

VILNIAUS UNIVERSITETAS
Gamtos mokslų fakultetas
Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

Mikrobiologijos studijų programos magistrantūros II kurso studentė

Ana Solopova

Magistrinis darbas

Lizocimo sukelti bakterijų apvalkalėlio pažeidimai ir *Lactococcus lactis* ląstelių atsakas į juos

Darbo vadovas:
prof. dr. Rimantas Daugelavičius

Vilnius 2009

Lizocimo sukelti bakterijų apvalkalėlio pažeidimai ir *Lactococcus lactis* ląstelių atsakas į juos

Darbas atliktas
Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir biofizikos katedroje, Membranų biochemijos
laboratorijoje

Ana Solopova

Darbo vadovas:

prof. dr. R. DAUGELAVIČIUS

Turinys

Turinys	3
Santrumpos	4
Įvadas	5
Literatūros apžvalga	7
1.1. Peptidoglikano hidrolazės	7
1.1.1. N-acetilmuramil-L-alaninamidazės	8
1.1.2. Endopeptidazės ir karboksipeptidazės	9
1.1.3. N-acetil-β-D-muramidazės	10
1.1.4. Lizocimai	10
1.1.5. Litinės transglikozilazės	11
1.1.6. N-acetil-β-D-gliukozaminidazės	11
1.2. Peptidoglikano hidrolazių funkcijos ir jų aktyvumo reguliacija	12
1.2.1. Ląstelės sienelės augimo reguliacija DD-karboksipeptidazėmis	12
1.2.2. Peptidoglikano apvalkalo augimo reguliacija	12
1.2.3. Dukterinių ląstelių atskyrimas	13
1.2.4. Hidrolazių aktyvumo reguliacija	14
1.3. Lizocimas	14
1.3.1. Lizocimo paplitimas ir reikšmė	15
1.3.2. Lizocimo molekulinė struktūra	17
1.3.3. Katijoninės antimikrobinės lizocimo savybės	18
1.4. <i>L. lactis</i> atsakas į ląstelės apvalkalo pažeidimų sukeltą stresą	20
1.4.1. Dvikomponentės sistemos	22
1.4.2. Bakterijų atsparumo lizocimo hidrolaziniui aktyvumui mechanizmai	23
1.4.3. Peptidoglikano O-acetilinimas	24
1.4.4. <i>L. lactis</i> peptidoglikano O-acetilinimo reguliacija	25
2. Medžiagos ir metodai	27
2.1. Medžiagos	27
2.1.1. Cheminiai reagentai	27
2.1.2. Fermentai	27
2.1.3. Antibiotikai	27
2.1.4. Bakterijos	27
2.1.5. Terpės	28
2.1.6. Komerciniai rinkiniai	28
2.2. Metodai	28
2.2.1. Elektrocheminiai matavimai	28
2.2.2. Genų raiškos tyrimai mikrogardelių metodu	29
2.2.2.1. RNR išskyrimas	29
2.2.2.2. kDNR sintezė, naudojant išskirtos RNR mėginius	29
2.2.2.3. Amino-alil-modifikuotos kDNR gryninimas	30
2.2.2.4. Amino-alil-modifikuotos kDNR žymėjimas Cy dažais (Amersham)	30
2.2.2.5. Hibridizacija	30
Išvados	32
Santrauka	33
Summary	34
Literatūra	35

Santrumpos

ABC	- ATP surišanti kasetė
GD	- gramicidinas D
MFS	- didžioji nukreipiamoji didšeimė (MFS)
NAG	- N-acetil-gliukozaminas
NAM	- N-acetil-muramo rūgštis
PBP	- peniciliną surišantis baltymas
PCB ⁻	- fenildikarbaundekarborano jonas
PMB	- polimiksinas B
Psp	- fago šoko baltymas
PTS	- fosfotransferazinė sistema
Tat	- dvigubo arginino transporto sistema
TPP ⁺	- tetrafenilfosfonio jonas

Įvadas

Lizocimą, antibakterinį fermentą, gebantį skaidyti bakterijų peptidoglikaną, 1922 m. atrado A. Flemingas. Klasikinis šių plačiai paplitusių fermentų šeimos atstovas yra vištos kiaušinio baltymo lizocimas. Tai pirmasis baltymas, kuriam buvo nustatyta aminorūgščių seka bei atlikta kristalografinė analizė. Giminingi c tipo lizocimai randami daugelio organizmų – žinduolių, roplių, bestuburių - audiniuose ir įvairiose išskyrose (Pellegrini ir kt., 1997). Kitų tipų lizocimai, besiskiriantys struktūrinėmis, katalitinėmis ir imunologinėmis savybėmis, randami paukščių, bestuburių, augalų, grybų, bakterijų ląstelėse ir bakterijų virusuose (Hindenburg ir kt., 1974; Fiolka ir kt., 2005). Visų šių fermentų atrankumas yra vienodas: bakterijų peptidoglikane jie skelia β -glikozidinių ryši tarp N-acetilmuramo rūgšties 1 C atomo ir N-acetilgliukozamino 4 C atomo.

Šiandien tai vis dar labai svarbus fermentas, kurio savybės nagrinėjamos baltymų chemijoje, enzimologijoje, molekulinėje biologijoje ir genetikoje, imunologijoje ir evoliucinėje biologijoje. Nepaisant didelio informacijos kiekio, biologinė lizocimo svarba šeimininko gynybos sistemoje iki šiol nėra galutinai suprasta (During ir kt., 1999). Tačiau lizocimai nėra tik gynybiniai ar, kai kuriais atvejais, virškinimo fermentai. Lizocimų katalizuojamos hidrolizės metu atpalaiduoti peptidoglikano fragmentai gali indukuoti imunostimuliuojančių ar antibakterinių junginių sintezę, kitas biologines reakcijas, todėl jie yra ypatingai svarbūs šeimininko organizmui.

Labai patogus atsparumo lizocimui tyrimų objektas yra šiam fermentui jautri gramteigiama pienaarūgštė bakterija *Lactococcus lactis*. Žinios apie laktokokų lizę svarbios praktikoje, kadangi šio bakterijos yra plačiai naudojamos maisto pramonėje – sūrių, grietinės, rūgpienio gamyboje.

Šio darbo tikslas - ištirti kiaušinio baltymo lizocimo bei jo sudėtinės dalies- 9 aminorūgščių antimikrobinio peptido RAWVAWRNR (toliau 9a peptidas) - poveikį *L. lactis* citoplazminės membranos laidumui ir genų raiškai bei nustatyti *L. lactis* atsako į apvalkalo pažeidimų sukeltą stresą mechanizmą.

Darbo užduotys:

1. Ištirti, kaip lizocimas, karščiu inaktyvuotas lizocimas ir lizocimo antimikrobinis peptidas įtakoja *L. lactis*, *Bacillus subtilis* bei *Pseudomonas aeruginosa* ląstelių citoplazminės membranos laidumą.

2. Ištirti, ar skiriasi *L. lactis* tėvinės padermės ir lizocimui atsparių mutantų pradiniai atsakai į natyvaus, kaitinto lizocimo ir peptido poveikį.

3. DNR mikrogardelių metodu ištirti, kaip lizocimas bei antimikrobinis 9a peptidas įtakoja genų raišką *L. lactis* laukinės padermės MG1363 bei mutantinės padermės $\Delta oppA$ ląstelėse.

Literatūros apžvalga

1.1. Peptidoglikano hidrolazės

Pirmoji ir svarbiausia apsaugos nuo įvairių nepalankių aplinkos veiksnių grandis yra bakterijų ląstelės apvalkalas. Tai pagrindinė struktūra, suteikianti ląstelei formą ir neutralizuojanti aukštą vidinį osmosinį slėgį. Tai svarbiausia aplinkos informacijos pajutimo sistema ir molekulinis sietas, kontroliuojantis medžiagų pernašą. Ląstelės apvalkalas taip pat yra įvairių antibiotikų taikinyss. Taigi išlaikyti ląstelės apvalkalo vientisumą veikiant įvairiems apvalkalą ardantiems junginiams yra gyvybiškai svarbu.

Gramteigiamųjų bakterijų ląstelių apvalkalas sudarytas iš dviejų sluoksnių – citoplazminės membranos, apsuptos stora ląstelės sienele. Šių bakterijų peptidoglikano apvalkalas yra trimatė daugiasluoksnė tinklo pavidalo apie 50 nm struktūra, galinti atlaikyti aukštą turgoro slėgį. Dėka tvirtų cukrų grandinių ir lanksčių peptidinių tiltelių kombinacijos, peptidoglikano tinklas yra stiprus, bet kartu elastingas, galintis atlaikyti įvairias stresines sąlygas. Tai dinamiška molekulė, kurioje nuolat vyksta biosintezė, surinkimas, brendimas, ardyimas, perdirbimas, taip užtikrinant ląstelės formos palaikymą, augimą ir dalijimąsi vienu metu (Jordan ir kt., 2007).

Gramteigiamųjų bakterijų ląstelės apvalkale išsibarsčiusios teicho rūgštys, kurios yra įtvirtintos membranoje (lipoteicho rūgštys) arba kovalentiškai prijungtos prie cukraus grandžių peptidoglikane. Teicho rūgštys vaidina svarbų vaidmenį nulemiant fizikochemines apvalkalo savybes. Tai polianijoniniai, turtingi fosfatų linijiniai polimerai, atsakingi už bendrą neigiamą gramteigiamųjų bakterijų ląstelių paviršiaus krūvį.

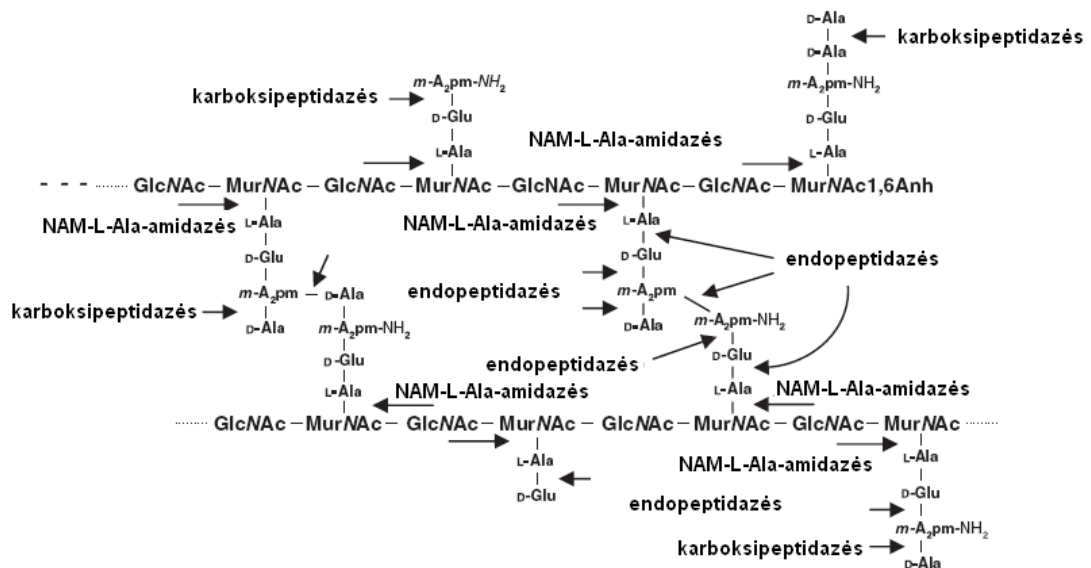
Be šių pagrindinių savybių, gramteigiamųjų bakterijų apvalkalams būdingos įvairios papildomos struktūros, svarbios virulentiškumui, atsparumui antibiotikams, kolonizacijai. Tai užląstelinės polisacharidinės kapsulės, baltyminiai S-sluoksniai. Mikobakterijų ir korinebakterijų ląstelių sienelės pasižymi ypatinga struktūra, kuriai būdingi papildomi sluoksniai, sudaryti iš arabinogalaktanų ir mikolinių rūgščių. Tai lemia mažą sienelių pralaidumą antibiotikams (Jordan ir kt., 2007).

Bakterijų peptidoglikano hidrolazės sudaro didelę ir įvairialypę grupę fermentų, gebančių skaidyti peptidoglikaną ar tirpius jo fragmentus. Šie fermentai dalyvauja bakterijų sienelės augimo ir jo reguliacijos procesuose, įvairiuose lizės reiškiniuose. Dažnai sunku priskirti konkrečias funkcijas atskiroms hidrolazėms. Bakterijos turi daug šio tipo fermentų ir jų funkcijos persidengia arba dažnai viena hidrolazė atlieka keletą funkcijų (Smith ir kt., 2000).

