

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos IV kurso studentė

Manta VAIČIKAUSKAITĖ

Bakalaurinis darbas

Naujo bakteriocino charakterizavimas bei jo heterologinė ekspresija

Darbo vadovas

Dokt. Arnoldas Kaunietis

Vilnius 2018

Naujo bakteriocino charakterizavimas bei jo heterologinė ekspresija

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre Biomokslų institute

Manta Vaičiškaitė

Darbo vadovas dokt. Arnoldas Kaunietis

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Antimikrobiniai peptidai	8
1.1.1. Bakterijų antimikrobiniai peptidai.....	8
1.1.2. Bakteriocinai prieš antibiotikus.....	9
1.2. Bakteriocinų klasifikacija.....	10
1.2.1. I klasės bakteriocinai	11
1.2.2. II klasės bakteriocinai.....	12
1.2.3. III klasės bakteriocinai	14
1.3. Veikimo mechanizmas	15
1.3.1. Membranos permeabilizacija (padidintas membranos pralaidumas)	15
1.3.2. Genų raiškos ir baltymų produkcijos slopinimas	16
1.3.3. Poveikis ląstelės sienieli	16
1.4. Bakteriocinų molekulinė charakteristika.....	17
1.5. Bakteriocinų panaudojimas	19
1.5.1. Bakteriocinų panaudojimas maisto pramonėje.....	19
1.5.2. Bakteriocinų panaudojimas ląstelės sienelės tyrimuose.....	20
1.5.3. Bakteriocinų panaudojimas degalų industrijoje	20
1.5.4. Panaudojimas prieš termofilines bakterijas	21
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	22
2.1. Bakterijų kamienai ir auginimo sąlygos.....	22
2.2. Bioinformatiniai metodai	23
2.3. Kompetentinių ląstelių ruošimas elektrotransformacijai.....	23
2.4. Geobacilino 26 klonavimas į <i>E. coli</i>	24
2.5. Rekombinantinio baltymo ekspresija	26
2.6. Elektroforetinė analizė	26
2.7. Grynimasis Ni ²⁺ afininės chromatografijos metodu	26
2.8. Nudruskinimas	27
2.9. Lėkštelių su jautriu kamieniu ruošimas.....	27
2.10. Šulinėlių agare metodas	27

2.11.	Bakteriocino temperatūrinis stabilumas	27
2.12.	Kolonijas formuojančių vienetų skaičiavimas.....	28
2.13.	Minimalios inhibicijos koncentracijos matavimas	28
2.14.	Bakteriocino veikimo mechanizmo nustatymas	28
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	29
3.1.	Geobacilino 26 bioinformatinė analizė	29
3.2.	Geobacilino 26 geno klonavimas į <i>E. coli</i>	30
3.3.	Baltymo raiška	31
3.4.	Geobacilino 26 su signaliniu peptidu raiška.....	32
3.5.	Geobacilino 26 be signalinio peptido raiška	33
3.6.	Geobacilino 26 aktyvumas prieš kitas termofilines bakterijas	34
3.7.	Geobacilino 26 temperatūrinis stabilumas	36
3.8.	Geobacilino 26 veikimo mechanizmas.....	36
	IŠVADOS	38
	SANTRAUKA	39
	SUMMARY	40
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	41

SANTRUMPOS

AMP – antimikrobiniai peptidai

DNazė - nukleazė

RNazė - ribonukleazė

GRAS – visuotinai pripažinti saugiais (Generally Recognised as Safe)

TOMM – tiazolio/oksazolio modifikuoti mikrocinai

ABC – ATP prisijungiantys kasetės transporteriai

ATP – Adenozin 5' trifosfatas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

RNR - ribonukleorūgštis

NAM – N-acetilmuramo rūgštis

NAG – N-acetilgliukozamino rūgštis

Rpm – apsisukimai per minutę (revolutions per minute)

MB – Maitinamasis buljonas

LB – Luria-Bertani

SOC – super optimalus buljonas su katabolitų represija

dNTP - deoksinukleotidas

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

IPTG – izopropil β-D-1-thiogalaktopiranozidas

NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelio elektroforezė

KFV – kolonijas formuojantys vienetai

Geo26 – geobacilinas 26

tRNR – transportinė ribonukleazė

MIC – minimali inhibicinė koncentracija

OT – optinis tankis

ĮVADAS

Bakteriocinai, tai bakterijų ribosomų sintetinami antimikrobiniai peptidai/baltymai, turintys inhibicinį (bakteriolitinį arba bakteriostatinį) aktyvumą prieš bakteriociną sintetinančią bakteriją artimas ar tolimesnes bakterijų rūšis. Tai labai heterogeninė peptidų/baltymų grupė, kadangi skirtingi bakteriocinai skiriasi savo struktūra, dydžiu, modifikacijomis, fizikocheminėmis savybėmis. Bakteriocinai skiriasi ir savo veikimo mechanizmu. Remiantis šiomis savybėmis bakteriocinai yra skirstomi į 3 atskiras klases:

- I klasei priklauso karštyje stabilūs, maži (<10 kDa), po transliacijos modifikuojami peptidai
- II klasei priklauso karštyje stabilūs, maži (<10 kDa), po transliacijos nemodifikuojami peptidai
- III klasei priklauso karštyje labilūs, dideli (>10kDa), nemodifikuojami peptidai/baltymai

Iš visų šių klasių mažiausiai tyrinėti yra III klasės bakteriocinai.

Pastaraisiais metais pastebėtas bakteriocinų potencialas panaudojimui įvairios srityse. Bakteriocinai, kitaip nei antibiotikai, yra baltyminės kilmės. Jie nekenkia žmogaus organizmui ir jo mikrobiotai, todėl gali būti panaudojami maisto pramonėje, ilginant maisto produktų galiojimo laiką ir kokybę. Toks bakteriocinų panaudojimas sumažintų cheminių priedų ir fizinio apdorojimo kieki, taip pasiekiant dabartinius vartotojų poreikius natūralesniems ir mažiau apdirbtiems maisto produktams. Be maisto pramonės, bakteriocinai dar turi klinikinį pritaikymą. Parodytas įvairių bakteriocinų aktyvumas prieš patogenines bakterijas. Kadangi bakterijos turi kitokius atsparumo bakteriocinams mechanizmus nei antibiotikams, bakteriocinai gali būti panaudojami kovai prieš antibiotikams atsparius bakterijų kamienus.

Bakteriocinai gali būti panaudojami ir procesuose, kuriuose naudojama aukštesnė temperatūra, kaip prevencinė priemonė prieš užkratą termofilinėmis bakterijomis

Termofilinių bakterijų bakteriocinai dar mažai tyrinėti, ir šiuo metu nė vienas dar nėra pritaikytas naudojimui pramonėje, todėl šiame darbe yra tyrinėjamas *Geobacillus* sp. 15 kamieno bakteriocinas

Šio **darbo tikslas**: Ekspresuoti aktyvų bakteriociną *Escherichia coli* ląstelėse ir jį charakterizuoti

Uždaviniai:

1. Optimizuoti sąlygas veiksmingai geobacilino 26 (Geo26) ekspresijai *E. coli* ląstelėse
2. Išgryninti bakteriociną
3. Nustatyti temperatūros įtaką bakteriocino stabilumui
4. Nustatyti Geo26 aktyvumą prieš termofilines bakterijas
5. Nustatyti bakteriocino veikimo mechanizmą

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Antimikrobiniai peptidai

Gyvendami sudėtingoje gyvenamoje aplinkoje, įvairūs organizmai, nuo vienaląsčių iki sudėtingų daugialąsčių, pastoviai sąveikauja vieni su kitais. Šios sąveikos gali būti žalingos organizmams, todėl jiems yra reikalingos apsaugos sistemos. Viena jų, tai antimikrobinių peptidų (AMP) biosintezė. AMP – tai trumpi (8 – 50 amino rūgščių), mažos molekulinės masės peptidai. Dauguma jų yra katijoniniai, turi keletą hidrofobinių aminorūgščių liekanų, yra amfipatiniai ir rodo didelį antimikrobinį aktyvumą. Skirtingos AMP klasės atrastos įvairiuose organizmuose: žinduoliuose, voragyviuose, varliagyviuose, augaluose grybuose ir net vienaląsčiuose mikroorganizmuose (Le, Fang ir Sekaran, 2017). Bakterijų sintetinami AMP jau seniai tyrinėjami kaip potencialūs antimikrobiniai junginiai, kurie gali būti panaudojami tiek klinikiniuose gydymuose tiek maisto apsaugoje (prezervacijoje). Išskyrus porą išimčių, bakterijų AMP panaudojimas yra labai ribojamas, tačiau dabar, didėjant antibiotikams atsparių patogeninių bakterijų kiekiui, prokariotų sintetinami AMP galėtų būti perspektyvi priemonė kovai su šia problema (Hassan et al., 2014).

AMP gali būti klasifikuojami į grupes, remiantis jų antrine struktūra: turintys α – spiralinę struktūrą, bei turintys β – klosčių struktūrą arba linijiniai AMP. Amfipatiniai α – spiralinės struktūros AMP turi menkai išreikštą savo erdvinę struktūrą vandeningoje aplinkoje, tačiau įgauna amfipatinę spiralinę struktūrą, kai patenka į nepolinę aplinką, pavyzdžiui, bakterijos membraną. Kiti AMP charakterizuojami kaip turintys dvi ar daugiau β – klosčių, kurios yra stabilizuojamos disulfidinių tiltelių. Galiausiai, išėsti AMP neturi jiems būdingos struktūros, bet apibūdinami kaip turintys didelį kiekį specifinių aminorūgščių liekanų, tokių kaip histidinas, argininas, glicinas ar triptofanas (Zhang ir Gallo, 2016).

1.1.1. Bakterijų antimikrobiniai peptidai

Bakterijos sintetina dviejų tipų AMP: ribosomų sintetinamus, dar žinomus kaip bakteriocinus, ir ne ribosomų sintetinamus AMP, kurie neturi juos koduojančių struktūrinių genų (Ye et al., 2013). Bakteriocinų sintezę aktyvuoja nepakankamas maisto medžiagų kiekis aplinkoje, tam, kad bakterijai būtų suteikiamas pranašumas, kovojant dėl vietos ir išteklių. Bakteriocinai yra dažnai aptinkami, turi didelę įvairovę, veikia prieš artimas (siauro veikimo spektro) ar prieš tolimesnes (plataus veikimo spektro) bakterijų rūšis (Yang et al., 2014)

Pirmieji charakterizuoti bakteriocinai buvo iš gramneigiamų bakterijų, tai *E. coli* kolicinai, kurie buvo atrasti dar 1925m. Andre Gratia. Kolicinams priklauso grupė įvairių antibakterinių, didelės molekulinės masės (30 – 80 kDa) baltymų, kurie žudo artimas bakterijų rūšis įvairiais mechanizmais, pavyzdžiui, inhibuojant ląstelės sienelės sintezę, padarant ląstelės membraną pralaidžią ar stabdant DNazės ar RNazės aktyvumą (Cleveland et al., 2001). Kadangi kolicinai prieš žudydami jautrius kamienus jungiasi prie specifinių receptorių, jie turi siaurą taikinių ratą ir mutacija receptoriuje gali padaryti kamieną nejautriu (Cascales et al., 2007).

Gramteigiamų bakterijų bakteriocinai turi aukštą specifinį aktyvumą prieš maistą gadinančias ir patogenines bakterijas (Field et al., 2015). Daugiausia žinomi ir ištirti yra pienarūgščių bakterijų bakteriocinai, kadangi jau nuo senų laikų šios bakterijos yra naudojamos įvairių maisto produktų fermentacijoje, ne tik dėl savybės keisti produktų skonį ar struktūrą, bet ir dėl gebėjimo sintetinti inhibitorius, kurie stabdo gedimo procesą ir patogeninių mikroorganizmų augimą (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Vienas žinomiausių ir geriausiai ištirtų pienarūgščių bakterijų bakteriocinų – tai nizinas, atrastas dar 1928 metais Rogerso. Nizinas yra *Lactococcus lactis* sintetinamas mažas peptidas, kuris atakuoja ląstelės sienelę ir sukelia ląstelių taikinių lizę. Šiuo metu Nizinas yra gaminamas pramoniniu mastu ir specifiskai panaudojamas įvairiose srityse, pavyzdžiui prevencijai nuo bakterijų sporų sudygimo ant maisto produktų paviršiaus (Gharsallaoui et al., 2016).

Bakteriocinai, tai heterogeninė baltymų grupė ir paprastai yra skirstomi į mažus peptidus, kurie yra modifikuojami po transliacijos (I klasė) ir nemodifikuojamus peptidus (II klasė), bei didesnius karštyje labilius baltymus (III klasė). Dauguma bakteriocinų turi didelį specifinį aktyvumą prieš klinikinius taikinius (įskaitant ir antibiotikams atsparias bakterijų rūšis), turi kitokius veikimo mechanizmus nei dabartiniai chemoterapiniai vaistai. Dėl savo baltyminės kilmės jie nekenkia žmogaus organizmui ir jo mikrobiotai, bei yra tinkami genų pagrindu vykdomai baltymų inžinerijai. Būtina paminėti, kad gali išsivystyti atsparumas bakteriocinams, tačiau tokia galimybė gali būti sumažinama detaliai supratęs bakteriocinų veikimo ir apsaugos nuo jų mechanizmus (Cotter, Ross, ir Hill, 2013).

