



PD 15251



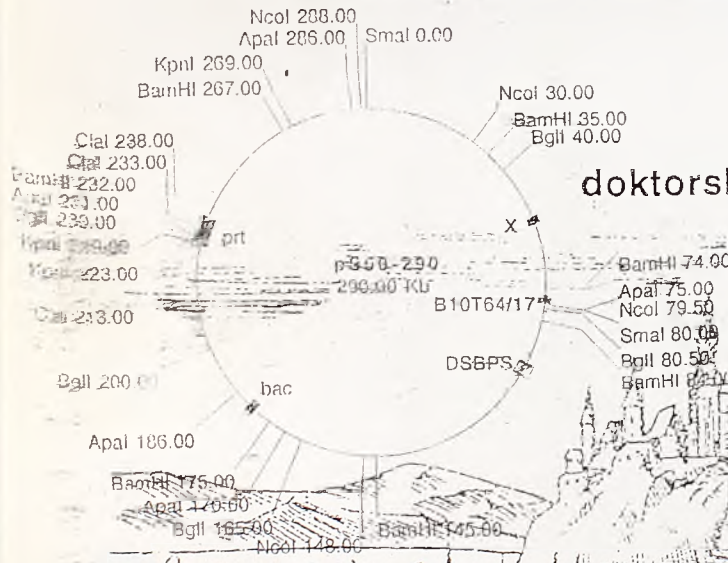
003101486

UNIVERZITET U BEOGRADU

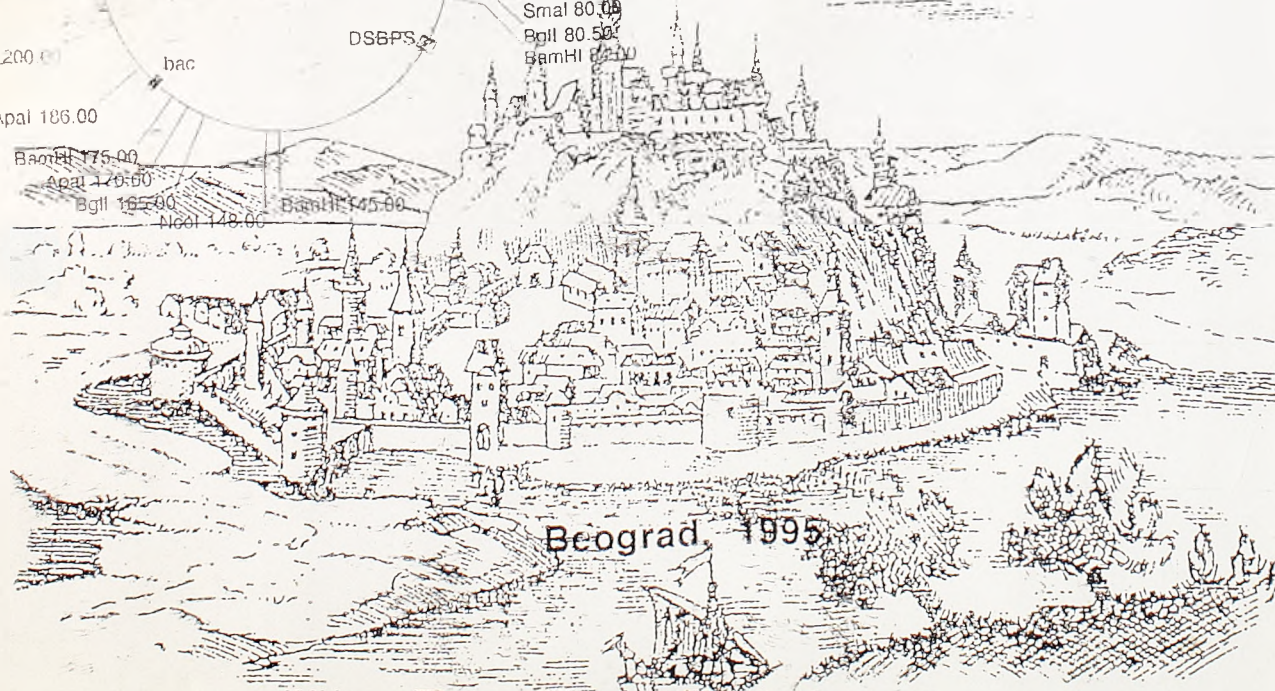
COBISS • BIOLOSKI FAKULTET, BEOGRAD

Milan O. Kojic

ANALIZA VELIKOG KONJUGABILNOG PLAZMIDA BAKTERIJE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50



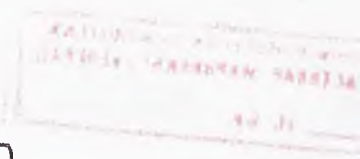
doktorska disertacija



Beograd, 1995

72 15251

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOSKI FAKULTET, BEOGRAD



Milan O. Kojic

ANALIZA VELIKOG KONJUGABILNOG PLAZMIDA BAKTERIJE
Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50



doktorska disertacija

Beograd, 1995.

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
„СВЕТИСЛАВ НАЧИНСКИ“ - БЕОГРАД
Д. бр. 101486



101

101486

MENTOR: dr Ljubisa Topisirovic, redovni profsor, Bioloski fakultet, Beograd.

KOMENTOR:

CLANOVI KOMISIJE: dr Ljubisa Topisirovic, redovni profesor, Bioloski fakultet, Beograd.

dr Branka Vasiljevic, naucni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd.

dr Jelena Knezevic, docent, Bioloski fakultet, Beograd.

DATUM ODBRANE: _____

DATUM PROMOCIJE: _____

DOKTORAT NAUKA: _____

ANALIZA VELIKOG KONJUGABILNOG PLAZMIDA BAKTERIJE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50

APSTRAKT

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50 je prirodni izolat iz maslacne mafe. Soj S50 sintetise bakteriocin uskog spektra delovanja i proteinazu PI tipa. Soj S50 poseduje tri vidljiva plazmida koji se mogu izolovati (pS50-7, pS50-10a i pS50-10b). Ciscenjem plazmida iz soja S50 istovremenim tretmanom subletalnom temperaturom i novobiocinom (10 μ g/ml) dobijen je Bac- i Prt- derivat (S50-1).

Analizom genoma soja S50 i derivata S50-1 na elektroforezi u pulsirajucem polju (PFGE) nakon digestije restrikcionim enzimima ustanovljeno je da se geni za sintezu proteinaze PI tipa i bakteriocina S50 nalaze na plazmidu velicine oko 290kb koji je oznacen kao plazmid pS50-290. Na osnovu razdvajanja secene DNK na PFGE i hibridizacije sa probama za proteinazni (Q₁ i Q₉₂) i bakteriocinski gen (LcnA) odredjena je restrikciona mapa plazmida pS50-290 i odredjen je položaj gena na njemu. Plazmid pS50-290 pokazuje visok stepen retardacije na PFGE sto moze biti posledica vezivanja proteina za njega.

