protitelesi proti B dom. označenih celic s pretočno citometrijo. Fluorescenca je sovpadala s količino fuzijskih proteinov vezanih na površino laktkoknih celic. Ugotovili so, da je največje izražanje fuzijskega proteina prisotno v laktkokih, ki so vsebovali plazmid pSDLBA3b. Sistem je bil uspešno uporabljen za površinsko predstavitev Z domene (derivat B domene), ki je bila sposobna vezave TNF-α, in bi lahko bila uporaben odstranjevanje TNF-α iz prebavnega trakta pri KVČB (Ravnikar in sod., sprejeto v tisk).

B domena je ena od petih domen stafilokoknega proteina A (SPA), ki ima pomembno vlogo v imunologiji, saj je zanj značilna specifična vezava na Fc dela imunoglobulinov (Ig) večine sesalcev vključno s človeškimi (Nilsson in sod., 1987). B domena stafilokoknega proteina A je sestavljena iz 58 AK, ki kodirajo protein s tremi heliksi. Njene dobre lastnosti so poleg majhnosti tudi stabilna zgradba, visoka topnost, enostavno izražanje v *E. coli* in odpornost na proteaze. Ima poznano tridimenzionalno strukturo in veže IgG preko Fc dela imunoglobulinov (Bratkovič in sod., 2006). Z domena je sintetično pridobljena B domena stafilokoknega proteina A, ki se imenuje tudi IgG vezavna domena, saj je prav tako zmožna vezave IgG protiteles preko Fc dela (Nilsson in sod., 1987).



Slika 5: Genski konstrukti za površinsko predstavitev v laktokokih (Ravnikar in sod., sprejeto v tisk: 11)

### 2.3.2 Določanje površinskega proteoma bakterij

Kljud številnih poznanim načinom za površinsko predstavitev heterolognih proteinov v G- in G+ bakterijah, se še vedno išče nove nosilne proteine za učinkovito izražanje proteinov na površini. Zaradi številnih pomembnih lastnosti, ki jih imajo površinski proteini bakterij, je postalo vedno bolj pomembno poznavanje vseh površinskih proteinov (površinskega protoma) bakterij. Površinski proteom lahko uporabimo pri iskanju novih nosilnih proteinov za površinsko predstavitev ali iskanju novih kandidatnih proteinov za cepiva proti infekcijskim bakterijam, kjer cepiva še niso poznana ali niso dovolj učinkovita.

Poznavanje površinskega proteoma bakterij je pomembno tudi s stališča poznavanja fiziologije bakterij in njihove interakcije z gostiteljem. Površinski proteini so tisti, ki igrajo ključno vlogo v medsebojnem vplivu med bakterijskimi celicami in okoljem. Vključeni so namreč v adhezijo in napad gostiteljskih celic, v zaznavanje kemijskih in fizičnih dejavnikov zunanjega okolja in pošiljanje primerenega signala v celico, v postavitev obrabnega mehanizma proti gostiteljskemu odgovoru, v toksičnost, in so prvi, ki jih prepozna imunski sistem, ko bakterija prodre v gostitelja (Tjalsma in sod., 2008; Rodriguez-Ortega in sod., 2006).

Za določanje površinskega proteoma bakterij se trenutno uporabljam tri glavne metode (Rodriguez-Ortega in sod., 2006). Pri prvi metodi gre napovedovanje površinskih proteinov z genomskimi analizami in uporabo algoritmov, kot je PSORT. Prednost te metode je, da je hitra, vendar ni zanesljiva in ni kvantitativna. Pri drugem pristopu gre najprej za ločitev membranskih frakcij in frakcij celične stene, sledi analiza frakcij z dvo-dimenzionalno (2D) elektroforezo ali 2D kromatografijo in nato analiza z masnim spektrometrom. Ta pristop se veliko uporablja za določanje površinskih proteomov številnih bakterij in je kvantitativen. Slabost metode je nezadostna selektivnost in kontaminacija membranskih proteinov s citoplazmatskimi proteinimi. Pri tretji metodi se površinski proteini najprej določijo s prvo ali drugo metodo, nato pa je potrebno lokalizacijo proteinov potrditi s produkcijo poliklonskih protiteles proti rekombinantni obliku vsakega določenega proteina ali s poskusom vezave protiteles na celotne bakterijske celice. Prednost tretje metode je, da je kvantitativna in omogoča identifikacijo resničnih

površinsko dostopnih proteinov, vendar zahteva veliko intenzivna dela v laboratoriju. (Rodriguez-Ortega in sod., 2006).

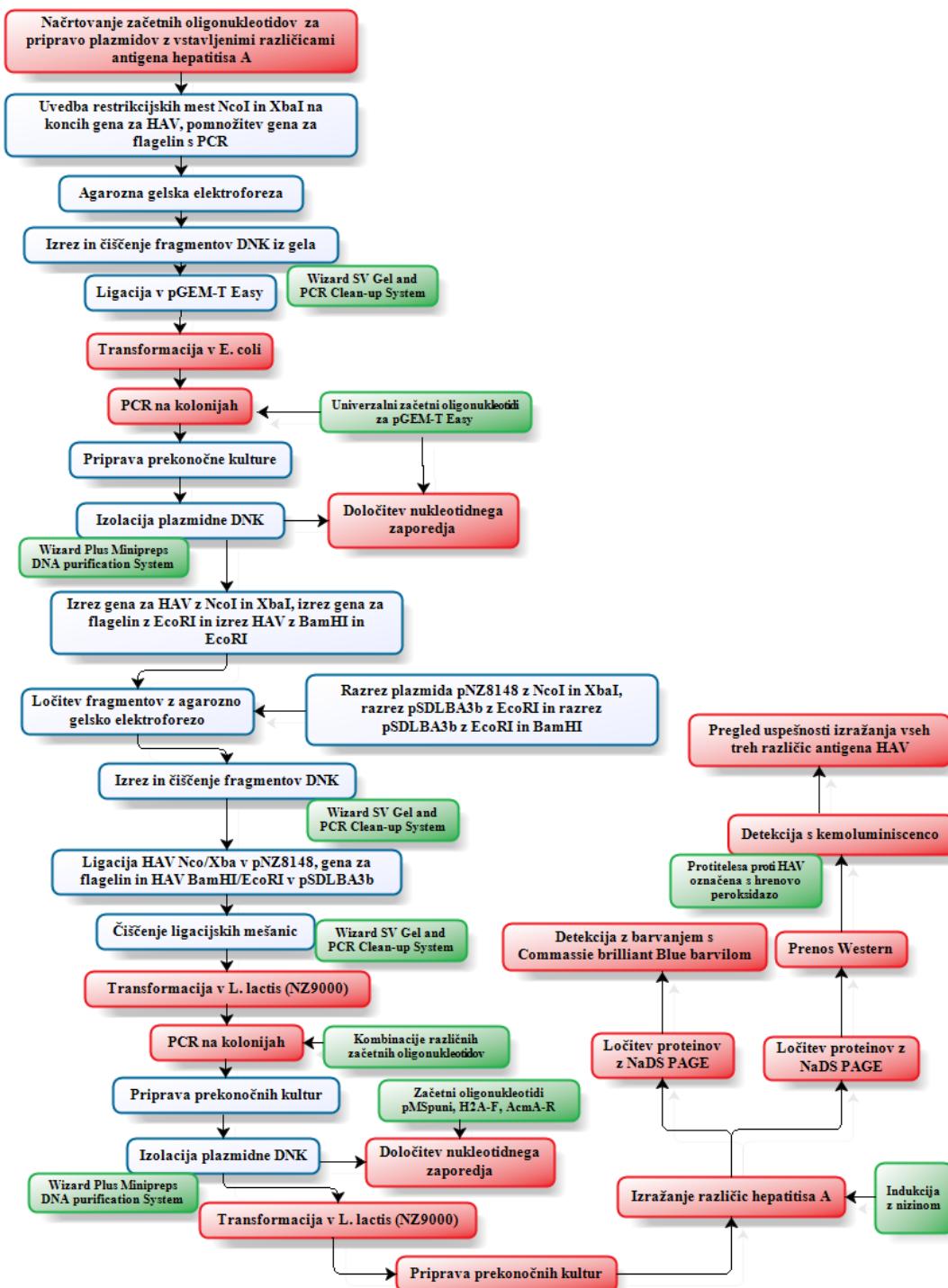
Pri določanju površinskega proteoma s tretjo metodo je pred analizo z masnim spektrometrom potrebna proteolitična obdelava bakterij pod pogoji, ki ohranijo viabilnost celic (Doro in sod., 2009). Proteolitična obdelava površinskih proteinov vključuje uporabo encimov, kot so tripsin, proteinaza K, lizocim, mutanolizin, lizostafin in drugi (Severin in sod., 2007). Pri postopku razgradnje proteinov se lahko uporablja samo en encim za razgradnjo proteinov ali kombinacija dveh ali več. Pri tretji metodi, kjer se uporablja proteolitična razgradnja površinskih proteinov, lahko tudi izpustimo ločitev proteinov s kromatografijo (Severin in sod., 2007). Tak pristop je hiter in visoko selektiven, saj je bilo potrjeno, da večina identificiranih proteinov spada v kategorije proteinov celične stene, lipoproteinov, membranskih proteinov in izločenih proteinov (Doro in sod., 2009).

Zaradi številnih bolezni, ki jih povzročajo streptokoki, je bilo določenih veliko površinskih proteomov streptokokov skupine A (Rodriguez-Ortega in sod., 2006; Severin in sod., 2007) in streptokokov skupine B (Doro in sod., 2009) z namenom iskanja novih kandidatnih vakcin za zaščito ljudi pred boleznimi, ki jih povzročajo. Poročajo tudi o številnih drugih določenih površinskih proteomih z namenom iskanja novih vakcin, spoznavanja mehanizmov sidranja, patogeneze, toksičnosti, interakcij z okoljem in iskanja novih nosilnih proteinov za površinsko predstavitev na bakterijah.

### 3 MATERIALI IN METODE

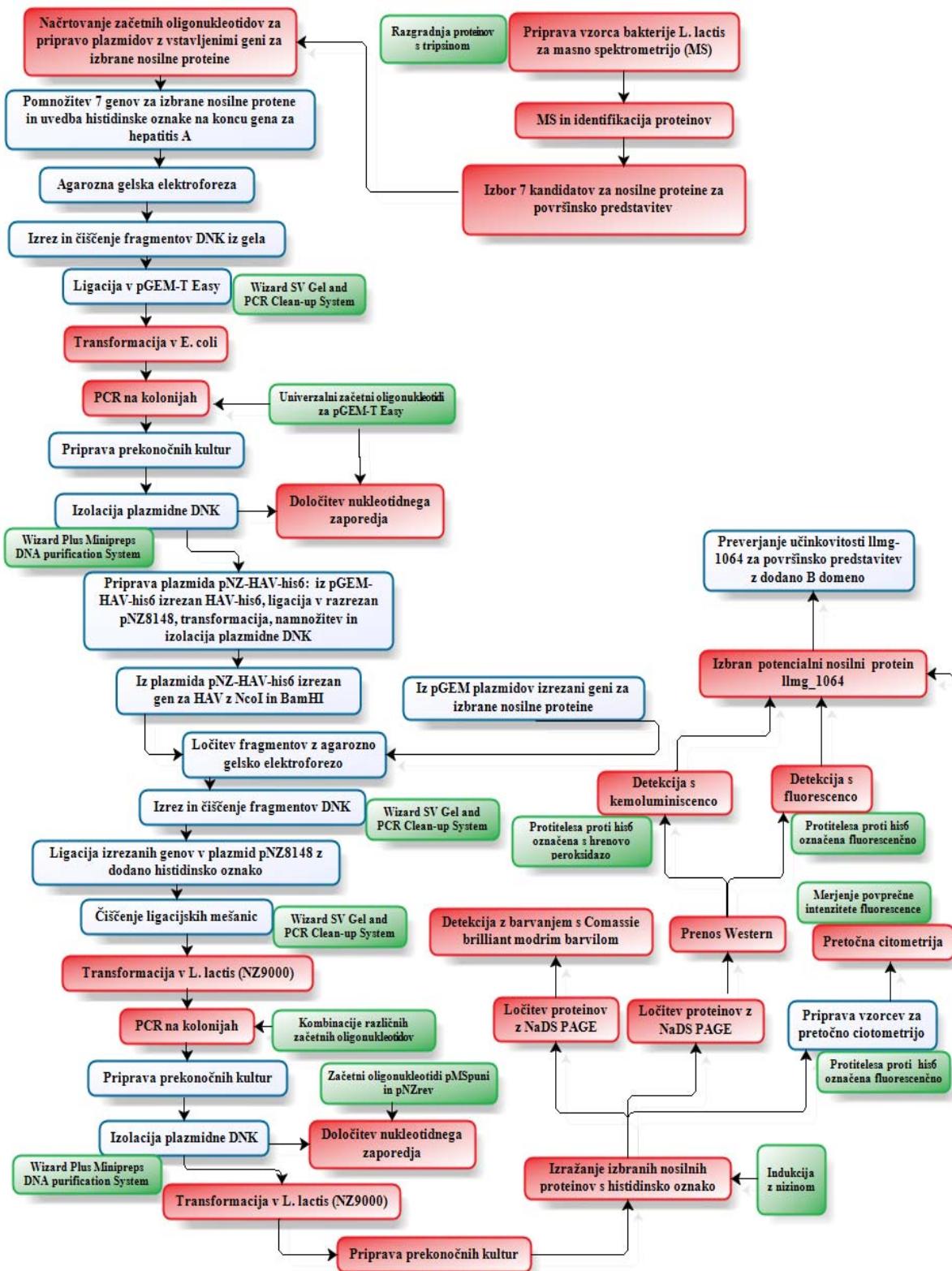
#### 3.1 POTEK DELA

##### 3.1.1 Potek dela za preverjanje izražanja različic antigaena hepatitisa A



Slika 6: Potek dela za preverjanje izražanja različic antigaena hepatitisa A

### 3.1.2 Potek dela iskanja in vrednotenja novih nosilnih proteinov za površinsko predstavitev



Slika 7: Potek dela iskanja in vrednotenja novih nosilnih proteinov za površinsko predstavitev

## 3.2 MATERIALI

### 3.2.1 Bakterijske kulture

V eksperimentalnem delu smo uporabljali dve bakterijski kulti:

- *E. coli*: DH5α (Invitrogen)

Genotip: F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub>-, m<sub>k</sub>+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1

DH5α kompetentne celice smo uporabili za namnožitev pGEM-T Easy z vstavljenim genom za izbran površinski protein ali različico antigaena hepatitisa A.

- *L. lactis*: NZ9000

Genotip: MG1363 nisRK ΔpepN

NZ9000 je standardni gostiteljski sev za z nizinom regulirano gensko ekspresijo (NICE®). Sev vsebuje regulatorska gena *nisR* in *nisK*, ki sta integrirana v *pepN* (Kuipers in sod., 1998).

NZ9000 smo uporabili za pripravo kompetentnih celic *L. lactis*, pripravo vzorca za masno spektrometrijo, namnožitev genov za izbrane površinske proteine s PCR, namnožitev plazmidov z vstavljenim genom za izbrane površinske proteine ali različice antigaena hepatitisa A in za izražanje različic antigaena hepatitisa A v *L. lactis* ter izbranih površinskih proteinov na površini *L. lactis*.

### 3.2.2 Plazmidi

Pri pripravi konstruktov z vstavljenimi različicami antigaena HAV in geni za izbrane površinske protein smo uporabili plazmide, ki so zbrani in opisani v preglednici 1.

Preglednica 1: Plazmidi, ki smo jih uporabili pri pripravi konstruktov

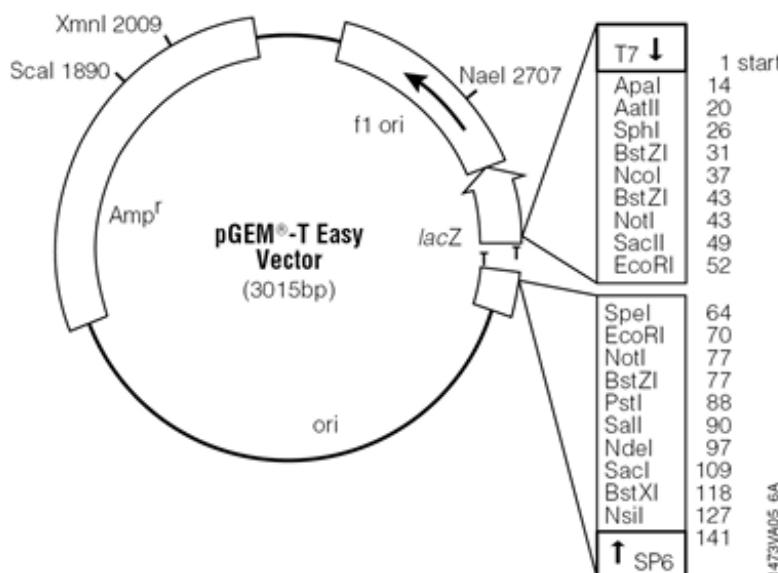
Plazmid	Opis plazmida
pGEM®-T Easy	splošen vektor za kloniranje PCR produktov (Promega)
pUC-HAV	plazmid pUC57 z vstavljenim genom za HAV (ATG: biosynthetics)
pGEM-HAV-Nco/Xba	pGEM-T Easy z vstavljenim genom HAV
pGEM-FliC	pGEM-T Easy z vstavljenim genom za flagelin
pGEM-HAV-Nco/Xba His6	pGEM-T Easy z vstavljenim genom HAV in zaporedjem His6
pGEM-0551	pGEM-T Easy z vstavljenim genom za llmg_0551
pGEM-2020	pGEM-T Easy z vstavljenim genom za llmg_2020
pGEM-2232	pGEM-T Easy z vstavljenim genom za llmg_2232
pGEM-2330	pGEM-T Easy z vstavljenim genom za llmg_2330
pGEM-0168	pGEM-T Easy z vstavljenim genom za llmg_0168
pGEM-1907	pGEM-T Easy z vstavljenim genom za llmg_1907
pGEM-1064	pGEM-T Easy z vstavljenim genom za llmg_1064
pGEM-B dom.	pGEM-T Easy z vstavljenim genom za B domeno
pNZ8148	kloramfenikolna rezistenca, nizinski promotor (NIZO)
pSDLBA3b	pNZ8148 s fuzijo genov sp <sub>Usp</sub> -LEIS, b-dom in acmA3b (Ravnikar in sod., sprejeto v tisk)

### 3.2.2.1 pGEM®-T Easy Vector

pGEM®-T Easy Vector (Promega) (slika 8) je odprt plazmid, ki ima na obeh 3'-koncih dodan timidin. Timidin onemogoča zapiranje plazmida samega vase in prilega koncem PCR produktov, ki jim nekatere vrste termostabilnih polimeraz (tudi DreamTaq Green DNK polimeraza) na 5'-koncih dodajo adenin. S tem je močno izboljšana ligacija PCR produktov v plazmid.

Plazmid vsebuje :

- T7: iniciacijsko mesto za T7 RNK polimerazo,
- SP6: iniciacijsko mesto za SP6 RNK polimerazo,
- *lacZ*: gen za  $\beta$ -galaktozidazo z vsebujočim multiplim mestom za kloniranje (MCS) omogoča identifikacijo transformiranih klonov z belo-modro selekcijo. MCS vsebuje območja za številne restriktivne encime, ki omogočajo restrikcijo plazmida in nato vstavitev DNK fragmentov,
- Amp<sup>r</sup>: gen za  $\beta$ -laktamazo, ki omogoča selekcijo uspešno transformiranih bakterij na osnovi rezistence na ampicilin.



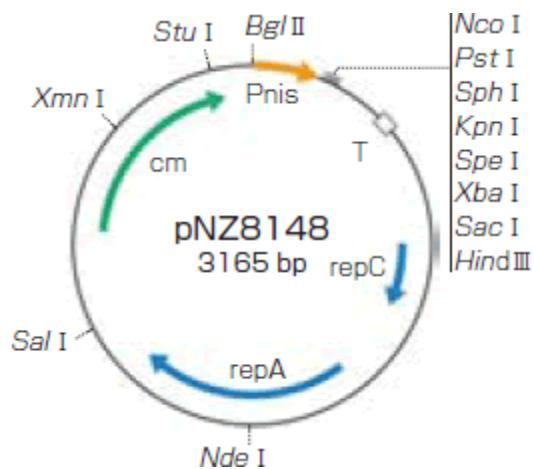
Slika 8: Prikaz plazmida pGEM®-T Easy

### 3.2.2.2 pNZ8148

pNZ8148 (slika 9) je široko uporaben gostiteljski plazmid v *L. lactis*.

Plazmid vsebuje.

- Pnis: nizinski promotor A,
- T: terminator na koncu MCS,
- Cm: gen za kloramfenikol acetiltransferazo, ki omogoča selekcijo uspešno transformiranih bakterij na osnovi rezistence na kloramfenikol,
- repC: replikacijski gen C,
- repA: replikacijski gen A.



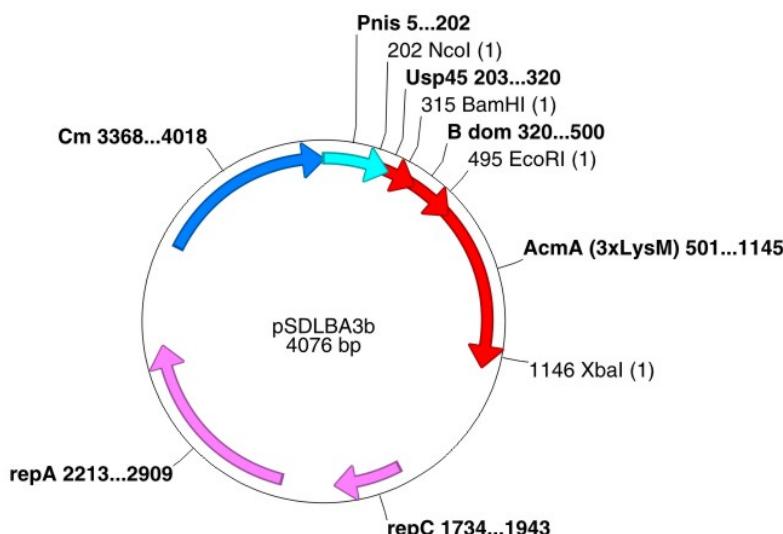
Slika 9: Prikaz plazmida pNZ8148

### 3.2.2.3 pSDLBA3b

Plazmid pSDLBA3b je plazmid, ki omogoča površinsko predstavitev heterolognih proteinov na mlečno kislinski bakteriji *L. lactis*. Prekomerno izražanje heterolognih proteinov omogoča nizinski promotor, ki se nahaja na plazmidu.

Plazmid pSDLBA3b (slika 10) vsebuje:

- Pnis: nizin A promotor,
- Usp45: signalni peptid za izločanje proteinov v gojišče,
- B dom: B domena iz stafilokoknega proteina A, ki ima zmožnost vezave IgG-Fc,
- AcmA: regija za pritrdiritev na površino,
- Cm: gen za kloramfenikol acetiltransferazo, ki omogoča selekcijo uspešno transformiranih bakterij na osnovi rezistence na kloramfenikol,
- repC: replikacijski gen C,
- repA: replikacijski gen A.



Slika 10: Prikaz plazmida pSDLBA3b

### 3.2.3 Začetni oligonukleotidi

Vsi začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri pripravi želenih plazmidov, so zbrani v preglednici 2. Pri oblikovanju začetnih oligonukleotidov smo upoštevali naslednje zahteve za oblikovanje začetnih oligonukleotidov:

- začetni oligonukleotid naj bo dolg 20-30 bp, kar omogoča specifičnost vezave,
- talilna temperatura ( $T_m$ ) začetnih oligonukleotidov mora biti 52-65 °C,
- vsebnost GC naj bo 40-60 %,
- znotraj začetnih oligonukleotidov ne sme biti nobenih sekundarnih struktur.

Lastnosti vseh oblikovanih začetnih oligonukleotidov smo preverili s programom OligoAnalyzer 3.1 (IDT, 2010), ki je prosto dostopen na spletu. Oligonukleotidi so bili naročeni pri Thermo Fisher Scientific (Nemčija). Vsi naročeni začetni oligonukleotidi so bili raztopljeni v določenem volumnu (100 pmol/ $\mu$ M) in nato razredčeni na 5  $\mu$ M.

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri pripravi plazmidov z vstavljenimi različicami antigaena HAV in geni za izbrane površinske proteine

Oznaka	Nukleotidno zaporedje (5'→3') z označenimi restriktionskimi mesti
H2a-F-Nco	AATACCAT <u>GGCTGTC</u> CTGGAGCATTAG
H2a-R-Xba	TATT <u>TCTAG</u> ATTATTGACTAAAAAGTCCCTTC
AcmA-R3-Xba	TTATT <u>TCTAG</u> ATTATTTATT <u>CGT</u> AGATA <u>CTGACC</u>
FliC-F-spac	TGAATTCTCCGGAGGGAGGTGGTCAGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGA GCACAAGTCATTAATACCAACAGC
FliC-R-EcoNS	TGAATT <u>CCCTGC</u> AGCAGAGACAG EcoRI
H2a-R-6His	TT <u>CTAG</u> ATTAATGATGATGATGAT <u>GGATC</u> TTGACTAAAAAGTCCCTTC XbaI BamHI
H2a-F	GCTGTCTCTGGAGCATTAG
H2a-R	TTATTGACTAAAAAGTCCCTTC
0551-F	<u>ACCATGG</u> CTAAAAAA <u>ATTA</u> ATAGCGCTAG
0551-R	T <u>GGATC</u> CTCTCCATAAT <u>GAAA</u> ATGTG
2020-F	T <u>CCATGG</u> CTAAAAGCGGAA <u>ATGACTCG</u>
2020-R	T <u>GGATC</u> CTATCAACT <u>CTTT</u> CCTGACTC
2232-F	<u>ACCATGG</u> CTAAGTGGAT <u>GAAAAAAGACAG</u> TTAAG
2232-R	T <u>GGATC</u> CTGGTGT <u>CCATACAGAA</u> ATT <u>TTTG</u>
2330-F	<u>ACCATGG</u> CTAAAAAA <u>ATTAA</u> ATT <u>TGACT</u> CTTGC
2330-R	T <u>GGATC</u> CTTGAATT <u>GATCAGCAG</u>
0168-F	ACCATGGCTAATAAGAA <u>ACAATT</u> AAA <u>ACAATAAC</u>
0168-R	<u>AGGATCC</u> AGGTT <u>GACTGTATTGAC</u>
1907-F	<u>ACCATGG</u> CTAA <u>ATTCA</u> AAA <u>ACTCGGATTAG</u>
1907-R	T <u>GGATC</u> CTT <u>GAATG</u> AAG <u>ATGTACTGATG</u>
1064-F	<u>ACCATGG</u> CTAAAAAC <u>CGCGTAATCGCAG</u>
1064-R	T <u>GGATC</u> CT <u>TTGAAGGAACAGTAATT</u> TTCC
pMSpuni	GTTAGATAC <u>AAATGATT</u> CG
pMSrev	T <u>GCTTTTGG</u> CTAT <u>CAATC</u>
M13-uni	T <u>GTAAAACGACGGCCAGT</u>
SP6	CATT <u>TAGGTGACACTATAG</u>
Bdom-F-BamHI	<u>ACTCGGATCCG</u> CTGATA <u>ACAAATTCAAC</u>
Bdom-R-XbaI	ACGTT <u>CTAG</u> ATT <u>TTTGGT</u> GCT <u>TGTGCATC</u>

### 3.2.4 Encimi

Pri eksperimentalnem delu diplomske naloge smo uporabljali encime, ki jih prikazuje preglednica 3.

Preglednica 3: Encimi in njihovi proizvajalci, uporabljeni v eksperimentalnem delu

Encim	Proizvajalec
NcoI (10 U/ $\mu$ L) (cepitev zaporedja CCATGG)	New England BioLabs
XbaI (cepitev zaporedja TCTAGA)	New England BioLabs
BamHI-HF (cepitev zaporedja GGATCC)	New England BioLabs
EcoRI-HF (cepitev zaporedja GAATTC)	New England BioLabs
DreamTaq Green DNK polimeraza (za PCR)	Fermentas
T4 DNK ligaza	Fermentas
T4 DNK ligaza (ligacija v pGEM-T Easy)	Promega
lizocim (za razgradnjo celične stene <i>L. lactis</i> )	Sigma
mutanolizin (za razgradnjo celične stene <i>L. lactis</i> )	Sigma
tripsin	Promega
endoproteinaza Glu-C	Roche

### 3.2.5 Kemikalije

Vse kemikalije uporabljeni pri eksperimentalnem delu in njihove proizvajalce prikazuje preglednica 4.

Preglednica 4: Vse kemikalije in njihovi proizvajalci uporabljeni pri eksperimentalnem delu

Kemikalija	Proizvajalec
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Promega
10x ligacijski pufer	New England Biolabs
agarosa	BioWhittaker Molecular Applications
SYBR barvilo	Invitrogen
10x DreamTaq Green pufer	Fermentas
6x nanašalna raztopina za elektroforezo (Loading Dye Solution)	Fermentas
pufer za NcoI, EcoRI-HF, BamHI-HF (NEBuffer 4)	New England Biolabs
pufer za XbaI (NEBuffer 2)	New England Biolabs
BSA za pripravo raztopine 10 mg/mL	New England Biolabs
označevalec velikosti 100 bp (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder)	Fermentas
označevalec velikosti 1000 bp (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder)	Fermentas
označevalec velikosti za NaDS PAGE (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder )	Fermentas
Coomassie Brilliant Blue	Amersham
akrilamid	Merck
amonijev persulfat za pripravo 10% raztopine APS	Sigma
TEMED (N,N,N,N-tetrametiletilendiamin)	Merck
1-butanol	Merck
4x NaDS nanašalni pufer	Pripravljen
DTT	Fermentas
DPBS	Invitrogen

se nadaljuje

nadaljevanje

Kemikalija	Proizvajalec
mravljična kislina	/
HCl (37 %) za pripravo 1M raztopine	Merck
TRIS	Serva
etanol 96 % (v/v)	Carlo Erba
glicerol 100 % (v/v)	Carlo Erba
glicin	Serva
glukoza monohidrat	Fluka
saharoza	Serva
metanol	Sigma Aldrich
NaDS	Sigma
EDTA	Serva
ampicilin za pripravo raztopine 100 mg/mL	Sigma
kloramfenikol za pripravo raztopine 25 mg/mL	Sigma
nizin	Fluka
Tween 20	Serva
2x ligacijski pufer (2x Rapid Ligation Buffer)	Promega
Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System	Promega
• raztopina za resuspendiranje celic (Cell Resuspension Solution)	
• raztopina za lizo celične stene (Cell Lysis Solution)	
• raztopina za alkalnih proteaz (Alkaline Protease Solution)	
• raztopina za nevtralizacijo (Neutralisation Solution)	
• raztopina za spiranje kolone (Column Wash Solution)	
• voda brez nukleaz (Nuclease free Water)	
Wizard® Sv Gel and PCR Clean-Up System	Promega
• raztopina za vezavo na membrano (Membrane Binding Solution)	
• raztopina za spiranje kolone (Column Wash Solution)	
• voda brez nukleaz (Nuclease free Water)	
blokirna raztopina (Western Blocking Reagent)	Roche
Lumi-Light Enhancer Solution	Roche
Lumi-Light Stable Peroxide Solution	Roche
zajčja poliklonska protitelesa proti 6X His tag® (FITC) (ab1206)	Abcam
Anti-His6-Peroxidase solution	Roche
protitelesa Anti-VPI (HAV)	eENZYME
sekundarna kozja antizajčja IgG-Hrpo protitelesa	DIANOVA
Alexa Fluor 488 konjugirana zajčja antimisja protitelesa (A-11059)	Invitrogen

### 3.2.6 Gojišča in raztopine

Sestavo in pripravo raztopin in gojišč, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu, prikazuje preglednica 5 .

Preglednica 5: Raztopine in gojišča uporabljeni pri eksperimentalnem delu

<b>LB, LBA tekoče gojišče</b>	<b>LB, LBA trdno gojišče</b>
5 g/L kvasni ekstrakt 10 g/L kazeinski hidrolizat 10 g/L NaCl z 0,1 M NaOH uravnamo do pH=7,5 in avtoklaviramo. Za LBA gojišče dodamo ampicilin po ohlajanju do končne koncentracije 100 µg/mL.	Za trdno LB/LBA gojišče dodamo 15 g/L agarja, avtoklaviramo, ohladimo in vlijemo v petrijevke. Pri LBA gojišču še dodamo ampicilin do končne koncentracije 100 µg/mL.
<b>M-17 tekoče gojišče</b>	<b>GM-17C10 trdno gojišče</b>
5 g/L pepton iz kazeina 5 g/L sojin pepton 5 g/L laktosa 5 g/L goveji ekstrakt 2,5 g/L kvasni ekstrakt 0,5 g/L askorbinska kislina 0,25 g/L magnezijev sulfat 19 g/L dinatrijev beta-gliceroftosfat	42,5 g/L M-17 0,5 % glukoza 10 µg/mL kloramfenikol Glukozo in antibiotik dodamo po avtoklaviranju in ohlajanju na 45 °C, nato gojišče zlijemo v sterilne petrijevke.
<b>GM-17 tekoče gojišče</b>	<b>SGM-17</b>
42,5 g/L M-17 0,5 % glukoza 10 µg/mL kloramfenikol Glukozo in antibiotik dodamo po avtoklaviranju in ohlajanju na 45 °C.	42,5 g/L M-17 0,5 % glukoza 0,5 M saharoza sterilno prefiltriramo v brezprašni komori
<b>SGM-17 z glicinom</b>	<b>0,5 M saharoza z 10 % glicerolom</b>
M-17 0,5 % glukoza 0,5 M saharoza 3 % glicin sterilno prefiltriramo v brezprašni komori	50 mL 1 M saharoza 50 mL 20 % glicerol 20 % glicerol avtoklaviramo in dodamo sterilno prefiltrirani 1 M glukozi
<b>Zmes dNTP</b>	<b>10X TAE pufer</b>
5 µL dATP 5 µL dCTP 5 µL dGTP 5 µL dTTP 380 µL dH <sub>2</sub> O	48,4 g Tris 11,4 mL ledocetna kislina 40 mL EDTA (0,5 M) dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 1000 mL
<b>10X NaDS pufer</b>	<b>10X WB pufer</b>
29 g Tris 144 g glicin 10 g NaDS dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 1 L	29 g Tris 144 g glicin dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 1 L
<b>1X NaDS pufer</b>	<b>Pufer za prenos</b>
100 mL 10X NaDS pufer dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 1 L	100 mL 10X WB pufer 200 mL metanol 3,75 mL 10 % (m/v) NaDS dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 1 L
<b>TBS</b>	<b>TBST</b>
6,05 g Tris 8,76 g NaCl 800 mL dH <sub>2</sub> O uravnamo pH=7,5 z 1M HCl, dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 1 L	1 mL Tween 20 dodamo v 1 L TBS
<b>1 % blokirna raztopina</b>	<b>0,5 % blokirna raztopina</b>
10 mL Western blocking reagent 10X 90 mL TBS	5 mL TBS 5 mL 1 % blokirna raztopina

se nadaljuje

nadaljevanje

Raztopina protiteles proti His6 (FITC)	Raztopina protiteles proti His6 (HRP)
5 µL protiteles 5 mL 0,5 % blokirna raztopina	1,5 µL protiteles 5 mL 0,5 % blokirna raztopina
Raztopina primarnih protiteles proti HAV	Raztopina sekundarnih protiteles (HRP)
5 µL protiteles 5 mL 0,5 % blokirna raztopina	1 µL protiteles 10 mL 0,5 % blokirna raztopina
Lumi- Light substrat za detekcijo po prenosu	TBS+
2,5 mL Lumi-Light Enhancer Solution 2,5 mL Lumi-Light Stable Peroxide Solution	50 mM TrisHCl 1 M NaCl 0,1 % SDS uravnamo pH=7,5 z 1 M HCl
Raztopina Coomassie Brilliant Blue	PBS
500 µL ocetne kislina 0,05 g Coomassie Brilliant Blue 20 mL metanola dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 50 mL	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 0,2 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> uravnamo pH=7,2 z 1M HCl, dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 1 L
30 % razbarvalna raztopina	10 % razbarvalna raztopina
400 mL teh. etanol 100 mL ocetna kislina 500 mL dH <sub>2</sub> O	140 mL teh. etanol 50 mL ocetna kislina 810 mL dH <sub>2</sub> O

### 3.2.7 Laboratorijska oprema in ostali materiali

Laboratorijsko opremo in ostale materiale uporabljene pri praktičnem delu prikazuje preglednica 6.

