



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos magistro studijų programos II kurso  
studentė

Saulė ULINAUSKAITĖ

Magistro baigiamasis darbas

**Naujo bakteriocino, produkuojamo termofilinės bakterijos,  
identifikavimas, klonavimas ir heterologinė raiška**

Darbo vadovas: dr. A. Kaunietis

Vilnius 2020

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	5
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	7
1.1. Bakteriocinai .....	7
1.1.1. Gram-neigiamų bakterijų bakteriocinai .....	7
1.1.2. Gram-teigiamų bakterijų bakteriocinai .....	8
1.2. Bakteriocinų klasės .....	8
1.2.1. I klasės bakteriocinai .....	9
1.2.2. II klasės bakteriocinai .....	10
1.2.3. III klasės bakteriocinai .....	12
1.3. Bakteriocinų veikimo mechanizmai.....	12
1.3.1. Poveikis ląstelės sienelei .....	12
1.3.2. Padidėjęs membranos pralaidumas .....	13
1.3.3. Genų raiškos ir baltymų produkcijos slopinimas .....	14
1.4. Bakteriocinų sintezės ir atsparumo mechanizmai .....	15
1.5. Termofilinių bakterijų bakteriocinai .....	16
1.6. Bakteriocinų panaudojimas .....	16
1.6.1. Bakteriocinų panaudojimas maisto pramonėje .....	17
1.6.2. Bakteriocinų panaudojimo medicinoje perspektyvos .....	18
1.6.3. Bakteriocinų panaudojimas prieš termofilines bakterijas .....	19
1.6.4. Bakteriocinų panaudojimas augalininkystėje.....	19
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	20
2.1. Medžiagos .....	20
2.1.1. Plazmidės ir pradmenys .....	20
2.1.4. Bakterijų kamienai ir auginimo sąlygos.....	20
2.2. Metodai.....	22

2.2.1. Antibakterinio aktyvumo tikrinimas .....	22
2.2.2. Baltymų koncentravimas.....	23
2.2.3. Glicino-NDS-PAGE baltymų elektroforezė ir zimograma .....	23
2.2.4. Baltymų išsodinimas iš supernatanto amonio sulfatu .....	23
2.2.5. Nudruskinimas .....	24
2.2.6. Anijonų mainų chromatografija .....	24
2.2.7. Hidrofobinių sąveikų chromatografija .....	24
2.2.8. Baltymų gryninimas Amberlite XAD16N derva .....	24
2.2.9. Katijonų mainų chromatografija .....	25
2.2.10. DNR išskyrimas, valymas ir klonavimas .....	25
2.2.11. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR).....	26
2.2.12. Geno <i>geo19A</i> klonavimas .....	26
2.2.13. Geno <i>geo19B</i> klonavimas .....	27
2.2.14. Geno <i>geo19C</i> klonavimas .....	27
2.2.15. Geno <i>geo19D</i> klonavimas .....	28
2.2.16. DNR elektroforezė agarozės gelyje.....	28
2.2.17. Elektrokompentinių ląstelių ruošimas .....	28
2.2.18. Elektrotransformacija .....	29
3. REZULTATAI .....	30
3.1. Minimalios augimo terpės optimizacija .....	30
3.2. Geo19 gryninimas skysčių chromatografijos sistema.....	31
3.3. Geobacilino 19 genų klasterio analizė .....	33
3.4. <i>Geo19A</i> , <i>geo19B</i> , <i>geo19C</i> ir <i>geo19D</i> klonavimas į raiškos vektorius .....	34
3.5. Heterologinė <i>geo19A</i> , <i>geo19B</i> , <i>geo19C</i> ir <i>geo19D</i> genų raiška <i>E. coli</i> ląstelėse .....	36
4. REZULTATŲ APTARIMAS .....	38
5. NUMATYTI EKSPERIMENTAI.....	40
IŠVADOS.....	41

REZULTATŪ SKLAIDA.....	42
PADĒKA.....	43
SANTRAUKA .....	44
SUMMARY .....	45
LITERATŪROS SARAŠAS.....	46

## SANTRUMPOS

- ABC – ATP prisijungiantys kasetės transporteriai (*angl.* ATP-binding cassette)
- AMP – antimikrobiniai peptidai (*angl.* antimicrobial peptides)
- Bp – bazių pora
- dNTP – deoksinuleozidtrifosfatas
- GRAS – visuotinai pripažinti saugiais (*angl.* Generally Regarded as Safe)
- KT – kambario temperatūra
- LAB – pienarūgštės bakterijos (*angl.* lactic acid bacteria)
- Lan – lantioninas (aminorūgštis)
- LAP – linijiniai azolio turintys peptidai (*angl.* linear azol(in)e-containing peptides)
- LB – Luria-Bertani
- MB – maistinis buljonas
- MKS – daugybinis klonavimo regionas (*angl.* Multiple Cloning Site)
- NDS-PAGE – natrio dodecil sulfato-poliakrilamido gelių elektroforezė
- NMR – branduolinis magnetinis rezonansas (*angl.* Nuclear Magnetic Resonance)
- OT – optinis tankis
- PGR – polimerazinė grandininė reakcija
- PTM – potransliacinės modifikacijos (*angl.* post-translational modification)
- REazė – restrikcijos endonukleazė
- SDM – minimali druskų terpė praturtinta piruvatu ir gliceroliu (*angl.* semi defined medium)
- SDP – sporuliaciją nutolinantis baltymas (*angl.* sporulation delaying protein)
- TOMM – tiazolio/oksazolio modifikuoti mikrocinai (*angl.* thiazole/oxazole modified microcins)
- Tris – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis
- UV – ultravioletinė spinduliuotė

## IVADAS

Bakteriocinai – tai antimikrobiniai peptidai sintetinami bakterijos ribosomų ir pasižymintys antibakteriniu aktyvumu prieš bakteriociną sintetinančiai bakterijai artimas ar tolimesnes bakterijų rūšis. Išskiriamos trys bakteriocinų klasės, I klasei priklauso maži po transliacijos modifikuoti, II klasei maži po transliacijos nemodifikuoti, o III klasei dideli nemodifikuoti bakteriocinai. Bakteriocinų aktyvumas prieš maistą gadinančias bei patogenines bakterijas gali būti plačiai panaudojamas maisto pramonėje, žemės ūkyje bei medicinoje. Šiuo metu, kai bakterinis atsparumas antibiotikams kelia didelį susirūpinimą, bakteriocinai galėtų būti tinkama alternatyva tradiciniams antibiotikams.

Bakteriocinai tyrinėjami jau ilgą laiką, tačiau žinių apie termofilinių bakterijų bakteriocinus sukaupta nedaug. Termofilnės bakterijos daugiausia gamina termostabilius baltymus, termofilinių bakterijų gaminami bakteriocinai taip pat galėtų būti termostabilesni už mezofilų gaminamus. Šiame darbe naudotas termofilinis *Geobacillus stearothermophilus* 15 kamienas izoliuotas iš Lietuvoje esančių naftos telkinių. *G. stearothermophilus* 15 kamienas gamina du bakteriocinus – 26 kDa molekulinės masės geobaciliną 26 (Geo26) ir 19 kDa molekulinės masės geobaciliną 19. Ankstesnių tyrimų metu Geo26 buvo išgrynintas, charakterizuotas ir priskirtas III klasės bakteriocinams. Tuo tarpu Geo19 išgryninti nepavyko. Šiame darbe tęsiami geobacilino 19 tyrimai.

Šio **darbo tikslas**: nustatyti geobacilino 19 (Geo19) aminorūgščių seką, klonuoti bei susintetinti jį *Escherichia coli* ląstelėse.

### Uždaviniai:

1. Atrinkti optimalią augimo terpę *G. stearothermophilus* 15 produkuojamo bakteriocino Geo19 biosintezei ir gryninimui.
2. Optimizuoti Geo19 gryninimo strategiją skysčių chromatografijos sistema.
3. Išgryninus Geo19 jį pateikti masių spektrometrijos analizei, nustatyti aminorūgščių seką.
4. Klonuoti Geo19 biosintezę koduojančius genus į raiškos vektorius ir atlikti bakteriocino heterologinę raišką *E. coli* ląstelėse.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Bakteriocinai

Visi gyvi organizmai produkuoja antimikrobinius baltymus (AMP), dauguma jų vadinami antimikrobiniais peptidais dėl jų sąlyginai mažo dydžio. Eukariotų imuninėje sistemoje AMP tarnauja kaip pirmas gynybos lygis (paveldimas imunitetas) prieš nepageidaujamus svetimkūnius (Hiemstra & Zaat, 2013). Bakterijos gamina dviejų tipų AMP – ribosomų sintetinius (taip pat žinomi kaip bakteriocinai), bei ne ribosomų sintetinius. Pastarieji neturi juos koduojančių struktūrinių genų (Chikindas et al., 2018).

Bakteriocinai – tai antimikrobiniai peptidai/baltymai sintetiniai bakterijos ribosomų ir pasižymintys antibakteriniu aktyvumu prieš bakteriociną sintetinančiai bakterijai artimas ar tolimesnes bakterijų rūšis. Ši junginių grupė yra labai įvairi ir heterogeniška, jai priklausantys antimikrobiniai peptidai pasižymi unikaliomis charakteristikomis (Acedo et al., 2018; Alvarez-Sieiro et al., 2016). Bakteriocinų aktyvumas prieš patogenines bei kitas nepageidautinas bakterijas atveria plačias galimybes jų panaudojimui maisto pramonėje ir medicinoje. Antibiotikams atsparių bakterijų daugėjant (WHO, 2015) bakteriocinai gali būti potencialios alternatyvos tradiciniams antibiotikams klinikinėje praktikoje ir veterinarijoje (Chikindas et al., 2018; Cotter et al., 2013; Perez et al., 2014).

### 1.1.1. Gram-neigiamų bakterijų bakteriocinai

Bakteriocinų sukelta kitų bakterijų augimo inhibicija pirmą kartą aprašyta mokslininko André Gratia 1925 metais, po antagonistinės sąveikos atradimo tarp *Escherichia coli* kamienų. Tuo metu jie buvo pavadinti koliciniais. Kolicinai – tai dideli antibakteriniai baltymai (> 10 kDa), gram-neigiamų bakterijų bakteriocinų prototipai. Po šio atradimo pradėta daugiau domėtis bakteriociniais ir pastebėta, kad į kolicinus panašius junginius gamina ir kitos gram-neigiamos bakterijos (Klaenhammer, 1993; Cascales et al., 2007). Aptikti klebicinai gaminami *Klebsiella pneumoniae*, marcescinai – *Serratia marcescens*, alveicinai – *Hafnia alvei*, kloacinai – *Enterobacter cloacae* ir piocinai gaminami *Pseudomonas* bakterijų.

Dauguma šios grupės bakteriocinų yra gana dideli ir karštyje nestabilūs peptidai. Išimtis – mikrocinai, tokie kaip mikrocinas V gaminamas *E. coli*. Šie bakteriocinai yra mažesni (< 10 kDa) ir karštyje stabilesni už minėtus kolicinus. Siauras antimikrobino aktyvumo spektras yra

pagrindinis gram-neigiamų bakterijų bakteriocinų minusas, dėl kurio jų panaudojimas pramonėje labai apribotas (Balciunas et al., 2013; Güllüce et al., 2013).

### **1.1.2. Gram-teigiamų bakterijų bakteriocinai**

Gram-teigiamos bakterijos gamina didelę įvairovę bakteriocinų. Gram-teigiamų bakterijų bakteriocinai dėl savo netoksiškumo prieš eukariotines ląsteles ir daug platesnio, lyginant su gram-neigiamų bakterijų, inhibicinio spektro, gali būti naudingais įrankiais pramonėje ir medicinoje (Balciunas et al., 2013).

### **1.2. Bakteriocinų klasės**

Nuo pirmų bakteriocinų atradimo ir charakterizavimo, žinios apie jų įvairovę, veikimo būdą, sintezę, sekreciją ir genetinę organizaciją sparčiai plėtėsi. Didėjant bakteriocinų įvairovei 1993 metais Klaenhammer pasiūlė pirmą bakteriocinų klasifikacijos schemą (Klaenhammer, 1993). Tuo laikotarpiu labiausiai domėtasi bakteriociniais, kuriuos gamina pienarūgštės bakterijos (LAB), todėl remiantis žiniomis šioje srityje buvo pasiūlytas skirstymas į keturias klases:

- I klasė. Lantibiotikai, tai maži (< 5 kDa), membraną veikiantys peptidai turintys neįprastas aminorūgštis, tokias kaip lantioninas ar 3-metillantioninas.
- II klasė. Maži (< 10 kDa), karštyje stabilūs, neturintys lantionino, membraną veikiantys peptidai.
- III klasė. Dideli, karštyje nestabilūs bakteriocinai (> 30 kDa).
- IV klasė. Kompleksiniai bakteriocinai, turintys baltyminę ir lipidinę ar angliavandenilinę dalis, reikalingas aktyvumui.

Didėjant bakteriocinų skaičiui buvo sukurtos ir kitos klasifikacinės sistemos, tačiau dauguma jų rėmėsi Klaenhammer sukurta klasifikacija. Ketvirtos bakteriocinų klasės, apėmusios didelius baltyminius kompleksus, turinčius angliavandenilinę ar lipidinę dalis, atsisakyta. Šiuo metu ketvirtai klasei priklausę – leukonocinas S ir laktocinas 27 – vadinami bakteriolizinais (Güllüce et al., 2013; Kumariya et al., 2019).

Naujesnė bakteriocinų kvalifikacija buvo pasiūlyta Alvarez-Sieiro ir jo kolegų 2016 metais. Ši klasifikacija skirta LAB bakteriocinams, kadangi dauguma žinomų bakteriocinų gaminami būtent šios grupės bakterijų. Autorių teigimu ši klasifikacija tinkama ir kitiems gram-teigiamų bakterijų bakteriocinams (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Išskiriamos trys pagrindinės bakteriocinų klasės:

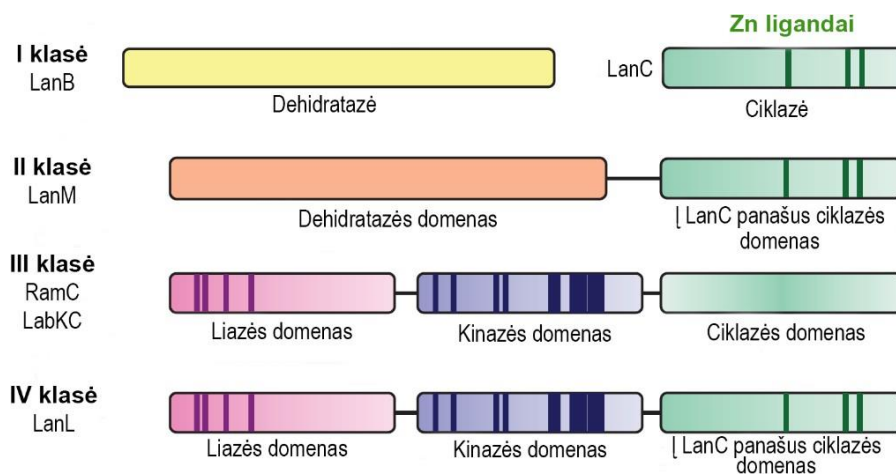


- I klasė. Šiai klasei priklauso maži (< 10 kDa), po transliacijos modifikuojami, karštyje stabilūs bakteriocinai. Modifikacijos apima neįprastas aminorūgštis ir struktūras, nuo kurių priklauso bakteriocino savybės (lantioninas, heterociklai, ciklizacija, glikozilinimas ir kt.). I klasės bakteriocinams būdingas lyderinio peptido, atsakingo už fermentų atpažinimą, transportą, peptido neveiklumą, jungtis su šerdiniu peptidu.
- II klasė. Šiai klasei priklauso maži (< 10 kDa), po transliacijos nemodifikuojami, karštyje stabilūs bakteriocinai. Šios klasės atstovams brendimui reikalingi tik keli fermentai – tai lyderinė peptidazė ir/arba transporteris.
- III klasė. Šiai klasei priklauso dideli (> 10 kDa), nemodifikuoti, karštyje nestabilūs bakteriocinai. Šios klasės atstovams būdingas bakteriolizinis veikimo būdas arba nelizuojantis veikimas.