Peptidoglikano skaidymo produktai atlieka signalinių molekulių vaidmenį – taip bakterijas atpažįsta kiti organizmai, o kai kuriose bakterijose yra indukuojama β -laktamazė (Jacobs ir kt., 1997). Peptidoglikano hidrolazės taip pat atsakingos už autolizės procesų įjungimą tam tikromis sąlygomis.

Kiekvienam glikozidiniam ir amidiniam ryšiui, randamam peptidoglikano molekulėje, yra žinoma nors po vieną hidrolazę, tačiau dažnai ne visų specifiskumų fermentai būna vienoje bakterijų rūšyje. 1-ame. paveiksle parodytos įvairių hidrolazių skėlimo sritys. N-acetilmuramil-L-alanino amidazės hidrolizuoja peptidinį ryšį tarp NAM ir L-Ala, atskirdamos glikano grandinę nuo peptido, tuo tarpu karboksi- ir endopeptidazės kerpa įvairias LD- ir DD- jungtis peptidinuose tilteliuose.

Glikano grandinę skaido trijų tipų fermentai (glikozidazės): N-acetilgliukozaminidazės, lizocimai ir litiinės transglikozilazės. Paskutiniai du tipai bendrai vadinami N-acetil- β -D-muramidazėmis (muramidazėmis) (Vollmer ir kt., 2008).



1 pav. Įvairių peptidoglikano hidrolazių skėlimo sritys (Pagal Vollmer ir kt., 2008) .

1.1.1. N-acetilmuramil-L-alaninamidazės

N-acetilmuramil-L-alaninamidazės hidrolizuoja peptidinį ryšį tarp NAM ir peptidinio tiltelio N-galinės L-Ala liekanos. Šios amidazės randamos bakterijų ir bakteriofagų ar profagų genomuose. Dažniausiai tai bakterijų autolitinės sistemos nariai, turintys signalinę seką, kuri nukreipia šiuos fermentus už plazminės membranos ribų. Tuo tarpu faginės amidazės yra endolizina, neturintys signalinių sekų, ir, manoma, už ląstelės ribų patenkantys fagų koduojamų baltymų holinų pagalba (Loessner, 2005).

Dažniausiai bakterijų proteome randama keletas skirtingų peptidoglikano amidazių, pvz., *Escherichia coli* turi penkis skirtingus šio tipo fermentus. Keturi iš jų randami periplazmoje ir yra tirpūs, penktasis, AmiD, yra inkaruotas išorinėje membranoje.

Manoma, kad tirpios *E. coli* amidazės sudėtyje turi Zn^{2+} , todėl į periplazmą yra transportuojamos Tat (Twin-arginine transport) sistemos, kuri yra atsakinga už tretinę struktūrą įgijusių, kofaktorius sudėtyje turinčių baltymų pernašą per citoplazminę membraną.

Svarbiausia šių amidazių funkcija yra skelti bakterijos dalijimosi metu susidariusią pertvarą, tam, kad susidariusios dukterinės ląstelės galėtų atsiskirti viena nuo kitos.

Paprastai peptidoglikano amidazės sudarytos iš dviejų modulių – katalitinio ir nekatalitinio, atsakingo už prisijungimą prie ląstelės sienelės peptidoglikano, lipoteicho rūgščių ar pneumokokų teicho rūgščių, sudėtyje turinčių cholino (Vollmer ir kt., 2008).

Netikėtai buvo nustatyta, kad *E. coli* peptidoglikano amidazės struktūriškai yra panašios į eukariotų peptidoglikaną atpažįstančius baltymus. Šie baltymai yra randami daugelio gyvūnų, tarp jų vabzdžių, dygiaodžių, moliuskų ir stuburinių organizmuose. Jie dalyvauja įgimto imuniteto reakcijose (Dziarski ir Gupta, 1994).

1.1.2. Endopeptidazės ir karboksipeptidazės

Šie fermentai skelia peptidinį ryšį tarp dviejų aminorūgščių peptidoglikane arba jo tirpiuose fragmentuose. Karboksipeptidazės nuskelia C-galinę aminorūgštį, endopeptidazės skelia ryšį peptidinės grandinės viduje. DD peptidazės kerpa tarp dviejų D-aminorūgščių, tuo tarpu LD- ar DL- peptidazės skelia ryšį tarp L- ir D- aminorūgščių. Daug DD-endopeptidazių priklauso mažos molekulinės masės peniciliną prisijungiantiems baltymams. Šie fermentai inhibuojami β -laktamų, kurie yra pentapeptidinio donoro galinio pakaito D-Ala-D-Ala struktūriniai analogai peptidoglikano transpeptidavimo reakcijoje (Smith ir kt., 2000).

Du tipai peniciliną surišančių baltymų yra priskiriami endopeptidazėms. Vienas jų - daugiamodulinių fermentų tipas, vadinamas 4-tojo tipo peniciliną surišančių baltymų tipu. Antrasis tipas yra vadinamas 7-tojo tipo peniciliną surišančių baltymų tipu. Jam priklauso vienmoduliniai fermentai, inkaruoti citoplazminėje membranoje amfifiline spirale.

4-tojo tipo peniciliną surišantys baltymai sudaryti iš trijų domenu. Pirmajame domene išsidėstęs endopeptidazės/peniciliną prijungiantis aktyvusis centras, kuris visų 4-tojo tipo baltymų yra beveik identiškasis.

Manoma, kad šie fermentai susiję su ląstelių morfologija, dukterinių ląstelių atskyrimu ir bioplėvelių formavimu (Vollmer ir kt., 2008).

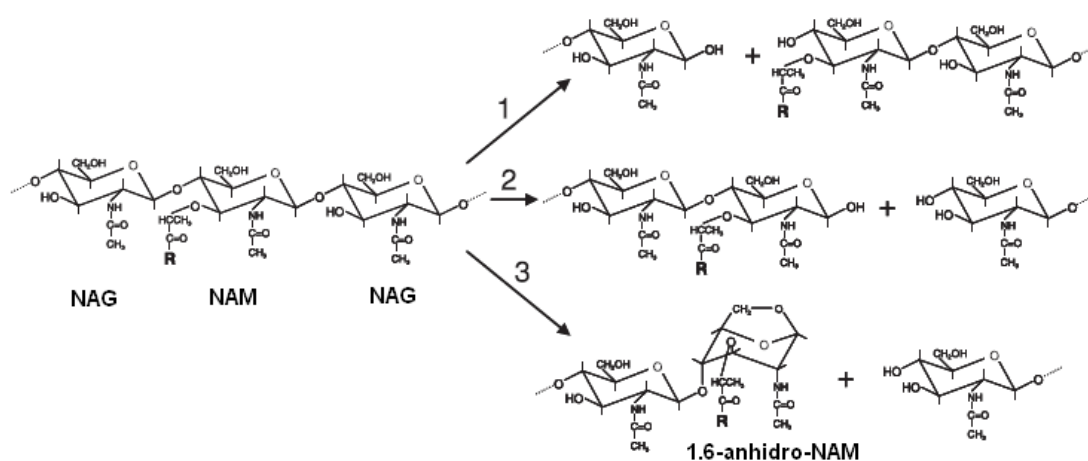
7-tojo tipo penicilinui jautri DD-endopeptidazė yra sujungta su membrana, ji ir jos hidrolizės produktai stabilizuoja ir stimuliuoja kitos peptidoglikano hidrolazės - tirpios litinės transglikozilazės Slt70 - aktyvumą, tiesiogiai sąveikaudami su ja.

Kai kurios DD-endopeptidazės nėra giminingos peniciliną surišantiems baltymams, taigi jos nėra jautrios β -laktamams.

1.1.3. N-acetil- β -D-muramidazės

N-acetil- β -D-muramidazės (N-acetilmuramidazės) yra plačiai paplitę fermentai, hidrolizuojantys β 1,4-glikozidinių ryši tarp NAM ir NAG liekanų peptidoglikane (2 pav.). Šis ryšys gali būti kerpamas dviem būdais:

1. Lizocimai hidrolizuoja glikozidinių ryši susidarant produktui su galine redukuojančia NAM liekana.
2. Litinės transglikozilazės glikozidinių ryši skelia kartu vykstant transglikozilinimo reakcijai, susidarant 1,6-anhidro žiedui.



2 pav. Glikozidinių ryši peptidoglikane skeliantys fermentai: 1. N-acetil-gliukozaminidazės, 2. Lizocimai, 3. Litinės transglikozilazės. R - peptido liekana, prijungta prie NAM.

1.1.4. Lizocimai

Fermentai, turintys panašią į lizocimo struktūrą, yra skirstomi į devynias klases. Visi šie fermentai skelia β 1,4-glikozidinių ryši, kai kurie be šio aktyvumo dar geba hidrolizuoti chitiną (β 1,4-NAM polimerą) ar chitozaną (dalinai deacetilintą chitiną), arba pasižymi litinių transglikozilazių aktyvumu. Keturių klasių atstovai hidrolizuoja peptidoglikaną. Šių klasių prototipais laikomi vištos kiaušinio baltymo lizocimas, žąsies kiaušinio baltymo lizocimas, bakteriofago T4 lizocimas ir grybo *Chalaropsis* lizocimas. Lizocimo savybės yra plačiau nagrinėjamos 1.3 skyriuje.

1.1.5. Litinės transglikozilazės

Litinės transglikozilazės skelia glikozidinių ryši tarp NAM ir NAG kartu vykstant transglikozilavimo reakcijai, ties NAM liekana susidaro 1,6-anhidro žiedas. Reakcijoje dalyvauja rūgštinis pakaitas, dažniausiai Glu, atiduodantis protoną glikozidinės jungties deguonies atomui.

Daugelio litinių transglikozilazių katalitiniai domenai turi panašią į lizocimo aktyviojo centro struktūrą. Lizocimams taip pat būdingas Glu liekanos buvimas aktyviajame centre. Tačiau šie fermentai yra ganėtinai skirtingi: rūgštinio Glu aplinka litinių transglikozilazių aktyviajame centre yra labiau hidrofobiška, taip pat šie fermentai neturi antosios katalitinės Asp liekanos, dalyvaujančios lizocimų katalizėje. Tai paaiškina šių fermentų grupių skirtingus katalizės mechanizmus (hidrolizė/vidumolekulinio žiedo formavimas). Be to, lizocimai ir litinės transglikozilazės skiriasi substratiniais specifiškumais. Lizocimai yra endo-N-acetilmuramidazės, tuo tarpu daugumai litinių transglikozilazių būdingas egzo-litinis aktyvumas - jos atpalaiduoja 1,6-anhidro-NAM liekanas nuo glikano grandinės galo. Kristalinėse struktūrose matomi substratą surišančių kišenių skirtumai. Lizocimai geba prisijungti heksasacharidą, skirtingos litinės transglikozilazės substratą prijunginčioj srity talpina nuo trijų iki šešių N-aminosacharido liekanų (Vollmer ir kt., 2008).

N-acetilmuramidazės skiriasi substratiniais specifiškumais priklausomai nuo peptidų pakaitų. Pavyzdžiui, fago T4 lizocimas skaido tik peptidoglikaną su prijungtais peptidiniais tilteliais. Fermentas nehidrolizuoja peptidoglikano be peptidų grupių.. Tuo tarpu žąsies lizocimas ir transglikozilazė MltA vienodai gerai atpažįsta glikano grandines ir su peptidiniais tilteliais, ir be jų. Šie skirtumai rodo, kad kai kurių N-acetilmuramidazių struktūrose yra peptidus prijungiančios sritys (Ursinus ir Holtje, 1994).

Remiantis aminorūgščių sekomis bei konservatyvių motyvų buvimu, litinės transglikozilazės yra suskirstytos į keturias šeimas. *E. coli* ląstelėje randamos visų šeimų transglikozilazės, išskyrus ketvirtąją šeimą. Visi šie fermentai randami *E. coli* periplazmoje, arba yra lipoproteinai, prijungti prie išorinės membranos vidinio sluoksnio. Ketvirtajai šeimai daugiausia priklauso bakteriofagų litinės transglikozilazės (Kraft ir kt., 1998).

1.1.6. N-acetil-β-D-gliukozaminidazės

Endo-N-acetil-β-D-gliukozaminidazės yra plačiai paplitusios tarp bakterijų. Jos hidrolizuoja glikozidinių ryši tarp N-acetil-β-D-gliukozamino liekanų ir gretimų monosacharidų įvairiuose oligosacharidiniuose substratuose – peptidoglikane, chitine, N-glikanuose (Vollmer ir kt., 2008).

Didelio molekulinio svorio (celiuliozę, chitiną) degraduojantys fermentai dažnai struktūroje turi substratą prijungiantį domeną, kuris padidina fermentų aktyvumą. Daugumai peptidoglikano hidrolazių taip pat būdingi tokie domenai.