Soj S50 je ukrstan sa vecim brojem recipijentnih sojeva (MG7284, IL1403, VEL1122 i ocisceni derivati soja S50) u kojima su dobijani Bac⁺ konjugnti sa priblizno istom frekvencom. Na osnovu toga se moze tvrditi da je plazmid pS50-290 autokonjugabilan ili Tra⁺ plazmid, odnosno da na sebi poseduje sve neophodne gene za sopstveni transfer. Pored sinteze bakteriocina ustanovljeno je da svi dobijeni konjuganti sintetisu i proteinazu PI tipa istih karakteristika kao i soj S50. Analizom plazmidnog sastava konjuganata ustanovljeno je da i drugi plazmidi soja S50 (pS50-7 i pS50-10b) poseduju sposobnost konjugacionog transfera, najverovatnije zato sto poseduju gen za Mob protein i *oriT* sekvencu.

Restrikcionom analizom plazmida izolovanih iz konjuganata, rekonjuganata i derivata S50-20 (digestija *Sma*I restrikcionim enzimom i razdvajanje dobijenih fragmenata na PFGE) ustanovljeno je da je u njima plazmid pS50-290 (oznacen kao pS50-290 Δ) skracen i da poseduje samo jedno *Sma*I restrikciono mesto za razliku od plazmida pS50-290 izolovanog iz soja S50 koji poseduje dva. Fragment koji se deletira je velicine nekoliko kilobaza i pokazuje homologiju sa ostalim plazmidima soja S50 (pS50-7, pS50-10a i pS50-10b). Hibridizacionim eksperimentima u kojima je plazmid pS50-7 koriscen kao proba pokazano je da svi plazmidi soja S50 poseduju homologe sekvence cije prisustvo govori o zajednickom poreklu ovih plazmida.

U procesu izolacije spektinomycin-rezistentnih derivata soja S50 izolovani su mutanti koji pokazuju visok nivo rezistencije na spektinomycin i koji ujedno poseduju inverziju u hromozomu velicine izmedju 180 i 790kb. Istu inverziju je posedovao i mutant derivata S50-20-62 rezistentan na visoku koncentraciju spektinomicina.

Kljucne reci: *Lactococcus lactis*, plazmid, proteinaza, bakteriocin S50, konjugacija, rezistencija, PFGE, retardacija, inverzija, homologija

ANALYSIS OF LARGE CONJUGATIVE PLASMID OF *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50

ABSTRACT

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50 was isolated from butter starter culture. Strain S50 produced bacteriocin which has narrow antibacterial spectrum. In addition, strain S50 synthesized extracellular cell wall-associated proteinase of PI-type. The strain S50 has three plasmids detectable by conventional procedures for isolation of plasmids (pS50-7, pS50-10a and pS50-10b). Curing experiments of strain S50 with novobiocin (10 μ g/ml) and sublethal temperature (41°C) resulted in obtaining a Prt⁻, Bac⁻ derivative (S50-1).

The analysis of original strain S50 and Prt⁻, Bac⁻ derivative S50-1 by restriction enzymes on PFGE revealed that *prt* and *bac* genes are located on the large plasmid (approximately 290 kb) named pS50-290. Restriction map of plasmid pS50-290 was done by concomitant using PFGE and hybridization experiments with *prt* (Q₁ and Q₉₂) and *bac* (LcnA) probes.

The plasmid pS50-290 shows significant retardation on PFGE. DNA sequence which is target for binding protein(s) is located between *Sma*I restriction site (at position 80 kb) and *Nco*I (148 kb) on restriction map.

The plasmid pS50-290 is self-transmissible (Tra⁺) plasmid. Strain S50 was used as a donor in conjugation experiments for transfer of plasmid pS50-290 to the other lactococcal strains (MG7284, IL1403 and VEL1122). All conjugations gave high number of conjugants. The obtained transconjugants (frequency of conjugation were about 10⁻⁷) produced bacteriocin S50 and proteinase of PI type. These data show that ability for conjugal transfer depends only on genetic elements located on pS50-290 plasmid.

Conjugants MG10 and SIL102, besides plasmid pS50-290 acquired smaller plasmids of strain S50 (MG10 has plasmid pS50-7 and SVEL102 pS50-10b). Transfer of plasmids pS50-7 and pS50-10b (they are non-self-transmissible plasmids) appeared to be dependent on cotransfer of the conjugative plasmid pS50-290.

The analysis of conjugants and derivative S50-20 (derivative of the strain S50 cured of plasmids pS50-7 and pS50-10b) by restriction enzyme *Sma*I and PFGE showed that the plasmid pS50-290 (designated pS50-290 Δ) present in them has only one *Sma*I site. Hybridization experiments (labelled pS50-7 was used as a probe) revealed that plasmids pS50-290, pS50-10a and pS50-10b contain homologous sequences to the particular region of plasmid pS50-7. Plasmid pS50-290 Δ which is present in conjugants and derivative S50-20 hasn't shown homology because it has deleted that region.

During the isolation of spectinomycin-resistant mutants of the derivative S50-1 as well as S50-20-62 to be used as a recipients in conjugation crosses an inversion within chromosomal DNA has occurred in them.

Key words: *Lactococcus lactis*, plasmid, proteinase, bacteriocin S50, conjugation, resistance, PFGE, retardation, inversion, homology

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu, pod neposrednim rukovodstvom prof. Dr Ljubise Topisirovica.

Ovom prilikom zeleo bih da se zahvalim svima onima koji su ucestvovali u razvoju svih mojih sposobnosti koje su doprinele uspesnom realizovanju ovog rada.

Dr Ljubisi Topisirovicu, na produblivanju interesovanja za rad u ovoj oblasti, za pruzenu pomoc u toku izrade ovog rada, za budno i strpljivo pracenje eksperimenata i dobijenih rezultata, na mnogobrojnim diskusijama koje su mi pomogle u pravilnom tumacenju dobijenih rezultata, njihovoj obradi i interpretiranju, kao i na stvaranju novih ideja, a posebno na razvoju moje samostalnosti u planiranju i vodjenju eksperimenata. Takodje mu se zahvaljujem na strpljenju koje je pokazao u ispravljanju gresaka koje sam cinio, kako u eksperimentalnom radu tako i pisanju.

Dr Jeleni Knezevic za kriticku ocenu ovog rada.

Dr Branki Vasiljevic, za kriticku ocenu ovog rada, za savete koje mi je davala pri resavanju mnogih mojih dilema, za optimizam koji mi je pomogao da upoznam lepote bavljenja ovim poslom.

