

VILNIAUS UNIVERSITETAS

ARNOLDAS KAUNIETIS

NAUJŲ BAKTERIOCINŲ IŠ TERMOFILINIŲ BAKTERIJŲ IDENTIFIKAVIMAS,
HETEROLOGINĖ BIOSINTEZĖ BEI CHARAKTERIZAVIMAS

Daktaro disertacijos santrauka

Biomedicinos mokslai, biologija (01B)

Vilnius, 2018

Disertacija rengta 2013-2017 metais Vilniaus universitete (Lietuva). Dalis šio darbo tyrimų atlikti stažuotės laikotarpiu (nuo 01-11-2015 iki 01-05-2017) Groningeno universitete (Nyderlandai).

Doktoranto vadovai:

- Prof. dr. Donaldas J. Čitavičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B. Nuo 2013-10-01 iki 2016-01-31).
- Prof. dr. Lilija Kalėdienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B. Nuo 2016-02-01 iki 2017-09-30).

Disertacija ginama viešame disertacijos Gynimo tarybos posėdyje.

Pirmininkas:

- prof. dr. Algimantas Paulauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B).

Nariai:

- Dr. Daumantas Matulis (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P),
- Dr. Rolandas Meškys (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P),
- Dr. Milda Stuknytė (Milano universitetas, Italija, biomedicinos mokslai, biologija – 01B),
- Prof. dr. Rūta Navakauskienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

Disertacija bus ginama viešame disertacijos Gynimo tarybos posėdyje 2018 m. birželio mėn. 22 d. 10 val. Gyvybės mokslų centro R402 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, LT-10257, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2018 m. gegužės mėn. 21 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: [https:// www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](https://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

VILNIUS UNIVERSITY

ARNOLDAS KAUNIETIS

IDENTIFICATION, HETEROLOGOUS BIOSYNTHESIS AND CHARACTERIZATION
OF NOVEL BACTERIOCINS FROM THERMOPHILIC BACTERIA

Summary of doctoral dissertation

Biomedical sciences, biology (01B)

Vilnius, 2018

The dissertation was prepared during the period of 2013-2017 at Vilnius University (Lithuania). Part of this research work was carried out during the traineeship (from 01-11-2015 till 01-05-2017) at the University of Groningen (the Netherlands).

Doctoral advisors:

- Prof. Dr. Donaldas J. Čitavičius (Vilnius University, biomedical sciences, biology – 01B. From 01-10-2013 till 31-01-2016).
- Prof. Dr. Lilija Kalėdienė (Vilnius University, biomedical sciences, biology – 01B. From 01-02-2016 till 30-09-2017).

The dissertation is defended at the public Dissertation Defense Board meeting.

Chairman:

- Prof. Dr. Algimantas Paulauskas (Vytautas Magnus University, Biomedical sciences, Biology – 01B).

Members:

- Dr. Daumantas Matulis (Vilnius University, Physical sciences, Biochemistry – 04P).
- Dr. Rolandas Meškys (Vilnius University, Physical sciences, Biochemistry – 04P).
- Dr. Milda Stuknytė (University of Milan, Italy, Biomedical sciences, Biology – 01B).
- Prof. Dr. Rūta Navakauskienė (Vilnius University, Physical sciences, Biochemistry – 04P).

The dissertation will be defended at the public Dissertation Defense Board meeting at 10 a.m. on the 22nd of June in the R402 auditorium at the Life Sciences Center, Vilnius University (Saulėtekio ave. 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania).

The summary of doctoral dissertation was sent on 21st of May, 2018.

The thesis is available at the Library of Vilnius University and at website of Vilnius University: <https://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

Turinys

1	Santrumpų sąrašas	7
2	Įvadas	8
3	Metodai	13
3.1	Bakterijų kultūrų kultivavimo sąlygos	13
3.2	8 ir 15 bakterijų kamienų antibakterinio poveikio spektro nustatymas	13
3.3	Genominės DNR sekoskaita ir bioinformatinė analizė	13
3.4	Antibakterinio aktyvumo matavimas	14
3.5	Palidocino genų klasterio klonavimas, ekspresija ir bakteriocino gryninimas	14
3.6	Glikocinų prekursorių bei <i>palS</i> , <i>palT</i> ir <i>palST</i> genų klonavimas į ekspresijos vektorius	15
3.7	Glikocinų pirmtakų ekspresija kartu su <i>palS</i> , <i>palT</i> ir <i>palST</i> genais	16
3.8	Baltymų gryninimas amonio sulfatu	17
3.9	Bakteriocinų, produkuojamų 15 bakterijų kamieno, gryninimas chromatografiniais metodais	17
3.10	Baltymų elektroforetinė analizė skirstant baltymus pagal molekulinę masę	18
3.11	Bakteriocinų, produkuojamų 15 bakterijų kamieno, dvikryptė elektroforetinė analizė	18
3.12	Geno <i>geo26</i> , koduojančio geobaciliną 26, klonavimas ir heterologinė ekspresija	19
4	Rezultatai	20
4.1	8 ir 15 kamienų dalinis identifikavimas ir antibakterinio spektro nustatymas	20
4.2	Genominės DNR sekoskaita ir bioinformatinė analizė	21
4.3	Palidocino biosintezės genų klasterio klonavimas ir raiška	22
4.4	Palidocino charakterizavimas	23
4.5	PalS ir PalT baltymų funkcijų įvertinimas ir patvirtinimas	26
4.6	Disulfidinių tiltelių nustatymas pre-PalA-His-Glc ir PalA-His-Glc peptiduose	27
4.7	Palidocino aminorūgščių sekos palyginimas su kitais glikociniais	27
4.8	Kitų glikocinų sintezė panaudojant PalS ir PalT baltymus	28
4.9	<i>G. stearothermophilus</i> 15 produkuojamų bakteriocinų, gryninimas ir analizė	31
5	Rezultatų aptarimas	33
6	Išvados	34

7	Publikacijos ir konferencijos	35
8	Finansinė parama	36
9	CV	37

1 Santrumpų sąrašas

AMP – antimikrobiniai peptidai

MCS – multikloninis saitas

RBS – ribosomos prisijungimo vieta

ACN – acetonitrilas

TFA – trifluoracto rūgštis

DNR – deoksiribonukleorūgštis

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

OT – optinis tankis

IPTG - izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozidazė

GBE – grubus bakteriocino ekstraktas

NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė

RP-HPLC – atvirkštinių fazių aukšto slėgio skysčių chromatografija.

MS – masių spektrometrija

MS/MS – tandeminė masių spektrometrija

GS-MS – dujų chromatografija

2 Įvadas

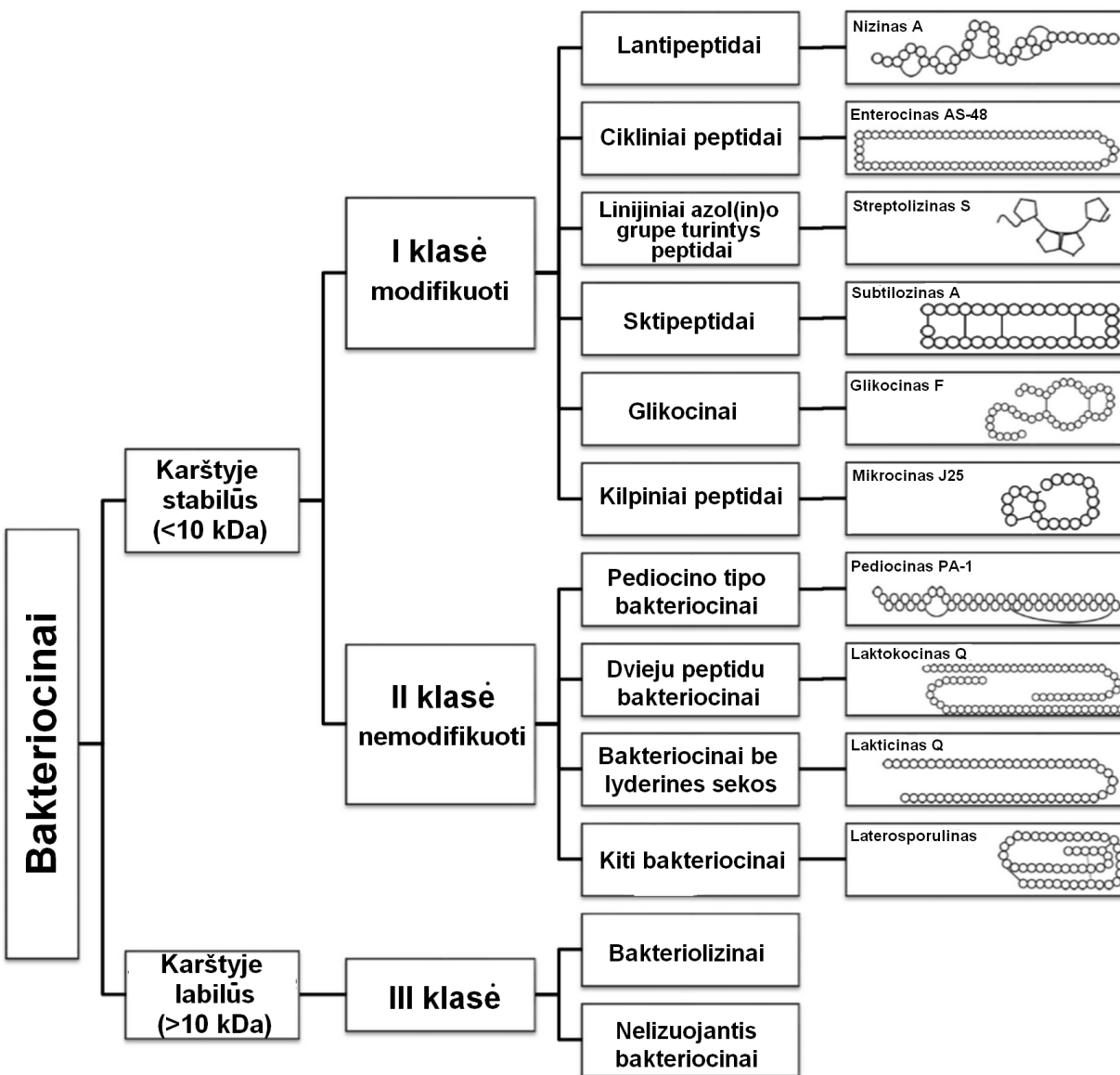
Gamtoje didelė įvairovė organizmų tokių kaip: augalai, gyvūnai, vabzdžiai, bakterijos ar grybai, produkuoja ir sekretuoja bioaktyvias medžiagas, kurios pasižymi antimikrobinėmis savybėmis. Vienos iš tokių medžiagų yra antimikrobiniai peptidai (AMP). Pastarieji sulaukė didelio dėmesio, dėl savo potencialaus panaudojimo įvairiose pramonės srityse, kaip galima alternatyva įprastiems antibiotikams. *Bakteriocinai* yra AMP, kurie yra sintezuojami ribosomų ir produkuojami bakterijose. Šie peptidai pasižymi didele įvairove savo molekulinės masės dydžių, struktūrų, veikimo mechanizmų, antibakterinių spektrų, producento imuniteto mechanizmų, savo paties produkuojamam bakteriocinui, bei taikinių-receptorių. Šiuo metu, didėjant antibiotikams atsparių bakterijų skaičiui, bakteriocinai tapo ypač patrauklūs tyrimų objektai. Bakteriocinai, kaip alternatyva antibiotikams, turi potencialo pritaikymui ne tik medicinoje ar veterinarijos srityje, bet taip pat ir maisto pramonėje, kontroliuojant maistą gadinančius ar patogeninius mikroorganizmus.