Endo-N-acetil- β -D-gliukozaminidazės dažnai turi vieną ar kelis sienelę surišančius domenų. *Lactococcus lactis* ląstelėse randamos keturios N-acetil- β -D-gliukozaminidazės. Dvi iš jų – AcmA ir AcmD struktūroje turi tris peptidoglikaną surišančius domenų LysM, N-gliukozaminidazė AcmB – kitokią sienelę surišantį domeną. Įdomu tai, kad būtent trijų LysM domenų buvimas suteikia optimaliausią AcmA aktyvumą (Steen ir kt, 2005).

Skirtingai nuo endo- N-acetilgliukozaminidazių, skeliančių peptidoglikano glikozidinius ryšius, citoplazminės N-acetilgliukozaminidazės hidrolizuoja disacharidą NAG-1,6-anhidro-NAM(peptidą), kuris yra viduląstelinis peptidoglikano atnaujinimo kelio tarpinis produktas.

1.2. Peptidoglikano hidrolazių funkcijos ir jų aktyvumo reguliacija

1.2.1. Ląstelės sienelės augimo reguliacija DD-karboksipeptidazėmis

DD-karboksipeptidazės pašalina peptidoglikano peptidų galinę penktoje pozicijoje esančią D-alanino liekaną. Pentapeptidai gali būti ir donoriais, ir akceptoriais transpeptidavimo reakcijoje, tuo tarpu tetrapeptidai atpažįstami tik kaip akceptoriai. Kontroliuojant peptidoglikano apvalkalo augimą, pentapeptidų perteklius turi būti mažinamas DD-karboksipeptidazių. Taigi DD-karboksipeptidazės yra labai svarbios dalijimuisi, ląstelės formos palaikymui, taip pat šie fermentai reguliuoja peptidinių tiltelių kiekį sporų peptidoglikane (Morlot ir kt., 2003).

1.2.2. Peptidoglikano apvalkalo augimo reguliacija

Peptidoglikano apvalkalas – tai didžiulė tinklo pavidalo molekulė. Norint praplėsti tinklą, peptidoglikano sintazės įterpia naujus subvienetus. Neįmanoma įsivaizduoti tokios molekulės augimo mechanizmo be hidrolazių katalizuojamo kovalentinių jungčių ardymo. *E. coli* periplazmoje randama apie 12 peptidoglikano hidrolazių. Neabejojama, kad šie fermentai dalyvauja ląstelės sienelės augimo procese, nes ląstelės augimo metu yra stebimas tiek Gram-negiamųjų, tiek gramteigiamųjų bakterijų peptidoglikano fragmentų atpalaidavimas. *E. coli* per vieną generaciją netenka apie 40% peptidoglikano. Atpalaiduotų produktų struktūra rodo, kad tai yra litinių transglikozilazių, endopeptidazių bei amidazių skaidymo produktai (Vollmer ir kt., 2008).

Manoma, kad hidrolizės ir sintezės reakcijos yra koordinuotos laike ir erdvėje – *E. coli* ląstelėje skirtingos sintazės ir hidrolazės formuoja multi-fermentinius kompleksus. Taip užtikrinama, kad hidrolazės yra aktyvios tik sintezės srityse (Vollmer ir Holtje, 2001).

Lazdelės pavidalo gramteigiamosioms bakterijoms būdingas augimas iš vidaus į išorę. Nauji peptidoglikano sluoksniai yra prijungiami po ląstelės sienelės. Išoriniai sienelės sluoksniai yra skaidomi ir atpalaiduojami į terpę. Kuo greičiau ląstelė auga, tuo intensyviau vyksta peptidoglikano hidrolizė, taigi šie fermentai yra labai svarbūs nulemiant ląstelės augimo greitį. Priešingai nei *E. coli*, gramteigiamųjų bakterijų ląstelėse peptidoglikano sintazės ir hidrolazės tiesiogiai nesąveikauja tarpusavyje, kadangi yra fiziškai atskirtos. Sintazės formuoja naujus vidinius sienelės sluoksnius, tuo tarpu hidrolazės yra aktyvios išorinėje pusėje (Vollmer ir kt., 2008).

E. coli bei *Bacillus subtilis* peptidoglikano sintezė yra reguliuojama citoskeleto elementų. Jie plazminėje membranoje formuoja spiralinius filamentus ir lokalizuoja peptidoglikano sintezės kompleksus (Daniel ir Errington, 2003)

1.2.3. Dukterinių ląstelių atskyrimas

Peptidoglikano hidrolazės skaido septą taip atskirdamos dukterines ląsteles po dalijimosi. Šiame procese dalyvauja amidazės, litinės transglikozilazės bei endopeptidazės. Šiuos fermentus koduojančių genų delecijos lemia ilgų ląstelių grandinėlių formavimąsi bei membranų defektus (Priyadarshini ir kt., 2006).

Peptidoglikano hidrolazės taip pat dalyvauja sporuliacijos procese – jos hidrolizuoja asimetrinę septą, lemia sporos apvalkalo brendimą. Specifinės amidazės nuskelia peptidų grandinėles, tada yra formuojami laktaminiai žiedai. Toks sporos apvalkalas atlaiko didesnę mechaninį spaudimą, lemia mažesnę vandens kiekį apvalkale. Ląstelė pasiruošia ramybės būsenai. Susiformavus sporos apvalkalui, motininė ląstelė yra lizuojama. Sporos dygimo procese taip pat dalyvauja hidrolazės. Nepralaidus apvalkalas turi būti specifiškai skaidomas, kad į ląstelę patektų vanduo ir prasidėtų augimas (Foster ir Johnstone, 1990).

Sekrecijos sistemų, pilių ir žiuželių susirinkime dalyvauja hidrolazės, reikalingos praplatinti peptidoglikano poras tam, kad dideli kompleksai galėtų būti gabenami į išorinę sienelės pusę (Koraimann, 2003).

Peptidoglikano hidrolazės taip pat svarbios bioplėvelių formavimui, nekompetentinių ląstelių lizei (alolizei), šeimininko – patogeno sąveikai (Claverys ir kt., 2007).

1.2.4. Hidrolazių aktyvumo reguliacija

Peptidoglikano hidrolazės yra potencialiai letalūs fermentai, gebantys suskaidyti juos produkuojančių organizmų ląstelės sienelę, todėl jie turi būti labai griežtai kontroliuojami. Reguliacija vyksta daugelyje etapų – nuo transkripcinio iki potransliacinio, tačiau svarbiausia yra biocheminė reguliacija.

Sporuliacijos bei sporų dygimo procesuose dalyvaujančių hidrolazių sintezė dažniausiai yra reguliuojama transkripciniame lygyje specifinių sigma faktorių.

Jau susintetintų hidrolazių aktyvumas yra kontroliuojamas įvairiais būdais – fizinėmis ar cheminėmis substrato peptidoglikano modifikacijomis. Žinoma, kad kiti sienelės polimerai, tokie, kaip teichojinės rūgštys, taip pat keičia gramteigiamųjų bakterijų hidrolazių aktyvumą. Autolizinai tampa mažiau aktyvūs žemame pH, manoma, kad tai yra dėl sienelės joninės aplinkos pakitimų (Vollmer ir kt. 2008).

1.3. Lizocimas

(N-acetil-muramido-glikano hidrolazė, EC 3.2.1.17)

Lizocimas, išskirtas iš vištos kiaušinio baltymo, yra 14.400 daltonų polipeptidas, sudarytas iš 129 aminorūgščių liekanų. Tai bazinis baltymas (teigiamai įkrautas), jo izoelektrinis taškas yra apie 10.7 – 11.0. Lizocimas sudaro 3.5% visų kiaušinio baltymų.

Žąsies (g-) tipo lizocimą atrado Jolles. Šis lizocimas yra plačiau paplitęs paukščių tarpe nei vištos kiaušinio baltymo lizocimas. G-tipo lizocimas sudarytas iš 185 aminorūgščių, fermento molekulinė masė yra 21 kDa. Aptinkama nedidelė žąsies ir vištos lizocimo sekų homologija, manoma, kad Glu 73 ir Asp 86 atitinka Glu 35 ir Asp 52 c-tipo aktyviajame centre. Vištos ir žąsies kiaušinio baltymo lizocimai šiek tiek skiriasi katalitinėmis savybėmis. Žąsies kiaušinio baltymo lizocimas pasižymi 3-6 kartus didesniu specifiniu aktyvumu, tačiau jam nebūdingas chitinazinis aktyvumas. Taip pat manoma, kad žąsies tipo lizocimui tinkamesnis substratas yra NAM liekanos, turinčios peptidų pakaitus (Hindenburg ir kt. 1974).

Kai kurių paukščių kiaušiniuose randama kelių tipų lizocimų, pvz., juodosios gulbės, Kanadinės žąsies kiaušiniuose yra vištos tipo ir žąsies tipo lizocimų. Įdomu tai, kad nors vištos kiaušinyje randamas c-tipo lizocimas, šio paukščio polimorfbranduoliniai lekocitai sintetina dviejų tipų lizocimus. Tai įrodo, kad paukščių genome yra genai, koduojantys abiejų formų fermentus, ir tik rūšiai specifiniai reguliacijos mechanizmai lemia, ar abi formos, ar kuri viena, bus ekspresuojama kiaušinio baltymo gamybos metu (Hindenburg ir kt. 1974).

Bakteriofago T4 lizocimas yra 18.7 kDa baltymas, sudarytas iš 164 aminorūgščių. Tai muramidazė, padedanti pasidauginusioms fago dalelėms išsilaisvinti iš infekuotos ląstelės. T4 lizocimas lizuoja bakterijos sienelę iš citoplazmos pusės (Akinalp ir kt. 2007). Šio fermento seka nėra homologiška c-tipo lizocimų sekai, tačiau panašios katalitinės savybės. Fago lizocimas žymiai greičiau skaido *E. coli* ląstelių sienelės peptidoglikaną, turintį peptidinius tiltelius, nei vištos lizocimas (Jolles ir kt. 1984). Abiejų tipų lizocimai turi panašią konformaciją, jiems būdingos panašios substrato prisijungimo savybės. Išlaikyta aktyvaus centro homologija – Glu 11 ir Asp 20 atitinka vištos lizocimo Glu 35 bei Asp 52 – svarbiausias aminorūgštis, reikalingas katalizei. Šie panašumai leidžia daryti prielaidą, jog c-tipo ir fago lizocimai kilo iš to paties protėvio.

Gentes *Chalaropsis* grybai sintetina užląstelinį lizocimą, kuris be tipiško lizocimui β -1,4-N-acetilmuramidazinio aktyvumo dar pasižymi β -1,4-N,6-O-diacetilmuramidaziniu aktyvumu. Taigi *Chalaropsis* lizocimas yra aktyvus prieš tas bakterijų grupes, kurios yra atsparios c-tipo lizocimui. Šio fermento seka ir dydis smarkiai skiriasi nuo kitų žinomų lizocimų, tačiau katalitinės *Chalaropsis* lizocimo savybės priklauso nuo Asp 6 ir Glu 33, taigi visų lizocimų aktyviajame centre randamos rūgštinės funkcinės grupės.

1.3.1. Lizocimo paplitimas ir reikšmė

Streptomyces coelicolor ląstelėse sintetinamas celozilas, priklausantis *Chalaropsis* lizocimų klasei, turi tik vieną elipsės formos domeną. Fermentas skaido O-acetilintą *Staphylococcus aureus* peptidoglikaną, sudėtyje turintį N,6-O-diacetilmuramo rūgštis. Jis taip pat hidrolizuoja ir N-deacetilintas glikano grandines (Rau ir kt., 2001; Vollmer ir kt., 2008). Šio lizocimo struktūra neturi jokio panašumo į c-tipo ar fago lizocimus.

Chalaropsis lizocimų klasei taip pat priklauso *Streptococcus pneumoniae* autolizinas LytC. Šis fermentas, kaip ir kitos *S. pneumoniae* peptidoglikano hidrolazės, turi choliną prisijunginąjį domeną, padedantį LytC prisitvirtinti prie ląstelės sienelės teicho rūgščių.

Iš *Enterococcus faecium* išskirti du autolitiniai lizocimai. Vienas jų, vadinamas SF muramidaze, yra egzofermentas, skaidantis glikano grandines nuo jų NAG galo. Pesticinas yra endo-specifinė N-acetilmuramidazė, kaip ir vištos lizocimas. Pesticinas yra koduojamas pst geno, randamo *Yersinia pestis* virulentinėje plazmidėje, greta imunitetą jam lemiančio geno. Toks genų išsidėstymas būdingas bakteriocinus koduojančioms plazmidėms (Vollmer ir kt., 2008).

Bestuburių organizme lizocimas yra vienas pagrindinių apsauginės sistemos komponentų, kadangi šie organizmai negamina imunoglobulinų. Jo randama įvairiuose vabzdžių kūno

audiniuose, pvz., *Manduca sexta* daugiausia lizocimo turi riebaliniame kūne, kiek mažiau vidurinėje žarnoje, širdies perikardo ląstelėse, Malpigijaus vamzdeliuose, epidermyje, seilių liaukose, raumenyse.