Veliku zahvalnost dugujem svojim najblizim saradnicima iz laboratorije za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama koji su mi nesebicno pomagali u eksperimentalnom radu i nastojanjima da razvijemo radnu, a i drugarsku atmosferu u nasoj laboratoriji, koja je sve radosti ovog posla ucinila jos vecim, a sve tuge laksim. Zahvalnost dugujem i svim ostalim saradnicima i profesorima Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, na pomoci i iskrenom drugarstvu koje ovaj Institut cini jedinstvenim i zaista prijatnim mestom za rad.

Posebno se zahvaljujem mome bati koji je sve vreme mog dosadasnjeg zivota i rada koracao uz mene i bio najveca potpora mome uspehu. Zahvaljujem se mojoj Snezi koja je pokazala veliko razumevanje za potroseno vreme u eksperimentalnom radu. Zahvaljujem se mojim roditeljima, mom seoskom ucitelju, a takodje i svim mojim nastavnicima i profesorima.

Ovaj rad posvecujem mojoj Ani

SADRZAJ

I UVOD

1. Bakterije mlecno kiselinskog vrenja.....	1
1.1. Laktokoke (rod <i>Lactococcus</i>).....	2
2. Plazmidi.....	2
2.1. Plazmidi laktokoka.....	3
2.1.1. Laktokokalni ssDNK plazmidi.....	3
2.1.2. Laktokokalni teta-replicirajuci plazmidi.....	4
2.1.3. Stabilnost laktokokalnih plazmida.....	5
3. Horizontalni transfer DNK.....	6
3.1. Transformacija.....	7
3.2. Transdukcija.....	8
3.3. Konjugacija.....	8
3.3.1. Seks faktor.....	8
3.3.2. Konjugativni plazmidi laktokoka.....	10
3.3.3. Konjugativni transpozoni.....	11
3.3.4. Konjugativni transpozoni laktokoka.....	11
4. Proteinaze laktokoka.....	12
5. Bakteriocini laktokoka.....	13

II CILJ ISTRAZIVANJA

15

III MATERIJAL I METODE

1. Eksperimentalni materijal.....	16
1.1. Bioloski materijal-Bakterijski sojevi i vektori.....	16
1.2. Medijumi za rast bakterija.....	17
2. Metode.....	18
2.1. Metode za izolaciju DNK.....	18
2.1.1. Mini-metoda izolacije plazmidne DNK iz <i>E. coli</i>	18
2.1.2. Mini-metoda izolacije plazmidne DNK iz laktokoka.....	19
2.1.3. Preciscavanje DNK fenolom (PCI procedura).....	19
2.1.4. Mini-metoda izolacije dvolancane forme M13 faga.....	19
2.1.5. Izolacija velike kolicine plazmidne DNK iz laktokoka.....	20
2.1.6. Izolacija velike kolicine plazmidne DNK i dvolancane forme M13 faga iz <i>E. coli</i>	20

2.1.7. Preciscavanje DNK u gradijentu CsCl.....	21
2.1.8. Brza izolacija ukupne DNK.....	21
2.1.9. Izolovanje jednolancane forme iz M13 faga.....	21
2.1.9.1. Mini-metoda izolacije jednolancane DNK iz M13 faga.....	22
2.1.10. Izolacija DNK <i>in-situ</i> iz laktokoka.....	22
2.2. Enzimske reakcije sa DNK.....	23
2.2.1. Digestija DNK restrikcionim enzimima.....	23
2.2.2. Digestija DNK restrikcionim enzimima <i>in-situ</i> u agaroznim blokovima.....	23
2.2.3. Popunjavanje DNK krajeva Klenow fragmentom DNK polimeraze I.....	23
2.2.4. Ligiranje DNK.....	24
2.3. Elektroforeza DNK.....	24
2.3.1. Klasicna horizontalna elektroforeza DNK.....	24
2.3.2. Elektroforeza u pulsirajucem polju (PFGE).....	24
2.4. Elucija DNK fragmenata.....	25
2.4.1. Elektroelucija DNK fragmenata.....	25
2.4.2. Elucija DNK fragmenata iz agaroze niske tacke topljenja.....	25
2.5. Obelezavanje DNK metodom "Nick-Translacije".....	26
2.6. "Southern" hibridizacija.....	26
2.6.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane.....	26
2.6.2. Hibridizacija.....	27
2.7. Sekvenciranje DNK.....	27
2.8. Metode rada sa proteinima.....	28
2.8.1. Dobijanje aktivnog proteinaznog ekstrakta	28
2.8.2. Hidroliza kazeina.....	28
2.8.3. Elektroforeza proteina (SDS PAGE).....	29
2.9. Metode rada sa bakterijama i fazima.....	29
2.9.1. Transformacija <i>E. coli</i> kompetentnih celija plazmidnom i fagnom DNK.....	29
2.9.2. Transformacija laktokoka elektroporacijom.....	30
2.9.3. Ciscenje plazmida iz laktokoka.....	30
2.9.4. Bakteriocinski test.....	31
2.9.5. Konjugacioni transfer.....	31

IV REZULTATI

1. Karakterizacija soja <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> S50..	32
---	----

2. Lokacija gena za proteoliticku i bakteriocinsku aktivnost.....	32
3. Analiza velikog plazmida pS50-290.....	37
3.1. Velicina plazmida.....	37
3.2. Restrikciona mapa i lokacija gena na plazmidu pS50-290.....	38
4. Konjugacioni eksperimenti.....	38
4.1. Konjugativna svojstva plazmida pS50-290.....	38
4.2. Vreme konjugacionog prenosa.....	41
4.3. Analiza konjuganata.....	42
4.3.1. Plazmidni sastav konjuganata.....	42
4.3.2. Proteoliticka svojstva konjuganata.....	45
4.3.3. Analiza sposobnosti sinteze bakteriocina u konjugantima.....	47
4.3.4. Analiza konjuganata na elektroforezi u pulsirajucem polju (PFGE).....	48
4.3.5. Hibridizacioni eksperimenti sa DNK izolovanom iz konjuganata.....	51
5. Medjusobna homologija plazmida soja S50	53
5.1. Kloniranje sekvenci iz plazmida pS50-290 homologih plazmidu pS50-7.....	55
V DISKUSIJA	60
VI ZAKLJUCCI	67
VII LITERATURA	69

I UVOD

1. BAKTERIJE MLECNO KISELINSKOG VRENJA

Mnoge vrednosti koje se nalaze u covekovom okruzenju vrse pozitivan uticaj na njegov zivot i sposobnosti, iako on toga veoma cesto nije ni svestan. Cilj nauke je da uoci te vrednosti i da ih jos vise priblizi coveku kako bi ih on mogao svesno kontrolisati i mnoge od njih prevesti iz stihijskih u vremenski i kvantitativno kontrolisane. Jedna od vrednosti koja cini sastavni deo covekove sredine, a veoma cesto i njegove crevne flore jesu bakterije mlecno kiselinskog vrenja. Za razliku od bakterija koje izazivaju bolesti i koje destruktivno deluju na covekov organizam, bakterije mlecno kiselinskog vrenja na njega deluju blagotvorno sa vise aspekata. Pored toga ove bakterije nasle su siroku primenu i u industriji. Doba tehnicko tehnoloskog prosperiteta nezamislivo je bez ucesca ovih bakterija u prehrambenoj industriji. S obzirom na ovako veliki znacaj bakterija mlecno kiselinskog vrenja za coveka od izuzetne je vaznosti dobro poznavanje ovih bakterija .