### 1.2.1. I klasės bakteriocinai

I klasės bakteriocinai toliau skirstomi į poklasisius – Ia (lantibiotikai), Ib (žiediniai bakteriocinai), Ic (saktibiotikai), Id (LAP arba TOMM), Ie (glikocinai) ir If (laso peptidai).

**Ia poklasis.** Lantipeptidai – tai ribosomų sintetinami policikliniai, potransliacinių modifikacijų (PTM) turintys peptidai, jiems būdingos tokios neįprastos aminorūgštys, kaip lantioninas ar metilantioninas. Genai susiję su lantipeptidų PTM paprastai būna viename operone. Lantipeptidai turintys antimikrobinį aktyvumą yra žinomi kaip lantibiotikai (Alkhalili & Canbäck, 2018). Išskiriamos keturios lantipeptidų klasės pagal turimus PTM fermentus (1.1 pav., Knerr & van der Donk, 2012).



**1.1 pav.** Keturių lantipeptidų klasių modifikacijas atliekančių fermentų schematinė reprezentacija. Paryškinti konservatyvūs motyvai. Sutrumpinimai: LabKC, labionino sintetazė; LanB, lantipeptido dehidratasė; LanC, lantipeptido ciklazė; LanL, IV klasės lantipeptidų sintetazė; LanM, II klasės lantipeptidų sintetazė; RamC, SapB-modifikuojanti sintetazė (Knerr & van der Donk, 2012).

**Ib poklasis.** Žiediniai bakteriocinai – tai bakteriocinai, kuriems būdingas N-galo sujungimas su C-galu peptidiniu ryšiu, taip suformuojant žiedinę molekulę. Šio poklasio nariai turi  $\alpha$  – spiralines struktūras bei skirtingus veikimo mechanizmus (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Zhao & Kuipers, 2016).

**Ic poklasis.** Saktibiotikai – tai sparčiai auganti bakteriocinų grupė, kuriai būdingos neįprastos sieros ir  $\alpha$  – anglies jungtys tarp amino rūgščių liekanų. Bakteriocinus modifikuoja ir šiuos tioeterinius ryšius suformuoja S-adenozilmetionazės (Mathur et al., 2015).

**Id poklasis.** Šiam poklasiui priklauso bakteriocinai ciklodehidratacijos ir dehidrogenacijos fermentinių reakcijų metu įgyjantys heterociklinius žiedus iš serino, treonino ir cisteino. Serinas verčiamas oksazoliu, treoninas – metiloksazoliu, cisteinas – tiazoliu (Melby et al., 2011). Alvarez-Sieiro su kolegomis (2016) šiuos bakteriocinus vadina linijiniais azolio turinčiais peptidais (LAP), kitas šio poklasio pavadinimas – tiazolio/oksazolio modifikuoti mikrocinai (TOMM). Bakteriocinų genai koduojami operonuose kartu su transporto, modifikacijos ir imuniteto genais (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Collins et al., 2017; Zhao & Kuipers, 2016).

**Ie poklasis.** Glikocinai – tai bakteriocinai turintys glikozilintas aminorūgštis (Arnison et al., 2013). Apie glikocinų veikimo mechanizmus žinoma nedaug.

**If poklasis.** Laso peptidams būdingas N-galinis makrolaktamo žiedas pervertas C-galu suformuojant laso struktūrą, dar žinomą kaip lariato mazgas. Žiedas susiformuoja izopeptidiniu ryšiu susijungus N-galinei glicino, alanino, serino ar cisteino  $\alpha$ -amino grupei ir aspartato arba glutamato (7, 8 ar 9-oje pozicijoje aminorūgščių grandinėje) karboksirūgšties šoninei grandinėlei (Hegemann et al., 2015; Zhao & Kuipers, 2016).

### 1.2.2. II klasės bakteriocinai

Antrai klasei priklauso maži, karštyje stabilūs, potransliacinių modifikacijų neturintys bakteriocinai. Ši klasė toliau skirstoma į poklasius – IIa (į pediociną panašūs bakteriocinai), IIb (dviejų peptidų bakteriocinai), IIc (lyderinės sekos neturintys bakteriocinai) ir IId (į pediociną nepanašūs bakteriocinai) (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Kumariya et al., 2019).

**IIa poklasis.** Šio poklasio bakteriocinams būdingas labai konservatyvus hidrofilinis katijoninis N-galinis regionas turintis disulfidinį tiltelį tarp dviejų cisteinų. Į pediociną panašūs bakteriocinai tai plataus spektro antimikrobiniai junginiai, pasižymintys dideliu aktyvumu prieš patogenines ir maistą gadinančias bakterijas, tokias kaip *Listeria monocytogenes* ar *Staphylococcus aureus*, todėl turi daug potencialo būti panaudoti maisto pramonėje bei biomedicinoje. Katijoninis N-galas turi konservatyvų Y-G-N-G-V-X-C (X – bet kokia

aminorūgštis) motyvą, dar vadinamą pediocino dėžute, kuris, manoma, atsakingas už nespecifišką sąveiką su taikiniu. Disulfidinį tiltelį pakeitus hidrofobiniais ryšiais bakteriocino aktyvumas išlaikomas. C-galas yra mažiau konservatyvus ir manomai susijęs su specifiskumu taikiniui (Cui et al., 2012).

Ila poklasio bakteriocinų lyderinio peptido seka daugeliu atvejų turi konservatyvų Gly-Gly fragmentą, kuris tarnauja kaip atpažinimo signalas. Lyderinis peptidas yra nukerpamas ABC transporterio ir jo pagalbinių baltymų fermentinės reakcijos metu perkeliant bakteriociną už ląstelės ribų (Drider et al., 2006). Gautas subrendęs bakteriocinas gali būti nuo 25 iki 58 aminorūgščių ilgio (Cui et al., 2012).

**Iib poklasis.** Šio poklasio bakteriocinai sudaryti iš dviejų skirtingų peptidų. Optimalus antibakterinis aktyvumas pasiekiamas esant panašiam abiejų peptidų kiekiui. Bakteriocino produkcijai reikalingi bent penki skirtingi genai, kurie gali būti viename arba dviejuose operonuose. Struktūriniai abiejų peptidų genai visada randami vienas šalia kito tame pačiame operone kartu su imuniteto baltymą koduojančiu genu. Peptidų pirmtakai, kaip ir Ila poklasio bakteriocinai, turi N-galinę lyderinio peptido seką su Gly-Gly motyvu, kuri yra nukerpama tam skirto ABC transporterio, perkeliant bakteriocino peptidus per ląstelės membranas. ABC transporteris koduojamas tame pačiame arba šalia esančiame operone. Abiejų peptidų aminorūgščių sekos varijuoja, konservatyvus tik dažnas GxxxG motyvas, randamas abiejuose peptiduose. Šis motyvas reikalingas peptidų tarpusavio sąveikai bei bakteriocino antimikrobiniam aktyvumui (Nissen-Meyer et al., 2010). Rasta Iib poklasio bakteriocinų, kurių peptidai individualiai turi antimikrobinį aktyvumą, tačiau šiais atvejais dviejų komplementarių peptidų kombinacija visada smarkiai padidina aktyvumą.

Iib poklasio bakteriocinų transkripcija reguliuojama quorum sensing sistemos, sudarytos iš trijų komponentų – indukcijos faktoriaus, su membrana asocijuotos histidino kinazės bei atsako reguliatorių (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

**Iic poklasis.** N-galinės lyderinės sekos neturintys bakteriocinai yra unikalūs tuo, kad yra sintetinami be lyderinio peptido, kuris paprastai veikia kaip atpažinimo signalas bakteriocino sekrecijai ir modifikacijoms bei laiko neaktyvų bakteriociną producento viduje. Šio poklasio bakteriocinai taip pat dažnai neturi imuniteto genų, bakterijų sintetinančių šiuos bakteriocinus imuniteto jiems mechanizmas yra neaiškus (Masuda et al., 2012).

**Iid poklasis.** Į pediociną nepanašūs vieno peptido bakteriocinai – tai heterogeninė, negiminingų vieno linijinio peptido bakteriocinų grupė. Šio poklasio nariams būdingos skirtingos struktūros, sekrecijos mechanizmai ir veikimo būdas (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

### 1.2.3. III klasės bakteriocinai

III klasės bakteriocinai – tai didelės molekulinės masės, karštyje nestabilūs antimikrobiniai peptidai, dažniausiai sudaryti iš skirtingų domenų (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Išskiriami du poklasiai – IIIa (bakteriolizinai) ir IIIb (nelizuojantys didelės molekulinės masės bakteriocinai).

**IIIa poklasis.** Bakteriolizinai veikia kaip proteazės ardydami ląstelės sienelės peptidoglikano sluoksnį ir sukeldami taikinio bakterijos žūtį. Vienas iš šios klasės atstovų, tai lizostafinas, 27 kDa baltymas gaminamas *Staphylococcus simulans* bakterijų. Lizostafinas veikia nutraukdamas pentaglicinų tiltelius ląstelės sienelės peptidoglikane (Bastos et al., 2010). Lizostafinas gali sutrikdyti *Staphylococcus aureus* ir *Staphylococcus epidermidis* formuojamų bioplėvelių augimą efektyviau nei dažnai naudojamas antibiotikas vankomicinas.

**IIIb poklasis.** Nelizuojantys didelės molekulinės masės bakteriocinai gali sutrikdyti bakterijos taikinio ląstelės sienelės ir citoplazminės membranos vientisumą neardydami peptidoglikano sluoksnio (Ibrahim, 2019).

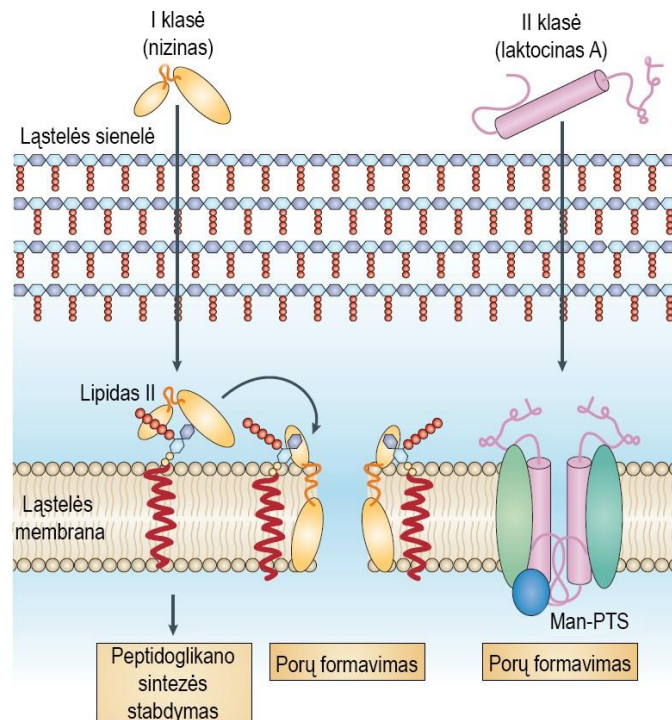
## 1.3. Bakteriocinų veikimo mechanizmai

Bakteriocinai pasižymi skirtingais veikimo mechanizmais. Galima skirstyti bakteriocinus į turinčius bakteriocidinį efektą, vykstant arba nevykstant ląstelės lizei, arba veikiančius bakteriostatiskai, inhibuojant ląstelių augimą. Bakteriocinų taikiniai gali būti ląstelės sienelės komponentai, genų raiška ar baltymų produkcija (Silva et al., 2018).

### 1.3.1. Poveikis ląstelės sieniei

Daugelio LAB bakteriocinų inhibuojančių gram-teigiamas bakterijas veikimo mechanizmas susijęs su ląstelės sienie. Kai kurie antibiotikai ir II klasės bakteriocinai jungiasi prie peptidoglikano pirmtako lipido II, taip stabdydami peptidoglikano sintezę. Tai vienintelis kai kurių bakteriocinų veikimo būdas (1.2 pav., Cotter et al., 2013).

IIIa klasei priklausantys bakteriolizinai veikia ardydami peptidoglikano sluoksnį. Zoocinas A, turintis aktyvumą prieš streptokokus, veikia kaip D-alanil-L-alanino endopeptidazė ardydamas peptidinius ryšius peptidoglikano sluoksnyje. Milericinas B veikia kaip mureino hidralazė. Enterolizinas A skelia peptidoglikaną tarp L-alanino ir D-glutamo rūgšties peptidų monomeruose, bei per L-lizino ir D-aspartato rūgšties tiltelį (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Lizostafinas skelia peptidinius tiltelius išskirtinai tarp glicinų peptidoglikano sluoksnyje (Ibrahim, 2019).

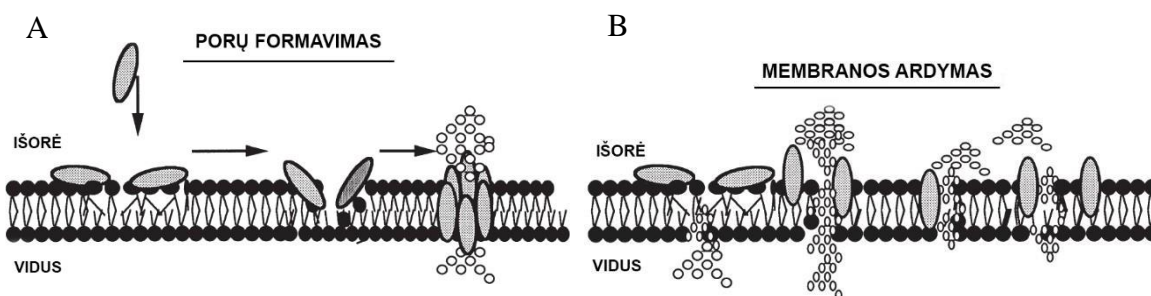


**1.2 pav.** Bakteriocinų veikimo mechanizmai. Kai kurie I klasės bakteriocinai, pavyzdžiui nizinas, stabdo peptidoglikano sintezę inhibuodami peptidoglikano pirmtaką lipidą II. Kiti bakteriocinai, pavyzdžiui II klasei priklausantis laktocinas A, gali formuoti poras. Laktocinas A prisijungia prie manozės fosfotransferazės sistemos (man-PTS) receptoriaus ir formuojama pora (Cotter et al., 2013).

### 1.3.2. Padidėjęs membranos pralaidumas

Dauguma žinomų bakteriocinų yra amfifiliniai, katijoniniai peptidai turintys  $\alpha$  spirales,  $\beta$  klostes arba į sraigatą panašias antrines struktūras. Remiantis amfifilinėmis bakteriocinų ypatybėmis galimi bent du skirtingi membranos pralaidumą didinantys mechanizmai (1.3 pav.). Bakteriocinai gali formuoti porų kompleksus. Susijungiant, įsiterpiant į membraną ir oligomerizuojantis bakteriocinų monomerams formuojamos poros, kuriose hidrofilinės bakteriocinų dalys yra nukreiptos į vidų, o hidrofobinės į išorę (nizinas, pediocinas PA-1, laktococinai A ir B, laktocinas F). Bakteriocinai taip pat galėtų veikti kaip detergentai pažeisdami membranos vientisumą. Toks veikimo būdas pasireikštų bioenergetinių parametru sutrikdymu bei įsisotinimo kinetikos nebuvimu. Keliamos tyrimais paremtos hipotezės apie bakteriocinų veikimo būdo priklausomybę nuo koncentracijos (Montville & Chikindas, 2013).