Vabzdžių lizocimas dažniausiai yra priskiriamas c-tipo lizocimams, bet pasitaiko ir i-tipo (angl. invertebrate). Kartais viename organizme randama abiejų tipų lizocimo, tai būdinga *Drosophila melanogaster* (Fiolka ir kt. 2005). Iš vabzdžių hemolimfos išgrynintas c-tipo lizocimas pasižymi fungistatiniu ar fungicidiniu poveikiu. Fermentas hidrolizuoja chitino β -1, 4 jungtis grybų sienelėje (Fiolka ir kt. 2005).

Lepidoptera būrio vabzdžiams dažniausiai būdingas c-tipo lizocimas. Iš dvisparnių atstovo *Ceratitis capitata* išskirtas lizocimas yra didelės molekulinės masės (23 kDa) baltymas, kurio N-galo seka yra homologiška fago lizocimo sekai. Vabzdžio chitinazinio/muramidazinio specifinio aktyvumo santykis yra 350 kartų didesnis nei vištos lizocimo.

Vynuoginės sraigės *Helix pomatia* lizocimas taip pat pasižymi didele molekuline mase – apie 24 kDa. Moliuskų lizocimas yra randamas mantijos gleivėse bei kiaušinėliuose, hemolimfoje jį sekretuoja hemocitai (Fiolka ir kt. 2004).

Panašūs į lizocimą baltymai randami daugelyje jūrinių bestuburių. Dėl nedidelio aktyvumo skaidant NAG polimerus daugiašerės žieduotosios kirmėlės *Nephtys hombergii* lizocimas galėtų būti priskirtas g-tipo lizocimams, tačiau kitomis savybėmis šis fermentas primena c-tipo lizocimą.

Jūrų žvaigždės *Asterias rubens* lizocimas yra 15 kDa ir turi unikalią N-galinę seka, nepanašią į žinomų lizocimų.

Į lizocimą panašūs fermentai aptikti daugelyje jūrinių dvigeldžių, pvz., midijos *Mytilus edulis* organizme randamas baltymas yra 18 kDa, jo izoelektrinis taškas yra žemesnis nei vištos lizocimo – apie 9,2 (Fiolka ir kt. 2004; Jolles ir kt. 1984).

Žinduolių seilėse, ašarose, gleivėse, imuninės sistemos ląstelėse yra randamas vištos kiaušinio baltymo tipo lizocimas (Yoshimura ir kt., 1988; Nitta ir Sugai, 1989; Prager, 1993).

Labai įdomus lizocimas buvo išgrynintas iš karvių tikrojo skrandžio (šliužo) gleivių. Čia jis sudaro 10% visų gleivių baltymų. Šis lizocimas yra atsparesnis skaidymui pepsinu, pasižymi didesniu aktyvumu rūgštinėje terpėje, tuo tarpu neutralaus pH sąlygomis jo aktyvumas yra gana mažas. Skrandžio bakterijos galvijams yra labai svarbus mitybinių medžiagų šaltinis. Bakterijos žūsta rūgštinėje tikrojo skrandžio terpėje, jų sienelės yra suskaidomos lizocimo, tuomet ląstelių turinys tampa prieinamas kitiems virškinimo fermentams. Taigi galvijų tikrojo skrandžio lizocimas evoliucionavo į virškinimo fermentą – jo aminorūgščių seka pakito, fermentas tapo funkcionalus skrandžio aplinkoje. Molekulėje sumažėjo pepsinui jautrių jungčių, taip pat sumažėjo elektrostatiinių sąveikų su pepsinu kiekis, taigi lizocimas tapo atsparesnis šiam

skrandžio fermentui. Galvijų skrandžio lizocimo paviršius yra neigiamesnis nei vištos ar žmogaus lizocimų. Jautriausios žemam pH Asp-Pro jungties praradimas evoliucijos eigoje sąlygojo padidėjusią fermento toleranciją rūgštinei terpei (Jolles ir kt. 1984; Irwin ir kt. 1989).

Lizocimas pasižymi ne tik antibakterinėmis savybėmis. Augaliniai lizocimai dažniausiai pasižymi dideliu chitinaziniu aktyvumu – jų pagrindinė funkcija yra apsaugoti augalus nuo grybinių fitopatogenų. Pupelių *Phaseolus mungo* sėklose aptikta lizocimo, apsaugančio augalą nuo parazitinių grybų, tokių, kaip *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Sclerotium rolfsii*, ir *Botrytis cinerea* (Wang ir kt., 2005).

Dėl tokio plataus paplitimo lizocimas laikomas primityvaus nespecifinio apsaugos mechanizmo komponentu, susijusiu su monocitų – makrofagų sistema, kuri yra filogenetiškai senesnė nei specifinė limfocitų – imunoglobulinų sistema. Lizocimas ne tik pasižymi tiesioginiu baktericidiniu poveikiu, jis taip pat stimuliuoja makrofagų fagocitines funkcijas. Buvo parodyta, kad bakterijų fagocitozė nevyko tol, kol jos nebuvo paveiktos lizocimu. Taip pat įrodyta, kad lizocimas tiesiogiai įtakoja fagocitinį aktyvumą, pvz., lizocimo priedas terpėje sustiprina tuberkuliozės bacilų fagocitozę.

1.3.2. Lizocimo molekulės struktūra

Lizocimo molekulė yra ovali, sudaryta iš dviejų domenų, sujungtų ilga α -spirale. Tarp domenų yra išsidėstęs aktyvusis centras. N-galinis domenas (40-88 pakaitai) sudarytas iš kelių spiralių ir antiparalelinių β -lakštų. Antrasis domenas sudarytas iš 1-39 ir 89-129 pakaitų. Jam būdinga α -spiralinė antrinė struktūra. Molekulė iš išorės yra hidrofiliinė, nepolinės grupės yra neprieinamos tirpikliui.

Abu domenai juda vienas kito atžvilgiu. Tai sukelia globalius konformacinius pokyčius, kurie leidžia pasiekti substratą ir sukuria tinkamą aplinką katalizei.

Aktyvusis lizocimo centras sudarytas iš šešių subvienetų A, B, C, D, E ir F, kurie kartu geba prisijungti šešis sacharidų pakaitus. Katalitinis centras išsidėstęs tarp E ir D subvienetų. Glu 35 yra pagrindinis rūgštinis katalizatorius ir protonuoja acetatinį substrato ryšį, tuo tarpu neigiamai įktauta Asp 52 liekana stabilizuoja susidariusį karboksiono joną (Godjajev ir kt. 1998).

Vištos lizocimą koduojantis genas turi keturis egzonus. Tarp geno egzonų ir lizocimo struktūrinių vienetų išsidėstymo yra matoma koreliacija. Antrasis egzonas koduoja katalitinio centro sritį, kurioje išsidėstę Glu 35, Asp 52, kiti katalizei svarbūs elementai bei dalis substrato surišančios srities. Antasis egzonas gali egzistuoti kaip primityvi glikozidazė.

Trečiasis egzonas koduoja sritį, kuri papildo aktyvųjį centrą ir suteikia papildomą substratinį specifiškumą bei katalitinį aktyvumą.

Pirmasis bei ketvirtasis egzoni koduoja potransliacines signalines mRNR sekas, prelizocimo signalinį peptidą, taip pat molekulę stabilizuojančias N- ir C- galines sritis.

Panašu, kad vištos, žąsies ir T4 lizocimai yra kilę iš vieno protėvio. Nors šių fermentų aminorūgščių sekos nėra labai panašios, tačiau tretinės struktūros turi daug bendrų bruožų. Žąsies lizocimui būdingos sritys, labai panašios į vištos lizocimo, tačiau šių sekų neturi fago lizocimas. Taip pat egzistuoja kitos žąsies lizocimo sritys, atitinkančios fago lizocimo, bet ne vištos lizocimo sritis. Tačiau nėra sričių, bendrų vištos ir fago lizocimų sekoms (Jolles ir kt. 1984).

Lizocimai yra struktūriškai giminingi α -laktalbuminams – šių baltymų genų egzonų struktūros yra labai panašios (Nitta ir Sugai, 1989; Kumagai ir kt. 1992). Manoma, kad prieš atsiskiriant paukščių bei žinduolių klasėms, lizocimo gene įvyko duplikacija. Vienas iš genų įgijo savybę prisijungti kalcio jonus. Šiandien tokie lizocimai randami arklio bei balandžio organizmuose. Vėliau žinduolių linijoje kalcį prisijungiančio lizocimo genas duplikavosi ir iš vieno jų kilo α -laktalbuminas (Nitta ir Sugai, 1989).

1.3.3. Katijoninės antimikrobinės lizocimo savybės

Tyrinėjant antibakterinį ir priešgrybinį lizocimo poveikį, buvo pastebėtos lizocimo savybės, kurių negalima paaiškinti šio junginio muramidaziniu ir chitinaziniu aktyvumu. Transgeniniuose augaluose ekspresuojamas fago T4 lizocimas suteikia atsparumą fitopatogeniniams grybams, tarp jų ir chitino nesintetinančiam *Phytophthora infestans* (During ir kt., 1999). Tiriant šį reiškinį nustatyta, kad lizocimas pasižymi membraną ardančiu poveikiu. Tai parodyta ne tik su bakterijomis, grybais, bet ir su bulvių protoplastais. Tačiau hemolitinių savybių lizocimas neturi, žinduolių ląstelėms jis nepavojingas (During ir kt., 1999).

Iš literatūros duomenų yra žinoma, kad net karščiu denatūruotas lizocimas pasižymi antimikrobinio poveikiu (Ibrahim ir kt. 1996; Herbert ir kt. 2007). Lizocimui denatūruojant prarandamas muramidazinis aktyvumas, didėja molekulės hidrofobiškumas, tirpikliui tampa prieinami Trp pakaitai. Molekulė tampa amfifiline. Dėl teigiamų krūvių ir susidariusio hidrofobinio paviršiaus didėja molekulės afiniškumas ląstelių membranoms. Teigiamai įkrautos aminorūgščių liekanos sąveikauja su fosfolipidų galvų grupėmis, ir hidrofobinėmis savybėmis pasižyminti molekulė suardo tvarkingą fosfolipidų išsidėstymą membranoje. Taip pat denatūruotam lizocimui būdinga savybė dimerizuotis. Molekulių dimerizacija vyksta aktyviojo centro srityje, taigi jis tampa neprieinamas substratui, fermentinis aktyvumas tampa lygus nuliui. Tačiau toks katalitiškai neaktyvus lizocimas tampa baktericidiškas ir gramneigiamosioms bakterijoms (Ibrahim ir kt. 1996). Struktūrinės kaitinamo lizocimo savybės tampa panašios į

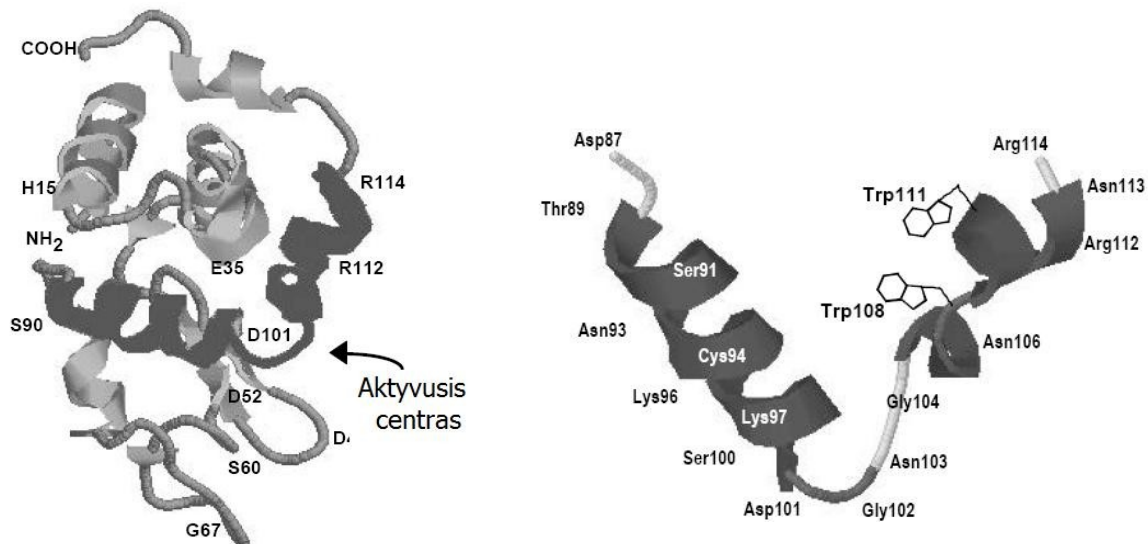
dimerinio membraną laidinančio baltymo defensino. Yra žinoma, kad alveolių II tipo epitelio ląstelių keratinosomose dalis lizocimo yra dimerinės formos. Taigi panašu, kad lizocimo izomerizacija gali vykti in vivo, keičiant lizocimo specifiškumą tam tikromis sąlygomis (Ibrahim ir kt. 1996).