Bakterije mlecno kiselinskog vrenja su heterogena grupa Gram-pozitivnih, anaerobnih ili fakultativno anaerobnih, nemotilnih i nesporulisucih bakterija koje kao glavni ili jedini produkt fermentativnog metabolizma sintetisu mlecnu kiselinu. Ono sto karakterise ove bakterije je da ne poseduju porfirine i oksidativnu fosforilaciju tako da do energije dolaze fosforilacijom na nivou supstrata bez potrebe za kiseonikom (London, 1976). Na osnovu puteva i krajnjih produkata fermentacije secera bakterije mlecno kiselinskog vrenja mogu se podeliti u dve grupe: homofermentativne i heterofermentativne (Batt, 1986). Krajnji produkti metabolizma ovih bakterija, kao sto su mlecna i sircetna kiselina, zatim vodonik peroksid mogu ispoljiti inhibitorni efekat na okolne bakterije (Klaenhammer, 1988), dok neki sojevi to postizu sintezom inhibitornih supstanci proteinske prirode, najcesce male molekulske mase zvanih bakteriocini (Gilliland and Speak, 1977; Klaenhammer, 1993). Pored fermentativnih, bakterije mlecno kiselinskog vrenja poseduju proteoliticku i u manjoj meri i lipoliticku sposobnost (Olson, 1990). Takodje poseduju sposobnost sinteze aromogenih supstanci koje daju prijatan ukus i miris proizvodima, a po nekim autorima poseduju i sposobnost sinteze molekula koji vrse detoksifikaciju kancerogena i razgradnju holesterola (Gilliland, 1990). Posto bakterije mlecno kiselinskog vrenja imaju veoma nisku biosintetsku sposobnost, one za svoj rast potrebuju bogate nutrijente (Morishita *et al*, 1981; Jansen and Hammer, 1993). Najvazniji rodovi ove grupe bakterija kako za molekularno biologska istrazivanja tako i za prehrambenu industriju su: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus*.

Pored osnovnih mikrobioloskih znanja o bakterijama mlecno kiselinskog vrenja za uspesnu kontrolu industrijski bitnih svojstava ovih bakterija, a takodje i za vrsenje genetskih manipulacija u cilju izmene, odnosno poboljsanja ovih vaznih svojstava potrebno je i dobro poznavanje molekularne genetike ovih bakterija. Za postizanje ovog cilja neophodno su potrebni dobro razvijeni sistemi za transfer DNK, zatim stabilni vektori za kloniranje i ekspresiju gena. Prvi radovi na razvoju sistema za transfer DNK zasnovani su na poboljsanju prirodnog *in-vivo* transfera DNK kao sto su transdukcija i konjugacija (Fitzgerald and Gasson, 1988). Razvojem sistema transfera DNK za laktokoike, najpre transformacije protoplasta (Kondo and McKay, 1982), a zatim elektroporacije (McIntyre and Harlander, 1989) otvoren je put za mnogo ekstenzivnije genetske studije ovih bakterija. Najbolje prouceni, a i najsiru primenu u industriji do sada nasli su sojevi u okviru roda *Lactococcus*.



1.1. Laktokoke (rod *Lactococcus*)

Laktokoke su bakterije mlecno kiselinskog vrenja okruglog ili jajolikog oblika, velicine oko 2 μ m u precniku, koje se mogu naci pojedinačno ili grupisane u lance. Ovaj rod cine dve vrste *Lactococcus lactis* (sa podvrstama *lactis*, *cremoris* i *diacetylactis*) i *Lactococcus raffinolactis* (Mundt, 1986). Neki sojevi u okviru ovog roda poseduju svojstva koja su veoma vazna za industriju kao sto su proteoliticka sposobnost, zatim sposobnost sinteze aromogenih jedinjenja acetoina i diacetila fermentacijom citrata i sinteze bakteriocina od kojih je napoznatiji nizin.

Veliki broj endogenih plazmida laktokoka su korisnici za razvoj razlicitih vektora za kloniranje od kojih vecina ima sirok opseg domacina (Kok *et al*, 1984). I pored velikog napretka u razvoju vektora, sistema transfera DNK i uspesnog kloniranja gena odgovornih za osobine znacajne za industriju jos uvek su prisutni problemi stabilnosti vektora (strukturne i segregacione) i efikasnosti transfera, koji za svoje resavanje zahtevaju jos bolje poznavanje biologije plazmida laktokoka. Problem segregacione nestabilnosti plazmida koji nose gene za industrijski bitne karaktere pokusava se resiti na dva nacina: integracijom ovih gena u hromozom domacina i povecanjem stabilnosti plazmida koji nose klonirane gene. Metod za integraciju gena, cija je originalna lokacija bila na plazmidu, u hromozom je brzo razvijen i uspesno se koristi (Leenhouts *et al*, 1990; Leenhouts *et al*, 1991), mada je za njegovu siru primenu potrebno jos bolje poznavanje organizacije genoma laktokoka. Za uspesno poboljsanje stabilnosti vektora potrebno je detaljnije poznavanje biologije plazmida, a posebno replikacionih mehanizama.