Preglednica 6: Laboratorijska oprema in ostali materiali uporabljeni pri praktičnem delu diplome

Oprema	Tip, proizvajalec
centrifuge	Eppendorf 5415C Eppendorf 5417C Eppendorf 5415R LC-321, Tehnica SorvallRC5C PLUS 1925X All American
avtoklav	POWER PAC 300, BioRad
aparatura za gelsko elektroforezo	POWER PAC, BioRad
aparatura za NaDS page in prenos na membrano	2720 Thermal Cycler, Applied Biosystem
aparatura za PCR	Genius, Sartorius
tehtnici	200A, Tehnica
mikrovalovna pečica	ZM21MS, Zannusi
termoblok	ThermoShaker, Biometra
magnetno mešalo	Rotamix SHP-10, Tehnica
konično mešalo (vortex)	Vibromix 10, Tehnica
stresalnik	Vibromix 31, Tehnica
inkubator (30 °C)	Memmert
inkubator (37 °C)	Binder
inkubator-stresalnik	Certomat HK, Sartorius
brezprašna komora	Labcaire
spektrofotometer za merjenje koncentracije DNA	ND 1000, NanoDrop
pipete	Eppendorf
spektrofotometer	Lambda Bio +, PerkinElmer

se nadaljuje

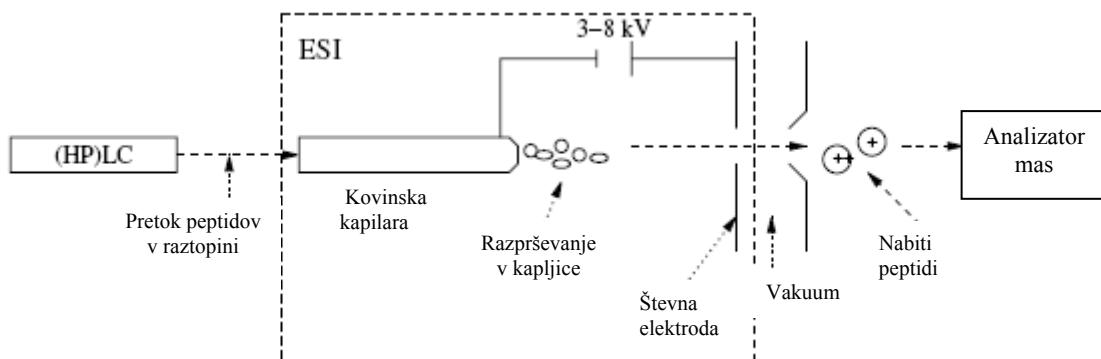
nadaljevanje

Oprema	Tip, proizvajalec
aparatura za elektroporacijo	Gene Pulser II apparatus, Biorad
ultrazvočni razbijalec	Cell disruptor W185, Sonifer
pretočni citometer	BD FACSCalibur, Becton Dickinson Inc.
masni spektrometer	1100 HPLC-Chip/MS System, Agilent technologies
pH meter	SevenEasy, Mettler Toledo
digestorij	Wesemann
vakuumski koncentrator	Speed Vac SV C100H, Savant Eppendorf 5301
fluorescenčni scaner	Typhoon 9410, GE Healthcare
aparatura za natis slik (tiskalnik)	P90, Mitsubishi
aparatura za slikanje gelov	UVItec
kadičke in material za ektroforezo	BioRad
material za vlivanje gelov in izvedbo NaDS PAGE	mini-Protean II apparatus, BioRad
kivete za elektroporacijo 0,2 cm	GenePulser, BioRad
PVDF membrana	Immobilon-P, Millipore
0,2 µm filtri	Minisart, Sartorius Stedim

### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Masna spektrometrija površinskih proteinov *L. lactis*

Masna spektrometrija je metoda, ki se uporablja za merjenje razmerja med maso in nabojem neke komponente v vzorcu. Masni spektrometer je sestavljen in treh glavnih delov: vira ionizacije, analizatorja mase in detektorja. Komponente, ki jih želimo analizirati moramo najprej ionizirati z virom ionizacije, nato se prenese vzorec v analizator mase, kjer se komponente ločijo glede na razmerje m/z. Detektor na koncu zazna posamezne ločene komponente in spektre mas prikaže na računalniku. Poznamo dve glavni vrsti masnih spektrometrov: masni spektrometri, ki izvajajo enojno masno spektrometrijo in tandemski masni spektrometri. Prvi merijo razmerje m/z celih peptidov, pri tandemski masni spektrometriji pa se peptidi fragmentirajo in masni spektrometer meri razmerje m/z posameznih fragmentov. V proteomiki se največ uporablja dva vira ionizacije, MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) in ESI (Electrospray Ionization). MALDI je najpogostejši vir ionizacije pri enojni masni spektrometriji, ESI pa pri tandemski masni spektrometriji. V našem primeru smo uporabljali ESI (slika 11), kjer pridejo peptidi v vir ionizacije preko tekočinskega pretoka, ki ga največkrat ustvarja aparatura za HPLC. Tekočina se nato razprši iz kapilare v močno elektromagnethno polje, kjer se površina posamezne kapljice nabije. V tem procesu zaradi izhlapevanja topila kapljice postajajo vse manjše in površina vedno bolj nabita. Na koncu se nabiti peptidi deabsorbirajo od površine kapljic, večina jih nosi dva ali več protonov in tako se v električnem polju transportirajo v analizator mas (Eidhammer in sod., 2007).



Slika 11: Princip ESI vira ionizacije (Eidhammer in sod., 2007: 72)

Poznamo več različnih analizatorjev mas kot so kvadrupol, ionska past, analizator na čas preleta (TOF), analizator z Furierjevo transformacijo in ionsko ciklotronsko resonanco, ter hibridni analizatorji, ki so kombinacije naštetih. V našem primeru je bil analizator mas ionska past, kjer je analizator zmožen lovljenja ionov v omejenem prostoru. Detektor zazna na koncu ločene ionizirane peptide in rezultati se prikazujejo v obliki spektra mas. Identifikacija proteinov poteka naprej tako, da se eksperimentalno določeni podatki primerjajo s teoretičnimi sekvencami proteinov v podatkovnih bazah. To primerjavo praktično opravi program, ki je običajno priložen masnemu spektrometru (Eidhammer in sod., 2007).

#### Razgradnja površinskih proteinov *L. lactis*

V erlenmajerico smo prelili 200 mL gojišča GM-17 in mu dodali 2,5 mL prekonočne kulture NZ9000 in inkubirali na 30 °C približno 2 h do OD<sub>600</sub> 0,3. Kulturo smo prenesli v veliko centrifugirko in centrifugirali pri 3500 g, 10 min in 4 °C. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in zbrane celice resuspendirali v 25 mL PBS pufru. Nastalo vsebino smo prelili v 50 mL falkonke in centrifugirali pri 3500 g, 10 min in 4 °C. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in usedlino resuspendirali v 25 mL PBS. Postopek centrifugiranja in spiranja smo ponovili še trikrat. Po zadnjem centrifugiranju smo odlili supernatant in usedlino resuspendirali v 800 µl PBS s 40 % saharozo in 5 mM DTT. Vsebino falkonke smo prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirke in nato razgradili površinske proteine z dodatkom 10 µg tripsina za 30 min na 37 °C. Po inkubaciji s tripsinom smo za zaustavitev delovanja tripsina dodali 0,1 % mravljične kislino. Vzorec smo nato centrifugirali pri 3500 g, 10 min in 4 °C. Po centrifugiranju smo supernatant odpipetirali in ga sterilno prefiltrirali skozi 0,2 µm filter v 1,5 mL mikrocentrifugirko. Prefiltrirano suspenzijo smo še nato razsolili na Vivapure C18 Micro spin koloni (Sartorius) po navodilih proizvajalca.

Priprava vzorca je potekala v brezprašni komori z laminarnim tokom, zaradi zahtev čistosti vzorca.

#### Identifikacija proteinov z HPLC Chip/MS sistemom

Vzorec peptidov smo nanesli na 1200 Series HPLC-Chip/MS sistem, ki ga sestavljajo nanopretočni tekočinski kromatograf, HPLC-Chip/MS vmesnik in LC/MSD Trap XCT Ultra masni spektrometer. Peptide smo ločili na proteinskem ID čipu, na katerem se nahaja 40-nL obogatitvena kolona in 75 µL x 43 mm analitična kolona. Pri tekočinski kromatografiji je bila mobilna faza sestavljena iz topila A (0,1 % mravljična kislina) in

topila B (acetonitril). Peptide smo eluirali z uporabo 42 min gradiента od 3-90 % topila B. Podatke smo analizirali s programom Spectrum Mill in identificirane proteine poiskali v NCBIInr podatkovni bazi (NCBI, 2010).

### 3.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižno reakcijo s polimerazo smo uporabili za pomnožitev sedmih genov za izbrane površinske proteine *L. lactis*, gena za flagelin in za uvedbo restriktičnih mest NcoI/XbaI ter histidinskega peptida na terminalih gena za hepatitis A. Za vsako PCR reakcijo smo uporabili primerno šablono za pomnoževanje in začetna oligonukleotida. Kombinacijo le teh za določen namen prikazuje preglednica 7. Pri PCR smo uporabljali DreamTaq™ Green DNK polimerazo in pripadajoč 10x DreamTaq™ Green pufer. Pufer že vsebuje MgCl<sub>2</sub> in dve različni barvili, kar omogoča direkten nanos PCR produktov na gel. Polimeraza omogoča pomnožitev daljših fragmentov in poveča donos PCR v primerjavi s konvencionalno *Taq* polimerazo. Pogoje za izvedbo PCR reakcije prikazuje preglednica 8.

#### Izvedba:

Pripravili smo naslednje reakcijske mešanice v PCR mikrocenrifugirkah:

1 µL šablone  
2 µL začetnega oligonukleotida F (ang. forward- napredujuč)  
2 µL začetnega oligonukleotida R (ang. reverse- nasprotn)  
5 µL 10x DreamTaq Green pufera  
8 µL dNTP  
27 µL dH<sub>2</sub>O  
5 µL polimeraze (0,25 µL DreamTaq Green DNK polimeraze + 4,75 µL dH<sub>2</sub>O)  
 $\Sigma = 50 \mu\text{L}$

Preglednica 7: Šablone in začetni oligonukleotidi uporabljeni pri PCR mešanicah za različne namene

Šablona	Začetni oligonukleotidi	Namen
pGEM-Flic	F:Flic-F-spac R:Flic-R-EcoNS	pomnožitev gena za flagelin
pUC-HAV	F: H2a-F-Nco R: H2a-R-Xba	uvedba restriktičnih mest NcoI/XbaI na terminalih gena za hepatitis
genomska DNK NZ9000	F: 0551-F R:0551-R	pomnožitev gena za llmg_0551
genomska DNK NZ9000	F: 2020-F R:2020-R	pomnožitev gena za llmg_2020
genomska DNK NZ9000	F: 2232-F R:2232-R	pomnožitev gena za llmg_2232
genomska DNK NZ9000	F: 2330-F R:2330-R	pomnožitev gena za llmg_2330
genomska DNK NZ9000	F: 0168-F R:0168-R	pomnožitev gena za llmg_0168
genomska DNK NZ9000	F: 1907-F R:1907-R	pomnožitev gena za llmg_1907
genomska DNK NZ9000	F: 1064-F R:1064-R	pomnožitev gena za llmg_1064
pGEM-HAV NcoI/XbaI	F: H2a-F-Nco R: H2a-R-6His	uvedba histidinske oznake na koncu gena za HAV

Preglednica 8: Pogoji za izvedbo PCR

Reakcija	Temperatura	Čas
začetna denaturacija	94 °C	5 min
denaturacija	94 °C	30 s
vezava začetnih oligonukleotidov	46 °C	1 min
podaljševanje verige	72 °C	1 min
končno podaljševanje verige	72 °C	5 min
ohladitev zmesi	4 °C	∞

} 30 ciklov

Po končani PCR smo celoten volumen produktov nanesli na agarozno gelsko elektroforezo.

### 3.3.3 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je učinkovita metoda ločevanja molekul DNK po velikosti v agaroznem gelu v električnem polju. Agaroza je linearen polisaharid, ki je topen v vročem pufru, pri ohlajanju pa polimerizira in tvori gel. Hitrost potovanja negativno nabite DNK je odvisna od velikosti DNK, zamreženosti gela in jakosti električnega polja. Pri agarozni gelski elektroforezi smo uporabili barvilo SYBR Safe, ki ima podobno občutljivost kot etidijev bromid, vendar je veliko manj toksičen in mutagen. Za določanje velikosti fragmentov smo uporabili 100 bp in 1 kb označevalce velikosti.

Agarozno gelsko elektroforezo smo uporabili za ločitev PCR produktov, produktov restrikcije in produktov PCR na kolonijah.

#### Izvedba:

Na začetku smo sestavili ogrodje za vlivanje gela in vstavili ustrezne glavnice. V stekleno erlenmajerico smo natehtali primerno količino agaroze (1,5 % za produkte PCR in restrikcije, 1 % za produkte PCR na kolonijah) in dodali 50 mL ali 150 mL TAE pufr (odvisno od velikosti gela). Agarozo smo raztopili v pufru z večkratnim segrevanjem do vrelišča v mikrovalovni pečici. Po segrevanju smo zmes ohladili do 50 °C pod hladno vodo, dodali 1 µL/10 mL gela SYBR Safe barvila, premešali in vlili v ogrodje. Po strjevanju gela smo odstranili glavnice in v nastale žepke nanesli ustrezne količine produktov (celoten volumen PCR produktov in produktov restrikcije, 10 µL produkta PCR na kolonijah). Zraven produktov smo v žepke nanesli 1 µL označevalca velikosti (zmešan z 2 µL nanašalnega pufrja in 9 µL dH<sub>2</sub>O), ki nam je omogočal določitev velikosti fragmentov. Gel smo zalili s TAE pufrom, ga pokrili s pokrovom in elektrode priklopili na vir napetosti. Velike gele smo priključili na 120 V, manjše pa na 95 V. Po končani elektroforezi smo rezultate pregledali po UV lučjo na UV transiluminatorju ali Uvitec arhivirnem sistemu, kjer smo sliko posneli s kamero, jo shranili na računalnik in natisnili na termičnem tiskalniku.

Produkte PCR in restrikcije smo izrezali pod UV lučjo, jih prenesli v mikrocentrifugirke in jih nato očistili iz gela.

### 3.3.4 Čiščenje fragmentov DNK iz gela

Za čiščenje izrezanih fragmentov DNK iz gela smo uporabili komplet reagentov Wizard SV gel and PCR Clean-Up System. Pred čiščenjem smo določili maso izrezanega koščka

gela, ki smo mu nato dodali 10 µL/10 mg gela raztopine za vezavo na membrano. Nato smo inkubirali na 62 °C s stresanjem približno 10 min, da se je gel popolnoma raztopil. Nastalo raztopino smo nanesli na kolono vstavljeni v zbiralno cevko in pustili 1 minuto, da se je vezala DNK. Vse skupaj smo potem centrifugirali na 10000 g 1 minuto, odstranili eluat in kolono vrnili v zbirno cevko. Sledilo je spiranje kolone s 700 µL in drugič s 500 µL suspenzije za spiranje membrane z dodanim etanolom. Po drugem spiranju smo centrifugirali 5 min, da se odstrani čim več etanola. Na koncu smo kolono prenesli v mikrocentrifugirko, v njo dodali 30 µL vode brez nukleaz in z enominutnim centrifugiranjem na 10000 g eluirali DNK.

### 3.3.5 Ligacija v plazmid pGEM®-T Easy

Produkte PCR lahko enostavno ligiramo v pGEM® -T Easy, saj jim Taq polimeraza na koncih doda adenin, ki se poveže s timinom na koncih plazmida. Nastanek fosfodiestrskih vezi med bazama katalizira encim ligaza.

Izvedba:

V mikrocentrifugirke smo pripravili ligacijske mešanice:

3,5 µL PCR produkta očiščenega iz gela  
1 µL pGEM-T Easy plazmida  
5 µL 2x ligacijskega pufra  
0,5 µL T4 DNK ligaze za ligacijo v pGEM  
 $\Sigma = 10 \mu\text{L}$

Ligacija je potekala 19 h na 16°C.

### 3.3.6 Transformacija kompetentnih celic *E. coli* (DH5α)

Transformacijo kompetentnih celic *E.coli* smo izvedli s temperaturnim šokom. Pri tem membrana *E.coli* postane prepustnejša za plazmid, ki vdre v celice. Uspešnost transformacije preverimo z modro/belim testom, ki ga omogoča plazmid pGEM-T Easy, saj vsebuje znotraj gena za encim β-galaktozidazo mesto za kloniranje. Na trdno LBA gojišče zato razmazemo IPTG, ki inducira izražanje gena za β-galaktozidazo, in X-gal, ki je substrat za encim β-galaktozidazo. Encim razgradi substrat v produkt, ki na zraku dimerizira v modro barvilo, kar obarva kolonije modro. Če plazmid vstavi fragment v mesto za kloniranje, je s tem prekinjeno izražanje gena za β-galaktozidazo, zato kolonije s takim plazmidom ostanejo bele.

Izvedba:

Pripravljene kompetentne celice DH5α so shranjene na -80 °C, zato smo jih pred uporabo odtalili na ledu. Po odtalitvi smo 40 µL kompetentnih celic dodali 10 µL ligacijske mešanice in inkubirali pol ure na ledu. Med inkubacijo se plazmid adherira na površino kompetentnih celic. Po inkubaciji smo izvedli temperaturni šok v vodni kopeli z 42 °C 45 s in mikrocentrifugirke prenesli za 2 min na led. Celicam smo nato dodali 950 µL LB tekočega gojišča brez antibiotika in stresali 1 h v stresalniku na 37 °C. Po stresanju smo na trdno LBA gojišče razmazali 50 µL IPTG/X-gal za modro/beli test in nato 100 µL nekoncentrirane transformacijske mešanice. Preostalo mešanico smo centrifugirali 2 min pri 7000 RPM (vrtljaji na minuto), odstranili 800 µL supernatanta in v preostalem volumnu

resuspendirali usedlino. Tako koncentriran del mešanice smo razmazali po drugi plošči LBA z X-gal. Plošče smo inkubirali čez noč v inkubatorju na 37 °C.

### 3.3.7 PCR na osnovi kolonije

PCR na osnovi kolonije smo uporabili za hiter pregled transformiranih kolonij, saj tako lahko učinkovito ugotovimo, katera kolonija vsebuje želen plazmid z vstavljenim genom in katera je lažno pozitivna.

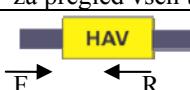
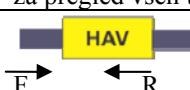
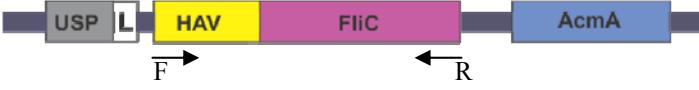
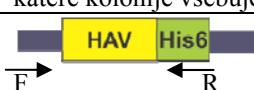
#### Izvedba:

Za PCR na osnovi kolonije smo si pripravili mešanice v PCR mikrocentrifugirkah:

1 µL začetnega oligonukleotida F  
1 µL začetnega olininukleotida R  
3 µL 10x DreamTaq Green pufra  
6 µL dNTP  
14 µL dH<sub>2</sub>O  
5 µL polimeraze (0,20 µL DreamTaq Green DNK polimeraze + 4,80 µL dH<sub>2</sub>O)  
 $\Sigma = 30 \mu\text{L}$

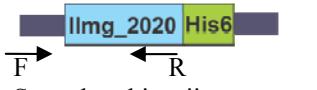
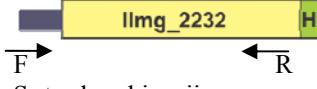
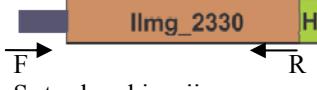
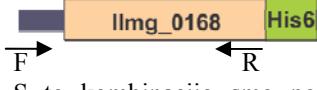
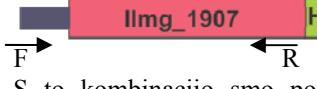
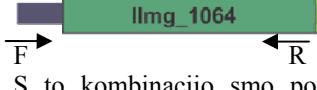
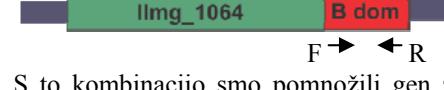
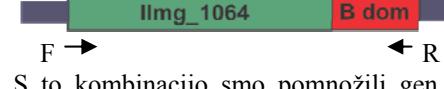
Za pregled posameznih kolonij s PCR na kolonijah smo uporabili različne kombinacije začetnih oligonukleotidov, ki jih prikazuje preglednica 9. V preglednici so prikazane tudi sheme prileganj kombinacij začetnih ologonukleotidov na določen plazmid in uporaba posamezne kombinacije.

Preglednica 9: Kombinacije začetnih oligonukleotidov uporabljene pri PCR na osnovi kolonije in shematičen prikaz prileganja začetnih oligonukleotidov ter uporaba posamezne kombinacije.

Začetni oligonukleotidi	Shema prileganja in uporaba
F: H <sub>2</sub> a-F R: AcmA-R3-XbaI	 <p>S to kombinacijo smo pomnožili gen za HAV in AcmA regijo ter tako preverili katere kolonije <i>L. lactis</i> vsebujejo plazmide z vstavljenim genom za HAV.</p>
F: SP6 R: M13 uni	 <p>univerzalna začetna oligonukleotida za pGEM-T Easy, ki sta bila uporabljena za pregled vseh transformiranih kolonij v pGEM-T Easy</p>
F: pMSpuni R: H <sub>2</sub> a-R	 <p>S to kombinacijo smo pomnožili gen za HAV in del plazmidnega zaporedja ter tako preverili katere kolonije <i>L. lactis</i> vsebujejo plazmide z vstavljenim genom za HAV.</p>
F: H <sub>2</sub> a-F R: Flic-R-EcoNS	 <p>S to kombinacijo smo pomnožili gen za HAV in flagelin ter tako preverili katere kolonije vsebujejo plazmide <i>L. lactis</i> z vstavljenimi genom za flagelin.</p>
F: pMSpuni R: H <sub>2</sub> a-R-6His	 <p>S to kombinacijo smo pomnožili gen za HAV z dodano histidinsko oznako in del plazmidnega zaporedja ter tako preverili katere kolonije <i>L. lactis</i> vsebujejo plazmide z vstavljenim genom za HAV z dodano histidinsko oznako.</p>

se nadaljuje

nadaljevanje

Začetni oligonugleotidi	Shema prileganja in uporaba
F: pMSpuni R:0551-R	 <p>S to kombinacijo smo pomnožili gen za limg_0551 in del plazmidnega zaporedja ter tako preverili katere kolonije <i>L. lactis</i> vsebujejo plazmide z vstavljenim genom za limg_0551.</p>
F: pMSpuni R:2020-R	 <p>S to kombinacijo smo pomnožili gen za limg_2020 in del plazmidnega zaporedja ter tako preverili katere kolonije <i>L. lactis</i> vsebujejo plazmide z vstavljenim genom za limg_2020.</p>
F: pMSpuni R:2232-R	 <p>S to kombinacijo smo pomnožili gen za limg_2232 in del plazmidnega zaporedja ter tako preverili katere kolonije <i>L. lactis</i> vsebujejo plazmide z vstavljenim genom za limg_2232.</p>
F: pMSpuni R:2330-R	 <p>S to kombinacijo smo pomnožili gen za limg_2330 in del plazmidnega zaporedja ter tako preverili katere kolonije <i>L. lactis</i> vsebujejo plazmide z vstavljenim genom za limg_2330.</p>
F: pMSpuni R:0168-R	 <p>S to kombinacijo smo pomnožili gen za limg_0168 in del plazmidnega zaporedja ter tako preverili katere kolonije <i>L. lactis</i> vsebujejo plazmide z vstavljenim genom za limg_0168.</p>
F: pMSpuni R:1907-R	 <p>S to kombinacijo smo pomnožili gen za limg_1907 in del plazmidnega zaporedja ter tako preverili katere kolonije <i>L. lactis</i> vsebujejo plazmide z vstavljenim genom za limg_1907.</p>
F: pMSpuni R:1064-R	 <p>S to kombinacijo smo pomnožili gen za limg_1064 in del plazmidnega zaporedja ter tako preverili katere kolonije <i>L. lactis</i> vsebujejo plazmide z vstavljenim genom za limg_1064.</p>
F: Bdom-F-BamHI R: Bdom-R-XbaI	 <p>S to kombinacijo smo pomnožili gen za B domeno in tako preverili katere kolonije <i>L. lactis</i> vsebujejo plazmide z vstavljenim genom za limg_1064 z dodano B-domeno.</p>
F: 1064-F R: Bdom-R-XbaI	 <p>S to kombinacijo smo pomnožili gen za limg_1064 in B-domeno ter tako dodatno preverili katere kolonije <i>L. lactis</i> vsebujejo plazmide s vstavljenim genom za limg_1064 z dodano B-domeno.</p>

V PCR mešanice smo dodali posamezne kolonije tako, da smo se s sterilnim koncem nastavka za pipete dotaknili kolonije na trdnem gojišču, prenesli nastavek z bakterijami v PCR mešanico in premešali. Ta del smo opravili ob gorilniku v prostoru za aseptično delo. Nato smo izvedli PCR na osnovi kolonije po programu, ki je opisan v preglednici 10.

Preglednica 10: Pogoji za izvedbo PCR na osnovi kolonije

Reakcija	Temperatura	Čas	
začetna denaturacija	99 °C	10 min	dodatek polimeraze
ohladitev	50 °C	2 min	
denaturacija	94 °C	30 s	
vezava začetnih oligonukleotidov	46 °C	1 min	
podaljševanje verige	72 °C	1 min	
končno podaljševanje verige	72 °C	5 min	
ohladitev zmesi	4 °C	∞	

} 30 ciklov

Polimerazo smo dodali v PCR mešanico po končanem prvem koraku začetne denaturacije, ko se je mešanica ohladila na 50 °C.

Po končani PCR na osnovi kolonije smo 10 µL produktov nanesli na agarozno gelsko elektroforezo in s pomočjo standardov preverili ustreznost transformiranih kolonij.

### 3.3.8 Priprava prekonočnih kultur

Prekonočne kulture smo pripravili z namenom, da namnožimo bakterije v večjih količinah za nadaljnjo uporabo. Uporabljali smo jih za izolacijo plazmidne DNK, pripravo vzorca za MS, pripravo kompetentnih celic *L. lactis* in za izražanje izbranih površinskih proteinov ter različic antigaena hepatitisa A.

#### Izvedba:

V steklene epruvete z zamaški smo aseptično odpipetirali 5 mL gojišča (LB za *E. coli*, GM-17 za *L. lactis*). V LB gojišče smo dodali 5 µL ampicilina, v GM-17 gojišče pa 2 µL kloramfenikola. Bakterije smo prenesli v gojišče s sterilnim zobotrebcem tako, da smo zobotrebec prijeli s prežarjeno pinceto, se z njim dotaknili kulture na trdnem gojišču in ga potopili v gojišče. Prekonočne kulture *E. coli* smo inkubirali čez noč na 37 °C s stresanjem, kulture *L. lactis* pa na 30 °C brez stresanja.

### 3.3.9 Izolacija plazmidne DNK (minipreparacija)

Izolacijo plazmidne DNK iz *E. coli* in *L. lactis* smo izvedli s kompletom reagentov Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System. Pri izolaciji plazmidne DNK iz *L. lactis* smo predhodno razgradili celično steno z lizocimom in mutanolizinom zaradi debele celične stene *L. lactis*.

#### Izvedba:

Najprej smo v mikrocentrifugirko prelili 1,5 mL prekonočne kulture ustreznega plazmida in jo nato centrifugirali na 10000 RPM 5 min. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in še enkrat dodali 1,5 mL kulture ter ponovili centrifugiranje. Spet smo odlili supernatant in nato v primeru *E. coli* dodali 250 µL suspenzije za resuspendiranje, pri *L. lactis* pa 210 µL suspenzije za resuspendiranje, 40 µL lizocima in 1 µL mutanolizina. Za učinkovito

razgradnjo celične stene *L. lactis* smo inkubirali suspenzije na 37 °C s stresanjem 25 minut. V nadaljevanju je potekala izolacija DNK enako za *E. coli* in *L. lactis* po protokolu Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, 2009). V mikrocentrifugirke smo dodali 250 µL suspenzije za lizo, premešali s štirikratnim obračanjem, dodali 10 µL raztopine alkalne proteaze, premešali z obračanjem in inkubirali 5 min. Nato smo dodali 350 µL raztopine za nevtralizacijo in centrifugirali 10 minut pri maksimalni (max.) hitrosti. Sledila je vezava plazmidne DNK na kolono, tako da smo vstavili kolono v zbiralno cevko in vanjo odpipetirali supernatant. Pustili smo 1 min, da se je vezala DNA, in nato centrifugirali pri max. hitrosti 1 minuto. Iz zbiralne cevke smo odstranili zbrano tekočino in sprali kolono prvič s 750 µL razopine za spiranje z dodanim etanolom in drugič z 250 µL raztopine za spiranje z dodanim etanolom. Po 2 min centrifugiranju pri max. hitrosti smo kolone prenesli v sterilno centrifugirko in DNK eluirali z 80 µL vode brez nukleaz.

Na koncu izolacije plazmidne DNK smo izmerili koncentracije DNK na Nano Drop spektrofotometru.

### **3.3.10 Določanje nukleotidnega zaporedja plazmidne DNK**

Nukleotidnega zaporedja plazmidne DNK izolirane iz *E. coli* in *L. lactis* nismo določali sami, ampak smo vzorce poslali v Nemčijo na Eurofins MWG Operon's sequencing service. Rezultate sekvenc, ki smo jih prejeli, smo analizirali s programom ClustalW (EMBL-EBI, 2009), ki je prosti dostopen na medmrežju.

### **3.3.11 Cepitev DNK s pomočjo restrikcijskih encimov**

DNK smo cepili z restrikcijskimi encimi tako, da smo si na začetku pripravili restrikcijske mešanice v mikrocentrifugirkah. Vsaka restrikcijska mešanica je vsebovala plazmid, iz katerega smo izrezali želen gen, primerne restrikcijske encime, pripadajoč pufer in destilirano vodo, s katero smo dopolnili mešanico do 30 µL. Po enakem postopku smo pripravili restrikcijsko mešanico za razrez plazmida. Tako smo ustvarili komplementarne lepljive konce, in omogočili ligacijo gena v plazmid. Sestavo restrikcijskih mešanic za pripravo plazmidov z vstavljenimi različicami antigaena hepatitisa A prikazuje preglednica 11, za pripravo plazmidov z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine pa preglednica 12.

Preglednica 11: Restriktijske mešanice za pripravo plazmidov z vstavljenimi geni za različice antigena hepatitisa A

Izrez gena 1	Razrez plazmida 1	Izrez gena 2	Razrez plazmida 2
15 µL pGEM-HAV Nco/Xba 2 µL NcoI 1 µL XbaI 3 µL NEBuffer 2 9 µL dH <sub>2</sub> O	15 µL pSDLBA3b 2 µL NcoI 1 µL XbaI 3 µL NEBuffer 2 9 µL dH <sub>2</sub> O	21 µL pUC-HAV 2 µL BamHI 1 µL EcoRI 3 µL NEBuffer 4 3 µL dH <sub>2</sub> O	15 µL pSDLBA3b 2 µL BamHI 1 µL EcoRI 3 µL NEBuffer 4 9 µL dH <sub>2</sub> O
Σ= 30 µL	Σ= 30 µL	Σ= 30 µL	Σ= 30 µL
Izrez gena 3	Razrez plazmida 3	Izrez gena 4	Razrez plazmida 4
15 µL pGEM-HAV Nco/Xba His6 2 µL NcoI 1 µL XbaI 3 µL NEBuffer 2 9 µL dH <sub>2</sub> O	15 µL pSDLBA3b 2 µL BamHI 1 µL EcoRI 3 µL NEBuffer 2 9 µL dH <sub>2</sub> O	15 µL pGEM-FliC 1 µL EcoRI-HF 3 µL NEBuffer 4 11 µL dH <sub>2</sub> O	20 µL pSD-HAV 1 µL EcoRI-HF 3 µL NEBuffer 4 6 µL dH <sub>2</sub> O
Σ= 30 µL	Σ= 30 µL	Σ= 30 µL	Σ= 30 µL

Preglednica 12: Restriktijske mešanice za pripravo plazmidov z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine s histidinsko oznako in dodatek B domene v pNZ-1064

Izrez gena X	Razrez plazmida	Izrez gena za B dom.	Razrez plazmida
15 µL pGEM-X 2 µL NcoI 1 µL BamHI-HF 3 µL NEBuffer 4 9 µL dH <sub>2</sub> O	15 µL pSD-HAV Nco/Xba His6 2 µL NcoI 1 µL BamHI-HF 3 µL NEBuffer 4 9 µL dH <sub>2</sub> O	15 µL pGEM-B dom. 1 µL BamHI-HF 1 µL XbaI 3 µL NEBuffer 4 0,3 µL BSA 9,7 µL dH <sub>2</sub> O	15 µL pNZ-1064 1 µL BamHI-HF 1 µL XbaI 3 µL NEBuffer 4 0,3 µL BSA 9,7 µL dH <sub>2</sub> O
Σ= 30 µL	Σ= 30 µL	Σ= 30 µL	Σ= 30 µL

Črka X predstavlja oznako za posamezen izbran površinski protein (llmg\_0551, llmg\_2020, llmg\_2232, llmg\_2330, llmg\_0168, llmg\_1907 in llmg\_1064).

Vse restriktijske mešanice smo stresali v termobloku na 37 °C približno 3 ure. Uspešnost restriktije smo preverili na agarozni gelski elektroforezi tako, da smo vsaki mešanici na koncu restriktije dodali 6 µL 6x nanašalnega pufra za elektroforezo, nanesli celoten volumen na gel in na koncu elektroforeze določili velikosti ločenih fragmentov DNK s pomočjo označevalcev velikosti pod UV lučjo. Ustrezne fragmente DNK in plazmide smo izrezali pod UV lučjo in jih očistili iz gela.

### 3.3.12 Ligacija izrezanih fragmentov DNK

Očiščene izrezane fragmente DNK smo ligirali s pomočjo T4 DNK ligaze, ki katalizira nastanek fosfodiesterske vezi in tako poveže lepljive konce fragmentov v načrtovan plazmid.

#### Izvedba:

V mikrocentrifugirke smo pripravili ligacijske mešanice:

- 13 µL fragmenta X
- 13 µL plazmida Y
- 3 µL 10x ligacijskega pufra
- 1 µL T4 DNK ligaze
- Σ = 30 µL

Različne kombinacije fragmenta X in plazmida Y pri ligaciji za nastanek načrtovanega plazmida prikazuje preglednica 13.