Pirmą kartą bakteriocinai mokslinėje literatūroje buvo paminėti tyrėjo A. Gratia 1925 m., kuomet buvo aprašytas antagonistinis augimo poveikis tarp skirtingų *Escherichia coli* bakterijų. Bakteriocinai buvo pavadinti „koliciniais“, kad atspindėtų juos produkuojantį organizmą. Priešingai nei gramneigiamų bakterijų, gramteigiamų bakterijų bakteriocinai dažniausiai yra mažos molekulinės masės peptidai (<10 kDa). Dauguma jų pirmiausiai susintetinami ribosomų kaip pirmtakai, o tik tada, po peptido transliacijos, yra modifikuojami, kad įgytų antibakterinį aktyvumą. Peptidų potransliacinės modifikacijos suteikia jiems specifinių cheminių savybių, kurių neturėjo prieš modifikavimą. Be to, potransliacinės modifikacijos pasitarnauja, kaip mechanizmas, kontroliuojantis ir aktyvuojantis peptido antibakterines savybes, ir tuo pačiu apsaugantis producentą nuo savo paties susintetinto bakteriocino. Šie antibakteriniai peptidai pasižymi antimikrobinio aktyvumu prieš kitas bakterijas, kurios priklauso tai pačiai rūšiai kaip ir producentas (siauro veikimo spektro) arba kurios yra filogenetiškai tolimos producentui (plataus veikimo spektro).

Šiuo metu naujausia bakteriocinų klasifikacija (**1 pav.**) yra sukurta Alvarez-Sieiro et al. (2016). Ji pritaikyta LAB bakteriocinams, tačiau tinkama ir kitų bakterijų bakteriocinams. Remiantis šia klasifikacine sistema bakteriocinai yra skirstomi į tris pagrindines klases, o pastarieji į poklasius:

- **I klasė – po transliacijos modifikuojami bakteriocinai.** Tai mažesni nei 10 kDa peptidai, kurie po transliacijos yra modifikuojami. Šie bakteriocinai struktūriškai susideda iš lyderinės sekos bei šerdinio peptido sekos. Lyderinė seka tarnauja kaip atpažinimo motyvas modifikaciją atliekantiems fermentams, transportui ar išlaiko peptidą neaktyvų.
- **II klasė – nemodifikuoti bakteriocinai.** Šiai grupei priskiriami mažesni nei 10 kDa peptidai, kurie neturi potransliacinių modifikacijų. Peptido subrendimui, kuomet įgyjama galutinė struktūrą bei peptidas tampa aktyviu, nėra reikalingi modifikacijos fermentai, išskyrus peptidazę, kuri nukerpa lyderinę seką, ir/arba bakteriocino transporterį, reikalingą peptido sekrecijai.
- **III klasė – dideli nemodifikuoti bakteriocinai.** Tai didelės molekulinės masės (>10 kDa) bakteriocinai, neturintys potransliacinių modifikacijų.

Bakteriocinai taip pat gali atlikti ir tarpląstelių signalinių molekulių funkciją. Yra iškelta prielaida, jog producentui esant natūralioje ekologinėje aplinkoje, pirminė bakteriocinų funkcija nėra žudyti kitas bakterijas. Manoma, kad natūralios bakteriocinų koncentracijos, juos produkuojančioms bakterijoms įprastose sąlygose, yra sąlyginai nedidelės. Tuo tarpu, literatūroje yra gausu pavyzdžių, parodančių, kaip bakteriocinai atlieka įvairias reguliacines funkcijas, įskaitant jų pačių sintezę. Žvelgiant iš evoliucinės perspektyvos, yra logiškiau, jog jie veikia kaip prevencinė priemonė ir slopina kitų bakterijų įsitvirtinimą, šioms formuojant bioplėveles bakteriocino producento ekologinėje nišoje. Tokiu atveju, labiau tikėtina, jog jų funkcija, esant mažoms bakteriocino koncentracijoms, yra signalo perdavimas bei kitų bakterijų augimo slopinimas, nei pastarųjų žudymas, esant didelėms bakteriocino koncentracijoms.



1 paveikslas. Bakteriocinų klasifikacija pagal Alvarez-Sieiro et al. (2016).

Šiuo metu bakteriocinų tyrimai yra labai aktualūs. Jie praplečia mūsų žinias ir supratimą apie šiuos junginius, atskleidžia jų įvairovę. Bakteriocinų tyrimai leidžia atrasti naujus, iki šiol nežinomus antibakterinius peptidus ar baltymus, padeda atskleisti jų veikimo mechanizmus, suprasti jų biosintezės mechanizmus, potransliacines modifikacijas bei kitas vertingas jų savybes. Naujos žinios gali pasitarnauti bakteriocinų pritaikymui maisto ar veterinarijos srityje bei medicinoje. Yra daugybė mikroorganizmų grupių, kurių produkuojami bakteriocinai iki šiol nebuvo daug ir detalai tyrinėjami, todėl jie galėtų būti

naujų bakteriocinų šaltinis. Nauji bakteriocinai galėtų turėti iki šiol nežinomas potransliacines modifikacijas, kurios suteikia peptidams vertingas savybes. Šios modifikacijos bei jas vykdančys fermentai galėtų pasitarnauti naujų bakteriocinų ar kitų bioaktyvių peptidų su vertingomis savybėmis sintezei.

Tyrimų tikslas

Naujų gramteigiamųjų termofilinių endosporas formuojančių bakterijų bakteriocinų paieška, biosintezė bei charakterizavimas.

Užduotys

- Identifikuoti naujus bakteriocinus, koduojamus termofilinių *Aeribacillus pallidus* 8 ir *G. stearothermophilus* 15 bakterijų kamienų genomuose, taikant bioinformatinės analizės metodus.
- Išgryninti bakteriocinus, sintetinus *G. stearothermophilus* 15 bakterijų kamieno, ir nustatyti jų aminorūgščių seką.
- Taikant heterologinę raišką susintetinti bei charakterizuoti naujus bakteriocinus.
- Įvertinti potransliacinių modifikacijų fermentų specifiškumą savo substratams ir jų pritaikymo galimybę naujų bakteriocinų heterologinei biosintezei *E. coli* ląstelėse.

Darbo aktualumas ir naujumas

Termofilinių bakterijų bakteriocinų tyrimai yra perspektyvi, tačiau menkai ištirta sritis. Daugumos žinomų termofilinių bakterijų bakteriocinų aprašymui trūksta išsamumo ir tik keletas iš jų aminorūgščių sekos yra nustatytos. Šiame darbe yra aprašomi du nauji bakteriocinai iš termofilinių endosporas formuojančių *Aeribacillus pallidus* 8 ir *Geobacillus stearothermophilus* 15 bakterijų kamienų. Naujas glikocinų poklasio bakteriocinas buvo identifikuotas 8 kamiene. Šis peptidas yra modifikuojamas po transliacijos, S-ryšiu prijungiant gliukozę prie Cys aminorūgšties liekanos. Tokio tipo glikozilinimas yra ypač retas bakterijų tarpe. Šiame darbe pirmą kartą yra aprašoma glikocinų heterologinė biosintezė. Be to, buvo nustatyta, jog glikocinų antibakteriniam aktyvumui pasireikšti nėra

būtinai lyderinės sekos pašalinimas, tačiau glikozilinimas priešingai – būtinai. Šiame darbe naujai aprašyto glikocino biosintezės sistema pirmą kartą sėkmingai panaudota kitų naujų glikocinų biosintezei. Šie rezultatai pagilina žinias apie naujus, nedidelio ir mažai tyrinėto glikocinų poklasio bakteriocinus.

Tuo tarpu iš 15 bakterijų kamieno buvo išskirtas ir išgrynintas naujas didelės molekulinės masės bakteriocinas, priklausantis III bakteriocinų klasei. Pastarieji, palyginus su kitų klasių atstovais, nebuvo daug ir išsamiai tyrinėti. Naujojo bakteriocino aminorūgščių seka nepasižymi reikšmingu panašumu į jokią kito žinomos funkcijos baltymo seką. Tolimesni naujojo bakteriocino tyrimai galėtų praplėsti ir pagilinti žinias apie III klasės bakteriocinus. Šio darbo rezultatai suteikia galimybę ir palengvina naujų didelės molekulinės masės bakteriocinų paiešką ateityje.

Ginamieji teiginiai

- Antibakterinių peptidų, produkuojamų termofilinių bakterijų, arba bakteriocinų sintezę koduojančių genų šiose bakterijose tyrimai padeda atrasti naujus bakteriocinus.
- Identifikuotas naujas po translacijos modifikuojamas bakteriocinas, priklausantis glikocinų poklasiui, pasižymintis stabilumu ir ypač maža minimalia slopinančia koncentracija. Tuo tarpu kitas naujas identifikuotas nemodifikuojamas didelės molekulinės masės bakteriocinas nepasižymi sekos panašumu į kitus žinomus bakteriocinus.
- Pirmą kartą pademonstruota glikocino biosintezė, panaudojant heterologinę jo biosintezės genų klasterio raišką kitame bakterijų kamiene.
- Glikocinų potransliaciniai modifikavimo fermentai gali būti panaudojami kitų naujų glikocinų heterologinei biosintezei.

3 Metodai

3.1 Bakterijų kultūrų kultivavimo sąlygos

Termofilinės bakterijos augintos maitinamojo buljono (MB) terpėje (1 % triptono, 0,5 % NaCl ir 0,5 % mėsos ekstrakto). Kultūros buvo saugomos suspendavus MB terpėje su gliceroliu (10 %) -70/80 °C temperatūroje. Termofilinių bakterijų kultūros pirmiausiai buvo atšviežinamos, jas užsėjant ant agarizuotos MB terpės (1,5 % agaru). Bakteriocinų grynimui ir išskyrimui 15 kamienas augintas MB terpėje papildant ją druskomis: KCl – 0.07 μmol/L and MgCl₂ – 1.1 μmol/L.

3.2 8 ir 15 bakterijų kamienų antibakterinio poveikio spektro nustatymas

8 ir 15 kamieno antagonistinis poveikis prieš kitas termofilines filogenetiškai artimas bakterijas tikrintas agarizuotos terpės užpylimo metodu. Antibakterines medžiagas produkuojantis kamienas užsėjamas ant agarizuotos MB terpės, Petri lėkštelės centre, ir inkubuojama 55 °C temperatūroje 16-18 val. Po to užpilama agarizuota MB terpė su inokuliuotu testuojamu kamieniu, kurio optinis tankis (OT (600nm)) agarizuotoje terpėje ~0,04. Terpei sustingus lėkštelė inkubuojama 55 °C temperatūroje 16-18 val. Po inkubacijos vertinama slopinimo zona aplink lėkštelės centre užsėtą tiriamąjį kamieną.

3.3 Genominės DNR sekoskaita ir bioinformatinė analizė

Genominės DNR, išskirtos iš 8 ir 15 bakterijų kamienų, buvo siųstos genomų sekoskaitai į “GATC Biotech” (Vokietija), naudojant Illumina HiSeq 2000 technologiją. Gautos sekos surinktos į kontigus, naudojantis Velvet programa, anuotos RAST serveryje bei įkeltos į NCBI duomenų bazę (identifikaciniai numeriai atitinkamai yra LVHY00000000 ir LVHZ00000000).

Bakteriocinų paieška tirtuose 8 ir 15 kamieno genomuose atlikta BAGEL3 serveryje. 8 ir 15 kamienai identifikuoti naudojantis Genomų atstumo skaičiuoklės programa “Genome-to-Genome Distance Calculator” (GGDC), kuri analizuoja genomus skaitmeninės DNR-DNR hibridizacijos “digital DNA-DNA hybridization” (dddH) metodu. 8 ir 15 kamienų genomai

lyginti su kitų termofilinių (*Para*)*Geobacillus* spp., ir *Caldibacillus* sp. bakterijų genomais, rastais NCBI duomenų bazėje.

3.4 Antibakterinio aktyvumo matavimas

Antibakteriniam aktyvumui nustatyti buvo naudojamas *Parageobacillus genomospecies* 1 NUB36187 (BGSC 9A11) bakterijų kamienas. Į ištirpintą (55° C) agarizuotą MB terpę užsėjamas jautrus kamienas, kultūros OT (600 nm) terpėje ~0,04. Agarizuota MB terpė su inokuliuotu jautriu kamieniu išpilstoma į Petri lėkšteles. Terpei sustingus, joje iškerpami šulinėliai (~1 cm skersmens). Nustatinėjant bakteriocino aktyvumą difuzijos šulinėliuose metodu, į šulinėlius įpilama po 50 µl mėginio, jį kiekvieną kartą 2 kartus skiedžiant MB terpe. Nustatinėjant bakteriocino aktyvumą lašelių metodu, ant agarizuotos terpės užnešama po 10 µL mėginio. Lėkštelės inkubuojamos termostate 60 °C temperatūroje 16-18 val. Po inkubacijos lėkštelėse vertinamos susidariusios slopinimo zonos. Bakteriocino aktyvumas vertinamas sutartiniais vienetais mililitre (SV/mL), kuris apskaičiuojamas formule $2^n \times 1 \text{ mL} / V$. V – mėginio tūris, n – didžiausio bakteriocino skiedimo vertė, kuomet dar matoma slopinimo zona aplink šulinėlį.