2. PLAZMIDI

Geni za esencijalne funkcije u bakterijskoj celiji locirani su na hromozomu. Pored hromozomalne DNK veliki broj sojeva bakterija poseduje i druge DNK molekule koji mogu samostalno da se replikuju, nazvane plazmidi. Plazmidi su otkriveni sezdesetih godina ovog veka, najpre preko markera koje nose, a zatim su vizuelizovani na gradijentu gustine CsCl (Datta, 1985). Plazmidi se mogu definisati kao ekstrahromozomalna, za zivot bakterije cesto neesencijalna DNK, koja se autonomno replikuje. Interes za izucavanje plazmida pojavio se odmah nakon njihovog otkrica. Ovaj interes je porastao sa otkricem da su geni za veoma vazne bakterijske osobine (kao sto su virulencija, rezistentnost na antibiotike i druge agense, sinteza antibiotika, sposobnost konjugacije, bioloska fiksacija azota, katabolizam secera i druge) od znacaja za medicinu, farmaciju, prehrambenu i druge vrste industrije locirani na plazmidima (Stanisich, 1988). Sa razvojem metodologije rekombinantne DNK plazmidi, pored fagne DNK, dobijaju jos jednu veoma znacajnu ulogu. Oni postaju osnova za razvoj vektora za kloniranje, propagaciju i ekspresiju strane DNK u bakterijama. Zbog znacaja koji imaju, plazmidi su igrali veoma vaznu ulogu u bioloskim istrazivanjima, a i danas jos uvek postoji potreba za njihovim jos boljim poznavanjem i to njihove strukture, replikacije, particije, stabilnosti itd. Plazmidi se mogu klasifikovati na vise nacina: prema tipu replikacije [plazmidi koji se repliciraju mehanizmom kotrljajuceg obruca (RCR) i teta-replicirajuci], strukturi (cirkularni i linearni), prema genima koje nose (konjugabilni, R, Ti ..), opsegu domacina (sirok i uzan) ili prema inkopatibilnosti (plazmidi koji ne mogu koegzistirati u istom domacinu cine jednu inkopatibilnu grupu) itd. (Novick, 1987). Plazmidna DNK izolovana je iz velikog broja kako Gram pozitivnih tako i Gram negativnih bakterija. Iako broj plazmida izolovanih iz Gram pozitivnih bakterija nije manji u poredjenju sa izolovanim iz Gram negativnih, ipak se mora reci da se o biologiji plazmida Gram pozitivnih bakterija daleko manje zna.

2. 1. Plazmidi laktokoka

Razliciti sojevi laktokoka poseduju razlicit broj plazmida, pocev od onih koji ne poseduju plazmide kao sto su na primer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (McKay *et al*, 1980) i *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* BC101 (Nissen-Meyer *et al*, 1992b), do onih koji imaju veci broj plazmida: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO712 [5] (Gasson, 1983), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* WM4 [6] (Scherwitz *et al*, 1983), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* DRC3 [8] (McKay and Baldwin, 1984), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 4365 [9] (Davey, 1984), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 4E9 [10] (Neve *et al*, 1984) i *Lactococcus lactis* ME2 [13] (Klaenhammer and Sanozky, 1985). U nekim sojevima veci broj plazmida, razlicitih po svojim karakteristikama, veoma stabilno koegzistira, dok se u drugim mogu veoma lako eliminisati bilo spontano ili tretmanom razlicitim agensima (Davey, 1984; Kok, 1987; Holo *et al*, 1991). Za neke plazmide nije poznato da determinisu neke fenotipske osobine te su nazvani kripticnim, dok se za veliki broj zna da pored gena za replikativne funkcije nose i gene za veoma vazne karaktere. Otkricem da su neke osobine znacajne za industriju vezane za prisustvo nestabilnih plazmida uciniilo je biologiju plazmida laktokoka veoma znacajnom granom istrazivanja. Lista gena znacajnih za industriju, koji su locirani na plazmidima, je velika: rezistencija na fage (McKay and Baldwin, 1984; Klaenhammer and Sanozky, 1985; Lucey *et al*, 1992), katabolizam saharoze (Steele and McKay, 1986) i laktoze (Kempner and McKay, 1979; Gasson, 1983; van der Lelie *et al*, 1991; Petzel and McKay, 1992), sinteza bakteriocina (Davey, 1984; Neve *et al*, 1984; Harmon and McKay, 1987; van Belkum *et al*, 1989; Dufour *et al*, 1991; Holo *et al*, 1991; Gupta and Batish, 1992; Klaenhammer, 1993), imunost na bakteriocin (Klaenhammer and Sanozky, 1985; Dufour *et al*, 1991; Holo *et al*, 1991; Klaenhammer, 1993), sinteza proteinaza (Kuhl *et al*, 1979; Gasson, 1983; Kok, 1987; de Vos *et al*, 1989) itd.

Veliki broj laktokokalnih plazmida moze se konjugacijom prebaciti iz jednog soja u drugi (Fitzgerald and Gasson, 1988). Neki od ovih plazmida prenose se zahvaljujuci sopstvenim mobilizacionim funkcijama, dok se vecina prenosi mobilizacionim funkcijama drugih plazmida ili hromozoma (Lucey *et al*, 1993).

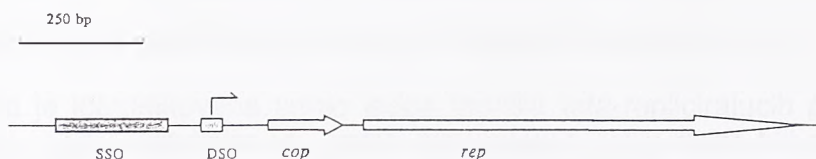
U eksperimentima ciscenja plazmida metodom parcijalnog formiranja protoplasta soja *Lactococcus lactis* NCDO712 dobijeni su delecioni derivati (Gasson, 1983), tako da se moze pretpostaviti da su mnogi laktokokalni plazmidi u stvari samo derivati jednog velikog nestabilnog praplazmida. Drugi, donekle suprotan put nastanka laktokokalnih plazmida moze biti i formiranje manje ili vise stabilnih kointegrata koji mogu nastati preko IS elemenata ili mesto specifičnom rekombinacijom (Gruss and Ehrlich, 1989; Prevots *et al*, 1994). IS elementi i transpozoni su cesto prisutni na plazmidima i hromozomima vecine sojeva laktokoka (Polzin and Shimizu-Kadota, 1987; Romero and Klaenhammer, 1990; Haandrikman *et al*, 1990; Schäfer *et al*, 1991; Polzin and McKay, 1991).

Velicina laktokokalnih plazmida je veoma razlicita. Laktokokalni RCR replicirajuci plazmidi su malih velicina, od 2-6 kilobaza, (Neve *et al*, 1984; Klaenhammer and Sanozky, 1985), od kojih su dobro izanalizirani pSH71 (2,01kb), pWVO1 (2,17kb) (de Vos, 1987; Kok *et al*, 1984), dok se velicina teta-replicirajucih plazmida kreće od nekoliko kilobaza do nekoliko desetina kilobaza (Gasson, 1983; Scherwitz *et al*, 1983; Neve *et al*, 1984; Klaenhammer and Sanozky, 1985), pa cak i preko 100 kilobaza (Kok, 1987; Scherwitz-Harmon and McKay, 1987; Prevots *et al*, 1994).