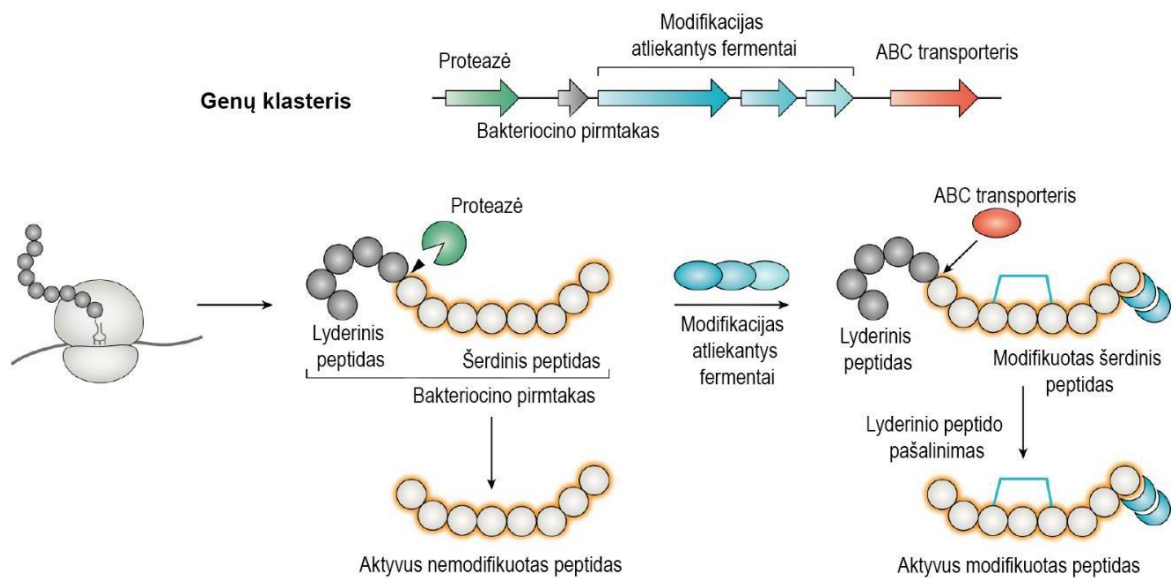
Efektyviai bakteriocinų veiklai gali būti reikalingos skirtingos membranos sąlygos. Lantibiotikai veikia energizuotas membranas. Labiausiai tyrinėtam lantibiotikui nizinui būdingi du su lipidu II susiję veikimo mechanizmai – peptidoglikano sintezės stabdymas ir porų formavimas (1.2 pav.). N-galinė nizino molekulės dalis yra atsakinga už sėkmingą lipidinio bisluoksnio pervėrimą, tuo tarpu C-galas susijęs su pradine membranos paviršiaus ir bakteriocino sąveika. Prieš suformuojant poras membranoje nizinas turi prisijungti prie lipido II. Kiti bakteriocinai veikia neenergizuotas membranas, tačiau jiems reikalingas receptorinis membranos baltymas. (Cotter et al., 2013; Montville & Chikindas, 2013). *Lactococcus garvieae* DCC43 gaminamas žiedinis bakteriocinas garvicinas ML kaip receptorius naudoja maltozės ABC transporterį ir permeazę. Ila klasės bakteriocinai prie membranos jungiasi per manozės permeazę fosfotransferazinėje sistemoje (man-PTS, 1.2 pav.). Mikrocinas E492 atpažįsta FepA, CirA arba Fiu geležies sideroforų receptorius išorinėje membranoje (Cotter et al., 2013). Lantibiotikų formuojamos poros yra „pleišto“ modelio, tuo tarpu II klasės bakteriocinai formuoja poras pagal „statinės šulo“ mechanizmą (Kumariya et al., 2019).



**1.3 pav.** Membranos pralaidumą didinantys bakteriocinų veikimo mechanizmų modeliai. A – porų formavimas, B – į detergentų veikimą panašus membranos ardyimas (Montville & Chikindas, 2013).

### 1.3.3. Genų raiškos ir baltymų produkcijos slopinimas

Bakteriocinai gali žudyti bakterijas sutrikdydami DNR, RNR ar baltymų metabolizmą. Mikrocinas B17, pereina išorinę membraną per poriną OmpF, o vidinę membraną – pasitelkus SbmA transporterį. Patekęs į ląstelės vidų inhibuoja DNR girazės reguliuojamą DNR superspiralizaciją ir taip sutrikdo DNR replikaciją (Parks et al., 2007). Laso peptidas mikrocinas J25 patekęs į ląstelę stabdo transkripciją blokuodamas RNR polimerazės antrinį kanalą (Vincent & Morero, 2009). Mikrocino C7-C51 atveju, inhibojama aspartil-tRNR sintetazė ir taip blokuojama iRNR sintezė. Kiti bakteriocinai jungiasi prie 23S rRNR ribosomos subvieneto ar blokuoja aminoacil-tRNR prisirišimą prie 50S ribosomos. Bakteriocinas GE2270 A jungiasi prie šaperono elongacijos faktoriaus Tu ir blokuoja baltymų sintezę (Cotter et al., 2013).



**1.4 pav.** Bendrinė bakteriocino biosintezės kelio schema nuo genų klasterio iki brandaus bakteriocino. Ribosomos susintetintas bakteriocino pirmtakas gali būti perkirtas proteazės (žalia) ir ABC transporterio (raudonas) perkeliamas į ląstelės išorę kaip nemodifikuotas bakteriocinas. Šerdinis peptidas sujungtas su lyderiniu peptidu (pilkas) – svarbi sąlyga PTM fermentų (mėlyna) veikimui. Modifikuotas bakteriocinas praranda lyderinį peptidą ir transportuojamas per membranas peptidazinį aktyvumą turinčio ABC transporterio (Li & Rebuffat, 2020).

#### 1.4. Bakteriocinų sintezės ir atsparumo mechanizmai

Aktyvių bakteriocinų sintezei ir imunitetui reikalingi genai dažniausiai organizuoti operonuose, bakterijos genome, plazmidėje ar kituose mobiliuose elementuose. Šių operonų ekspresijai reikalingas autoinduktorius. Ekspresiją dažnai reguliuoja dviejų, kartais trijų komponentų reguliacinės sistemos. Bakteriocinas nizinas pats veikia kaip autoinduktorius aktyvuodamas dviejų komponentų reguliacinę sistemą, taip pat yra unikalių ekspresijos reguliavimo pavyzdžių būdingų konkretiems bakteriocinams (Uzelac et al., 2015). Brevicino 174A produkcija ir imunitetas šiam bakteriocinui kontroliuojamas dviejų transkripcijos reguliatorinių baltymų, kurie veikia kaip teigiami autoreguliatoriai (Noda et al., 2018).

Pirmiausia susintetinamas bakteriocino pirmtakas, kuris taip pat gali būti modifikuotas. Subrendęs bakteriocinas praranda lyderinę seką ir yra transportuojamas už ląstelės ribų. II klasės c poklasio bakteriocinai lyderinės sekos neturi. Skirtingų klasių bakteriocinai patiria nevienodas modifikacijas. Transportui naudojami ABC transporteriai arba sec kelio eksporteriai (1.4 pav., Kumariya et al., 2019).

Bakteriocinai yra toksiški ne tik kitų rūšių bakterijoms, bet ir juos gaminančioms bakterijoms. Atsparumas sintetinam bakteriocinui užtikrinamas imuniteto baltymo arba ABC transporterio, koduojamų bakteriocino geno klasteryje (Li & Rebuffat, 2020). Imuniteto

baltymas specifiskai veikia prieš sintetinamą bakteriociną. Manoma, kad bakteriocinui veikiant iš išorės, imuniteto baltymas sulaiko prie receptoriaus prisijungusį bakteriociną tokiu būdu stabdydamas tolimesnę jo veiklą vedančią prie ląstelės žūties (Ríos Colombo et al., 2018).

### 1.5. Termofilinių bakterijų bakteriocinai

Dauguma žinomų bakteriocinų yra izoliuoti iš mezofilinių bakterijų rūšių. Antimikrobiniai peptidai iš termofilinių bakterijų rūšių dažnai pasižymi didesniu stabilumu aukštose temperatūrose ir pH. Termofilinės bakterijos gali augti utilizuodamos piruvatą arba vandenilį su tiosulfatu (Mikulík et al., 2017).

*Geobacillus* genčiai priklauso daugiau nei 25 rūšys, kurios buvo aptiktos įvairiose termofilinėms bakterijoms prieinamose skirtingose pasaulio vietose. Šiuo metu tik du termofilinių bakterijų bakteriocinai gaminami *Geobacillus thermodenitrificans* N680-2 yra detalai charakterizuoti. *Geobacillus thermodenitrificans* N680-2 gamina į niziną panašų bakteriociną geobaciliną I, bei geobaciliną II. Geobacilinas I buvo ekspresuotas *E. coli*. NMR rezultatai parodė, kad geobacilinas I turi septynis tioesterinius tiltelius ir daug didesnę stabilumą lyginant su nizinu. Antimikrobinis geobacilino I aktyvumas yra panašus į nizino A. Tuo tarpu geobacilinas II yra aktyvus tik prieš *Bacillus* genties bakterijas. Šių bakteriocinų produkcija priklauso nuo inkubacijos laiko, pH bei azoto koncentracijos, stabilumas išlaikomas esant 55°C temperatūrai (Mikulík et al., 2017).

*Aeribacillus palidus* 8 gamina hipotetinį bakteriociną palidociną. Palidocinas pasižymi dideliu aktyvumu prieš specifines termofilines bakterijas, tokias kaip *Parageobacillus sp.* ir *Caldibacillus sp.* (Kaunietis et al., 2019).

*Bacillus thermoleovorans* S-II ir *B. thermoleovorans* NR-9 gamina bakteriocinus termoleovoriną-S2 ir termoleovoriną-N9. Šie bakteriocinai yra stabilūs esant 3–10 pH ir 70–80°C temperatūrai. Termoleovorinai veikia inhibuodami greitai augančias ląsteles, nustatytas aktyvumas prieš *Salmonella typhimurium*, *Branhamella catarrhalis*, *Streptococcus faecalis*, ir *Thermus aquaticus* (Mikulík et al., 2017).

### 1.6. Bakteriocinų panaudojimas

Bakteriocinai yra viena iš natūralių apsaugos priemonių naudojama bakterijų konkuruojant toje pačioje ekologinėje nišoje. Iš evoliucinės perspektyvos mikroorganizmams paranku apsaugai naudoti quorum sensing inhibiciją, o ne žudyti konkurentus. Vietoje to, kad bakterijos gamintų didelius kiekius bakteriocinų, jos stabdo bioplėvelių formavimąsi ir



konkurentų įsitvirtinimą su nedideliais kiekiais bakteriocinų pasitelkiant quorum sensing inhibiciją.

Dauguma dabar žinomų bakteriocinų buvo atrasti ir tyrinėti kaip antimikrobiniai junginiai. Pradedant nizino atradimu buvo aprašyta daug naujų bakteriocinų su unikaliomis struktūromis bei skirtingais veikimo mechanizmais, taip pat nustatyti daugumos jų biosintezės, sekrecijos ir imuniteto genai. Per pastarąjį dešimtmetį bakteriocinai domino tyrėjus ne tik kaip maisto apsaugos priemonė, bet ir kaip įrankiai infekcijų gydyme bei kovai prieš antibiotikams atsparias patogenines bakterijas (Chikindas et al., 2018).

### **1.6.1. Bakteriocinų panaudojimas maisto pramonėje**

Bakteriocinai naudojami maisto produktų apsaugai vieni arba kombinuojant su kitais metodais. Rezultatai gauti pasitelkiant kultūras rodo, kad bakteriocinai turi inhibicinį poveikį tiriamoms bakterijoms, tačiau bakteriocinų panaudojimas maisto pramonėje turi būti testuojamas norint patvirtinti jų efektyvumą. Atlikta nemažai tyrimų atskleidžiančių bakteriocinų ir bakteriocinus produkuojančių kamienų potencialą būti panaudotiems mėsos, pieno, žuvies, alkoholinių gėrimų, salotų ir fermentuotų daržovių gamyboje ar apdorojime. Šiuo metu tik nizinas ir pediocinas PA1 komerciškai naudojami kaip maisto konservantai. LAB bakteriocinai, tokie kaip enterocinas, AS-48 (Sánchez-Hidalgo et al., 2011) ar lacticinas 3147 (Suda et al., 2012) turi daug perspektyvų būti panaudoti kaip maisto konservantai, tačiau pramoninio lygio iki šiol nepasiekė.

Išgrynintų bakteriocinų kaip maisto konservantų panaudojimo maisto pramonėje alternatyva yra bakteriocinus gaminančių bakterijų panaudojimas kontroliuojant maisto produktus užkrečiančių bakterijų augimą. Didelė dalis LAB bakterijų turi GRAS statusą, tai rodo jų visuotinį pripažinimą saugiomis vartoti. Tokių bakterijų naudojimas maisto produktuose gali būti veiksmingas būdas kontroliuoti nepageidaujamų mikroorganizmų augimą. LAB bakterijos taip pat yra dažnai naudojamos kaip pradinės kultūros maisto fermentacijoje. Kitas LAB kultūrų panaudojimas yra bakteriocinų produkcija in situ pridant apsaugines kultūras į pieno gaminius gamybos bei sandėliavimo metu (Silva et al., 2018).

Apibendrinant tai, kas minėta, didžioji dalis maisto pramonėje naudojamų bakteriocinų gali būti suskirstyti į tris grupes – nepilnai išgryninti bakteriocinai (Nisaplin®, turintis 2.5% nizino, ALTA 2431, turintis pediocino PA1), pieno ir kiti fermentuoti maisto produktai, turintys bakteriocinų grubaus fermentato pavidalu (MicroGARD® serijos bakteriocinų turintys produktai) bei bakteriocinus gaminančios maisto apsaugai skirtos kultūros. Daugėja tyrimų,

naudojant nizinę kartu su kitais bakteriociniais siekiant didesnio efektyvumo kovoje su maistą gadinančiomis bakterijomis (Chikindas et al., 2018).

### 1.6.2. Bakteriocinų panaudojimo medicinoje perspektyvos

Pirminė bakteriocinų panaudojimo sritis visada buvo maisto pramonė. Didėjantis antimikrobinis atsparumas tradiciniams antibiotikams, atveria naujas galimybes bakteriocinų panaudojimo įvairiuose sveikatos apsaugos produktuose tyrinėjimui siekiant sustabdyti potencialiai tradiciniams antibiotikams atsparias bakterijas (Chikindas et al., 2018).

Bakteriocinai turi daug ypatybių, dėl kurių būtų galima manyti, kad jie galėtų būti veiksminga alternatyva antibiotikams. Vienos tokių ypatybių yra didelis aktyvumas, žemas toksiškumas, plataus ir siauro spektro veikimo peptidai, galimas bioinžinerinis modeliavimas bei produkcija in situ probiotinių rūšių bakterijų.

Bakteriocinų aktyvumas prieš klinikoje svarbius patogenus varijuoja tarp klasių ir jose. Dauguma I klasės bakteriocinų yra aktyvesni prieš gram-teigiamus patogenus. Nemodifikuoti II klasės bakteriocinai taip pat pasižymi antimikrobinu aktyvumu prieš gram-teigiamus taikinius. Kai kurie IIa poklasio bakteriocinai yra aktyvūs prieš *L. monocytogenes* bei kitus gram-teigiamus patogenus. Gram-neigiamų bakterijų bakteriocinai, dar vadinami mikrocinais, pasižymi didžiausiu aktyvumu prieš gram-neigiamus patogenus (Cotter et al., 2013).

*Lactobacillus fermentum* HV6b gamina IIa klasės bakteriociną fermenticiną HV6b. Šis bakteriocinas stabdo vaginalines infekcijas sukeliančių bakterijų, tokių kaip *Bacteroides*, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*, *Staphylococci* ir *Streptococci* augimą. Fermenticinas HV6b taip pat pasižymi spermicidiniu veikimu bei spermatozoidų imobilizavimu. Nauja formulė, turinti savo sudėtyje *L. fermentum* HV6b arba fermenticino HV6b galėtų būti naudojama vaginalinių kremų, apsaugančių nuo infekcijas sukeliančių bakterijų bei veikiančių kaip kontraceptinė priemonė, produkcijai (Kaur et al., 2013).

Macedocinas gaminamas *S. macedonicus* gali nužudyti burnos ertmėje besidauginančius patogenus. Šis bakteriocinas galėtų būti naudojamas kaip aktyvus ingredientas dantų pastose ir burnos skalavimo skysčiuose (Zoumpopoulou et al., 2013).