3.5 Palidocino genų klasterio klonavimas, ekspresija ir bakteriocino gryninimas

Genų klasteris *pal*, susidedantis iš genų *palA*, *palS*, *palT*, *paldbA* ir *paldbB* buvo pagausintas PGR būdu. Toliau, naudojant „USER Enzyme“ (NEB) klonavimo rinkinį įklonuotas į pBAD24 ekspresijos vektoriaus multikloninį saitą (MCS) už promotoriaus ir ribosomos prisijungimo vietos (RBS) vektoriuje. Gautas konstruktas pBAD24-*pal* perkeltas į *Escherichia coli* BL21(DE3) raiškos kamieną. Bakterijų kultūra auginta 1 l modifikuotoje M9 terpėje (Na₂HPO₄×7H₂O – 12.8 g/l, KH₂PO₄ – 3 g/l, NaCl – 0.5 g/l, NH₄Cl – 1 g/l, MgSO₄ – 0.24 g/l, CaCl₂ – 0.11 g/l ir 4 ml glicerolio) 37 °C temperatūroje, o *pal* genų klasterio ekspresija indukuota kultūrai pasiekus OT ~0,6. Praėjus 16 val. po indukcijos pradžios bakterijų kultūra buvo nucentrifuguota. Bakteriocino gryninimui supernatantas užnešamas ant „Amberlite XAD16N“ (Sigma-Aldrich) hidrofobinės poliaromatinės dervos, o peptidai eliuojami 100 % metanolio. Toliau, eliuoti peptidai su bakteriocinu gryninami

katijonų mainų chromatografijos metodu, naudojant NGC (Bio-Rad) skysčių chromatografijos sistemą su „HiTrap SP HP 5 ml“ (GE Healthcare Life Sciences) kolonėle. Mėginio užnešimui ant kolonėlės naudotas 50 mM pieno rūgšties buferis (pH 4,5), o peptidų eliucijai - 50 mM pieno rūgšties buferis su 300 mM NaCl (pH 4,5). Eliuoti peptidai gryninti atvirkštinės fazės chromatografijos metodu (RP-HPLC), panaudojant „Agilent 1260 Infinity LC“ skysčių chromatografijos sistemą su „Jupiter Proteo“, C-12, 250×10 mm bei 250×4.6 mm kolonėlėmis (Phenomenex). Peptidai eliuoti 0.01 % trifluoroacto rūgšties (TFA) buferyje keliant acetonitrilo (ACN) koncentraciją linijiniu gradientu nuo 5 iki 60 %. Eliucijos frakcijos analizuotos MALDI-TOF MS metodu bei tikrintas jų antibakterinis aktyvumas lašelių metodu. Frakcijos su išgrynintu palidocinu saugotos -80 °C temperatūroje.

3.6 Glikocinų prekursorių bei *palS*, *palT* ir *palST* genų klonavimas į ekspresijos vektorius

Genas *palA*, koduojantis palidocino prekursoriaus peptidą, buvo padaugintas PGR būdu ir, panaudojant restrikcijos endonukleazes bei T4 ligazę, įklonuotas į pRSFDuet-1 ekspresijos vektoriaus MCS. Taikiniui specifinės mutagenezės būdu, naudojant fosforilintus (5'-gale) pradmenis, konstruktas pRSFDuet-1-*palA* padaugintas PGR metodu ir į jį įterpta DNR seka, koduojanti His7 inkarą peptido C-gale. Panaudojant T4 ligazę, PGR produktas suliguotas, tuomet gautas naujas konstruktas pRSFDuet-1-*palA*-his, koduojantis palidocino pirmtaką su His7 inkaru peptido C-gale.

Sintetiniai genai, koduojantys glikocinų pirmtakus peptidus su His6 inkaru peptido C-gale: sublancinas 168 (*sunA-his*), glikocinas F (*gccF-his*), enterocinas F4-9 (*enfA4-9-his*), Hyp1 (*hyp1-his*) ir Hyp2 (*hyp2-his*), buvo užsakyti „GenScript“ įmonėje. Genai susintetinti pUC57 vektoriuje su optimizuotais kodonais *E. coli* bakterijai. Glikocinų genai perklonuoti į pRSFDuet-1 ekspresijos vektoriaus MCS, naudojant restrikcijos endonukleazes ir T4 ligazę. Gauti pRSFDuet-1 konstruktai koduojantys genus *sunA-his/gccF-his/enfA4-9-his/hyp1-his/hyp2-his*.

Taikiniui specifinės mutagenezės būdu, panaudojus fosforilintus (5'-gale) pradmenis, konstruktai pRSFDuet-1-*hyp1-his* ir pRSFDuet-1-*hyp2-his* padauginėti PGR metodu ir iš jų

pašalintos DNR sekos, koduojančios peptidų lyderines sekas. Panaudojant T4 ligazę PGR produktai suliguoti ir gauti nauji konstruktai pRSFDuet-1-core_hyp1-his ir pRSFDuet-1-core_hyp2-his, kurie koduoja Hyp1 ir Hyp2 numanomų glikocinų peptidus be lyderinių sekų (šerdiniai peptidai) ir su His6 inkaru peptidų C-galuose.

Genai *pals*, *palT* padauginți PGR būdu ir, panaudojant Quick-Fusion Cloning Kit (Bimake) klonavimo rinkinį, įklonuoti į pBAD24 ekspresijos vektoriaus MCS. Gauti pBAD24 konstruktai, koduojantys genus *pals/palT/palST*.

3.7 Glikocinų pirmtakų ekspresija kartu su *pals*, *palT* ir *palST* genais

E. coli BL21(DE3) ląstelės transformuotos pRSFDuet-1 ekspresijos vektoriumi, koduojančiu *palA-his/sunA-his/gccF-his/enfA4-9-his/hyp1-his/hyp2-his/core_hyp1-his/core_hyp2-his* genus, bei ekspresijos vektoriumi pBAD24, koduojančiu *pals/palT/palST* genus, buvo auginamos 100 ml LB terpėje 37 °C temperatūroje su aeracija. Kuomet ląstelių OD (600 nm) pasiekė ~0,6, genų ekspresija buvo indukuota arabinoze bei IPTG. Praėjus 4 val. po indukcijos pradžios, ląstelės nucentrifuguotos ir suspenduotos buferyje A (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 7.4). *core_hyp1-his* ir *core_hyp2-his* genai ekspresuoti tik su *pals*, o jų indukcija vykdyta 7 val. Ląstelių suspensija suardyta sonikatoriumi, tuomet mėginys vėl nucentrifuguotas. Atskyrus supernatantą (tirpi ląstelių frakcija), nuosėdos (netirpi ląstelių frakcija) buvo suspenduotos buferyje A su 6 M guanidino-HCl. Ištirpinus nuosėdas peptidai gryninti „NGC“ (Bio-Rad) skysčių chromatografijos sistema naudojant „HisTrap FF 1 ml“ (GE Healthcare Life Sciences) Ni²⁺ afininės chromatografijos kolonėlę. Baltymai eliuoti iš kolonėlės buferiu B (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 500 mM imidazolo, 4 M guanidino-HCl, pH 7,4). Toliau, mėginys grynintas atvirkštinės fazės chromatografijos metodu (RP-HPLC) su “Agilent 1260 Infinity LC” skysčių chromatografijos sistema, naudojant “Jupiter Proteo“, C-12, 250×10 mm (Phenomenex) kolonėlę. Peptidai iš kolonėlės eliuoti 0,01 % TFA buferiu, keliant ACN koncentraciją linijiniu gradientu nuo 5 % iki 60 %. Eliucijos frakcijos analizuotos MALDI-TOF MS metodu bei tikrintas jų antibakterinis aktyvumas lašelių metodu.

Genai *core_hyp1-his* ir *core_hyp2-his* ekspresuoti tik su *pals*, o jų indukcija vykdyta 7 val. Susintetintų peptidų gryninimas vyko tokiu pačiu principu, kaip ir kitų, prieš tai analizuotų peptidų, su papildomu RP-HPLC gryninimo etapu, naudojant „Jupiter Proteo“, C-12, 250×4.6 mm (Phenomenex) kolonėlę. Eliucijos frakcijos analizuotos MALDI-TOF MS metodu bei tikrintas jų antibakterinis aktyvumas lašelių metodu.

3.8 Baltymų gryninimas amonio sulfatu

15 kamieno naktinė kultūra, auginta MB terpėje 55 °C temperatūroje, 200 aps./min., inokuliuota į šviežią MB terpę santykiu 1:100. Toliau bakterijų kultūra auginta tomis pačiomis sąlygomis iki 7 val. Tuomet ląstelės nucentrifuguotos, o supernatante iki 80 % prisotinimo ištirpintas amonio sulfatas. Po 2-3 val. maišymo tirpalas nucentrifuguotas, supernatantas nupiltas, o nuosėdos suspenduotos buferyje A (25 mM tris-HCl, pH 8) ir dializuotos dializės maišelyje „SnakeSkin Dialysis Tubing, 3.5K MWCO” (Thermo Fisher Scientific) tame pačiame buferyje pagal gamintojo rekomendacijas. Po dializės gautas grubus bakteriocino ekstraktas (GBE) buvo saugomas -20 °C temperatūroje.

3.9 Bakteriocinų, produkuojamų 15 bakterijų kamieno, gryninimas chromatografiniais metodais

Po GBE išskyrimo, jame esantys bakteriocinai, gryninti jonų mainų chromatografija. GBE užneštas ant anijonų mainų chromatografijos kolonėlės UNO Q6, 12×53 mm, 6 ml (Bio-Rad). Baltymai iš kolonėlės eliuoti buferyje A (25 mM tris-HCl, pH 8) linijiniu gradientu keliant NaCl koncentraciją iki 1 M. Antibakterinis aktyvumas tikrintas eliuacijos frakcijose bei frakcijoje su neprikibusiais baltymais (mėginys pratekėjęs pro kolonėlę) lašelių metodu.

Eliucijos frakcijos, kuriose pastebėtas antibakterinis aktyvumas po gryninimo anijonų mainų chromatografija, dializuotos dializės maišelyje „SnakeSkin Dialysis Tubing, 3.5K MWCO” buferyje B (25 mM natrio-citratinis, pH 3.8). Dializuotas mėginys užneštas ant katijonų mainų chromatografijos kolonėlės UNO S6, 12×53 mm, 6 ml (Bio-Rad). Baltymai eliuoti buferyje B linijiniu gradientu keliant NaCl koncentraciją iki 0,5 M. Antibakterinis aktyvumas tikrintas eliuacijos frakcijose lašelių metodu.

Eliucijos frakcijos, kuriose identifikuotas antibakterinis aktyvumas po gryninimo katijonų mainų chromatografija, dializuotos dializės maišelyje „SnakeSkin Dialysis Tubing, 3.5K MWCO” buferyje C (15 mM MES pH 6.5 ir 2 M amonio sulfato). Dializuotas mėginys užneštas ant “Bio-Scale MT5“ kolonėlės, 10 x 64 mm (Bio-Rad), užpildytos „Macro-Prep, methacrylate-based (HIC)“ hidrofobinių sąveikų chromatografijos derva (Bio-Rad). Baltymai eliuoti buferyje C linijiniu gradientu mažinant amonio sulfato koncentraciją iki 0 M. Antibakterinis aktyvumas tikrintas eliucijos frakcijose lašelių metodu.

Po gryninimo anijonų mainų chromatografija frakcija, su neprikibusiais baltymais, dializuota dializės maišelyje „SnakeSkin Dialysis Tubing, 3.5K MWCO” buferyje D (25 mM MES pH 6.5). Dializuotas mėginys užneštas ant katijonų mainų chromatografijos kolonėlės UNO S6, 12×53 mm, 6 ml (Bio-Rad). Baltymai eliuoti buferyje D linijiniu gradientu keliant NaCl koncentraciją iki 0,5 M. Antibakterinis aktyvumas tikrintas eliucijos frakcijose lašelių metodu.