2. 1. 1. Laktokokalni ssDNK plazmidi

Ono sto karakterise laktokokalne plazmide koji u toku replikacije prolaze kroz formu

jednolancanog intermedijera (ssDNK plazmide) je to da su to mali plazmidi, velicine od 2- 6kb, sa velikim brojem kopija i širokim opsegom domacina. Vecina vektora razvijenih za kloniranje u laktokokama bazirana je na ovim plazmidima. Replikacija ovih plazmida odvija se preko jednolancanih intermedijera, mehanizmom kotrljajućeg obruca, po čemu su ovi plazmidi i dobili ime ssDNK ili RCR plazmidi. Analizom replikacionih regiona ssDNK plazmida pWVO1, pSH71 i pD125 pokazano je da su oni skoro identicni. Svi oni sadrže otvoreni okvir citanja (ORF) za Rep protein, odgovoran za inicijaciju replikacije, koji pokazuje ekstenzivnu homologiju među članovima ove familije plazmida. Pored gena za Rep protein replikacioni region ssDNK plazmida čine ss oridzin (region odgovoran za sintezu "+" lanca DNK), ds oridzin (mesto od koga otpocinje i na kome se završava sinteza drugog "-" DNK lanca) i *cop* region (regulatorni region odgovoran za broj kopija sa kojim se sintetise represorni protein koji se veže za promotor *rep* i *cop* gena (Slika 1).



Slika 1. Opšta strukturna organizacija oridzina laktokokalnog RCR plazmida.

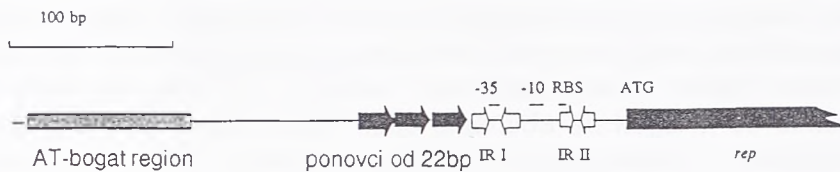
SSO: ss oridzin; DSO: ds oridzin; *cop*: gen za Cop protein; *rep*: gen za Rep protein. Strelica pokazuje smer replikacije (Seegers, 1994).

Ovi plazmidi se mogu lako detektovati kako na osnovu homologije sa do sada poznatim ssDNK plazmidima tako i po prisustvu ssDNK u lizatu bakterija (Seegers, 1994).

2. 1. 2. Laktokokalni teta-replicirajući plazmidi

Vecina važnih gena zbog kojih su laktokoke i interesantne za prehrambenu industriju locirana je na velikim plazmidima koji pokazuju i strukturnu i segregacionu nestabilnost (Gasson, 1983). Analizom replikacionih regiona ovih laktokokalnih plazmida pokazano je da oni nemaju homologiju sa ssDNK plazmidima. Međutim ustanovljeno je da svi analizirani replikoni velikih plazmida laktokoka (pWVO2, pWVO4, pWVO5, pIL7 itd.) pripadaju istoj familiji i pokazuju visok stepen međusobne homologije. Pokazano je da oni po strukturnoj organizaciji replikacionog regiona pripadaju klasi A teta-replicirajućih plazmida. Ovi plazmidi na sebi nose *rep* gen za Rep protein odgovoran za replikaciju i visoko konzervisanu *ori* sekvencu lociranu uzvodno od *rep* gena. Ovaj *ori* region se sastoji od AT bogate sekvence (koja pokazuje visok stepen homologije među različitim plazmidima ove familije), zatim tri i po puta ponovljena direktna ponovka od 22bp i dve invertovano ponovljene sekvence koje se nalaze u -35 regionu i regionu odgovornom za vezivanje ribozoma za iRNK (RBS-u) *rep* gena. Invertovano ponovljena sekvencu u -35 regionu predstavlja mesto vezivanja Rep proteina čime je njegova sinteza autoregulisana, a

istovremeno regulisan je i broj kopija plazmida (Slika 2).



Slika 2. Opsta strukturalna organizacija oridzina laktokokalnog tetra-replicirajućeg plazmida.

IR: invertovane ponovljene skvencene; *rep*: gen za Rep protein. (Seegers, 1994)

Do sada je identifikovana samo jedna familija tetra-replicirajućih plazmida koja je široko rasprostranjena medju laktokokama. Jedna laktokokalna celija moze biti prebivaliste veceg broja replikona ove grupe. Nadjeno je da neki sojevi poseduju i po sest replikona koji pripadaju istoj familiji. Kako ovi veoma slicni plazmidi koegzistiraju zajedno jos uvek nije dovoljno poznato (Seegers, 1994).

2. 1. 3. Stabilnost laktokokalnih plazmida

Zivotni ciklus plazmida sastoji se iz dva razlicita dogadjaja; povecanja broja kopija (replikacije) i distribucije plazmidnih kopija u cerke celije (particije). Ova dva dogadjaja su kontrolisana genima lociranim na plazmidima. Prirodni bakterijski plazmidi pokazuju veoma visok stepen stabilnosti. Stabilnost plazmida zavisi od kontrolnih sistema procesa replikacije i particije, njihove korelacije sa deobom celije kao i njihovih rekombinativnih svojstava. Odnos izmedju plazmida i hromozoma je veoma izbalansiran i manifestuje se kroz relativno konstantan broj kopija plazmida po celiji. S obzirom da je frekvencija gubljenja plazmida sa malim brojem kopija u prirodi manja od 10^{-7} po celijskoj deobi govori da bakterije poseduju precizne mehanizme kontrole replikacije i distribucije plazmida pri celijskoj deobi (Gerdes and Molin, 1986; Nordström and Austin, 1989). Delecionom analizom veceg broja plazmida (ColE1, R1, pT181, λ *dv*, F, NR1 itd.), jos osamdesetih godina ustanovljeno je da na plazmidima postoje dva domena odgovorna za njihovu stabilnost; replikacioni region i particioni region nazvan *par* (Nordström, 1985; Gerdes and Molin, 1986; Nordström and Austin, 1989). Replikacioni sistem svojom aktivnoscu obezbedjuje da se uvek u bakterijskoj celiji neposredno pred njenu deobu, zavisno od plazmida on nalazi u relativno odredjenom broju kopija, ali ne manje od dve, dok je njihova pravilna raspodela u cerke celije zavisna od aktivnosti particionog sistema. Regulacija replikacije plazmida pociva na sistemu negativne povratne sprege koja u funkciji brzine rasta ili brzine deobe celije kontrolise broj kopija plazmida oko njegove karakteristicne vrednosti. Dok kontrola replikacije obezbedjuje relativno konstantan broj kopija plazmida po celiji, particioni sistem obezbedjuje da svaka cerka celija pri deobi dobije bar jednu kopiju plazmida. Particioni