Nors buvo įrodyta, kad denatūruotas lizocimas pasižymi antimikrobinėmis ir priešgrybinėmis savybėmis, liko neaišku, ar šios savybės atsiranda kintant lizocimo struktūrai denatūracijos metu, ar jos būdingos ir natyvios struktūros muramidaziniu poveikiu nepasižyminčiai lizocimo molekulei. Norint tai patikrinti, atlikti genetinės inžinerijos eksperimentai. Lizocimo aktyviame centre esanti aminorūgštis Asp 52, kuri yra ypatingai svarbi molekulės katalitinei funkcijai, buvo pakeista serinu. Dėl šios mutacijos lizocimo antrinė bei tretinė struktūra išliko visiškai nepakitusi, tačiau molekulė tapo katalitiškai neaktyvi. Buvo įrodyta, kad tokia lizocimo molekulė taip pat pasižymi antibakteriniu poveikiu, taigi, baktericidinės savybės ne atsiranda molekulę denatūruojant, o yra būdingos natyvios struktūros lizocimui (Ibrahim ir kt. 2001).

Tyrinėjant baktericidines vištos kiaušinio baltymo lizocimo savybes, nepriklausančias nuo jo muramidazinio aktyvumo, molekulės struktūroje atrastas konservatyvus motyvas „spirale – kilpa – spirale“, paprastai randamas baktericidinių ir membraniniu aktyvumu pasižyminčių baltymų struktūroje (3 pav.). Toks motyvas būdingas cecropinams, kolicinui E1. Šis spiralinio segtuko motyvas yra randamas struktūriškai lanksčioje lizocimo molekulės srityje, taigi jis gali turėti įtakos biologinėms lizocimo funkcijoms, tokioms, kaip antimikrobinė, anti – ŽIV, antinavikinė, imuninės sistemos moduliavimo. Panašūs spiraliniai motyvai rasti fago T4 lizocimo struktūroje (Doring ir kt., 1999).

Tiriant lizocimo spiralinio segtuko motyvą nustatyta, kad N-galinė jo spirale yra labai hidrofobinė, tuo tarpu C-galinė yra mažiau hidrofobinė ir sudėtyje turi teigiamai įkrautų aminorūgščių. Dėl šių struktūrinių ypatumų manoma, kad N-galinė spiralinio segtuko spirale įsiterpia į lipidų dvisliuoksnį, kol anijoninės fosfolipidų galvų grupės sąveikauja su C-galine spirale. Yra nustatyta, kad šiam motyvui sąveikaujant su membrana, suardomas transmembraninis potencialas, tai leidžia manyti, kad, kelioms molekulėms padengiant membranos paviršių, susidaro kanalas. Tokio kanalo skersmuo yra gana didelis, nes iš citozolio į terpę per jį pereina toks stambus baltymas kaip β -galaktozidazė. Genų inžinerijos metodais keičiant aminorūgštis šioje svarbioje lizocimo srityje nustatyta, kad antibakterinę funkciją labai sustiprina hidrofobinių bei teigiamą krūvį turinčių aminorūgščių įvedimas į lizocimo polipeptidinę grandinę. Įdomu tai, kad iš žmogaus ir babuino audinių išskirto lizocimo peptidinėje grandinėje evoliucijos eigoje 106 pozicijoje vietoje Asn atsirado Arg (Pellegrini ir kt., 1996).

Žmogaus lizocimo 9 aminorūgščių RAWVAWRNR fragmentas pasižymi ne tik baktericidiniu, bet ir antinavikiniu bei anti – ŽIV-1 poveikiu. Fragmentas taip pat inhibuoja HHV8 užkrėstų ląstelių proliferaciją AIDS pacientų, kuriems diagnozuota Kaposi sarkoma, organizmuose. Šį žmogaus lizocimo fragmentą kaip anti-AIDS vaistą naudojanti technologija yra užpatentuota (Lee-Huang ir kt., 2005).



3 pav. A - Erdvinė lizocimo molekulės struktūra. B – Lizocimo spiralinio plaukų segtuko motyvas (Pagal Ibrahim ir kt., 2001).

1.4. *L. lactis* atsakas į ląstelės apvalkalo pažeidimų sukeltą stresą

Lactococcus lactis – tai gramteigiamieji kokai, augantys poromis arba formuojantys trumpas grandinėles. Priklausomai nuo augimo sąlygų, yra ovalios formos, 0.5 – 1.5 μm ilgio. Tai nesporuliuojančios, nejudrios bakterijos. *L. lactis* pasižymi homofermentiniu metabolizmu, kurio galutinis produktas dažniausiai yra L-pieno rūgštis. Dėl gebėjimo sintetinti pieno rūgštį ši bakterija yra plačiai naudojama maisto pramonėje.

Lactococcus lactis padermės, kartais mišiniuose su kitomis pienarūgščių bakterijų rūšimis, naudojamos fermentuotų pieno produktų gamyboje. Žmogui vykdant griežtą selekciją produktų skonio, kvapo, struktūros atžvilgiu, *L. lactis* prisitaikė augti piene. Šis procesas tęsiasi ir šiandien (Wegmann ir kt., 2007).

1985 metais “pieno pramonės” laktokokai buvo reklasifikuoti į du *L. lactis* porūšius – *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (anksčiau *Streptococcus lactis*) ir *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (anksčiau *Streptococcus cremoris*). Taip ši rūšis atskirta nuo streptokokų, kuriems priklauso daugybė patogeninių rūšių.

Eksperimentams naudota padermė, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, yra tarptautinis pienarūgščių bakterijų genetikos prototipas. Žinios, įgytos tyrinėjant šį mikroorganizmą, yra plačiai naudojamos įvairioms biotechnologijos reikmėms. 1980 metais buvo pašalinta nestabili tėvinės padermės NCDO712 plazmidinė DNR (Gasson, 1983). Iš šios padermės kilusi MG1363 yra genetiškai patikima ir stabili, tai palengvina įterptos laktokokinės ar heterologinės DNR analizę. Baltymų ir peptidų ekspresijai šios padermės ląstelėse buvo sukurtos įvairios sistemos, ji naudojama kaip ląstelinis fabrikas įvairių heterologinių produktų gamybai, tarp jų antimikrobiniais junginiais – bakteriocinams, bakteriofagų endolizinams, defensinams – gaminti (Wegmann ir kt., 2007).

L. lactis GRAS (angl. generally regarded as safe) statusas leidžia šias bakterijas naudoti terapinių baltymų ar vakcinų gamybai ir sekrecijai. *L. lactis* išgyvena perėjimą per virškinimo traktą, taigi MG1363 ląstelės yra sėkmingai naudojamos bioaktyvių molekulių, tokių, kaip vakcinos ar imuninės sistemos modulatoriai, pernašai į žarnyną. Svarbu tai, kad mutantinės genetiškai modifikuotos padermės ląstelės, ekspresuojančios citokiną interleukiną 10, buvo naudojamos klinikiniuose bandymuose su pacientais, sergančiais žarnyno infekcija (Steidler ir Vandembroucke, 2006). Gyvų bakterijų MG1363, ekspresuojančių E7 antigeną ir interleukiną 12, pagrindu sukurta vakcina apsaugojo peles nuo 16 tipo papilomos viruso sukeltų auglių (Bermudez-Humaran ir kt., 2005). Neseniai *L. lactis* buvo panaudota kaip negyva pernašos sistema gleivinės vakcinacijai – prie laktokokų ląstelių sienelių buvo prijungti pneumokokų antigenai (Audouy ir kt., 2006).

Padermė MG1363 naudojama laktokokų metabolizmo analizei, įterpiant heterologinius genus, bandoma keisti šios bakterijos metabolinius kelius. Kadangi laktokokų metabolizmas yra gana paprastas, jį lengva modeliuoti – sukurtos padermės, vykdančios vitaminų B ar alanino perprodukciją (Sybesma ir kt., 2003; Hols ir kt., 1999).

L. lactis bakterijos naudojamos didelio masto pramoniniuose fermentacijos procesuose. Jų metu ląstelės susiduria su daugybe skirtingų sąlygų, tokių, kaip svarbių mitybinių medžiagų trūkumas ar ekstremalios fizinės sąlygos – aukšta ar žema temperatūra, didelis osmosinis slėgis ar žemas pH.

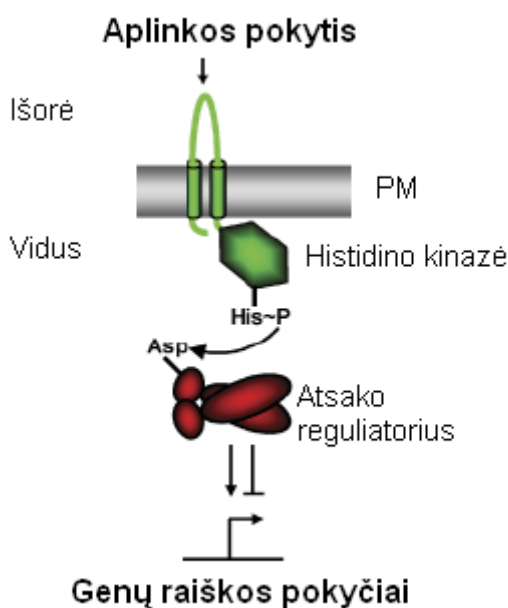
Kaip ir dauguma kitų organizmų, *L. lactis* bakterijoms išgyventi nepalankiomis sąlygomis padeda įvairūs atsako į stresą mechanizmai. Dažniausiai pakitusios aplinkos sąlygos iššaukia savitų genų rinkinių, vadinamų atsako į stresą genais, ekspresiją.

Dėl istoriškai ilgo *L. lactis* naudojimo maisto gamybai, ši bakterija laikoma saugia naudoti maisto pramonėje. Genetinės modifikacijos suteikia galimybę praplėsti *L. lactis* panaudojimo ribas suteikiant šioms bakterijoms naujas savybes. Šiuo metu naudojamos sistemos leidžia tik konstitutyvią genų ekspresiją, tuo tarpu įvairiose pramoninėse ir laboratorinėse situacijose

indukuojamos genų raiškos sistemos yra privalumas. Tam, kad galima būtų naudoti indukuojamas genų raiškos sistemas maisto pramonėje, indukuojančiu signalu turi būti nekenksmingas maisto papildas arba fizinio parametro pokytis, lengvai valdomas pramoniniame procese. Dėl šios priežasties itin domimasi streso indukuojamomis sistemomis – jas galima panaudoti kuriant *L. lactis* padermes, sintetinančias heterologinių genų produktus.

1.4.1. Dvikomponentės sistemos

Dvikomponentės genų raiškos valdymo sistemos yra randamos visų prokariotų, išskyrus mikoplazmų, ląstelėse. Jos yra svarbios aplinkos sąlygų pajutimo ir atsako procesuose, taip pat dalyvauja bakterijų patogenezėje. Dvikomponentę sistemą sudaro jutiklis histidino kinazė, dažniausiai išsidėstęs bakterijos membranoje, ir jam savitas atsako valdymo baltymas, paprastai veikiantis kaip DNR prisijungiantis transkripcijos reguliatorius (4 pav.). Histidino kinazės autofosforilinimą atsakant į aplinkos signalą lydi fosfato grupės perdavimas savitam atsako reguliatoriui. Šis keičia atitinkamo regulono genų raiškos stiprumą (Ng ir Winkler, 2004).



4 pav. Bakterijų dvikomponentės genų raiškos valdymo sistemos komponentai ir veikimo mechanizmas.

Lactococcus lactis MG1363 genome atrastos aštuonios dvikomponentės genų raiškos valdymo sistemos (O’Connell-Motherway ir kt.,2000; Jordan ir kt., 2007). Ląstelių atsake į apvalkalo pažaidų stresą dalyvauja CesSR dvikomponentė sistema (*angl.* Cell Envelope Stress). Ji yra homologiška *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans* LiaSR ir *Staphylococcus aureus* VraSR sistemoms, dalyvaujančioms atsake į membranas veikiančių antibiotikų poveikį (Kuroda

ir kt., 2003; Yin ir kt., 2005; Zhang ir Biswas, 2009). Dauguma šių sistemų pasižymi atsparumą lemiančių genų raišką skatinančiu poveikiu. Išimtis yra *Streptococcus mutans* LiaSR. Panašu, kad sensorinė kinazė LiaS slopina baltymo reguliatoriaus poveikį. Inaktyvavus kinazę koduojantį geną, ląstelės tampa atsparesnės membraną veikiantiems antibiotikams (Zhang ir Biswas, 2009).