3.10 Baltymų elektroforetinė analizė skirstant baltymus pagal molekulinę masę

GBE ir eliucijos frakcijos po chromatografinio gryninimo buvo analizuojamos glicino/tricino-NDS-PAGE metodu. Po elektroforezės gelis 2-3 val plaunamas fiksavimo tirpale (25% izopropanolio, 10% acto rūgšties ir 50% H₂O), po to 1-2 val plaunamas H₂O ir perpjaunamas į dvi dalis. Viena dalis buvo dažoma „PageBlue Protein Staining Solution” (Thermo Fisher Scientific), kita gelio dalis užpilama agarizuota MB terpe su inokuliuotu jautriu kamieniu (galutinis kultūros OT (600 nm) ~0,4). Terpei sustingus, lėkštelė su užpiltu geliu inkubuojama termostate 55 °C temperatūroje per naktį. Po inkubacijos lėkštelėje vertinamos inhibicijos zonos. Lėkštelė su inhibicijos zonomis lyginama su dažytu geliu ir nustatoma bakteriocinų molekulinė masė.

3.11 Bakteriocinų, produkuojamų 15 bakterijų kamieno, dvikryptė elektroforetinė analizė

Bakteriocinai, po gryninimo chromatografijos metodais, analizuoti elektroforetine analize, išskirstant juos pagal izoelektrinį tašką. Prieš analizę mėginiuose esantys baltymai

sukoncentruoti išsodinant juos metanolio/chloroformu. Tuomet, baltymų nuosėdos ištirpintos mėginio užnešimo buferyje ir mėginys paskirstytas ant „ReadyStrip IPG Strips”, 24 cm, pH 3–10 (Bio-Rad) strypelių. Kitame strypelyje paskirstytas mėginys su baltymų standartais “IEF Standards” (Bio-Rad). Strypeliai analizuoti elektroforezės būdu pagal gamintojo rekomendacijas. Po elektroforetinės analizės strypelis su standartais dažytas “PageBlue Protein Staining Solution“ (Thermo Scientific). Vienas iš strypelių su mėginiu Petri lėkštelėje buvo užpiltas agarizuota MB terpe su inokuliuotu jautriu kamieniu (galutinis kultūros OT (600 nm) ~0,4). Terpei sustingus, lėkštelė su strypeliu inkubuota termostate 55 °C temperatūroje per naktį. Lėkštelėje su strypeliu, virš kurio atsirado inhibicijos zonos, lyginama su strypeliu, kuriame analizuoti baltymų standartai. Kitas strypelis, su mėginiu po izoelektrinio fokusavimo, toliau analizuotas baltymų elektroforezės būdu, baltymus paskirstant pagal molekulinę masę (NDS-PAGE). Po šios analizės gelis buvo dažytas “PageBlue Protein Staining Solution“. Baltymas, kuris atitinka bakteriocino molekulinę masę dažytame gelyje ir inhibicijos zoną lėkštelėje su strypeliu, buvo iškirptas iš gelio ir pateiktas masės spektrometrijos analizei MS/MS metodu.

3.12 Geno *geo26*, koduojančio geobaciliną 26, klonavimas ir heterologinė ekspresija

Genas *geo26* buvo padaugintas PGR būdu ir įklonuotas į pBAD24 ir pNZ8048 ekspresijos vektorių MCS, panaudojant restrikcijos endonukleazes ir T4 ligazę. Gauti konstruktai pBAD24-*geo26* ir pNZ8048-*geo26*, atitinkamai transformuoti į *E. coli* BL(DE3) ir *Lactococcus lactis* NZ9000 raiškos kamienus.

E. coli BL21(DE3) bakterijų kultūra, transformuota konstruktu pBAD24-*geo26*, buvo auginta LB terpėje 37 °C temperatūroje esant 200 aps./min. Po 16-21 val. auginimo kultūra buvo persėta (1:100) į šviežią 20 ml LB terpę ir auginta 37 °C temperatūroje esant 200 aps/min. Kuomet ląstelių OT pasiekė ~0,6, *geo26* geno ekspresija buvo indukuota arabinoze. Praėjus 4 val po indukcijos pradžios, 5 ml ląstelių kultūros buvo nucentrifuguota ir suspenduota 0,3 ml 50 mM tris-HCl pH 8 buferyje. Ląstelių suspensija sumaišyta su stikliniais rutuliukais (0.1 mm diametro) ir ląstelės mechaniškai suardytos pulsuojančiame

mikseryje. Gautas ląstelių lizatas nucentrifuguotas, tuomet patikrintas supernatanto antibakterinis aktyvumas difuzijos šulinėlių metodu.

Geno *geo26* ekspresija buvo vykdoma taip pat ir *Lactococcus lactis* bakterijose, taikant „NICE Expression System“ ekspresijos sistemą (MoBiTec GmbH) pagal gamintojo rekomendacijas. *L. lactis* ląstelės, transformuotos konstruktu pNZ8048-*geo26*, augintos MG-17 terpėje 30 °C temperatūroje be aeracijos. Po 16-21 val. kultūra persėta (1:100) į šviežią MG-17 terpę ir toliau auginta 30 °C temperatūroje be aeracijos. Kuomet bakterijų kultūra pasiekė OT ~0,6, geno *geo26* ekspresija indukuota nizinu. Praėjus 4 val. po indukcijos ląstelės surinktos ir suardytos tokiu pačiu principu kaip ir prieš tai *E. coli* ląstelės. Supernatante patikrintas antibakterinis aktyvumas difuzijos šulinėliuose metodu.

4 Rezultatai

4.1 8 ir 15 kamienų dalinis identifikavimas ir antibakterinio spektro nustatymas

Šiame darbe buvo naudoti termofiliniai 8 ir 15 bakterijų kamieniai iš Vilniaus universiteto, Gamtos mokslų centro, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros mikroorganizmų kolekcijos. Šių kamienų dalinė identifikacija buvo atlikta panaudojus 16S rDNR sekoskaitą. Remiantis 16S rDNR seka nustatyta, kad 8 kamienas priklauso *Aeribacillus* genties bakterijoms, tuo tarpu 15 kamienas – *Geobacillus* genčiai. Naudojant agarizuotos terpės užpylimo metodą, buvo parodyta, jog 8 kamienas pasižymi plačiu, o 15 kamienas siauru antibakterinio veikimo spektru prieš termofilines bakterijas, priklausančias (*Para*)*Geobacillus* ir *Anoxybacillus* gentims (**1 lentelė**).

1 lentelė. 8 ir 15 bakterijų kamieno antibakterinis poveikis prieš *Parageobacillus* spp. *Geobacillus* spp. *Anoxybacillus* sp. ir *Aeribacillus* sp. bakterijų kamienus. Antibakterinis aktyvumas yra (+); antibakterinio aktyvumo nėra (-); mažas antibakterinis aktyvumas (\pm). 8 ir 15 bakterijų kamienų antibakterinis aktyvumas nustatytas naudojant agarizuotos terpės užpylimo metodą.

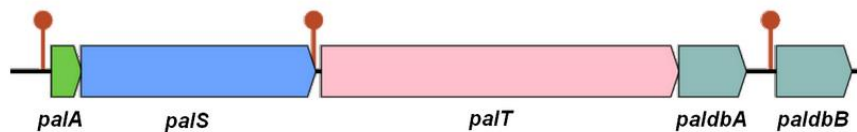
Antibakterinio aktyvumo identifikavimui naudoti kamieniai	Antibakteriniu aktyvumu pasižymintys kamieniai	
	Kamienas 8	Kamienas 15
<i>P. toebi</i> DSM 14590 ^T	+	-
<i>P. thermoglucosidans</i> DSM 2542 ^T	+	-
<i>P. genomospecies</i> 1 NUB36187 (BGSC 9A11)	+	+
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T	+	-
<i>G. thermocatenulatus</i> DSM 15378	+	-
<i>G. thermoleovorans</i> DSM 5366 ^T	+	\pm
<i>G. lituanicus</i> DSM 15325 ^T	+	-
<i>G. stearothermophilus</i> DSM 22 ^T	+	\pm
<i>G. jurassicus</i> DSM 15726 ^T	+	+
<i>G. subterraneus</i> DSM 13552 ^T	+	+
<i>G. thermoleovorans</i> HTA426	+	-
<i>A. tepidamans</i> DSM 16325 ^T	+	\pm
<i>A. pallidus</i> DSM 3670 ^T	-	-
Kamienas 15	+	-
Kamienas 8	+	-

4.2 Genominės DNR sekoskaita ir bioinformatinė analizė

Šiame darbe 8 ir 15 bakterijų kamienų genominės DNR buvo išskirtos ir pateiktos sekoskaitai, panaudojant Illumina HiSeq 2000 sistemą. 8 ir 15 kamienų genomų sekos (LVHY000000000 ir LVHZ000000000, atitinkamai) analizuotos Genomų atstumo skaičiuokle – „Genome-to-Genome Distance Calculator“ (GGDC), panaudojant skaitmeninės DNR-DNR hibridizacijos metodiką – „digital DNA-DNA hybridization“ (dDDH). Remiantis šia analize 8 kamienas buvo identifikuotas kaip *Aeribacillus pallidus* rūšis, o 15 – *Geobacillus stearothermophilus* rūšis.

Siekiant rasti šiuose bakterijų genomuose genus, koduojančius bakteriocinus bei jų biosintezėje dalyvaujančius fermentus, genomų sekos analizuotos BAGEL4 serveryje. Remiantis šia analize 15 kamieno genome nebuvo aptikta jokių žinomų bakteriocinų bei jų biosintezę koduojančių genų. Tuo tarpu 8 kamiene buvo aptikta keletas genų klasterių, kurie koduoja baltymus, numanomai atsakingus už bakteriocinų biosintezę.

Vienas iš genų klasterių (**2 pav.**), identifikuotų 8 kamiene, kodavo baltymus, kurie turėjo 38-53 % sekų panašumą į sublancino 168 biosintezėje dalyvaujančių baltymų sekas. Sublancinas 168 yra po translacijos modifikuojamas bakteriocinas, priklausantis glikocinų poklasiui.

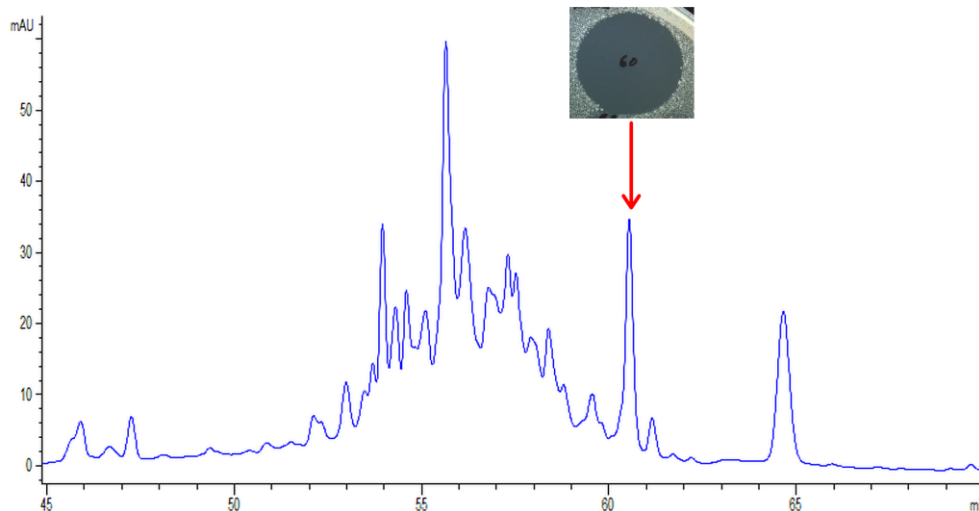


2 paveikslas. Genų klasteris *pal*, atsakingas už palidocino biosintezę. Genų klasterio ilgis 4805 bp.

Naują glikociną, kurį pavadiname palidocinu, koduojantis genų klasteris *pal*, susideda iš 5 genų. Pastarieji koduoja: 61 aminorūgšties grandinės ilgio bakteriocino pirmtako peptidą PalA; glikoziltransferazę PalS; bakteriocino lyderio peptidazę/transporterį PalT; bei disulfidinių tiltelių susidaryme dalyvaujančių baltymų porą PaldbA ir PaldbB. Šis genų klasteris ir jo koduojami baltymai buvo pasirinkti tolimesniems darbams.