1.1.2. Bakteriocinai prieš antibiotikus

Dėl panašumo bakteriocinai ir antibiotikai dažnai maišomi tarpusavyje. Norint panaudoti bakteriocinus maisto pramonėje būtina juos atskirti. Pagrindiniai skirtumai tarp šių dviejų medžiagų apibendrinti 1.1 lentelėje (Cleveland et al., 2001).

1.1 lentelė. Bakteriocinų ir antibiotikų skirtumai

Savybė	Bakteriocinai	Antibiotikai
Panaudojimas	Maisto pramonėje	Klinikinis
Sintezė	Sintetinama ribosomų	Antrinis metabolitas
Aktyvumas	Dažniausiai siauro spektro	Įvairaus spektro
Ląstelės šeimininkės imunitetas	Yra	nėra
Ląstelės taikinės atsparumo ar tolerancijos mechanizmas	Paprastai prisitaikoma pakeičiant ląstelės membranos kompoziciją	Paprastai genetiškai perduodama determinantė, daranti įtaką įvairiems svarbiems ląstelės procesams, priklausomai nuo veikimo mechanizmo
Reikalavimai sąveikai	Kartais reikalingos inkarinės molekulės	Reikalingas specifinis taikiny
Veikimo mechanizmas	Daugiausiai porų formavimas membranoje, keletu atvejų ląstelės sienelės ardymas arba sintezės trikdymas	Ląstelės membrana arba viduląsteliniai taikiniai
Toksiškumas	Nėra žinomo	Yra

Priešingai nei antibiotikai, kurie yra antriniai metabolitai, bakteriocinai yra sintetiniai ribosomų, ir jautrūs proteazėms, todėl nekenksmingi žmogaus organizmui ir jį supančiai aplinkai (Yang et al., 2014). Dėl mažo toksiškumo jie gali būti naudojami arba išgryninti, arba *in situ* – juos produkuojančios bakterijos. Yra žinoma, kad bakteriocinai sąveikauja su didele įvairove receptorių, kurie yra skirtingi, nei receptoriai sąveikaujantys su antibiotikais, todėl kryžminio atsparumo susidarymas yra mažai tikėtinas. Nors išlieka tikimybė išsivystyti atsparumui prieš bakteriocinus, galimybė, kad šis atsparumas atsiras komensalinėse populiacijose už bakteriocino taikinio zonos, yra labai maža (Egan, Ross, ir Hill, 2017).

1.2. Bakteriocinų klasifikacija

Bakteriocinai yra klasifikuojami remiantis jų struktūra, molekulinio dydžiu, posttransliacinėmis modifikacijomis ir genetinėmis charakteristikomis. Ir gramneigiamos ir gramteigiamos bakterijos turi savo klasifikacijas. Kadangi pienarūgščių bakterijų produkuojami bakteriocinai šiuo metu turi didžiausią susidomėjimą, dėl savo pripažįstamų kaip saugių (GRAS) statuso, dauguma bakteriocinų klasifikacijos schemų yra sukurtos būtent šiems bakteriocinams, tačiau tinka ir kitų gramteigiamų bakterijų bakteriocinams (Drider ir Rebuffat, 2011). Pirmiausia pienarūgščių bakterijų antimikrobiniai peptidai buvo priskiriami vienai iš aštuonių grupių,

remiantis jų atsparumu karščiui, jautrumu tripsinui, veikimo spektro dydžiu. Vėliau šis skirstymo būdas buvo pakeistas pranašesniu, kurį pasiūlė Klaenhammer (1993). Jis išskyrė bakteriocinus į 4 skirtingas klases su poklasiais. Klaenhammer pasiūlytos klasės:

- I klasės bakteriocinai, dar kitaip vadinami lantibiotikais, tai mažos molekulinės masės (< 10 kDa), karštyje stabilūs peptidai, kurie biosintezės metu yra modifikuojami. Šie bakteriocinai po modifikacijos turi nestandartinių aminorūgščių ir išskirtinę struktūrą.
- II klasės bakteriocinai taip pat yra mažos molekulinės masės karštyje stabilūs peptidai, tačiau po transliacijos jie nėra modifikuojami, todėl jų brendimui nereikalingi įvairūs fermentai (neskaitant signalinę seką kerpančios peptidazės ir/ar bakteriocino transporterio).
- III bakteriocinų klasė šiuo metu mažiausiai tyrinėta. Ją sudaro didesni nei 10 kDa baltymai, kurie nėra modifikuojami po transliacijos. Šios klasės bakteriocinai nėra stabilūs karštyje.
- IV klasės bakteriocinai – kompleksiniai baltymai, turintys turintys lipidinę arba angliavandenių dalį/dalis.

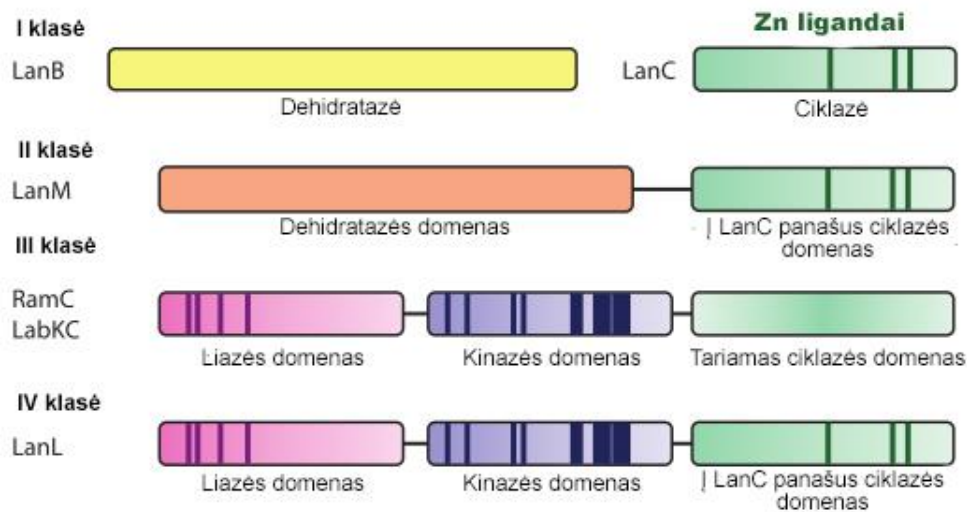
Visos naujesnės bakteriocinų klasifikacijos schemas remiasi šia klasifikacija, tačiau dabartinėse klasifikacijos sistemose dažnai nėra išskiriama IV bakteriocinų klasė ir jų poklasiai skirtingų autorių darbuose išskiriami skirtingai. Gramneigiamų bakterijų bakteriocinai yra grupuojami pagal savo dydį į didelės molekulinės masės peptidus, dar vadinamus koliciniais, ir mažos molekulinės masės peptidus – mikrocinus (Drider ir Rebuffat, 2011).

1.2.1. I klasės bakteriocinai

Ia klasė (Lantibiotikai), tai policikliniai bakteriocinai, savo struktūroje turintys neįprastas aminorūgštis, kaip lantioniną ir/ar metilantioniną, atsirandančias potransliacinės modifikacijos metu. Paprastai genai susiję su lantibiotikų brendimu yra lokalizuojami tame pačiame operone. Remiantis fermentais, kurie dalyvauja brendimo procese (1.1 pav.), lantibiotikai gali būti skirstomi į dar 4 poklasius

- I poklasio bakteriocinai yra modifikuojami LanB dehidratazės ir LanC ciklazės, vykdant Serino/treonino dehidrataciją ir ciklizaciją, susidarant tioeteriams ryšiams.
- II poklasio bakteriocinams tos pačios reakcijos atliekamos vienos bifunkcinės lantipeptido sintazės LanM, kuri turi N-galinę dehidratazės ir C-galinę, į LanC ciklazę panašų domeną.

- III poklasio lantipeptidai yra modifikuojami trifunkcinės sintetazės, turinčios N-galinį liazės domeną, centrinį kinazės domeną ir manomą C-galinį ciklazės domeną.
- Galiausiai, IV poklasio lantipeptidai, modifikuojami LanL sintetazės, kaip ir III poklasio fermentas, turintis liazės ir kinazės domenus, , be to šis fermentas turi ir į LanC panašų domeną (Knerr ir van der Donk, 2012)



1.1 pav. Skirtingų nantibiotikus modifikuojančių ferment klasių schematinis vaizdas su paryškintais konservatyviais motyvais (Knerr ir van der Donk, 2012)

Ib klasė (saktibiotikai), tai auganti bakteriocinų grupė, apibūdinama, kaip turinti neįprastus sieros – α -anglies ryšius. Šios modifikacijos yra vykdomos S-adenozilmetionazės baltymų, kurie katalizuoja šių tioeterinių ryšių formavimąsi (Collins et al., 2017). Kaip ir visi bakteriocinai, saktibiotikai yra sintetinami ribosomų bei turi antibakterinį aktyvumą ir šis bruožas juos skiria nuo diketopiperazinių, kurie taip pat turi sieros – α -anglies ryšius, bet yra formuojami ne-ribosominių peptidų sintazių sistemų (Mathur et al., 2015).

Ic klasė Tiazolio/oksalolio modifikuoti mikrocinai (TOMM). Šie bakteriocinai modifikuojami po transliacijos, paverčiant cisteiną, seriną ir treoniną į atitinkamus heterociklus: tiazolį, oksazolį, metiloksalolį. TOMM koduojami operonuose kartu su transporto, modifikacijos ir imuniteto genais (Collins et al., 2017).

1.2.2. II klasės bakteriocinai

Kaip jau minėta, tai heterogeninė bakteriocinų grupė, kurią sudaro 30-20 aminorūgščių turintys peptidai (< 10 kDa), sudaryti iš standartinių aminorūgščių. Šios klasės bakteriocinai gali turėti disulfidinių tiltelių, ar būti ciklizuoti sujungiant peptido N- ir C-galus (Drider ir Rebuffat, 2011), taip pat yra termostabilūs ir teigiamo krūvio (Yang et al., 2014). Kartu su šios klasės

bakteriocinai sintetinami indukcijos faktorius, kuris aktyvuoja reguliacinių genų transkripciją. Šis indukcijos faktorius yra dalis signalo transdukcijos sistemos, kuri yra atsakinga už bakteriocinų sintezę (Drider ir Rebuffat, 2011).

Naujausioje literatūroje II klasės bakteriocinai yra skirstomi į 4 atskiras grupes.

IIa klasės bakteriocinai, dar vadinami į pediociną panašiais, yra sintetinami daugumos gramteigiamų bakterijų. Jie buvo pripažinti, kaip turintys potencialą panaudojimui natūraliai maisto apsaugai ir biomedicinos srityje, kadangi geba inhibuoti patogenines/maistą gadinančias bakterijas kaip *Listeria monocytogenes* ir *Staphylococcus aureus* bei sporas formuojančias bakterijas kaip *Bacillus cereus* ir *Clostridium perfringens*. Šiuos bakteriocinus sieja siauras veikimo spektras ir didelis aktyvumas prieš *L. monocytogenes*. IIa klasės bakteriocinai dar pasižymi konservatyviu N-galiniu domenu (Y-G-N-G-V-X₁-C-X₂-K/N-X₃-X₄-C, kur X – bet kuri aminorūgštis). Ši hidrofiliinė, katijoninė seka kartais dar vadinama „pediocino dėžute“. Visi į pediociną panašūs bakteriocinai turi du cisteinus N gale, kurie sudaro disulfidinį tiltelį (Drider ir Rebuffat, 2011).

Šios klasės bakteriocinai yra nemodifikuojami, išskyrus lyderinės sekos atskėlimą nuo bakteriocino pirmtako. Šis atskėlimas dažnai vyksta specifinėje Gly-Gly apdoravimo vietoje ir yra atliekamas kartu perkeliant peptidą į ląstelės išorę. Bakteriociną perkelia tam skirtas ABC transporteris ir jo pagalbiniis baltymas (Ennahar et al. 2000: 85–106). Hidrofobinis ir/arba amfifilinis C-galinis domenai yra mažiau konservatyvūs. Pasiūlyta, kad konservatyvūs N-galinis regionas yra atsakingas už nespecifinį jungimąsi prie ląstelės paviršiaus, o mažiau konservatyvūs C-galinis domenai nulemia specifiškumą taikiniui (Drider ir Rebuffat, 2011).