Manoma, kad CesSR sistema yra indukuojama ląstelės sienelės sintezę inhibuojančių katijoninių antibiotikų, sąveikaujančių su lipidu II, tokių, kaip bacitracinas ar laktokokcinas 972 (Martinez ir kt., 2007).

L. lactis CesSR sistema ir jos ortologai skiriasi reguliuojamais genais ir jų skaičiumi. LiaR valdo tik savo paties operono (liaIHGFSR) ir yhcYZ-yhdA raišką, tuo tarpu nuo VraR yra priklausoma 46 genų transkripcija. Remiantis Martinez ir kt., 2007, CesR reguliuoja 21 geno raišką. Šiems transkripcijos reguliatoriams bendra tai, kad jų regulonai dalyvauja atsake į ląstelės apvalkalo pažeidimus. Dažnai CesR ortologai valdo genų, koduojančių baltymus, homologiškus fago šoko baltymams (Psp), transkripciją. *L. lactis* geno limg_2163 produktui būdingas Psp domenas. Psp baltymai yra susiję su atsaku į užląstelinį stresą bei palaiko membranos vientisumą.

S. aureus VraR reguliuojami genai dalyvauja ląstelės sienelės biosintezėje. *L. lactis* CesR regulone tokią funkciją galėtų atlikti genų limg_1101-1103 produktai, kadangi vienas jų turi β -laktamazės/transpeptidazės domeną.

Streptokokų, laktokokų ir stafilokokų CesR/VraR baltymai priklauso grupei, nutolusiai nuo *Bacillus* sp. LiaR ortologų (O'Connell-Motherway ir kt., 2000).

Dvikomponentė sistema CesSR valdo *L. lactis* atsaką į lizocimo sukeltą stresą ir sąlygoja ląstelių adaptaciją bei atsparumo mechanizmų įjungimą.

1.4.2. Bakterijų atsparumo lizocimo hidrolaziniams aktyvumui mechanizmai

Bakterijoms būdingi du pagrindiniai atsparumo lizocimui mechanizmai. Vienas jų – peptidoglikano modifikavimas:

1. Peptidoglikano NAM O-acetilimas, aprašytas 19 gramneigiamųjų ir gramteigiamųjų bakterijų rūšių.
2. Kitų polimerų, pvz., polisacharidų prijungimas prie ląstelės sienelės.
3. Peptidinių jungčių kiekio peptidoglikane padidėjimas.
4. NAG N-deacetilimas (Bera ir kt., 2005; Hebert ir kt., 2007).

Antrasis mechanizmas – lizocimą inhibuojančių junginių sintezė. *E. coli* periplazmoje randamas inhibitorius Ivy (*angl.* inhibitor of vertebrate lysozyme), *S. pyogenes* sekretuoja

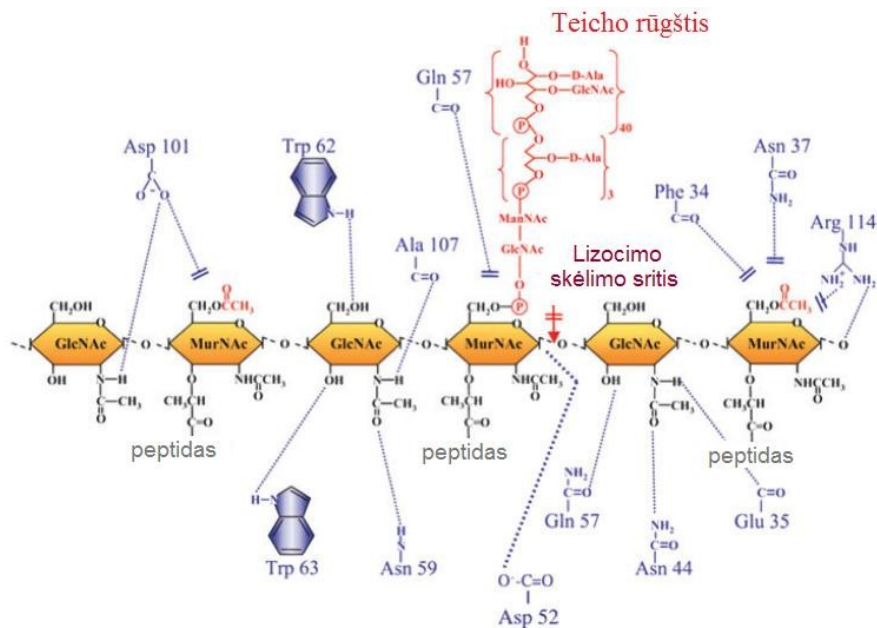
veiksnį Sic (*angl.* streptococcal inhibitor of complement), užląstelinį virulentiškumo faktorių, inhibuojantį lizocimą (Hebert ir kt., 2007).

1.4.3. Peptidoglikano O-acetilinimas

Peptidoglikano O-acetilinimas būdingas 69 bakterijų padermėms, priklausančioms 19 gramteigiamųjų bei gramneigiamųjų rūšių, tarp jų *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, taip pat svarbiems žmogaus patogenams – *Neisseria gonorrhoeae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* (Bera ir kt., 2005; Hebert ir kt., 2007; Clarke ir kt., 2007). Dažniausiai šių bakterijų peptidoglikano O-acetilinimo laipsnis siekia daugiau nei 30%. Didžiausią O-acetilinimo laipsnis būdingas *S. aureus* – apie 60%. Parodyta, kad gramneigiamųjų bakterijų O-acetilinimas vyksta už citoplazmos ribų, manoma, kad acetilo grupės donoras ir O-acetiltransferazė yra išsidėstę plazminėje membranoje arba ląstelės sienelėje (Bera ir kt. 2005). Peptidoglikano acetilinimas vyksta ties N-acetilmuramo rūgšties liekanos 6 C atomo hidroksilo grupe, susidaro N-2,O-6-diacetilmuramo rūgšties liekana.

Daugėja duomenų, kad peptidoglikano O-acetilinimas keičia peptidoglikano hidrolazių aktyvumą. Taigi tokiu būdu yra reguliuojama autolizinių veikla (Clarke ir kt., 2007). Manoma, kad peptidoglikano O-acetilinimas yra pagrindinis *S. aureus* atsparumo lizocimui mechanizmas (Bera ir kt., 2005). Nustačius lizocimo trimatę struktūrą, tapo aišku, kaip peptidoglikano O-acetilinimas inhibuoja muramidazę (5 pav.).

Lizocimas hidrolizuoja keletą struktūriškai panašių substratų. Geriausiai žinomas substratas – polisacharidas iš NAM ir NAG. Lizocimas skelia β -glikozidinių ryši tarp N-acetilmuramo rūgšties 1 C atomo ir N-acetilgliukozamino 4 C atomo. Optimalus substratas yra (NAG-NAM)₃ heksasacharidas, kur lizocimas skelia NAM4-O-NAG5 glikozidinių ryši. Fermento aktyviajame centre yra kiekvieną heksasacharido žiedą prijungiančios sritys. Bent penkios aminorūgščių liekanos sąveikauja su NAM C6 atomo OH grupe. O-acetilinant šią grupę arba prijungiant prie jos teichojinės rūgšties molekulę, yra įtakojama substrato sąveika su lizocimu, taigi yra įgyjamas atsparumas lizocimo vykdomai hidrolizei (Bera ir kt. 2005; Clarke ir kt., 2007).

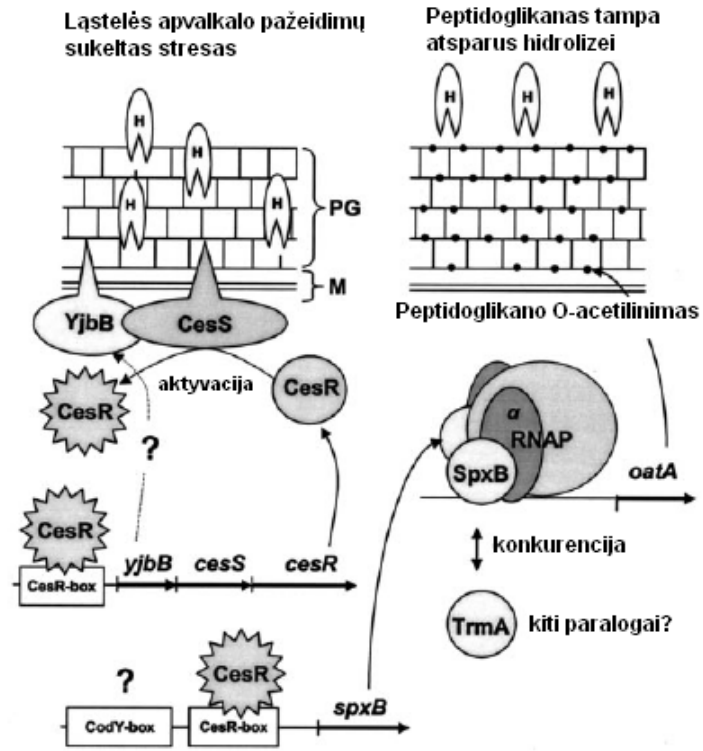


5 pav. Lizocimo ir stafilokokų peptidoglikano sąveikos mechanizmas (Pagal Bera ir kt., 2005).

1.4.4. *L. lactis* peptidoglikano O-acetilimo reguliacija

Manoma, kad į ląstelės apvalkalo pažeidimus *L. lactis* ląstelės atsako molekulinį įvykių kaskada (5 pav.). Pirmiausia yra indukuojami CesSR regulono genai: membranoje esanti sensorinė kinazė CesS autofosforilinimosi ir fosfato grupės perdavimu aktyvuoja transkripcijos aktyvatorių CesR. Aktyvuotas CesR baltymas atpažįsta CesR motyvą savo operono promotoriaus sekoje bei SpxB baltymą koduojančio geno promotoriaus sekoje. CesR indukuoja *spxB* geno transkripcijos aktyvaciją. Baltymas SpxB priklauso transkripcijos reguliatorių, lemiančių gramteigiamųjų bakterijų atsakus į stresines sąlygas, šeimai. SpxB rišasi su RNR polimerazės α -subvienetu ir nukreipia ją ant *oatA* geno promotoriaus, sąlygodamas pastarojo geno raišką. Genas *oatA* koduoja peptidoglikano O-acetilazę. Intensyvi šio geno raiška lemia peptidoglikano O-acetilimą, tuo padarydama sienelę atsparią lizocimui (Veiga ir kt., 2007).

Manoma, kad kiti transkripcijos aktyvatoriaus SpxB paralogai gali konkuruoti dėl prisijungimo srities RNR polimerazės α -subvienete taip nulemdami dar sudėtingesnę ląstelės atsako į įvairių aplinkos sąlygų sukeltą stresą sistemą.



6 pav. *L. lactis* atsako į ląstelės apvalkalo stresą reguliacija. RNAP – RNR polimerazė (Pagal Veiga ir kt., 2007).

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos

2.1.1. Cheminiai reagentai

NaCl, NaOH - Boom

NaH₂PO₄ · H₂O, Na₂HPO₄ · 2H₂O, NaHCO₃ - Merck

Tetrafenilfosfonio (TPP⁺) chloridas, dietilpirokarbonatas (DEPC), natrio dodecilsulfatas (NDS) – Sigma

HEPES – Roche

Macaloid - Elementis Specialities

EDTA - Na druska – Serva

Fenildikarbaundekaborano (PCB⁻) kalio druską susintetino ir išvalė Dr. A. Beganskiene (Vilniaus Universitetas, Chemijos fakultetas).

2.1.2. Fermentai

Lizocimo (Fluka) 50 mg/ml tirpalas vandenyje buvo ruošiamas prieš pat eksperimentą.

2.1.3. Antibiotikai

Gramicidinas (Serva) 5 mg/ml tirpalas laikomas -20°C.

Chloramfenikolis (Sigma) 5 mg/ml tirpalas, laikomas -20°C.

Eritromicinas (Sigma) 10 mg/ml tirpalas, laikomas +4°C.

2.1.4. Bakterijos

Magistrinio darbo metu buvo tiriamos šios bakterijos:

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* padermė MG1363 (Gasson, 1983) ir iš jos išvestos padermės:

VES1562 – MG1363 $\Delta acmA$

VES1770 – MG1363 $\Delta htrA$

VES2824 – spontaninė lizocimui atspari padermė, genome turinti deleciją, kuri apima *guaA* geną

VES3910 – MG1363 *spxB*⁺

VES4075 – MG1363/pVE3916

VES4240 – MG1363 *yxB*/p*murMN*⁺

VES4320 – MG1363 *oatA*/*spxB*⁺

VES4372 – MG1363 *pepN*

VES4527 – MG1363 $\Delta mscL$

VES4534 – MG1363 *pgdA*⁺

VES4784 – MG1363 $\Delta oatA$

VES5870 – MG1363 $\Delta oppA$

Pseudomonas aeruginosa padermė PAO (Holloway, 1969).