Preglednica 13: Kombinacije fragmenta X in plazmida Y pri ligaciji za nastanek načrtovanega plazmida

Kombinacija	Načrtovan plazmid
X: HAV Nco/Xba Y: pNZ8148	pNZ-HAV Nco/Xba
X: HAV Y: pSDLBA3b	pSD-HAV
X: HAV Nco/Xba His6 Y: pNZ8148	pNZ-HAV Nco/Xba His6
X: FliC Y: pSD-HAV	pSD-HAV-FliC
X: llmg_0551 Y: pNZ8148 z His6	pNZ-0551
X: llmg_2020 Y: pNZ8148 z His6	pNZ-2020
X: llmg_2232 Y: pNZ8148 z His6	pNZ-2232
X: llmg_2330 Y: pNZ8148 z His6	pNZ-2330
X: llmg_0168 Y: pNZ8148 z His6	pNZ-0168
X: llmg_1907 Y: pNZ8148 z His6	pNZ-1907
X: llmg_1064 Y: pNZ8148 z His6	pNZ-1064
X: B dom. Y: pNZ-1064 brez His6	pNZ-1064-B dom.

Ligacija je potekala 19 h na 16 °C.

### 3.3.13 Čiščenje ligacijske mešanice pred elektroporacijo

Pred elektroporacijo kompetentnih celic *L. lactis* smo očistili ligacijske mešanice z uporabo reagentov Wizard SV gel and PCR Clean-up System. Postopek čiščenja ligacijske mešanice je bil podoben čiščenju PCR produktov iz gela, le da raztopljanje ni bilo potrebno, ampak smo kar mešanici dodali enak volumen raztopine za vezavo na membrano. Naprej smo sledili navodilom proizvajalca in na koncu eluirali plazmidno DNK s 30 µL vode brez nukleaz (Promega, 2002)

Pred elektroporacijo smo očiščeno ligacijsko mešanico skoncentrirali na vakuumskem koncentratorju do približno 5 µL.

### 3.3.14 Priprava kompetentnih celic *L. lactis* za elektroporacijo

Za gensko manipulacijo sevov je pomembno omogočiti vstop DNK v celice *L. lactis*. Med razvojem metode za transformacijo *L. lactis* se je izkazala za najučinkovitejšo elektroporacija celic. *L. lactis* je G+ bakterija in ima debelo celično steno, kar predstavlja fizično prepreko za vstop DNK v celice med postopkom transformacije. To predstavlja oviro tudi pri elektroporaciji *L. lactis*, zato je potrebno celice prej obdelati tako, da

oslabimo celično steno in s tem izboljšamo prenos DNK v celico. Ugotovili so, da visoko uspešnost transformacije dosežemo z rastjo celic *L. lactis* v osmotsko stabilnem gojišču z glicinom, zato je potrebno pred elektroporacijo pripraviti kompetentne celice, ki omogočajo učinkovit sprejem tuje DNK (Holo in Nes, 1995).

Izvedba:

V štiri steklene epruvete z zamaški smo odpipetirali 10 ml tekočega gojišča GM-17 in nato ob 10., 12. 14. in 16. uri v eno epruveto nacepili kulturo NZ9000. Kulturo smo nacepili tako, da smo se z zobotrebcem dotaknili ene kolonije NZ9000 na trdnem gojišču in prenesli zobotrebec v epruveto s tekočim gojiščem. Zvečer smo pomerili optično gostoto vseh štirih kolonij, nacepljenih ob različnih časih, in tisto, ki je imela OD<sub>600</sub> 0,5-0,8 100x razredčili v SGM-17 z dodanim glicinom. Kulturo smo pustili rasti čez noč (12-16 h) do optične gostote pri 600 nm 0,2-0,7. Rast je potekala v inkubatorju na 30 °C. Kulturo smo nato prelili v dve veliki centrifugirki in centrifugirali 20 min, pri 5000 g in 4 °C. Po centrifugiraju smo odlili supernatant in celice resuspendirali v 20 mL hladne 0,5 M saharoze z 10 % glicerolom. Nastalo suspenzijo smo prenesli v 50 mL centrifugirke in nato centrifugirali 15 min pri 5000 g in 4 °C. Postopek spiranja smo še enkrat ponovili in potem celice resuspendirali v takem volumnu 0,5 M saharoze z 10 % glicerolom, kot je celic (ocenimo približno). Kompetentne celice smo na koncu razdelili v 1,5 mL mikrocenrifugirke po 100 µL, jih zamrznili v tekočem dušiku in prenesli na -80 °C.

### 3.3.15 Elektroporacija kompetentnih celic *L. lactis*

Elektroporacijo kompetentnih celic *L. lactis* smo uporabili za vstavljanje ligacijskih mešanic v *L. lactis* in za namnožitev plazmidne DNK. Postopek je potekal po navodilih za elektroporacijo v *L. lactis* (Holo in Nes, 1995).

Izvedba:

Kompetentne celice *L. lactis* smo najprej odtalili na ledu. V pripravljene mikrocentrifugirke smo odpipetirali 45 µL kompetentnih celic in jim nato dodali 5 µL ligacijske mešanice (za namnožitev 2 µL izolirane plazmidne DNK). Mešanico smo narahlo premešali in s pipeto prenesli v elektroporacijsko kiveto, ki smo jo predčasno ohladili na ledu. Mešanico v kivetah smo zbrali na dnu kivete in odstranili zračne mehurčke, ki v kiveti ne smejo biti prisotni. Na aparaturi za elektroporacijo smo nastavili napetost 2,0 kV, kapaciteta 25 µF in upornost 200 Ω. Elektroporacijsko kiveto smo nato namestili v aparaturo za elektroporacijo in skozi spustili kratek pulz, ki povzroči luknje v membrani ter s tem vstop DNK v celice *L. lactis*. Tako po sprožitvi pulza smo dodali v kiveto 1 mL gojišča SGM17, premešali in prenesli v mikrocentrifugirko. Po dveh urah inkubacije na 30 °C smo 100 µL mešanice celic razmazali po plošči s trdnim gojiščem GM-17C10. Preostali del smo centrifugirali 2 min na 5000 RPM, odstranili 800 µL supernatanta in prestali del resuspendirali. Tako skoncentriran del elektroporacijske mešanice smo prav tako razmazali na plošče s trdnim gojiščem GM-17C10. Plošče smo inkubirali 2 dni na 30 °C in nato uspešnost transformacije preverili s PCR na osnovi kolonije, pripravili prekonočne kulture, izolirali plazmidno DNK in določili nukleotidno zaporedje.

### **3.3.16 Izražanje različic antigaena hepatitisa A in izbranih površinskih proteinov v/na *L. lactis***

Največkrat uporabljen in podrobno opisan sistem za nadzorovano izražanje genov v *Lactococcus lactis* je z nizinom nadzorovani sistem za izražanje NICE (NIsin Controlled gene Expression). Izražanje proteina se inducira z nizinom, ki je bakteriocin in tudi sredstvo za konzerviranje hrane zaradi njegovega antimikrobnega delovanja (Mierau in Kleerebezem, 2005).

#### Izvedba:

V steklene epruvete z zamaški smo odpipetirali 10 mL gojišča GM-17 in dodali 4 µL kloramfenikola ter 100 µL prekonočne kulture bakterij z ustreznim plazmidom (pSD-HAV, pSD-HAV Nco/Xba, pSD-FliC, pNZ-0551, pNZ-2020,...). Celice smo nato inkubirali v inkubatorju brez stresanja na 30 °C do OD<sub>600</sub>=0,5-0,8. Ko so celice zrasle do primerne optične gostote, smo jih dodali 10 µL nizina (25 ng/mL) in tako inducirali izražanje želenega proteina. Po treh urah indukcije na 30 °C smo iz epruvet z izraženimi izbranimi površinskimi proteini odvzeli 1 mL vzorca in ga shranili v hladilniku za kasnejšo analizo s pretočno citometrijo. Preostali del smo odlili v sterilno centrifugirko in centrifugirali 10 min pri 5000 g in 4 °C. V primeru izražanja različic antigaena hepatitisa A smo celoten volumen prenesli v centrifugirko, saj nismo opravljali analiz s pretočnim citometrom. Po centrifugiranju smo odlili supernatant, celice resuspendirali v 400 µL PBS in prenesli v mikrocentrifugirke, ki smo jih shranili na -20 °C za NaDS PAGE in prenos Western.

### **3.3.17 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS**

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS uporabljamo za ločevanje proteinov glede na njihovo velikost. NaDS je negativno nabit detergent, ki denaturira proteine tako, da podre njihovo sekundarno in terciarno strukturo in jih s tem linearizira. NaDS prekrije proteine, zaradi česar ti dobijo negativni naboј, kar omogoča migracijo proteinov proti pozitivnemu polu v električnem polju. Negativen naboј proteina je sorazmeren z velikostjo proteina in ni odvisen od strukture proteina, zato poteka ločevanje le glede na velikost proteinov. Poliakrilamid je polimer sestavljen iz akrilamidnih monomerov. Polimerizacija akrilamida steče ob prisotnosti amonijevega persulfata in TEMEDa. Ločevanje proteinov izboljšamo z uporabo dveh različno koncentriranih gelov. Na vrhu pripravimo manj zamrežen koncentracijski gel, ki omogoča skoncentriranje proteinov v zelo ozkem pasu. Ti nato hkrati vstopijo v separacijski gel, kjer se zaradi večje zamreženosti proteini ločijo po velikosti.

Ločene proteine po elektroforezi lahko detektiramo z nespecifičnim barvanjem z barvili, kot je Coomassie Brilliant Blue, ali imunološkimi tehnikami z uporabo protiteles.

#### Izvedba:

Najprej smo sestavili ogrodje za vlivanje gelov (Mini-Protean II apparatus) in zmešali prve štiri sestavine za 4 % koncentracijski in 12 % separacijski gel (preglednica 14). Nato smo najprej v separacijski gel dodali APS in TEMED, premešali in vlili med stekelca približno 5 mL gela. Na vrhu smo vlili 1 mL z vodo nasičenega butanola, ki zravnava gladino gela. Počakali smo da se gel strdi in nato odlili butanol ter preostanek popivnali s filter papirji.

Do konca smo pripravili koncentracijski gel tako, da smo dodali APS in TEMED, premešali in ga nalili med stekelca na separacijski gel do vrha. Na vrhu smo vstavili med stekelca glavniček in spet počakali, da se gel strdi. Po strjevanju smo odstranili glavniček in okvir z gelom vstavili v ogrodje za NaDS PAGE ter prenesli v posodo, kjer smo na sredino nalili 1x NaDS pufer, tako da je bil gel do vrha prekrit s pufrom.

Preglednica 14: Količine sestavin za pripravo koncentracijskega in separacijskega gela

Sestavine	4% gel	12 % gel
Akrilamid (40 %)	1 mL	6 mL
pufer	2,5 mL	5 mL
10 % NaDS	100 µL	200 µL
dH <sub>2</sub> O	6,34 mL	8,68 mL
10 % APS	50 µL	100 µL
TEMED	10 µL	20 µL

#### Priprava vzorcev:

Najprej smo v ledeni kopeli odtalili zamrznjene shranjene vzorce izraženih proteinov v *L. lactis* in nato celice lizirali s kratkim ultrazvočnim razbijanjem. V mikrocentrifugirke smo zamešali 14 µL vzorca, 5 µL 4x NaDS nanašalnega pufra in 1 µL DTT. Vzorce smo nato kuhalni v vodni kopeli 5 min in nato kratko centrifugirali.

Tako pripravljeni vzorce smo nanesli na gel v žepke, kjer smo v en žepek dodali 5 µL proteinskega označevalca velikosti. Posodo smo prekrili s pokrovom in elektrode priklopili na vir napetosti. Elektroforezo smo izvajali pri 60 mA v primeru dveh gelov, če pa je bil samo en gel pa pri 30 mA, tako dolgo, da je elektroforezna fronta pripravila skoraj do konca gela. Po končani elektroforezi smo previdno razdrli ogrodje in okvir z gelom. Zgornji koncentracijski gel smo odrezali, preostanek gela pa položili v petrijevko. Gel z ločenimi proteini smo nato pobarvali s Coomassie Brilliant Blue barvilom ali uporabili za prenos Western.

Barvanje gela s Coomassie Brilliant Blue je potekalo tako, da smo zmešali 30 mL barvila in 30 mL ocetne kisline, ter vlili v petrijevko z gelom. Gel smo stresali v barvili 1-2 h in ga nato razbarvali s stresanjem 20 min v 30 % razbarvalni raztopini ter čez noč v 10 % razbarvalni raztopini. Drugi dan smo gel prenesli v vodo in vidne lise s proteinimi poslikali.

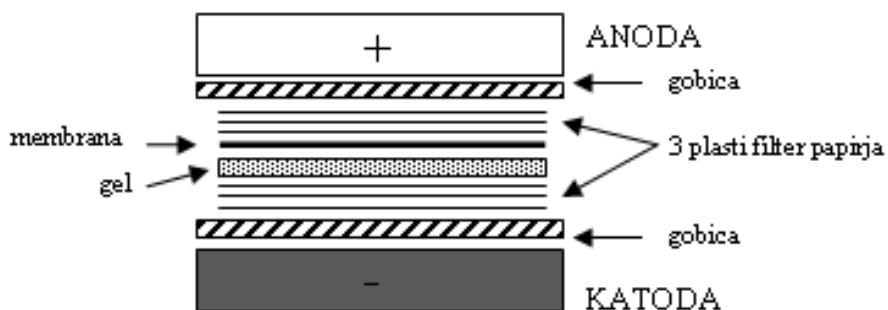
#### **3.3.18 Prenos Western in detekcija proteinov s protitelesi**

Najbolj specifična detekcija proteinov je z uporabo protiteles. Ker s protitelesi ne moremo direktno označevati proteinov ločenih na NaDS PAGE, jih moramo prenesti na PVDF membrano ali nitrocelulozno membrano s pomočjo električnega toka, kar imenujemo prenos Western. Po prenosu moramo membrano inkubirati v blokirni raztopini, da blokiramo mesta na membrani in s tem preprečimo vezavo nespecifičnih protiteles. Po blokiranju membrane sledi označevanje s protitelesi, kjer lahko uporabljam različna protitelesa. Velikokrat se uporablja kombinacija primarnih in sekundarnih protiteles, kjer so primarna protitelesa usmerjena proti specifičnemu proteinu, sekundarna pa proti primarnemu protitelesu in so označena. Sekundarna protitelesa so lahko označena radioaktivno, fluorescenčno ali z encimom, ki ob prisotnosti substrata tvori produkt, ki ga lahko detektiramo.

V našem primeru smo uporabili več različnim protiteles. Pri označevanju izraženih različic antiga hepatitisa A smo uporabili primarna protitelesa proti HAV in sekundarna protitelesa, ki so bila konjugirana s peroksidazo. V prisotnosti substrata je nastal produkt, ki smo detektirali na filmu s pomočjo kemoluminiscence. Pri označevanju izbranih površinskih proteinov smo uporabili fluorescenčno označena in s peroksidazo označena protitelesa proti histidinski oznaki, ki naj bi se izrazila skupaj z izbranim površinskim proteinom.

Izvedba:

Najprej smo si izrezali filter papirje in PVDF membrano v velikosti gela. Filter papirje in gobice smo namočili v pufru za prenos, membrano pa smo najprej aktivirali v metanolu in jo nato prenesli v pufer za prenos. Prav tako smo v pufer za prenos prenesli gele z ločenimi proteini po NaDS PAGE. Ves pripravljen material smo sestavili v sendvič po postopku, ki ga prikazuje slika 12. Pri tem smo pazili, da med posameznimi plastmi ni bilo nobenih zračnih mehurčkov.



Slika 12: Shema prenosa Western

Pripravljena sendviča smo vstavili v ogrodje naprave za prenos Western, dodali posodo z ledom za hlajenje in zalili s pufrom za prenos. Posodo smo prekrili s pokrovom z elektrodamami in jih priključili na napetost 100 V ter pustili, da je prenos potekal eno uro in pol. Po prenosu smo membrane položili v petrijevke z blokirno raztopino in pustili stresati na stresalniku 2 h. Nato smo membrane prenesli v polivinilasto vrečko, dodali ustrezno raztopino protiteles in vrečko zatalili. Zataljeno vrečko smo položili v petrijevko in označevanje s protitelesi je tako potekalo čez noč na stresalniku v hladni sobi na 4 °C. V primeru označevanja s fluorescenčno označenimi protitelesi, smo petrijevke z zataljenimi vrečkami pokrili z aluminijasto folijo, saj je tako označevanje potekalo v temi. Drugi dan smo membrane prenesli v TBST pufer in jih sprali tako, da smo jih štirikrat po 15 min stresali v TBST pufru. Fluorescenčno označene proteine na membrani smo po spiranju detektirali na fluorescenčnem detektorju slike in slike shranili. S peroksidazo označene proteine smo detektirali s pomočjo kemoluminiscence, tako da smo na membrano dodali 750 µL Lumi-Light substrata, inkubirali 2 min in prenesli v kaseto za ekspozicijo. V temnici smo v kaseto namestili film, eksponirali nekaj minut in nato takoj razvili film. Postopek smo ponovili pri različnih časih ekspozicije in tako pridobili najustreznejšo sliko.

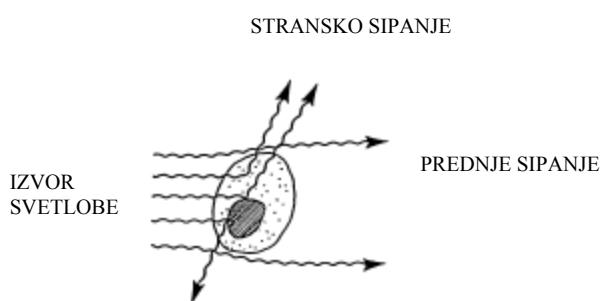
Označevanje različic antiga hepatitisa A je potekalo s pomočjo primarnih in sekundarnih s peroksidazo označenih protiteles. V tem primeru smo čez noč membrane inkubirali v

raztopini primarnih protiteles. Naslednji dan po smo membrane sprali s TBST (štirikrat po 15 min) in jih prenesli v raztopino sekundarnih protiteles. Označevanje s sekundarnimi protitelesi je potekalo eno uro na stresalniku na sobni temperaturi. Nato smo membrano spet sprali s TBST in proteine detektirali s pomočjo kemoluminiscence, kot je opisano zgoraj.

### 3.3.19 Pretočna citometrija izraženih izbranih površinskih proteinov in proteina llmg\_1064 z dodano B domeno

Pretočna citometrija je metoda za karakterizacijo in merjenje lastnosti celic in celičnih komponent, ki potujejo skozi laserski žarek v tekočinskem toku. Na mestu, kjer prihaja do interakcij med laserskim žarkom in tokom celic, celice prehajajo posamezno (hidrodinamsko fokusiranje). Pri prehodu skozi laserski žarek celice oddajo svetlobne signale, ki so odvisni od njihove velikosti, granuliranosti, notranje kompleksnosti in intenzitete fluorescence (BD Biosciences, 2000).

Pretočni citometer je sestavljen iz treh glavnih sistemov: tekočinski, optični in elektronski. Tekočinski sistem ima vlogo transportiranja celic v toku do laserskega žarka, optični sistem s pomočjo laserjev ustvarja svetlobni signal in s pomočjo optičnih filtrov detektira oddani signal, elektronski sistem pa pretvori detektiran svetlobni signal v elektronski signal, ki ga lahko računalniško obdelamo. Pri interakciji laserskega žarka s celicami pride do razprševanja svetlobe in emitacije fluorescenčne svetlobe. Razpršeno svetlobo, ki jo oddaja obsevana celica, merita dva fotodetektorja (slika 13). Prvi se imenuje FALS (forward angle light scatter) in se nahaja v ravnini poti laserskega žarka ter omogoča zapis parametra prednjega sipanja (forward scatter, FSC), ki nastane zaradi kontakta s celičnimi membranami in je sorazmeren velikosti celice. Drugi fotodetektor se imenuje RALS (right angle light scatter) in se nahaja pravokotno od poti laserskega žarka ter omogoča zapis parametra stranskega sipanja (side scatter, SSC), ki je prenosorazmeren kompleksnosti posamezne celice.



Slika 13: Prikaz prednjega in stranskega sipanja razpršene svetlobe pri interakciji s celico (BD Biosciences, 2000: 14).

Emitirano fluorescenčno svetlobo, ki jo oddaja določeno barvilo, merijo fluorescenčni detektorji. Fluorescenčni detektorji pretvorijo svetlobne signale v električne, ki jih lahko po računalniški obdelavi prikažemo matematično ali grafično. Tako zraven morfoloških lastnosti celic, dobimo še informacije o funkcionalnih lastnostih celic (BD Biosciences, 2000). Za pretočno citometrijo smo uporabili pretočni citometer BD FACSCalibur s

sistemom dveh laserjev (488 in 633 nm) in štirih fluorescenčnih fotodetektorjev (FL1: 530 nm, FL2: 585 nm, FL3: 670 nm, FL4: 661 nm).

V našem primeru smo celice *L. lactis* z izraženimi površinskimi proteini in histidinsko oznako, označili s protitelesi proti histidinski oznaki. Protiteesa so bila fluorescenčno označena, zato smo lahko na pretočnem citometru zaznali jakost fluorescenčne svetlobe, ki so jo oddale s protitelesi označene celice *L. lactis*. Prav tako smo s pretočnim citometrom preverili funkcionalnost izbranega najučinkovitejšega nosilnega proteina z dodano B domeno. V tem primeru smo celice z izraženim površinskim proteinom llmg\_1064 in dodano B domeno označili z nespecifičnimi protitelesi, ki jih veže B domena preko Fc regije in so bila prav tako fluorescenčno označena.

Izvedba:

V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 500 µL pufra TBS. V vsako mikrocentrifugirko smo dodali 10 µL shranjenega vzorca za pretočno citometrijo (izraženi izbrani površinski proteini na površini *L. lactis*) in rahlo premešali z vorteksiranjem. Vzorce smo nato centrifugirali pri 5000 g, 3 min in 4 °C. Po centrifugiranju smo odpipetirali supernatant, dodali 300 µL TBS pufra in premešali z vorteksiranjem. Za označevanje vzorcev z izraženimi izbranimi površinskimi proteini smo dodali 3 µL protiteles proti histidinski oznaki in inkubirali s stresanjem 1 uro na sobni temperaturi. Za označevanje vzorcev z izraženim površinskim proteinom llmg\_1064 in dodano B domeno smo dodali 0,6 µL zajčjih proti mišjih protiteles in inkubirali s stresanjem 2 uri na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali po enakem postopku, kot na začetku, odstranili supernatant in usedlino resuspendirali v 200 µL 0,1 % TBST pufru. Pri vzorcih z izraženimi površinskimi proteini smo postopek spiranja s TBST še enkrat ponovili, pri vzorcih z izraženim llmg\_1064 in dodano B domeno pa smo postopek spiranja ponovili še dvakrat. Na koncu smo usedlino po centrifugiranju resuspendirali v 300 µL TBS pufra. Za merjenje jakosti fluorescence na pretočnem citometru smo označene vzorce prenesli v epruveto za pretočni citometer, ki smo jo namestili na mesto za vnos vzorca. V programu pretočnega citometra smo nastavili vse potrebne parametre in določili del celic, ki smo jim želeli zmeriti povprečno intenziteto fluorescence. Povprečno intenziteto fluorescence smo izmerili najmanj 100000 bakterijskim celicam. Na koncu smo upoštevali meritve vseh treh neodvisnih poskusov, kjer smo vsako meritev dvakrat ponovili.

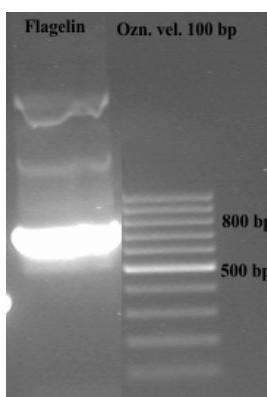
Kot negativno kontrolo smo vedno uporabili bakterije, ki so vsebovale prazen plazmid pNZ8148. Indukcija in označevanje bakterij s praznim plazmidom je potekalo po enakem postopku, kot označevanje ostalih vzorcev. Pri preverjanju funkcionalnosti izbranega površinskega proteina llmg\_1064 z dodano B domeno smo za primerjavo uporabili plazmid pSDLBA3b. V tem poskusu smo še dodatno preverili stabilnost vezave izraženega površinskega proteina llmg\_1064 z dodano B domeno tako, da smo pri pripravi vzorcev za pretočno citometrijo na začetku uporabili pufer TBS+. Tako smo v mikrocentrifugirke odpipetirali 500 µL pufra TBS+, dodali 10 µL vzorca za pretočno citometrijo, centrifugirali in nato še dvakrat sprali s TBS+. Potem smo vzorce še dvakrat sprali s TBS, da smo se znebili SDS-a, in nato nadaljevali postopek označevanja s protitelesi.

## 4 REZULTATI

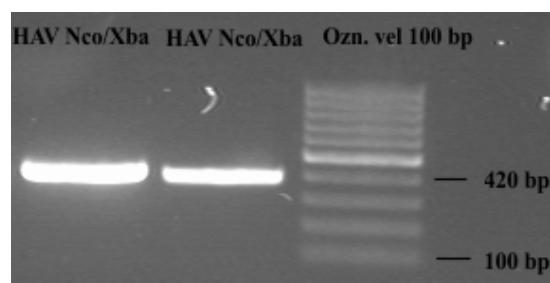
### 4.1 PREVERJANJE IZRAŽANJA RAZLIČIC ANTIGENA HEPATITISA A

#### 4.1.1 Priprava plazmidov z vstavljenimi različicami antigaena hepatitisa A

Pri pripravi laktokoknih plazmidov z vstavljenimi različicami antigaena hepatitisa A smo najprej s PCR metodo pomnožili gen za flagelin, ki smo ga želeli dodati med gen za hepatitis A in AcmA regijo v plazmidu pSD-HAV, da bi s tem povečali imunski odziv na hepatitis A. Prav tako smo s PCR pomnožili gen za HAV in mu na koncih uvedli novi restrikcijski mesti NcoI in XbaI, saj smo tako lahko v nadaljevanju s pomočjo restrikcije in ligacije odstranili celoten konstrukt iz plazmida pSDLBA3b in vstavili le gen za HAV. Rezultat pomnožitve gena za flagelin (velikost 800 bp) prikazuje slika 14, uvedbo restrikcijskih mest na koncih gena za HAV (velikost 420 bp) pa prikazuje slika 15.

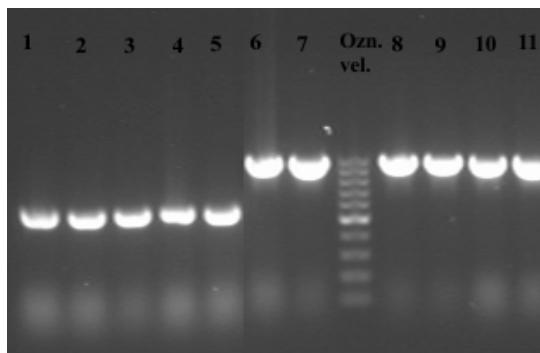


Slika 14: Pomnožitev gena za flagelin



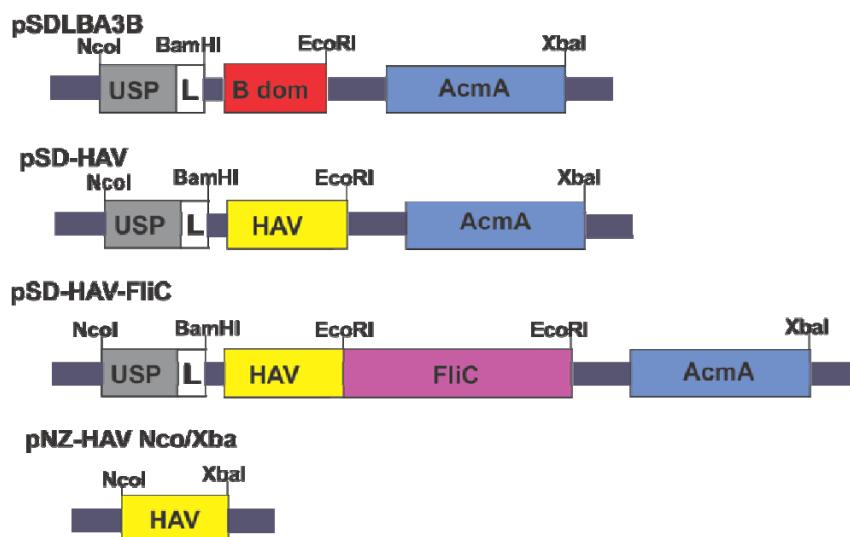
Slika 15: Rezultati uvedbe restrikcijskih mest Nco/Xba na koncu HA

Pomnožene dele DNK smo potem izrezali iz gela, očistili in najprej vstavili v pGEM-T Easy. Nato smo plazmide transformirali v *E. coli* in preverili uspešnost transformacije s PCR na osnovi kolonije, kjer smo uporabili univerzalne začetne oligonukleotide za pGEM-T Easy. Rezultate PCR na osnovi kolonije za preverjanje uspešnosti transformacije gena za flagelin in gena za HAV z restrikcijskima mestoma NcoI in XbaI prikazuje slika 16.



Slika 16: Rezultati PCR na osnovi kolonije za kolonije s plazmidi pGEM-HAV Nco/Xba in pGEM-FliC. 1-5: pGEM-HAV-Nco/Xba, ~420 bp + 200 bp plazmidnega dela; 6-11: pGEM-FliC, ~800 bp + 200 bp plazmidnega dela.

Uspešnost ligacije v plazmid smo še dodatno preverili z določanjem zaporedja dela plazmida z vstavljenim različico antigahepatitisa A. Plazmide s pravilnim zaporedjem DNK smo shranili na -20 °C. Za pripravo laktkoknih plazmidov smo z restriktijskima encimoma BamHI in EcoRI izrezali gen za HAV iz plazmida pUC-HAV in ga vstavili v plazmid pSDLBA3b, ki smo mu prej izrezali B domeno. Tako smo dobili plazmid pSD-HAV, v katerega smo v nadaljevanju še dodatno vstavili gen za flagelin, ki smo ga izrezali iz plazmida pGEM-FliC z EcoRI. Plazmid pSD-HAV smo predhodno prav tako razrezali z EcoRI. Za pripravo plazmidov z genom za HAV za izražanje znotraj celic, smo gen za HAV izrezali z restriktijskima encimoma NcoI in XbaI iz plazmida pGEM-HAV-Nco/Xba in ga vstavili v plazmid pSDLBA3b, ki smo mu predhodno odstranili celoten konstrukt, tako da je ostal samo plazmid pNZ8148. Sheme vseh treh plazmidov z vstavljenimi različicami antigahepatitisa A in plazmida pSDLBA3B prikazuje slika 17.



Slika 17: Sheme konstruktorjev z različicami antigahepatitisa A in plazmida pSDLBA3b

Laktkokne plazmide smo nato transformirali z elektroporacijo v *L. lactis*, in zrasle kolonije preverili s PCR na osnovi kolonije. Za vsak konstrukt smo uporabili drugačno kombinacijo začetnih oligonukleotidov in tako potrdili, katere kolonije vsebujejo želen plazmid. Kolonije, ki so bile pozitivne, smo namnožili čez noč in drugi dan iz njih izolirali plazmidno DNA, ki smo jo nato poslali na določanje nukleotidnega zaporedja. S pomočjo določanja zaporedja DNK smo dokazali, da plazmidi res vsebujejo želen konstrukt v pravilnem zaporedju. Nukleotidna zaporedja konstruktorjev različic antigahepatitisa A so prikazana v prilogi A. Končne laktkokne plazmide z vstavljenimi različicami antigahepatitisa A prikazuje preglednica 15.

Preglednica 15: Seznam in opis končnih pripravljenih plazmidov z vstavljenimi različicami antigahepatitisa A

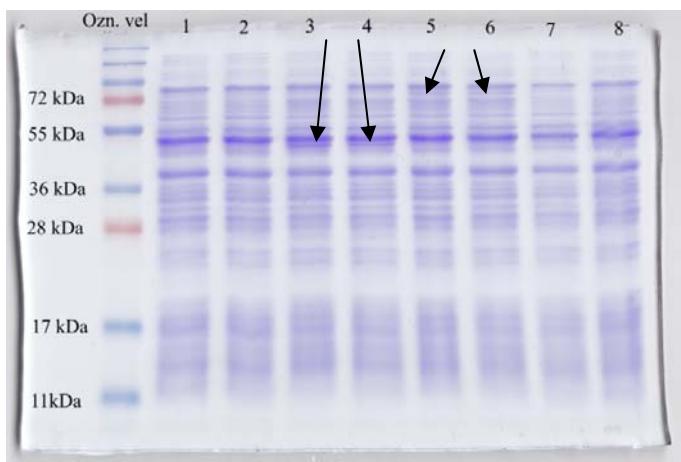
Plazmid	Opis plazmidova
pSD-HAV	pSDLBA3b z zamenjano b-dom z genom za HAV
pSD-HAV-FliC	pSDLBA3b-fuzija genov sp <sub>Usp-LEIS</sub> , HAV, FliC in acmA3b
pNZ-HAV-Nco/Xba	pNZ8148 z vstavljenim genom za HAV

#### 4.1.2 Izražanje različic antigena hepatitisa A v *L. lactis*

Izražanje različic antigena hepatitisa A v *L. lactis* je potekalo v majhnem merilu, v 10 mL gojišča z dodano prekonočno kulturo z ustreznim plazmidom. Izražanje smo inducirali z dodatkom nizina in je trajalo tri ure. Izražanje proteinov smo inducirali v dveh epruvetah z bakterijami, ki so vsebovale plazmid pNZ-HAV-Nco/Xba, v dveh epruvetah z pSD-HAV, v dveh epruvetah z pSD-HAV-FliC in v dveh epruvetah z bakterijami, ki so vsebovale prazen plazmid pNZ8148. S tem poskusom smo želeli preveriti, kako se antigen hepatitisa A izraža znotraj celic *L. lactis*, zunaj celic (z dodanim signalom za izločanje in proteinom za pritrditev na površino) in še dodatno z dodanim flagelinom. Prazen plazmid pNZ8148 je predstavljal negativno kontrolo. Po izražanju smo bakterije zbrali, odlili gojišče in nato zbrane bakterije raztopili v PBS pufru. Tako pripravljene vzorce bakterij z izraženimi proteini smo shranili na -20 °C, prav tako pa smo shranili gojišče, ki je ostal po centrifugiraju bakterij. Uspešnost Izražanja različic antigena hepatitisa smo preverili tako, da smo najprej odmrznjene celice *L. lactis* z izraženimi proteini lizirali s pomočjo ultrazvočnega razbijalca in lizate nanesli na NaDS PAGE. Ločene proteine smo detektirali z barvanjem s Commassie brilliant modrim barvilom in z označevanjem s protitelesi, ki smo ga izvedli po prenosu ločenih proteinov na membrano s prenosom Western.

##### 4.1.2.1 Rezultati NaDS PAGE in barvanja s Commassie brilliant modrim barvilm

Uspešnost izražanja različic antigena hepatitisa A smo preverili z barvanjem gela ločenih proteinov v barviliu Commassie brilliant modro. Rezultate barvanja prikazuje slika 18.