IIb klasei priklauso dviejų peptidų nemodifikuoti bakteriocinai. Jie daugiausia randami pienerūgštėse bakterijose. Koduojantys šiuos bakteriocinus genai visada randami vienas prie kito, tame pačiame operone, o imuniteto baltymas, suteikiantis apsaugą nuo abiejų peptidų, irgi randamas visai šalia. ABC transporterį koduojantis genas randamas tame pačiame, arba artimame operone. Abiejų peptidų aminorūgščių sekos varijuoja, konservatyvūs yra tik dažnas GxxxG motyvas, esantis abiejuose peptiduose. Šis motyvas reikalingas sąveikauti dviem spiralėms vienai su kita ir yra būtinas bakteriocino antimikrobiniam aktyvumui (Drider ir Rebuffat., 2011). Šios klasės bakteriocinų aktyvumui reikalinga sinergetinė abiejų peptidų sąveika, kad pasireikštų antimikrobinis aktyvumas. Pasitaiko bakteriocinų, kurie individualiai turi antimikrobinį poveikį,

tačiau komplementaraus peptido prijungimas stipriai padidina aktyvumą. Du komplementarūs peptidai yra aktyvūs nanomolinėse ar net pikomolinėse koncentracijose (Mokoena, 2017).

Šių bakteriocinų sintezė yra reguliuojama 3 komponentų quorum sensing sistemos (stimulas ir atsakas, priklausomas nuo ląstelių tankumo), kuri susideda iš indukcijos faktoriaus, su membrana asocijuoto baltymo histidino kinazės ir atsako reguliatorių.

IIC klasei priskiriami bakteriocinai, neturintys N-galinės lyderinės sekos, kuri paprastai funkcionuoja kaip sekrecijos ir modifikacijos atpažinimo seka ir jį sintetinančioje ląstelėje palaiko bakteriociną neaktyvų.

IId klasei priklauso ne į pediociną panašūs, vieno peptido bakteriocinai. Tai heterogeninė peptidų grupė, sudaryta iš nesusijusių, linijinio peptido bakteriocinų, turinčių skirtingas struktūras, sekrecijos ir veikimo mechanizmus (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

1.2.3. III klasės bakteriocinai

Tai didelės molekulinės masės karštyje nestabilūs peptidai/baltymai, paprastai sudaryti iš keleto skirtingų domenų: translokacijos, jungimosi prie receptoriaus ir antibakterinio aktyvumo (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Priešingai nei kiti bakteriocinai, jie ne visada turi specifinius imuniteto baltymus, tačiau ląstelės sintetinančios šiuos bakteriocinus gali modifikuoti savo ląstelės sienelę, kad įgytų atsparumą (Cotter et al., 2005). Pagal savo veikimo mechanizmą šie bakteriocinai gali būti išskirti į dvi atskiras grupes.

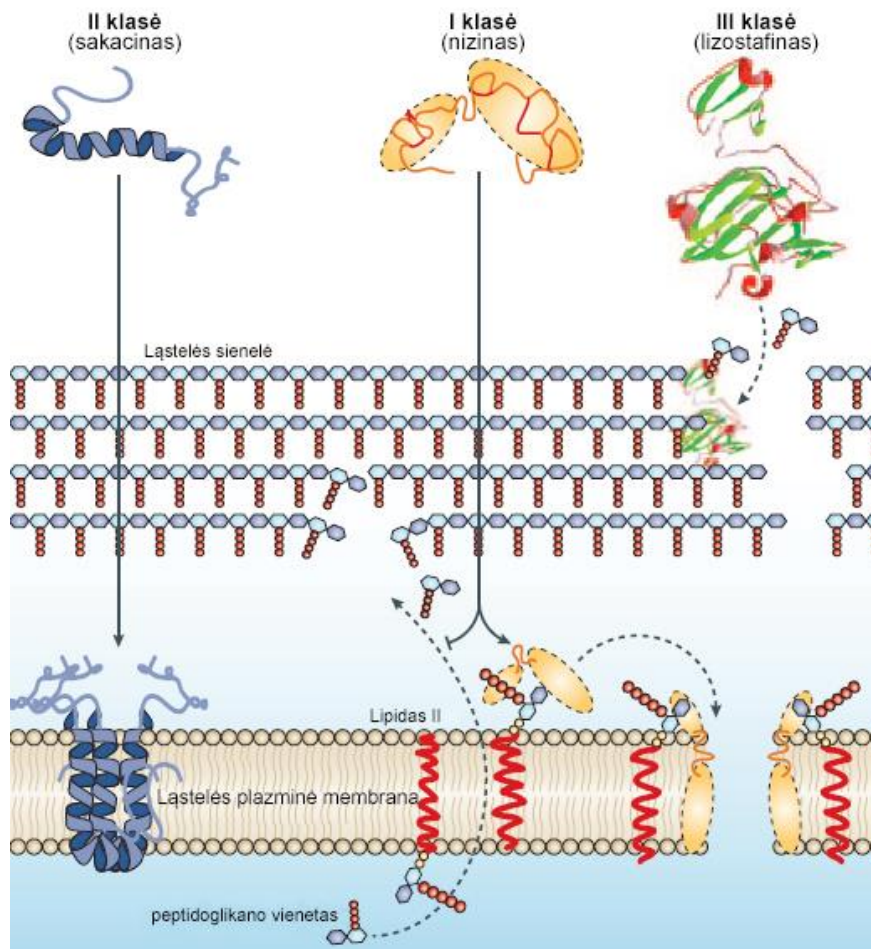
IIIa klasės bakteriocinai, kitaip dar vadinami bakteriolizinais. Šie bakteriocinai ardo bakterijų sienelę, sudarytą iš peptidoglikano, kuri yra svarbi ląstelei dalijantis, taip pat suteikiant ląstelei stiprumo ir standumo, palaikant ląstelės formą ir saugant nuo osmotinės lizės.

Šios bakteriocinų klasės pavyzdys – lizostafinas. Šis bakteriocinas turi N-galinį peptidazės domeną, atsakingą už katalitinį aktyvumą, ir C-galinį domeną, atsakingą už jungimąsi prie peptidoglikano substrato. Šis fermentas laisvai pereina jautrių stafilokokų kapsulę, ir ardo ląstelių sienelę per peptidinius tiltelius (Bastos et al. 2010: 1139–1161).

IIIb klasei priklauso nelizuojantys didelės molekulinės masės bakteriocinai. Ši didelių bakteriocinų klasė neardo peptidoglikano sluoksnio bakterijose. Disgalaktinas yra vienas šios klasės bakteriocinų pavyzdžių. Manoma, kad jis turi dviejų domenų struktūrą. C-galiniame domene disgalaktinas turi hidrofobinių aminorūgščių liekanų, kurios formuoja regioną, galintį įsiterpti į membraną (Swe et al., 2009).

1.3. Veikimo mechanizmas

Paprastai bakteriocinai jungiasi prie specifinių receptorių, randamų ant mikroorganizmų paviršiaus. Šie receptoriai palengvina bakteriocinų transportą per ląstelės membraną. Bakteriocinai gali veikti: 1. Sudarydami poras membranose, paveikdami membranų potencialą ir indukuodami K^+ jonų, ATP ir aminorūgščių ištekėjimą, 2. Sukeldami ląstelės lizę, 3. Sutrikdydami ar slopindami DNR, RNR ir baltymų sintezę. Kai kurių bakteriocinų iš skirtingų klasių veikimo mechanizmas pavaizduotas 1.2 pav. Bakteriocinai yra specifiniai savo veikimo atžvilgiu ir dažnai turi aktyvumą tik prieš artimas bakterijų rūšis, nors yra ir turinčių platų veikimo spektrą (Józefiak ir Sip, 2013).



1.2 pav. Skirtingų bakteriocinų klasių atstovų veikimo mechanizmas (Cotter, Hill ir Ross, 2005)

1.3.1. Membranų permeabilizacija (padidintas membranų pralaidumas)

Dauguma bakteriocinų, kurių aminorūgščių sekos yra žinomos, yra amfifiliniai, katijoniniai peptidai, turintys α -spirales, β -klostės arba į sraigatą panašias antrines struktūras. Remiantis amfifilinėmis bakteriocinų charakteristikomis, yra bent du mechanizmai, kurie paaiškintų jų veikimą didinant membranų pralaidumą. Jie gali veikti kaip keleto žingsnių poracijos kompleksas,

kurio metu bakteriocino monomerai tarpusavyje susijungia, įsiterpia ir oligomerizuojasi citoplazmineje membranoje, kad suformuotų porą, kurioje hidrofilinės liekanos lokalizuotos poros viduje, o hidrofobinės išorėje (nizinas, pediocinas PA-1, laktocinas A ir B). Alternatyviai, bakteriocinai gali sutrikdyti membranos vientisumą veikdami kaip detergentai. Taip jie sutrikdo bioenergetinius ląstelės parametrus ir panaikina įsisotinimo kinetiką.

Skirtingi bakteriocinai, didinantys membranos pralaidumą, veikia panašiai, tačiau jiems reikalingos skirtingos sąlygos, kad pasiekti jų efektyvų veikimą. Lantibiotikai veikia ant energizuotų membranų. Nizino N-galinis domenas yra atsakingas už įsiterpimą į lipidų bisluoksnį, o C-galinė dalis atsakinga už pirminę sąveiką su membranos paviršiumi. Prieš formuojant poras, nizinas turi prisijungti prie peptidoglikano prekursoriaus lipido II, esančio membranoje. Kiti bakteriocinai veikia neenergizuotas membranas, tačiau jiems reikia membranos receptoriaus baltymo. Mutacijos receptoriuose suteikia atsparumą bakteriocinams. Nissen-Meyer et al., 1992m. atlikti tyrimai su į pediociną panašiais bakteriociniais parodė, kad slopinamo aktyvumo specifiskumas koreliuoja su C-galinio bakteriocino domeno seka. Šie rezultatai siūlo, kad šis domenas nulemia bakteriocino specifiskumą (Doyle ir Buchanan, 2013).

1.3.2. Genų raiškos ir baltymų produkcijos slopinimas

Bakteriocinai gali žudyti kitas ląsteles trigdydami jų DNR, RNR ir baltymų metabolizmą. Pavyzdžiui, MccB17 pereina išorinę membraną per porinę OmpF, o per vidinę membraną yra perkeliamas peptido transporterio. Ląstelės viduje jis funkcionuoja neleisdamas girazei superspiralizuoti DNR ir taip trikdo DNR replikaciją. Bakteriocinas MccJ25 patekęs į ląstelę slopina transkripciją blokuodamas RNR polimerazės antrinį kanalą. Kiti bakteriocinai jungiasi prie 23S rRNR subvieneto ir blokuoja aminoacil-tRNR jungimąsi prie 50S ribosomos. GE2270 A jungiasi prie bakterijos šaperono elongacijos faktoriaus Tu ir inhibuoja baltymų sintezę (Cotter, Ross, ir Hill, 2013).

1.3.3. Poveikis ląstelės sienelėi

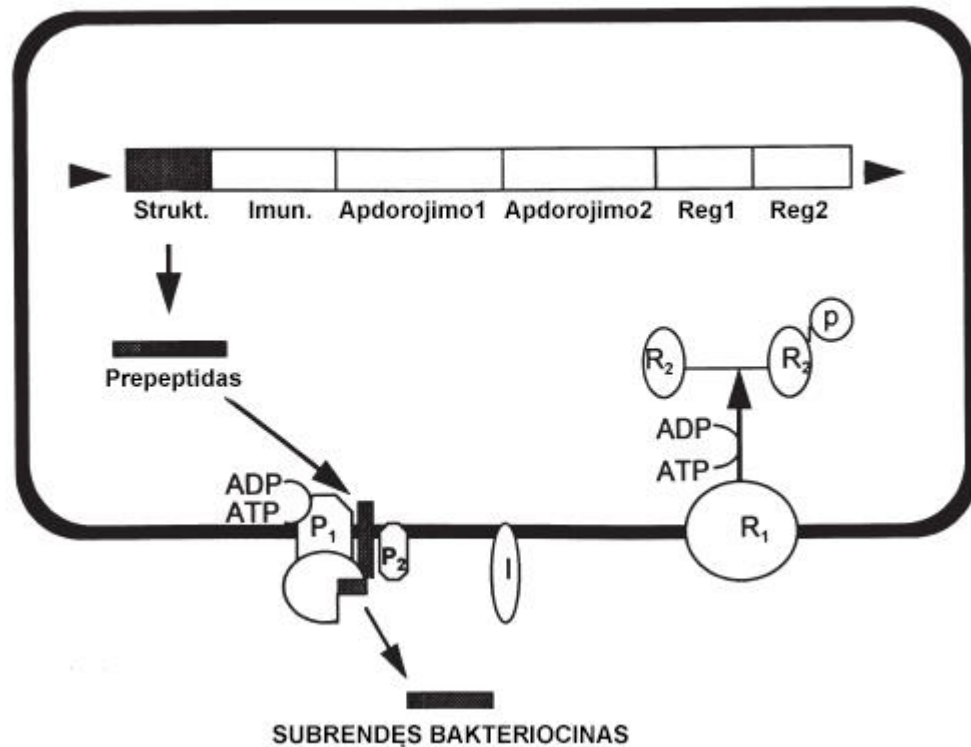
Nors dauguma bakteriocinų veikia jautrias ląsteles formuodami poras jose, pasitaiko bakteriocinų veikiančių gramteigiamų ląstelių sienelę. Vienas iš būdų – jungimasis prie peptidoglikano prekursoriaus lipido II. Šitokį veikimo mechanizmą turi lantibiotikai, nmodifikuoti bakteriocinai, dviejų peptidų bakteriocinai ir keletas gramneigiamų bakterijų kolicinų. Nizinas naudoja lipidą II kaip prisijungimo molekulę porų formavimui. Lipidas II tampa dalimi poros ir yra perdislokuojamas iš vietos, kurioje jis yra reikalingas ląstelės sienelės

biosintezei. Tokiu būdu, be porų formavimo, dar sutrikdomas ląstelės augimas ir dalijimasis. Kitaip nei nizinas, mersacidinas yra ne poras formuojantis bakteriocinas. Jis jungiasi prie lipido II ir slopina transglikozilinimo žingsnį ląstelės sienelės biosintezės metu, nepaveikdamas DNR, RNR ar baltymų biosintezės.