Bacillus subtilis padermė YB886 gauta iš Dr. P. Tavares (CNRS, Gif sur Yvette)

2.1.5. Terpės

L. lactis kultivavimui buvo naudojama M17 terpė (Merck), papildyta 0.5 % gliukozės. Kai kurių mutantinių padermių kultivavimui į GM17 terpę buvo pridedama chloramfenikolio (5 $\mu\text{g/ml}$), eritromicino (3 $\mu\text{g/ml}$).

P. aeruginosa ir *B. subtilis* buvo auginamos LB terpėje: 10 g triptono; 5 g mielių ekstrakto; 5 g NaCl; distiliuoto vandens iki 1000 ml, pH 7,0.

2.1.6. Komerčiniai rinkiniai

High Pure RNA isolation kit – Roche

Superscript RT – Invitrogen

NucleoSpin Extract II – Macherey-Nagel

2.2. Metodai

2.2.1. Elektrocheminiai matavimai

Elektrocheminiai matavimai buvo atliekami termostatuotose 5 ml talpos kiuvetėse. Ląstelių suspensijos buvo aeruojamos magnetinėmis maišyklėmis. Matavimams naudotos *L. lactis* ląstelės buvo auginamos per naktį 30°C temperatūroje GM17 terpėje, kultūros skiedžiamos MG17 terpe iki A_{550} 0.1 ir auginamos iki A_{550} 1.2 (3×10^9 cfu/ml). Ląstelės buvo nusodinamos centrifuguojant (centrifuga Beckman, rotorius JA-14, 10000 aps/min, 20 min, +18°C) ir resuspenduojamos GM17 terpėje 100 kartų mažesniame tūryje nei naudotas auginimui.

TPP⁺, PCB⁻ ir K⁺ jonų koncentracijos terpėje buvo matuojamos selektyviais elektrodais, prijungtais prie signalo stiprinimo sistemos, pagamintos aukštą įėjimo varžą turinčio operacinio stiprintuvo AD549JH (Analog Devices) pagrindu. Stiprinimo sistema buvo prijungta prie kompiuterio per duomenų perdavimo plokštę (DT302; Data Translation, Inc.) Palyginamieji Ag-AgCl elektrodai (Orion modelis 9001; Thermo Inc.) buvo netiesiogiai per agarizuotus druskos tiltelius sujungti su matavimo kiuvetėmis. Membraninių TPP⁺ ir PCB⁻ jonams atrankių elektrodų

savybės yra aprašytos Griniaus ir bendraautorių (1981). K^+ jonams selektyvus elektrodas (Orion modelis 93-19) buvo įsigyti iš Thermo Inc.

Matuojant TPP^+ , K^+ ar PCB^- jonų koncentracijas, prieš kiekvieno bandymo pradžią buvo atliekama matavimo sistemos kalibracija, pridendant standartinį kiekį, atitinkamai, TPP^+ , K^+ arba PCB^- druskų tirpalų.

2.2.2. Genų raiškos tyrimai mikrogardelių metodu

2.2.2.1. RNR išskyrimas

20 ml ląstelių kultūros (A600 0.5) buvo centrifuguojama 10 000 aps/min 3 min. kambario temperatūroje (Eppendorf centrifuga 5810R). Pašalinus auginimo terpę, ląstelės buvo nedelsiant užšaldomos skystame azote ir laikomos $-80^{\circ}C$ temperatūroje.

Atšildytos ląstelės resuspenduojamos 400 μ l TE buferio (su dietilpirokarbonatu), suspensija buvo perkeliama į 2 ml mėgintuvėlius, kuriuose buvo iš anksto paruoštas mišinys:

0.5 g stiklinių rutuliukų,

50 μ l 10 % NDS,

500 μ l fenolio/chloroformo:IAA (izoamilio alkoholio) (1:1)

150-175 μ l Macaloid reagento

Ląstelės buvo homogenizuojamos 45 s kratant mėginius Biospec Mini-BeadBeater-8, daroma 1 min. pertrauka, suspensija atvėsinama lede, kartojama 2 kartus.

Centrifuguojama 10 min. 10 000 aps./min. greičiu $4^{\circ}C$ temperatūroje. Viršutinė fazė buvo perkeliama į švarų mėgintuvėlį, pridedama 500 μ l chloroformo:IAA (24:1), centrifuguojama 5 min. 10 000 aps./min. greičiu $4^{\circ}C$ temperatūroje.

Toliau RNR išskyrimui iš beląstelinio ekstrakto buvo naudojamas Roche rinkinys High Pure RNA Isolation Kit. Išskirti RNR mėginiai laikomi $-80^{\circ}C$ temperatūroje.

RNR koncentracija mėginiuose buvo nustatoma spektrofotometriškai, matuojant 260 nm ilgio bangoje. RNR mėginių kokybė (16S/23S santykis, užterštumas DNR, RNR degradacija) buvo tikrinama naudojant Agilent RNA6000 Nano Assay rinkinį ir Agilent Bio-analyzer 2100 elektroforezės sistemą (Agilent Technologies).

2.2.2.2. kDNR sintezė, naudojant išskirtos RNR mėginius

Amino-alil-modifikuotos kDNR sintezei naudotas Invitrogen rinkinys Superscript III.

1. Pradmenų lydymo reakcijos mišinio sudėtis: 10-20 μ g ląstelių RNR,

2 µl atsitiktinių nonamerų, dejonizuoto vandens iki 18 µl. Inkubuojama +70°C temperatūroje 5 min.

2. Atvirkštinė transkripcija. Buvo pridedami reakcijos komponentai: 6 µl 5 x reakcijos buferio, 3 µl 0.1M DTT, 1.2 µl 25x AA-dUTP/ dNTP mišinio, 1.8 µl Superscript III atvirkštinės transkriptazės.

Atvirkštinės transkripcijos reakcija buvo vykdoma 16 val. 42°C temperatūroje.

mRNR suardymui buvo pridėta 3 µl 2.5M NaOH, inkubuojama 15 min. 37°C temperatūroje. Reakcijai neutralizuoti pridėta 15 µl 2 M HEPES.

2.2.2.3. Amino-alil-modifikuotos kDNR gryninimas

Amino-alil-modifikuotos kDNR gryninimui naudojamas Macherey-Nagel rinkinys NucleoSpin Extract II. Nevalytas kDNR mišinys užpilamas ant NucleoSpin Extract II kolonėlių, 1 min. centrifuguojama 11 000 aps/min, membrana plaunama NT3 buferiu, vėliau 80% etanoliu. kDNR eliucijai naudojamas 0.1 M natrio bikarbonato tirpalas, pH 9.

Išgrynintos amino-alil-modifikuotos kDNR koncentracija nustatoma Nanodrop spektrofotometru. Žymėjimui naudojama ne mažesnė nei 60 ng/µl kDNR koncentracija.

2.2.2.4. Amino-alil-modifikuotos kDNR žymėjimas Cy dažais (Amersham)

Amino-alil-modifikuota kDNR buvo maišoma su Cy3 ir Cy5 dažų esteriais. 60-90 min. inkubuojama kambario temperatūroje, tamsoje. Buvo pridedama 15 µl 4 M hidrosil-amino, 15 min. inkubuojama 30°C temperatūroje, tamsoje. Žymėta kDNR buvo gryninama naudojant NucleoSpin Extract II kolonėles. Eliucijai naudojama 50 µl eliucijos buferio NE iš NucleoSpin Extract II rinkinio. kDNR žymėjimo efektyvumas buvo nustatomas Nanodrop spektrofotometru. Cy3 ir Cy5 koncentracija turi būti ne mažesnė nei 0.5 pmol/µl.

2.2.2.5. Hibridizacija

Cy3 ir Cy5 fluorescuojančiais dažais žymėti mėginiai buvo sumaišomi taip, kad kDNR koncentracijų skirtumas būtų ne didesnis nei 30 %. Sumaišyti mėginiai džiovinami, vėliau kDNR buvo resuspenduojama 7 µl vandens.

Mėginiai buvo inkubuojami 2 min. 94°C temperatūroje, pridedama 35 µl 68°C temperatūros hibridizacijos buferio (Ambion). Mėginiai buvo hibridizuojami su *Lactococcus lactis* subsp.

cremoris MG1363 viso genomo DNR mikrogardelėmis. Hibridizacija vyko 45°C temperatūroje daugiau nei 16 val. Po hibridizacijos mikrogardelės buvo plaunamos ir skenuojamos kaip aprašyta (van Hijum ir kt., 2005). Duomenys buvo apdorojami ir normalizuojami MicroPrep programomis. Geno ekspresijos patikimumas buvo nustatomas naudojant Cyber-T programą.

Išvados

1. Parinktos *L. lactis* auginimo ir inkubavimo sąlygos, tinkamiausios potenciometriniam jautrumo lizocimui tyrimams atlikti.

2. Lizocimas sukelia viduląstelinio K^+ ištekėjimą iš *L. lactis* MG1363 ląstelių ir dalinę jų citoplazminės membranos depoliarizaciją.

4. Mutantinių padermių ląstelių atsakai į membraną laidinantį lizocimo poveikį yra skirtingi - kuo mutantinė padermė atsparesnė lizocimui, tuo vėliau prasideda K^+ jonų ištekėjimas iš šios padermės ląstelių.

3. Natyvus, kaitintas lizocimas ir 9a peptidas skirtingai veikia *L. lactis* apvalkalėlio laidumą. 9a peptidas bei kaitintas lizocimas sukelia staigesnį K^+ jonų ištekėjimą ir membranos įtampos sumažėjimą nei natyvus lizocimas. 9a peptido sukeliamas K^+ jonų ištekėjimas yra grįžtamas.

4. 9a peptidu ir lizocimu veiktose ląstelėse iššaukiama dvikomponentės valdymo sistemos CesSR raiška ir sukliamas nuo SpxB priklausomas ląstelių atsparumas lizocimui.

5. Lizocimas ir 9a peptidas sukelia kiek skirtingus *L. lactis* transkriptomo pokyčius: lizocimas savitai skatina nuo N-deacetilazės priklausomo atsparumo mechanizmo įsijungimą, tačiau slopina *busAA-AB* genų, koduojančių OpuA sistemą, raišką, priešingai 9a peptidui, kuris stiprina pastarųjų genų raišką.

Santrauka

Šiame darbe tirtas grameigiamųjų ir gramneigiamųjų bakterijų atsakas į natyvaus ir katalitiškai neaktyvaus lizocimo bei jo 9 aminorūgščių katijoninio peptido sukeltus ląstelės apvalkalo pažeidimus. Panaudojant potenciometrinius metodus, buvo nustatyta, kad šie junginiai sukelia viduląstelinio K^+ ištekėjimą iš *L. lactis*, *B. subtilis* ir *P. aeruginosa* ląstelių ir dalinę jų citoplazminės membranos depoliarizaciją, tačiau natyvus, kaitintas lizocimas ir 9a peptidas skirtingai veikia *L. lactis* apvalkalėlio laidumą. Peptidas bei kaitintas lizocimas sukelia staigesnį K^+ jonų ištekėjimą ir membranos įtampos sumažėjimą nei natyvus lizocimas. Peptido sukeliamas K^+ jonų ištekėjimas yra grįžtamas. Taip pat buvo įvertintas įvairių mutantinių *L. lactis* padermių jautrumas lizocimui. Pastebėta, kad kuo padermė atsparesnė lizocimui, tuo vėliau prasideda K^+ jonų ištekėjimas iš šios padermės ląstelių. Pasitelkus DNR mikrogardelių metodą, buvo tiriamas lizocimo bei peptido poveikis *L. lactis* MG1363 bei *ΔoppA* ląstelių genų raiškos pokyčiams. Nustatyta, jog peptidu ir lizocimu veiktose ląstelėse iššaukiama dvikomponentės valdymo sistemos CesSR raiška ir sukeliamas nuo SpxB priklausomas ląstelių atsparumas lizocimui. Gauti rezultatai rodo, jog lizocimas ir 9a peptidas sukelia kiek skirtingus *L. lactis* transkriptomo pokyčius: lizocimas savitai skatina nuo N-deacetilazės priklausomo atsparumo mechanizmo įsijungimą, taip pat skiriasi OpuA sistemą koduojančių genų raiška.