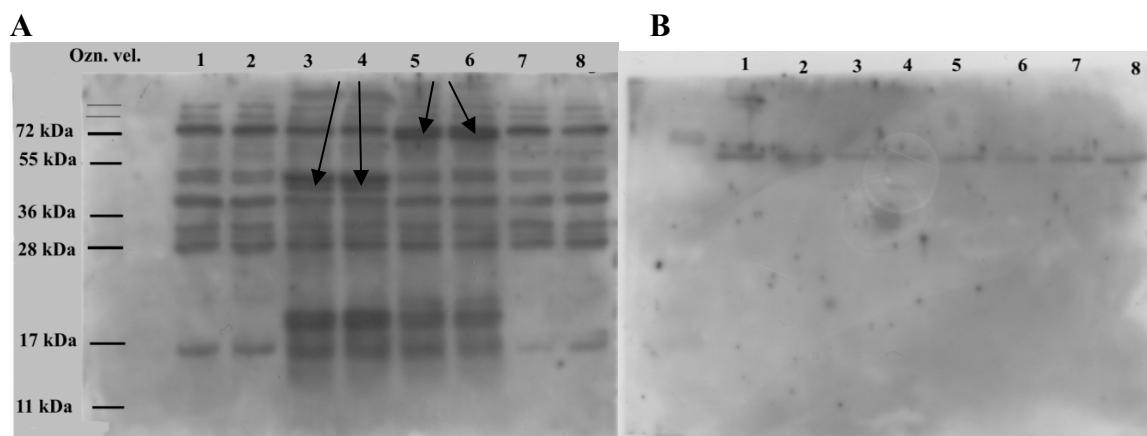
Slika 18: Rezultati NaDS PAGE izraženih različic antigena hepatitisa A v *L. lactis* s. 1, 2- pNZ-HAV-Nco/Xba, 3, 4 - pSD-HAV, 5, 6- pSD-HAV-FliC, 7, 8- pNZ8148

Pri izražanju proteinov v pNZ-HAV-Nco/Xba smo pričakovali prekomerno izražanje samega antigena hepatitisa A znotraj celic *L. lactis*. Teoretična molekulska masa antigena za HAV znaša 15,7 kDa, vendar rezultata v taki velikosti na sliki 18 nismo zasledili. Izražanje antigena za HAV z dodano regijo za izločanje in domeno za pritrditev na površino smo potrdili, saj na sliki 18 vidimo liso ustrezne velikosti, ki je označena s puščico na sliki. Molekulska masa izraženega proteina iz plazmida pSD-HAV namreč znaša 41,8 kDa. V *L. lactis* smo izrazili tudi antigen za HAV z dodanim genom za flagelinom, kar je vidno na slikah kot lisa velikosti približno 72 kDa. Izračunana vrednost

molekulske mase pSD-HAV-Flic znaša 69,5 kDa. Pri bakterijah, ki so vsebovale prazen plazmid pNZ8148 nismo zasledili prekomernega izražanja.

#### 4.1.2.2 Rezultati prenosa Western označenih različic antigahepatitisa A s protitelesi proti HAV

Označevanje s protitelesi je potekalo po prenosu proteinov na PVDF membrano s prenosom Western. Proteine smo najprej označili s primarnimi protitelesi proti antigenu za HAV in nato z sekundarnimi protitelesi, ki so bila označena s hrenovo peroksidazo. Sliko smo razvili po dodatku substrata s pomočjo filmov, ki smo jih različno dolgo izpostavili v kaseti in nato v razvijalni raztopini. Na filmih so se pojavile črne lise različne intenzitete (slika 19). Pri preverjanju izražanja različic antigahepatitisa A smo dodatno na NaDS PAGE nanesli tudi gojišča, ki smo jih shranili po centrifugiraju bakterij. S tem smo preverili ali se proteini res nahajajo v celici *L. lactis* v primeru pNZ-HAV-Nco/Xba ali so pritrjeni na površini *L. lactis* v primeru pSD-HAV in pSD-HAV-Flic. Rezultate označevanja proteinov v gojišču prikazuje slika 19b.



Slika 19. Rezultati prenosa Western označenih celičnih lizatov izraženih različic antigahepatitisa A v *L. lactis* s protitelesi proti HAV. (a) Celični lizat. (b) Gojišče. 1, 2- pNZ-HAV-Nco/Xba, 3, 4 - pSD-HAV, 5, 6 - pSD-HAV-Flic, 7, 8- pNZ8148

Z označevanjem izraženih različic antigahepatitisa A s protitelesi smo prišli do enakih rezultatov, kot z barvanjem gela ločenih proteinov v Commassie brilliant modrem barvilu. Tako na sliki 19a ne vidimo prekomernega izražanja antigahepatitisa A za HAV znotraj celic *L. lactis*, saj bi potem pričakovali liso v velikosti 15 kDa. Izražanje pNZ-HAV se tudi bistveno ne razlikuje od izražanja praznega plazmida pNZ8148. Smo pa opazili izražanje pSD-HAV, ki je na sliki vidno kot lisa velikosti približno 42 kDa, in izražanje pSD-HAV-Flic, ki je na sliki 19a vidno kot lisa velikosti približno 70 kDa. Pri označevanju gojišč po izražanju izbranih površinskih proteinov s protitelesi nismo opazili nobenih pomembnih proteinov.

## 4.2 ISKANJE IN VREDNOTENJE NOVIH NOSILNIH PROTEINOV ZA POVRŠINSKO PREDSTAVITEV

### 4.2.1 Rezultati masne spektrometrije

#### 4.2.1.1 Napoved in analiza površinskega proteoma *Lactococcus lactis* NZ9000

Program za identifikacijo proteinov je s pomočjo primerjave med eksperimentalnimi in teoretičnimi sekvcencami peptidov identificiral 171 proteinov, ki jih je razvrstil glede na število identificiranih peptidov in so bili pripisani številnim različnim vrstam mlečnokislinskih bakterij in tudi nekaterim drugim bakterijam. Med temi identificirani proteini je bilo 56 proteinov pripisanih vrsti *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 že s programom ali ročno z iskanjem informacij o proteinih v podatkovni bazi NCBI. Preglednica 15 prikazuje vseh 56 identificiranih proteinov v *L. lactis*, razvrščeni so glede na število identificiranih peptidov in od tega jih je 44 takih, ki so bili identificirani z dvema peptidoma ali več, 12 pa le z enim peptidom. V bazi NCBI smo poiskali vse informacije o identificiranih proteinih na površini *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 in jim pripisali nukleotidno in proteinsko sekenco. Nato smo s pomočjo programa Augur (Billion, 2006) določili površinske motive, ki jih program pripše identificiranim površinskim proteinom. To smo naredili tako, da smo v programu izbrali eno od ponujenih površinskih motivov proteinov in organizem, v katerem smo identificirali proteine. Program omogoča napoved površinskih motivov, kot so lipoprotein, LPXTG signal za sortiranje, z levcinom bogate regije, signalni peptid, transmembranske vijačnice, LysM domene, NLPC/P60 proteini in glicin-triptofan domene. Kot rezultat smo dobili listo vseh površinskih proteinov *L. lactis*, ki imajo predviden izbran površinski motiv, in na tej listi smo poiskali identificirane proteine z masno spektrometrijo. Augur napoved površinskih proteinov temelji na Hidden-Markov-Model (HMM) algoritmu. Med zadetke spadajo vsi proteini, ki imajo HMM rezultat nad 0. Večini identificiranih proteinov je program pripisal funkcijo signalnega peptida za izločanje, veliko je bilo takih s transmembranskimi vijačnicami, nekaj lipoproteinov in en z LPXTG signalom za sortiranje (preglednica 16). Ostalih površinskih motivov ni bilo napovedanih za noben identificiran protein. Med 56 identificiranimi proteini je bilo 15 takih, ki jih nismo našli na seznamu Augur napovedanih površinskih proteinov.

Proteinske sekvene površinskih proteinov, ki jim je Augur napovedal transmembranske vijačnice, smo dodatno vnesli v program TMHMM Server v. 2.0 (CBS, 2009), ki nam je napovedal število transmembranskih domen, kje se nahajajo in kateri del sekvene je na zunanji in notranji strani membrane. Program nam je vse te podatke tudi shematično prikazal. Prav tako smo preverili Augur napoved za lipoproteine, kjer smo proteinske sekvene vnesli v program LipPred (EIJVR, 1999), s katerim smo potrdili ali gre res za lipoproteine in kateri del lipoproteina se nahaja v membrani. S pomočjo vseh dobljenih podatkov in programa TOPO2 (Johns, 2010) smo lahko narisali sheme proteinov s transmembranskimi domenami in lipoproteine (slika 20). Na shemah so lepo vidne transmembranske domene, del lipoproteina, ki je v membrani, in deli proteinov, ki so na zunanji ter notranji strani membrane. Na shemah smo z oranžno barvo označili aminokislinsko zaporedje peptidov, ki so bili identificirani z masno spektrometrijo. Na shemah identificiranih proteinov vidimo tudi, da so bili skoraj vsi peptidi identificirani na zunanjem delu proteina, izjema so le proteini llmg\_0909, llmg\_1625 in llmg\_1680.

Ko smo zbrali vse podatke o identificiranih proteinih, jim določili funkcije in narisali sheme, smo med njimi izbrali sedem kandidatnih nosilnih proteinov za površinsko predstavitev v mlečnokislinski bakteriji *L. lactis*.

Preglednica 16: Identificirani proteini na površini *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363

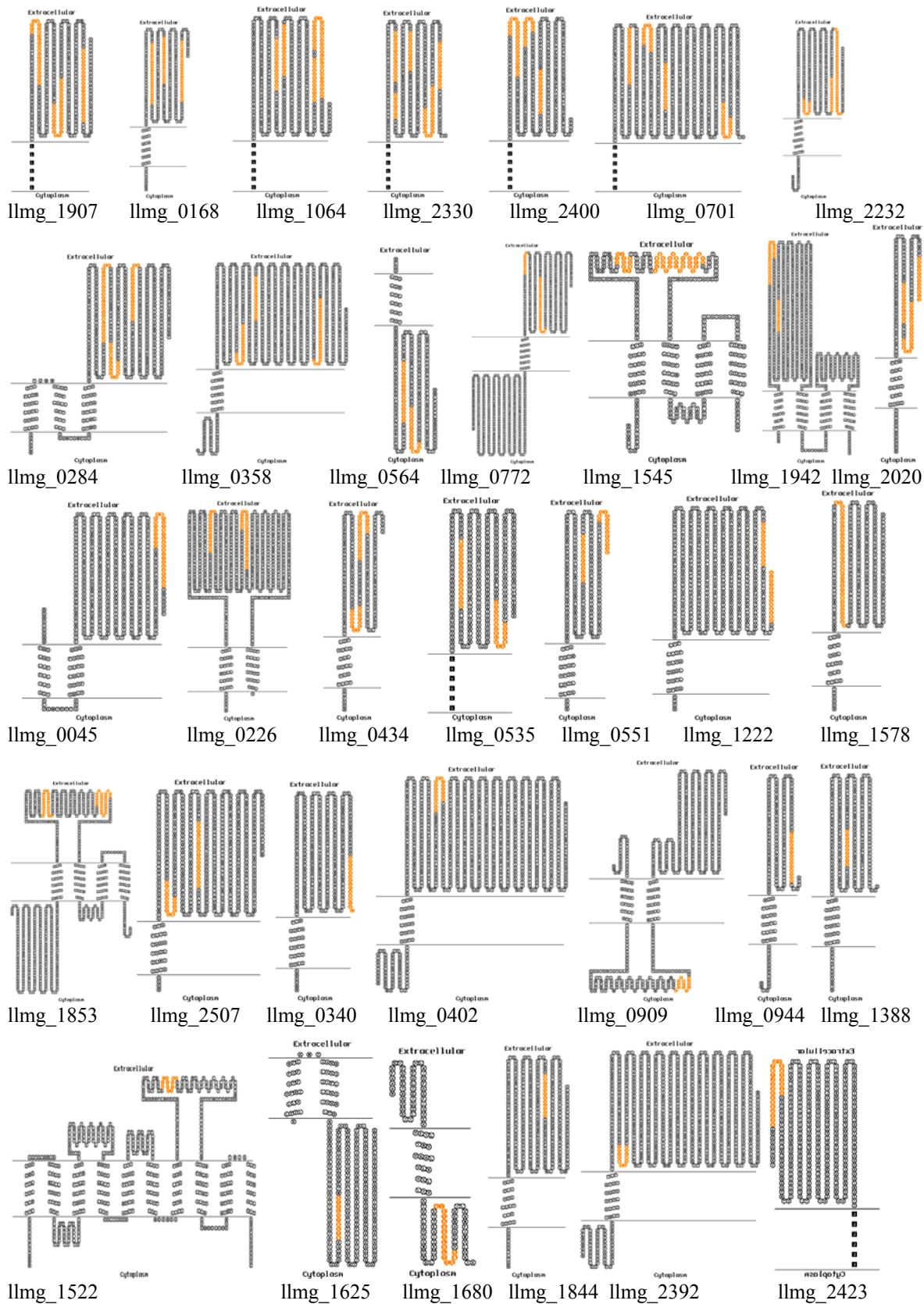
Številka gena v NCBI	Ime proteina	Oznaka lokusa	Število identificiranih peptidov	Augur napoved
4796714	foldazni protein prsA prekurzor	llmg_1907	7	SP, lipoprotein
4798433	deoksiribonukleaza	llmg_0168	5	SP, 1 TM vijačnica
4796662	bazični membranski protein A	llmg_1064	5	SP, lipo
4796941	amino-kislinski ABC transporter ekstracelularno vezavni protein	llmg_2330	5	lipoprotein
4797162	cink ABC transporter substrat vezavni protein	llmg_2400	5	lipoprotein
4797064	hipotetični protein llmg_0229	llmg_0229	4	SP
4799089	oligopeptid-vezavni protein prekurzor	oppA	4	SP, lipoprotein
4797813	hipotetični protein llmg_2232	llmg_2232	4	SP, 1 TM vijačnica
4797547	hipotetični protein llmg_0284	llmg_0284	3	SP, 3 TM vijačnice
4797509	penicilin-vezavni protein 2B	llmg_0358	3	1 TM vijačnica
4798729	domnevno topna litična peptidoglikan transglikozidaza	llmg_0564	3	1 TM vijačnica
4796839	hipotetični protein llmg_0772	llmg_0772	3	1 TM vijačnica
4797960	hipotetični protein llmg_1399	llmg_1399	3	SP
4798066	protein za celično delitev ftsX-podoben protein	llmg_1545	3	SP, 4 TM vijačnice
4797831	glutamin ABC transporter permeaza in substrat vezavni protein	llmg_1942	3	SP, lipoprotein, 4 TM vijačnice
4797205	hipotetični protein llmg_2020	llmg_2020	3	SP, 1 TM vijačnica
4798120	hipotetični protein llmg_2194	llmg_2194	3	/
4797215	50S ribosomalni protein L5	llmg_2371	3	/
4797497	hišna proteaza	llmg_2419	3	SP
4797839	30S ribosomalni protein S19	llmg_2379	3	/
4796934	hipotetični protein llmg_0045	llmg_0045	2	SP, 2 TM vijačnici
4796944	površinski protein	llmg_0226	2	SP, 2 TM vijačnici
4798643	30S ribosomalni protein S4	llmg_0296	2	/
4798201	hipotetični protein llmg_0434	llmg_0434	2	SP, lipoprotein, 1 TM vijačnica
4796877	transkripcijski regulator	llmg_0461	2	/
4797412	hipotetični protein llmg_0482	llmg_0482	2	/
4797326	arginin-vezavni periplazemski protein 1 prekurzor	llmg_0535	2	SP, lipoprotein
4797599	hipotetičniprotein llmg_0551	llmg_0551	2	1 TM vijačnica
4798606	imunogenemu sekrecijskemu proteinskemu prekurzoru podoben protein	llmg_0904	2	SP
4798758	50S ribosomanil protein L31 tip B	llmg_0906	2	/

se nadaljuje

nadaljevanje

Številka gena v NCBI	Ime proteina	Oznaka lokusa	Število identificiranih peptidov	Augur napoved
4798924	D-alanin prenosni protein DltD	llmg_1222	2	1 TM vijačnica
4798993	D-alanil-D-alanin karboksipeptidaza	llmg_1578	2	SP, 1 TM vijačnica
4798969	50S ribosomalni protein L19	llmg_1671	2	/
4798321	30S ribosomalni protein S1	llmg_1724	2	/
4797993	ABC transporter ATP-vezavni permeazni protein	in llmg_1853	2	4 TM vijačnice
4798092	podaljševalni faktor Tu	llmg_2050	2	/
4797004	50S ribosomalni protein L17	llmg_2353	2	/
4797213	50S ribosomalni protein L15	llmg_2362	2	/
4799022	50S ribosomalni protein L18	llmg_2365	2	/
4797347	30S ribosomalni protein S2	llmg_2430	2	/
4797218	sekrecijski 45 kDa proteinski prekurzor	llmg_2507	2	SP, lipoprotein, 1 TM vijačnica
4798926	50S ribosomalni protein L13	llmg_2546	2	/
4797426	DacA protein	llmg_2560	2	SP
4798880	D-metionin-vezavni lipoprotein plpD	llmg_0340	1	SP, 1 TM vijačnica
4797912	penicilin-vezavni protein 1B	llmg_0402	1	1 TM vijačnica
4796692	senzorska proteinska kinaza kinA	llmg_0909	1	2 TM vijačnici
4798138	hipotetični protein llmg_0944	llmg_0944	1	SP, 1 TM vijačnica
4798858	hipotetični protein llmg_1388	llmg_1388	1	SP, 1 TM vijačnica
4798533	celično površinski antigen I/II prekurzor	llmg_1398	1	LPXTG
4797750	hipotetični protein llmg_1522	llmg_1522	1	SP, 10 TM vijačnic
4798759	hipotetični protein llmg_1625	llmg_1625	1	2 TM vijačnici
4798150	protein za celično delitev	llmg_1680	1	1 TM vijačnica
4798322	hipotetični protein llmg_1844	llmg_1844	1	SP, 1 TM vijačnica
4798109	penicilin-vezavni protein 2a	llmg_2392	1	1 TM vijačnica
4797921	hipotetični protein llmg_2423	llmg_2423	1	SP, lipoprotein

SP: signalni peptid za izločanje, TM: transmembransk-a(i, e)



Slika 20: Sheme proteinov, ki so bili napovedani kot lipoproteini ali z membranskimi domenami

#### 4.2.1.2 Izbrani površinski proteini *Lactococcus lactis* NZ9000

Med identificiranimi površinskimi proteini *L. lactis* smo izbrali sedem kandidatnih nosilnih proteinov za površinsko predstavitev, pri čemer smo upoštevali naslednje značilnosti:

- protein je bil identificiran z masno spektrometrijo z dvema peptidoma ali več,
- C-konec proteina je napovedan na zunanjji strani celice
- identificiran je bil peptid na C-koncu,
- protein je po Augur napovedi spadal med lipoproteine ali proteine s transmembransko vijačnico,
- protein nima daljšega nukleotidnega zaporedja od 1100 bp zaradi lažjega kloniranja.

Pri izbiri smo si pomagali z vsemi podatki, ki smo jih zbrali s pomočjo baze NCBI in zgoraj omenjenih programov za napoved površinskih proteinov, transmembranskih domen, lipoproteinov in modeliranja transmembranskih domen. Zaradi obsežnosti teh zbranih podatkov priloga B prikazuje zbrane podatke o sedmih izbranih površinskih proteinih, preglednica 17 pa prikazuje del pomembnejših lastnosti izbranih proteinov.

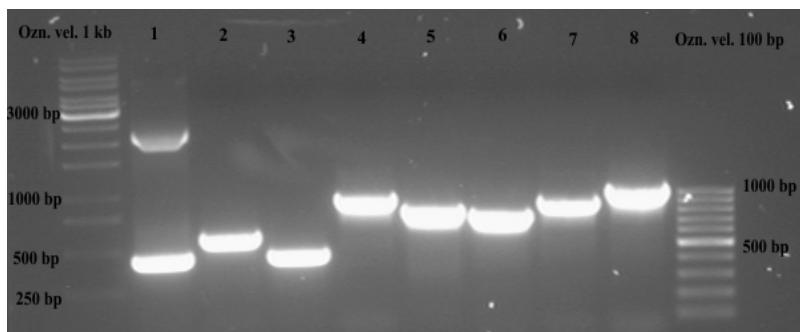
Preglednica 17: Izbrani površinski proteini *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 in njihove lastnosti

Številka gena v NCBI	Ime proteina	Oznaka lokusa	Število identificiranih peptidov	Identificiran v <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	% AK pokrivanja	Molekulska masa proteina (kDa)	Dolžina gena (bp)	Augur opis
4797599	hipotetični protein llmg_0551	llmg_0551	2	da	13	23,3	597	1 TM vijačnica
4797205	hipotetični protein llmg_2020	llmg_2020	3	da - rocno	27	17,3	444	SP, 1 TM vijačnica
4797813	hipotetični protein llmg_2232	llmg_2232	4	da	17	36,9	966	SP, 1 TM vijačnica
4796941	amino-kislinski ABC transporter extracelularno vezavni protein	llmg_2330	5	da - rocno	22	32,1	843	lipoprotein
4798433	deoksiribonukleaza	llmg_0168	5	da	22	29,6	786	SP, 1 TM vijačnica
4796714	foldazni protein prsA prekurzor	llmg_1907	7	da	21	34,7	927	SP, lipoprotein
4796662	bazični membranski protein A	llmg_1064	5	da - rocno	20	37,9	1065	SP, lipoprotein

SP: signalni peptid za izločanje, TM: transmembranska

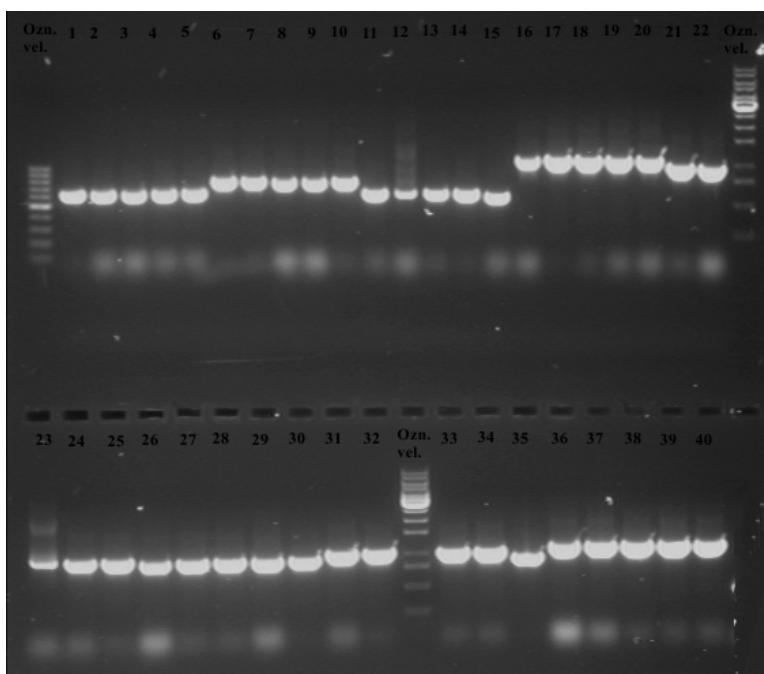
#### 4.2.2 Priprava plazmidov z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine

Gene za sedem izbranih površinskih proteinov smo s PCR pomnožili z uporabo genomske DNK *L. lactis* kot šablone. Pomnožene gene smo nato vstavili v pGEM-T Easy za nadaljnjo pripravo končnih plazmidov z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine s histidinsko oznako. S PCR smo še pomnožili gen za HAV, ki smo mu na koncu dodali histidinsko oznako s pomočjo ustreznih začetnih oligonukleotidov. Gen za HAV smo v nadaljevanju nadomestili z geni za izbrane površinske proteine. Rezultati pomnožitve genov s PCR za izbrane površinske proteine in uvedbe histidinske oznake na koncu gena za HAV so prikazani na sliki 21.



Slika 21: Uvedba histidinske oznake na koncu gena HAV in pomnožitve genov izbranih površinskih proteinov s PCR. 1- HAV-His6, ~ 440 bp; 2- llmg\_0551, 597 bp; 3- llmg\_2020, 444 bp; 4- llmg\_2232, 966bp; 5-llmg\_2330, 843 bp; 6- llmg\_0168, 786 bp; 7- llmg\_1907, 927 bp; 8- llmg\_1064, 1056 bp.

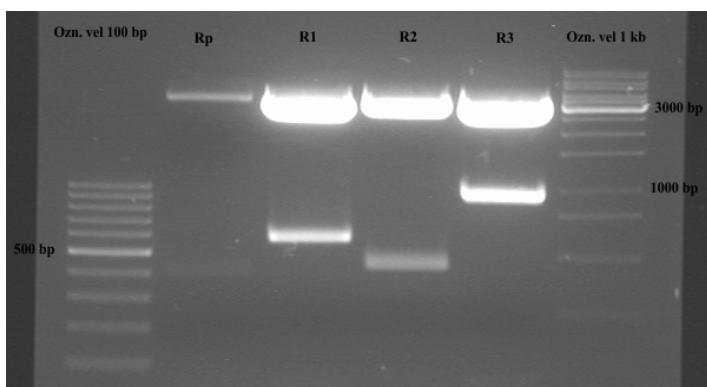
Na sliki 21 so lepo vidni fragmenti pomnoženih genov ustreznih velikosti za posamezen izbran površinski protein in pomnožen gen za HAV z dodano histidinsko oznako, ki je velik približno 440 bp. Vsak posamezen fragment smo izrezali iz gela, ga očistili in ligirali v pGEM-T Easy čez noč na 16 °C. Vseh 8 ligacij smo nato transformirali v *E. coli* in uspešnost transformacije preverili s PCR na kolonijah s pomočjo univerzalnih začetnih oligonukleotidov za pGEM-T Easy (slika 22). Pri tem smo vzeli kolonije, ki so bile obarvane belo, saj naj bi te vsebovale konstrukt, modro obarvane pa ne. Vsi pomnoženi deli genov za izbrane površinske proteine so večji za približno 100-200 bp, ker univerzalni začetni oligonukleotidi prilegajo na vsaki strani na del plazmida pGEM-T Easy in se pomnoži še del plazmida.



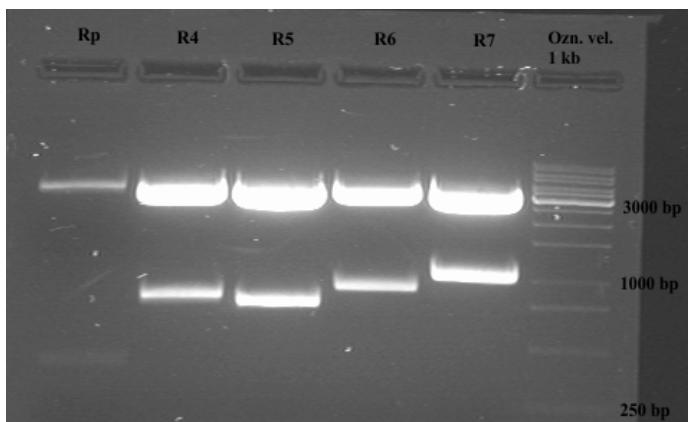
Slika 22: Rezultati PCR na kolonijah za pGEM-HAV Nco/Xba His6 in pGEM-izbran površinski protein.  
1-5: pGEM-HAV Nco/Xba His6, ~450 bp; 6-10: pGEM-0551, ~600 bp; 11-15: pGEM-2020, ~450 bp; 16-20: pGEM-2232, ~1000 bp; 21-25: pGEM-2330, ~850 bp; 26-30: pGEM-0168, ~950 bp; 31-35: pGEM-1907, ~600 bp; 35-40: pGEM-1064, ~1100 bp.

Izbrane pozitivne kolonije smo namnožili čez noč, naslednji dan izolirali plazmidno DNK in ji določili zaporedje. S pravilnim ujemanjem zaporedja s predvidenim zaporedjem plazmidne DNK smo dokazali, da plazmidi vsebujejo željen konstrukt.

V nadaljevanju smo najprej pripravili laktkokni plazmid pNZ-HAV-Nco/Xba His6, ki je služil kot gostiteljski plazmid za vstavljanje genov za izbrane površinske proteine. Plazmid smo naredili tako, da smo iz pGEM-HAV-Nco/Xba His6 izrezali z restrikcijskima encimoma NcoI in XbaI gen za HAV z dodano histidinsko oznako in ga ligirali v plazmid pSDLBA3b, ki smo mu predhodno z restrikcijskima encimoma NcoI in XbaI odstranili celoten konstrukt. Tako smo dobili plazmid pNZ8148 z vstavljenim genom za HAV in dodano histidinsko oznako (pNZ-HAV-Nco/Xba His6) (slika 25), ki smo ga namnožili v *L. lactis*, izolirali plazmidno DNK in preverili zaporedje DNK. S pomočjo plazmida pNZ-HAV-Nco/Xba His6 smo lahko pripravili laktkokne plazmide z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine z dodano histidinsko oznako. To smo naredili tako, da smo iz plazmida pNZ-HAV-Nco/Xba His6 s pomočjo restrikcijskih encimov NcoI in BamHI izrezali gen za HAV in iz pripravljenega plazmida pGEM z izbranim površinskim proteinom gen za izbran površinski protein. Restrikcijske mešanice za pripravo plazmidov z vstavljenimi geni izbranih površinskih proteinov in dodano histidinsko oznako smo nanesli na agarozni gel, ločili fragmente in rezultate poslikali pod UV lučjo (slika 23 in slika 24).

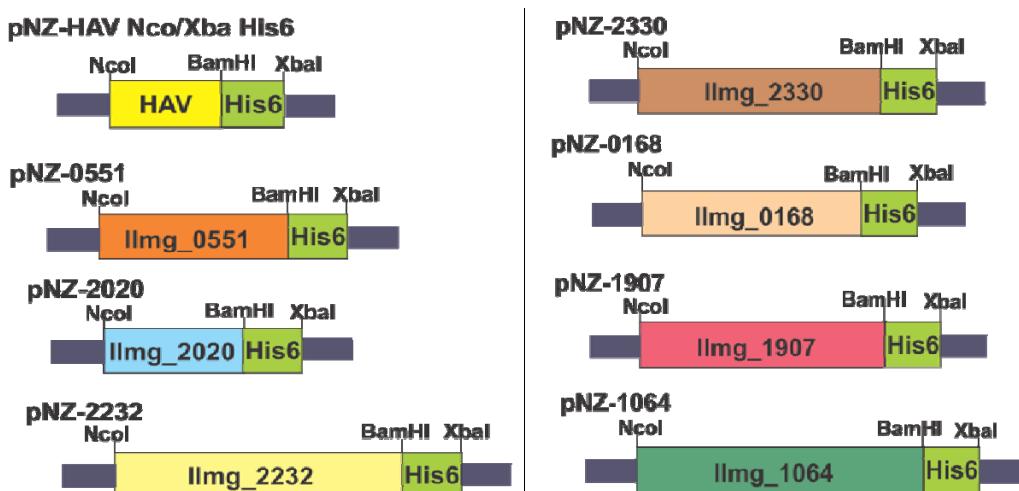


Slika 23: Rezultati restrikcije plazmidov za pripravo plazmidov z vstavljenimi geni za llmg\_0551, llmg\_2020 in llmg\_2232 z dodano histidinsko oznako. Rp-plazmid pNZ-HAV-Nco/Xba His6 brez gena za HAV; R1- iz pGEM-0551 izrezan gen za llmg\_0551, 597 bp; R2- iz pGEM-2020 izrezan gen za llmg\_2020, 444 bp; R3- iz pGEM-2232 izrezan gen za llmg\_2232, 966 bp.



Slika 24: Rezultati restrikcije plazmidov za pripravo plazmidov z vstavljenimi geni za llmg\_2330, llmg\_0168, llmg\_1907 in llmg\_1064 z dodano histidinsko oznako. Rp- plazmid pNZ-HAV-Nco/Xba His6 brez gena za HAV; R4- iz pGEM-2330 izrezan gen za llmg\_2330, 843 bp; R5- iz pGEM-0168 izrezan gen za llmg\_0168, 786 bp; R6- iz pGEM-1907 izrezan gen za llmg\_1907, 927 bp; R7- iz pGEM-1064 izrezan gen za llmg\_1064, 1056 bp

Iz gela smo nato izrezali plazmid in gene za izbrane površinske proteine, očistili produkte iz gela in pripravili ligacijske mešanice, kjer smo v plazmid s histidinsko oznako ligirali posamezne gene za izbrane površinske proteine. Vseh sedem pripravljenih plazmidov z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine (slika 25, preglednica 18), smo nato transformirali v *L. lactis* in preverili uspešnost transformacije s PCR na osnovi kolonije s pomočjo različnih izbranih kombinacij začetnih oligonukleotidov. Pozitivne kolonije smo nato namnožili čez noč, izolirali plazmidno DNK in poslali na določanje zaporedja. Določena nukleotidna zaporedja za posamezen površinski protein so zbrana v prilogi B.



Slika 25: Sheme končnih laktokoknih plazmidov z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine z dodano histidinsko oznako

Preglednica 18: Seznam in opis končnih pripravljenih laktokoknih plazmidov z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine

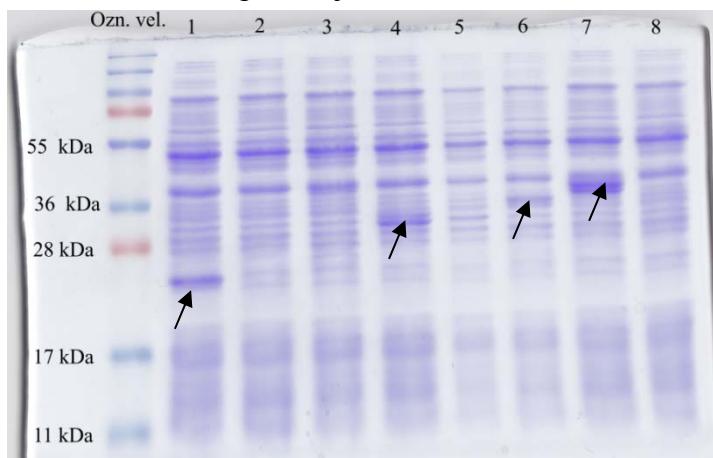
Plazmid	Opis plazmida
pNZ-0551 his6	pNZ8148 z vstavljenim genom za llmg_0551 in dodanim His6 zaporedjem
pNZ-2020 his6	pNZ8148 z vstavljenim genom za llmg_2020 in dodanim His6 zaporedjem
pNZ-2232 his6	pNZ8148 z vstavljenim genom za llmg_2232 in dodanim His6 zaporedjem
pNZ-2330 his6	pNZ8148 z vstavljenim genom za llmg_2330 in dodanim His6 zaporedjem
pNZ-0168 his6	pNZ8148 z vstavljenim genom za llmg_0168 in dodanim His6 zaporedjem
pNZ-1907 his6	pNZ8148 z vstavljenim genom za llmg_1907 in dodanim His6 zaporedjem
pNZ-1064 his6	pNZ8148 z vstavljenim genom za llmg_1064 in dodanim His6 zaporedjem

#### 4.2.3 Izražanje izbranih površinskih proteinov v *L. lactis*

S pripravljenimi plazmidi z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine smo lahko s pomočjo nizinskega sistema v pNZ8148 izrazili posamezen izbran površinski protein s histidinsko oznako, ki bi se naj izrazila v fuziji s površinskim proteinom. S pomočjo histidinske oznake smo lahko z uporabo različno označenih protiteles proti histidinski oznaki detektirali izražene izbrane površinske proteine. Izražanje izbranih površinskih proteinov je potekalo v 10 mL gojišča, ki smo mu dodali ustrezno prekonočno kulturo s plazmidom, ki je imel vstavljen gen za izbran površinski protein. Po tri urni indukciji z nizinom smo odvzeli vzorce za pretočno citometrijo, preostanek centrifugirali, shranili gojišče in zbrane celice *L. lactis* resuspendirali v PBS pufru. Po ločevanju proteinov na NaDS PAGE smo proteine detektirali z barvanjem gela v barvilu Commassie brilliant modro in z označevanjem s protitelesi proti histidinski oznaki po prenosu proteinov na membrano.

#### 4.2.3.1 Rezultati NaDS PAGE in barvanja s Commassie brilliant modrim barvilom

Rezultate barvanja gela ločenih izbranih površinskih proteinov s Commassie brilliant modrim barvilom prikazuje slika 26.