Kai kurie bakteriocinai pasižymi ne tik antibakteriniu, bet ir antivirusiniu ar antigrybeliniu veikimu (Juturu & Wu, 2018). *Enterococcus faecium* STHa gamina į pediociną panašų bakteriociną ST5Ha. Pastebėta, kad ST5Ha aktyviai veikia prieš kai kurias LAB ir *Listeria* rūšis, maisto produktų patogenus bei virusus. Numanomas antivirusinio peptido veikimas gali būti virusinių dalelių agregacija bakterijoje šeimininkėje, virusinių receptorių blokavimas, stabdant viruso patekimą į ląstelę, arba pagrindinių viruso replikacijos etapų

inhibicija (Todorov et al., 2010). *Burkholderia sp.* T-34, *Burkholderi sp.* RO-1, *B. purantari* JCM5492 ir *B. phenazinium* JCM10564 gamina antigrybelinius bakteriocinus bulvių dekstrozės terpėje. 10 kDa bakteriocinas esant neutraliam pH turi antigrybelinį efektą prieš skirtingas *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* ir *Pencillium* rūšis. Šio bakteriocino antigrybelinis veikimas pagrįstas sporų dygimo stabdymu ir hifų elongacija (Kishimoto et al., 2009). Nemažai bakteriocinų pasižymi antivirusiniu arba antigrybeliniu veikimu, tačiau nededama daug pastangų išnaudoti šias savybes vaistų kūrime (Juturu & Wu, 2018).

### **1.6.3. Bakteriocinų panaudojimas prieš termofilines bakterijas**

Pienas gaminamas tešmenų ląstelėse yra sterilus, tačiau dėl didelio maistinių medžiagų kiekio gali būti labai geru substratu bakterijų užkratui. Pieno kokybė yra griežtai stebima skaičiuojant somatines ir bakterines ląsteles. Užkrėtimas bakterijomis gali sukelti ligas, sugadinti pieną ar jo produktus. Aerobinės sporas formuojančios bakterijos iš *Sporosarcina*, *Paenisporsarcina*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Geobacillus* ir *Bacillus* genčių kelia didelį susirūpinimą, nes gali išgyventi industrinę pasterizaciją ir formuoti bioplėveles vamzdžiuose ir nerūdijančio plieno įrangoje. Visai neseniai bakteriocinai kaip biologiniai biocidai pradėti tyrinėti siekiant surasti „žalesnį“ ir aplinkai draugišką bakterijų kontrolės metodą. LAB bakteriocinai – nizinas, lacticinas 3147 ar 481 ir pediocinas PA-1 – galėtų potencialiai būti panaudoti pieno pramonėje (Gopal et al., 2015).

### **1.6.4. Bakteriocinų panaudojimas augalininkystėje**

Bakteriocinų panaudojimas gali apimti ir augalininkystę. Bakteriocinai gali veikti skatindami augalų augimą bei apsaugodami nuo patogenų, dėl šių priežasčių galimas gausesnis derlius. *Bradyrhizobium japonicum* 532C gamina bakteriociną turiciną 17. Pastebėta, kad turicinas 17 patekęs ant sojų bei kukurūzo lapų ar šaknų tiesiogiai stimuliuoja šių augalų augimą (Abriouel et al., 2011). *Bacillus subtilis* 14B gamina 21 kDa bakteriociną Bac 14B, kuris efektyviai veikia prieš *Agrobacterium tumefaciens*, augalų karūnos gumbų ligos sukėlėją. *B. subtilis* IH7 kamienas gamina bakteriociną Bac IH7, kuris skatina augalų augimą. Pomidoras ir sėjamas melionas paveikti Bac IH7 buvo aukštesni, augalų šaknys ilgesnės, vaisių užaugo daugiau ir jie buvo didesni. Bac IH7 taip pat gali būti panaudotas prieš sėklų patogenus, tokius kaip *Alternaria solani* (Subramanian & Smith, 2015).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos

#### 2.1.1. Plazmidės ir pradmenys

DNR klonavimui naudotos pCDFDuet-1 (Novagen), pETDuet-1 (Novagen) ir pRSFDuet-1 (Novagen) plazmidės (2.1 lentelė).

#### 2.1 lentelė. Naudotos plazmidės

Plazmidė	Kopijų skaičius ląstelėje	Atrankos žymuo
pCDFDuet-1	20-40	Spektinomocinas
pETDuet-1	~ 40	Ampicilinas
pRSFDuet-1	> 100	Kanamocinas

#### 2.2 lentelė. Naudoti pradmenys

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5'-3'	Restriktazė
Geo19A-NcoI.F	tcagtccatgggcaaaaaggttctatctctactagctatattcactttagtagtgcca	NcoI
Geo19A-Xho.R	atgcactcgagttaggaattcttccgcaattaagtaatgtattgttctctagc	XhoI
Geo19A-BamHI.F	ctagtggatccgaaaaaggttctatctctactagctatattcactttagtagtgcca	BamHI
Geo19A-Xho.R	atgcactcgagttaggaattcttccgcaattaagtaatgtattgttctctagc	XhoI
Geo19B-IF.F	aacttaataaggagatataacatgttccaaaacataaaggaatcaactgtaaacc	NcoI
Geo19B-IF.R	ctaagcattatgcggcgcgaagcttcacctcttcaagtagtaataagttatactttatttagtg	HindIII
Geo19C-IF.F	taagtataagaaggagatatacatatgaatcaggaaataagaataaactgtaattgttcttatattactct	NdeI
Geo19C-IF.R	gcagcggttctttaccagactcgagttatgttttggaaacatttaattctacctcaccatttcatag	XhoI
Geo19D-NcoI.F	gtagccatgggctcgaaagaatggaaaataaagctggttccttacttacattg	NcoI
Geo19D-HindIII.R	gctagaagcttttactactcaatacttggataataaaataataactaatgagcgt	HindIII
ACYCDuetUp1	ggatctcgacgctccct	
T7 Terminator	gctagttattgctcagcgg	

#### 2.1.4. Bakterijų kamienai ir auginimo sąlygos

Darbe naudotas *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Novagen) klonavimo kamienas bei *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) ir *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen) raiškos kamienai. Termofilinis *Parageobacillus genomospecies* 1 NUB36187 kamienas buvo naudotas kaip indikatorinis kamienas bakteriocino aktyvumui nustatyti.

Darbe naudotos augimo terpės aprašytos 2.3 lentelėje. *E. coli* kamienai auginami Luria-Bertani (LB) terpėje 37 °C temperatūroje 180 aps./min. Geobaciliną 19 (Geo19) sintetinant *Geobacillus stearothermophilus* 15 ir indikatorinis kamienai auginami maistinio buljono (MB) terpėje papildytoje druskomis 55 °C temperatūroje 200 aps./min. *Geobacillus*

*stearothermophilus* 15 kamienas taip pat augintas ir modifikuotoje minimalioje druskų terpėje (SDM) papildytoje:

- 10 % MB
- 1 % MB
- 1 % kazamino rūgščių (Difco)
- 10 % mėsos ekstrakto (AppliChem)
- 10 % mėsos ekstrakto (AppliChem) ir 1 % kazamino rūgščių (Difco)

### 2.3 lentelė. Naudotos terpės

Terpė	Sudėtis
LB (Biolab)	10 g/L peptono 5 g/L mielių ekstrakto 10 g/L NaCl
MB	10 g/L peptono (Merck) 5 g/L mėsos ekstrakto (Merck) 5 g/L NaCl (AppliChem) Krano vanduo
SDM	4g/L glicerolio (Roth) 4g/L natrio piruvato (Merck) 50 mmol/L TRIS-HCl 1 mL/L ×1000 druskų mišinio 2 (DM2)
×1000 DM2	14,1 mmol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck) 37,4 mmol/L NH <sub>4</sub> Cl (Merck) 1,6 mmol/L MgSO <sub>4</sub> (Merck) 1,7 mmol/L K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Merck) 15,2 μmol/L MnCl <sub>2</sub> (Merck) 43,2 μmol/L FeCl <sub>3</sub> (Merck) 1,4 mmol/L ZnSO <sub>4</sub> (Merck) 161,7 μmol/L H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Merck)

	210,6 µmol/L CoCl <sub>2</sub> (Merck)
	1,2531 mmol/L CuSO <sub>4</sub> (Merck)
	42,1 µmol/L NiCl <sub>2</sub> (Merck)
SOC	5 g/L mielių ekstrakto (AppliChem)
	20 g/L peptono (Merck)
	0,5 g/L NaCl (AppliChem)
	0,186 g/L KCl (Merck)
	2,4 g/L MgSO <sub>4</sub> (Merck)
	20 mL/L 20% gliukozės tirpalo (Roth)
GYT	100 mL/L glicerolio (Roth)
	1,25 g/L mielių ekstrakto (AppliChem)
	2,5 g/L triptono (Merck)

Agarizuota MB terpė buvo gaminama į terpę pridedant 15 g/L agarą (AppliChem). *E. coli* kamienų auginimui bei atrankai naudota komercinė agarizuota LB (Biolab) terpė. LB terpė sterilinta 121 °C 20 min., MB ir SDM – 121 °C 30 min. SOC terpė sterilinta be gliukozės 121 °C 20 min. SOC terpei atvėsus įpiltas filtruotas gliukozės tirpalas (20 %). Filtruoti (0,22 µm) gliukozės, piruvato arba autoklavuotas glicerolio tirpalas į terpes pridedami po autoklavavimo. Esant reikalui terpės buvo papildomos antibiotikais: ampicilinas 50 µg/mL, kanamicinas 50 µg/mL, spektinomycinas 50 µg/mL, chloramfenikolis 34 µg/mL.

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Antibakterinio aktyvumo tikrinimas

Ruošiant lėkšteles su indikatoriniu kamieniu šviežia *Parageobacillus genomospecies* 1 NUB36187 kultūra tankiai gazonu užsėjama ant Petri lėkštelės su agarizuota MB terpe ir auginama 55 °C temperatūroje. Po 4-5 val. lėkštelės plaunamos nuo lėkštelės skysta MB terpe ir pagaminama ląstelių suspensija, kurios optinis tankis (OT<sub>600nm</sub>) yra 1. Ląstelių suspensija inokuliuojama į nesustingusią (55-60 °C) terpę su agaru santykiu 1:99. Terpė gerai išmaišoma ir išpilstoma į Petri lėkšteles.

Tikrinant mėginio antibakterinį aktyvumą šulinėlių difuzijos metodu Petri lėkštelėse su jautriu kamieniu, steriliu pipetmano antgaliu išpjaunami šulinėliai. Į šulinėlius pilama 100 µL

mėginio. Tikrinant mėginio antibakterinį aktyvumą lašelių metodu ant lėkštelės užlašinama 10  $\mu\text{L}$  mėginio. Lėkštelės inkubuojamos 55 °C temperatūroje per naktį. Po inkubacijos vertinamos matomos inhibicinės zonos.

### **2.2.2. Baltymų koncentravimas**

Supernatantų baltymai koncentruoti vykdant baltymų ekstrakciją chloroformu ir metanoliumi pagal Wessel ir Flügge (1984). 1,5 mL tūrio ependorfe 100  $\mu\text{L}$  tiriamojo mėginio sumaišoma su 400  $\mu\text{L}$  metanolio ir išvorteksuojama. Tuomet įpilama 100  $\mu\text{L}$  chloroformo, gerai išvorteksuojama ir įpilama 300  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Susidrumstęs mėginys išvorteksuojamas ir centrifuguojamas 14000  $\times$  g 1 min. Susiformuoja trys sluoksniai, su pipetmanu nusiurbiamas viršutinis sluoksnis, nepaliekiant baltymų – vidurinio sluoksnio. Į ependorfą su likusiu apatiniu sluoksniu ir baltymais įpilama 400  $\mu\text{L}$  metanolio, išvorteksuojama ir centrifuguojama 20000  $\times$  g 5 min. Pašalinama kiek galima daugiau metanolio nepaliekiant nuosėdų ir džiovinama. Per kelis kartus sukonzentruojama po 0,5 mL mėginio.

### **2.2.3. Glicino-NDS-PAGE baltymų elektroforezė ir zimograma**

Glicino-NDS-PAGE atliekama pagal Laemmli (Rosenberg, 1996). Sukonzentruotos baltymų nuosėdos buvo sumaišomos ir ištirpinamos NDS-PAGE mėginių buferyje, tuomet išskirstomos 15 % NDS-poliakrilamido gelyje elektroforezės metodu. Po elektroforezės gelis plaunamas fiksavimo tirpalu (70 %  $\text{H}_2\text{O}$ , 10 % acto rūgšties (Merck), 20 % propanolio (Roth)). Po valandos tirpalas nupilamas ir plaunamas 3  $\times$  10 min su distiliuotu vandeniu. Ant plauto gelio Petri lėkštelėje užpilama agarizuota nesustingusi MB terpė su *P. genomospecies* 1 NUB 36187 kamieniu (paruošimas aprašytas 2.2.1 skyrelyje). Agarui susitingus lėkštelė inkubuojama per naktį 55 °C temperatūroje. Inhibicinės zonos lyginamos su kartu elektroforezėje leista baltymų liniuote PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

### **2.2.4. Baltymų išsodinimas iš supernatanto amonio sulfatu**

*G. stearothermophilus* 15 kultūra buvo auginama 100 mL SDM + 10 % MB terpėje, pasiekus terpės optinį tankį ( $\text{OT}_{600\text{nm}}$ ) 1,6-1,7 bakterijų kultūra centrifuguojama 7000  $\times$  g 4 °C temperatūroje 20 min. Supernatantas nupilamas ir sumaišomas su amonio sulfatu iki 80 % prisotinimo laipsnių. Tirpalas maišomas 12-16 val. 4 °C temperatūroje, po to centrifuguojamas 20000  $\times$  g 4 °C temperatūroje 1 valandą. Gautas supernatantas nupilamas, o nuosėdos

ištirpinamos 2,5 mL 50 mM TRIS-HCl, pH 8 buferyje. Gauta suspensija nudruskinama gelchromatografijos metodu.

### **2.2.5. Nudruskinimas**

Nudruskinimas vykdytas gelchromatografijos metodu. Paruoštame nudruskinimo buferyje (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8) per naktį išbrinkinama Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech) derva. Dervai išbrinkus buferis pakeičiamas tris kartus. Kolonėlė užpildoma 8,5 mL dervos. Prieš užnešant mėginį kolonėlė plaunama 5 jos tūriais nudruskinimo buferiu. Tuomet užnešama 2,5 mL mėginio. Mėginiui subėgus į gelį ant kolonėlės užpilama buferio ir surenkama 3,5 mL iš kolonėlės ištekėjusio nudruskinto mėginio.

### **2.2.6. Anijonų mainų chromatografija**

Anijonų mainų chromatografija atliekama su BioLogic DuoFlow (Bio-Rad) vidutinio slėgio skysčių chromatografijos sistema naudojant kolonėlę UNO Q12 (Bio-Rad). Prieš užnešant mėginį ant kolonėlės, ji ekvilibruojama buferiu A (15 mM Tris, pH 8). Tiriamasis mėginys, esantis buferyje A, užnešamas ant kolonėlės. Baltymai nuo kolonėlės eliuojami naudojant buferį B (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8) ir keliant jo koncentraciją linijiniu gradientu. Bakteriocino aktyvumas surinktose frakcijose tikrinamas lašelių metodu.

### **2.2.7. Hidrofobinių sąveikų chromatografija**

Hidrofobinių sąveikų chromatografija atliekama su BioLogic DuoFlow vidutinio slėgio skysčių chromatografijos sistema naudojant Bio-Scale MT5 (Bio-Rad) kolonėlę užpildytą Macro-Prep Methyl HIC derva (Bio-Rad). Prieš užnešant mėginį ant kolonėlės, ji ekvilibruojama buferiu B (20 mM pieno rūgšties, 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 4). Tiriamasis mėginys, esantis buferyje B, užnešamas ant kolonėlės. Baltymai nuo kolonėlės eliuojami naudojant buferį A (20 mM pieno rūgšties, pH 4) ir didinant jo koncentraciją linijiniu gradientu. Bakteriocino aktyvumas surinktose frakcijose tikrinamas lašelių metodu. Frakcijos su nustatytu bakteriocino aktyvumu nudruskinamos gelchromatografijos metodu naudojant 15 mM natrio acetato, pH 4,5 nudruskinimo buferį, nudruskinti mėginiai tuo pačiu buferiu skiedžiami 6 kartus ir toliau gryninami katijonų mainų chromatografijos metodu.