sistem je zbirni naziv za nekoliko mehanizama koji na potpuno različite načine obezbeđuju ravnomernu raspodelu plazmida u cerke ćelije. U zavisnosti od broja kopija i veličine plazmida razvili su se različiti pasivni i aktivni particioni mehanizmi. Pasivni mehanizmi, kao što je slučajna distribucija plazmida, česti su kod malih plazmida sa velikim brojem kopija. Veliki plazmidi sa malim brojem kopija koji poseduju pasivne mehanizme distribucije (plazmidi *E. coli*: P1) razvili su dodatne ili pomoćne mehanizme, koji obezbeđuju da obe cerke ćelije dobiju po najmanje jednu kopiju plazmida, kao što su mesto specifični rekombinacioni sistem (isti pomoćni mehanizam particije poseduje i ColE1 plazmid koji se u ćeliji nalazi u velikom broju kopija) i antiklamping sistem (plazmid pT181 iz *Staphylococcus aureus*-a i plazmid pSC101). Plazmidi sa malim brojem kopija poseduju pretežno aktivne sisteme particije kao što su ubilacki sistem [koji je baziran na principu toksina i antidota, gde je toksin dugoziveca, a antidot kratoziveca molekula tako da ćelija bez kopije plazmida sa koga bi se sintetisao antidot biva ubijena (kod F plazmida i toksin i antidot su proteini, dok je kod R1 plazmida ubica $mRNK$ za toksični protein, a antidot ili blokirajući agens je mala antisens RNK)] i pravi particioni sistem (koji predstavlja selektivno pomeranje molekula DNK u cerke ćelije u najmanje jednoj kopiji, slično pomeranju hromozoma u mitozu). Pravi particioni sistem (*par* lokus) se sastoji kod P1 i F plazmida od dva kodirajuća autoregulisuća gena čiji produkti deluju u *cis* poziciji na jednu target sekvencu. Pretpostavlja se da kodirani proteini uz pomoć drugih ćelijskih proteina se vezuju za target sekvencu sa jedne strane, a sa druge za ćelijski skelet. Ovaj kompleks koji se sastoji od dva proteina i dva plazmida usled elongacije ćelijskog zida bakterije obezbeđuje da se plazmidi kreću ka polovima (Nordstöm and Austin, 1989).

Mali plazmidi sa velikim brojem kopija kao što su ssDNK plazmidi laktokoka nemaju aktivnu kontrolu particionog procesa, dok im se kontrola replikacije najčešće odigrava preko Cop proteina čiji je gen lociran neposredno uz *rep* gen. Produkt *cop* gena je represor *repB* gena. Razdvajanje plazmida u cerke ćelije se odvija po principu slučajnosti, a zatim se broj kopija koriguje replikacionim funkcijama koji se aktiviraju smanjenjem broja plazmida u ćeliji (kontrola replikacije) (Seegers, 1994). Mali ssDNK plazmidi laktokoka pored segregacione nestabilnosti koja je vezana za particiono-replikacioni sistem pokazuju i strukturnu nestabilnost koja je najverovatnije povezana sa postojanjem jednolancanih intermedijera u replikaciji ovih plazmida koji indukuju rekombinacioni sistem ćelije. Moguće je da je ovo i razlog zasto su ovi plazmidi ograničene veličine od 2-6kb.

Mehanizmi regulacije procesa particije i replikacije teta-replicirajućih laktokokalnih plazmida nisu još uvek najbolje proučeni. Oni takođe pokazuju, kako segregacionu tako i strukturnu nestabilnost (Gasson, 1983). Upoređenjem međusobne sličnosti teta-replicirajućih plazmida prisutnih u jednoj istoj ćeliji ustanovljeno je da oni pokazuju visok stepen homologije i to naročito u regionu odgovornom za replikaciju (Seegers, 1994). Moguće je da su oni nastali strukturnim rearanzmanima jednog velikog plazmida, a da je segregaciona nestabilnost uzrokovana prisustvom identične sekvence u svima njima odgovorne za particiju tako da particioni sistem nije u mogućnosti da ih prepozna kao različite.

3. HORIZONTALNI TRANSFER DNK

Sposobnost bakterija da razmenjuju genetičku informaciju je veoma važna komponenta njihove genetičke varijabilnosti. Transfer genetičke informacije između mikroorganizama u prirodi odvija se relativno često. Uspesani transfer genetičke informacije iz bakterije u bakteriju podrazumeva replikaciju donorske DNK u recipijentnom organizmu. Ovaj proces zahteva savladavanje nekoliko barijera koje stoje pred donorskom DNK. Donorska DNK najpre mora da se translocira kroz bakterijske membrane, zatim da uspesno prebrodi restrikciono-modifikacioni

enzimski sistem recipijenta (koji u sustini štiti genom bakterije od promena, na taj način što prepoznaje i degraduje stranu DNK), da se integriše u replikon(e) recipijenta ili da obezbedi samostalnu replikaciju sa sopstvenih elemenata. Ukoliko se vrši transfer DNK nezavisnih replikona, plazmida, u ćeliju koja već poseduje jedan ili više sličnih replikona neophodno je da taj replikon (plazmid) ne pripada istoj inkompatibilnoj grupi kako bi donorski replikon uspostavio nezavisan opstanak u recipijentu. Pored ovih problema, prepreke koje se mogu pojaviti na putu donorske DNK su kako ekstracelijske tako i periplazmatične nukleaze (Porter, 1988; Jawetz *et al*, 1989; Dreiseikelmann, 1994). Sposobnost, odnosno mogućnost mikroorganizama da razmenjuju genetički materijal veoma je uspešno iskorišćena za različite laboratorijske manipulacije. Procesi u kojima dolazi do razmene genetičkog materijala bakterija su: transformacija, transdukcija i konjugacija.

3. 1. Transformacija

Prvi otkriveni proces razmene genetičkog materijala u bakterijama bila je transformacija. Još 1928. godine Griffith je otkrio da kod *Streptococcus pneumoniae* dolazi do promene virulentnosti usled transformacije nekim što poseduje patogeni streptokok, a 1944. godine Avery i saradnici su otkrili da je "transformisuci princip" DNK. Pod transformacijom se podrazumeva aktivno uzimanje slobodne DNK od strane bakterijskih ćelija i njeno održavanje putem replikacije ili rekombinacije (nesena DNK može biti inkorporisana u hromozom ili u neki drugi replikon prisutan u recipijentnoj ćeliji putem rekombinacije ili zadržati kao nezavisan replikon aktivacijom sopstvenih replikacionih funkcija). Da bi recipijentne ćelije primile DNK one moraju postići stanje kompetentnosti za transformaciju. Neke bakterije (unutar Gram pozitivnih i Gram negativnih) ovo stanje postižu prirodno u toku svoga rasta, fiziološka kompetentnost (ulazak u kompetentno stanje za uzimanje DNK je normalan deo fiziologije ovih bakterija), dok kod drugih ovo stanje može biti izazvano veštački (indukovana kompetentnost). Transformacioni proces sastoji se od nekoliko koraka koji su slični kod svih bakterija: razvoj kompetentnosti aktivacijom gena za kompetentnost, vezivanje DNK iz spoljašnje sredine uz pomoć proteina, procesovanje DNK uz pomoć nukleaza koje je prevode u jednolančanu formu, unosenje jednolančane DNK u ćeliju kroz poru, integracija unete DNK u hromozom putem rekombinacije i njena ekspresija (Porter, 1988; Jawetz *et al*, 1989; Dreiseikelmann, 1994).