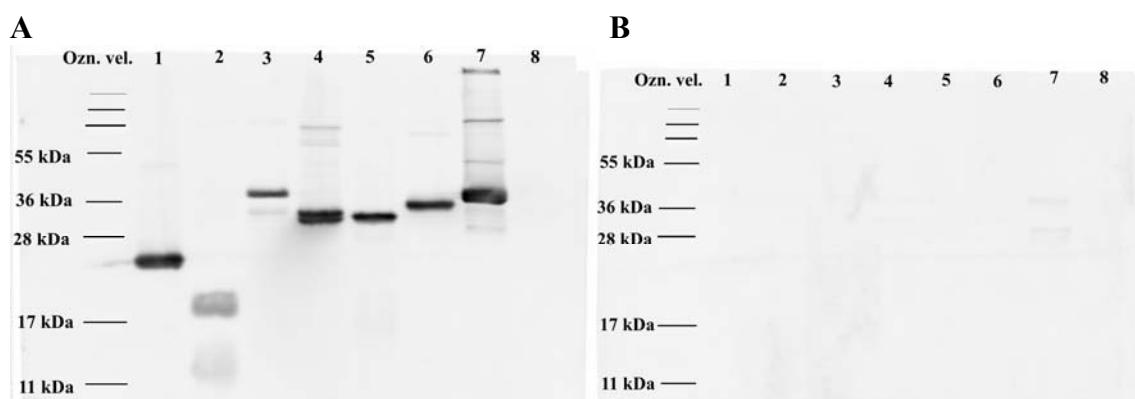
Slika 26: Rezultati NaDS PAGE analize izraženih izbranih površinskih proteinov. 1- llmg\_0551 his6, 2- llmg\_2020 his6, 3- llmg\_2232 his6, 4- llmg\_2330 his6, 5- llmg\_0168 his6, 6- llmg\_1907 his6, 7- llmg\_1064 his6, 8- pNZ8148 (kontrola)

Na sliki 26 smo opazili prekomerno izražanje proteina llmg\_0551 (23,3 kDa), llmg\_2330 (32,1 kDa), llmg\_1907 (34,7 kDa) in llmg\_1064 (37,9 kDa), katerega izražanje je bilo tudi najbolj izrazito. Pri llmg\_2020 (17,3 kDa), llmg\_2232 (36,9 kDa) in llmg\_0168 (29,6 kDa) nismo zaznali prekomernega izražanja, saj so bili proteini v celičnem lizatu enaki, kot v celičnem lizatu izražanja plazmida pNZ8148, ki je služil kot negativna kontrola.

#### 4.2.3.2 Rezultati prenosa Western in označevanja s protitelesi

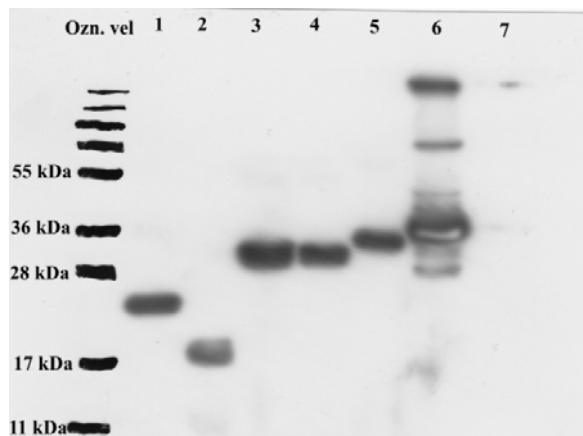
Ločene proteine z NADS PAGE smo najprej prenesli na PVDF membrano, kar nam je omogočalo nadaljnje označevanje s protitelesi. Uspešnost izražanja izbranih površinskih proteinov v *L. lactis* smo preverili s protitelesi proti histidinski oznaki. Pri tem smo uporabili protitelesa proti histidinski oznaki, ki so bila označena fluorescenčno (FITC protitelesa) in protitelesa proti histidinski oznaki, ki so bila označena s hrenovo peroksidazo (HRP protitelesa). Rezultate označevanja celičnih lizatov izraženih površinskih proteinov s FITC protitelesi prikazuje slika 27a. S FITC protitelesi proti histidinski oznaki smo označili tudi prenesene proteine iz gojišča, vendar v njem nismo zasledili nobenih proteinov, ki bi se prekomerno izrazili in bi imeli dodano histidinsko oznako (slika 27b).

Na sliki 27a vidimo, da smo s prenosom Western detektirali vse izbrane površinske proteine z dodano histidinsko oznako. Z označevanjem s protitelesi lahko zaznamo tudi prekomerno izražanje izbranih proteinov llmg\_2020 (17,2 kDa), llmg\_2232 (36,9 kDa) in llmg\_0168 (29,6 kDa), ki ga z barvanjem s Commassie barvilom nismo zaznali. Še vedno opazimo, da je prekomerno izražanje najbolj izrazito pri llmg\_1064 in llmg\_2330.



Slika 27: Rezultati prenosa Western ločenih celičnih lizatov in gojišč izraženih površinskih proteinov s FITC označenimi protitelesi proti histidinski oznaki. (a) Celični lizat. (b) Gojišče. 1- llmg\_0551 his6, 2- llmg\_2020 his6, 3- llmg\_2232 his6, 4- llmg\_2330 his6, 5- llmg\_0168 his6, 6- llmg\_1907 his6, 7- llmg\_1064 his6, 8- pNZ8148 (kontrola)

Z označevanjem celičnih lizatov izbranih površinskih proteinov s protitelesi proti His6, ki so bila označena s hrenovo peroksidazo, smo še dodatno potrdili uspešnost izražanja izbranih površinskih proteinov z dodano histidinsko oznako v *L. lactis* (slika 28). Na filmu so po dodatku substrata in razvijanja slike nastale lise, ki so bile ustreznih velikosti in so bile povsem enake kot tiste pri označevanju s FITC protitelesi. Med označenimi izbranimi površinskimi proteini s HRP protitelesi na sliki 28 ni proteina llmg\_2232, saj nam v tem poskusu ni zrasla prekonočna kultura s plazmidom pNZ-2232 his6, zato naprej tudi izražanje ni bilo možno. Celoten poskus izražanja izbranih površinskih proteinov smo še enkrat ponovili, vendar smo takrat označevali samo s protitelesi proti histidinski oznaki, ki so bila fluorescenčno označena (slika 27a).

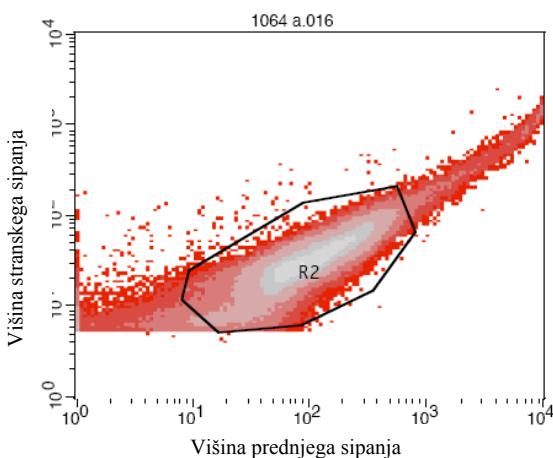


Slika 28: Rezultati označevanja celičnih lizatov izraženih površinskih proteinov s HRP označenimi protitelesi proti histidinski oznaki. 1- pNZ-0551 his6, 2- pNZ-2020 his6, 3- pNZ-2330 his6, 4- pNZ-0168 his6, 5- pNZ-1907 his6, 6- pNZ-1064 his6, 7- pNZ8148

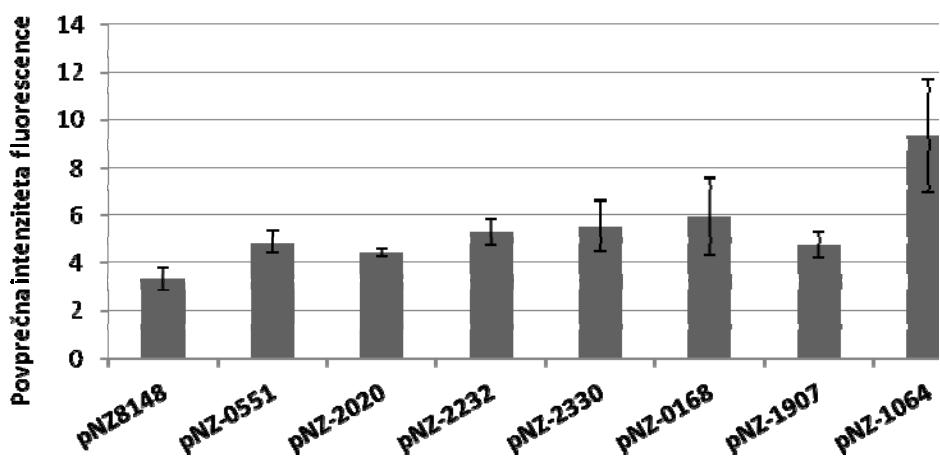
#### 4.2.4 Površinska predstavitev izbranih površinskih proteinov na *L. lactis*

Površinsko predstavitev izbranih površinskih proteinov smo ovrednotili s pretočno citometrijo. To smo naredili tako, da smo izbrane površinske proteine z dodano histidinsko oznako označili s protitelesi proti histidinski oznaki, ki so bila označena

fluorescenčno. Za analizo s pretočno citometrijo smo najprej določili celice, ki smo jim želeli izmeriti povprečno intenziteto fluorescence, se pravi, da smo določili vrata (ang. »gate«) na grafikonu, ki je prikazoval parametra prednjega in stranskega sipanja (FSC/SSC) (slika 29). Nato smo s pretočno citometrijo izmerili povprečno intenziteto fluorescence laktokoknih celic, ki so imele na površini izražen izbran površinski protein z dodano histidinsko oznako (slika 30). Fluorescenza sovpada s količino izraženega površinskega proteina oz. histidinske oznake, ki se izrazi zraven izbranega površinskega proteina in jo lahko enostavno detektiramo s protitelesi. Največjo povprečno intenziteto fluorescence smo izmerili v vzorcu s celicami, ki so prekomerno izražale protein llmg\_1064 z dodano histidinsko oznako. V primerjavi s kontrolo (pNZ8148) se je povprečna intenziteta fluorescence pNZ-1064 his6 povečala skoraj za trikrat.



Slika 29: Prikaz gostote laktokoknih celic glede na višino prednjega in stranskega sipanja



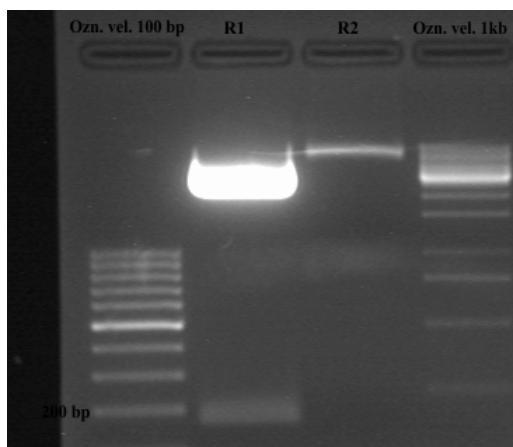
Slika 30: Povprečna intenziteta fluorescence laktokoknih celic z izraženim izbranim površinskim proteinom in dodano histidinsko oznako.

#### 4.2.5 Izbor najustreznejšega nosilnega proteina za površinsko predstavitev in določanje njegove funkcionalnosti z dodano B domeno

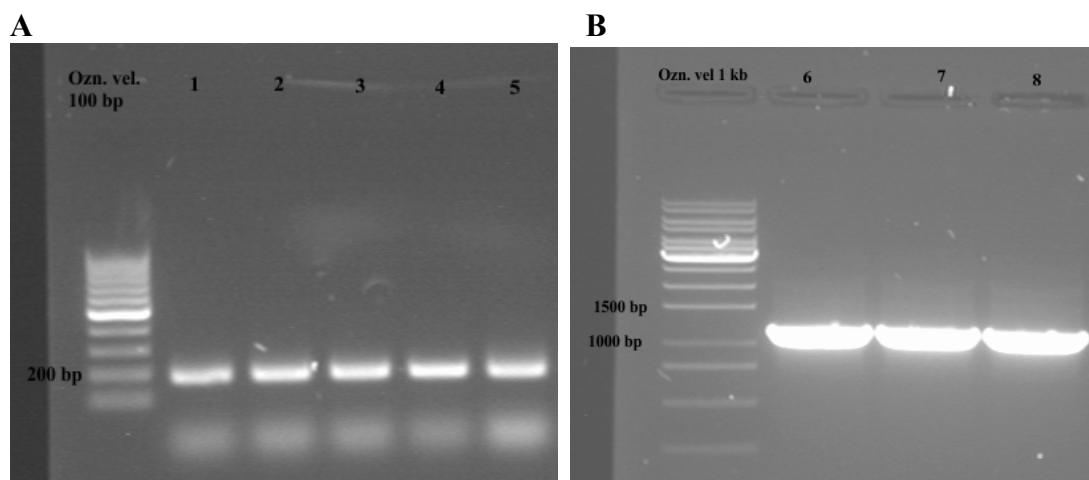
Na podlagi rezultatov izražanja in pretočne citometrije izbranih površinskih proteinov z dodano histidinsko oznako, smo izbrali najustreznejši nosilni protein za površinsko predstavitev v *L. lactis*. Izbran je bil protein llmg\_1064, ki je opisan kot bazični membranski protein A. Da bi dokazali njegovo funkcionalnost, smo k genu za protein llmg\_1064 dodali B domeno, ki je del stafilocoknega proteina A in ima zmožnost vezave IgG. Izražanje B domene v fuziji z llmg\_1064 na površini *L. lactis* smo detektirali z barvanjem gela ločenih proteinov v lizatu pNZ-1064-B dom in s pretočno citometrijo, kjer smo označili B domeno s nespecifičnimi protitelesi, ki se vežejo na B domeno. Protitelesa so bila fluorescenčno označena.

##### 4.2.5.1 Priprava plazmida pNZ-1064-B dom.

Za določanje funkcionalnosti izbranega nosilnega proteina za površinsko predstavitev v *L. lactis* smo si najprej pripravili plazmid, v katerega smo zraven gena za llmg\_1064 namesto histidinske oznake vstavili gen za B domeno. To smo naredili tako, da smo iz plazmida pGEM-B dom. s pomočjo restrikcijskih encimov BamHI in XbaI izrezali B domeno in iz plazmida pNZ-1064 his6 histidinsko oznako (slika 31). B domeno smo nato vstavili v plazmid pNZ-1064 brez his6 s pomočjo ligacije in nato očiščeno ligacijsko mešanico transformirali v *L. lactis*. Uspešnost transformacije smo preverili s PCR na osnovi kolonije, kjer smo uporabili enkrat kombinacijo začetnih oligonukleotidov za pomnožitev B domene in drugič tako kombinacijo, da smo pomnožili gen za llmg\_1064 in B domeno. Rezultate obeh PCR na osnovi kolonije prikazuje slika 32.



Slika 31: Rezultati restrikcije za pripravo plazmida pNZ-1064-B dom. R1- izrez gena za B dom. iz pGEM-B dom, 174 bp; R2- iz pNZ-1064 izrezan his6.



Slika 32: Rezultati PCR na osnovi kolonije za pNZ-1064-B dom. (a) Pomnožitev B domene. (b) Pomnožitev gena za llmg\_1064 in B domene. 1-5: B domena, 174 bp; 6-8: llmg\_1064 in B domena, 1230 bp.

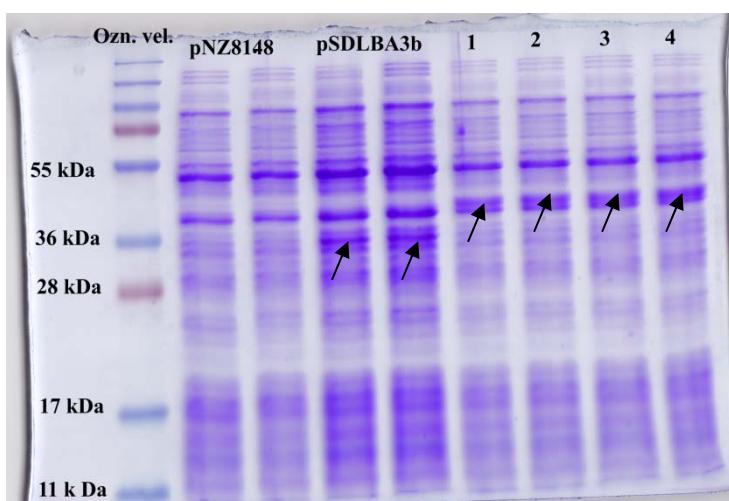
Iz pozitivnih kolonij smo nato izolirali plazmidno DNK pNZ-1064-B dom. in določili nukleotidno zaporedje. Zaradi dolgega konstrukta smo morali določiti zaporedje DNK iz N-terminalnega konca in C-terminalnega konca, saj le tako lahko sestavili celotno zaporedje (Priloga A). Pri tem smo uporabili univerzalni F začetni oligonukleotid za pNZ8148 (pMSPuni) in R univerzalni začetni oligonukleotid (pMSPRev). Z določanjem nukleotidnega zaporedja smo še dodatno potrdili, da kolonije vsebujejo plazmid z želenim zaporedjem plazmidne DNK. Shemo konstrukta z dodano B domeno prikazuje slika 33.



Slika 33: Shema plazmida pNZ-1064- B dom.

#### 4.2.5.2 Izražanje llmg\_1064 z dodano B domeno na površini *L. lactis*

Ko smo pripravili laktkokni plazmid pNZ-1064-B dom., smo lahko v nadaljevanju izrazili protein llmg\_1064 z dodano B domeno na površini *L. lactis*. Izražanje proteina llmg\_1064 z dodano B dom. je potekalo na enak način, kot izražanje ostalih proteinov v *L. lactis*, s pomočjo nizina. Po izražanju smo shranili 1 mL celične suspenzije za pretočno citometrijo, preostanek pa smo centrifugirali, odlili gojišče in celice resuspendirali v PBS pufru. Zraven konstrukta pNZ-1064-B dom. smo izrazili pSDLBA3b za pozitivno kontrolo in pNZ8148 za negativno kontrolo. Celice *L. lactis* z izraženimi proteini smo nato razbili z ultrazvočnim razbijjalcem, proteine ločili na NaDS PAGE in gel pobarvali v barvilu Commassie. Rezultate izražanja pNZ-1064-B dom. prikazuje slika 34.

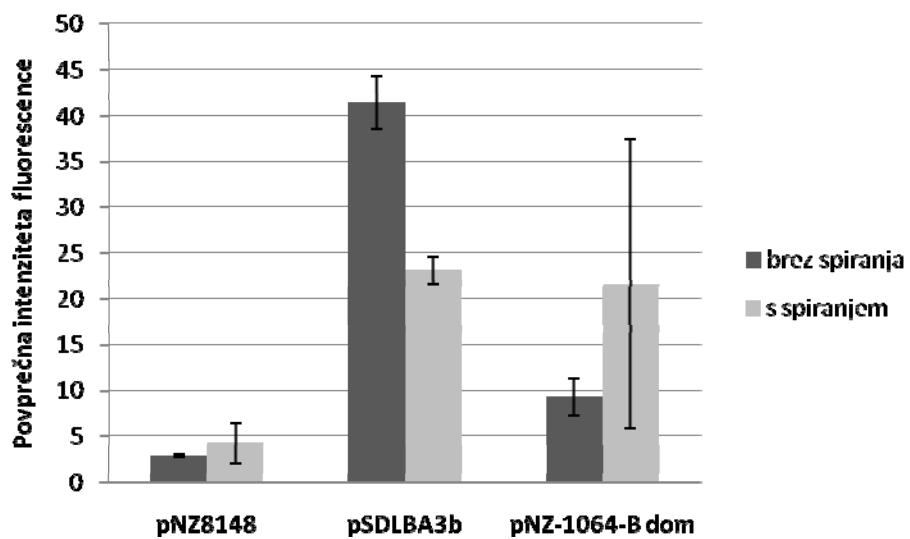


Slika 34: Rezultati izražanja pNZ-1064-B dom. pNZ8148- negativna kontrola, pSDLBA3b- pozitivna kontrola, 1-2: pNZ-1064-B dom. 1. kolonija, 3-4: pNZ-1064-B dom. 2. kolonija.

V primerjavi z negativno kontrolo vidimo na sliki 34, da se izrazi protein llmg\_1064 v fuziji z B domeno, kar je vidno kot lisa molekulske mase 44 kDa. Izražanje llmg\_1064 z B domeno je pri obeh kolonijah enako. Kot pozitivno kontrolo smo izrazili B domeno v fuziji z AcmA regijo, kar je na sliki vidno kot lisa velikosti 33 kDa.

#### 4.2.5.3 Določanje funkcionalnosti nosilnega proteina llmg\_1064 z dodano B domeno

Funkcionalnost nosilnega proteina llmg\_1064 smo dokazali s pomočjo pretočne citometrije tako, da smo mu dodali B domeno. Fuzijo proteina llmg\_1064 in B domene smo lahko detektirali s pomočjo označevanja z nespecifičnimi protitelesi, ki jih veže B domena preko Fc regije. S pretočnim citometrom smo merili povprečno intenzitetu fluorescence, ki so jo oddajale celice z izraženo B domeno (slika 35). V tem poskusu smo še dodatno preverili stabilnost vezave proteina llmg\_1064-B dom. s spiranjem celic s pufrom, ki vsebuje detergent SDS in večjo koncentracijo soli. Pri izražanju pSDLBA3b gre za nekovalento vezavo B domene na površino *L. lactis* preko AcmA regije, pri izražanju pNZ-1064-B dom. pa gre za kovalentno vezavo proteina llmg\_1064 in B domene na površini *L. lactis*, zato smo pričakovali zmanjšanje povprečne intenzitete fluorescence celic pSDLBA3b po spiranju s pufrom TBS+. Kot vidimo na sliki 33 se je povprečna intenziteta fluorescence pSDLBA3b res zmanjšala skoraj za polovico. Po spiranju celic z izraženim llmg\_1064 in B domeno na površini *L. lactis* nismo pričakovali nobenih večjih sprememb v povprečni intenziteti fluorescence, vendar se je le ta za polovico povečala, kar je lahko posledica spiranja molekul, ki so ovirale vezavo protiteles na B domeno.



Slika 35: Povprečna intenziteta fluorescence laktkoknih celic z izraženim konstruktom brez spiranja in s spiranjem s TBS+ pufrom.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Zaradi številnih nevšečnosti, ki jih povzroča parenteralna aplikacija cepiv, potekajo dandanes številne raziskave za razvoj peroralnih cepiv. Ta bi lahko zaradi nizkih stroškov pridelave in enostavnega načina apliciranja, postale široko uporabne za vse dele sveta, predvsem pa za manj razvite revne države tretjega sveta, kjer je zaradi slabih higienskih razmer in naravnih dejavnikov prisotnih največ okužb z nevarnimi infekcijskimi boleznimi. Mlečnokislinske bakterije so zaradi svoje dolgoletne varne uporabe in probiotičnih lastnosti primerni kandidati za peroralno dostavo cepiv in drugih molekul, ki omogočajo zdravljenje ali lajšanje simptomov bolezni. Med nevarne infekcijske bolezni spada tudi hepatitis A, ki je akutna infekcijska bolezen jeter. Večinoma se prenaša fekalno-oralno preko okužene vode in hrane ter med osebami. Hepatitis A povzroča virus hepatitisa A. Po okužbi z njim je možno samo simptomatsko zdravljenje. Pred hepatitisom A se lahko zaščitimo le preventivno s cepljenjem in dobro sanitarno ter osebno higieno. Zato smo se v prvem delu diplomskega dela posvetili pripravi laktokoknih plazmidov z vstavljenimi različicami antigaena hepatitisa A, ki smo jih v nadaljevanju izrazili na MKB *L. lactis* z namenom uporabe kot oralna vakcina proti HAV.

Za razvoj peroralne vakcine proti hepatitisu A smo pripravili tri različice antigaena. Pri prvi različici je bil gen za HAV vstavljen v plazmid pNZ8148 pod nizinski promotor. Antigen za HAV naj bi se v tej različici prekomerno izrazil znotraj celic *L. lactis*. Prekomernega izražanja nismo zasledili niti z barvanjem z barvilom niti z označevanjem s protitelesi. V drugi različici smo gen za HAV vstavili v plazmid pSDLBA3b, ki omogoča površinsko predstavitev antigaena s pomočjo signalnega peptida Usp45 (za izločanje iz celic) in AcmA domene s tremi LysM ponovitvami, ki imajo funkcijo pripenjanja na celično steno. V plazmidu pSDLBA3b je bila odstranjena funkcionalna B domena in zamenjana z antigenom za HAV, pri čemer smo dobili plazmid pSD-HAV. Celice *L. lactis*, ki so imele vstavljen plazmid pSD-HAV, so izražale fuzijski protein SP<sub>Usp45</sub>-HAV-AcmA v velikosti 42 kDa. Izražanje smo uspešno potrdili z barvanjem s Commassie brilliant modrim barvilom in z označevanjem s protitelesi proti HAV. V tretji različici smo v plazmid pSD-HAV dodali gen za flagelin med gen za HAV in AcmA regijo. Gen za flagelin smo dodali zaradi njegove znane funkcije stimulacije imunskega odziva preko TLR5 receptorja. S tem smo želeli doseči povečanja imunskega odziva proti HAV. Tudi v tem primeru smo z barvanjem z barvilom in z označevanjem s protitelesi dokazali izražanje fuzijskega proteina SP<sub>Usp45</sub>-HAV-FliC-AcmA v velikosti 70 kDa v celicah *L. lactis*, ki so vsebovale plazmid pSD-HAV-FliC. Tako smo uspešno izrazili dve različici antigaena hepatitisa A v *L. lactis*. Znotrajceličnega izražanja antigaena za HAV nismo zasledili, kar pripisujemo morebitni razgradnji antigaena HAV, ker v tem primeru ni bil izražen v fuziji z nekim proteinom, ki lahko omogoča stabilizacijo in s tem prepreči razgradnjo. Da bi lahko z gotovostjo trdili, da je izražanje antigaena HAV znotraj celic neuspešno, bi morali izražanje večkrat ponoviti ob različnih pogojih izražanja. Celice *L. lactis*, ki bi izražale omenjena fuzijska antigaena, bi lahko bile uporabne kot peroralno cepivo proti hepatitisu A.

V prihodnje želimo preveriti imunski odziv miši ali drugih poskusnih živali (po pridobitvi potrebnih dovoljenj za izvedbo poskusa na eksperimentalnih živalih) ob uživanju bakterij,

ki izražajo različice antigaena hepatitisa A. Na ta način bi lahko ovrednotili učinkovitost izražanja različic antigaena hepatitisa A in njihovo sposobnost stimulacij imunskega odziva. Pri tem bi bilo potrebno tudi ovrednotiti vpliv flagelina na imunski odziv testnih živali v primerjavi s cepivom brez vstavljenega flagelina. Prav tako bi bilo potrebno preveriti kaj se zgodi z bakterijami s površinskimi antigeni pri prehodu skozi prebavnji trakt. Za uporabo pri ljudeh bi bilo potrebno nadomestiti antibiotični selekcijski označevalci v laktokoknih plazmidih s prehransko uporabnimi selekcijskimi označevalci (Renault, 2002). Pred uporabo pa bi bilo seveda potrebno novo cepivo preizkusiti tudi v vseh fazah kliničnih študij.

Mlečnokislinske bakterije kot nosilci cepiv za peroralno predstavitev antigaena so zanimiv in uporaben predmet raziskovanja, vendar je do aplikacije pri ljudeh potrebno še veliko postoriti in dokazati, saj GSO v javnosti še vedno veljajo kot velika grožnja.

Med možnimi načini predstavitev antigenov, se velikokrat omenja površinska predstavitev na bakterijah, ki ni uporabna samo za predstavitev antigenov, ampak tudi za rešetanje proteinskih knjižnic, vezavo toksinov in drugih škodljivih molekul, detekcijo mutacij, dostavo encimov in drugih proteinskih molekul, ki lahko vežejo ali razgradijo škodljive snovi v telesu ali okolju (Lee in sod., 2003). Ker MKB spadajo med G+ bakterije z debelo celično steno in s številnimi proteini na površini in ker imajo priznan status GRAS, so primeren kandidat za površinsko predstavitev na bakterijah. Med njimi je *Lactococcus lactis* modelni organizem, v katerem je bilo razvitih že kar nekaj mehanizmov za površinsko predstavitev, vendar niso bili vedno dovolj učinkoviti. V ta namen smo se v drugem delu diplomskega dela osredotočili na iskanje ter vrednotenje novih nosilnih proteinov za površinsko predstavitev na *L. lactis* s pomočjo določanja površinskega proteoma *L. lactis*.

Določanje površinskega proteoma G+ bakterij s proteolitično razgradnjo površinskih proteinov in detekcijo razgrajenih peptidov z masno spektrometrijo je široko uporabna metoda za iskanje novih antigenov bakterijskih patogenov v razvoju novih vakcin (Doro in sod., 2009; Rodriguez-Ortega in sod., 2006; Severin in sod., 2007). Mi smo omenjeno metodo uporabili za iskanje novih nosilnih proteinov za površinsko predstavitev na *L. lactis*. Površinski proteom *L. lactis* NZ9000 (derivat MG1363) smo razgradili z encimom tripsinom in s pomočjo masne spektrometrije identificirali razgrajene peptide. Eksperimentalno smo z masno spektrometrijo identificirali 56 površinskih proteinov *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (preglednica 16). S pomočjo Augur napovedi površinskih proteinov *L. lactis* MG1363 smo lahko določili napovedane površinske motive identificiranih proteinov. Med identificiranimi proteini je bilo 15 takih, ki jih ni bilo na seznamu Augur napovedanih površinskih proteinov. Od teh 15 proteinov je bila večina ribosomalnih proteinov in nekaj drugih citoplazmatskih proteinov. O identifikaciji nekaterih citoplazemskih proteinov na površini bakterij so poročali tudi v drugih raziskavah površinskih proteomov (Doro in sod., 2009; Rodriguez-Ortega in sod., 2006; Severin in sod., 2007), vendar mehanizem in pomen površinske predstavitev citoplazmatskih proteinov ni povsem znan. Glede nato, da se na površini ne pojavljajo pomembnejši citoplazmatski proteini in so podobne proteine zasledili tudi v drugih raziskavah, sklepamo, da pojavi le-teh ni posledica celične lize zaradi razgradnje s tripsinom ali ravnanja s celicami. Pri razgradnji površinskih proteinov namreč ne bi smelo

priti do lize celic zaradi tripsina, saj ima *L. lactis* debelo celično steno, ki je odporna na razgradnjo.

Med identificirani proteini na površini *L. lactis* je bilo 12 takih, ki so bili identificirani samo z enim peptidom. Ti zadetki so manj zanesljivi, zato smo pri izbiri kandidatnih nosilnih proteinov uporabili samo proteine z dvema ali več identificiranimi peptidi. Pri izbiri kandidatnih proteinov so nam pomagali vsi podatki o identificiranih proteinih, zbrani s pomočjo programov, ki smo jih omenili pri rezultatih. Glavni kriterij je bil večje število identificiranih peptidov za posamezen protein, saj smo predvidevali, da so ti proteini bolj izpostavljeni na površini in podvrženi razgradnji s tripsinom. Upoštevali smo še ali je bil protein napovedan kot protein s transmembransko domeno ali kot lipoprotein, da je imel protein krajsi gen od 1100 bp, da je bil identificiran peptid na C-koncu proteina, in da se je C-konec proteina nahajal na zunanjji strani celice. V pomoč so nam bile tudi sheme lipoproteinov in proteinov s transmembranskimi domenami, ki so nam nazorno prikazale dele proteinov, ki so na zunanjji ali notranji strani celične stene. Večina identificiranih peptidov se je po pričakovanju nahajala na zunanjji strani celične stene. Med vsemi določenimi proteini so bili le trije, ki so imeli peptide identificirane na notranji strani celične stene, zato sklepamo, da je pri njih prišlo do napake pri modeliranju.

Med identificiranimi proteini je bilo tudi nekaj proteinov, ki se izločajo iz celic, med njimi tudi Usp45 protein (llmg\_2507). Teh proteinov med rezultati nismo pričakovali, saj bi se morali sprati pri pripravi vzorca pred razgradnjo s tripsinom. Predvidevamo, da se ti proteini pojavijo na površini *L. lactis*, ker se del izločenih proteinov zaradi neznanih mehanizmov pritrdi na površino bakterije ali pa v procesu izločanja pride do napake in del molekul ostane ujetih v celični steni.

Za kandidatne nosilne proteine za površinsko predstavitev na *L. lactis* smo izbrali sedem proteinov. Za vseh sedem izbranih proteinov smo najprej pomnožili gene, ki smo jih nato uspešno klonirali preko klonirnega vektorja v laktokokni plazmid pNZ8148 pod nizinski promotor in pred histidinsko oznako. Histidinska oznaka se je tako nahajala na C-koncu izbranega površinskega proteina in ni služila le za označevanje izraženih proteinov, ampak tudi kot potniški protein v sistemu površinske predstavitev. Za vseh sedem proteinov smo potrdili izražanje v *L. lactis* NZ9000 po indukciji z nizinom. Izražanje proteinov smo uspešno detektirali tako z barvanjem z barvilm kot z označevanjem s protitelesi po prenosu Western. V obeh primerih smo detektirali izbrane površinske proteine ustreznih velikosti, izražanje pa je bilo najizrazitejše pri bazičnem membranskem proteinu A (llmg\_1064). Nivo izražanja je pomemben pri površinski predstavitev, saj z večjim nivojem izražanja nosilnih proteinov predvidevamo tudi večje količine želenega proteina na površini. Tam je nato sposoben na primer vezati več toksinov ali proizvesti močnejši imunski odziv. Pri tem je tudi pomembno, da prekomerno izražanje in pritrditve heterolognih proteinov na površino ne vpliva na rast celic *L. lactis*. V našem primeru vpliva nismo opazili, saj so se celice tudi po treh urah indukcije z nizinom normalno rastle.

Nivo izražanja oziroma količino proteinov, ki se je izrazila in pritrnila na površino celic *L. lactis* smo detektirali z merjenjem povprečne intenzitete fluorescence, ki so jo oddajale celice označene s protitelesi proti histidinski oznaki, na pretočnem citometru. Celice so namreč izražale fuzijski protein, ki je bil sestavljen iz izbranega nosilnega proteina in

histidinske oznake na C-koncu. Povprečna intenziteta fluorescence označenih celic je sovpadala s količino proteina, ki se izrazi na površini *L. lactis*. V primerjavi s kontrolo (bakterije s praznim pNZ8148) smo v vseh primerih detektirali povečano povprečno intenziteto fluorescence, vendar je ta bila največja pri bazičnem membranskem proteinu A (BmpA). Na podlagi vseh dobljenih rezultatov smo izbrali BmpA kot potencialni nosilni protein za površinsko predstavitev v MKB *L. lactis*.