### **2.2.8. Baltymų gryninimas Amberlite XAD16N derva**



Amberlite XAD16N (Sigma) derva paruošiama naudojimui pagal gamintojo rekomendacijas. *G. stearotherophilus* 15 kultūros supernatantas (200 mL) su derva (50 g) paliekamas maišytis ant magnetinės maišyklės. Po 2 valandų derva atskiriama nuo supernatanto chromatografijos kolonėlėje ir praplaunama užpilant 200 mL distiliuoto vandens. Vėliau kolonėlė užpildoma metanolio (100 mL) ir derva supilama į stiklinį indelį. Toliau derva su metanolio paliekama ant magnetinės maišyklės 15 min. Po maišymosi derva supilama atgal į kolonėlę, atskiriant ir surenkant metanolį. Antibakterinis aktyvumas metanolyje vertinamas lašelių metodu. Surinkta metanolio frakcija po gryninimo su Amberlite XAD16N praskiedžiama perpus su buferiu iki galutinės 25 mM TRIS-HCl koncentracijos, pH 8 ir toliau gryninama anijonų mainų chromatografijos metodu.

### **2.2.9. Katijonų mainų chromatografija**

Katijonų mainų chromatografija atliekama su BioLogic DuoFlow (Bio-Rad) vidutinio slėgio skysčių chromatografijos sistema naudojant UNO S1 (Bio-Rad) kolonėlę. Prieš užnešant mėginį ant kolonėlės, ji ekvilibruojama buferiu A (15 mM Natrio acetato, pH 4,5). Tiriamasis mėginys, esantis buferyje A, užnešamas ant kolonėlės. Baltymai nuo kolonėlės eliuojami naudojant buferį B (15 mM Natrio acetato, 500 mM NaCl, pH 4,5) ir keliant jo koncentraciją linijiniu gradientu. Bakteriocino aktyvumas surinktose frakcijose tikrinamas lašelių metodu. Frakcijos su nustatytu bakteriocino aktyvumu pateiktos masių spektrometrijos analizei Biochemijos instituto Proteomikos centrui.

### **2.2.10. DNR išskyrimas, valymas ir klonavimas**

Genominės DNR išskyrimui naudotas GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo Fisher Scientific) rinkinys pagal gamintojo rekomendacijas. DNR gryninimui po PGR reakcijos arba po DNR restrikcijos naudotas GeneJET PCR Purification (Thermo Fisher Scientific) rinkinys, DNR valymui iš agarozės gelio naudotas GeneJET Gel extraction (Thermo Fisher Scientific) rinkinys pagal gamintojo rekomendacijas. Plazmidinė DNR iš bakterijų kultūrų buvo skiriama naudojant GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific) rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. DNR karpymas buvo vykdomas naudojant restrikcijos endonukleazes (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas. DNR ligavimui naudota T4 DNR ligazė (Thermo Fisher Scientific) arba NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB) klonavimo rinkinys pagal gamintojo rekomendacijas.

### 2.2.11. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)

Genų pagausinimui buvo atliekama PGR naudojant PfuX7 polimerazę (Nørholm, 2010) ir DreamTaq DNR polimerazės buferį pagal pastarojo gamintojo rekomendacijas arba Phusion HF polimerazę (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas. Naudoti pradmenys pateikti 2.2 lentelėje. PGR su PfuX7 polimeraze atlikta vadovaujantis protokolu:

- 1) 3 min, 95 °C – pirminė denatūracija;
- 2) 30 s, 95 °C – antrinė denatūracija;
- 3) 30 s,  $T_a = T_m - (5-10 \text{ °C})$  – pradmenų prilydimas;
- 4) 1 kb/min., 72 °C – DNR sintezė;  
2-3 žingsniai kartojami 29 kartus
- 5) 5-15 min, 72 °C – galutinė DNR sintezė.

PGR su Phusion HF polimeraze atlikta pagal gamintojo rekomenduojamą protokolą.

Kolonijų PGR metu buvo naudojama PfuX7 polimerazė su Green DreamTaq polimerazės buferiu pagal pastarojo gamintojo rekomendacijas, vietoj DNR matricos į reakcijos mišinį įdedant nedidelį kiekį transformantų kolonijos biomasės ir pirmąjį DNR denatūracijos žingsnį pailginant iki 5-6 min.

### 2.2.12. Geno *geo19A* klonavimas

Genas *geo19A*, koduojamas *G. stearothermophilus* 15 kamieno genome, buvo padaugintas PGR metodu dviem pradmenų poromis: Geo19A-NcoI.F ir Geo19A-XhoI.R bei Geo19A-BamHI.F ir Geo19A-XhoI.R. Atitinkamai gauti DNR produktai *geo19A* ir *geo19A-His* buvo karpomi restriktazėmis, *geo19A* karpytas su FD (Fast Digest) NcoI ir FD XhoI, o *geo19A-His* su FD BamHI ir FD XhoI.

Plazmidė pRSFDuet-1 taip pat buvo sukarpyta su restriktazėmis FD NcoI ir FD XhoI, ir suliguota su *geo19A*, naudojant T4 DNR ligazę. Ligavimo mišinys perkeltas į *E. coli* DH5α ląsteles elektroporacijos metodu. Teigiami transformantai, turintys naują konstrukta pRSF-*geo19A*, atrinkti kolonijų PGR metodu naudojant pradmenų porą ACYCDuetUp1 ir T7 Terminator.

Plazmidė pRSFDuet-1 taip pat buvo sukarpyta ir su restriktazėmis FD BamHI ir FD XhoI, bei suliguota su *geoA-His*, naudojant T4 DNR ligazę, o ligavimo mišinys perkeltas į *E. coli* DH5α ląsteles elektroporacijos metodu. Teigiami transformantai, turintys naują konstrukta pRSF-*geo19A-His*, atrinkti kolonijų PGR metodu naudojant pradmenų porą ACYCDuetUp1 ir T7 Terminator.

Atrinkti teigiami transformantai buvo persėti į šviežią LB terpę su kanamicinu ir auginti per naktį. Ryte iš bakterijų kultūrų buvo išskirti sukonstruoti vektoriai: pRSF-geo19A ir pRSF-geo19A-His.

### **2.2.13. Geno *geo19B* klonavimas**

Genas *geo19B*, koduojamas *G. stearothermophilus* 15 kamieno genome, buvo padaugintas PGR metodu su pradmenų pora Geo19B-IF.F ir Geo19B-IF.R. Gautas DNR produktas *geo19B* karpytas restriktazėmis FD NcoI ir FD HindIII.

Plazmidė pCDFDuet-1 buvo sukarpyta restriktazėmis FD NcoI ir FD HindIII ir suliguota su *geo19B*, naudojant NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix klonavimo rinkinį. Ligavimo mišinys perkeltas į *E. coli* DH5α ląsteles elektroporacijos metodu. Teigiami transformantai, turintys naują konstruktą pCDF-geo19B, atrinkti kolonijų PGR metodu naudojant pradmenų porą ACYCDuetUp1 ir T7 Terminator.

Atrinkti teigiami transformantai buvo persėti į šviežią LB terpę su spektinomicinu ir auginti per naktį. Ryte iš bakterijų kultūrų buvo išskirtas sukonstruotas vektorius pCDF-geo19B.

### **2.2.14. Geno *geo19C* klonavimas**

Genas *geo19C*, koduojamas *G. stearothermophilus* 15 kamieno genome, buvo padaugintas PGR metodu su pradmenų pora Geo19C-IF.F ir Geo19C-IF.R. Gautas DNR produktas *geo19C* karpytas restriktazėmis FD NdeI ir FD XhoI.

Plazmidė pCDFDuet-1 buvo sukarpyta restriktazėmis FD NdeI ir FD XhoI, ir suliguota su *geo19C*, naudojant NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix klonavimo rinkinį. Ligavimo mišinys perkeltas į *E. coli* DH5α ląsteles elektroporacijos metodu. Teigiami transformantai, turintys naują konstruktą pCDF-geo19C, atrinkti kolonijų PGR metodu naudojant pradmenų porą ACYCDuetUp1 ir T7 Terminator.

Vektorius pCDF-geo19B buvo sukarpytas restriktazėmis FD NdeI ir FD XhoI ir suliguotas su *geo19C*, naudojant NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix klonavimo rinkinį. Ligavimo mišinys perkeltas į *E. coli* DH5α ląsteles elektroporacijos metodu. Teigiami transformantai, turintys naują konstruktą pCDF-geo19BC, atrinkti kolonijų PGR metodu naudojant pradmenų porą ACYCDuetUp1 ir T7 Terminator.

Atrinkti teigiami transformantai buvo persėti į šviežią LB terpę su spektinomicinu ir auginti per naktį. Ryte iš bakterijų kultūrų buvo išskirti sukonstruoti vektoriai pCDF-geo19C ir pCDF-geo19BC.

### 2.2.15. Geno *geo19D* klonavimas

Genas *geo19D*, koduojamas *G. stearothermophilus* 15 kamieno genome, buvo padaugintas PGR metodu su pradmenų pora Geo19D-NcoI.F ir Geo19D-HindIII.R. Gautas DNR produktas *geo19D* karpytas restriktazėmis FD NcoI ir FD HindIII.

Plazmidė pETDuet-1 buvo sukarpyta restriktazėmis FD NcoI ir FD HindIII ir suliguota su *geo19D*, naudojant T4 DNR ligazę. Ligavimo mišinys perkeltas į *E. coli* DH5 $\alpha$  ląsteles elektroporacijos metodu. Teigiami transformantai, turintys naują konstrukta pET-*geo19D*, atrinkti kolonijų PGR metodu naudojant pradmenų porą ACYCDuetUp1 ir T7 Terminator.

Atrinkti teigiami transformantai buvo persėti į šviežią LB terpę su spektinomicinu ir auginti per naktį. Ryte iš bakterijų kultūrų buvo išskirtas sukonstruotas vektorius pET-*geo19D*.

### 2.2.16. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė buvo atliekama horizontalioje elektroforezės sistemoje (Bio-Rad, #1640300), mėginius išskirstant 1 % agarozės gelyje su etidžio bromidu (AppliChem), sistemą užpildant 1 $\times$  TAE buferiniu tirpalu (Thermo Fisher Scientific). Elektroforezės buvo vykdytos 45 min veikiant 80 V įtampai. Po elektroforezės geliai buvo analizuojami transiluminatoriuje (DNR MiniBis Pro) apšviečiant juos ultravioletine šviesa (320 nm). Kartu su mėginiais į gelį buvo leidžiami GeneRuler (Thermo Fisher Scientific) arba MassRuler (Thermo Fisher Scientific) DNR fragmentų ilgio standartai.

### 2.2.17. Elektrokompentinių ląstelių ruošimas

Elektrokompentinės *E. coli* DH5 $\alpha$ , BL21 (DE3) ir Rosetta (DE3) ląstelės buvo paruoštos transformacijai pagal Sambrook ir Russell (2001) metodikas su modifikacijomis. *E. coli* kultūros augintos purtyklėje skystoje LB terpėje 37 °C temperatūroje su aeracija per naktį. Ryte kultūros persėtos į šviežią LB terpę (1 % terpės tūrio) ir toliau augintos tomis pačiomis sąlygomis iki OT (600 nm) 0,5. Rosetta (DE3) kamienas augintas terpėse su 34  $\mu$ g/mL chloramfenikolio. Pasiėkus reikiama OT, ląstelės vėsintos ledo vonelėje 10-15 min. ir 15 min. centrifuguotos 5000  $\times$  g 4 °C temperatūroje. Ląstelių nuosėdos plautos steriliu 10 % glicerolio tirpalu (30-40 mL) ir 15 min. centrifuguotos 6000  $\times$  g 4 °C temperatūroje. Plovimas kartotas dar du kartus ląsteles centrifuguojant 20 min. 6500  $\times$  g ir 25 min. 7000  $\times$  g. Toliau ląstelių nuosėdos suspenduotos 1 mL 10 % glicerolio tirpalo ir 2 min. centrifuguotos 5000  $\times$  g 4 °C

temperatūroje. Gautos ląstelių nuosėdos suspenduojamos 0,4 mL GYT terpės ir išpilstomos į mėgintuvėlius po 40 µL. Paruoštos elektrokompetentinės ląstelės saugomos -70 °C temperatūroje.

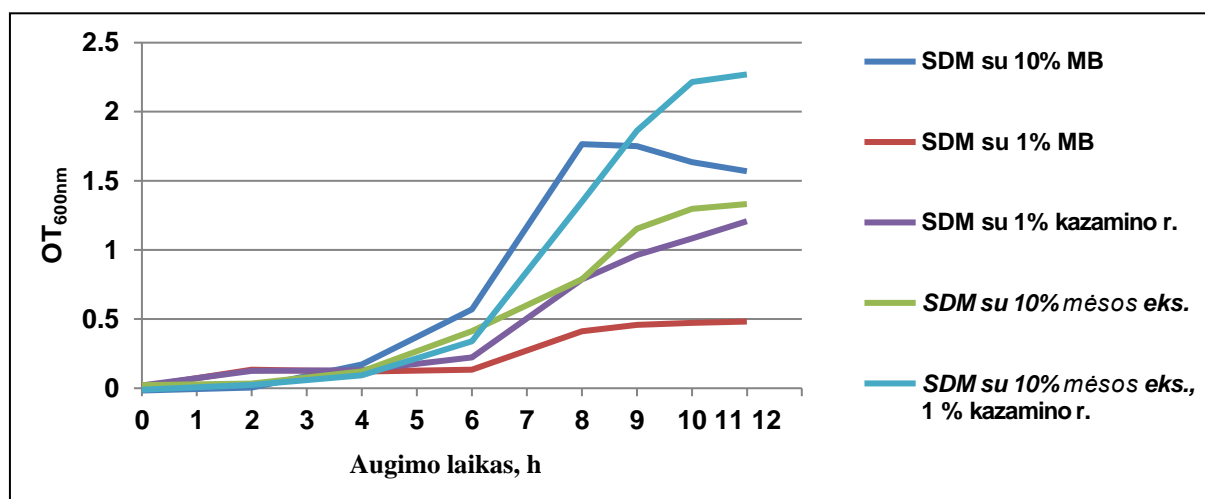
### **2.2.18. Elektrotransformacija**

Bakterijų kultūros transformuotos naudojant elektroporacijos metodą kiuvetėse su 1 mm tarpu taikant šiuos parametrus: 18 kV/cm, 5 ms. Į šaltas (0 °C) elektrokompetentines ląsteles įdedamas 1 µL DNR, tuomet ląstelės perkeliama į šaltą (0 °C) elektroporacijos kiuvetę ir atliekama elektroporacija. Po elektrotransformacijos ląstelės regeneruotos 1 mL SOC terpėje 800 aps./min 37 °C temperatūroje 1 val., tuomet transformantai išsėti ant agarizuotos LB terpės su atitinkamu antibiotiku ir per naktį inkubuoti termostate 37 °C temperatūroje. Išaugus transformantams, kolonijų PGR metodu atrenkami teigiami transformantai – turintys sukonstruotą plazmidinę DNR. Teigiamo transformato kolonija užsėjama į skystą LB terpę su atitinkamu antibiotiku ir auginama 37 °C 180 aps./min per naktį. Tuomet iš bakterijų kultūrų išskiriamos plazmidės, kurios toliau transformuojamos elektroporacijos metodu į *E. coli* raiškos kamienus BL21 (DE3) ir Rosetta (DE3). Genų koekspresijai – kelių genų raiškai vienu metu, į raiškos kamienus elektroporacijos metu perkeliama kelios plazmidės.