4.3 Palidocino biosintezės genų klasterio klonavimas ir raiška

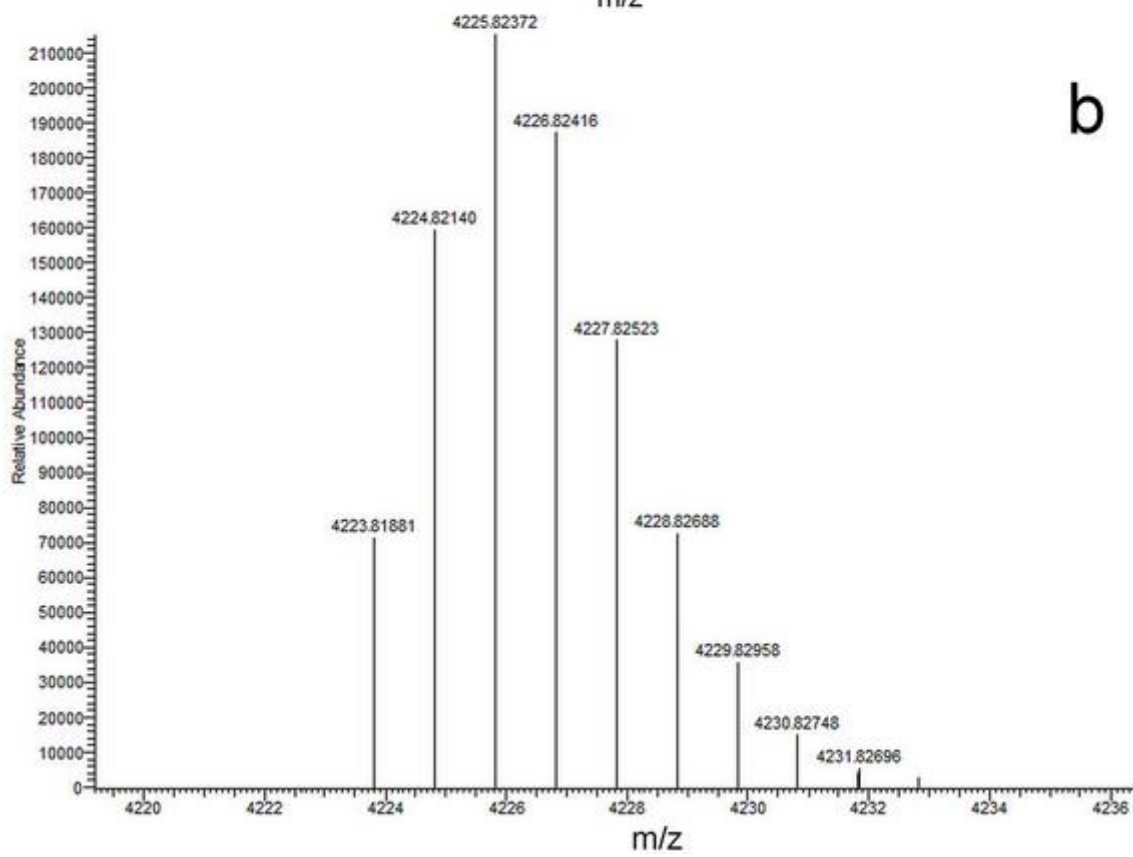
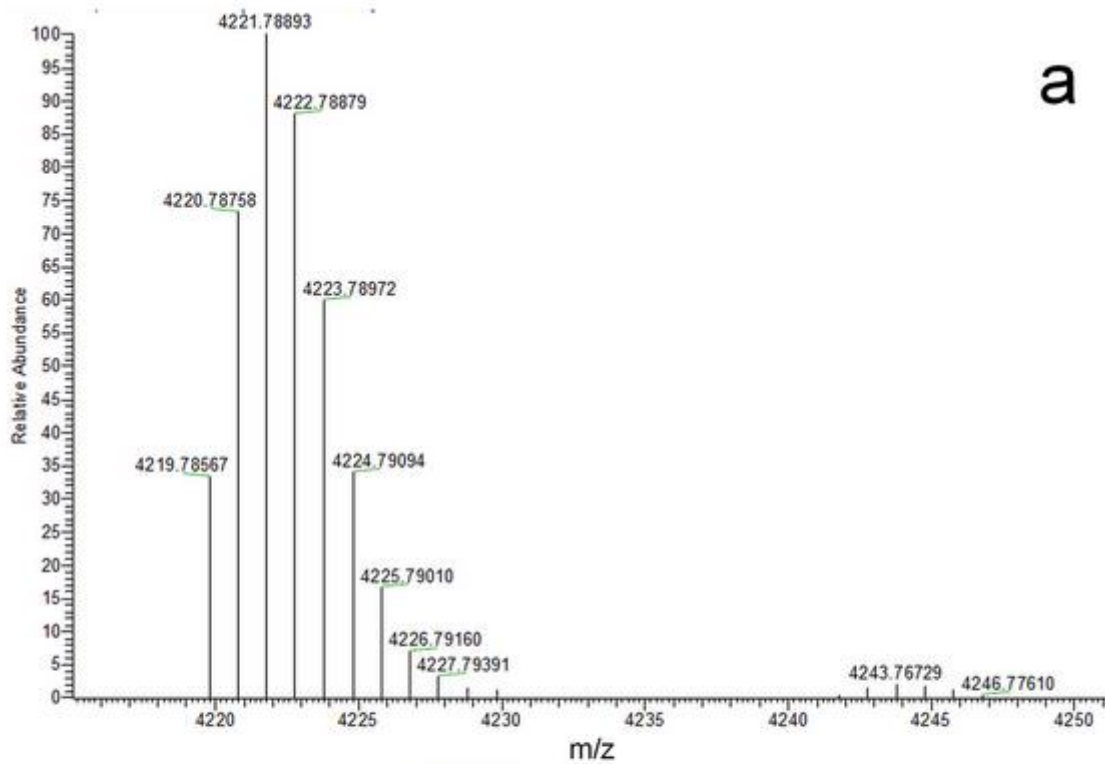
Genų klasteris *pal*, koduojantis visa palidocino biosintezės sistemą, buvo padaugintas PGR metodu ir įklonuotas į pBAD24 raiškos vektorių. Palidocino biosintezės sistemos ekspresija buvo vykdoma *E. coli* BL21(DE3) raiškos kamiene, indukuojant arabinoze. Susintetintas antibakterinis peptidas palidocinas buvo išgrynintas iš terpės supernatanto, naudojant hidrofobinių sąveikų, katijonų mainų bei atvirkštinės fazės chromatografijos metodus (RP-HPLC). Išgrynintas bakteriocinas pasižymėjo antibakteriniu aktyvumu (**3 pav.**)



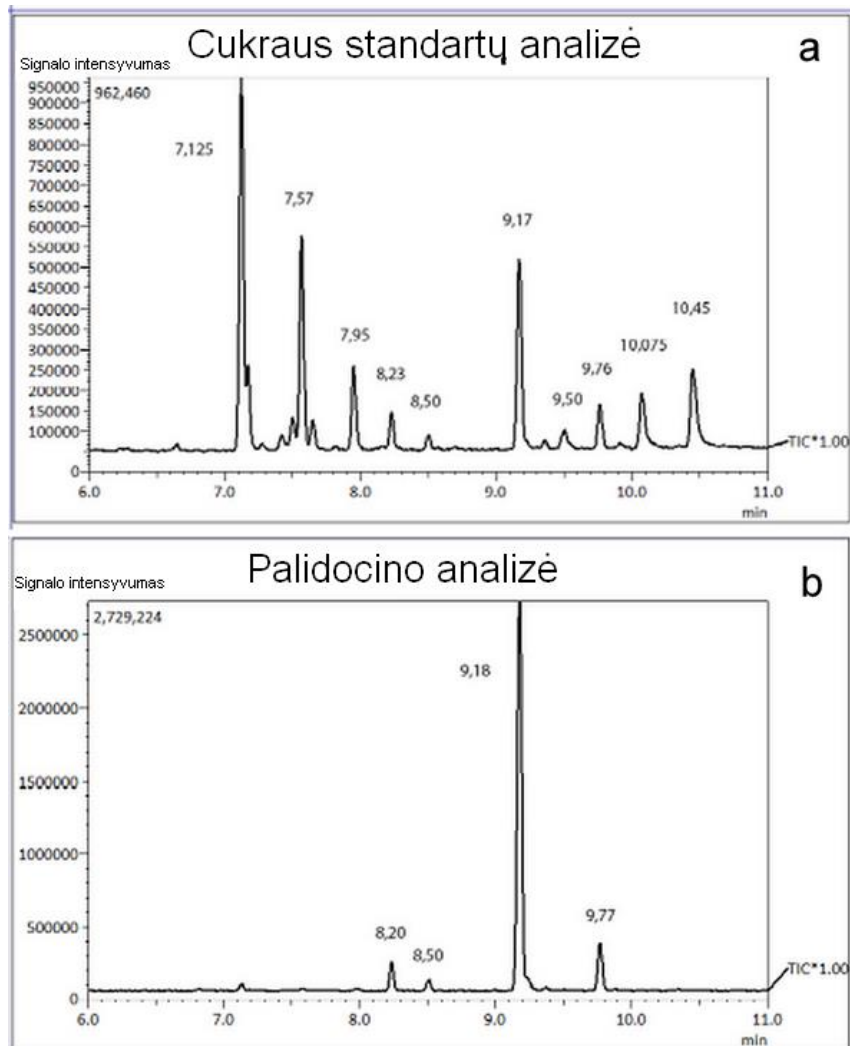
3 paveikslas. Bakteriocino gryninimo chromatograma RP-HPLC metodu. Chromatogramoje pažymėtas peptido eliacijos pikas, pasižymintis antibakteriniu aktyvumu prieš *P. genomospecies* 1 NUB36187 (BGSC 9A11).

4.4 Palidocino charakterizavimas

Išgrynintas palidocinas toliau buvo analizuojamas masių spektrometrijos (MS) metodais. MS analizė padėjo nustatyti tikslią palidocino molekulinę masę bei potransliacines modifikacijas. Teorinė palidocino masė (monoizotopinė), apskaičiuota pagal peptido aminorūgščių seką, yra 4061,76 Da. Analizė naudojant LC-ESI-MS metodą parodė, jog išgryninto natyvaus peptido molekulinė masė (monoizotopinė) yra 4219,79 Da (**4a pav.**). Tuo tarpu palidocino, kuris paveiktas TCEP, siekiant redukuoti disulfidinius tiltelius, molekulinė masė (monoizotopinė) – 4223,82 Da (**4b pav.**). Remiantis šiais masių skirtumais, galima teigti, jog palidocinas turi du disulfidinius tiltelius -4 Da, bei +162 Da. Detalesnė peptido analizė naudojant LC-ESI-MS/MS metodą parodė, kad Cys25 (šerdinis peptidas) turi +162 Da potransliacinę modifikaciją. Pastaroji, vertinant molekulinę masę, teoriškai atitinka heksozės liekaną, prijungtą S-ryšiu prie Cys25 aminorūgšties liekanos. Siekiant nustatyti, ar Cys25 yra glikozilintas ir identifikuoti heksozės molekulę, palidocinas buvo analizuotas dujų chromatografijos metodu (GC-MS). Ši analizė parodė, kad peptido sudėtyje yra gliukozės (**5 pav.**), kuri ir buvo prijungta S-ryšiu prie Cys25 aminorūgšties liekanos. Remiantis šiais duomenimis bei PSIPRED programos skaičiavimais schemeje yra pateikta teorinė palidocino struktūra (**7 pav.**).



4 paveikslas. Išgryninto palidocino analizė LC-ESI-MS metodu. Natyvaus peptido analizė (a) ir peptido, paveikto TCEP, analizė (b).