Za preverjanje učinkovitosti potencialnega nosilnega proteina BmpA smo v nadaljevanju dela histidinsko oznako v plazmidu pNZ-1064 his6 zamenjali z B domeno stafilokoknega proteina A. B domena je v tem primeru predstavljal potniški protein za površinsko predstavitev z BmpA kot nosilnim proteinom. B domeno smo uporabili za potniški protein zaradi zmožnosti nespecifične vezave protiteles preko Fc dela, kar nam je tudi omogočalo enostavno detekcijo B domene s protitelesi. B domeno smo uporabili tudi zaradi primerjave našega sistema površinske predstavitve s sistemom, ki so ga Ravnikar in sod. (sprejeto v tisk) razvili za vezavo TNF α pri kronični vnetni črevesni bolezni. Tudi v njihovem sistemu, ki je vseboval Usp45 signalni peptid za izločanje in C-konec AcmA proteina za pritrdiritev na površino, so B dom. uporabili kot modelni protein za površinsko predstavitev. Tako smo v nadaljevanju opravili poskus, kjer smo B domeno izrazili na površini s pomočjo nosilnega proteina BmpA in z SP<sub>Usp45</sub>/AcmA fuzijo. Izražanje B domene smo detektirali s protitelesi proti B domeni, ki so bila fluorescenčno označena. Količina izražene B dom. je bila v primeru našega sistema z BmpA proteinom štiri do petkrat nižja od količine pridobljene z SP<sub>Usp45</sub>/AcmA fuzijo. Rezultat ni bil povsem nepričakovani, saj je bil sistem z SP<sub>Usp45</sub>/AcmA fuzijo večkrat preizkušen in optimiziran, naš sistem pa še čaka nadaljnja optimizacija in izboljšave, ki bodo lahko povečale nivo izražanja. Nov sistem površinske predstavitve bi bilo potrebno v prihodnosti preizkusiti za površinsko predstavitev različic antigaena hepatitisa A na *L. lactis*.

Za dodatno primerjavo obuhvatnih sistemov za površinsko predstavitev na *L. lactis* smo opravili eksperiment, kjer smo preverjali moč vezave predstavljenih proteinov na površino bakterij. Pri sistemu SP<sub>Usp45</sub>/AcmA fuzije je namreč vezava LysM domen C-konca AcmA regije na peptidoglikan nekovalentna, pri našem sistemu pa se BmpA veže na površino kovalentno. Da bi preverili moč vezave, smo laktokokne celice z izraženimi proteini spirali s purom s povečano koncentracijo soli in dodatkom detergenta. V primeru nekovalentne vezave proteinov je prišlo do približno polovičnega zmanjšanja količine izraženih proteinov na površini laktokoknih celic. Pri BmpA kovalentni vezavi B domene na površino je nepričakovano prišlo do zvišanja povprečne intenzitete fluorescence laktokoknih celic, kar si razlagamo s tem, da so se med spiranjem odstranile komponente na površini, ki so prej ovirale vezavo protiteles na izraženo B domeno.

## 5.2 SKLEPI

V okviru diplomskega dela smo:

- pripravili plazmide z vstavljenimi geni za različice antiga hepatitis A,
- izrazili različice antiga hepatitis A v *L. lactis* in izražanje uspešno detektirali z barvanjem z barvilm in z označevanjem s protitelesi,
- določili in analizirali površinski proteom bakterije *Lactococcus lactis* MG1363, derivat NZ9000 ter tako identificirali 56 površinskih proteinov *L. lactis*,
- na podlagi analize površinskega proteoma izbrali potencialne nosilne proteine za površinsko predstavitev na bakteriji *L. lactis*,
- pripravili plazmide z vstavljenimi geni za izbrane površinske proteine, označene s histidinsko oznako,
- izrazili površinske proteine v *L. lactis*,
- uspešnost izražanja površinskih proteinov ustrezno detektirali in ovrednotili,
- med kandidatnimi površinskimi proteini izbrali najustreznejši nosilni protein za površinsko predstavitev,
- funkcionalnost potencialnega nosilnega proteina BmpA preverili z dodano B domeno stafilocoknega proteina A,
- sistem površinske predstavitev dodatno ovrednotili s primerjavo z sistemom SP<sub>Usp45</sub>/AcmA fuzije,
- dokazali močnejšo vezavo BmpA proteina v fuziji z B dom. na površino *L. lactis* v primerjavi z nekovalento vezavo B dom. preko LysM regije na površino.

## 6 POVZETEK

Mlečnokislinske bakterije so že stoletja spremjevalci človeške prehrane in so za kvasovkami drugi najpomembnejši industrijski mikroorganizem. Spadajo med gram pozitiven bakterije in kot glavni produkt metabolizma sladkorjev tvorijo mlečno kislino, po kateri so dobine tudi ime. Med pomembnimi produkti proizvodnje MKB so bakteiocini, ki jih MKB tvorijo kot zaščito pred kompetitivnimi bakterijami in so zaradi svoje antimikrobne aktivnosti primerni za konzerviranje hrane. Med najpomembnejšimi bakteriocini je nizin iz *L. lactis*, ki je edini bakteriocin, ki se dodaja v hrano kot aditiv. MKB so zaradi dolgotrajne uporabe dobine status GRAS, prav tako pa zaradi ugodnega vpliva v prebavnem traktu nekateri sevi veljajo za probiotične kulture. V prehrambeni industriji se MKB uporabljajo kot starter kulture za proizvodnjo fermentiranih proizvodov.

Med najpomembnejše MKB spada modelni organizem *Lactococcus lactis*, med katerimi se največkrat uporablja seva *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 in *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403, ki imata tudi določeno nukleotidno zaporedje celotnega genoma. *L. lactis* se uporablja v mlečni industriji za proizvodnjo sirotke in drugih mlečnih izdelkov, prav tako pa je uporaben za fermentacijo rastlinskega materiala. Zaradi dolgotrajne varne uporabe in ker ni naravno prisoten v človeškem prebavnem traktu, je uporaben za oralni vnos cepiv in drugih terapevtskih učinkovin.

Z genskim spreminjanjem MKB lahko dosežemo še širšo uporabnost MKB v živilski industriji predvsem za spreminjanje lastnosti hrane. Še večja pa je uporabnost GS MKB za terapevtske namene, kjer se veliko raziskav opravlja na uporabi MKB za dostavo cepiv in proteinov s fiziološko vlogo. Za genso spreminjanje MKB je bilo razvito veliko različnih sistemov za kloniranje in izražanje genov. Med sistemi za izražanje heterolognih genov v MKB so bili razviti konstitutivni in nadzorovani sistemi, med katerimi je najpomembnejši z nizinom nadzorovani sistem za izražanje iz *L. lactis*.

Hepatitis A je bolezen jeter, ki jo povzroča okužba z virusom hepatitisa A. Hepatitis A je široko razširjena bolezen v revnih državah s slabimi higieniskimi razmerami in se lahko hitro prenaša preko fekalno-oralnih poti. Najučinkovitejša zaščita pred okužbo s HAV je cepljenje, ki pa zaradi drage parenteralne aplikacije ni dostopno za široko uporabo na endemičnih območjih s HAV. Ker bi oralna aplikacija cepiva proti HAV omogočila enostavno in poceni cepljenje vseh ljudi po svetu, smo se v prvem delu diplomske naloge odločili pripraviti laktkokne plazmide z vstavljenimi različicami hepatitisa A in jih izraziti v *L. lactis*. Celice *L. lactis* z izraženimi različicami HAV bi bile v nadaljevanju uporabne za peroralno cepivo proti HAV. Plazmide z različicami HAV smo pripravili tako, da se je pri prvi različici HAV izrazil znotraj celic, pri drugi na površini in pri tretji prav tako, s tem da smo mu dodali flagelin, ki ima vlogo povečanja stimulacije imunskega odziva. Pri pripravi plazmidov smo za izražanje na površini *L. lactis* uporabili plazmid pSDLBA3b, ki je vseboval SP<sub>Usp45</sub> signalni peptid za izločanje in AcmA regijo z LysM ponovitvami, ki se nekovalentno pritrdijo na površino *L. lactis*. Plazmide smo pripravili tako, da smo najprej pomnožili potrebne gene s PCR, ki smo jih nato preko klonirnega plazmida pGEM-T Easy klonirali v laktkokne plazmide. Izražanje smo detektirali z NaDS PAGE in prenosom Western. Izražanje HAV smo uspešno detektirali na površini laktakov,

ki so izražali samo HAV in HAV s flagelinom. Znotraj celic nismo detektirali izražanja antigaena hepatitisa A.

Za površinsko predstavitev v MKB obstaja že veliko sistemov, vendar niso vsi dovolj učinkoviti za posamezno aplikacijo. Zaradi tega se iščejo novi sistemi ali novi nosilni proteini za površinsko predstavitev na bakterijah. Za iskanje novih nosilnih proteinov in kandidatnih vakcin proti številnim patogenom se v zadnjem času velikokrat uporablja določanje površinskega proteoma s pomočjo proteolize površinskih proteinov in masne spektrometrije razgrajenih površinskih proteinov. V drugem delu diplomske naloge je bil tako namen poiskati kandidate za nove nosilne proteine v MKB *L. lactis* MG1363 s pomočjo določanja površinskega proteoma.

Površinski proteom *L. lactis* smo razgradili s tripsinom in razgrajene površinske proteine analizirali z masno spektrometrijo. Identificirali smo 56 različnim površinskih proteinov, med katerimi smo s pomočjo različnih programov in dobljenih podatkov izbrali 7 kandidatnih nosilnih proteinov za površinsko predstavitev v *L. lactis*. Vseh sedem genov za površinske proteine smo pomnožili s PCR in jih klonirali preko klonirnega plazmida pGEM-T Easy v laktkoknji plazmid pNZ8148 z dodano histidinsko oznako na C-koncu gena. Proteine smo izrazili na površini *L. lactis* s pomočjo z nizinom nadzorovanega sistema za izražanje in izražanje detektirali z NaDS PAGE in prenosom Western. Z obema metodama smo detektirali izražanje izbranih površinskih proteinov ustreznih velikosti. Površinsko predstavitev izbranih površinskih proteinov smo ovrednotili s pretočno citometrijo laktkoknih celic, ki so izražale izbrane površinske proteine s histidinsko oznako. V vseh primerih smo zasledili povečano povprečno intenziteto fluorescence laktkoknih celic, ki so izražale izbrane površinske proteine s histidinsko oznako, v primerjavi s celicami, ki so imele vstavljen prazen plazmid pNZ8148.

Na podlagi rezultatov prenosa Western in pretočne citometrije smo izbrali potencialni nosilni protein za površinsko predstavitev v *L. lactis*. Izbran je bil bazični membranski protein A (BmpA) ali llmg\_1064. Učinkovitost BmpA smo preverili z dodano B domeno stafilokoknega proteina A, ki ima lastnost nespecifične vezave IgG preko Fc dela protiteles. Z B dom. smo nadomestili v plazmidu histidinsko oznako in jo izrazili v laktkoknih celic. Izražanje smo detektirali s pretočno citometrijo fluorescenčno označenih celic, ki so izražale BmpA-B dom. fuzijski protein. B domena, ki smo jo izrazili na površini s pomočjo BmpA nosilnega proteina je bila funkcionalna, saj je uspešno vezala protitelesa. V primerjavi s predstavljivo B domene s sistemom SP<sub>Usp45</sub>/AcmA je bila količina izražene B domene z BmpA nosilnega proteina 4-5-krat manjša, vendar sistem še ni bil optimiziran in ima velik potencial za nadaljnje raziskave.

Nov sistem za površinsko predstavitev z BmpA nosilnim proteinom smo dodatno ovrednotili s preverjanjem moči vezave izraženega proteina na površino. Moč vezave smo preverili s spiranjem celic s pufrom, ki je vseboval detergent in visoke koncentracije soli. Med sabo smo primerjavi moč kovalentne vezave BmpA proteina na površino in moč nekovalentne vezave preko AcmA LysM domen. Povprečna intenziteta fluorescence fuzijskega proteina, ki je bil vezan nekovalentno, se je zmanjšala skoraj za polovico, medtem ko je povprečna intenziteta fluorescence kovalentno vezane B domene nepričakovano narasla. Dokazali smo, da je kovalentna vezava BmpA proteina na površino močnejša v primerjavi z nekovalento vezavo preko AcmA dela.

## 7 VIRI

Berlec A., Štrukelj B. 2008. Gensko spremenjene mlečnokislinske bakterije kot dostavnici sistem za biološka zdravila. Farmacevtski vestnik, 59: 115-120

Berlec A., Štrukelj B. 2009. Novel applications of recombinant lactic acid bacteria in therapy and in metabolic engineering. Recent Patents on Biotechnology, 3, 2: 77-87

BD Biosciences. 2000. Introduction to flow cytometry: A learning guide. San Jose, BD Biosciences: 52 str.  
[http://www.bath.ac.uk/ceos/bioimaging/Documents/Intro to flow cytometry.pdf](http://www.bath.ac.uk/ceos/bioimaging/Documents/Intro%20to%20flow%20cytometry.pdf) (4. 5. 2010)

Billion A. 2006. Augur:: The protein prediction, classification and analysis pipeline. Giessen, Institute of Medical Microbiology (software).  
<http://141.50.94.20/augur/faq/faq.php> (6. 3. 2010)

Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarme K., Weissenbach J., Ehrlich S. D. Sorokin A. 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. Genome Research, 11, 5: 731-753

Braat H., Rottiers P., Hommes D. W., Huyghebaert N., Remaut E., Remon J. P., van Deventer S. J. H., Neirynck S., Peppelenbosch M. P., Steidler L. 2006. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 4, 6: 754-759

Bratkovic T., Berlec A., Popovic T., Lunder M., Kreft S., Urleb U., Štrukelj B. 2006. Engineered staphylococcal protein A's IgG-binding domain with cathepsin L inhibitory activity. Biochemical and Biophysical Research Communications, 349, 1: 449-453

Buist G., Kok J., Leenhouts K., Dabrowska M., Venema G., Haandrikman A. J. 1995. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. Journal of Bacteriology, 177, 6: 1554-1563

Buist G. 1997. AcmA of *Lactococcus lactis*, a cell-binding major autolysin. PhD thesis. Groningen, University of Groningen: 120 str.  
<http://dissertations.ub.rug.nl/FILES/faculties/science/1997/g.buist/thesis.pdf> (6. 6. 2010)

CBS. 2009. TMHMM Server v. 2.0. Lyngby, CBS-Center for Biological Sequence Analysis (software).  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> (4. 3. 2010)

Charbit A., Boulain J. C., Ryter A., Hofnung M. 1986. Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface. The EMBO Journal, 5, 11: 3029-3037

- Courtney P. D. 2000. LACTOCOCCUS/*Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and *cremoris*. V: Encyclopedia of food microbiology. Robinson R. K. (ed.). Vol. 2. Oxford, Elsevier: 1166-1171
- De Ruyter P. G., Kuipers O. P., Beertshuyzen M. M., van Alen-Boerrigter I., de Vos W. M. 1996. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. Journal of Bacteriology, 178, 12: 3434-3439
- De Vos W. M. 1999. Gene expression system for lactic acid bacteria. Current Opinion in Microbiology, 89, 5: 1166-1445
- Doro F., Liberatori S., Rodriguez-Ortega M. J., Rinaudo C. D., Rosini R., Mora M., Scarselli M., Altindis E., D'Aurizio R., Stella M., Margarit I., Maione D., Telford J. L., Norais N., Grandi G. 2009. Surfome analysis as a fast track to vaccine discovery: identification of a novel protective antigen for Group B *Streptococcus* hypervirulent strain COH1. Molecular & Cellular Proteomics, 8, 7: 1728-1737
- Eidhammer I., Flikka K., Martens L., Mikalsen S. 2007. Computational methods for mass spectrometry proteomics. Michester, John Wiley & Sons: 67-79
- EIJVR. 1999. LipPred.Oxford, The Edward Jenner Institute for Vaccine Research (software).  
<http://www.darrenflower.info/LipPred/> (3. 4. 2010)
- EMBL-EBI. 2009. ClustalW. Cambridge, EMBL-EBI-European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (software).  
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> (3. 3. 2010)
- Freudl R., MacIntyre S., Degen M., Henning U. 1986. Cell surface exposure of the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. Journal of Molecular Biology, 188, 3: 491-494
- Hadem J., Manns M. 2007. Immune response to hepatitis A and E viruses. V: Liver immunology. Gershwin M., Vierling J., Manns M. (eds.). New Jersey, Humana Press: 163-177
- Héchard Y., Sahl H. 2002 Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. Biochimie, 84, 5-6: 545–557
- Holo H., Nes I. 1995. Transformation of *Lactococcus* by electroporation. V: Methods in molecular biology. Nickoloff J. A. (ed.). New Jersey, Humana Press: 195-199
- Honko A. N., Sriranganathan N., Lees C. J., Mizel S. B. 2006. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. Infection and Immunity, 74, 2: 1113-1120

- IDT. 2010. OligoAnalyzer 3.1. Coralville, IDT-Integrated DNA technologies (software).  
<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/Default.aspx> (10. 1. 2010)
- Ishii K., Akira S. 2007. Toll or toll-free adjuvant path toward the optimal vaccine development. *Journal of Clinical Immunology*, 27, 4: 363–371
- Jensen P. R., Hammer K. 1998. The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters. *Environmental Microbiology*, 64: 82-87
- Johns S. 2010. TOPO 2. Transmembrane protein display software. San Francisco, University of California (software).  
<http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO-run/wtopo.pl> (6. 3. 2010)
- Kandler O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49, 3: 209-224
- Khudyakov Y., Lopareva E., Jue D., Fang S., Spelbring J., Krawczynski K., Margolis H. S., Fields H. A. 1999. Antigenic epitopes of the hepatitis A virus polyprotein. *Virology*, 260, 2: 260–272
- Kuipers O. P., Beertuyzen M. M., de Ruyter P. G., Luesink E. J., de Vos W. M. 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 45: 27299-27304
- Kuipers O. P., Ruyter P. G., Kleerebezem M., Vos W. M. 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 64: 15-21
- Le Loir Y., Nouaille S., Commissaire J., Bretigny L., Gruss A., Langella P. 2001. Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 9: 4119-4127
- Lee S., Choi J., Xu Z. 2003. Microbial cell-surface display. *Trends in Biotechnology*, 21, 1: 45–52
- Leroy F., De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 2: 67–78
- Liaudet L., Murthy K., Mabley J., Pacher P., Soriano F. G., Salzman A. L., Szabo C. 2002. Comparison of inflammation, organ damage, and oxidant stress induced by *Salmonella enterica* serovar *Muenchen* flagellin and serovar *Enteritidis* lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 70, 1: 192-198
- Luchansky J. B., Muriana P. M., Klaenhammer T. R. 1988. Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*. *Molecular Microbiology*, 2, 5: 637-646

- Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V., Polouchine N., Shakhova V., Grigoriev I., Lou Y., Rohksar D., Lucas S., Huang K., Goodstein D. M., Hawkins T., Plengvidhya V., Welker D., Hughes J., Goh Y., Benson A., Baldwin K., Lee J. H., Diaz-muniz I., Dosti B., Smeianov V., Wechter W., Barabote R., Lorca G., Altermann E., Barrangou R., Ganesan B., Xie Y., Rawsthorne H., Tamir D., Parker C., Breidt F., Broadbent J., Hutkins R., O'sullivan D., Steele J., Unlu G., Saier M., Klaenhammer T., Richardson P., Kozyavkin S., Weimer B., Mills D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 103: 15611-15616
- Mercenier A., Muller-Alouf H., Granette C. 2000. Lactic acid bacteria as live vaccines. Current Issues in Molecular Biology, 2: 17–26
- Mierau I., Kleerebezem M. 2005. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 68, 6: 705–717
- Mitchell L., Joseph A., Kedar E., Barenholz Y., Galun E. 2006. Mucosal immunization against hepatitis A: antibody responses are enhanced by co-administration of synthetic oligodeoxynucleotides and a novel cationic lipid. Vaccine, 24: 5300-5310
- Mitchell L. A., Galun E. 2003 Rectal immunization of mice with hepatitis A vaccine induces stronger systemic and local immune responses than parenteral immunization. Vaccine, 21, 13-14: 1527-1538
- Murthy K., Deb A., Goonesekera S., Szabó C., Salzman A. 2003. Identification of conserved domains in *Salmonella muenchen* flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro. Journal of Biological Chemistry, 279, 7: 5667-5675
- NCBI. 2010. GenBank, Protein, Nucleotide. Databases. Bethesda, NCBI-National Center for Biotechnology Information.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>
- Nilsson B., Moks T., Jansson B., Abrahmsen L., Elmlad A., Holmgren E., Henrichson C., Jones T. A., Uhlen M. 1987. A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. Protein Engineering, 1, 2: 107-113
- Pouwels P., Leer R., Shaw M., Heijne Den Bak-Glashouwer M., Tielen F. D., Smit E., Martinez B., Jore J., Conway P. L. 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. International Journal of Food Microbiology, 41, 2: 155–167
- Previsani N., Lavanchy D. 2000. Hepatitis A. Geneva, WHO-World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response: 39 str.  
[http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisA\\_whocdscsredc2000\\_7.pdf](http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisA_whocdscsredc2000_7.pdf) (6. 6. 2010)

- Promega. 2009. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. Manual. Madison, Promega: 15 str.  
<http://www.promega.com/tbs/tb225/tb225.pdf> (2. 2. 2010)
- Promega. 2002. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Manual. Madison, Promega: 10 str.  
<http://www.eastport.cz/doc/man/WizardSVGel.pdf> (1. 2. 2010)
- Raha A., Varma N., Yusoff K., Ross E., Foo H. 2005. Cell surface display system for *Lactococcus lactis*: a novel development for oral vaccine. Applied Microbiology and Biotechnology, 68, 1: 75–81
- Ravn P. 2003. Optimization of signal peptide SP310 for heterologous protein production in *Lactococcus lactis*. Microbiology, 149, 8: 2193-2201
- Ravnikar M., Štrukelj B., Lunder M., Berlec A. 2010. Engineered lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* capable of binding antibodies and TNFα. Applied and Environmental Microbiology, sprejeto v tisk: 33 str.
- Renault P. 2002. Genetically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment. Biochimie, 84, 11: 1073–1087
- Rodriguez-Ortega M. J., Norais N., Bensi G., Liberatori S., Capo S., Mora M., Scarselli M., Doro F., Ferrari G., Garaguso I., Maggi T., Neumann A., Covre A., Telford J. L., Grandi G. 2006. Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome. Nature Biotechnology, 24, 2: 191-197
- Samatey F., Imada K., Nagashima S., Vonderviszt F., Kumasaka T., Yamamoto M., Namba K. 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. Nature, 410, 6826: 331-337
- Samuelson P., Gunnarsson E., Nygren P., Ståhl S. 2002. Display of proteins on bacteria. Journal of Biotechnology, 96, 2: 129–154
- Sandine W. E., Radich P. C., Eliker P. R. 1972. Ecology of the lactic streptococci. Journal of Milk Food Technology, 35: 176-184
- Scheppeler L., Vogel M., Marti P., Müller L., Miescher S. M., Stadler B. M. 2005. Intranasal immunisation using recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a new strategy to prevent allergic disease. Vaccine, 23, 9: 1126-1134
- Schrezenmeir J., de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. American Journal of Clinical Nutrition, 73, 2: 361S-364S
- Severin A., Nickbarg E., Wooters J., Quazi S., Matsuka Y. V., Murphy E., Moutsatsos I. K., Zagursky R. J., Olmsted S. B. 2007. Proteomic analysis and identification of

*Streptococcus pyogenes* surface-associated proteins. Journal of Bacteriology, 189, 5: 1514-1522

Siezen R. J., Bayjanov J., Renckens B., Wels M., van Huijum S. A. F. T., Molenaar D., van Hylckama Vlieg J. E. T. 2010. Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, a plant-associated lactic acid bacterium. Journal of Bacteriology, 192, 10: 2649-2650

Steidler L., Hans W., Schotte L., Neirynck S., Obermeier F., Falk W., Fiers W., Remaut E. 2000. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. Science, 289, 5483: 1352-1355

Steidler L., Neirynck S., Huyghebaert N., Snoeck V., Vermeire A., Goddeeris B., Cox E., Remon J. P., Remaut E. 2003 Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. Nature Biotechnology, 21, 7: 785-789

Stiles M. E., Holzapfel W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36, 1: 1-29

Sybesma W., Hugenholtz J., De Vos W. M., Smid E. J. 2006. Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups, and industry. Electronic Journal of Biotechnology, 9, 4: 424-448

Tjalsma H., Lambooy L., Hermans P. W., Swinkels D. W. 2008. Shedding & shaving: disclosure of proteomic expressions on a bacterial face. Proteomics, 8, 7: 1415-1428

Van Asseldonk M., Rutten G., Oteman M., Siezen R. J., de Vos W. M., Simons G. 1990. Cloning of usp45, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. Gene, 95, 1: 155-160

Van Asseldonk M., Vos W. M., Simons G. 1993. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* usp45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous  $\alpha$ -amylase. Molecular and General Genetics MGG, 240, 3: 428-434

Van Hylckama Vlieg J. , Rademaker J. L., Bachmann H., Molenaar D., Kelly W. J., Siezen R. J. 2006. Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. Current Opinion in Biotechnology, 17, 2: 183-190

Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiological Reviews, 60, 2: 407-438

Walker W. A., Goulet O., Morelli L., Antoine J. 2006. Progress in the science of probiotics: from cellular microbiology and applied immunology to clinical nutrition. European Journal of Nutrition, 45, S1: 1-18

Wegmann U., O'Connell-Motherway M., Zomer A., Buist G., Shearman C., Canchaya C., Ventura M., Goesmann A., Gasson M. J., Kuipers O. P., van Sinderen D., Kok J. 2007. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of Bacteriology*, 189, 8: 3256-3270

WHO. 2000. Hepatitis A vaccines. *Weekly Epidemiological Record*, 75, 5: 38-44  
[http://www.who.int/immunization/wer7505Hepatitis A\\_Feb00\\_position\\_paper.pdf](http://www.who.int/immunization/wer7505Hepatitis A_Feb00_position_paper.pdf) (8. 6. 2010)

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se prof. dr. Borotu Štruklju, ki mi je omogočil izdelavo diplomske naloge na področju farmacevtske biotehnologije, in za vso pomoč pri izdelavi diplomskega dela.

Posebna zahvala gre somentorju dr. Alešu Berlecu za pomoč pri celotni izvedbi diplomskega dela, tako pri eksperimentalnem delu, kot pri pisanju diplomskega dela. Hvala za vse nasvete, spodbudo, prijaznost in angažiranost za nadaljnje sodelovanje.

Zahvala gre tudi Zali Jevnikar iz Farmacevtske fakultete za hitro opravljene meritve na pretočnem citometru.

Zahvaljujem se Petri Avanzo, Juretu Pohlevnu in Jerici Sabotič za pomoč in nasvete pri eksperimentalnem delu in za prijetno vzdušje v laboratoriju. Hvala tudi vsem ostalim sodelavcem na Institutu Jožef Stefan, ki so mi kakor koli pomagali.

Za strokovni pregled diplomskega diplomskega dela se zahvaljujem doc. dr. Poloni Jamnik.

Največja zahvala gre mojim dragim sošolcem, staršem in fantu, ki so me spremljali skozi celoten študij, mi stali ob strani in me podpirali tudi v težkih trenutkih.

## PRILOGE

Priloga A: Določena nukleotidna zaporedja končnih laktokoknih konstruktov

Pri vseh zaporedjih velja, da so podčrtana zaporedja za restrikcijske encime, preko katerih so bili vstavljeni posamezni geni.

> HAV Nco/Xba\_pMSPuni -- 12..1052 of sequence  
ATTATAAGGAGGCACCTCACCATGGCTGTCTGGAGCATTAGATGGATTAGGTGATAAAACTGATTCTACATT  
CGGTTTAGTCTCTATTCAAATTGCTAACTATAATCATTCTGACGAGTACTTATCATTAGTTATCTTAGT  
GTTACAGAACAGTCAGAATTTCACCCACGTGCTCCACTTAACAGTAACGCAATGCTTCTACTGAATCTA  
TGATGTCACGAATTGCTGCTGGTGTCTGAATCATCTGTTGATGACCCCTCGTAGTGAAGAAGATAAGAGATT  
TGAGTCACATATTGAATGTAGAAAACCATAAGGAATTACGCTTGTAGTCGGAAAACAAGATTAAAGTAT  
GCTCAAGAAGAACCTCAAACGAAGTATTACCTCCACCGTAAAATGAAGGGACTTTTAGTCAATAAATCTA  
GAGAGCTCAAGCTTCTTGAACCAAAATTAGAAAACCAAGGCTTGAAACGTTCAATTGAAATGGCAATTAAA  
CAAATTACAGCACGTGCTTGATTGATAGCCAAAAGCAGCAGTTGATAAAGCAATTACTGATATTGCTG  
AAAAATTGTAATTATAAATAAAATCACCTTTAGAGGTGGTTTTTTATTATAAATTATTGTTGATT  
CGCTTCGATAGAACAACTAAACGTTCTGAGACGTTAGCCTTATTCGTTAGTTATCGGATAATCG  
TTAAAACAGGCATTACGTAGCGTAAAGCCCTTGAGCGTAGCGTGGCTTGCAGCGAAGATGTTGCTGTTA  
GATTATGAAAGCCGATGACTGAATGAAATAAACGCGCAGCGCTCTTCTATTGTTGGAGGAGGCTAAGG  
GAGTTGAGGGAAATGAAATTCCCTCATGGGTTGATTAAAATTGCTTGCATTTGCCAGCGTAGCGC  
TGGAAAATTTGAAAGGGAAATTTGAAAGGGAAAGGAAGCGAATTTGCTCCGT  
TACGACCCCCCATTAAGTG

S sivo barvo označen gen za HAV.

> Flic1\_A\_H2A-F -- 25..940 of sequence  
GGTTTAGTCTCTATTCAAATTGCTAACTATAATCATTCTGACGAGTACTTATCATTAGTTATCTTAGT  
TTACAGAACAGTCAGAATTTCACCCACGTGCTCCACTTAACAGTAACGCAATGCTTCTACTGAATCTAT  
GATGTCACGAATTGCTGCTGGTGTCTGAATCATCTGTTGATGACCCCTCGTAGTGAAGAAGATAAGAGATT  
GAGTCACATATTGAATGTAGAAAACCATAAGGAATTACGCTTGTAGTCGGAAAACAAGATTAAAGTATG  
CTCAAGAAGAACCTCAAACGAAGTATTACCTCCACCGTAAAATGAAGGGACTTTAGTCAAGAATTCTC  
CGGAGGAGGTGGTCAGGAGGGTGGATCTGGTGGAGGTGGAGCACAAGTCATTAAACCAACAGCCTCTCG  
CTGATCACTCAAATAATCAACAAGAACAGTCAGCTCGCTGAGTTCTATCGAGCGTCTGCTTCTGGCT  
TGCCTATTAAACAGCGCAAGGATGACGAGCGGGTCAGCGATTGCTAACCGTTACCTCTAACATTAAAGG  
CCTGACTCAGCGGCCGTAACGCCAACGACGGTATCTCCGTTGCGCAGACCACCGAAGGCGCCTGTCGAA  
ATCAACACAACCTACAGCGTGTGCGTGAACGTACGGTACAGGCCACTACCGTACTAACTCTGAGTCTGATC  
TGTCTTCTATCCAGGACGAAATTAAATCCCGTCTGGATGAAATTGACCGCGTATCTGGTCAGACCCAGTTCAA  
CGCGTGAACGTGCTGGCAAAAATGGCTCATGAAATCCAGGTTGGCGCAATGATAACCAGACTATCACT  
ATCGATCTGAAGCAGATTGATGCTAAACTCTTGGCTTG

S svetlo sivo označen del zaporedje za HAV gen, s temno sivo del gena za flagelin.

> Flic1\_B\_AcmA-R -- 18..985 of sequence, reverse complement, 968 bases, 1C74 checksum.  
GGAAGGTTGGATCTGGTGGAGGTGGAGCACAAGTCATTAACCAACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAAT  
AATATCAACAAAGAACAGTCAGCTCGCTGCGAGTTCTATCGAGCGTCTGCTTCTGGCTTGCATTAACAGCG  
CGAAGGATGACGCGACGGGTCAAGCGATTGCTAACGTTTACCTCTAACATTAAAGGCGTACTCAGCGGC  
CCGTAACGCCAACGACGGTATCTCCGTTGCGCAGACCACCGAAGGCGCCTGTCGAAATCAACAAACACTTA  
CAGCGTGTGCGTGAACGTACGGTACAGGCCACTACCGTACTAACTCTGAGTCTGATCTGCTTCTATCCAGG  
ACGAAATTAAATCCCGTCTGGATGAAATTGACCGCGTATCTGGTCAAGACCCAGTTCAACGGCGTAACTGCT  
GGCAAAAATGGCTCCATGAAATCCAGGTTGGCGCAAATGATAACCAGACTATCACTATCGATCTGAAGCAG  
ATTGATGCTAAACTCTTGGCTTGATGGTCCCAGGGTAGACAATTCCGTTCTCCCTCGGTGGCGTCAA  
ACCGTCTGGATCCCGGTTACCAACCTGAACAAACACCACCTAACCAACCTGCTGAGCGCAGTCCCGTATTCA  
GGACGCCGACTATGCGACCGAAGTGTCCAATATGCGAAAGCGCAGATCATCCAGCAGGCCGTAACCTCGTG  
TTGGCAAAAGCTAACCAACAGGTACCGCAGCAGGGTCTGCTGCTGAGGGTGAATTCTCTGGTGGCTCGACAA  
CCACAATTACGAATAATTCTGGAACCAATAGCAGTTCAACTACTTACCGTCAAATCTGGTATACTCT

```
TTGGGAAATCTCACAAAGATATGGAATTAGTGTGCTCAAATTCAAAGTGCATAATCTTAAAGTACCA  
TCTACATTGGTCAAAA
```

S temno sivo označeno nadaljevanje zaporedja gena za flagelin in s svetlo sivo del AcmA zaporedja.

```
> HAV-His6_pMSPuni -- 12..965 of sequence  
ATTATAAGGAGGCACTCACCAGGCTCTGGAGCATTAGATGGATTAGGTGATAAAACTGATTCTACATT  
CGGTTTAGTCTCTATTCAAATTGCTAATCATTCTGACGAGTACTTATCATTAGTTATCTTAGT  
GTTACAGAACAGTCAGAATTTCACGCTCCACTTAACAGTAACGCAATGCTTCTACTGAATCTA  
TGATGTCACGAATTGCTGCTGGTGTCTGAATCATCTGTTGATGACCCCTGAGTGAAGAAGATAAGAGATT  
TGAGTCACATATTGAATGTAGAAAACCATACAAGGAATTACGTCTGAAGTGGAAAACAAAGATTAAAGTAT  
GCTCAAGAAGAACTTCAAAACGAAGTATTACCTCACCACGTAAAATGAAGGGACTTTTAGTCAAGGATCCC  
ATCATCATCATCATCATTAATCTAGAGAGCTCAAGCTTCTTGAACCAAAATTAGAAAACCAAGGCTTGA  
CGTTCAATTGAAATGGCAATTAAACAAATTACAGCACGCTGTTGATTGATAGCCAAAAGCAGCAGTTG  
ATAAAGCAATTACTGATATTGCTGAAAATTGTAATTTATAAATAAAATCACCTTTAGAGGTGGTTTTT  
ATTTATAAATTATTGTTGATTTCGCTTCGATAGAACAAATCACCTTTCTGAGACGTTAGCGTTAGCGTT  
TCGTTAGTTATCGGCATAATCGTAAACAGGGCTTACGCTAGCGTAAAGCCCTTGAGCGTAGCGTGGCT  
TTGCAGCGAAGATGTTGTCTGTTAGATTATGAAAGCCGATGACTGAATGAAATAAGCGCAGCGTCCTCT  
ATTCGGTGGAGGAGGCTCAAGGGAGTTGAGGAATGAAATTCCCTCATGGGTTGATTAAAATTGCT  
TGCAA
```

S svetlo sivo označeno zaporedje za HAV gen, s temno sivo zaporedje za histidinski peptid in dvakrat podčrtan je stop kodon.

```
> 0551_1_pMSP -- 18..1004 of sequence  
AAGGAGGCACTCACCAGGCTAAAAAAATTAAATAGCGCTAGTAATTGGTACCAATTGCCATCACCGGAT  
TTTCGGATATAACTATTTCAAAAAAAATTAGCTCACGTACACGGGATTATCATGTACAGTGATAATAAAGAA  
GAAATGGACTCTAAGTTAGAAACTAATAAAAGAATATAGAGAAAAGCTTAACGTAGAGGGAAAATACAGTT  
CAAATCAGATACTTAGTCTGAACACACAAGCAGCTAATAATTAGAATCAAGGGCATTAAATCATGT  
TACGAAAAAGGGAAAAGGCTAGTTTAAGAAAGTAAAAACTATCAGCAGAACCTGCCTTGTGGACTTCT  
AAATCGTATACTCTGTGACCGATGATAGTAGTAAACAAATTGATTCTAAGAGTAAAGATTACATCGTT  
GAGAATATAGCGCAGTCTAAACTAATCCTTGATAATGAAGATTATCAAATTGATGCTAAAACAGA  
GTATGTAAGTGTAAATAAAAGAAAAGCGCAGCCTGACAAAGCACTTTGAGCTATAAGACAAATGGATCTATC  
CCTTCACACATTTCATTATGGAGAAGGATCCCATCATCATCATCATTAATCTAGAGAGCTCAAGCTT  
CTTGAAACAAATTAGAAACCAAGGCTGAAACGTTCAATTGAAATGGCAATTAAACAAATTACAGCAGT  
GTTGCTTGTGATAGCCAAAAGCAGCAGTTGATAAGCAATTACTGATATTGCTGAAAATTGTAATT  
TAAATAAAATCACCTTTAGAGGTGGTTTTTATTATAAATTATTGTTGATTGCTTGTGATAGAAC  
ATCAAAATCGTTCTGAGACGTTAGCGTTATTGTTAGTATCGCATAATCGTAAACAGGCGTTA  
TCGTAGCGTAAAGCCCTGAGCGTAGCGTGGCTTG
```

S svetlo sivo označeno zaporedje za llmg\_0551 gen, s temno sivo zaporedje za histidinski peptid in dvakrat podčrtan je stop kodon.

```
> 2020_9_pMSP -- 14..1003 of sequence  
TATAAGGAGGCACTCACCAGGCTAAAAGCGGAAAATGACTCGACATTGCAAATTATAATCGGAAATTAG  
TGATAATTTCAGCCATTATTGTCTATCGGTCTTTCTTTGGAAAAGTCTGAATCCCTATTCGGTGC  
AGCGCAAGCGATAATATTGCTAAAGACAAACAGATTAGTCAGCGACGGGATTGATATTGCGTCTACA  
GATACTGTGACTTATTCAATTGCGGGCTCAATAAGCGAACCAAGAAGTTGAAATTAAATTCCAAAAAAAT  
CTGGTAAAATCAAAGAGGTACAATTATCGAGGGGGTTCACCTGCAAGCCTAACGACTAAAGATAACAAATC  
AGTTGTTTAGCGCTTACAAAGGGAAACCAGCCTGGGAAGTAAATAATAGCAATGGATTAAAGTTATGAC  
TTTGAGTCAGGAAAAGAGTTGATAGGATCCCATCATCATCATCATTAATCTAGAGAGCTCAAGCTTCTT  
TGAACCAAAATTAGAAAACCAAGGCTGAAACGTTCAATTGAAATGGCAATTAAACAAATTACAGCAGTGT  
GCTTGTGATAGCCAAAAGCAGCAGTTGATAAGCAATTACTGATATTGCTGAAAATTGTAATT  
ATAAAATCACCTTTAGAGGTGGTTTTTATTATAAATTATTGTTGATTGCTTGTGATAGAACAAAT  
CAAATCGTTCTGAGACGTTAGCGTTATTGTTAGTATCGCATAATCGTAAACAGGCGTTATCG  
TAGCGTAAAGCCCTGAGCGTAGCGTGGCTTGCAAGCGAAGATGTTGCTGTTAGATTGAAAGCCGATGA
```

CTGAATGAAATAATAAGCGCAGCGCCTTCTATTCGGTTGGAGGAGGCTAAGGGAGTTGAGGGAAATGAAAT  
TCCCTCATGGGTTGATTAAAATTGCTTGCAATTGCC

S svetlo sivo označeno zaporedje za llmg\_2020 gen, s temno sivo zaporedje za histidinski peptid in dvakrat podčrtan je stop kodon.