### 3. REZULTATAI

#### 3.1. Minimalios augimo terpės optimizacija

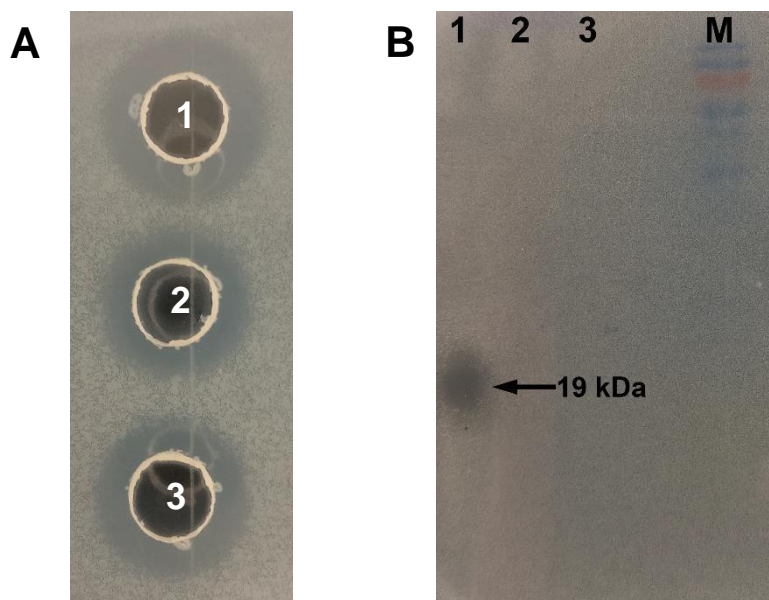
Ankstesnių laboratorijoje vykdytų tyrimų metu *Geobacillus stearotherophilus* 15 kamieno auginimui buvo naudojama maitinamojo buljono terpė (MB). Siekiant pagerinti Geo19 gryninimo procesą nuspręsta kiek galima sumažinti baltymų, kurie įeina į terpės sudėtį, kiekį. Šiame darbe naudota minimali augimo terpė (SDM) papildyta nedideliais kiekiais maitinamojo buljono, kazamino rūgštimis bei mėsos ekstraktu siekiant surasti tokią terpės sudėtį, kurioje būtų didelis geobacilino 19 kiekis ir mažai kitų baltymų. Bakterijų kultūros augimo kreivės pateiktos 3.1 paveiksle. Rezultatai buvo gauti atlikus po tris bandymus su kiekvienu terpės variantu ir išvedus vidurkį. SDM terpėje papildytoje 1 % MB OT buvo mažiau už 0,5, todėl ši terpė nebenaudota. SDM terpė papildyta 1 % kazamino rūgščių taip pat nebenaudota, nes *G. stearotherophilus* 15 kamieno augimas SDM terpėje papildytoje 1 % kazamino rūgščių ir 10 % mėsos ekstrakto buvo geresnis.



3.1 pav. *G. stearotherophilus* 15 augimas skirtingose terpėse.

Siekiant įvertinti, kada yra sekretuojamas bakteriocinas ir kada jo kiekis terpėje didžiausias, sukonzentruoti augimo terpių supernatantai analizuoti šulinėlių difuzijos ir glicino-NDS-PAGE metodais (3.2 pav.). Stebint inhibicines zonas šulinėlių difuzijos metodu (3.2 pav., A) nustatyta, kad trijose skirtingose SDM terpėse *G. stearotherophilus* gali sintetinti bakteriocinus. Kadangi ankstesnių laboratorijoje vykdytų tyrimų metu nustatyta, kad Geo26 yra karštyje nestabilus bakteriocinas, o tuo tarpu Geo19 antibakterinį aktyvumą išlaiko aukštesnėse temperatūrose, supernatantų mėginiai buvo pakaitinti siekiant pašalinti Geo26 aktyvumą. Analizuojant tokius supernatantus glicino-NDS-PAGE metodu nustatyta, kad tik SDM terpėje

papildytoje maitinamuoju buljone, *G. stearotherophilus* 15 kamienas sintetina Geo19, auginant kitose terpėse Geo19 aktyvumas nenustatytas (3.2 pav., B). SDM terpė papildyta 10 % MB toliau naudota gryninant Geo19 iš *G. stearotherophilus* 15 kamieno kultūros supernatanto skysčių chromatografijos sistema.



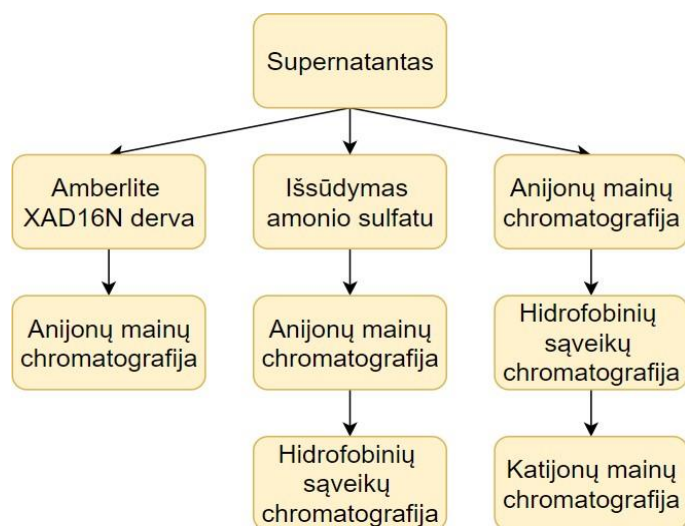
**3.2 pav.** Supernatantų analizė šulinėlių difuzijos ir glicino-NDS-PAGE metodais. Mėginiai imti po 8 val. nuo auginimo pradžios. 1 – SDM terpės su 10 % MB supernatantas; 2 – SDM terpės su 10 % mėsos ekstrakto supernatantas; 3 – SDM terpės su 1 % kazamino rūgščių ir 10 % mėsos ekstrakto supernatantai; M – PageRuler Prestained baltymų liniuotė. Jautrus kamienas – *Parageobacillus genomospecies* 1 NUB36187.

### 3.2. Geo19 gryninimas skysčių chromatografijos sistema

Siekiant optimizuoti Geo19 gryninimą skysčių chromatografijos sistema šiame darbe buvo išbandyta keletas naujų skirtingų strategijų (3.3 pav.). Po kiekvieno gryninimo etapo antibakterinis aktyvumas tikrintas šulinėlių difuzijos arba lašelių metodu.

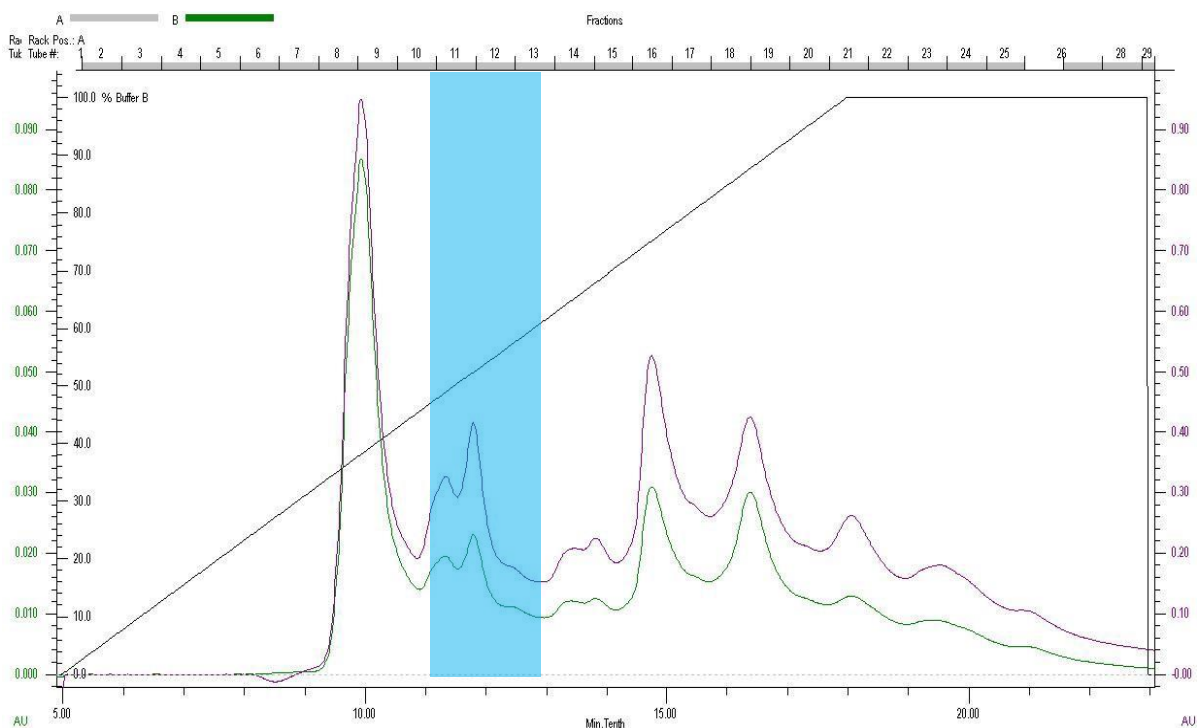
Baltymus iš supernatanto gryninant Amberlite XAD16N derva ir tuomet vykdant anijonų mainų chromatografiją antibakterinis aktyvumas buvo visiškai prarandamas. Nuspręsta, kad ši metodika neveiksminga ir pereita prie kitų gryninimo strategijų.

Kitu atveju pirmiausiai supernatanto baltymai buvo išsodinti amonio sulfatu, tuomet vykdyta anijonų mainų chromatografija bei po jos hidrofobinių sąveikų chromatografija. Ši strategija pasirodė esanti efektyvesnė, tačiau Geo19 aktyvumas vis tiek buvo gana mažas.



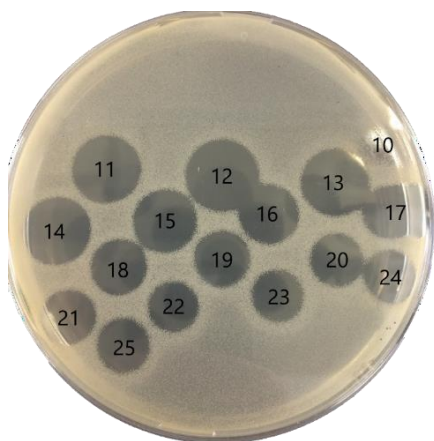
**3.3 pav.** Geo19 gryninimas iš supernatanto skysčių chromatografijos sistema.

Galiausiai Geo19 grynintas pradėdant nuo anijonų mainų chromatografijos, tada vykdant hidrofobinių sąveikų, bei katijonų mainų chromatografiją (3.4 pav.). Po visų trijų gryninimo etapų buvo matomas didelis Geo19 aktyvumas (3.5 pav.). Aktyviausios frakcijos pateiktos Biochemijos instituto Proteomikos centrui masių spektrometrijos analizei.



**3.4 pav.** Katijonų mainų chromatograma. Šviesiai mėlynu fonu pažymėtos aktyviausios frakcijos. Violetinė kreivė – 214 nm, žalia – 280 nm absorbcija, juoda – NaCl gradientas.





**3.5 pav.** Katijonų mainų chromatografijos eliucijos frakcijos.

### 3.3. Geobacilino 19 genų klasterio analizė

Geo19 peptidas buvo išanalizuotas masių spektrometrijos metodu (LC-ESI-MS) ir nustatyta jo aminorūgščių seka. Genas koduojantis Geo19 buvo identifikuotas *G. stearothermophilus 15* genome (priskirtas numeris: LVHZ01000044). Geobacilino 19 baltymo seka buvo sulyginama su NCBI duomenų bazėje esančiomis sekomis. Nustatyta, kad geobacilino 19 aminorūgščių seka turi nedidelį panašumą į jau aprašyto bakteriocino SDP pirmtako seką. Žinoma, kad bakteriocino SDP biosintezėje dalyvauja SdpA ir SdpB baltymai, būtini norint gauti aktyvų bakteriociną, todėl palygintos ir šalia Geo19 koduojančio geno esančių kitų genų koduojamų baltymų sekos (3.1 lentelė). Nustatytas panašumas tarp SDP biosintezėje dalyvaujančių baltymų ir baltymų koduojamų šalia geobacilino19. Baltymo Geo19B seka turi 36,9 % panašumą į SdpB baltymą, tuo tarpu Geo19C seka 32,1 % panaši į SdpA.

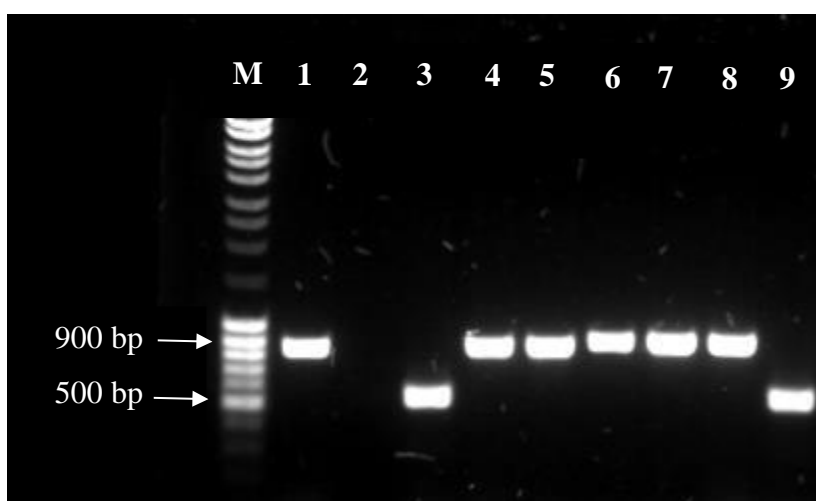
**3.1 lentelė.** Geo19 biosintezės genų klasterio panašumas į SDP bakteriocino biosintezės genų klasterį

Geno pavadinimas	Panašumas į kitus baltymus	Panašumas, %
Geo19C	SdpA (peptidazė)	32,1
Geo19B	SdpB (peptidazė)	36,9
Geo19A	SdpC (bakteriocino pirmtakas)	25
Geo19D	Hipotetinis baltymas	44,4
AAA+ šeimos ATPazė	AAA+ ATPazė	98

### 3.4. *Geo19A*, *geo19B*, *geo19C* ir *geo19D* klonavimas į raiškos vektorius

Siekiant susintetinti aktyvų *Geo19* *Escherichia coli* ląstelėse ir įvertinti *geo19ABCD* genų klasterio koduojamų baltymų funkcijas, genai *geo19A*, *geo19B*, *geo19C* ir *geo19D* klonuoti į raiškos vektorius pCDFDuet-1, pETDuet-1 ir pRSFDuet-1. PGR metodu padauginėti genai ir vektoriai.

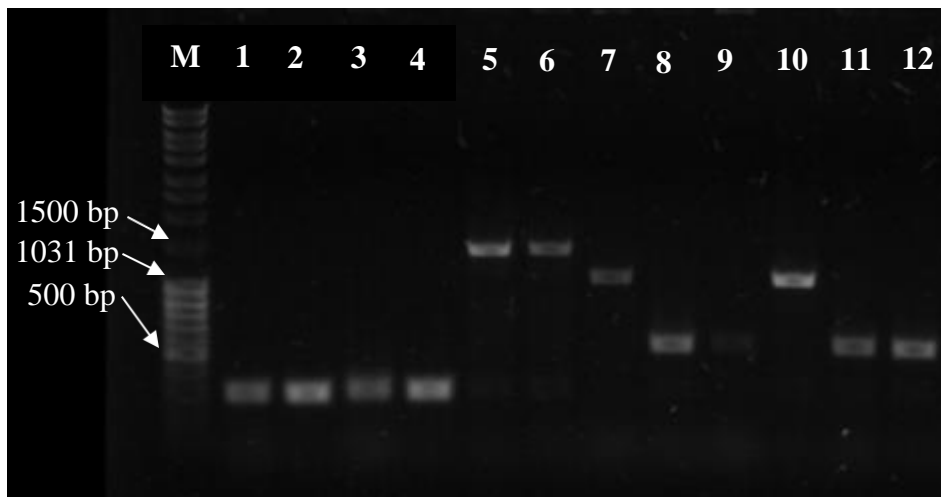
Genas *geo19A* buvo klonuotas į raiškos vektorių pRSFDuet-1, siekiant gauti konstruktus pRSF-*geo19A* ir pRSF-*geo19A*-His. Teigiamų transformantų atrankai buvo panaudotas kolonijų PGR metodas ir išskirti DNR konstruktai pRSF-*geo19A* ir pRSF-*geo19A*-His (3.5 pav.). pRSF-*geo19A*-His plazmidėje genas *geo19A* koduojamas su histidino liekanų žyme peptido N gale.