Yra apibūdinta keletas didelių, karštyje labilių bakteriocinų, kurie hidrolizuoja ląstelės senele. Jie yra priskiriami IIIa bakteriocinų klasei, dar vadinamai bakteriolizinais. Šie bakteriocinai paprastai grupuojami į turinčius katalitinį aktyvumą ir taikinio atpažinimo domeną. Vienas pavyzdžių – jau minėtas lizostafinas, kuris ardo peptidinius tiltelius tarp peptidoglikano monomerų, sudarytus vien iš glicino. Milericinas B turi aktyvumą prieš daugelį gramteigiamų bakterijų. Šis bakteriocinas skelia peptidoglikaną per peptidų šonines grandines ir per tiltelį. Yra randami bakteriocinai hidrolizuojantys ir gramneigiamų bakterijų peptidoglikano sluoksnį. Pesticinas, sintetinamas *Yersinia pestis*, sudarytas iš 3 domenų: translokacijos, jungimosi prie receptoriaus ir aktyvaus katalitinio domeno, kuris yra panašus į baltymus susijusius su lizocimu. Šis bakteriocinas yra aktyvus prieš kitas *Yersenia* rūšis ir prieš keletą *E. coli* kamienų. Pesticinas veikia skeldamas β 1-4 glikozidinius ryšius tarp NAM ir NAG (Roces et al. 2012: 259–272).

1.4. Bakteriocinų molekulinė charakteristika

Genetinė informacija, koduojanti bakteriocinų produkciją ir imunitetą gali būti lokalizuota plazmidėse ir/ar chromosomoje bei transpozonuose. Struktūriniai genai, koduojantys bakteriocinus, yra operonuose, kurių bendras vaizdas pavaizduotas paveikslėlyje (1.3). Operone paprastai būna bakteriocino struktūrinis genas, taip pat genai, koduojantys imunitetą, bakteriocino brendimą, apdorojimą ir eksportą iš ląstelės, bei genai susiję su bakteriocino biosintezės reguliavimu, tai įvairūs indukcijos faktoriai, atsako reguliatoriai (Lee ir Kim, 2011).



1.3 pav. Bendrinis bakteriocinų operonas. Struktūrinis genas (strukt.) koduoja prepeptidą, kuris yra modifikuojamas ir sekretuojamas apdorojimo genų produktų (P_1 , P_2) ir gali būti reguliuojamas signalo transdukcijos keliu, kurį koduoja Reg1 ir Reg2 genai (R_1 , R_2 šių genų produktai) (Doyle ir Buchanan, 2013)

Realii operonų struktūra skiriasi nuo bendrinės, kadangi ne visi bakteriocinų operonai turi visus genus, pavaizduotus bendroje schemoje. Struktūrinis bakteriocino genas paprastai koduoja prepeptidą, kuris sudarytas iš aktyvaus peptido pirmtako ir N-galinės lyderinės sekos. Lyderinės sekos yra svarbios tam, kad ABC transporteriai atpažintų bakteriocino pirmtaką ir nukirpus jo lyderinę seką eksportuotų subrendusį bakteriociną iš ląstelės. N-galinė seka gali padėti neutralizuoti bakteriocino antibakterinį poveikį, kadangi nesubrendęs bakteriocinas turi daug mažesnę aktyvumą. Manoma, kad ši seka lantibiotikuose turi ir modifikacijos sistemos atpažinimo rolę. Yra žinoma ir keletas bakteriocinų, neturinčių lyderinio peptido. (Cotter et al., 2005)

Imuniteto geno koduojamas baltymas padaro bakteriocinus sintetinančias ląsteles atsparias savo paties produkuojamiems bakteriocinams. Šis imunitetas yra specifinis ir dažnai koordinuotas kartu su bakteriocino sinteze (Lee ir Kim, 2011). Imunitetas bakterijai gali būti suteikiamas specialaus baltymo (I, IIa, IIb, IIc klasių bakteriocinai) arba ABC transporterio (I, IIc klasių bakteriocinai), kuris pumpuoja bakteriociną per membraną iš jį sintetinančios ląstelės. Nors imuniteto baltymai yra skirtingi, visi jie veikia arba izoliuodami bakteriociną, arba konkuruodami dėl receptoriaus. Imuniteto mechanizmai yra aukšto specifiškumo ir dažniausiai nesaugo nuo kitų

bakteriocinų (Cotter et al., 2005). Yra III klasės bakteriocinų, kurių operonuose nėra koduojamas imuniteto baltymo genas. Nuo šių bakteriocinų juos sintetinančios ląstelės apsisaugo keisdamos savo sienelės struktūrą (Cotter et al., 2005).

Apdoravimo ir transporto genai koduoja mažiausiai du baltymus, kurie reikalingi subrendusio bakteriocino formavimui. Vienas šių baltymų – tai ABC transporteris, kuris naudoja ATP energiją, kad perkeltų bakteriociną į ląstelės išorę. Šis transporteris turi du domenus: į membraną įsiterpiantį domeną ir citoplazminį, ATP prisijungiantį domeną. Bakteriocinai, kurie yra priklausomi nuo ABC transporterio sistemos gali būti padalijami į dvi atskiras grupes. Pirmoji tai bakteriocinai, turintys Gly-Gly seką lyderiniame peptide. Šie bakteriocinai yra sekretuojami unikalių ABC transporterių, kurie turi proteolitinį aktyvumą ir skelia lyderinį peptidą per Gly-Gly motyvą, taip sekretuodami jau aktyvų bakteriociną. Antroji bakteriocinų grupė neturi šio motyvo ir jų lyderinis peptidas nukerpamas proteazių, koduojamų bakteriocinų operonuose. Sekretacijos procese dalyvauja dar vienas papildomas baltymas (Cleveland et al. 2001).

1.5. Bakteriocinų panaudojimas

Pirminė bakteriocinų rolė yra suteikti juos sintetinančioms bakterijoms pranašumą prieš kitas bakterijas, užimančias tą pačią ekologinę nišą. Šis antagonistinis poveikis gali būti panaudojamas biotechnologijoje (Bastos et al. 2010).

1.5.1. Bakteriocinų panaudojimas maisto pramonėje

Bakteriocinų panaudojimas maisto pramonėje gali turėti daug privalumų: sumažinama rizika užsikrėsti nuo maisto, padidinamas maisto produktų galiojimo laikas, sumažinamas cheminių priedų kiekis ir fizinio apdoravimo intensyvumas, taip geriau išsaugant maistinę vertę ir sumažinant kainą. Tai taip pat padeda tenkinti vartotojų norus, kad maistas būtų kuo natūralesnis ir turėtų ilgesnį galiojimo laiką (Drider ir Rebuffat, 2011)

Maisto pramonėje bakteriocinai gali būti naudojami įvairiais būdais. Jie gali būti tiesiog įdedami į maisto produktus arba tiesiogiai inokuliuojant bakteriociną sintetinantį kamieną. Į maistą dedami bakteriocinai gali būti gryni arba pusiau išgryninti, kaip, pavyzdžiui, nizinas, kuris žinomas Nisaplin™ vardu. Šiuo metu, be nizino tik pediocinas PA-1 yra pardavinėjamas komerciškai kaip maisto priedas (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Yra parodytas bakteriocinų potencialas juos panaudoti mėsos, pieno produktų, žuvies, alkoholinių gėrimų, kiaušinių, fermentuotų daržovių

bioprezervacijoje, juos naudojant vienus, arba kombinuojant kartu su kitais maisto apsaugos metodais (Cotter et al., 2005)

Kitas praktiškas būdas panaudoti bakteriocinus, tai bakteriocinogeninius kamienus (ypač pienarūgščių bakterijų) panaudoti kaip starterines kultūras dešrų ar pieno produktų fermentacijoje. Taip išvengiama bakteriocino gryninimo etapo ir padidinama maisto kokybė bei saugumas. Bakteriocinogeninių kamienų sintetinamas enterocinas AS-48 gali tiesiogiai veikti maistą gadinančias ir patogenines bakterijas, pavyzdžiui *Listeria monocytogenes* dešrose arba *Staphylococcus aureus* pieno produktuose (Hassan et al., 2014).

Dažnai maisto produktai yra užkrėsti bakterijų sporomis. Jos kelia didelį nerimą, kadangi yra itin atsparios temperatūriniam ir cheminiam apdorojimui. Bakteriocinai rodo didelį potencialą, kovojant su šia problema. *Pediococcus pentosaceus* sintetinami III klasės bakteriocinai pentocinas L ir pentocinas S turi sporostatinį aktyvumą prieš *Bacillus cereus* sporas, kuris neleidžia joms sudygti (Egan et al., 2016).

1.5.2. Bakteriocinų panaudojimas ląstelės sienelės tyrimuose

Bakteriocinai gali būti naudojami ne tik dėl savo antibakterinių savybių. Aktyvūs prieš ląstelės sienelę bakteriocinai gali būti labai naudingi studijuojant ląstelės sienelės biologiją ir atsaką į ląstelės apvalkalo jaučiamą stresą. LCN972 bakteriocinas buvo panaudotas ištirti industrijoje svarbaus *Lactococcus lactis* atsaką į ląstelės sienelės pažeidimus. Šie tyrimai svarbūs, kadangi *L. lactis* yra plačiai naudojamas fermentacijos procesuose ir turi toleruoti įvairaus streso sąlygas. *L. lactis* transkripcinis atsakas į Lcn97 padėjo atpažinti baltymus, kurie yra svarbūs ląstelės sienelės apsaugoje. Mutantų, atsparių ląstelės sienelę veikiantiems bakteriocinams, charakterizavimas taip pat svarbus, kadangi gali padėti atrinkti atsparesnius kamienus ir atskleisti mechanizmus, pagal kuriuos ląstelės tampa atsparios. Šią informaciją gali suteikti bakteriocinų tyrimai (Roces, Rodríguez, ir Martínez, 2012). Rekombinantinis III klasės bakteriocinas lizostafinas ekspresuotas *E. coli* ląstelėse yra komerciškai parduodamas Sigma-Aldrich, ir plačiai naudojamas stafilokokų genetiniuose tyrimuose, izoliuojant jų DNR, taip pat formuojant protoplastus ir atskiriant stafilokokų kamienus (Bastos, Coutinho, ir Coelho, 2010).

1.5.3. Bakteriocinų panaudojimas degalų industrijoje

Bakteriocinai išskirti iš bakterijų, randamų naftos gręžiniuose, gali būti panaudojami kaip biocidai degalų industrijoje, kontroliuojant panašių bakterijų sukeltas problemas. *Bacillus cereus* H₂O-1 kamieno, išskirto iš naftos gręžinio Brazilijoje, sintetinamas bakteriocinas

potencialiai gali būti panaudojamas naftos telkinių vamzdynams valyti, kadangi slopina ten besiveisiančių sierą redukuojančių bakterijų bioplėvelių sudarymą ir tuo pačiu sumažina biokoroziją (Abriouel et al., 2011).

1.5.4. Panaudojimas prieš termofilines bakterijas

Termofilinės bacilos yra potencialus užkratas įvairiose industrijose, kur palaikomos aukštesnės temperatūros (40-65 °C) gaminimo procese ar produkto laikyme: popieriaus gamyboje, sulčių pasterizacijoje, dehidratuotų vaisių gamyboje ir pieno pramonėje. Pieno apdorojimo kontekste, termofilinės bacilos gali formuoti endosporas ir bioplėveles. Bioplėvelės formuojamos ant įrangos bei vamzdynuose yra opi problema ir dažna užkrato priežastis. Be to, termofilai geba sintetinti fermentus ir rūgštis, kurie gadina produktų skonį, todėl yra potencialūs gedimo organizmai (Burgess, Lindsay ir Flint, 2010). Bakteriocinai, veikiantys prieš termofilines bakterijas galėtų būti šios problemos išeitis.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Bakterijų kamienai ir auginimo sąlygos

Parageobacillus genomospecies 1 (NUB 36187) kamienas buvo naudotas kaip indikatorinis kamienas bakteriocino aktyvumui nustatyti. Darbe naudoti keli skirtingi *Escherichia coli* kamienai: *E. coli* DH5 α plazmidės kiekiui padauginti, *E. coli* BL21 (DE3) ir *E. coli* Rosetta (DE3) baltymų raiškai vykdyti. Visos augimo terpės naudotos šiame darbe yra nurodytos 2.1 lentelėje. Termofiliniai kamienai buvo auginami skystoje maitinamojo buljono (MB) terpėje papildytoje druskomis 55 °C temperatūroje 200 rpm. *E. coli* kamienai buvo auginami Luria-Bertani (LB) terpėje 37 °C temperatūroje 200 rpm. SOC terpė naudota transformantų regeneravimui. Agarizuotos MB ir LB terpės buvo gaminamos pridedant į jas agarą (1,5 %). Antibiotikai buvo naudojami kaip atrankos žymenys ir į terpę dedami atitinkamomis koncentracijomis pagal poreikį (ampicilinas 50 μ g/mL, kanamicinas 50 μ g/mL, chloramfenikolis 34 μ g/mL)

LB terpė sterilinta 121 °C 20 min., MB – 121 °C 30 min. SOC terpė sterilinta be gliukozės 121 °C 20 min. Jai atvėsus iki ~50 °C įpilamas filtruotas gliukozės tirpalas.