> 2232-2\_pNZuni -- 18..1000 of sequence  
AAGGAGGCACCTCACCATGGCTAAGTGGATGAAAAAAAGACAGTTAAGAAGAAATAAAATAATTAGAAGGC  
TTCTCTGACTTTATTGCTTAGTTATCGTTCTTCTGAAACAATTCTCCTATCTGGTCGAAAGCTCA  
GCATTCACATGCTAAAAGTGATAATGGAACGAGTTGTCAACGACAGCGGATGTTAAGGAGAGTACTCCTCA  
ACTTCGAATTCAAATAAGCAAGTAATCTATCCTACAATTATTCAGGTTCAAGTGGAAAGTGTACACCAG  
TGGATTGGTAGTTAACGGCTGCTTCCGATTGAAAACGTACCCGCTCATAAATCTTGGCAATTACTGCGGA  
TGTTAATAAAGATAACTTATTAAAATTGAAAGGCAAATTGCAAGATAACCAGTATCCGATGATTGAATT  
GGGACAGTAAAGGAACTGACTCTGGCTCAATATATTCTGCTGGATTACAAAAGTAGTCTTATTGATGC  
AGAATTATCAGATTCTGGATTAAATCTCGTCGGTTATTCTCAGGAGGGACGGTGCTGTACTATATGAT  
TGATACAGCCAATAATCAAATTCTCCCCTGTTAATAAATATGTTATCTTGGATGGGAATACAATAAGCG  
ACTAATCTCAATATGGAGAAAGCTGACTAATGTTGCAAAATGGACCTTAATTAAAACACAAATGTATC  
AATACATCGAAGAAAATGAAAGAATATCTCCGAAAGTTCAAATGTTACTATTGAAAGGAGATTAAATAG  
TGCCAAGCAGACAGACAGTGTATTCCGGGGCAGATAGTTTCAATTACCATCTTCAAGAATAACGGG  
AATGAAATAACATCAACTTATATCCAACAAAGCGAGCCATTACAAGGCCAAAAATCCAACGTAGTAA  
AATATGTCAAAAATTCTGTATGGAACACCAGG

>2-2232\_pNZrev -- 27..1002 of sequence, reverse complement, 976 bases, D68 checksum.  
TTATCGTTCTTCTGGAACAATTCTCCTATCTGGTCGAAAGCTCAGCATTCACTGCTAAAGTGTAA  
TGGAACGAGTTGTCAACGACAGCGGATGTTAAGGAGAGTACTCCTCACTTCGAAATTCAAAGCAAGTA  
ATCTATCCTACAATTATATTGCAAGGTTCAAGTGGAAAGTGTACACCACTGGATTGGTAGTTCAACGGCTGC  
TTCCGATTGAAAACGTACCCGCTCATAAATCTTGGCAATTACTGCGGATGTTAATAAAGATAACTTATTAAA  
AATTGAAAGGCAAATTGCAAGATAACCAGTATCCGATGATTGAAATTGGACAGTAAAGGAACTGACTCT  
GGCTCAATATATTCTGCTGGATTACAAAAGTAGTCTCTTATTGATGCAAGATTACAGATTCTGGATTA  
ATCTCGTGGTTATTCTCAGGAGGGACGGGTGCTGTGTACTATATGATTGATACAGCAATAATCCAATT  
TCCCCCTGTTAATAAATATGTTCTTGGATGGGAATACAATAAAGCGACTATCTCAATATGGAGAAAGC  
TTGACTAATGTCTGCAAATGGACCTTAATTAAAACACAAATGTATCAATACATCGAAGAAAATATGAAA  
GAATATCTCGAAAGTTCAAATGTTACTATTGAAAGGAGATTAAATAGTCCAAGCAGACAGACAGTGTAT  
TCCGTGGGAGATAGTTTCAATTACCATCTTCAAGAATAACGGGAATGAAATAACATCAACTTATAT  
CCAACCAAAGCGAGCCATTACAAGGCCAAAAATCCAACGTAGTAAATATGTCAAAATTCTGTATG  
GAACACCAGGATCCCATCATCATCATCATTAATCTAGAGAGCTCAAGCTTCTTGAACCAAAATTAGAA  
AACCAAGGCTGAAACGTTCAATGAAA

S svetlo sivo označeno zaporedje za llmg\_2232 gen, s temno sivo zaporedje za histidinski peptid in dvakrat podčrtan je stop kodon.

> 2330\_4\_pMSP -- 16..1011 of sequence  
TTATAAGGAGGCACTCACCATGGCTAAAAAAATAAAATTATTGACTCTGCAACACTTGGATTGCCTCAATT  
GGCTTACTTGTGCTGCTCGTCAAAAGATAATTCTCATCTCTAAATCAACAGATAAAAGTGACAACAGTAACCG  
TTGCAACTTCTGCCGCTCTGTGCTTATGAATACAGCGAAAATGGTAAAATGACTGGTTTGAATATGATAT  
TTTAAAGCAGCTGACAAGGACATGAAAGATTATAAATTGAGTTCAAGTCTACGAAGATACTGCGATTG  
GCTGCTTAGATGGGGTCGCGCACAAATTGCGGAAATAATTGGTAAAAGCTAAAGCTGTTCTGAAAAAT  
ATCTCTTAGTTATCCTGTCAGGAATTGATGCTATTCTCAACTTCTAAAGAAAACATCACTAAAAT  
TTCCCAACTTGTGGCAAACACAGAAATTCTGCTGGAAACAAACTATGGTGTATGTTGAAAGTGTGAAAT  
AAAAACCATCCGACAAAAAAATTGATGTTAAATATGCCAACGTCTTAGCTGACCGTCTATCTGCGATTG  
CTAGTGGACAAATTGATTCTTATTGCTCTAAAGCACCAGCAGAAAATTAAATCAGACAACATGCAATTAC  
AGGTTGGTTGATACTGTTCCACAGACTGAAACAAACAATGAGTTAAAACCTTATGATTACTTTATCCTT  
GATAACAGTCACACAAATTACAAAAAGATTGAAATGCAAGCAGAGCTCAAAAAACCTATGAAACGGAACGCTAA  
AAGAACTCTCAGAAAATATTCCATGACAGCCATTCCAGCTGCTGATCAATTCAAAGGATCCCATCATCA  
TCATCATCATTAATCTAGAGAGCTCAAGCTTCTTGAACCAAAATTAGAAAACCAAGGCTGAAACGTTCAAT  
TGAAATGGCAATTAAACAAATTACAGCACGTGTTGCTGATTGATAG

S svetlo sivo označeno zaporedje za llmg\_2330 gen, s temno sivo zaporedje za histidinski peptid in dvakrat podčrtan je stop kodon.

```
> 0168_9_pMSP -- 12..1032 of sequence
AAATTATAAGGAGGCACTCACCATGGCTAATAAGAAAACAATTAAAAACATAACAAGCGTGGTTGCAGTTATT
ATTGCACTAGCTGCGGATATTGGTTCTGGACGTTACATTAGGGCAAGGAATGATTCACTACTAGTA
GTAGTCAGTTCCACAAAAGCCTGGCAACATCAGTTAACAGCAAGCTCCTTGCTTTAAAAACCAAAAACA
AATGGTCATGGCAAATACTGATGCTTAGGGCGTCAGTTGATGCGCACATTCAACTTAAAGATTGCAAGAA
CCTAAAGTAAAACGGGAACCTTAACTTATAATCCTGTTGGCTGGCATAATTATAATTCTATTACAAGAAAT
CCAATGGTTGATTGGTAAAATGTGGTGATTGCGCGTGGACATTGGTTGTTATCAATTCTGGTTAAA
TGATGAAGCAAGAAATTAGTTCCGAAACTGCTTGGTTAACGGTGGAAATTTCACGGGAACGAATGATGGA
AATACTGCCAGCATGCTTATTATGAAAATCGGTTAGACAGCTGGCTGCTAATCATCCTAATTATTGG
ATTATCAAGTCACTCCACTTACAAAGGAAATGAGCTCTGCCACGCCAATTGATTGGCTTACGTTGGAAT
AGATAAAAACGGTCAAAGCTTGTCAATTAAACTTGGCGGGGACGTGAAAAGTCTGGGAATGGTGGAGCAACT
GTTGTTGTTCTTGATAATGTCGCTCTAATGCTAAAATTATGCTGACGGGACTGCACTCAATACAGTC
AACCTGGATCCCATCATCATCATCATCAATTCTAGAGAGCTCAAGCTTCTTGAACCAAATTAGAAAAC
CAAGGCTTGAACGTTCAATTGAAATGGCAATTAAACAAATTACAGCACGTGTTGCTTGTGATTGATAGCCAA
AAGCAGCAGTTGATAAAGCAATTACTGATATTGCTGAAAATTGTAATTATAAATAAAATCACCTTTA
```

S svetlo sivo označeno zaporedje za llmg\_0168 gen, s temno sivo zaporedje za histidinski peptid in dvakrat podčrtan je stop kodon.

```
> 1907_16_pMSP -- 13..1002 of sequence
ATTATAAGGAGGCACTCACCATGGCTAAATTCAAAAAACTCGGATTAGTTATGGCTACAGTCTTGCCGGAGC
CGCATTGGTAACCTGTCTGGTTGCTCAAGCAGTGATTCAAGCAAGGATATCATCACAAATGAAAGGTGAT
ACCATTCGCTTCTGATTATAACAGGAAGCTAACAAATTCCCGTCACAACCGACAATACCTTGCTTCAA
ATTTAACCTTGATAAAAATTCTACTAAAGATTGGAAAAGAAGTTACTGATAAAAGATGTCAACAAAAAGT
TAAATCTCTCAAAGATCAGTATGGAAGCCAATTGCGCTCAGCTTGCAACAACAAGGTTGACAGAAGCAAGT
TTCACACCACATGCGTACACAAATGCTTGAGCAAGCAGCAATTGACCAAGGAATCGAAGCAACGCAATATA
CTGATGCAAATCTAAAAAGCTTGGGAATCTTATCATCCAGATGTAACAGCTTATGTTGTTCTGAAACTTC
AAAAGATGCGACTAAAGCTTAGATGCTCTAAAAAGATGATGCTGGTAAAGCAAGCTTGAGAAAACA
AATGCTGCAAATAAGTCACTTTAATTCAACATCAACAACTGTGCCAAGTGGTCAAAGTGCAGCATTTA
AGTTGAAAATGGTGAATTTCAGCGTAATTGAACTACTAGTGCATCAACTGGTCTACTTCTTACTACAT
TGTTGAGATGGTTAAATCTCTGAAAAAGGTAGTGATATGAAACAAGTATAAAAAGAACTTAAAGTCA
AAAGCTGAAAAGAACAGATAACACCTTGTCAAGCGGAGTTATTGCTAAGTACCTTAAAGAACATAATGTC
CTGTGAAAGAACATCTGCTTGTCAATCTCTCACAATTCACTCAAACATCAAGTACATCTCATCTAAAGG
ATCCCCATCATCATCATCATCAATTCTAGAGAGCTCAAGC
```

S svetlo sivo označeno zaporedje za llmg\_1907 gen, s temno sivo zaporedje za histidinski peptid in dvakrat podčrtan je stop kodon.

```
> 1064_20_pMSP -- 15..993 of sequence
TTATAAGGAGGCACTCACCATGGCTAAAAAAACGCGTAATCGCAGTTAGTGCTATTGCACTTGCACTAGTCGCA
GTCCTGCAGGATGTCGTTCACATGACGCATCTGGAACTTCAGGTAAAGTAAAAACTGACCTTAAAGCAGCAA
TCGTCACCGATGCTAATGGTAAATGACCGTTCTGTTAACCAATCCGTTGGGAAGGTCTCAAAGCTGGGG
GAAAGAAAATAACCTGAAAAAAAGGTACTGGATACACTTACTTCAATCTAATTGCTCAGATTACACGACT
AACTATAACTCTGCGGAGCAACAAGGTTACAAACTTTGTTGGTATTGGATTCTCTTACAAGATGCGACAT
CAGCAGCTGCGAAAAATAATCCAAAATCTAACCTTGTATCGTCTGACTCTGCTATTAAAGACCAAAAGAATGT
AACTTCAGCAACTTTGCAGATAACGAAAGTGCTTATCTGCTGGTAGCTGCGGCCAAGCAACTAAACG
AACAAAAATTGGTTCATGGTGGGATGCAATCGATGTTATTACTGTTGAAAAGGTTATGTAGCTGGT
CCAAGTCTGAAATCAGACATCAAAGGTTGATATTCAATACGCTGGTTCTGATGCGCTAAAGGTA
AACAAATTGCAAGCAGCTATGTATGGTCTGGTAGTGTTACCAATGTGCGGGTGGCGTAGGGACAGGT
GTCTTCAGTGAAGCTAAAGCCTGAACTCAAGCAAAATGAAGCTGACAAAGTTGGGTTATCGGTGTTGACC
AAGACCAAGAACATCTGGAAAATATAAATCTAAAGACGGTAAAGGATTCTAACCTTGTCTGTTCAACAAT
CAAAGAAGTAGGAACACTGTTGAAAAGACATTGCTGACAAGACTAAAGACGGTAAATTCCCTGGAAACAATC
GTTACTTACAACCCTTAAAGGGTGTGTT
```

>20-1064\_pNZrev -- 25..998 of sequence, reverse complement, 974 bases, 2195 checksum.

```
GGGAAAGGTCTCAAAGCTGGGGAAAGAAAATAACCTGAAAAAAGGTACTGGATACACTTACTTCCAATCT
AATTCACTTCAGATTACACGACTAACTATAACTCTCGGGAGCAACAAGGTTACAAACTTTGTTGGTATTG
GATTCTCTTACAAGATGCGACATCAGCAGCTGCAGAAAATAATCCAAATCTAACCTTGTATCGTGACTC
TGTCACTAAAGACCAAAGAAATGTAACCTCAGCAACTTTGAGATAACGAAAGTCTTATCTGCTGGTGT
GCTCGGCCAAAGCAACTAAAACGAACAAAATTGGTTCATCGTGGGATGCAATCGATGTTATTACTCGTT
TTGAAAAGGTTATGTTAGCTGGTGCAGTCTGAAAATCAGACATCAAAGTTGATATTCAATACGCTGGTTC
TTCTCTGATCGGCTAAAGGTTAAACAATTGAGCAGCTATGTATGGTCTGGTATGTTACCAA
TGTGCGGGTGGCGTAGGGACAGGGTCTCAGTGAAGCTAAAGCCTGAACTCAAGCAAAATGAAGCTGACA
AAGTTGGTTATCGGTGTTGACCAAGACCAAGAACACCTGGAAAATATAATCTAAAGACGGTAAAGATTG
TAACCTTGTTCTGTTCAACAATCAAAGTAGGAACACTGGTAAAGACATTGCTGACAAGACTAAAGAC
GGTAAATTCCCTGGTGGAAACAATCGTTACTTACAACCTTAAAGGTTGAGATTAGGACTTGATAACG
CAACTTCAGAAATTAAAGATGCTGTTGCAAAGCAAAACAGATATCATTGATGGAAAATTACTGTTCC
AAAAGGATCCCATCATCATCATCATTAATCTAGAGAGCTCAAGCTTCTTGAACCAAAATTAGAAAAC
AAGGCTTGAACGTTCAATGAAATG
```

S svetlo sivo označeno zaporedje za llmg\_1064 gen, s temno sivo zaporedje za histidinski peptid in dvakrat podčrtan je stop kodon.

> 1064B\_pNZuni -- 12..1008 of sequence

```
ATTATAAGGAGGCACCTCACCATGGCTAAAAAACGCGTAATCGCAGTTAGTGCTATTGCACTTGCATCAGTCGC
AGTCCTTCAGGATGTCGTTACATGACGCATCTGGAACTTCAGGTAAAGTAAAACGCTTAAAGCAGCA
ATCGTCACCGATGCTAATGGTGTAAATGACCGTTCTGTTAACCAATCCGCTTGGGAAAGGTCTTCAAAGCTGGG
GGAAAGAAAATAACCTGAAAAAGGTTACTGGATACACTTACTTCAATCTAATTGCTCAGATTACACGAC
TAACTATAACTCTGGGAGCAACAAGGTTACAAACCTTGTGTTATTGGATTCTCTTACAAGATGCGACA
TCAGCAGCTGCGAAAATAATCCAAATCTAACCTTGTGTTATCGTGTACTCTGCTTAAAGACCAAAAGAATG
TAACCTCAGCAACTTTGAGATAACGAAAGTCTTATCTGCTGGTGTAGCTGCGGCCAAAGCAACTAAAC
GAACAAAATTGGTTATCGGTGGGATGCAATCCGATGTTATTACTCGTTTGAAAAGGTTATGTTAGCTGGT
GCCAAGTCTGAAAATCAGACATCAAAGGTTGATATTCAATACGCTGGTCTTCTGATGCGGCTAAAGGTA
AAACAATTGAGCTATGTATGGTTCTGGTGTAGTTACCAATGTGCGGGTGGCGTAGGGACAGG
TGTCTTCAGTGAAGCTAAAGCCTTGAACCTCAAGCAAAATGAAGCTGACAAGGTTGGGTTATCGGTGTTGAC
CAAGACCAAGAACACCTTGGAAAATATAATCTAAAGACGGTAAAGACATTCTAACCTTGTGTTCAACA
ATCAAAGAAGTAGGAACCTGGTAAAGACATTGCTGACAAGACTAAAGACGGTAAATTCCCTGGTGGAAACAA
TCGTTACTTACAACCTTAAAGGTTGAGATTAGGACTTGATA
```

>1\_1-1064B\_pNZrev -- 25..1013 of sequence, reverse complement, 989 bases, 3FA checksum.

```
TATTGGATTCTCTTACAAGATGCGACATCAGCAGCTGCAGAAAATAATCCAAATCTAACCTTGTATCGTT
GACTCTGTCATTAAGACCAAAGAAATGTAACCTCAGCAACTTTGAGATAACGAAAGTCTTATCTGCTG
GTGTAGCTCGGCCAAAGCAACTAAAACGAACAAAATTGGTTCATCGTGGGATGCAATCGATGTTATTAC
TCGTTTGAAAAGGTTATGTTAGCTGGTGCAGTCTGAAAATCAGACATCAAAGGTTGATATTCAATACGCT
GGTTCTTCTGATGCGGCTAAAGGTTAAAGCAATTGAGCAGCTATGTATGGTTCTGGTGTAGTTAGCTGGT
ACCAATGTGCGGGTGGCGTAGGGACAGGTCTCAGTGAAGCTAAAGCCTTGAACCTCAAGCAAAATGAAGC
TGACAAAGTTGGGTTATCGGTGTTGACCAAGACCAAGAACACCTGGAAAATATAATCTAAAGACGGTAAA
GATTCTAACCTTGTCTTCAACAATCAAAGAAGTAGGAACCTTGTAAAAGACATTGCTGACAAGACTA
AAGACGGTAAATTCCCTGGTGGAAACAATCGTTACTTACAACCTTAAAGGTTGAGATTAGGACTTGA
TAACGCAACTTCAGAAATTAAAGATGCTGTTGCCAAAGCAAAACAGATATCATTGATGGAAAATTACTGTT
CCTTCAAAAGGATCCGCTGATAACAAATTCAACAAAGAACACAAATGCTTCTGATGAAATTTCACATTAC
CTAACTTAAATGAAGAGCAACGCAATGGTTCATCCAAAGCTTAAAGATGACCCAAAGCCAAAGCGCTAACCT
TTTAGCAGAAGCTAAAGCTAAATGATGCAAGCACCAAATAATCTAGAGAGCTCAAGCTTCTTGAAC
CAAATTAGAAAACCAAGGCTTGAACGTTCAATGAAATG
```

S svetlo sivo označeno zaporedje za llmg\_1064 gen in s temno sivo zaporedje za B domeno.

## Hipotetični protein llmg\_0551

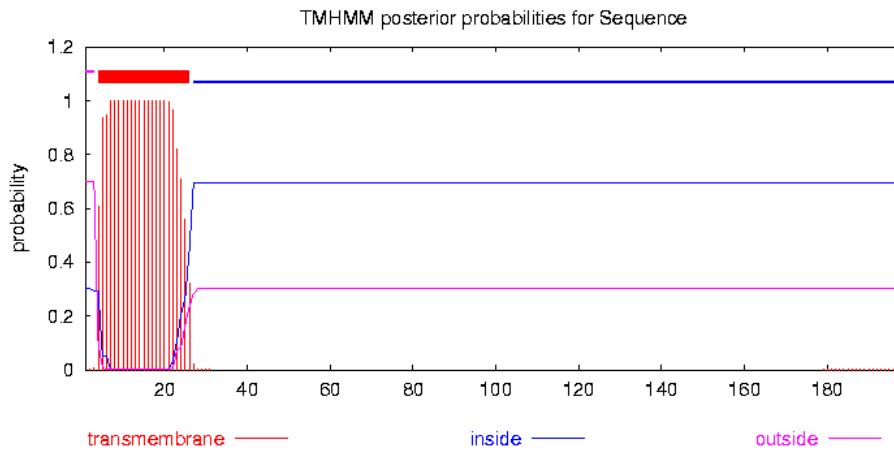
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..198  
/organism="Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363"  
/strain="MG1363"  
/db\_xref="taxon:416870"  
Protein 1..198  
/product="hypothetical protein"  
/calculated\_mol\_wt=22136  
CDS 1..198  
/locus\_tag="llmg\_0551"  
/coded\_by="NC\_009004.1:546237..546833"  
/transl\_table=11  
/db\_xref="GeneID:4797599"

### ORIGIN

1 mkkilialvi lvpiaitgff gynyfqknia hvhgimysd nkeemdskle tnkknieksl  
61 tvegkyssks dtlvlnqaa nklmnqgafn hvtkkgekas fkkvkklsae palwtsksyt  
121 svtdsssxti dskskdyivl geysatskil ildnedyqnf dakteyvsvi kekrdadkal  
181 lsyktngsip shifhyge

>gi|125623416|ref|YP\_001031899.1| hypothetical protein llmg\_0551 [Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363]  
MKKILIALVILVPIAITGFFGNYFQKNIAHVHGIIMYSDNKEEMDSKLETNKKNIEKSLSLTVEGKYSSKS  
DTLVLNNTQAANKLMNQGAFNHVTKKGEKASFKKVK**KLSAEPALWTSKSYTSVTDSSKTIDSKSVDYIVL**  
GEYSATSKILILDNEDYQNFDAKTEYVSVIKEKRDAKALLSYK**TNGSIPSHIFHYGE**

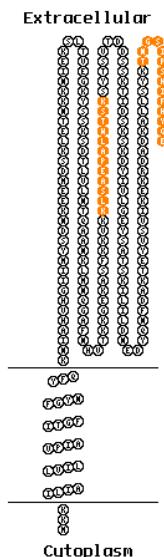
Transmembrane prediction (TMHMM)  
# Sequence Length: 198  
# Sequence Number of predicted TMHs: 1  
# Sequence Exp number of AAs in TMHs: 20.88946  
# Sequence Exp number, first 60 AAs: 20.87866  
# Sequence Total prob of N-in: 0.30165  
# Sequence POSSIBLE N-term signal sequence  
Sequence TMHMM2.0 outside 1 3  
Sequence TMHMM2.0 TMhelix 4 26  
Sequence TMHMM2.0 inside 27 198



### ORIGIN

1 atgaaaaaaaaa tattaatagc gctagtaatt ttggtagccaa ttgccatcac cggattttc  
61 ggatataact atttcaaaa aaatatagct cacgtacacg ggattatcat gtacagtat  
121 aataaagaag aatggactc taagtttagaa actaataaaaa agaatataga gaaaaggcta  
181 actgttagagg gaaaatacag ttcaaaatca gatacattag tcttgaacac acaaggcag  
241 aataaaatcaa tgaatcaagg ggatattat catgtacga aaaaaggggaa aaaggcttagt  
301 tttagaaaaag tgaaaaaact atcagcagaa cctgccttg ggacttcaa atcgataact  
361 tctgtgaccg atgatagtag taaaacaatt gattctaaga gtaaagatta catgtttta  
421 ggagaatata gcgcgacttc taaaatacta atccttgata atgaagatta tcaaaatttt  
481 gatgctaaaa cagagtatgt aagtgtataa aaagaaaaac gcgcacgtga caaagcactt  
541 ttgagctata agacaaatgg atctatccct tcacacattt ttcattatgg agaataa

>gi|125622882:546237-546833 Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363, complete genome  
ATGAAAAAAATATTAATAGCGCTAGTAATTGGTACCAATTGCCATCACCGGATTTCCGGATATAACT  
ATTTCAAAAATATAGCTCACGTACACGGGATTATCATGTACAGTGATAATAAGAAGAAATGGACTC  
TAAGTTAGAAAATAAAAAGAATATAGAGAAAAGCTTAAGTAGAGGGAAAATACAGTTCAAATCA  
GATACATTAGTCTGAAACACACAAGCAGCTAATAAATTAAATGAATCAAGGGGCATTTAATCATGTTACGA  
AAAAAGGGAAAAGGCTAGTTAAGAAAGTGAAGAAACTATCAGCAGAACCTGCCTTGTGGACTTCAA  
ATCGTATACTTCTGTGACCGATGATAGTAGTAAACAATTGATTCTAAGAGTAAGATTACATCGTTTA  
GGAGAATATAGCGCGACTTCTAAAATACTAATCCTTGATAATGAAGATTATCAAATTTGATGCTAAA  
CAGAGTATGTAAGTGTAAATAAAAGAAAACGCGACGCTGACAAAGCACTTTGAGCTATAAGACAAATGG  
ATCTATCCCTCACACATTTCATTATGGAGAATAA



## Hipotetični protein llmg\_2020

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..147
	/organism="Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363"
	/strain="MG1363"
	/db_xref="taxon: <a href="#">416870</a> "
<u>Protein</u>	1..147
	/product="hypothetical protein"
	/function="Uncharacterized protein conserved in bacteria"
	/calculated_mol_wt=16083
<u>Region</u>	26..147
	/region_name="COG5353"
	/note="Uncharacterized protein conserved in bacteria [Function unknown]; COG5353"
	/db_xref="CDD: <a href="#">34928</a> "
<u>CDS</u>	1..147
	/locus_tag="llmg_2020"
	/coded_by="complement(NC_009004.1:2005492..2005935)"
	/transl_table= <a href="#">11</a>
	/db_xref="GeneID: <a href="#">4797205</a> "

### ORIGIN

```

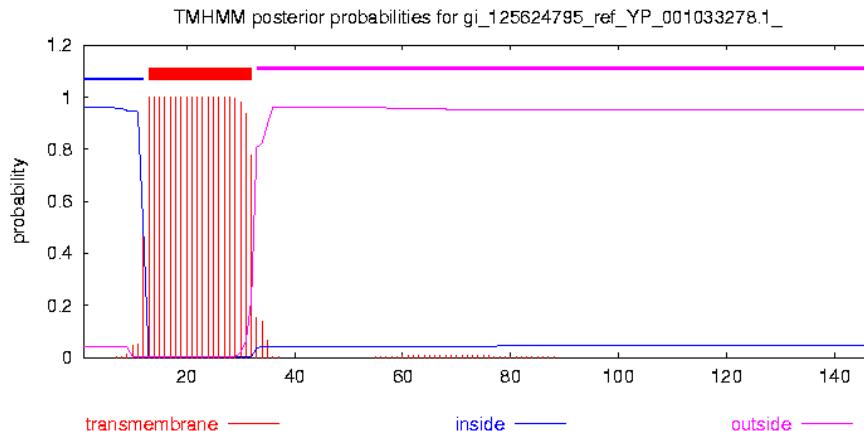
1 mkkkrkmtrhs qiiigilvii laiylsiglf fwkslnpyhs vraqainiak dktdlvkatg
61 fdiastdtvt ysivglnkan qevgilipkk sgkikevqls evgspasltt kdtksvvlal
121 ykgkpawevn nsngfkvydf esgkeli

```

>gi|125624795|ref|YP\_001033278.1| hypothetical protein llmg\_2020 [Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363]  
MKKRKMTRHSQIIIGILVIIILAIYLSIGLFFWKSLNPYHVSRAQAINIAKDKTDLVKATGFDIASTDTVT  
YSIVGLNK**ANQEVLGILIPKKSGKIKEVQLSEGVPASLTTKDTKS**VVLALYKGKPAWEVNNSNGFKV**YDF**  
**ESGKELI**

Signal peptide: 44, 33, 22 (Augur)

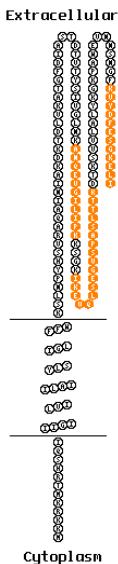
```
# gi_125624795_ref_YP_001033278.1_ Length: 147
# gi_125624795_ref_YP_001033278.1_ Number of predicted TMHs: 1
# gi_125624795_ref_YP_001033278.1_ Exp number of AAs in TMHs: 20.7935
# gi_125624795_ref_YP_001033278.1_ Exp number, first 60 AAs: 20.68787
# gi_125624795_ref_YP_001033278.1_ Total prob of N-in: 0.95994
# gi_125624795_ref_YP_001033278.1_ POSSIBLE N-term signal sequence
gi_125624795_ref_YP_001033278.1_ TMHMM2.0 inside 1 12
gi_125624795_ref_YP_001033278.1_ TMHMM2.0 TMhelix 13 32
gi_125624795_ref_YP_001033278.1_ TMHMM2.0 outside 33 147
```



#### ORIGIN

```
1 atgaaaaaagc ggaaaatgac tcgacattcg caaattataa tcggaatttt agtgataatt
61 ttagccattt atttgtctat cggcttttc ttttggaaaa gtctgaatcc ctatcatcg
121 gtgcgagcgc aaggataaa tattgctaaa gacaaaacag atttagtcaa agcgacggga
181 tttgatattg cgtctacaga tactgtact tattcaattt tcgggctcaa taaagcgaac
241 caagaaggta gaatttaat tccaaaaaaaaa tctggtaaaa tcaaagaggt acaattatct
301 gaggggggtt cacctgcaag cctaaccgact aaagatacca aatcaagtgt tttagcgctt
361 tacaaaggga aaccagcctg ggaagttaat aatagcaatg gatttaaagt ttatgacttt
421 gagtcagggaa aagagtttat atga
```

```
>gi|125622882:c2005935-2005492 Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363, complete genome
ATGAAAAGCGAAAATGACTCGACATTGCAATTATAATCGAATTAGTGATAATTAGCCATT
ATTTGTCTATCGTCTTTCTTTGGAAAAGTCTGAATCCCTATCATTGGTGCAGCGCAAGCGATAAA
TATTGCTAAAGACAAAACAGATTAGTCAGCAGCGACGGGATTGATATTGCGTCTACAGATACTGTGACT
TATTCAATTGTCGGCTCAATAAGCGAACCAAGAAGTTGGAATTAAATTCCAAAAAAATCTGGTAAA
TCAAAGAGGTACAATTATCTGAGGGGTTTCACCTGCAAGCCTAACGACTAAAGATAACCAATCAGTTGT
TTTAGCGCTTTACAAAGGGAAACCAGCCTGGGAAGTAAATAATAGCAATGGATTAAAGTTATGACTTT
GAGTCAGGAAAAGAGTTGATATGA
```