5 paveikslas. Palidocino analizė dujų chromatografijos (GC-MS) metodu. Cukraus standartų analizė fiskuojant jų eliuacijos nuo kolonėlės laiką (a): manozė – 7.125 min, α ir β galaktozė – 7.57 min ir 7.95 min, α ir β gliukozė – 8.23 min ir 8.5 min, manitolis (į mėginį įeinantis standartas) – 9.17 min, mono-O-acetilintas manitolis (į mėginį įeinantis standartas) – 9.76 min, α ir β N-acetil galaktozaminas – 9.5 min ir 10.075 min, N-acetil gliukozaminas – 10.45 min. Palidocino analizė (b).

Palidocino stabilumas buvo tirtas matuojant jo antibakterinio aktyvumo pokyčius po inkubacijos skirtingose temperatūrose arba buferiuose, esant skirtingoms pH reikšmėms. Šis tyrimas atskleidė, jog peptidas išlieka stabilus 10 dienų kambario temperatūroje, tačiau po 30 dienų jo antibakterinio aktyvumo lieka tik 12 %, lyginant su pradiniu aktyvumu prieš inkubaciją. Po 3 val. inkubacijos 90 °C temperatūroje jo aktyvumas nesumažėja, tuo tarpu po autoklavavimo 121 °C temperatūroje 15 min., lieka 50 % pradinio aktyvumo. Inkubacija

buferiuose, esant pH reikšmėms nuo 2-10, nesumažina palidocino aktyvumo. Šie rezultatai rodo, kad palidocinas yra stabilus aukštose temperatūros ir plačiame pH spektre.

Palidocino aktyvumas buvo tikrintas prieš įvairias termofilines bakterijas. Parodyta, kad jis yra aktyvus prieš kai kurias termofilines (*Para*)*Geobacillus*, *Caldibacillus* bei mezofilines *Bacillus* genties bakterijas. Jis pasižymi ypač maža minimalia slopinančia koncentracija prieš *P. genomospecies* 1 NUB36187 kamieną, kuri yra 2 pM.

4.5 PalS ir PalT baltymų funkcijų įvertinimas ir patvirtinimas

Siekiant patvirtinti numanomas glikoziltransferazės PalS ir bakteriocino lyderio peptidazės/transporterio PalT funkcijas, šiuos baltymus koduojantys genai buvo ekspresuoti kartu su *pala*, koduojančiu pirmtako peptidą PalA (**3 lentelė**). Norint palengvinti bakteriocino gryninimą po genų koekspresijos, palidocino pirmtako genas *pala* buvo modifikuotas, prijungiant DNR seką, koduojančią His7 inkarą peptido C-gale. Šio geno (*pala-his*) ekspresija buvo vykdoma kartu su *pals/palT/palST* genais *E. coli* BL21 (DE3) raiškos kamienoje.

Didžiausia susintetinto peptido koncentracija buvo aptikta netirpioje *E. coli* ląstelių lizato frakcijoje. Naudojant Ni²⁺ afininę (IMAC) bei atvirkštinės fazės (RP-HPLC) chromatografiją susintetinti peptidai išgryninti iš netirpios ląstelių lizato frakcijos. Tuomet analizuoti MALDI-TOF MS metodu bei patikrintas jų antibakterinis aktyvumas lašelių metodu. Ši analizė atskleidė, kad ekspresuojant *pala-his* kartu su *pals*, susintetinto peptido masė padidėja +162 Da. Tai patvirtina, jog PalS, modifikuoja palidocino pirmtaką pre-PalA-His ir gaunamas glikozilintas palidocino pirmtakas pre-PalA-His-Glc. Šis peptidas pasižymi antibakteriniu aktyvumu, priešingai nei nmodifikuotas pre-PalA-His peptidas, gautas ekspresuojant vien tik *pala-his* geną. Ekspresuojant *palT* kartu su *pala-his*, susintetinto peptido masė atitiko šerdinio palidocino peptido masę be lyderinės sekos. Tai patvirtina, kad PalT nukerpa pre-PalA-His lyderinę seką. Susintetintas šerdinis peptidas nepasižymėjo antibakteriniu aktyvumu. Ekspresuojant *palST* genus kartu su *pala-his*, susintetinto peptido masė atitiko glikozilinto be lyderinės sekos (subrendusio) peptido PalA-His-Glc masę. Šis peptidas pasižymėjo antibakteriniu aktyvumu. Tai patvirtina, jog pilnai

palidocino biosintezei pakanka glikocino pirmtako PalA, glikoziltransferazės PalS bei bakteriocino lyderio peptidazės/transporterio PalT.

4.6 Disulfidinių tiltelių nustatymas pre-PalA-His-Glc ir PalA-His-Glc peptiduose

Susintetinti ir išgryninti peptidai pre-PalA-His-Glc bei PalA-His-Glc toliau analizuoti siekiant nustatyti, ar juose susiformavo disulfidiniai tilteliai ir ar jie yra svarbūs palidocino antibakteriniam aktyvumui (2 lentelė). Šiuo tikslu, peptidai buvo paveikti disulfidinius tiltelius redukuojančiu reagentu TCEP ir/arba laisvas Cys aminorūgščių liekanas blokuojančiu reagentu IAA. Po reakcijų peptidai buvo vėl gryninami RP-HPLC, analizuojami MALDI-TOF MS metodu ir tikrinamas peptidų antibakterinis aktyvumas lašelių metodu. MS analizė parodė, jog pre-PalA-His-Glc ir PalA-His-Glc peptidai turi po du disulfidiniai tiltelius. Peptidų aktyvumo nustatymas lašelių metodu parodė, kad po disulfidinių tiltelių suardymo peptidai praranda savo antibakterinį aktyvumą.

2 lentelė. Peptidų pre-PalA-His, pre-PalA-His-Glc ir PalA-His-Glc antibakterinis aktyvumas po disulfidinių tiltelių suardymo. Disulfidiniai tilteliai suardyti TCEP, o tuomet susidarę laisvi Cys blokuojami ir alkilinami IAA. Nesant disulfidinių tiltelių ir paveikus peptidus IAA, laisvi Cys taip pat alkilinami. Blokuotų Cys masė padidėja 54 Da. Peptidų masė analizuojama MALDI-TOF MS metodu. Antibakterinis aktyvumas analizuojamas lašelių metodu. + rodo jog yra antibakterinis aktyvumas arba Cys buvo alkilinti, - rodo jog antibakterinio aktyvumo nėra arba Cys nebuvo alkilinti.

	pre-PalA-His		pre-PalA-His-Glc		PalA-His-Glc (subrendęs)	
	Aktyvumas	Cys alkilinimas	Aktyvumas	Cys alkilinimas	Aktyvumas	Cys alkilinimas
Natyvus (nepaveiktas TCEP ir/ar IAA) peptidas	-	-	+	-	+	-
Peptidas paveiktas IAA	-	-	+	-	+	-
Peptidas paveiktas TCEP ir IAA	-	+	-	+	-	+

4.7 Palidocino aminorūgščių sekos palyginimas su kitais glikociniais

Palidocino aminorūgščių seka buvo palyginta su visais iki šiol žinomais ir aprašytais glikociniais: sublancinu 168 (SunA), produkuojamu *B. subtilis*; glikocinu F (GccF), produkuojamu *Lactobacillus plantarum*; turandacinu (ThrA), koduojamu *B. thuringiensis*; bei enterocinu F4-9 (EnfA4-9), produkuojamu *Enterococcus faecalis* bakterijose. Didžiausia

PalA aminorūgščių sekos homologija rasta lyginant su SunA peptidu, taip pat tam tikri panašūs sekų motyvai buvo rasti ir ThuA peptide. Palidocino sekos analizė BLAST duomenų bazėje atskleidė, jog pastarasis bakteriocinas savo aminorūgščių seka pasižymi nedidele homologija ir į numanomas naujus glikocinų pirmtakų peptidus – Hyp1 ir Hyp2, kurie buvo rasti *Bacillus* genties bakterijų genome. Glikocinų pirmtakams: PalA, Hyp1, Hyp2, SunA ir ThuA, būdingos kelios konservatyvios aminorūgščių sekos. Tuo tarpu PalA, GccF ir EnfA4-9 reikšmingais sekų panašumais nepasižymėjo. Visų žinomų ir naujų numanomų glikocinų aminorūgščių sekų palyginimas pateiktas **6 paveiksle**.

PalA	MKDLLKELMYEVDLEEMENLQ-----GSGYSAAQCA--WMALSCVNYIPGV---GF-GCGG-YS-A-CE-LYKRYC-----	61
Hyp1	MNKNISKLMEFVSVEEMQLQ-----GKGLSKTQCA--WMAASCVNYLPGVP--GGF-GCGG-YE-M-CK-EYKQYCN-----	64
SunA	M----EKLFKEVKLEELLENQK-----GSGLGKAAQCAALWLQ--CAS-----GGTI-GCGG-GAVA-CQ-NYRQFCR-----	56
ThuA	M----KELIKELNLEELTFEGGYDGVNYMHQHDGGGAGGSGSIGTAQCA--YFKALC--YSGGSEWLGGYGGCGS-TQNN-CE-LARKYC-----	80
Hyp2	M----DNLLREISEEDLELYD-----GSGGFSSAQCA--YFIANC--ISGVGERR--GCGS-QQVD-CM-LARQ-CRQDQSPFYGGSRPA-	71
GccF	M----SKLVKTLTISEISKAQNN-----GKKP--AWC--WYT-----LAMCGAGYDSGTCDDYMYSH-CFGIKHHSSGSSSYHC	64
EnfA49	M---GNSILNKMTEVEEMAVK-----GGNL--VCPFM-----PDYIKRLSTGKGVSSVYMAWQIANCKS--SGSCMKGQTNRTC-----	67

6 paveikslas. Glikocinų pirmtakų peptidų palyginimas. Konservatyvūs aminorūgščių regionai pažymėti žalia spalva. Glikozilinos arba numanomai glikozilinos aminorūgštys pažymėtos mėlynai. Disulfidinius tiltelius formuojantys arba numanomai formuojantys Cys pažymėti oranžine spalva. Liderinės sekos kirpimo saitai arba numanomas kirpimo saitai pažymėtas raudonai.

4.8 Kitų glikocinų sintezė panaudojant PalS ir PalT baltymus

Siekiant nustatyti PalS ir PalT specifiškumą substratui (pirmtakui peptidui) bei jų pritaikymo galimybes kitų arba naujų glikocinų biosintezėje, *palS* ir *palT* buvo ekspresuoti kartu su glikocinų pirmtakais: Hyp1, Hyp2, SunA, GccF ir EnfA4-9 koduojančiais genais. Šiam tikslui naudoti sintetiniai pirmtakų genai su optimizuotomis kodonų sekomis ekspresijai *E. coli* ląstelėse. Kaip ir palidocino atveju glikocinus koduojantys genai buvo modifikuoti, prijungiant DNR seką, koduojančią His6 inkarą peptidų C-gale. Šių genų (*hyp1-his/hyp2-his/sunA-his/gccF-his/enfA4-9-his*) ekspresija buvo vykdoma kartu su *palS/palT/palST* genais *E. coli* BL21(DE3) raiškos kamieno. Didžiausia susintetinto peptido koncentracija buvo aptikta netirpioje *E. coli* ląstelių lizato frakcijoje. Naudojant Ni²⁺ afininę (IMAC) bei atvirkštinės fazės (RP-HPLC) chromatografiją susintetinti peptidai išgryninti iš netirpios ląstelių lizato frakcijos. Tuomet jie analizuoti MALDI-TOF MS metodu bei lašelių metodu patikrintas jų antibakterinis aktyvumas (**3 lentelė**).

2 lentelė. Glikocinų pirmtakų genų ekspresija kartu su genais *palS* ir *palT*. Glc – peptido modifikacija (+162 Da – glikozilinimas); (+) peptidas turi antibakterinį aktyvumą; NA – nėra antibakterinio aktyvumo; NM – nėra peptido modifikacijų; NLK – peptido lyderinė seka nėra nukirpta.