Ana Solopova

Response of *Lactococcus lactis* to cell envelope damage caused by lysozyme

Master thesis

Summary

We used potentiometric measurements to investigate the response of Gram-positive and Gram-negative bacteria to cell envelope stress, caused by native and heat-inactivated lysozyme and lysozyme-derived 9 amino acid peptide. It was found that these antimicrobial compounds induce leakage of K^+ outside the cells of *L. lactis*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa* and cause partial depolarization of bacterial cytoplasmic membrane. We observed different response of *L. lactis* cells to these compounds – peptide and heat-inactivated lysozyme cause more rapid efflux of K^+ ions than native lysozyme. Peptide has a reversible effect on K^+ leakage. Sensitivity of different mutant strains of *L. lactis* to lysozyme was studied. It was shown that more resistant the strain is, the later the leakage of K^+ ions is induced by lysozyme. To investigate the genome-wide response of *L. lactis* MG1363 and $\Delta oppA$ strains to lysozyme and 9 a.a. peptide, changes of gene expression after challenging cells with these antimicrobial compounds were analysed using DNA microarrays. It was estimated, that lysozyme and lysozyme-derived 9a.a. peptide induce CesSR system and SpxB-mediated response. It was also shown that *L. lactis* response to 9a.a. peptide and lysozyme differs. Lysozyme specifically induces PgdA-mediated resistance mechanism. Changes of expression of OpuA system in lysozyme and peptide treated cells are also different.

Literatūra

- Akinalp A. S., M. Asan, N. Ozcan, *Expression of T4 Lysozyme Gene (gene e) in Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. African Journal of Biotechnology, 2007. **6**: p.963-966.
- Audouy, S.A., et al., *Lactococcus lactis GEM particles displaying pneumococcal antigens induce local and systemic immune responses following intranasal immunization*. Vaccine, 2006. **24**(26): p. 5434-41.
- Bera, A., et al., *Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 2005. **55**(3): p. 778-87.
- Berkelman, T., P. Garret-Englele, and N.E. Hoffman, *The pacL gene of Synechococcus sp. strain PCC 7942 encodes a Ca(2+)-transporting ATPase*. J Bacteriol, 1994. **176**(14): p. 4430-6.
- Berntsson, R.P., et al., M.K. Doeven, F. Fusetti, R.H. Duurkens, D. Sengupta, S.J., Marrink, A.M. Thunnissen, B. Poolman, D.J. Slotboom. *The structural basis for peptide selection by the transport receptor OppA*. Embo J, 2009. **28**(9): p. 1332-40.
- Blank, L.M., et al., *Hemin reconstitutes proton extrusion in an H(+)-ATPase-negative mutant of Lactococcus lactis*. J Bacteriol, 2001. **183**(22): p. 6707-9.
- Bouvier, J., et al., *Characterization of OpuA, a glycine-betaine uptake system of Lactococcus lactis*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2000. **2**(2): p. 199-205.
- Brooijmans, R.J., et al., *Generation of a membrane potential by Lactococcus lactis through aerobic electron transport*. J Bacteriol, 2007. **189**(14): p. 5203-9.
- Clarke A. J., H. Strating, N. T. Blackburn, *Pathways for the O-Acetylation of Bacterial Cell Wall Polysaccharides*. Glycomicrobiology, 2000. p.187-223.
- Claverys, J.P., B. Martin, and L.S. Havarstein, *Competence-induced fratricide in streptococci*. Mol Microbiol, 2007. **64**(6): p. 1423-33.
- Daniel, R.A. and J. Errington, *Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell*. Cell, 2003. **113**(6): p. 767-76.
- Daugelavicius, R., E. Bakiene, J. Berzinskiene, D.H. Bamford., *Use of lipophilic anions for estimation of biomass and cell viability*. Biotechnol Bioeng, 2000. **71**(3): p. 208-16.
- Daugelavicius, R., E. Bakiene, J. Berzinskiene, D.H. Bamford., *Binding of lipophilic anions to microbial cells*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1997. **42**: p. 263-274.
- Doeven, M.K., J. Kok, and B. Poolman, *Specificity and selectivity determinants of peptide transport in Lactococcus lactis and other microorganisms*. Mol Microbiol, 2005. **57**(3): p. 640-9.
- During, K., et al., *The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes*. FEBS Lett, 1999. **449**(2-3): p. 93-100.
- Dziarski, R., *Cell-bound albumin is the 70-kDa peptidoglycan-, lipopolysaccharide-, and lipoteichoic acid-binding protein on lymphocytes and macrophages*. J Biol Chem, 1994. **269**(32): p. 20431-6.
- Fiolka, M.J., A.A. Ptaszynska, and W. Czarniawski, *Antibacterial and antifungal lysozyme-type activity in Cameraria ohridella pupae*. J Invertebr Pathol, 2005. **90**(1): p. 1-9.
- Fiolka, M.J. and A. Witkowski, *Lysozyme-like activity in eggs and in some tissues of land snails Helix aspersa maxima and Achatina achatina*. Folia Biol (Krakow), 2004. **52**(3-4): p. 233-7.
- Folgering, J.H., et al., *Lactococcus lactis uses MscL as its principal mechanosensitive channel*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 8784-92.

Foster, S.J. and K. Johnstone, *Pulling the trigger: the mechanism of bacterial spore germination*. Mol Microbiol, 1990. **4**(1): p. 137-41.

Gasson, M.J., *Plasmid complements of Streptococcus lactis NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing*. J Bacteriol, 1983. **154**(1): p. 1-9.

Hebert, L., et al., *Enterococcus faecalis constitutes an unusual bacterial model in lysozyme resistance*. Infect Immun, 2007. **75**(11): p. 5390-8.

Herbert, S., et al., *Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in staphylococci*. PLoS Pathog, 2007. **3**(7): p. e102.

Hindenburg, A., J. Spitznagel, and N. Arnheim, *Isozymes of lysozyme in leukocytes and egg white: evidence for the species-specific control of egg-white lysozyme synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(5): p. 1653-7.

Hols, P., et al., *Conversion of Lactococcus lactis from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(6): p. 588-92.

Ibrahim H. R., S. Higashiguchi, L. R. Juneja, M. Kim, T. Yamamoto, *A Structural Phase of Heat-Denatured Lysozyme with Novel Antimicrobial Action*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1996. **44**. p.1416-1423.

Ibrahim, H.R., T. Matsuzaki, and T. Aoki, *Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function*. FEBS Lett, 2001. **506**(1): p. 27-32.

Ibrahim, H.R., U. Thomas, and A. Pellegrini, *A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 43767-74.

Irwin, D.M. and A.C. Wilson, *Multiple cDNA sequences and the evolution of bovine stomach lysozyme*. J Biol Chem, 1989. **264**(19): p. 11387-93.

Jacobs, C., J.M. Frere, and S. Normark, *Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria*. Cell, 1997. **88**(6): p. 823-32.

Jolles, P. and J. Jolles, *What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday*. Mol Cell Biochem, 1984. **63**(2): p. 165-89.

Jolles, P., et al., *Stomach lysozymes of ruminants. II. Amino acid sequence of cow lysozyme 2 and immunological comparisons with other lysozymes*. J Biol Chem, 1984. **259**(18): p. 11617-25.

Jordan, S., M.I. Hutchings, and T. Mascher, *Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(1): p. 107-46.

Kraft, A.R., M.F. Templin, and J.V. Holtje, *Membrane-bound lytic endoglycosylase in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1998. **180**(13): p. 3441-7.

Kumagai, I., S. Takeda, and K. Miura, *Functional conversion of the homologous proteins alpha-lactalbumin and lysozyme by exon exchange*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 5887-91.

Kuroda, M., et al., *Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 2003. **49**(3): p. 807-21.

Lee-Huang, S., et al., *Structural and functional modeling of human lysozyme reveals a unique nonapeptide, HL9, with anti-HIV activity*. Biochemistry, 2005. **44**(12): p. 4648-55.

Li, M., et al., *Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(22): p. 9469-74.

Loessner, M.J., *Bacteriophage endolysins--current state of research and applications*. Curr Opin Microbiol, 2005. **8**(4): p. 480-7.

Martinez, B., et al., *Cell envelope stress induced by the bacteriocin Lcn972 is sensed by the Lactococcal two-component system CesSR*. Mol Microbiol, 2007. **64**(2): p. 473-86.

Morlot, C., et al., *Growth and division of Streptococcus pneumoniae: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle*. Mol Microbiol, 2003. **50**(3): p. 845-55.

Ng, W.L. and M.E. Winkler, *Singular structures and operon organizations of essential two-component systems in species of Streptococcus*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 10): p. 3096-8.

Nitta, K. and S. Sugai, *The evolution of lysozyme and alpha-lactalbumin*. Eur J Biochem, 1989. **182**(1): p. 111-8.

O'Connell-Motherway, M., et al., *Six putative two-component regulatory systems isolated from Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363*. Microbiology, 2000. **146** (Pt 4): p. 935-47.

Pedersen, M.B., et al., *Impact of aeration and heme-activated respiration on Lactococcus lactis gene expression: identification of a heme-responsive operon*. J Bacteriol, 2008. **190**(14): p. 4903-11.

Pellegrini, A., et al., *Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme*. J Appl Microbiol, 1997. **82**(3): p. 372-8.

Picon, A., et al., *Specificity mutants of the binding protein of the oligopeptide transport system of Lactococcus lactis*. J Bacteriol, 2000. **182**(6): p. 1600-8.

Poquet, I., et al., *HtrA is the unique surface housekeeping protease in Lactococcus lactis and is required for natural protein processing*. Mol Microbiol, 2000. **35**(5): p. 1042-51.

Prager, E.M., *The sequence-immunology correlation revisited: data for cetacean myoglobins and mammalian lysozymes*. J Mol Evol, 1993. **37**(4): p. 408-16.

Priyadarshini, R., D.L. Popham, and K.D. Young, *Daughter cell separation by penicillin-binding proteins and peptidoglycan amidases in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2006. **188**(15): p. 5345-55.

Rau, A., et al., *A new lysozyme fold. Crystal structure of the muramidase from Streptomyces coelicolor at 1.65 Å resolution*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31994-9.

Romeo, Y., J. Bouvier, and C. Gutierrez, *Osmotic regulation of transcription in Lactococcus lactis: ionic strength-dependent binding of the BusR repressor to the busA promoter*. FEBS Lett, 2007. **581**(18): p. 3387-90.

Smith, T.J., S.A. Blackman, and S.J. Foster, *Autolysins of Bacillus subtilis: multiple enzymes with multiple functions*. Microbiology, 2000. **146** (Pt 2): p. 249-62.

Steen, A., et al., *AcmA of Lactococcus lactis is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning*. Febs J, 2005. **272**(11): p. 2854-68.

Steidler, L. and P. Rottiers, *Therapeutic drug delivery by genetically modified Lactococcus lactis*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1072**: p. 176-86.

Sybesma, W., et al., *Increased production of folate by metabolic engineering of Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(6): p. 3069-76.

Ursinus, A. and J.V. Holtje, *Purification and properties of a membrane-bound lytic transglycosylase from Escherichia coli*. J Bacteriol, 1994. **176**(2): p. 338-43.

van Alen-Boerrigter, I.J., R. Baankreis, and W.M. de Vos, *Characterization and overexpression of the Lactococcus lactis pepN gene and localization of its product, aminopeptidase N*. Appl Environ Microbiol, 1991. **57**(9): p. 2555-61.

van der Heide, T. and B. Poolman, *Osmoregulated ABC-transport system of Lactococcus lactis senses water stress via changes in the physical state of the membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7102-6.

Veiga, P., et al., *SpxB regulates O-acetylation-dependent resistance of Lactococcus lactis peptidoglycan to hydrolysis*. J Biol Chem, 2007. **282**(27): p. 19342-54.

Veiga, P., et al., *Identification of an essential gene responsible for D-Asp incorporation in the Lactococcus lactis peptidoglycan crossbridge*. Mol Microbiol, 2006. **62**(6): p. 1713-24.

- Vollmer, W. and J.V. Holtje, *Morphogenesis of Escherichia coli*. Curr Opin Microbiol, 2001. **4**(6): p. 625-33.
- Vollmer, W., et al., *Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 259-86.
- Wang B. S., Z. X. Wang, S. R. Jia. *Creation of Transgenic Bananas Expressing Human Lysozyme Gene for Panama Wilt Resistance*. Journal of Integrative Plant Biology, 2005. **47**: p. 971-977.
- Wegmann, U., et al., *Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363*. J Bacteriol, 2007. **189**(8): p. 3256-70.
- Yin, S., R.S. Daum, and S. Boyle-Vavra, *VraSR two-component regulatory system and its role in induction of pbp2 and vraSR expression by cell wall antimicrobials in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(1): p. 336-43.
- Yoshimura, K., A. Toibana, and K. Nakahama, *Human lysozyme: sequencing of a cDNA, and expression and secretion by Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **150**(2): p. 794-801.
- Zhang, J. and I. Biswas, *A phenotypic microarray analysis of a Streptococcus mutans liaS mutant*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 1): p. 61-8.