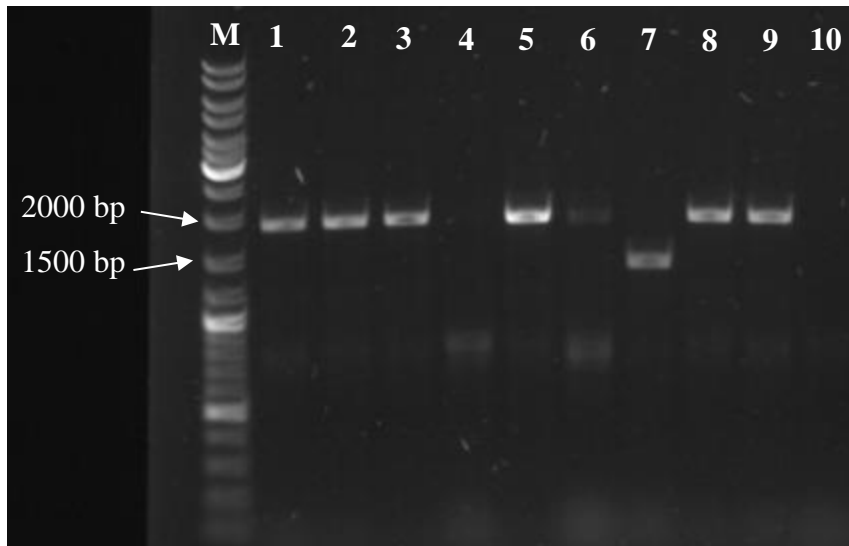
**3.5 pav.** Kolonijų PGR rezultatai atrenkant transformantus su pRSF-*geo19A* ir pRSF-*geo19A*-His plazmidėmis. M – MassRuler DNR liniuotė, 1-5 takeliai – ląstelės transformuotos su pRSF-*geo19A* konstruktu, 6-9 takeliai – ląstelės transformuotos su pRSF-*geo19A*-His konstruktu. Tuščias pRSFDuet-1 vektorius – 523 bp, pRSFDuet-1 vektorius turintis *geo19A* insertą – 843 bp, pRSFDuet-1 vektorius turintis *geo19A*-His insertą – 879 bp.

Genai *geo19B* ir *geo19C* klonuoti į raiškos vektorių pCDFDuet-1, siekiant gauti konstruktus pCDF-*geo19B*, pCDF-*geo19C* ir pCDF-*geo19BC*. pCDFDuet-1 vektorius pasižymi tuo, jog turi 2 multikloninius saitus MKS-1 ir MKS-2. Kuriant konstruktus pCDF-*geo19B* ir pCDF-*geo19C*, genai *geo19B* ir *geo19C* klonuoti į MKS-1 ir MKS-2 atitinkamai. Teigiamų transformantų atranka buvo vykdoma kolonijų PGR metodu (3.6 pav.). Gauta plazmidė pCDF-*geo19B* buvo panaudota kuriant kitą konstrukta – pCDF-*geo19BC*, į MKS-2 įklonuojant *geo19C* geną. Kolonijų PGR metodu buvo atrinkti teigiami transformantai (3.7 pav.).

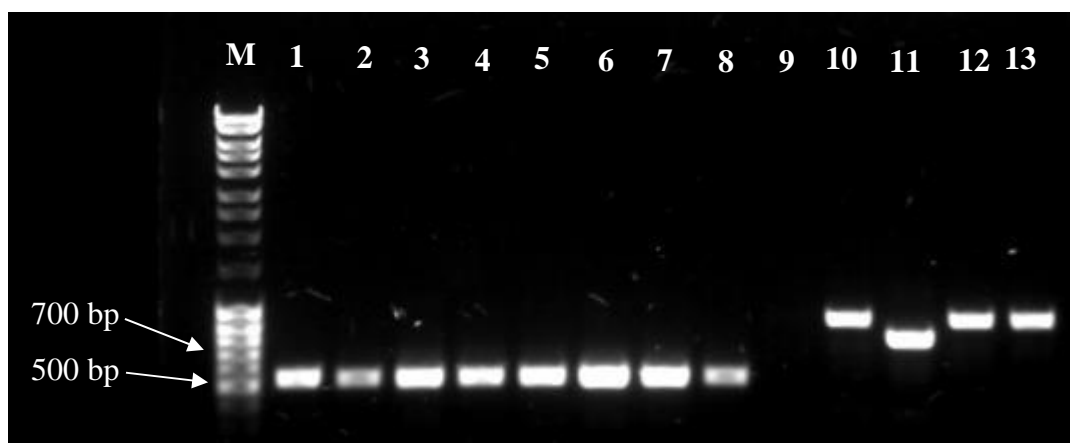
Genas *geo19D* buvo klonuotas į raiškos vektorių pETDuet-1, siekiant gauti konstrukta pET-geo19D. Teigiamų transformantų atrankai naudotas kolonijų PGR metodas (3.8 pav.). Iš viso buvo gauti ir išskirti šeši konstruktai, kurie toliau galėtų būti naudojami genų koekspresijai *E. coli* ląstelėse, siekiant gauti aktyvų ir subrendusį bakteriociną (3.2 lentelė).



**3.6 pav.** Kolonijų PGR rezultatai atrenkant transformantus su pCDR-geo19B ir pCDF-geo19C plazmidėmis. M – MassRuler DNR liniuotė, 1-6 takeliai – ląstelės transformuotos su pCDF-geo19B konstruktu (MKS-1), 7-12 takeliai – ląstelės transformuotos su pCDF-geo19B konstruktu (MKS-2). Tuščias pCDFDuet-1 vektorius – 526 bp, pCDFDuet-1 vektorius turintis *geo19B* geną – 1353 bp, pRSFDuet-1 vektorius turintis *geo19C* geną – 1030 bp.



**3.7 pav.** Kolonijų PGR rezultatai atrenkant transformantus su pCDF-geo19BC plazmide. M – GeneRuler DNR liniuotė, 1-10 takeliai – ląstelės transformuotos su pCDF-geo19BC konstruktu. pCDFDuet-1 vektorius turintis *geo19B* geną (MKS-1) – 1353 bp, pCDF vektorius turintis *geo19BC* genus (MKS-1 ir MKS-2) – 1857 bp.



**38 pav.** Kolonijų PGR rezultatai atrenkant transformantus su pET-geo19D plazmide. M – MassRuler DNR liniuotė, 9-13 takeliai – ląstelės transformuotos su pET-geo19D konstruktu. Tuščias pETDuet-1 vektorius – 509 bp. pETDuet-1 vektorius turintis *geo19D* geną – 676 bp.

### 3.2 lentelė. Darbe sukonstruotos plazmidės.

Konstrukto pavadinimas	Ligavimo metodas	Klonavimo vietas, REazės
pRSF-geo19A	T4 DNR ligazė	<i>NcoI, XhoI</i>
pRSF-geo19A-His	T4 DNR ligazė	<i>BamHI, XhoI</i>
pCDF-geo19B	NEBuilder Mix	<i>NcoI, HindIII</i>
pCDF-geo19C	NEBuilder Mix	<i>NdeI, XhoI</i>
pCDF-geo19BC	NEBuilder Mix	<i>NcoI, HindIII, NdeI, XhoI</i>
pET-geo19D	T4 DNR ligazė	<i>NcoI, HindIII</i>

### 3.5. Heterologinė *geo19A*, *geo19B*, *geo19C* ir *geo19D* genų raiška *E. coli* ląstelėse

Gauti konstruktai: pRSF-geo19A, pCDF-geo19B, pCDF-geo19C, pCDF-geo19BC ir pET-geo19D, toliau buvo perkelti į *E. coli* BL21 (DE3) ir Rosetta (DE3) ląsteles siekiant atlikti *geo19A*, *geo19B*, *geo19C* ir *geo19D* genų raišką (3.3 lentelė). Genų raiška ląstelėse nebuvo indukuota dėl 2020 metų kovo 16 dieną įsigaliojusių karantino sąlygų (žr. skyrių 5. NUMATYTI EKSPERIMENTAI).

### 3.3 lentelė. Į *E. coli* BL21 (DE3) ir Rosetta (DE3) kamienus perkelti konstruktai.

Transformuojami konstruktai	Ekspresuojami genai	Kultivavimui naudojami antibiotikai
pRSF-geo19A	<i>geo19A</i>	Kanamicinas
pRSF-geo19A ir pET-geo19D	<i>geo19AD</i>	Kanamicinas, ampicilinas

pRSF-geo19A ir pCDF-geo19B	<i>geo19AB</i>	Kanamicinas, spektinomicinas
pRSF-geo19A ir pCDF-geo19C	<i>geo19AC</i>	Kanamicinas, spektinomicinas
pRSF-geo19A ir pCDF-geo19BC	<i>geo19ABC</i>	Kanamicinas, spektinomicinas
pRSF-geo19A, pCDF-geo19BC ir pET.geo19D	<i>geo19ABCD</i>	Kanamicinas, spektinomicinas, ampicilinas

#### 4. REZULTATŲ APTARIMAS

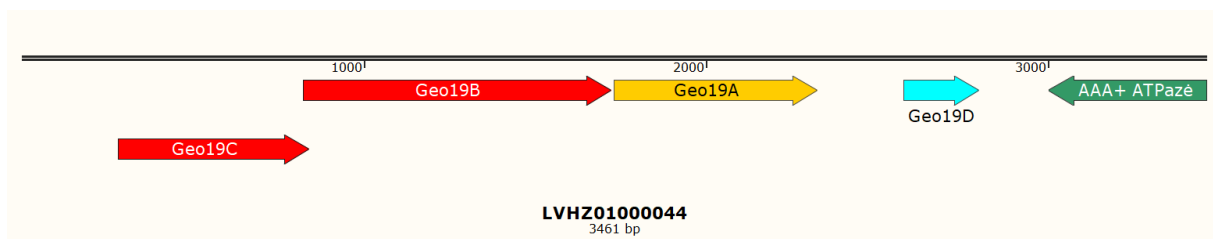
Išbandžius skirtingas modifikuotas minimalias terpes atrinkta SDM terpė papildyta 10 % MB ir naudota tolimesniuose darbuose. Gryninant geobaciliną 19 skysčių chromatografijos sistema išbandytos skirtingos strategijos. Geobacilinas 19 iš supernatanto išgrynintas vykdant anijonų mainų, tuomet hidrofobinių sąveikų ir galiausiai katijonų mainų chromatografiją. Aktyviausios katijonų mainų frakcijos pateiktos VU GMC Biochemijos instituto Proteomikos centrui masių spektrometrijos analizei. Gauta Geo19 aminorūgščių seka. Genas koduojantis Geo19 buvo identifikuotas *G. stearothermophilus* 15 genome (priskirtas numeris: LVHZ01000044). Geobacilino 19 baltymo seka buvo sulyginata su NCBI duomenų bazėje esančiomis sekomis. Nustatyta, kad geobacilino 19 aminorūgščių seka turi nedidelį panašumą į jau aprašyto bakteriocino SDP prekursoriaus seką (3.8 pav.). Palygintos šalia geo19 struktūrinio geno esančių genų koduojamų baltymų sekos su NCBI duomenų bazėje esančiomis sekomis. Aptiktas panašumas tarp SDP biosintezėje dalyvaujančių ir šalia geobacilino19 koduojamų baltymų.

3	KVLSLLAIFTLVVSIFFSTIPVNNVQSKELKD---YSGEELFEGVIFGYGEVAKLFPPEMWE	59
	<b>K+L LL + + + FS + ++ S K+ +SGE+ E G++FG GEV KL +</b>	
4	KLLRLLIVSMVTILVFSLVGLSKESSTSAKENHTFSGEDYFRGLLFGQGEVVKLISNDLD	63
60	ESLLKDFTYTDEQVQKIKEIESELKQVDPDFFTKFKEGIQSGDHSVIEETIQKTEESLMK	119
	<b>L+K+ T E + + ++ +K+ P + + K+ I S D + E + K ++ + K</b>	
64	PKLVKEANST-EGKKLVNDVVKFICKDQPPQYMDELKQSIDSKDPKKLIENMTKADQLIQK	122
120	VFEEVVKQASSDKKMRAMATKPGFVIALAYSÝ-VGATHIAAAFVLTVVAVGTFKFGPSSV	178
	<b>+ S K+ +A Y Y VG +A V K+V S</b>	
123	YAKKNENVKYSSNKVTPSCGLYAVCVAAAGLYVVGNAVALQTAAAVTTAVWKYVAKYSS	182
179	ESDN	182
	<b>+ N</b>	
183	SASN	186

**3.8 pav.** Geobacilino 19 (viršuje) ir SdpC (apačioje) pirmtakų baltymų sekų panašumai. Panašumai paryškinti pilkos spalvos fonu.

Bakteriocinas SDP yra koduojamas *sdpABC* genų klasterio *Bacillus subtilis* genome. Bakteriocino pirmtako SdpC N ir C galai yra nukarpomi po translacijos SdpAB baltymų ir gaunamas aktyvus 42 aminorūgščių ilgio, vieną disulfidinį tiltelį N-gale turintis bakteriocinas (Liu et al., 2010). Manoma, kad SdpAB veikia kaip peptidazės nukirpdamos signalines sekas N ir C galuose. SDP yra aktyvus prieš skirtingas Firmicutes tipo gram-teigiamas bakterijas, bei *E. coli* su pažeista išorine membrana. SDP dalyvauja *B. subtilis* bioplėvelės apsaugoje bei kanibalizme, nutolinant sporuliacijos procesą. SDP veikia didindamas membranos pralaidumą (Lamsa et al., 2012). Šalia *sdpABC* genų klasterio koduojamas SdpI imuniteto baltymas ir jo

repressorius SdpR. SdpC taip pat veikia kaip signalinė molekulė SdpI ir SdpR raiškai (Ikryannikova et al., 2019). Panašumas tarp *sdpABC* ir *geo19ABCD* genų klasterių, gali reikšti, kad geobacilino 19 produkcija ir veikimo būdas taip pat yra panašus. Geo19 yra termostabilus, neturi potransliacinių modifikacijų būtinų aktyvumui. Įvertinus panašumą į SDP bakteriociną, numanoma subrendusio Geo19 molekulinė masė be signalinės sekos yra mažesnė už 10 kDa. Visi šie požymiai būdingi II klasės bakteriocinams, todėl geobaciliną 19 galima priskirti būtent šiai klasei.



**3.9 pav.** Geobaciliną 19 koduojantis genų klasteris *G. stearothermophilus* 15 genome. Bakteriocino pirmtakas – geltona spalva, hipotetinis baltymas – mėlyna, AAA+ šeimos ATPazė – žalia, genai koduojantys peptidazes – raudona.

Siekiant susintetinti aktyvų Geo19 *E. coli* ląstelėse ir įvertinti *geo19ABCD* genų klasterio (3.9 pav.) koduojamų baltymų funkcijas pastarieji genai buvo klonuoti į raiškos vektorius pCDFDuet-1, pETDuet-1 ir pRSFDuet-1. Buvo gauti konstruktai: pRSF-geo19A, pRSF-geo19A-His, pCDF-geo19B, pCDF-geo19C, pCDF-geo19BC ir pET-geo19D. Šie konstruktai perkelti į *E. coli* BL21 (DE3) ir Rosetta (DE3) raiškos kamienus taip, kad tolimesnių tyrimų metu būtų galima įvertinti atskirų *geo19ABCD* genų klasterio koduojamų baltymų įtaką aktyvaus Geo19 produkcijai.