Ekspresuoti genai su prekursoriais	<i>palA-his</i>	<i>sunA-his</i>	<i>hyp1-his</i>	<i>hyp2-his</i>	<i>enfA4-9-his</i>	<i>gccF-his</i>
Ekspresuotas tik prekursorius	NA, NM, NLK	NA, NM, NLK	NA, NM, NLK	NA, NM, NLK	NA, NM, NLK	NA, NM, NLK
<i>palS</i>	+, Glc, NLK	+, Glc, NLK	+, Glc, NLK	NA, Glc, NLK	NA, NM, NLK	NA, NM, NLK
<i>palT</i>	NA, NM, lyderis nukirptas	NA, NM, NLK	NA, NM, NLK	NA, NM, NLK	NA, NM, NLK	NA, NM, NLK
<i>palST</i>	+, Glc, lyderis nukirptas	+, Glc, NLK	+, Glc, NLK	NA, Glc, NLK	NA, NM, NLK	NA, NM, NLK

Išgrynintų peptidų MS analizė parodė, jog nei vieno peptido masė nesumažėjo – lyderinė seka nebuvo nukirpta, tačiau Hyp1, Hyp2 bei SunA peptidų masės pakito maždaug +162 Da. Tai rodo, jog šie peptidai buvo glikozilinti. Įvertinus naujai susintetintų glikozilintų pirmtakų peptidų: pre-Hyp1-His-Glc, pre-Hyp2-His-Glc ir pre-SunA-His-Glc antibakterinį aktyvumą nustatyta, jog pre-Hyp1-His-Glc ir pre-SunA-His-Glc glikozilinti peptidai su lyderine seka turi antibakterinį poveikį. Ekspresuojant vien tik pirmtakų genus, be *palS* geno, išgryninti peptidai nepasižymėjo antibakteriniu poveikiu.

Toliau, buvo siekiama nustatyti, ar Hyp1 ir Hyp2 peptidai be lyderinės sekos gali būti glikozilinami glikoziltransferazės PalS. Šiam tikslui naujai sukonstruoti genai *core_hyp1-his* ir *core_hyp2-his*, koduojantys Hyp1 ir Hyp2 peptidus be lyderinės sekos (šerdiniai peptidai), su His6 inkaru peptidų C-gale.

Geno *palS* ekspresija kartu su *core_hyp1-his/core_hyp2-his* buvo atlikta *E. coli* BL21(DE3) ląstelėse. Peptidų biosintezė, gryninimas ir analizė buvo atliekama tokiu pačiu principu kaip ir prieš tai. Išgrynintų peptidų MS analizė negalėjo patvirtinti, jog susintetinti šerdiniai peptidai (be lyderinės sekos) buvo glikozilinti PalS glikoziltransferazės, nes Hyp1-His ir Hyp2-His peptidų masė nesiskyrė nuo jų apskaičiuotos teorinės masės. Nepaisant to, išgrynintų peptidų antibakterinio aktyvumo analizė atskleidė, jog pastarieji šerdiniai glikocinų peptidai įgijo antibakterinį aktyvumą (**7 pav.**). Ekspresuojant vien tik *core_hyp1-*

his/core_hyp2-his genus, be *palS* geno, išgryninti peptidai nepasižymėjo antibakteriniu poveikiu.

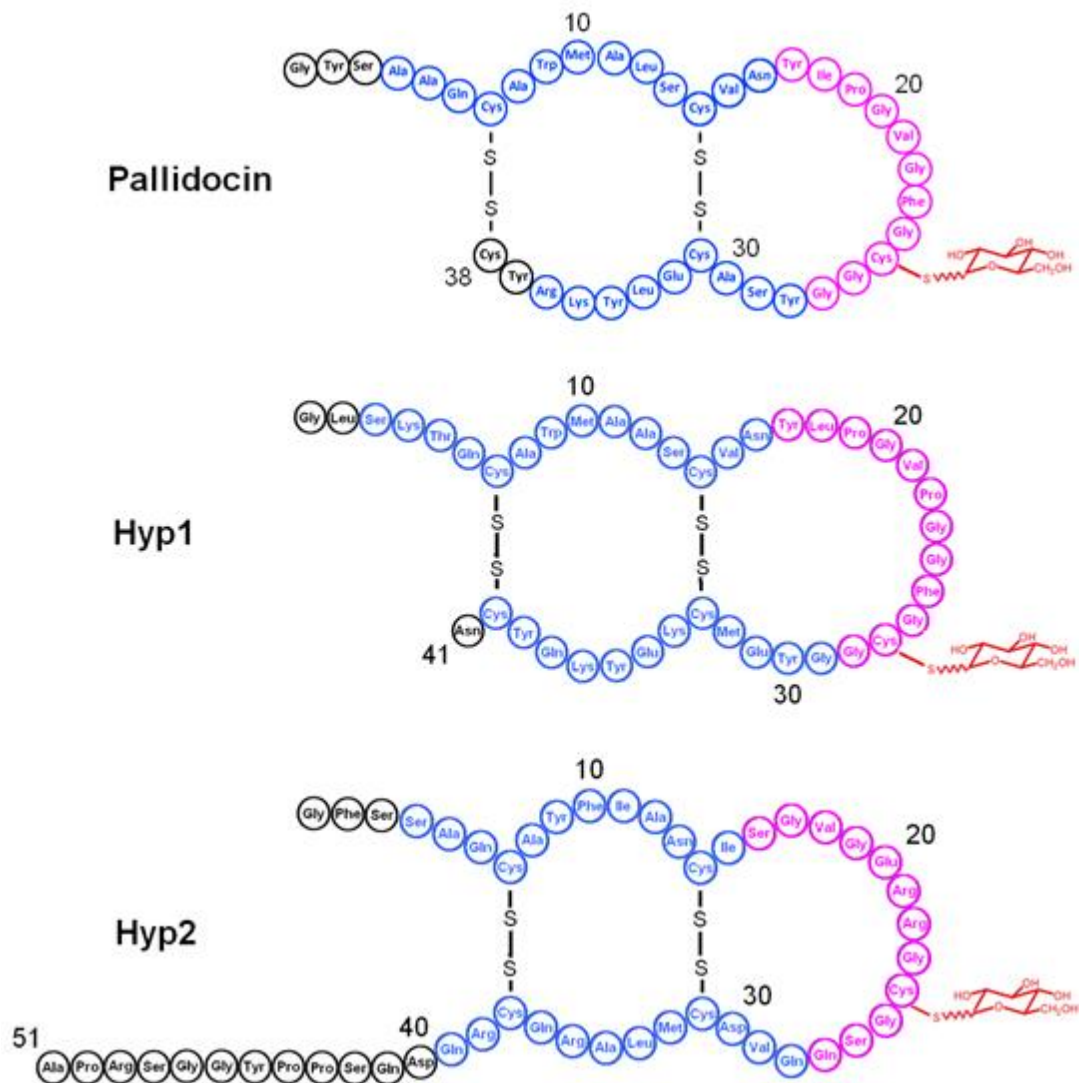


7 paveikslas. Glikocinų aktyvumas. P – PalA-Glc (subrendęs palidocinas); 1 – Hyp1-His(-Glc) šerdinis peptidas; 2 – Hyp2-His(-Glc) šerdinis peptidas. Antibakterinis aktyvumas nustatytas lašelių metodu.

Šie rezultatai patvirtina, jog buvo susintetinti glikozilinti šerdiniai peptidai: Hyp1-His-Glc ir Hyp2-His-Glc, tačiau jų išeiga buvo labai maža, kad būtų detektuoti tiek MALDI-TOF MS, tiek didesnės skiriamosios gebos LC-ESI-MS metodu.

Tolimesni tyrimai su išgrynintais šerdiniai peptidai Hyp1 ir Hyp2, pasižyminčiais antibakteriniu aktyvumu, parodė kad jie turi aktyvumą prieš kai kurias termofilines (*Para*)*Geobacillus*, *Caldibacillus* bei mezofilines *Bacillus* genties bakterijas.

Hyp1 ir Hyp2 šerdinių peptidų sekos buvo analizuotos PSIPRED programa, o teorinės šių peptidų struktūros pateiktos **8 paveiksle**. PSIPRED programos analizės rezultatai parodė, kad Hyp1 ir Hyp2 peptidai gali turėti po dvi α -spirales. Šios spiralės, kaip ir sublancino, glikocino F ir palidocino struktūrose, gali būti sujungtos dviem disulfidiniais tilteliais. Cys aminorūgštis, esanti tarpspiraliniam linkyje gali būti glikozilinama S-ryšiu, prijungiant gliukozės molekulę.



8 pav. Glikocinų teorinės struktūros sumodeliuotos PSIPRED programa. Aminorūgštys pažymėtos mėlynai sudaro α -spirales, rožine spalva pažymėtos aminorūgštys sudaro tarpspiralinį linkį, prie Cys aminorūgšties per S jungtį prijungta gliukozės molekulė.

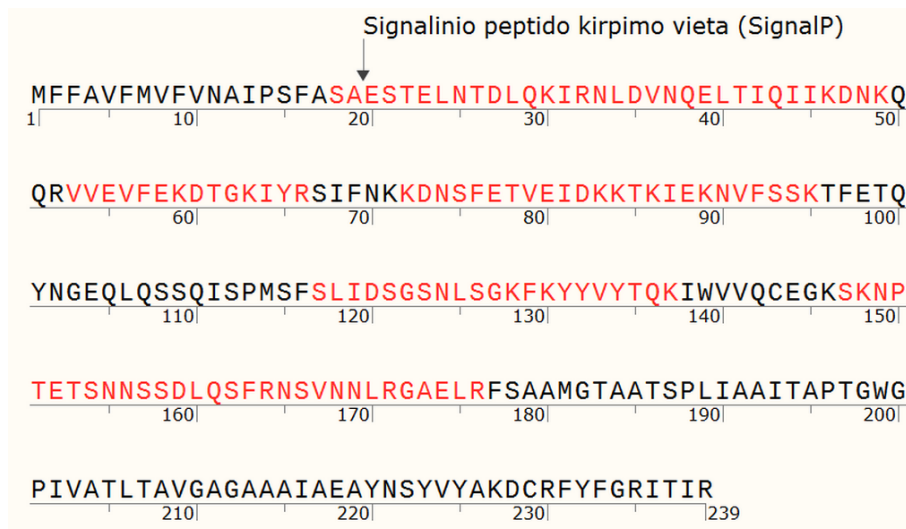
4.9 *G. stearotherophilus* 15 produkuojamų bakteriocinų, gryninimas ir analizė

Nors kito šiame darbe tirta termofilinio 15 kamieno genome nebuvo rasta jokių bakteriocinų ar jų sintezę koduojančių genų, tačiau šis kamienas pasižymėjo antibakteriniu poveikiu prieš kitas giminingai artimas bakterijas. Dėl šios priežasties, užauginus 15 kamieną skystoje terpėje, iš bakterijų kultūros supernatanto panaudojus jonų mainų chromatografijos bei dvikryptės baltymų elektroforezės metodus buvo išgrynintas 26 kDa molekulinės masės baltymas (šiam darbe pavadintas geobacilinu 26 (Geo26)) pasižymintis antibakterinėmis

savybėmis. Taip pat buvo nustatyta, jog 15 kamienas produkuoja ir 17 kDa molekulinės masės baltymą (šiam darbe pavadintas geobacilinu 17 (Geo17)), pasižymintį antibakterinėmis savybėmis.

Inkubuojant išgrynintą Geo26 skirtingose temperatūrose, buvo parodyta, kad šis bakteriocinas išlieka stabilus 70 °C temperatūroje, tuo tarpu po inkubacijos 80 °C temperatūroje jo aktyvumas krenta 50 %, po inkubacijos 90 °C temperatūroje aktyvumo nebelieka. Geo17 bakteriocinas išlaiko 50 % savo aktyvumo net po autoklavavimo 121 °C temperatūroje.

Išgrynintas Geo26 buvo pateiktas MS analizei MS/MS metodu. Remiantis šia analize 15 kamieno genome rastas genas, koduojantis šį baltymą, bei pačio baltymo aminorūgščių seka (**9 pav.**). Geo26 yra hipotetinis baltymas, kurio seka nepasižymi reikšmingu panašumu į jokią kitą žinomą ir aprašytą bakteriociną ar žinomos funkcijos baltymą.



9 paveikslas. Geobacilino (Geo26) baltymo aminorūgščių seka. Raudona spalva pažymėtos sekos, detektuotos MS/MS masių spektrometrijos analize. Signalinio peptido kirpimo vieta apskaičiuota SignalP programa.