## Hipotetični protein llmg\_2232

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..321 /organism="Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363" /strain="MG1363" /db_xref="taxon: <a href="#">416870</a>
<u>Protein</u>	1..321 /product="hypothetical protein" /function="Uncharacterized protein with an alpha/beta hydrolase fold" /calculated_mol_wt=35742
<u>Region</u>	73..320 /region_name="Esterase_lipase" /note="Esterases and lipases (includes fungal lipases, cholinesterases, etc.) These enzymes act on carboxylic esters (EC: 3.1.1.-). The catalytic apparatus involves three residues (catalytic triad): a serine, a glutamate or aspartate and a histidine.These...; c109107" /db_xref="CDD: <a href="#">142152</a> "
<u>CDS</u>	1..321 /locus_tag="llmg_2232" /coded_by="complement(NC_009004.1:2193297..2194262)" /note="Bacterial protein of unknown function (DUF915)" /transl_table= <a href="#">11</a> /db_xref="GeneID: <a href="#">4797813</a> "
ORIGIN	<pre> 1 mkwmkkqrqlr rnknnfrrls ltfialvivl sgtiffllsws kaqhshaksd ngtslsttad 61 vkestssstsn snkqviypti yiagsgsvt pvdwlvqrll pienvpahks laitadvnkd 121 nllkieggis qdnqypmief gtvkgtdsgs iysaglgkvv sylmqnyqip winlvgyssg 181 gtgavyytm tannpnfppv nkyvsldgey nkatnlqyge sltnvlqngp liktqmyqyi 241 eenyerispk vqmlllegdf nsakqtdsai pwadsfsiyh lfknngneit stlyptkash 301 sqapknptvv kyvknflygt p </pre>

```

>gi|125624999|ref|YP_001033482.1| hypothetical protein llmg_2232 [Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363]
MKWMKKRQLRRNKNFRLSLTFIALVIVLSGTIFFLWSKAQHSHAKSDNGTSLSTTADVKESTSSTSN
SNKQVIYPTIYIAGSSGSVTPWDWLVRQLLPIENVPAHKSLAITADVNKDNLKIEGQISQDNQYPMIEF
GTVKGTDGSIYSAGLQKVVSYLMQNYQIPWINLVGYSSGGTGAVYYMIDTANNPNFPPVNKYVSLDGEY
NKATNLQYGESLTNVLQNGPLIKTQMYQYIEENYERISPKVQMLLLEGDFNSAKQTDSAIPWADSFSIYH
LFKNNGNEITSTLYPTKASHSQAPKNPTVVVKYVKNFLYGT P

```

Signal peptide: 45, 45, 25 (Augur)

```

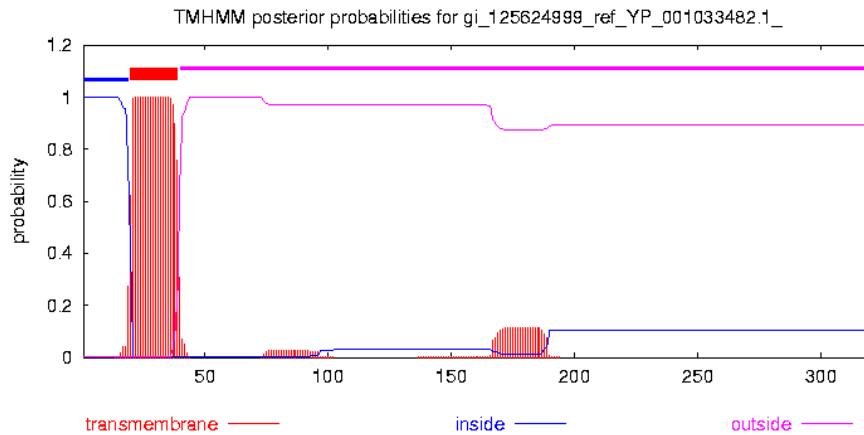
# gi_125624999_ref_YP_001033482.1_ Length: 321
# gi_125624999_ref_YP_001033482.1_ Number of predicted TMHs: 1
# gi_125624999_ref_YP_001033482.1_ Exp number of AAs in TMHs: 23.12814
# gi_125624999_ref_YP_001033482.1_ Exp number, first 60 AAs: 20.05918

```

```

# gi_125624999_ref_YP_001033482.1_ Total prob of N-in:      0.99866
# gi_125624999_ref_YP_001033482.1_ POSSIBLE N-term signal sequence
gi_125624999_ref_YP_001033482.1_          TMHMM2.0  inside      1     19
gi_125624999_ref_YP_001033482.1_          TMHMM2.0  TMhelix    20     39
gi_125624999_ref_YP_001033482.1_          TMHMM2.0  outside    40    321

```



#### ORIGIN

```

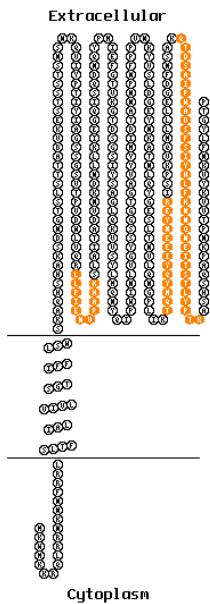
1 atgaagtgga taaaaaaaag acagttaga agaaataaaa ataatttag aaggcttct
61 ctgacttta ttgcttagt ttcgttctt tctggacaa tttcttcctt atcttggtcg
121 aaagctcgcg attcacatcg taaaagtgtat aatggacgc gtttgtcaac gacagcggat
181 gtaaggaga gtacttcctc aacttgcgtat tcaaataagg aagtaatcta tcctacaat
241 tatatgcag gttcaagtgg aagtgttaca ccagtggat ggttagtca acggctgtt
301 ccgattgaaa atgtacccgc tcataaatct ttggcaattt ctgcggatgt taataaaagat
361 aacttattaa aaatttgaagg gcaaaattcg caagataacc agtacccgtt gatttgaattt
421 gggacagttaa aaggaaactga ctctggctca atatattctg ctggattaca aaaagtagtc
481 tcttatttga tgcagaattt tcaagtttctt tggattaatc tcgtcggtt ttcttcaggaa
541 gggacgggtt ctgtgtacta tattttgtat acagccaata atccaaatttt tccccctgtt
601 aataatataatc tattttggaa tggggatatac aataaaaggcgta ctaatcttca atatggagaa
661 agcttgcatac atgttttgcataa atatggacact ttaattttttt cacaatgtt tcaatacatc
721 gaagaaaact atgaaagaat atcttcgaaa gttcaatgt tactatttggaa aggagatttt
781 aatagtgcacatc agcagacaga cagtgttattt ccgtggggcag atagtttttcaatttaccat
841 ctcttcaaga ataaacggaa tggaaaataaca tcaactttat atccaaaccaa agcgagccat
901 tcacaagcgc caaaaaatcc aactgttagta aaatatgtca aaaatttttctt gtatggaaaca
961 ccataaa

```

```

>gi|125622882:c2194262-2193297 Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363, complete genome
ATGAAGTGGATGAAAAAAAGACAGTTAGAAGAAGAATAAAATAATTAGAAGGCTTCCTGACTTTTA
TTGCTTTAGTTATCGTTCTTCTGGACAATTTCTTCTCTATCTTGTGAAAGCTCAGGATTACATGC
TAAAAGTGATAATGGAACAGAGTTGTCAACGACAGCGGATGTTAAGGGAGAGTACTTCCTCAACTTCGAAT
TCAAATAAGCAAGTAATCTATCCACATTTATATTGTCAGGTTCAAGTGGAAAGTGTACACCGAGTGGATT
GGTTAGTTCACCGGCTGTTCCGATTGAAAATGTACCCGCTCATAAATCTTGGCAATTACTGCGGATGT
TAATAAAGATAACTTATTAAGGAACTTGAAGGGCAAATTTCGCAAGATAACCAGTATCCGATGATTGAATT
GGGACAGTAAAGGAACCTGACTCTGGCTCAATATATTCTGCTGGATTACAAAAGTAGTCTCTTATTGAA
TGCAGAATTATCAGATTCTGGATTAACTCTCGTCGGTTATTCTTCAGGAGGGACGGGTGCTGTGACTA
TATGATTGATACAGCCAATAATCCAATTTCCTGGTTAATAAAATATGTATCTTGGATGGGGAAATAC
AATAAAGCGACTAATCTCCAATATGGAGAAAGCTTCAAGTAAATGTCTTGCACAAATGGACCTTAAATTAAAA
CACAAATGTATCAATACATCGAAGAAAACCTATGAAAGAATATCTCGAAAGTCAAATGTTACTATTGGA
AGGAGATTTAATAGTGCACAGACAGACAGTGCTATTCCGTGGGAGATAGTTTTCAATTTACCAT
CTCTTCAAGAATAACGGGAATGAAATAACATCAACTTTATATCCAACCAAAGCGAGCCATTACAAGCGC
CAAAAATCCAACGTAGTAAATATGTCAAAAATTCTGTATGGAAACACCATAA

```



## Amino-kislinski ABC transporter ekstracelularno vezavni protein (llmg\_2330)

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..280 /organism="Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363" /strain="MG1363" /db_xref="taxon: <a href="#">416870</a> "
<u>Protein</u>	1..280 /product="amino-acid ABC transporter extracellular binding protein" /function="ABC-type amino acid transport/signal transduction systems, periplasmic component/domain" /calculated_mol_wt=30922
<u>Region</u>	50..268 /region_name="SBP_bac_3" /note="Bacterial extracellular solute-binding proteins, family 3; pfam00497" /db_xref="CDD: <a href="#">109548</a> "
<u>Region</u>	55..268 /region_name="PBPb" /note="Bacterial periplasmic transport systems use membrane-bound complexes and substrate-bound, membrane-associated, periplasmic binding proteins (PBPs) to transport a wide variety of substrates, such as, amino acids, peptides, sugars, vitamins and...; cd00134" /db_xref="CDD: <a href="#">29040</a> "
<u>Site</u>	order(86,111,154,198) /site_type="other" /note="substrate binding pocket" /db_xref="CDD: <a href="#">29040</a> "
<u>Site</u>	order(179,185,191) /site_type="other" /note="membrane-bound complex binding site" /db_xref="CDD: <a href="#">29040</a> "
<u>Site</u>	228..233 /site_type="other" /note="hinge residues" /db_xref="CDD: <a href="#">29040</a> "
<u>CDS</u>	1..280 /locus_tag="llmg_2330" /coded_by="NC_009004.1:2288241..2289083" /note="PF00497: Bacterial extracellular solute-binding protein, family 3; Family membership" /transl_table= <a href="#">11</a> /db_xref="GeneID: <a href="#">4796941</a> "

ORIGIN

```
1 mkkiklltla tlgiasigll aacsskdnnss skstdkvttv tvatsaasvp yeysengkmt  
61 gfeydlkaa ddkmdkdykfe fkvyedsail aaldggraqi aannfgktka rsekylfhyp  
121 vrqgidaifs tsknenitq qlagktteip agtnygdmfme swnknhpdkk idvkysqrpl  
181 adrlsaiasg qidflfaska paenlirqha itglvdvtpt dlnekqsefk ydyfildnsq  
241 tklqkdlnae lkklyengtl kelsekyfhd shipaadqfk
```

>gi|125625091|ref|YP\_001033574.1| amino-acid ABC transporter extracellular binding protein [Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363]  
MKKIKLLTLATLGIASIGLLAACSSSKDNSSSKDTKVTTVTVAASAVPYESENGKMTGFEYDILKAA  
DKDKMDYKFKEFKVYEDSAILAALDGGRAQIAANNFGKTAKARSEKYLFSYPVRQGIDAIFSTSKENITKIS  
QLAGKTTEIPAGTNYGDMEFESWKNKHPPDKKIDVKYSQRPLADRLSIAIASGQIDFLFASKAPAEENLIRQHA  
ITGLVDTVPTDNLNKQSEFKTYDYFILDNSQTKLQKDLNAELKKLYENGTLKELSEKYFHDHSIAPADQFK

LipPred

## Prediction Results

Query name: >gi|125625091|ref|YP\_001033574.1|

## Query result: lipoprotein

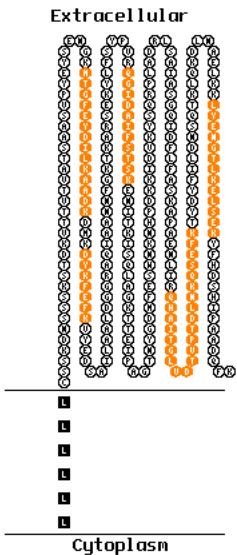
Cleavage residue: 23

Prediction confidence: 1

## ORIGIN

```
1 atgaaaaaaaaaaa taaaattatt gactcttgcac acacttgaaat ttgcctcaat tggtttact  
61 gctgcttgct cgtcaaaaga taattcatct tctaaatcaa cagataaaagt gacaacagta  
121 accgttgc当地 ctctgc当地 ttctgtgc当地 tatgaataca gc当地aaatgg taaaatgact  
181 gggtttgaat atgatatttt aaaagcagct gacaaggaca tgaagatta taaaatccgag  
241 ttcaaggtct acgaagatag tgcgatttt gctgttttag atgggtgc当地 cg当地acaaatt  
301 gccc当地aaata attttggtaa aactaaagct cgttctgaaa aataatcttt tagttatcc  
361 ttctgtcaag gaattgtgc当地 tattttctca acttcttcaaag aaaaacatcac taaaatttcc  
421 caacttgc当地 gccaaaacaaac agaaaattcct gctggacacaa actatggta tatgtttgaa  
481 agttggaaa aaaaccatcc cgacaaaaaaaaa attgatgtta aatatacgca acgtccctta  
541 gctgaccgtc tatctgc当地 tgctagtggca caaatttgatt tcttatttgc ctctaaagca  
601 ccaggc当地aaa atttaatcag acaacatgca attacagggtt tggttgatac tggccccc当地  
661 gacttgaaca aacaatctga gtttaaaact tatgattact ttatccttgc当地 taacagtcaa  
721 accaaattac aaaaagattt gaatgc当地 ctc当地aaaaac totatgaaaa cggaaacgct  
781 aaaaactct cagaaaaata ttccatgac agccatattt cagctgtgc当地 tcaattccaaa  
841 taa
```

>gi|125622882:2288241-2289083 Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363, complete genome  
ATGAAAAAAATAAAATTATTGACTCTTGCACACTTGGATTGCCAATTGGCTTACTTGCTGCTTGCT  
CGTCAAAAGATAATTCTCTTCAAATCACAGATAAAAGTGACAAACAGTAACCGTTGCACATTCTGCCGC  
TTCTGTGCCTTATGAATACAGCGAAATGGTAAATGACTGGTTTGAAATATGATATTAAAAGCAGCT  
GACAAGGACATGAAAGATTAAATTGAGTTCAAGTCTACGAAGAGTAGTGGATTGGCTGCTTTAG  
ATGGTGGTCGCGCAAAATTGCGGCAAAATTGGTAAACAGCTGGATTGGCTGCTTCTGAAAATATCTCTT  
TAGTTATCCTGTTCTCAAGGAATTGATGCTATTCTCAACTCTAAAGAAAACATCACTAAATTTC  
CAACTTGCTGGCAAAACACAGAAATTCTGCTGGAACAAACTATGGTGATATGTTGAAAGTTGGAATA  
AAAACCATCCCGACAAAAAATTGATGTTAAATATAGCCAACGCTTCTTAGCTGACCGTCTATCTGCGAT  
TGCTAGTGGACAAATTGATTCTTATTGCTCTAAAGCACCAGCAGAAAATTAACTCAGACAAACATGCA  
ATTACAGGTTGGTTGATACTGTTCCACAGACTGAAACAAACATCTGAGTTAAAACATTATGATTACT  
TTATCCTTGATAACAGTCAAACCAAAATTACAAAAGATTGAAATGCAAGAGCTCAAAAACCTATGAAAA  
CGGAACGCTAAAGAACCTCTCAGAAAAAATTCTCATGACAGCCATATTCCAGCTGCTGATCAATTCAA  
TAA



## Deoksiribonukleaza (llmg\_0168)

FEATURES	Location/Qualifiers
<u>source</u>	1..261 /organism="Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363" /strain="MG1363" /db_xref="taxon: <a href="#">416870</a> "
<u>Protein</u>	1..261 /product="deoxyribonuclease" /EC_number=" <a href="#">3.1.21.1</a> " /calculated_mol_wt=28386
<u>Region</u>	62..212 /region_name="NUC" /note="DNA/RNA non-specific endonuclease; prokaryotic and eukaryotic double- and single-stranded DNA and RNA endonucleases also present in phosphodiesterases. They exists as monomers and homodimers; c100089" /db_xref="CDD: <a href="#">140428</a> "
<u>CDS</u>	1..261 /locus_tag="llmg_0168" /coded_by="NC_009004.1:158769..159554" /note="DNA/RNA non-specific endonuclease; High confidence in function and specificity" /transl_table= <a href="#">11</a> /db_xref="GeneID: <a href="#">4798433</a> "

### ORIGIN

```

1 mnkkqlktit svvaviala vgyfgsgrlh lgqgndssts ssqvstkalat svkqaplpf
61 knqkqmvmman tdalgravda hiqlkdsqep kvkrepltyn pvgwhnnyfy ykknsngsigk
121 mwliarghhlv gyqfsglnde arnlvpeta w fnggnftgt dgn tasmlyy enrlsdswlan
181 hpnyyldyqv tplykggnl prqirlayvg idkngqslsi klggreksg nggatvvld
241 nvapnakiny adgtavntvk p

```

```

>gi|125623046|ref|YP_001031529.1| deoxyribonuclease [Lactococcus lactis subsp. cremoris
MG1363]
MNKKQLKTTSVVAVIIALAVGYFGSGLHLGQGNDSSSTSSQVSTKALAT SVKQAPLPFKNQKQMVMAN
TDALGRAVD AHIQLKDSQEPKV KREPLTYNPVGWHN NYFYYKKSNGS1GKMWLIAR GHLVGYQFSGLNDE
ARNLVPETAWFNGGNFTGTNDGNTASMLYYENRLDSWLANHPNYYLDYQVTPLYKG NELLPRQIRLAYVG
IDKNGQSLSIKLGGGR EKSGNGGATVVVLDNVAPNAKINYADGTAVNTVKP

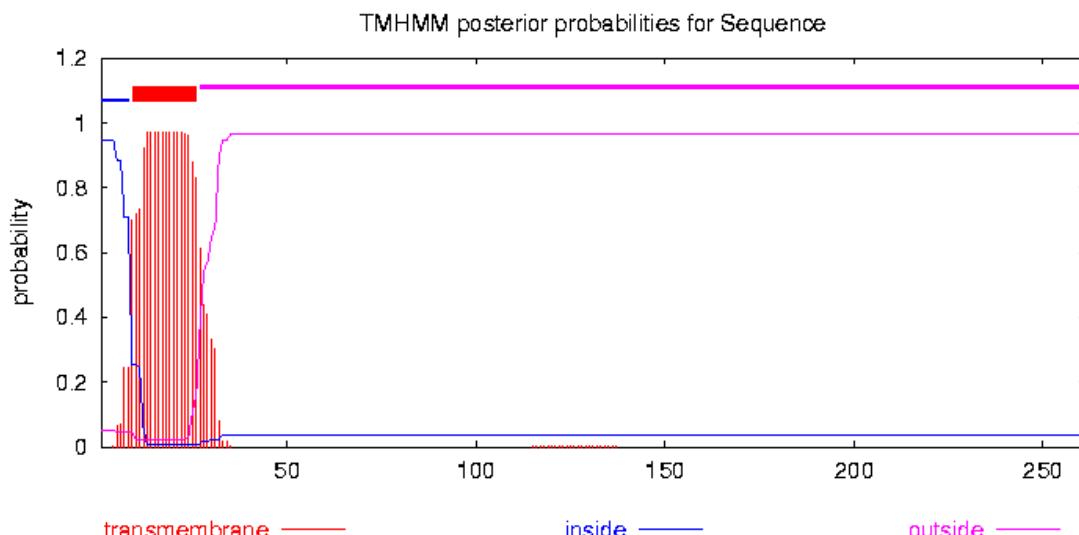
```

```

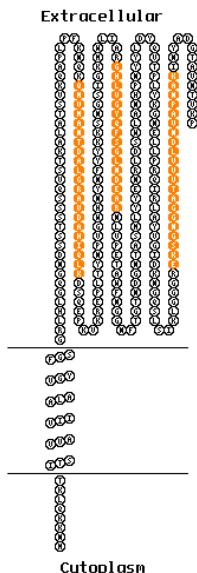
Signal peptide: 31, 21, 15 (Augur)
Transmembrane prediction (TMHMM)
# Sequence Length: 261
# Sequence Number of predicted TMHs: 1
# Sequence Exp number of AAs in TMHs: 19.27502
# Sequence Exp number, first 60 AAs: 19.26444
# Sequence Total prob of N-in: 0.94913
# Sequence POSSIBLE N-term signal sequence

```

Sequence	TMHMM2.0	inside	1	8
Sequence	TMHMM2.0	TMhelix	9	26
Sequence	TMHMM2.0	outside	27	261



>gi|125622882:158769-159554 Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363, complete genome  
ATGAATAAGAAACAATTAAAACAATAACAAGCGTGGTTGCAGTTATTATTCAGTCACTAGCTGTGGGATATT  
TTGGTTCTGGACGTTACATTTAGGCAAGGAAATGATTCTACTAGTAGTCAAGTTCCACAAA  
AGCCTTGGCAACATCAGTTAACGACTCCTTGCTTTAAAAACCAAAACAAATGGTCATGGCAAAT  
ACTGATGCTTCTAGGGCGTGCAGTTGATGCGCACATTCAACTTAAAGATTGCAAGAACCTAAAGTAAAC  
GGGAACCTTAACTTTAATCCTGTTGGCTGGCATATAATTATAATTCTATTACAAGGAAATCCAATGGTC  
GATTGGTAAATGTGGTGTGATTGCGCGTGGACATTGGTTGTTATCATTGGTTAAATGATGAA  
GCAAGAAATTCTGGCGGAAACTGCTTGGTTAACGGTGGAAATTTCACGGGAAACGAATGATGGAAATA  
CTGGCAGCATGCTTATATGAAAATCGGTTAGACAGCTGGCTGCTAACTCATCTAACTTATTGGAA  
TTATCAAGTCACTCCACTTACAAAGGAAATGAGCTTGGCCACGCCAAATTGATTGGCTTACGGTGA  
ATAGATAAAAACGGTCAAGCTTGTCAATTAAACTTGGCGGGGACGTGAAAAGTCTGGGAATGGTGGAG  
CAACTGTTGTTGTTGATAATGTCGCTCCTAATGCTAAAATTATGCTGACGGGACTGCAAGTCAA  
TACAGTCAAACCTTAA



## Foldazni protein prsA prekurzor (llmg\_1907)

FEATURES	Location/Qualifiers
<u>source</u>	1..308 /organism="Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363" /strain="MG1363" /db_xref="taxon: <a href="#">416870</a> "
<u>Protein</u>	1..308 /product="foldase protein prsA precursor" /EC_number=" <a href="#">5.2.1.8</a> " /function="Parvulin-like peptidyl-prolyl isomerase" /calculated_mol_wt=33520
<u>Region</u>	33..294 /region_name="prsA" /note="foldase protein PrsA; Reviewed; PRK01326" /db_xref="CDD: <a href="#">134537</a> "
<u>CDS</u>	1..308 /gene="pmpA" /locus_tag="llmg_1907" /coded_by="complement(NC_009004.1:1885919..1886845)" /note="High confidence in function and specificity" /transl_table= <a href="#">11</a> /db_xref="GeneID: <a href="#">4796714</a> "

### ORIGIN

```

1 m kfkkglv m atvfagaalv tlsgcsssds askdiitmkg dtirvsdlyk eakqfpsqpt
61 ntllqnltfd kiftkdfgke vtdkdvnkvv kslkdqygsq fasalqqqgl teasftpymr
121 tqmleqaa id heieatqytd anlkawesy hpdvtayvv etskdaatka ldaakkddag
181 kasfektnaa nkvtfnstst tvptevqtaa fklkngeffs viestsastg atsyivemv
241 kssekgsdmn kykkelknvi kaekeqdttf vsgviakyk knnvtvkesa fasifsqftq
301 tsstsssk

```

```

>gi|125624690|ref|YP_001033173.1| foldase protein prsA precursor [Lactococcus lactis subsp.
cremoris MG1363]
MKFKKLGLVMATVFGAAALVTLSGCSSSDSASKDIIITMKGDTIRVSDLYKEAKQFPSOPTNLLQNLTFD
KIFTKDFGKEVTDKDVNNKKVKS LKDQYGSQFASALQQQGLTEASFTPYMR TQM LEQAIDHEIEATQYTD
ANLKKAWESYHPDVTAYVVSETSKDAATKALDAAKKDDAGKASF EKTNAAANKVTFNSTSTTVPTEVQTA
FKLKNGEFSVIESTSASTGATSYIVEMVKSSEKGSDMNKYKELK NVIKA EKEQD TTFVSGVIAKYLK
KNNVTVKESAFASIFSQFTQTSSTSSK

```

Signal peptide: 32,32, 12 (Augur)

## LipPred Prediction Results

Query name: >gi|125624690|ref|YP\_001033173.1|

Query result: lipoprotein

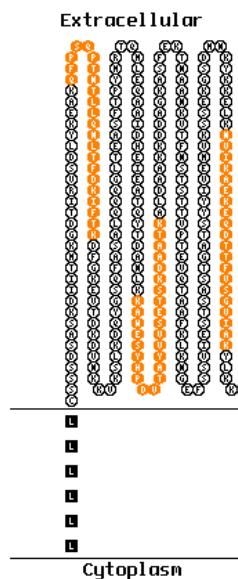
Cleavage residue: 25

Prediction confidence: 0.99

ORIGIN

```
1 ttgaaattca aaaaactcg attagttatg gctacagtct ttgccggagc cgcattggta
61 accttgcctg gttgcctcaag cagtgttgc gcaagcaagg atatcatcac aatgaaaggt
121 gataccattc gcgttctga ttatacaag gaagctaaac aattccgtc acaaccgaca
181 aatacttgc ttcaaaattt aacctttgat aaaaattttt ctaaagattt tgaaaaagaa
241 gttactgata aagatgtcaa caaaaaagttt aatctctca aagatcaga tggaaagccaa
301 tttgcctcag ctttgcaca acaaggttt acagaagcaa gtttcacacc atatactgg
361 acacaaatgc ttgagcaagc agcaatttgac cacgaaatcg aagcaacgca atatactgt
421 gcaaatctca aaaaagcttg ggaatcttat catccagatg taacagctta tggatgttct
481 gaaacttcaa aagatgcagc gactaaagct ttagatgtct ctaaaaaaaga tgatgtcggt
541 aaagcaagct ttgaaaaaac aatgtgtca aataaaagtca cttaattt aacatcaaca
601 actgtgccta ctgaggttca aactgcagca tttaaggta aaaaatggta attttcaagc
661 gtaattgaat ctactgtgc atcaactgtt gctacttctt actacattgt tgagatgtt
721 aaatcttctg aaaaaggtag ttagatgtaa aagtataaaa aagaactta aatgtcatt
781 aaagctgaaa aagaacaaga tacaaccttt gtcagcggag ttattgtaa gtacctaaa
841 aagaataatg tcactgtgaa agaatctgtt ttgcataa tcttctcaca attcactcaa
901 acatcaagta catcttcata taaaataa
```

>gi|125622882:c1886845-1885919 Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363, complete genome  
TTGAAATTCAAAAAACTCGGATTAGTTATGGCTACAGTCTTGGCAGCCGCATTGGTAACCTTGTCTG  
GTTGCTCAAGCAGTGATTCAGCAAGGATATCATCACAACTGAAAGGTGATACCATTGGCTTTCTGA  
TTTATACAAGGAAGCTAACAACTTCCGTACAACCGACAATACTTTGCTTCAAATTTAACCTTTGAT  
AAAAATTTTACTAAAGATTGGAAAAGAAGTTACTGATAAAGATGTCAACAAAAAGTTAAATCTCTCA  
AAGATCAGTATGAAAGCCAATTGCTCAGCTTCAACAAACAAGGTTGACAGAAGCAAGTTCACACC  
ATACATGGTACACAAATGCTTGAGCAAGCAGCAATTGACCACGAAATCGAAGCAACGCAATATACTGAT  
GCAAATCTAAAAAAGCTTGGGAATCTTATCATCCAGATGTAACAGCTTATGTTGTTCTGAAACTTCAA  
AAGATGCAAGCAGTAAAGCTTTAGATGCTGCTAAAAAGATGATGCTGTTAAGCAAGCTTTGAGAAAAC  
AAATGCTGAAATAAGTCACTTTAATTCAACATCAACAACTGTGCCACTGAGGTTCAAACGTGCAGCA  
TTTAAGTTGAAAATGGTGAATTCAAGCGTAATTGAATCTACTAGTCATCAACTGGTCTACTTCTT  
ACTACATTGTTGAGATGGTTAAATCTCTGAAAAGGTAGTGTATGAACAAGTATAAAAAGAACTTAA  
AAATGTCATTAAGCTGAAAAGAACAGATAACCTTGTCAAGCGAGTTATTGCTAAAGTACCTTAA  
AAGAATAATGTCAGTGAAAGAATCTGCTTTGCATCAATCTCTCACAAATTCACTCAAACATCAAGTA  
CATCTTCATCTAAATAA



### Bazični membranski protein A (llmg\_1064)

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..351
	/organism="Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363"
	/strain="MG1363"

```

Protein
/db_xref="taxon:416870"
1..351
/product="basic membrane protein A"
/function="Uncharacterized ABC-type transport system,
periplasmic component/surface lipoprotein"
/calculated_mol_wt=36730
Region
39..321
/region_name="PBP1_BmpA_PnrA_like"
/note="Periplasmic binding domain of basic membrane
lipoprotein, PnrA, in Treponema pallidum and its homologs
from other bacteria and archaea. The PnrA lipoprotein,
also known as Tp0319 or TmpC, represents a novel family of
bacterial purine nucleoside...; cd06354"
/db_xref="CDD:107349"
Site
order(45..46,55,130,177,205,231,260,286)
/site_type="other"
/note="ligand binding site"
/db_xref="CDD:107349"
CDS
1..351
/gene="bmpA"
/locus_tag="llmg_1064"
/coded_by="NC_009004.1:1023690..1024745"
/note="Conserved hypothetical protein"
/transl_table=11
/db_xref="GeneID:4796662"

```

#### ORIGIN

```

1 mkkrviaavsa ialasavavl gcrshdasgt sgkvktndlka aivtdangvn drsfqnsawe
61 glqswgkenn lkkgtgytyf qsnsasdyytynynsaeqqgy kllfgigfsl qdatasaakn
121 npksnfvivd svikdqknvt satfadnesa ylagavaaka tkttnkigfig gmqsdfvitrf
181 ekgvyagaks vksdikvdq yagsfsdaak gktiaamayg sgddvvvgca ggvgtgvfse
241 akalnsskne adkvwwvigvd qdgelylgkyk skdgkdsnfv lvstikevgt vvkdadiadktk
301 dgkfpqgtiv tynlknggvd lglndnatsei kdavakaktd iidgkitvps k

```

```

>gi|125623895|ref|YP_001032378.1| basic membrane protein A [Lactococcus lactis subsp.
cremoris MG1363]
MKKRVIAAVSATALASVAVLAGCRSHDASGTSGKVKTDLKAAIVTDANGVNDRSFNQSAWEGLQSWGKENN
LKKGTGYTYFQSNSASDYYTNYNSAEQQGYKLLFGIGFSLQDATSAAAKNNPKSNFVIVDSVIKDQKNVT
SATFADNESAYLAGVAAAKATKTNK1GFIGGMQSDVITRFEKGYVAGAKSVKSDIKVDIQYAGSFSDAAK
GKTIAAMYGSDDVVYQCAGGVTGVFSEAKALNSSNEADKVVWIGVDQDQEYLGKYKSKDGKDSNFV
LVSTIKEVGTVVKDIADKTDGKFPGGTIVTYNLKNGVVLGLDNATSEIKDAVAKAKTDI IDGKITVPS
K

```

## LipPred

### Prediction Results

Query name: >gi|125623895|ref|YP\_001032378.1|

Query result: lipoprotein

Cleavage residue: 22

Prediction confidence: 1

Signal peptide: 41, 27, 13 (Augur)

#### ORIGIN

```

1 atgaaaaaac gcgtaatcgc agtttgtctt attgcacttg catcagtcgc agtccttgc
61 ggatgtcggtt cacatgacgc atctggaaact tcaggtaaag taaaaactga ccttaaagca
121 gcaatcgtaa ccgatgctaa ttgtgttaat gaccgttcgt ttaaccaatc cgcttggaa
181 ggtcttccaa gctggggaa agaaaataac ctgaaaaaag gtactggata cacttacttc
241 caatctaatt cagcttcaga ttacacgact aactataact ctgcggagca acaaggttac
301 aaacttttgtt ttggatttgg attctttta caagatcgca catcagcgc tgcaaaaaat
361 aatccaaat ctaactttgtt tatcggttgc tctgtcatta aagacaaaaa gaatgttaact
421 tcagcaactt ttgcagataa cgaaaagtgc tatctgtctg gtgttagtgc ggccaaagca
481 actaaaaacga acaaattgg tttcatcggtt gggatgcaat ccgatgttat tactcgaaaa
541 gaaaaagggtt atgttagtgc tgccaagtctt gtaaaatcag acatcaaaatgtatccaa
601 tacgctgtttt ctttcgttca tgccgctaa ggtaaaaacaa ttgcagcgc tatgtatgg
661 tctgggtatgatgtttca ccaatgtgcg ggtggcgttaga gaacagggtt cttagtgc
721 gctaaaggct tgaaoctcaag caaaaatgaa gctgacaaag tttgggttat cgggtgtac
781 caagaccaag aataccttgg aaaaatataaa tctaaagacg gtaaaatgtt taacttgc
841 cttgtttcaa caatcaaaga agtaggaact gttgtaaaag acattgtca caagactaaa
901 gacggtaat tccctggtgg aacaatcggtt acttacaacc tttaaaatgg tggtagat
961 ttaggacttgc ataacgcac ttccggat aaagatgtgc ttgcacaaagc caaaacagat

```

1021 atcattgatg gaaaaattac tggcccttca aaataa

>gi|125622882:1023690-1024745 Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363, complete genome  
ATGAAAAAACCGTAATCGCAGTTAGTGCCTATTGCACCGCATCAGTCGCAGCCTTGCAAGGATGTCGTT  
CACATGACCGCATCTGGAACTTCAGTAAAGTAAAACGTACCTAAAGCAGCAATCGTACCGATGCTAA  
TGGTGTAAATGACCGTTCGTTAACCAATCCGCTGGAGGTCTTCAAAGCTGGGGAAAGAAAATAAC  
CTGAAAAAAGGTACTGGATACTTACCTTCAACTCTAATTCAAGCTTCAAGTACACGACTAACTATAACT  
CTGGCAGGACAACAAGGTTACAAACTTTGGTATTGGATTCTCTTACAAGATGCGACATCAGCAGC  
TGCAGAAAATAATCCAACATCTAACCTTGTACTCTGCTGGTAGCTGCGGCCAAAGCAACTAAAACGA  
TCAGCAACTTTGCAGATAACGAAAGTGCTTATCTGCTGGTAGCTGCGGCCAAAGCAACTAAAACGA  
ACAAAATTGGTTCATCGGTGGATCAATCGATGTTTACCGCTGGTAGCTGCGGCCAAAGCAACTAAAACGA  
TGCCAAGTCTGTAAAATCAGACATCAAGTGTGATATTCAATACGCTGGTCTTCTGATGCGGCTAAA  
GGTAAAACAATTGCAGCAGCTATGTATGGTTCTGGTAGTGTGTTTACCAATGTGCGGTGGCGTAG  
GAACAGGGTCTTCAGTGAAGCTAAAGCCTGAACTCAAGCAAAAATGAAGCTGACAAAGTTGGGTAT  
CGGTGTTGACCAAGACCAAGAACATCTGGAAAATATAATCTAAAGACGGTAAAGATTCTAACCTTGT  
CTTGTGTTCAACAATCAAAGAAGTAGGAACTGTTGTTAAAGACATTGCTGACAAGACTAAAGACGGTAAAT  
TCCCTGGTGGAAACAATCGTTACTTACACCTTAAAGGTTGTTGAGATTAGGACTTGATAACGCAAC  
TTCAGAAATTAAAGATGCTGTTGCCAAGCCAAACAGATATCATTGATGGAAAAATTACTGTTCCCTCA  
AAATAA