2.1 lentelė. Terpių sudėtis

Terpė	Sudėtis
LB	10 g/L peptono 5 g/L mielių ekstrakto 5 g/L NaCl
MB	10 g/L triptono 5 g/L mėsos ekstrakto 5 g/L NaCl +Druskos 0,5 μ mol/L MnSO ₄ 1 μ mol/L ZnSO ₄ 0,075 mmol/L KCl 1 mmol/L MgCl ₂ 2 mmol/L CaCl ₂

Terpė	Sudėtis
SOC	5 g/L mielių ekstrakto 20 g/L triptono 0,584 g/L NaCl 0,186 g/L KCl 2,4 g/L MgSO ₄ 20 mL/L 20% gliukozės tirpalo

2.2 lentelė. Naudotos plazmidės

Plazmidė	Kopijų skaičius ląstelėje	Atrankos žymuo	Fermentai, naudoti restrikcijai
pET26 + geo26	~40	Kanamicinas	NcoI, XhoI
pET21 + geo26	~40	Ampicilinas	NheI, XhoI
pETDuet-1 + geo26	~40	Ampicilinas	BamHI, XhoI
pACYCDuet-1 + geo26	~10-12	Chloramfenikolis	BamHI, XhoI

2.2. Bioinformatiniai metodai

Bakteriocino signalinis peptidas ir jo kirpimo vieta nustatyta naudojant SignalP 4.1 programą. Bakteriocino amino rūgščių seka lyginta su kitomis baltymų sekomis NCBI duomenų bazėje naudojant BLASTp algoritmą.

2.3. Kompetentinių ląstelių ruošimas elektrotransformacijai

Naktinės *E. coli* bakterijų kultūros, augintos LB terpėje, persėjamos į 100 mL šviežios LB terpės santykiu 1:99. Toliau bakterijų kultūra auginama purtyklėje 37 °C temperatūroje 200 rpm, kol pasiekiamas ląstelių optinis tankis esant 600 nm bangos ilgiui (OT₆₀₀) 0,5. Tuomet ląstelės vėsinaamos ledo vonelėje 15-20 min (po šio žingsnio ląstelės visada laikomos šalta).

Atvėsusios ląstelės centrifuguojamos +4 °C temperatūroje 15 min. prie 5000x g. Nucentrifugavus nupilamas supernatantas, ląstelių nuosėdos suspenduojamos 30 mL sterilaus distiliuoto šalto vandens ir vėl centrifuguojamos 15 min. esant 6000x g. Plovimas steriliu vandeniu pakartojamas dar du kartus, antra kartą centrifuguojant 20 min. esant 6500x g, trečią kartą – 25 min 7000x g.

Po trečio plovimo nupilamas supernatantas, ląstelės suspenduojamos 3 mL 10% glicerolio tirpale ir centrifuguojamos esant 5000x g 3 min. Baigus centrifuguoti supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 1 mL 10% glicerolio tirpale ir išpilstomos po 50 µL į mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai su pagamintomis kompetentinėmis ląstelėmis laikomi -70 °C temperatūroje.

2.4. Geobacilino 26 klonavimas į *E. coli*

Heterologinei geobacilino 26 ekspresijai *geo26* genas buvo padaugintas PGR metodu nuo *Geobacillus* sp. 15 kamieno genomines DNR. Geobacilino 26 struktūrinis genas, su koduojama signalinio peptido seka ir be signalinio peptido sekos buvo padaugintas naudojant pradmenis, kurie pateikti 2.3 lentelėje. Skirtingi pradmenys buvo sukonstruoti, siekiant įterpti geną su ir be signalinio peptido į skirtingas plazmides. Konstruojant pradmenis buvo įterptos atitinkamos restriktazių atpažinimo sekos.

PGR buvo vykdoma 50 µL tūryje. Reakcijos mišinyje buvo 1,25 U Phusion High-Fidelity DNR polimerazės (Thermo Fisher scientific), 200 µM kiekvieno nukleotido (dNTP), po 0,5 µM pradmenų ir 250 ng genomines DNR. PGR ciklai nustatyti pagal polimerazės naudojimosi instrukciją, o naudota pradmenų prikibimo temperatūra (T^a) – 52 °C. PGR produktai ir plazmidės grynintos naudojant PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific), kerpant DNR iš elektroforezės gelio naudota Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific). PGR produktų ir plazmidžių karpymui naudotos atitinkamos restriktazės (Thermo Fisher Scientific). DNR ligavimui naudota T4 DNR ligazė (Thermo Fisher Scientific). Šie rinkiniai naudoti pagal gamintojo rekomendacijas. Vykdam kolonijų PGR vietoje genomines DNR į reakcijos mišinį buvo įdedamos užaugusių transformantų ląstelės.

Geo26 genui, kuris koduoja bakteriociną su signaliniu peptidu, padauginimui naudoti FOR_pET21_bac26 ir REV_pET21/pET26_bac26 pradmenys. PGR produktas įklonuotas į pET21 plazmidės multikloninį saitą, naudojant NheI ir XhoI restriktazes, ir gautas pET21+geo26sp konstruktas. Geo26 genui, kuris koduoja bakteriociną be signalinio peptido, padauginti naudoti FOR_pET21_SignalP_bac26 ir REV_pET21/pET26_bac26 pradmenys. PGR produktas įklonuotas į pET21 plazmidės multikloninį saitą, naudojant NheI ir XhoI restriktazes, ir gautas pET21+geo26 konstruktas.

Geo26 genui, kuris koduoja bakteriociną su signaliniu peptidu, padauginimui naudoti FOR_pET26_bac26 ir REV_pET21/pET26_bac26 pradmenys. PGR produktas įklonuotas į pET26 plazmidės multikloninį saitą, naudojant NcoI ir XhoI restriktazes, ir gautas pET26+geo26sp konstruktas. Geo26 genui, kuris koduoja bakteriociną be signalinio peptido, padauginimui naudoti FOR_pET26_SignalP_bac26 ir REV_pET21/pET26_bac26 pradmenys. PGR produktas įklonuotas į pET26 plazmidės multikloninį saitą, naudojant NcoI ir XhoI restriktazes, ir gautas pET26+geo26 konstruktas.

Geo26 genui, kuris koduoja bakteriociną su signaliniu peptidu, padauginimui naudoti FOR_pETDuet_bac26 ir REV_pETDuet_bac26 pradmenys. PGR produktas įklonuotas į pETDuet-1 plazmidės multikloninį saitą, naudojant BamHI ir XhoI restriktazes, ir gautas pETDuet-1+geo26sp konstruktas. Geo26 genui, kuris koduoja bakteriociną be signalinio peptido, padauginimui naudoti FOR_pETduet_-SignalP_bac26 ir REV_pETduet_bac26 pradmenys. PGR produktas įklonuotas į pETDuet-1 plazmidės multikloninį saitą, naudojant BamHI ir XhoI restriktazes, ir gautas pETDuet+geo26 konstruktas.

Geo 26 genui su signalinio peptido seka ir įterptu histidino liekanų žymeniu N-gale padauginti naudoti FOR_pETDuet_bac26 ir REV_pETDuet_bac26 . PGR produktas įterptas į pACYCDuet-1 multikloninį saitą, naudojant BamHI ir XhoI restriktazes, ir gautas pACYCDuet+geo26 konstruktas. pACYCDuet-1 vektoriui su Geo26 genu be histidino liekanų žymens padauginti naudoti FOR_pET26_bac26 ir REV_pETDuet_bac26 pradmenys. PGR produktas įterptas į pACYCDuet-1 plazmidės multikloninį saitą, naudojant NcoI ir XhoI restriktazes, gautas pACYCDuet-6His+geo26 konstruktas.

Gauti pET21+geo26sp, pET21+geo26, pET26+geo26sp, pET26+geo26, pETDuet+geo26sp, pETDuet+geo26, pACYCDuet-6his+geo26, pACYCDuet+geo26 konstruktai, transformuoti elektroporacijos metodu (18 kV/cm, 5ms) į *E. coli* DH5α kamieną. Po elektroporacijos ląstelės regeneruotos 1 val. SOC terpėje 37 °C temperatūroje, tuomet išsėtos ant agarizuotos LB terpės su atitinkamu antibiotiku ir per naktį inkubuotos termostate 37 °C temperatūroje. Išaugus transformantams kolonijų PGR metodu patikrinamas plazmidės su geo26 genu buvimas transformantuose ir viena iš kolonijų užsėjama į skystą LB terpę ir auginama 37 °C purtyklėje per naktį. Tuomet iš bakterijų kultūros išskiriama plazmidė, kuri toliau transformuojamos elektroporacijos metodu į *E. coli* raiškos kamienus.

2.3 lentelė. Pradmenys

Pradmens pavadinimas	Seka
FOR_pET26_bac26	CAGCCATGGCGTTTTTTGCTGTGTTTATGGTCTTTG
FOR_pET21_bac26	AGTCATGGCTAGCATGTTTTTTGCTGTGTTTATGGTCTTTG
FOR_pETduet_bac26	CGAGGATCCGATGTTTTTTGCTGTGTTTATGGTCTTTG
FOR_pET26_SignalP_bac26	CATCCATGGAGTCTACTGAACTAAATACAGACTTAC
FOR_pETduet_SignalP_bac26	CTGGATCCCGAGTCTACTGAACTAAATACAGACTTAC
FOR_pET21_SignalP_bac26	CAGTCGCTAGCATGGAGTCTACTGAACTAAATACAGACTTAC
REV_pETduet_bac26	TCACTCGAGTTAACGAATAGTAATTCTACCAAAGTAAAAACGACAG
REV_pET12/pET26_bac26	ACGTACCTCGAGACGAATAGTAATTCTACCAAAGTAAAAACGAC

2.5. Rekombinantinio baltymo ekspresija

E. coli raiškos kamienai (BL21 (DE3) ir Rosetta (DE3)), su transformuotais konstruktais auginti LB terpėje 37 °C purtyklėje aeruojant su atitinkamu antibiotiku. Ląstelės auginamos, kol OT_{600} pasiekia 0,6. Pasiėkus reikiamą optinį tankį, baltymų raiška indukuojama terpę papildžius 1mM IPTG ir toliau auginant ląsteles 3 val. Po indukcijos ląstelės surenkamos jas centrifūguojant (5000x g, 20 min., 4 °C), tuomet ląstelių nuosėdos suspenduojamos natrio fosfato buferyje (50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, pH = 8)

2.6. Elektroforetinė analizė

NDS-PAGE atliekama pagal Laemmli (Ian M. Rosenberg, 1996). Baltymai skirstomi 15 % SDS-poliakrilamido gelyje 200 V 45 min. Po elektroforezės gelis dažomas Page Blue™ baltymų dažymo tirpalu (Thermo Fisher Scientific). Vizualizuotos baltymų juostelės lyginamos su kartu forezėje leista baltymų liniuote PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

2.7. Gryninimas Ni^{2+} afininės chromatografijos metodu

Surinktos ląstelės po indukcijos ardomos ultragarsu (20% amplitudė, sonifikuojama 2 s, tuomet pauzė 5 s). Suardytos ląstelės centrifuguojamos esant 14000x g 20 min. Supernatante atskiriama tirpi baltymų frakcija nuo netirpios. Pastaroji tirpinama natrio fosfato buferyje su 8M urėjos.

Kolonėlė su užpildyta 1 mL Profinity IMAC Resin (Bio-Rad) gelio pirmiausia plaunama 5 kolonėlės tūriais distiliuoto vandens. Tada ekvilibruojama 5 kolonėlės tūriais natrio fosfato buferio

su 5 mM imidazolo. Ekvilibravus kolonėlę supilamas mėginys (tirpi arba netirpi baltymų frakcija), papildytas 5 mM imidazolo. Mėginys pratekėjęs pro kolonėlę yra surenkamas, o kolonėlė toliau plaunama 5 mL natrio fosfato buferio su 20 mM imidazolo. Pratekėjusios nuplovimo frakcijos taip pat surenkamos. Tada vykdoma baltymų eliuacija, plaunant kolonėlę 5 mL natrio fosfato buferio su 500 mM imidazolo. Surenkamos eliuacijos frakcijos po 1 mL, baltymo grynumas tikrinamas NDS-PAGE baltymų elektroforezės metodu. Gryninant netirpią baltymų frakciją į buferius pridedama 8 M urėjos

2.8. Nudruskinimas

Išgrynintas mėginys nudruskinamas gelchromatografijos metodu. Paruošiamas nudruskinimo buferis (0,05 M NaH₂PO₄, pH 8), jame išbrinkinamas Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech) gelis. Brinkstant geliui buferis keičiamas tris kartus. Išbrinkus, kolonėlė užpildoma 8,5 mL gelio. Užpildyta kolonėlė plaunama 5 jos tūriais buferiu (0,05 M NaH₂PO₄, pH 8), tada užnešama 2,5 mL mėginio, jam subėgus į gelį, ant kolonėlės užpilama buferio, o pratekėjęs mėginys surenkamas (3,5 mL).