## 5. NUMATYTI EKSPERIMENTAI

Planuota vykdyti heterologinę *geo19A*, *geo19B*, *geo19C* ir *geo19D* genų raišką *E. coli* ląstelėse. Šiam uždaviniui įgyvendinti konstruktai pRSF-*geo19A*, pRSF-*geo19A*-His, pCDF-*geo19B*, pCDF-*geo19C*, pCDF-*geo19BC* ir pET-*geo19D* buvo perkelti į *E. coli* BL21 (DE3) ir Rosetta (DE3) raiškos kamienus. Tolimesni darbai būtų buvę indukuoti genų raišką su IPTG, įvertinti indukuotų ląstelių lizato antibakterinį aktyvumą bei išanalizuoti indukuotų ląstelių lizatus baltymų NDS-PAGE metodu.



## IŠVADOS

1. Atrinkta SDM terpė papildyta 10 % MB *G. stearothermophilus* 15 produkuojamo bakteriocino Geo19 biosintezei ir gryninimui.
2. Optimizuota Geo19 gryninimo strategija skysčių chromatografijos sistema. Geo19 iš supernatanto išgrynintas vykdant anijonų mainų, tuomet hidrofobinių sąveikų ir galiausiai katijonų mainų chromatografiją.
3. Po išgryninto Geo19 peptido masių spektrometrijos analizės (LC-ESI-MS) nustatyta aminorūgščių seka.
4. Geo19 bakteriocinas turi nedidelį aminorūgščių sekos panašumą į SDP bakteriociną, identifikuoti Geo19 biosintezėje galimai dalyvaujantys genai: *geo19ABCD*, todėl šis bakteriocinas gali būti priskirtas II bakteriocinų klasei.
5. Genai *geo19ABCD* buvo įklonuoti į raiškos vektorius pCDFDuet-1, pETDuet-1 ir pRSFDuet-1 ir paruošti genų raiškai *E. coli* BL21 (DE3) ir Rosetta (DE3) ląstelėse.

## REZULTATŲ SKLAIDA

Ulinauskaitė S., Kaupinis A., Valius M., Kalėdienė L., Kaunietis A. Geobacillin 19, novel bacteriocin from a thermophilic bacterium, Vita Scientia 2020, 2020 01 03, Vilnius. Stendinis pranešimas.

## **PADĖKA**

Dėkoju magistrinio darbo vadovui dr. Arnoldui Kauniečiui už suteiktą galimybę, kantrybę, vertingus patarimus rengiant magistrinį darbą bei už visus komentarus ir pagalbą rašant. Taip pat dėkoju Proteomikos centro darbuotojams už atliktą masių spektrometrijos analizę. Galiausiai noriu padėkoti Lukui Urbaičiui už palaikymą, motyvaciją ir psichologinę pagalbą sunkiomis akimirkomis.

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Saulė Ulinauskaitė  
Magistro baigiamasis darbas

**Naujo bakteriocino, produkuojamo termofilinės bakterijos,  
identifikavimas, klonavimas ir heterologinė raiška**

SANTRAUKA

Bakteriocinai – tai antimikrobiniai peptidai sintetinami bakterijos ribosomų ir pasižymintys antibakteriniu aktyvumu prieš bakteriociną sintetinančiai bakterijai artimas ar tolimesnes bakterijų rūšis. Bakteriocinai yra labai įvairialypė junginių grupė. Bakteriocinų aktyvumas prieš maistą gadinančias bei patogenines bakterijas gali būti plačiai panaudojamas maisto pramonėje, žemės ūkyje bei medicinoje.

Bakteriocinai tyrinėjami jau ilgą laiką, tačiau žinių apie termofilinių bakterijų bakteriocinus sukaupta nedaug. Termofilinės bakterijos daugiausia gamina termostabilius baltymus, termofilinių bakterijų gaminami bakteriocinai taip pat galėtų būti termostabilesni už mezofilų gaminamus. Šiame darbe naudotas termofilinis *Geobacillus stearothermophilus* 15 kamienas gaminantis kelis bakteriocinus. Vienas iš jų – 19 kDa molekulinės masės geobacilinas 19. Šiame darbe tęsiami geobacilino 19 tyrimai.

Darbo metu optimizuota auginimo terpė ir gryninimo strategija skysčių chromatografijos sistema. Išgrynintas geobacilinas 19 išanalizuotas masių spektrometrijos metodu bei pasitelkus bioinformatinius metodus nustatyta šio peptido aminorūgščių seka. Sulyginus geobacilino 19 ir šalia koduojamų baltymų sekas su baltymų sekomis esančiomis NCBI duomenų bazėje aptiktas panašumas tarp *geo19ABCD* ir *sdpABC* genų klasterių. Geobacilinas 19 buvo priskirtas II klasės bakteriocinams, nes pasižymi šiai klasei būdingomis charakteristikomis. Siekiant įvertinti *geo19ABCD* genų klasterio koduojamų baltymų funkcijas genai *geo19A*, *geo19B*, *geo19C* ir *geo19D* pasitelkus skirtingus ligavimo metodus sėkmingai įklonuoti į raiškos vektorius pCDFDuet-1, pETDuet-1 ir pRSFDuet-1. Gauti konstruktai perkelti į *E. coli* BL21 (DE3) ir Rosetta (DE3) raiškos kamienus, taip siekiant tolimesnių tyrimų metu įvertinti atskirų *geo19ABCD* genų klasterio koduojamų baltymų įtaką aktyvaus Geo19 produkcijai.

VILNIUS UNIVERSITY  
LIFE SCIENCES CENTER  
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Saulė Ulinauskaitė  
Master thesis

**Identification, cloning and heterologous expression of novel  
bacteriocin produced by thermophilic bacterium**

SUMMARY

Bacteriocins are ribosomally-synthesized antimicrobial peptides which are active against closely related or non-related to producer species. Bacteriocins are very heterogeneous group of compounds. Bacteriocins activity against food spoiling and pathogenic bacteria could be widely used in food industry, agriculture, and medicine.

Bacteriocins have been studied for a while now but knowledge about bacteriocins from thermophilic bacteria are still scarce. Thermophilic bacteria mostly produce thermostable proteins therefore bacteriocins produced by these bacteria could be also thermostable, possibly even more than bacteriocins produced by mesophilic bacteria. In this research thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* 15 strain producing several bacteriocins was used. One of them is 19 kDa molecular weight geobacillin 19. This research is continuation of work with geobacillin 19.

During this research we optimized growth medium and liquid chromatography purification strategy. Purified geobacillin 19 was analyzed by mass spectrometry and using bioinformatic tools we determined his amino acid sequence. The sequences of geobacillin 19 and proteins coded near *geo19* were compared to protein sequences in NCBI database. We discovered that there is a similarity between *geo19ABCD* and *sdpABC* gene clusters. Geobacillin 19 share features typical to class II bacteriocins, for this reason *Geo19* was assign to this class. To determine the functions of proteins coded in *geo19ABCD* gene cluster *geo19A*, *geo19B*, *geo19C* and *geo19D* genes using different ligation methods were cloned into pCDFDuet-1, pETDuet-1 and pRSFDuet-1 expression vectors. Constructs were moved to *E. coli* BL21 (DE3) and Rosetta (DE3) expression strains to determine individual *geo19ABCD* gene cluster genes functions in production of active *Geo19*.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Ben Omar, N., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Acedo, J. Z., Chiorean, S., Vederas, J. C., & van Belkum, M. J. (2018). The expanding structural variety among bacteriocins from Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(6), 805–828. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy033>
- Alkhalili, R. N., & Canbäck, B. (2018). Identification of Putative Novel Class-I Lanthipeptides in Firmicutes: A Combinatorial In Silico Analysis Approach Performed on Genome Sequenced Bacteria and a Close Inspection of Z-Geobacillin Lanthipeptide Biosynthesis Gene Cluster of the Thermophilic *Geobacillus* sp. Strain ZGt-1. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092650>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., Camarero, J. A., Campopiano, D. J., Challis, G. L., Clardy, J., Cotter, P. D., Craik, D. J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P. C., Entian, K.-D., Fischbach, M. A., Garavelli, J. S., ... van der Donk, W. A. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports*, 30(1), 108–160. <https://doi.org/10.1039/c2np20085f>
- Balciunas, E. M., Castillo Martinez, F. A., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. de M., Converti, A., & Oliveira, R. P. de S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins:

- A review. *Food Control*, 32(1), 134–142.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>
- Bastos, M. do C. de F., Coutinho, B. G., & Coelho, M. L. V. (2010). Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 3(4), 1139–1161. <https://doi.org/10.3390/ph3041139>
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Llobès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., & Cavard, D. (2007). Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(1), 158–229. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-06>
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>
- 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. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03339-y>
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins—A viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, J., Zhang, L., Ding, Z., Qu, X., & Cui, H. (2012). Class IIa bacteriocins: Diversity and new developments. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 16668–16707. <https://doi.org/10.3390/ijms131216668>
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., & Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 70(2), 564–582. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-05>
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A., & Cotter, P. D. (2015). The Prevalence and Control of *Bacillus* and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01418>

- Güllüce, M., Karadayı, M., & Barış, Ö. (2013). *Bacteriocins: Promising Natural Antimicrobials*. <https://doi.org/10.13140/2.1.5014.5606>
- Hegemann, J. D., Zimmermann, M., Xie, X., & Marahiel, M. A. (2015). Lasso Peptides: An Intriguing Class of Bacterial Natural Products. *Accounts of Chemical Research*, *48*(7), 1909–1919. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00156>
- Hiemstra, P. S., & Zaat, S. A. J. (Eds.). (2013). *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity*. Springer Basel. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0541-4>
- Ibrahim, O. O. (2019). *Classification of Antimicrobial Peptides Bacteriocins, and the Nature of Some Bacteriocins with Potential Applications in Food Safety and Bio-Pharmaceuticals*. 18.
- Ikryannikova, L. N., Kurbatov, L. K., Soond, S. M., & Zamyatnin, A. A. (2019). Harnessing the Potential of Killers and Altruists within the Microbial Community: A Possible Alternative to Antibiotic Therapy? *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *8*(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040230>
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2018). Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology Advances*, *36*(8), 2187–2200. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.007>
- Kaunietis, A., Buivydas, A., Čitavičius, D. J., & Kuipers, O. P. (2019). Heterologous biosynthesis and characterization of a glycocin from a thermophilic bacterium. *Nature Communications*, *10*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09065-5>
- Kaur, B., Balgir, P. P., Mittu, B., Kumar, B., & Garg, N. (2013). *Biomedical Applications of Fermenticin HV6b Isolated from Lactobacillus fermentum HV6b MTCC10770* [Research Article]. BioMed Research International; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2013/168438>
- Kishimoto, N., Fujita, T., Kitaguchi, Y., Arimoto, T., Okamoto, M., Tsukamoto, H., Ito, E., Onishi, R., Osada, R., & Yamaguchi, F. (2009). *Anti-fungal substance* (World



- Intellectual Property Organization Patent No. WO2009099098A1).  
<https://patents.google.com/patent/WO2009099098A1/en>
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria\*. *FEMS Microbiology Reviews*, *12*(1–3), 39–85. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x>
- Knerr, P. J., & van der Donk, W. A. (2012). Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annual Review of Biochemistry*, *81*, 479–505. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060110-113521>
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, *128*, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>
- Lamsa, A., Liu, W.-T., Dorrestein, P. C., & Pogliano, K. (2012). The Bacillus subtilis cannibalism toxin SDP collapses the proton motive force and induces autolysis. *Molecular Microbiology*, *84*(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08038.x>
- Li, Y., & Rebuffat, S. (2020). The manifold roles of microbial ribosomal peptide-based natural products in physiology and ecology. *The Journal of Biological Chemistry*, *295*(1), 34–54. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006545>
- Liu, W.-T., Yang, Y.-L., Xu, Y., Lamsa, A., Haste, N. M., Yang, J. Y., Ng, J., Gonzalez, D., Ellermeier, C. D., Straight, P. D., Pevzner, P. A., Pogliano, J., Nizet, V., Pogliano, K., & Dorrestein, P. C. (2010). Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of Bacillus subtilis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(37), 16286–16290. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008368107>

- Masuda, Y., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2012). New type non-lantibiotic bacteriocins: Circular and leaderless bacteriocins. *Beneficial Microbes*, 3(1), 3–12. <https://doi.org/10.3920/BM2011.0047>
- Mathur, H., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2015). The sactibiotic subclass of bacteriocins: An update. *Current Protein & Peptide Science*, 16(6), 549–558. <https://doi.org/10.2174/1389203716666150515124831>
- Melby, J. O., Nard, N. J., & Mitchell, D. A. (2011). Thiazole/oxazole-modified microcins: Complex natural products from ribosomal templates. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(3), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.02.027>
- Mikulík, K., Melčová, M., & Zídková, J. (2017). Antibacterial peptides from thermophilic bacteria. *International Journal of Engineering Research and Science*, 3(5), 262122.
- Montville, T. J., & Chikindas, M. L. (2013). Biological Control of Foodborne Bacteria. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4th Edition, 803–822. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch31>
- Nissen-Meyer, J., Oppegård, C., Rogne, P., Haugen, H. S., & Kristiansen, P. E. (2010). Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIIb) Bacteriocins. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(1), 52–60. <https://doi.org/10.1007/s12602-009-9021-z>
- Noda, M., Miyauchi, R., Danshiitsoodol, N., Matoba, Y., Kumagai, T., & Sugiyama, M. (2018). Expression of Genes Involved in Bacteriocin Production and Self-Resistance in *Lactobacillus brevis* 174A Is Mediated by Two Regulatory Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(7). <https://doi.org/10.1128/AEM.02707-17>
- Nørholm, M. H. (2010). A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. *BMC Biotechnology*, 10(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-21>

- Parks, W. M., Bottrill, A. R., Pierrat, O. A., Durrant, M. C., & Maxwell, A. (2007). The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. *Biochimie*, 89(4), 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.12.005>
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>
- Ríos Colombo, N. S., Chalón, M. C., Navarro, S. A., & Bellomio, A. (2018). Pediocin-like bacteriocins: New perspectives on mechanism of action and immunity. *Current Genetics*, 64(2), 345–351. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0757-9>
- Rosenberg, I. M. (1996). *Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques* (2nd ed.). Birkhäuser Basel. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2056-5>
- Sánchez-Hidalgo, M., Montalbán-López, M., Cebrián, R., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., & Maqueda, M. (2011). AS-48 bacteriocin: Close to perfection. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 68(17), 2845–2857. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0724-4>
- Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>
- Subramanian, S., & Smith, D. L. (2015). Bacteriocins from the rhizosphere microbiome – from an agriculture perspective. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00909>
- Suda, S., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2012). Lacticin 3147—Biosynthesis, molecular analysis, immunity, bioengineering and applications. *Current Protein & Peptide Science*, 13(3), 193–204. <https://doi.org/10.2174/138920312800785021>
- Todorov, S. D., Wachsman, M., Tomé, E., Dousset, X., Destro, M. T., Dicks, L. M. T., de Melo Franco, B. D. G., Vaz-Velho, M., & Drider, D. (2010). Characterisation of an antiviral

- pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology*, 27(7), 869–879. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.001>
- Uzelac, G., Miljkovic, M., Lozo, J., Radulovic, Z., Tomic, N., & Kojic, M. (2015). Expression of bacteriocin LsbB is dependent on a transcription terminator. *Microbiological Research*, 179, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.06.011>
- Vincent, P. A., & Morero, R. D. (2009). The structure and biological aspects of peptide antibiotic microcin J25. *Current Medicinal Chemistry*, 16(5), 538–549. <https://doi.org/10.2174/092986709787458461>
- Wessel, D., & Flüggé, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, 138(1), 141–143. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90782-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90782-6)
- WHO. (2015). *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*. WHO; World Health Organization. <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>
- Zhao, X., & Kuipers, O. P. (2016). Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics*, 17(1), 882. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3224-y>
- Zoumpopoulou, G., Pepelassi, E., Papaioannou, W., Georgalaki, M., Maragkoudakis, P. A., Tarantilis, P. A., Polissiou, M., Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. (2013). Incidence of Bacteriocins Produced by Food-Related Lactic Acid Bacteria Active towards Oral Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4640–4654. <https://doi.org/10.3390/ijms14034640>