Geo26 baltymą koduojantis genas buvo įklonuotas į raiškos vektorius pBAD24 ir pNZ8048 bei ekspresuotas atitinkamai *E. coli* BL21(DE3) bei *Lactococcus lactis* NZ9000 bakterijose. Po Geo26 ekspresijos buvo patikrintas antibakterinis aktyvumas šių bakterijų ląstelių lizatuose (**10 pav.**).



10 paveikslas. Geo26 antibakterinis aktyvumas ląstelių lizate. Bakteriocino ekspresija *E. coli* BL21(DE3) (a). Bakteriocino ekspresija *L. lactis* NZ9000 (b). 1 – Neindukuotos ląstelės (kontrolė), 2 – indukuotos ląstelės (4 val. po indukcijos). Antibakterinis aktyvumas tikrintas difuzijos šulinėliuose metodu.

Nustatyta, kad ekspresuojant Geo26 tiek *L. lactis*, tiek *E. coli* susintetinamas aktyvus bakteriocinas. Nepaisant to, šio baltymo gryninimas, sukonstravus Geo26 su His6 inkaru baltymo N-gale, nepavyko. Dėl to, detalesnių šio bakteriocino bei jo sintezės tyrimų pasiekti nepavyko.

5 Rezultatų aptarimas

Šiame darbe buvo identifikuotas ir aprašytas naujas po transliacijos modifikuojamas bakteriocinas – palidocinas. Jis bakteriocinų klasifikacijoje priskiriamas glikocinų – glikozilnamų bakteriocinų, poklasiui. Prie šio bakteriocino Cys aminorūgšties gliukozės molekulė prijungta S-ryšiu. Tai labai retas reiškinys bakterijų tarpe. Šiuo metu yra aprašyti tik keli S-ryšiu glikozilinti peptidai, priskiriami glikocinams.

Palidocino biosintezę koduojantys genai (*palA*, *palS*, *palT*, *paldbA* ir *paldbB*) buvo rasti gram-teigiamos endosporas formuojančios termofilinės *A. pallidus* 8 bakterijos genome. Šiame darbe buvo pirmą kartą pademonstruota glikocino heterologinė biosintezė. Palidocino biosintezės genų klasteris koduojamas gram-teigiamos bakterijos buvo ekspresuotas *E. coli* bakterijoje, o susintetintas bakteriocinas sekretuotas į augimo terpę.

Palidocino glikoziltransferazė PalS bei lyderio peptidazė/transporteris PalT yra pagrindiniai biosintezėje dalyvaujantys baltymai, kurių pakanka susintetinti palidociną *E. coli* bakterijoje. PalS buvo pritaikytas ir kitų glikocinų pirmtakų glikozilinimui. Šis fermentas gali prijungti cukraus molekulę ne tik prie pirmtako peptido PalA, bet ir prie SunA bei numanomų naujų glikocinų pirmtakų Hyp1 ir Hyp2 ir tokiu būdu juos aktyvuoti. Šiame

darbe parodyta, kad lyderinės sekos pašalinimas nėra būtinas glikocinų antibakteriniam aktyvumui. Aktyvumui pasireikšti pakanka pirmtako glikozilinimo, kas galiausiai lemia ir teisingų disulfidinių tiltelių susidarymą peptide. Palidocino atveju, jie taip pat yra būtini bakteriocino antibakteriniam aktyvumui. Pademonstruota, kad PalS gali glikozilinti ir Hyp1 ir Hyp2 glikocinų šerdinius peptidus, nors ir daug mažesniu našumu, nei glikozilinant Hyp1 ir Hyp2 pirmtakus su lyderine seka. Tokiu būdu buvo susintetinti du nauji glikocinai.

Tuo tarpu *G. stearothermophilus* 15 kamieno genome bakteriocinus koduojančių genų rasta nebuvo. Nepaisant to, šis kamienas produkuoja 26 kDa molekulinės masės bakteriociną geobaciliną 26 (Geo26) bei 17 kDa molekulinės masės baltyminės prigimties antibakterinę medžiagą geobaciliną 17 (Geo17). Išgryninus geobaciliną 26 nustatyta jo aminorūgščių seka ir bakteriociną koduojantis genas 15 kamieno genome.

Išgrynintas Geo26 visiškai praranda antibakterinį aktyvumą jį paveikus 90 °C temperatūra, o tuo tarpu Geo17 išlieka veiklus ir po 15 min. autoklavavimo 121 °C temperatūroje. Geobaciliną 26, remiantis jo didele molekuline mase, galima priskirti bakteriocinų III klasei. Ateityje nustačius geobacilino 17 aminorūgščių seką, galima būtų jį įvardinti kaip bakteriociną ir priskirti taip pat III bakteriocinų klasei, nors jo termostabilumas nėra būdingas šios klasės bakteriocinams.

6 Išvados

- Identifikuotas naujas glikocinų poklasio bakteriocinas – palidocinas, kuris yra koduojamas termofilinio *A. pallidus* 8 kamieno genome.
- Pirmą kartą taikant termofilinės bakterijos bakteriocino biosintezės genų klasterio ekspresiją, susintetintas ir heterologiškame *E. coli* kamienne sekretuotas glikocinas.
- Nustatytas palidocino aktyvumas prieš termofilines (*Para*)*Geobacillus*, *Caldibacillus* bei mezofilines *Bacillus* genties bakterijas. Palidocinas pasižymi labai maža (2pM) minimalia slopinančia koncentracija prieš *P. genomospecies* 1 NUB36187 kamieną. Parodyta, kad bakteriocinas stabilus 121 °C temperatūroje ir pH spektre nuo 2 iki 10.

- Parodyta, kad palidocino S-glikoziltransferazė PalS geba glikozilinti sublacino ir du naujus glikocinų pirmtakus: Hyp1 ir Hyp2. Nustatytam kad PalS mažu našumu glikozilina ir šerdinius Hyp1 ir Hyp2 peptidus. Glikozilinti Hyp1 ir Hyp2 šerdiniai peptidai pasižymi antibakteriniu poveikiu prieš termofilines (*Para*)*Geobacillus*, *Caldibacillus* bei mezofilines *Bacillus* genties bakterijas.
- Identifikuotas naujas bakteriocinas geobacilinas 26, sekretuojamas termofilinio *G. stearothermophilus* 15 kamieno. Tai 24,5 kDa molekulinės masės bakteriocinas, inaktyvuojamas 90 °C temperatūroje. Geobacilino 26 aminorūgščių seka nepasižymi panašumu į kitų žinomos funkcijos baltymų sekas.

7 Publikacijos ir konferencijos

Šiame darbe aprašyti rezultatai buvo publikuoti:

- **Kaunietis A**, de Jong A, Pranckutė R, Buivydas A, Kuipers OP. 2016. Draft genome sequences of two *Geobacillus* species strains, isolated from oil wells and surface soil above oil pools. *Genome Announc.* 4(5):e01129-16. doi: 10.1128/genomeA.01129-16.
- Pranckutė R, **Kaunietis A**, Kananavičiūtė R, Lebedeva J, Kuisienė N, Šaleikienė J, Čitavičius D. 2015. Differences of antibacterial activity spectra and properties of bacteriocins, produced by *Geobacillus* sp. bacteria isolated from different environments. *J. Microbiol. Biotechnol. Food. Sci.* 5(2):155-161. doi: 10.15414/jmbfs.2015.5.2.155-161.
- **Kaunietis A.**, Buivydas A., Čitavičius D., Kuipers O.P. Heterologous biosynthesis and characterization of a novel glycocin from a thermophilic bacteria. *Nature Communications* (publikacijos rankraštis pateiktas žurnalo įvertinimui).

Kitos publikacijos:

- Pranckutė R, **Kaunietis A**, Kuisiene N, Čitavičius DJ. 2016. Combining prebiotics with probiotic bacteria can enhance bacterial growth and secretion of bacteriocins. *Int. J. Biol. Macromol.* 89:669-676. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.05.041.

- Pranckutė R, **Kaunietis A**, Kuisiene N, Čitavičius D. 2014. Development of synbiotics with inulin, palatinose, α -cyclodextrin and probiotic bacteria. Polish J. Microbiol. 63(1):33-41.
- Lastauskienė E, Zinkevičienė A, Girkontaitė I, **Kaunietis A**, Kvedarienė V. 2014. Formic acid and acetic acid induce a programmed cell death in pathogenic *Candida* species. Curr. Microbiol. 69(3):303-10. doi: 10.1007/s00284-014-0585-9.

Šio darbo rezultatai buvo pristatyti mokslinėse konferencijose:

- **Kaunietis A**, de Jong A, Buivydas A, Kuipers OP. Identification, biosynthesis and characterization of a novel bacteriocin encoded in the genome of thermophilic bacteria *Aeribacillus pallidus*. The 7th Congress of European Microbiologists (FEMS), Valencia, Spain, 9-13 July 2017.
- **Kaunietis A**, Pranckutė R, Čitavičius D. Optimization of the secretion of bacteriocins and the bacterial cell growth of *Geobacillus* sp. 15 strain. The 6th Congress of European Microbiologists (FEMS), Maastricht, the Netherlands, 7-11 June 2015.

8 Finansinė parama

- Erasmus+ EU stipendija (2015 – 2016).
- Lietuvos mokslo tarybos doktoranto stipendija (2013 – 2014).

9 CV

Asmeninė informacija

Vardas, pavardė: ARNOLDAS KAUNIETIS
Gimimo metai: 01-02-1987
Adresas: S. Konarskio g. 22-28, LT-03124, Vilnius, Lietuva
E-paštas: kavenis1@gmail.com
Tel.: +37068531352

Išsilavinimas

2010 biologijos bakalauro diplomas, Vilniaus Universitetas.

2012 mikrobiologijos magistro diplomas, Vilniaus universitetas.

Konferencijos ir publikacijos

Stendiniai pranešimai tarptautinėse konferencijose:

- **Kaunietis A**, de Jong A, Buivydas A, Kuipers OP. Identification, biosynthesis and characterization of a novel bacteriocin encoded in the genome of thermophilic bacteria *Aeribacillus pallidus*. The 7th Congress of European Microbiologists (FEMS), Valencia, Spain, 9-13 July 2017.
- **Kaunietis A**, Pranckutė R, Čitavičius D. Optimization of the secretion of bacteriocins and the bacterial cell growth of *Geobacillus* sp. 15 strain. The 6th Congress of European Microbiologists (FEMS), Maastricht, the Netherlands, 7-11 June 2015.

Publikacijų sąrašas:

- **Kaunietis A**, de Jong A, Pranckutė R, Buivydas A, Kuipers OP. 2016. Draft genome sequences of two *Geobacillus* species strains, isolated from oil wells and surface soil

above oil pools. *Genome Announc.* 4(5):e01129-16. doi: 10.1128/genomeA.01129-16.

- Pranckutė R, **Kaunietis A**, Kuisiene N, Čitavičius DJ. 2016. Combining prebiotics with probiotic bacteria can enhance bacterial growth and secretion of bacteriocins. *Int. J. Biol. Macromol.* 89:669-676. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.05.041.
- Pranckutė R, **Kaunietis A**, Kananavičiūtė R, Lebedeva J, Kuisienė N, Šaleikienė J, Čitavičius D. 2015. Differences of antibacterial activity spectra and properties of bacteriocins, produced by *Geobacillus* sp. bacteria isolated from different environments. *J. Microbiol. Biotechnol. Food. Sci.* 5(2):155-161. doi: 10.15414/jmbfs.2015.5.2.155-161.
- Pranckutė R, **Kaunietis A**, Kuisiene N, Čitavičius D. 2014. Development of synbiotics with inulin, palatinose, α -cyclodextrin and probiotic bacteria. *Polish J. Microbiol.* 63(1):33-41.
- Lastauskienė E, Zinkevičienė A, Girkontaitė I, **Kaunietis A**, Kvedarienė V. 2014. Formic acid and acetic acid induce a programmed cell death in pathogenic *Candida* species. *Curr. Microbiol.* 69(3):303-10. doi: 10.1007/s00284-014-0585-9.

Stażuotės

01-11-2015 – 01-05-2017 Molekulinės genetikos grupėje Groningeno biomolekulių mokslo ir biotechnologijų institute, Groningeno universitetas, Nyderlandai.

Finansinė parama studijų metu

- Erasmus+ EU stipendija (2015 – 2016).
- Lietuvos mokslo tarybos doktoranto stipendija (2013 – 2014).