2.9. Lėkštelių su jautriu kamieniu ruošimas

Parageobacillus genomospecies 1 (NUB 36187) kamienas tankiai užsėjamas gazonu ant petri lėkštelės su agarizuota MB terpe ir auginamas 4 val. 55 °C temperatūroje. Tuomet lėkštelės plaunamos nuo lėkštelės skysta MB terpe ir pagaminama lėkštelių suspensija, kurios OT₆₀₀ = 1. Lėkštelių suspensija inokuliuojama į skystą terpę su agaru (santykiu 1:99), kol ji dar 55-60 °C. Terpė gerai išmaišoma ir išpilstoma į petri lėkšteles.

2.10. Šulinėlių agare metodas

Petri lėkštelėse su jautriu kamieniu iškerpami šulinėliai. Į juos pilamas neskiestas bei 2, 4, 8, 16 ir t.t. kartų skiestas NB terpe mėginys. Lėkštelė inkubuojama 55 °C termostate per naktį. Po inkubacijos lėkštelėje aplink šulinėlius vertinamos inhibicinės zonos. Bakteriocino aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę $AU/ml = (1ml \times V - 1) / D - 1$, kur V – mėginio tūris mL, o D – didžiausias skiedimų skaičius, kuomet šulinėlyje aiškiai matoma inhibicinė zona (Barefoot ir Klaenhammer 1983).

2.11. Bakteriocino temperatūrinis stabilumas

Išgrynintas ir nudruskintas bakteriocino mėginys inkubuojamas 2 val. skirtingose temperatūrose: 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C. Po inkubacijos jo aktyvumas nustatomas šulinėlių agare metodu

2.12. Kolonijas formuojančių vienetų skaičiavimas

Naktinė jautraus kamieno kultūra, auginta agarizuotoje MB terpėje, persėjama ant šviežios agarizuotos MB terpės ir auginama 4 val. 55 °C termostate. Praėjus šiam laikui ląstelės nuplaunamos skysta MB terpe ir pagaminama bakterijų kultūros suspensija, kurios $OT_{600} = 1$. Tada ant agarizuotos MB terpės lėkštelėje išsėjamos 10, 10^2 , 10^3 , ... ir 10^8 kartų skiestos ląstelės ir auginamos 55 °C termostate per naktį. Po inkubacijos, vertinamas kolonijų skaičius lėkštelėse, kuriose matoma 50 – 400 kolonijų. Visa tai pakartojama tris kartus ir išvedamas vidurkis. Skiedimą padauginus iš kolonijų skaičiaus vidurkio apskaičiuojamas KfV/mL, kuomet $OT_{600} = 1$.

2.13. Minimalios inhibicijos koncentracijos matavimas

Minimali bakteriocino inhibicinė koncentracija nustatyta remiantis Wiegand et al., 2008 metodu, kuris atitinkamai šiame darbe buvo modifikuotas. Naktinė jautraus kamieno kultūra, auginta agarizuotoje MB terpėje, persėjama ant šviežios agarizuotos MB terpės ir auginamos 4 val. 55 °C termostate. Praėjus šiam laikui ląstelės nuplaunamos skysta MB terpe ir pagaminama bakterijų kultūros suspensija, kurios OT_{600} atitinka 10×10^5 KfV/mL. 96 šulinėlių lėkštelėje išpilstoma po 100 μ L neskiesto, bei 2, 4, 8, 16 ir t.t. kartų skiesto bakteriocino mėginio, kuris prieš tai suspenduotas NB terpėje. Į šiuos šulinėlius taip pat išpilstoma po 100 μ L paruoštos ląstelių suspensijos NB terpėje, taip kad kiekviename šulinėlyje būtų $\sim 5 \times 10^5$ KfV/mL. Lėkštelės inkubuojamos per naktį 55 °C purtyklėje 300 rpm. Ryte vizualiai stebima, kokia mažiausia bakteriocino koncentracija dar stabdo ląstelių augimą šulinėlyje ir apskaičiuojama minimali inhibicinė bakteriocino koncentracija.

2.14. Bakteriocino veikimo mechanizmo nustatymas

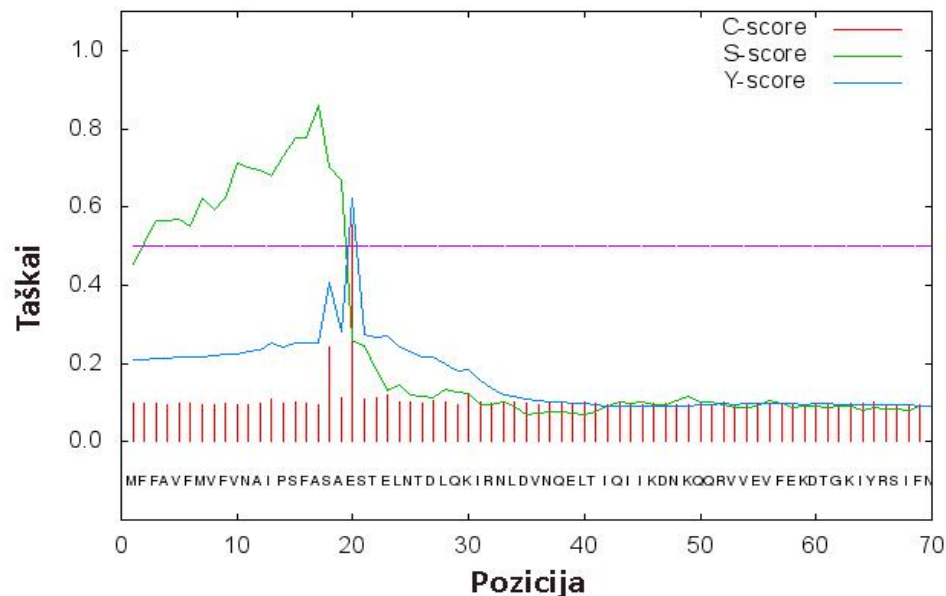
Naktinė jautraus kamieno kultūra užsėjama į 100 mL sterilios MB terpės santykiu 1:99 ir auginama 4 val. 55 °C 200 rpm purtyklėje. Praėjus 4 val. ši kultūra persėjama į sterilią MB terpe santykiu 1:9. Persėjus, ląstelės auginamos 2 val. tuomet į aktyviai augančių ląstelių kultūrą įdedamos skirtingos bakteriocino koncentracijos ir matuojamas optinio tankio pokytis praėjus 0, 30, 60 ir 120 min. nuo bakteriocino įdėjimo.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šis darbas yra jau prieš tai laboratorijoje vykdytų darbų tęsą. geobacilinas 26 (Geo26) prieš tai buvo išgrynintas iš *Geobacillus* sp. 15 kamieno, buvo nustatyta jo aminorūgščių seka ir pagal ją atrastas genas, kuris koduoja šį bakteriociną.

3.1. Geobacilino 26 bioinformatinė analizė

Bakteriocino geobacilino 26 (Geo26) aminorūgščių sekos analizė SignalP programa parodė, kad šis baltymas turi signalinį peptidą (3.1 pav.). C-vertė rodo, kur yra galimos signalinio peptido skėlimo vietos, S-vertė – atskiria aminorūgštis priklausančias signaliniam peptidui, nuo aminorūgščių nepriklausančių jam. Y-vertė išveda vidurkį tarp šių dviejų matmenų ir nurodo tikslesnę restrikcijos vietą. Remiantis C-verte matome, kad yra dvi galimos restrikcijos vietos, tačiau Y-vertė patikslina, kad signalinis peptidas yra 19 aminorūgščių ilgio, ir jo skėlimo vieta yra tarp A (19) ir E (20) aminorūgščių.



3.1 pav. SignalP programos rezultatai

Geo26 aminorūgščių sekos (3.2 pav.) analizė NCBI duomenų bazėje, naudojant BLASTp algoritmą, parodė, kad Geo26 yra hipotetinis baltymas, o jo seka nebuvo panaši į jokio žinomo bakteriocino aminorūgščių seką. Panašūs baltymai yra koduojami *Brevibacillus brevis*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Anoxybacillus* sp. P3H1B ir kai kurių *Bacillus* rūšių kamienų genomuose. Bakteriocino sekoje yra 2 cisteino aminorūgštys, todėl yra tikimybė, kad bakteriocinas

savo struktūroje gali formuoti disulfidinį tiltelį, o netinkamas jo susidarymas ar netgi jo suardymas gali įtakoti bakteriocino aktyvumą.



3.2 pav. Geobacilino 26 aminorūgščių seka

Remiantis šiais rezultatais ir aminorūgščių seka nustatyta, kad šis bakteriocinas yra naujas ir iki šiol netyrinėtas, neturi į save panašių žinomos funkcijos baltymų ir bakteriocinų. Taip pat šis bakteriocinas turi signalinį peptidą. Dėl savo dydžio (24,6 kDa) šis bakteriocinas galėtų būti priskirtas III bakteriocinų klasei.

3.2. Geobacilino 26 geno klonavimas į *E. coli*

Geobacillus sp. 15 kamieno genomine DNR buvo naudojama geobacilino 26 genui padauginti PGR metodu. Kadangi SignalP programa parodė, kad bakteriocinas turi signalinį peptidą, geobacilino 26 genas buvo klonuojamas į plazmidės su signalinio peptido seka (*geo26sp*), ir be jos (*geo26*). Abu šio geno variantai buvo klonuojami į pET21, pET26, pETDuet-1 plazmidės, o į pACYCDuet-1 plazmidę buvo klonuotas genas su signalinio peptido seka bei turintis histidino liekanų žymenį arba be jo. Tam, kad įvertinti šio baltymo heterologinę raišką, naudojant skirtingas plazmidės, ir gauti didžiausią aktyvaus baltymo kiekį. pET21 plazmidė pasirinkta, siekiant įterpti histidino liekanų žymenį C-gale, taip palengvinant baltymo gryninimą. pET26 plazmidė pasirinkta,

nes turi *pelB* signalinę seką, nukreipiančią rekombinantinį baltymą į periplazminę ertmę. Kadangi įtariama, jog baltymas gali turėti disulfidinį tiltelį, o nukreipimas į periplazminę ertmę padėtų tinkamai formuotis šiems tilteliams ir gauti aktyvų baltymą. pETDuet-1 vektorius pasirinktas dėl galimybės įterpti histidino liekanų žymenį N-gale. Klonavimas į pACYCDuet-1 vektorių buvo pasirinktas, kadangi tai mažakopijinė plazmidė, ir buvo tikimasi, jog sulėtėjus baltymo sintetzei nesusidarys netirpių kūnelių.

3.3. Baltymo raiška

Siekiant optimizuoti geobacilino 26 raišką, gauti konstruktai (3.1 lentelė) transformuoti į du skirtingus *E. coli* raiškos kamienus. BL21 (DE3) kamienas pasirinktas dėl savo tinkamumo svetimų genų raiškai. Jis yra plačiai naudojamas rekombinantinių baltymų raiškai, jame yra išveiklintos proteazės. Taip pat pasirinktas ir *E. coli* Rosetta (DE3) raiškos kamienas, dėl pRARE plazmidės turėjimo. Šioje plazmidėje koduojamos tRNR, turinčios retus kodonus. Tai gali būti naudinga, kadangi *geo26* yra genas iš gramteigiamos bakterijos ir klonuojamas į gramneigiamą *E. coli* bakteriją. Visi transformacijose naudoti konstruktai ir kamienai parodyti 3.1 lentelėje:

3.1 lentelė.

Konstruktas	<i>E. coli</i> kamienas	Pavykusi indukcija
pET26+geo26sp	Rosetta (DE3)	-
	BL21 (DE3)	-
pET26+geo26	BL21 (DE3)	-
pET21+geo26sp	Rosetta (DE3)	-
	BL21 (DE3)	+
pET21+geo26	BL21 (DE3)	-
pETDuet-1+geo26sp	Rosetta (DE3)	-
	BL21 (DE3)	-
pETDuet+geo26	Rosetta (DE3)	+
	BL21 (DE3)	-
pACYCDuet+geo26	BL21 (DE3)	-
pACYCDuet-6His+geo26	BL21 (DE3)	-

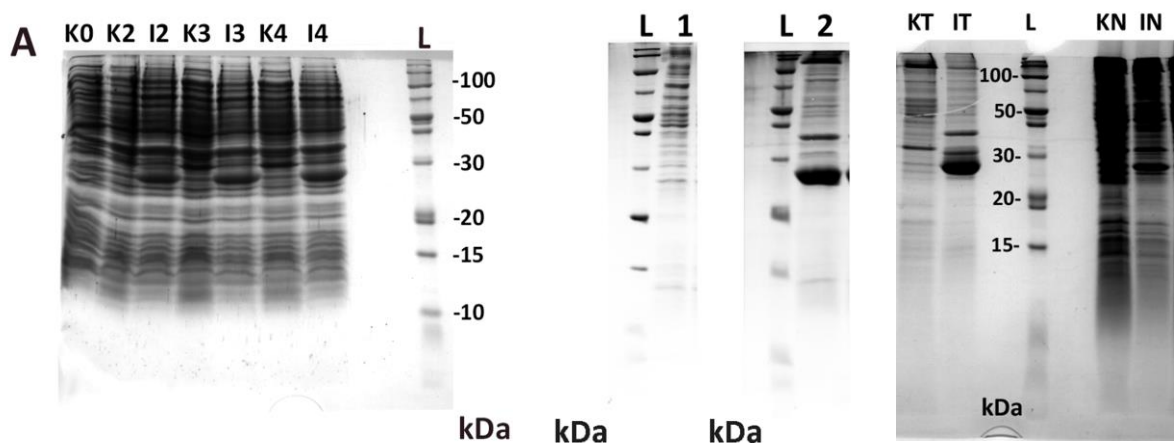
Buvo bandoma pasiekti geobacilino 26 baltymo raišką, naudojant visus gautus konstruktus ir ekspresijos kamienus. Po baltymo indukcijos naudotuose raiškos kamienuose ląstelių mėginiai buvo analizuojami NDS-PAGE metodu. Baltymo raiška buvo gauta tik naudojant pET21+geo26

konstrukta BL21 (DE3) kamiene, bei pETDuet-1+geo26 konstrukta Rosseta (DE3) kamiene. Naudojant kitus konstruktus šiuose kamienuose, baltymo raiškos gauti nepavyko. To tiksli priežastis nėra žinoma, kadangi plazmidžių konstruktai nebuvo sekvenuoti.

3.4. Geobacilino 26 su signaliniu peptidu raiška

Pirmiausia pavyko gauti Geo26sp (geobacilino 26 su signaliniu peptidu) raišką *E. coli* BL21 (DE3) kamiene, naudojant pET21 plazmidę. Lyginant su kontrole, didžiausias baltymo kiekis buvo gautas 3 ir 4 valandą po indukcijos (3.3 pav.). Buvo pastebėta, kad baltymas agreguoja į netirpius kūnelius ir yra netirpioje baltymų frakcijoje (3.4 pav). Gryninant šį Geo26sp Ni²⁺ afininės chromatografijos metodu jis neprikibo prie dervos ir buvo aptinkamas kartu su pratekėjusiais pro kolonėlę baltymais. Manoma, kad susidarant tretinei baltymo struktūrai, histidino liekanų žymuo pasislepia baltymo struktūroje, ir gryninimo metu nesąveikauja su Ni²⁺ jonais. Taip pat buvo nustatyta, kad šis baltymas neturi aktyvumo.

Siekiant gauti geobaciliną 26 tirpioje frakcijoje, po indukcijos ląstelės augintos +18 °C temperatūroje 16 valandų. Tokiomis sąlygomis sulėtėja ląstelių metabolizmas, baltymai sintetinami lėčiau, kas gali pagelbėti jų teisingam išsilankstymui ir įgyti tinkamą tretinę struktūrą. Ląstelių mėginių analizė NDS-PADE metodu parodė, kad šiuo atveju didžioji susintetinto geobacilino 26 dalis yra tirpioje frakcijoje (3.5 pav). Buvo bandyta gryninti šią tirpią baltymo formą Ni²⁺ afininės chromatografijos metodu. Kaip ir anksčiau, geobacilinas 26 buvo vis dar randamas neprikibusių prie kolonėlės baltymų frakcijoje, o baltymo aktyvumo taip pat nebuvo.



3.3 pav. pET21+geo26sp (su signaliniu peptidu) ekspresija *E. coli* BL21 kamiene, kultivuojant 37°C. K0 - neindukuotos 0 val.; K2, K3, K4 - neindukuotos 2,3 ir 4 val., atitinkamai; I2, I3, I4 -indukuotos 2, 3, ir 4 val., atitinkamai; L - baltymų liniuotė.

3.4 pav. Geo26sp klonuoto į pET21 ir ekspresuoto *E. coli* BL21 kamiene tirpi ir netirpi frakcijos, kai bakterijų kultūra auginta 37 °C. L – Baltymų liniuotė, T – tirpi frakcija, N – netirpi frakcija

3.5 pav. Geo26sp klonuoto į pET21 ir ekspresuoto *E. coli* BL21 kamiene tirpi ir netirpi frakcijos, kai bakterijų kultūra auginta 18 °C. KT – neindukuota tirpi frakcija, IT – indukuota tirpi frakcija, KN – neindukuota netirpi frakcija, IN – indukuota netirpi frakcija

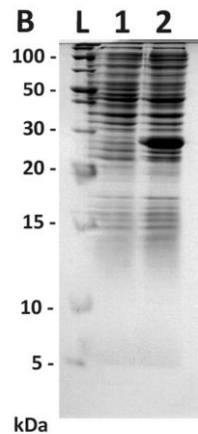
Tą pačią plazmidę įterpus į kitą raiškos kamieną – Rosetta (DE3) baltymo sintezė nevyko.

Iš rezultatų matyti, kad Geo26 su signalinio peptido seka raiška pET21 plazmidėje yra neefektyvi. Gaunamas baltymas, kuris neturi aktyvumo, ir nesigrynina Ni²⁺ afininės chromatografijos metodu

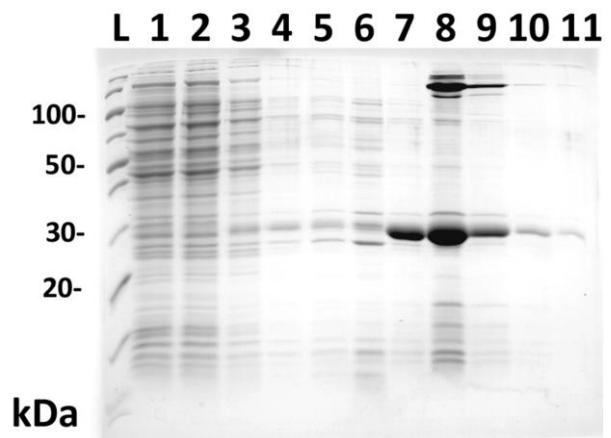
3.5. Geobacilino 26 be signalinio peptido raiška

Toliau buvo analizuojama Geo26 (geobacilinas 26 be signalinio peptido) baltymo raiška *E. coli* Rosetta (DE3) kamiene, naudojant pETDuet-1 plazmidę (3.6 pav.). Atlikus ląstelių mėginių analizę NDS-PAGE metodu, bei išanalizavus tirpią ir netirpią baltymų frakcijas paaiškėjo, kad šiuo atveju geobacilinas 26 neagreguoja į netirpius kūnelius ir yra tirpioje baltymų frakcijoje.

Toliau geobacilinas 26 buvo grynintas Ni²⁺ afininės chromatografijos metodu (3.7 pav.). Kadangi vykdant raišką buvo naudojama pETDuet-1 plazmidė, sintezės metu histidino liekanų žymuo buvo prijungtas baltymo N-gale. Manoma, kad dėl pakeistos histidino liekanų žymens vietos, jis nebesislėpė baltymo struktūroje ir gryninimas buvo sėkmingas.



3.6 pav. pETDuet-1+geo26 be signalinio peptido ekspresija *E. coli* Rosetta (DE3) kamiene. L - baltymų liniuotė; 1 – neprikibę baltymai, 2-6 – kolonėlės plovimo frakcijos, 7-11 – eliuacijos frakcijos



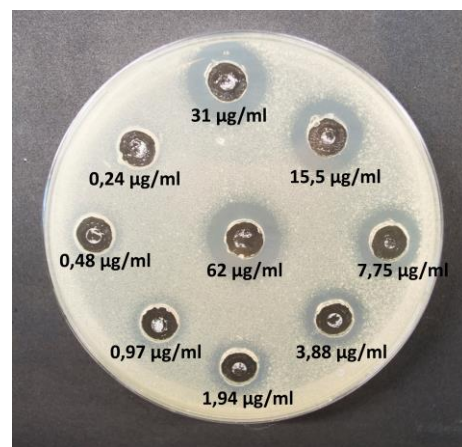
3.7 pav. Geo26 be signalinio peptido gryninimas iš *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelių lizato tirpios frakcijos. L – baltymų liniuotė, 1 – neprikibę baltymai, 2-6 – kolonėlės plovimo frakcijos, 7-11 – eliuacijos frakcijos

Iš 3.7 pav. matyti, kad eliuacijos frakcijose dar yra kitų baltymų. Buvo bandyta optimizuoti baltymo gryninimą ir atsikratyti priemaišų. Tačiau nuplaunant kolonėlę, pakėlus imidazolo koncentraciją iki 30 mM, dėl silpnų sąveikų tarp Ni^{2+} jonų ir histidino liekanų žymens, nuo kolonėlės nusiplauna dalis geobacilino 26. Buvo bandyta papildomai gryninti ir katijonų ar anijonų mainų chromatografijomis, tačiau visais atvejais gryninimo metu buvo prarandamas baltymas. Manoma, kad gryninimui galėjo būti pasirinktas netinkamas buferis, baltymas galėjo sudaryti agregatus kolonėlėje. Toliau tyrimai atlikti su dalinai grynu geobacilinu 26.

3.6. Geobacilino 26 aktyvumas prieš kitas termofilines bakterijas

Siekiant nustatyti geobacilino 26 veikimo spektrą, išgryninto bakteriocino aktyvumas buvo tikrintas prieš kitas termofilines bakterijas šulinėlių agare metodu. Gauti rezultatai pateikti 3.2 lentelėje. Iš jos matyti, kad geobacilinas 26 veikia prieš kai kuriuos *Geobacillus* ir *Parageobacillus* kamienus. Iš turimų rezultatų sunku pasakyti, ar tai plataus veikimo spektro bakteriocinas. Norint tai nustatyti reikėtų patikrinti Geo26 aktyvumą prieš kitas įvairių genčių bakterijas.

Taip pat buvo įvertinta ir Geo26 minimali inhibicinė koncentracija. Šiam tyrimui buvo pasirinktas *Parageobacillus genomospecies 1* (NUB 36187) kamienas, kadangi tiriant bakteriocino aktyvumą prieš jį buvo aiškiai matomos didžiausios inhibicinės zonos. Buvo parodyta, kad 484 ng/mL geobacilino koncentracija (minimali inhibicinė koncentracija, MIC) stabdo šio kamieno augimą. Tuo tarpu 242 ng/mL bakteriocino koncentracija jau augimo nebestabdė. Tuo tarpu, kito III klasės bakteriocino lizostafino MIC varijuoja nuo <0,047 iki 12,5 µg/mL (Bastos, Coutinho, ir Coelho, 2010).



3.8 pav. Skirtingų Geo26 koncentracijų įtaka jautraus kamieno augimui

3.2 lentelė. Geo26 aktyvumas prieš termofilines bakterijas

Kamienas	Aktyvumas
<i>Aeribacillus pallidus</i> (DSM 3670 ^T)	-
<i>Anoxybacillus tepidamans</i> (DSM 16315 ^T)	-
<i>Geobacillus gargensis</i> (DSM 15378 ^T)	-
<i>Geobacillus jurassicus</i> (DSM 15726 ^T)	++
<i>Geobacillus kaustophilus</i> (HTA 426)	++
<i>Geobacillus stearothermophilus 10</i> (DSM 13240)	+
<i>Geobacillus subterraneus</i> (DSM 13552 ^T)	-
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i> (DSM 730)	-
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (DSM 465 ^T)	-
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> (DSM 5366 ^T)	+/-
<i>Geobacillus uzenensis</i> (DSM 13551 ^T)	+/-
<i>Parageobacillus genomospecies 1</i> (NUB 36187)	++
<i>Parageobacillus thermoglucosidasus</i> (DSM 2542 ^T)	-
<i>Parageobacillus toebii</i> (DSM 14590 ^T)	+

++ didelė inhibicijos zona + maža inhibicijos zona +/- neryški inhibicijos zona - nėra inhibicijos

3.7. Geobacilino 26 temperatūrinis stabilumas

Norint patikrinti Geo26 stabilumą įvairiose temperatūrose, bakteriocinas buvo inkubuojamas 2 val. 50 °C, 60 °C, 70 °C ir 80 °C temperatūroje. Po inkubacijos bakteriocino aktyvumas pamatuotas šulinėlių agare metodu, darant dukartinius skiedimus. Rezultatai pateikti 3.3 lentelėje:

3.3 lentelė. Bakteriocino temperatūrinis aktyvumas, lyginant su kontrole

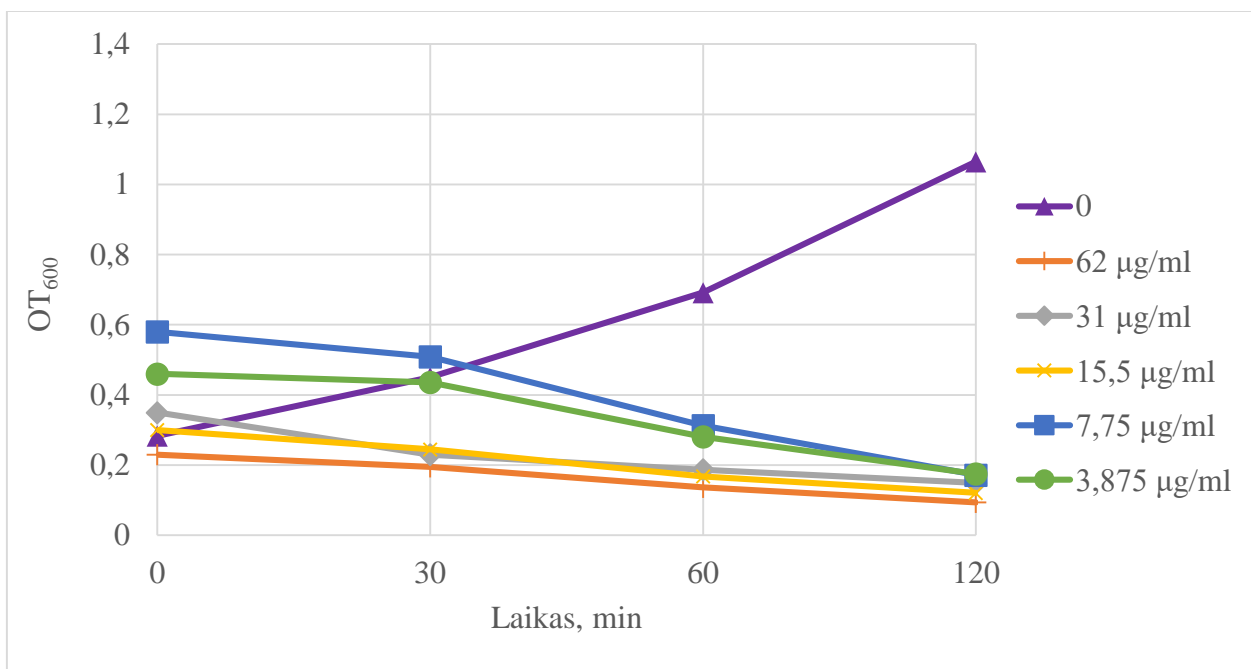
Temperatūra	Aktyvumas
-20 °C	100 %
4 °C	Prarandamas po 2 sav.
50 °C	100 %
60 °C	100 %
70 °C	100 %
80 °C	50 %

Iš rezultatų matyti, kad bakteriocinas išlaiko savo stabilumą tik esant temperatūrai iki 70 °C. Esant 80 °C temperatūrai bakteriocino aktyvumas sumažėja 50 %. Taip pat nustatyta, kad geobacilina 26 galima laikyti -20 °C temperatūroje, tačiau laikomas 2 savaites 4 °C temperatūroje jis praranda aktyvumą.

Dėl savo aktyvumo prieš kitas termofilines bakterijas ir stabilumo 60-70 °C temperatūroje šis bakteriocinas gali būti panaudojamas pramonėje, kur palaikomos temperatūros iki 70 °C, taip sumažinant užkrėtimo termofilais riziką.

3.8. Geobacilino 26 veikimo mechanizmas

Į aktyviai augančias jautraus kamieno ląsteles buvo įdėtos skirtingos bakteriocino koncentracijos (0; 3,875; 7,75; 15,5; 31 ir 62 µg/mL) ir stebimi optinio tankio pokyčiai skirtingais laiko tarpais. Lyginant su kontrole, esant įvairioms bakteriocino koncentracijoms, ląstelių optinis tankis mažėja, ir po 2 val jau yra arti nulio.



3.1 pav. Skirtingų geobacilino 26 koncentracijų įtaka ląstelių optiniam tankiui (600 nm)

Optinio tankio kritimas parodo, kad bakteriocinas veikia ląsteles bakteriolitiškai, kadangi kitu atveju ląstelių optinis tankis nekistų.

IŠVADOS

1. Vykdamt raišką *E. coli* ląstelėse buvo gautas aktyvus bakteriocinas
2. Geo26 buvo išgrynintas Ni²⁺ afininės chromatografijos metodu
3. Geo26 išlaiko stabilumą 70 °C temperatūroje, o 80 °C lieka 50 % jo pradinio aktyvumo
4. Geo26 turi aktyvumą prieš kai kurias *Parageobacillus* ir *Geobacillus* genties bakterijas
5. Geo26 veikia bakteriolitiškai

SANTRAUKA

Manta Vaičiškauskaitė

Naujo bakteriocino charakterizavimas bei jo heterologinė ekspresija

Darbo vadovas: dokt. Arnoldas Kaunietis

Vilniaus universitetas

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Vilnius, 2018

Bakteriocinai – tai heterogeninė bakterijų ribosomų sintetinamų antibakterinių peptidų grupė. Dėl įvairių pritaikymo galimybių, bakteriocinai yra patrauklūs tyrimo objektai.

Šio darbo tikslas buvo susintetinti rekombinantinį bakteriociną geobaciliną 26 ir jį charakterizuoti. Tai III klasės naujas (24,6 kDa dydžio) bakteriocinas nepasižymintis sekos panašumu į kitus žinomus baltymus ir bakteriocinus. Bakteriocino genas be signalinio peptido sekos (19 aminorūgščių ilgio) buvo ekspresuotas *E. coli* Rosetta (DE3) raiškos kamienne. Aktyvus rekombinantinis baltymas buvo išgrynintas Ni²⁺ afininės chromatografijos metodu. Parodyta, kad bakteriocinas išlaiko savo stabilumą temperatūrose iki 70 °C, o 80 °C temperatūroje praranda 50 % savo aktyvumo. Ištyrus geobacilino 26 aktyvumą prieš kitas termofilines gramteigiamas bakterijas nustatyta, kad geobacilinas 26 veikia prieš kai kurias *Parageobacillus* ir *Geobacillus* genties bakterijas, o jo minimali inhibicinė koncentracija prieš *Parageobacillus* genomospecies 1 kamieną yra 484 ng/mL. Tiriant bakteriocino įtaką šio kamieno ląstelių optiniam tankiui parodyta, kad geobacilinas 26 veikia bakteriolitiškai.

SUMMARY

Manta Vaičiškauskaitė

Characterisation and Heterologous Expression of New Bacteriocin

Work supervisor: PhD student Arnoldas Kaunietis

Vilnius University

Life Sciences Center

Institute of Biomedical Sciences

Vilnius, 2018

Bacteriocins are heterogenous group of ribosomally-synthesised antimicrobial peptides or proteins. They have many promising applications in medicine, research, food and fuel industries.

The aim of this work was to express active recombinant bacteriocin Geobacilin 26 (Geo26) and characterize it. The PCR amplified product of heat-labile class III Geobacilin 26 without signal peptide sequence was cloned in pETDuet-1 vector and expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3). Active recombinant Geobacilin 26 was purified using Ni²⁺ affinity chromatography method. It was shown that Geo26 is stable at temperatures reaching 70 °C, at 80 °C temperature bacteriocin only has 50 % of his activity. Bacteriocin's activity against other Gram-positive thermophilic bacteria was also studied. Geo26 is active against some bacterias from genus *Parageobacillus* and *Bacillus*, and his minimal inhibitory concentration against sensitive *Parageobacillus genomospecies* 1 strain is 484 ng/mL. When added to actively growing sensitive cells Geobacilin 26 reduced optical density, meaning that this bacteriocin has bacteriolytic mode of action.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abriouel H., Franz C.M.A.P., Omar N. Ben, Galvez A. 2011. Diversity and applications of Bacillus bacteriocins, *FEMS Microbiology Reviews* 35(1): 201–232. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x .
- Alvarez-Sieiro P., Montalbán-López M., Mu D., Kuipers O.P. 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family, *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(7): 2939–2951. DOI: 10.1007/s00253-016-7343-9 .
- Bastos M. do C. de F., Coutinho B.G., Coelho M.L.V. 2010. Lysostaphin: A staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications, *Pharmaceuticals* 3(4): 1139–1161. DOI: 10.3390/ph3041139 .
- Burgess S.A., Lindsay D., Flint S.H. 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing, *International Journal of Food Microbiology* 144(2): 215–225. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.027 .
- Cascales E., Buchanan S.K., Duche D., Kleanthous C., Lloubes R., Postle K., Riley M., Slatin S., Cavard D. 2007. Colicin Biology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71(1): 158–229. DOI: 10.1128/MMBR.00036-06 .
- Cheng-Foh Le, Chee-Mun Fang S.D.S. 2017. crossm Intracellular Targeting Mechanisms by, 61(4): 1–16.
- Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L. 2001. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation, *International Journal of Food Microbiology* 71(1): 1–20. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00560-8 .
- Collins F.W.J., O'Connor P.M., O'Sullivan O., Gómez-Sala B., Rea M.C., Hill C., Ross R.P. 2017. Bacteriocin Gene-Trait matching across the complete Lactobacillus Pan-genome, *Scientific Reports* 7(1): 1–14. DOI: 10.1038/s41598-017-03339-y .
- Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food, *Nature Reviews Microbiology* 05(3):777-788. DOI: 10,1038/nrmicro1240.
- Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. 2013. Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics?, *Nature Reviews Microbiology* 11(2): 95–105. DOI: 10.1038/nrmicro2937 .
- Egan K., Field D., Rea M.C., Ross R.P., Hill C., Cotter P.D. 2016. Bacteriocins: Novel solutions to age old spore-related problems?, *Frontiers in Microbiology* 7(APR). DOI: 10.3389/fmicb.2016.00461 .
- Egan K., Ross R.P., Hill C. 2017. Bacteriocins: antibiotics in the age of the microbiome, *Emerging Topics in Life Sciences* 1(1): 55–63. DOI: 10.1042/ETLS20160015 .
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A. 2000. Class IIa bacteriocins: Biosynthesis, structure and activity, *FEMS Microbiology Reviews* 24(1): 85–106. DOI: 10.1016/S0168-6445(99)00031-5 .
- Field D., Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. 2015. Bioengineering of the model lantibiotic nisin, *Bioengineered* 6(4): 187–192. DOI: 10.1080/21655979.2015.1049781 .
- Gharsallaoui A., Oulahal N., Joly C., Degraeve P. 2016. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(8): 1262–1274. DOI: 10.1080/10408398.2013.763765 .
- Hassan M., Kjos M., Nes I.F., Diep D.B., Lotfipour F. 2014. Antimicrobial Peptides from Prokaryotes, *Novel Antimicrobial Agents and Strategies* (ii): 71–90. DOI: 10.1002/9783527676132.ch5 .
- Józefiak D., Sip A. 2013. Bacteriocins in poultry nutrition - A review, *Annals of Animal Science* 13(3):

449–462. DOI: 10.2478/aoas-2013-0031 .

- Knerr P.J., van der Donk W.A. 2012. Discovery, Biosynthesis, and Engineering of Lantipeptides, *Annual Review of Biochemistry* 81(1): 479–505. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060110-113521 .
- Lee H., Kim H.Y. 2011. Lantibiotics, Class I Bacteriocins from the Genus *Bacillus*, *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(3): 229–235. DOI: 10.4014/jmb.1010.10017 .
- Mathur H., Rea M., Cotter P., Hill C., Ross R. 2015. The Sactibiotic Subclass of Bacteriocins: An Update, *Current Protein & Peptide Science* 16(6): 549–558. DOI: 10.2174/1389203716666150515124831 .
- Mokoena M.P. 2017. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review, *Molecules* 22(8). DOI: 10.3390/molecules22081255 .
- Montville T.J., Chikindas M.L., Biological Control of Foodborne Bacteria. In: Doyle M.P., Buchanan R.L. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 4th edition. ASM Press, Washington, DC, 2013. p. 803-822
- Rea M.C., Ross R.P., Cotter P.D., Hill C. Classification of Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria. In: Drider D., Rebuffat S. editors. Prokaryotic Antimicrobial Peptides From Genes to Applications. Springer Science+Business Media, LLC, 2011. p. 29-53.
- Roces C., Rodríguez A., Martínez B. 2012. Cell Wall-active Bacteriocins and Their Applications Beyond Antibiotic Activity, *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 4(4): 259–272. DOI: 10.1007/s12602-012-9116-9 .
- Swe P.M., Cook G.M., Tagg J.R., Jack R.W. 2009. Mode of action of dysgalactin: A large heat-labile bacteriocin, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63(4): 679–686. DOI: 10.1093/jac/dkn552 .
- Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nature Protocols* 3(2): 163–175. DOI: 10.1038/nprot.2007.521 .
- Yang S.C., Lin C.H., Sung C.T., Fang J.Y. 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals, *Frontiers in Microbiology* 5(MAY): 1–10. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241 .
- Ye R., Xu H., Wan C., Peng S., Wang L., Xu H., Aguilar Z.P., Xiong Y., Zeng Z., Wei H., Antibacterial activity and mechanism of action of ϵ -poly-l-lysine, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 439(1): 148–153. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.08.001 .
- Zhang L.J., Gallo R.L. 2016. Antimicrobial peptides, *Current Biology* 26(1): R14–R19. DOI: 10.1016/j.cub.2015.11.017 .