Transformacija je najviše korišćen metod u kloniranju i ekspresiji DNK u nekom domaćinu. Zbog široke primene laktokoka u industriji pojavila se potreba za poboljšanjem sojeva, uvodjenjem kloniranih gena bitnih za industriju transformacijom i njihovom ekspresijom u ovim sojevima. Da bi klonirani geni mogli biti uvedeni u laktokokalne ćelije potrebno je bilo razviti metode transformacije. Većina streptokoka postiže stanje kompetentnosti za transformaciju bilo fiziološki ili se ona može indukovati različitim induktorima (Hershfield, 1979; Lacks, 1979; Kondo and McKay, 1982), međutim laktokoke najverovatnije nisu prirodno prijemcive za stranu DNK. Moguće je da još uvek nije pronađen pravi induktor njihove kompetentnosti. Postoji nije bilo moguće indukovati kompetentno stanje laktokoka, krenulo se na mehaničko ubacivanje željene DNK, najpre sa transformacijom protoplasta laktokoka tretiranih PEG-om (Kondo and McKay, 1982; Kondo and McKay, 1984; Simon *et al*, 1985; Simon *et al*, 1986; van der Lelie *et al*, 1988), a zatim i celih netretiranih ćelija (Sanders and Nisholson, 1987). Postoje sve ove metode nisu dale dovoljnu efikasnost za uspešno kloniranje gena u laktokokama primenjeno je ubacivanje DNK električnim pulsom, odnosno transformacija elektroporacijom (Powell *et al*, 1988; McIntyre and Harlander, 1989a; McIntyre and Harlander, 1989b; Holo and Nes, 1989) koja daje zadovoljavajuće rezultate za većinu sojeva i koja se danas uspešno primenjuje.



3. 2. Transdukcija

Transdukcija predstavlja način prenošenja genetičke informacije između bakterijskih ćelija uz pomoć faga. Transdukujuce partikule predstavljaju bakterijsku DNK u fagnom omotacu. U specijalizovanoj transdukciji, DNK u fagnim partikulama predstavlja hibrid fagne i bakterijske DNK i svaka linija specijalizovanih transdukujucih faga sadrži specifičan fragment bakterijskog hromozoma koji se nalazi neposredno uz jedno od mesta za inserciju profaga u hromozom domaćina. U generalizovanoj transdukciji sva DNK spakovana u fagni omotac je bakterijska i generalizovani transdukujuci fazi mogu nositi bilo koji fragment bakterijskog genoma (kao hromozoma tako i plazmida) (Porter, 1988; Jawetz *et al*, 1989). Laktokoke također poseduju fage koji mogu imati lizogeni i litički ciklus. U laboratoriji se uspešno vrši transfekcija laktokoka još od 1982. godine (Geis, 1982), međutim za primenu transdukcije u izmeni i mapiranju genoma potrebno je još bolje poznavanje laktokokalnih faga i genetičke mape ovih bakterija.

3. 3. Konjugacija

Konjugacija je prvi put primećena u kulturi *E. coli* još 1946. godine. Osim kod Gram negativnih bakterija konjugacija je konstatovana i kod većeg broja Gram pozitivnih bakterija. Konjugacioni prenos nije ograničen samo između vrlo srodnih bakterijskih vrsta, već se odvija i između različitih rodova pa čak i između Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija (Brisson-Noël *et al*, 1988; Trieuucot *et al*, 1993). Uspesani konjugacioni prenos plazmidne DNK je dobijen i između *E. coli* i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Heinemaan and Sprague, 1989).

Konjugacija je specifičan prenos DNK iz donorske u recipijentnu ćeliju mehanizmom koji zahteva neposredan kontakt te dve ćelije. Pored zahteva za neposrednim ćelijskim kontaktom, da bi konjugacioni prenos bio uspešan potrebno je da se uspostavi kanal za prolazak DNK, prenos DNK kroz kanal i stabilizacija prenesene DNK u novom domaćinu bilo kao nezavisnog replikona ili integracijom u hromozom domaćina (Dunny *et al*, 1991). Sposobnost konjugacionog prenosa, odnosno gore navedenih funkcija kodirana je genima *tra* operona, koji može biti lociran na plazmidima (najčešće) ili na hromozomu. Kontakt između ćelija uspostavlja se uz pomoć pilusa, tako što vrh pilusa donorske ćelije uspostavlja kontakt sa spoljnim omotcem recipijentne ćelije dajući pri tome nestabilan konjugacioni par. Multipna ćelijska interakcija često biva uzrok formiranja konjugacionih ćelijskih agregata. Mada se nekada prenos DNK može odigrati i u ranim fazama nakon kontakta, kod većine organizama prenos DNK se odigrava tek između parova koji su specijalno stabilizovani u konjugacionim agregatima (Danny *et al*, 1978; Porter, 1988; van der Lelle *et al*, 1991; Andrup *et al*, 1993; Ruhfel *et al*, 1993). Recipijentna ćelija koja je primila DNK iz donorske ćelije naziva se merozigot. Merozigoti postaju transkonjuganti tek nakon stabilizacije DNK u recipijentnoj ćeliji.

3. 3. 1. Seks faktor

Pod seks faktorom u širem smislu, po analogiji sa F faktorom *E. coli*, može se podrazumevati replikon koji je autokonjugativan, mada ta sposobnost potiče samo od dela njegove genetičke informacije koji je označen kao *tra* operon. Ovaj operon predstavlja skup gena čiji produkti omogućavaju konjugacioni prenos DNK. Genetički elementi u zavisnosti da li poseduju seks faktor ili ne, mogu biti podeljeni na 1) samokonjugativne (oni koji poseduju celokupan *tra* operon koji im omogućava sve strukture i funkcije neophodne za prenos DNK), 2)

prenosne (pasivno prenosne-oni koji poseduju oridzin prenosa *oriT* i *mob* gen-koji kodira Mob protein, odgovoran za inicijaciju prenosa i prenose se zahvaljujuci produktima *tra* operona koji deluju *in-trans* i 3) konjugativne, ali ne i prenosne (oni koji poseduju gene *tra* operona koji kodiraju strukturne i funkcionalne proteine za prenos DNK, ali ne poseduju oridzin prenosa (*oriT*) i oni mogu mobilisati samo druge konjugativne elemente (Porter, 1988). Samokonjugativni plazmidi se jos nazivaju i Tra⁺ plazmidi, dok se svi ostali nazivaju Tra⁻ plazmidima. Plazmidi koji ne poseduju gene *tra* operona takodje mogu biti preneti u recipijentnu celiju ukoliko mogu da formiraju kointegrate sa elementima koji su samokonjugativni, bilo homologom rekombinacijom ili transpozicijom. Vaznu ulogu u ovom procesu igraju insercioni elementi koji olaksavaju stvaranje kointegrata, a i njihovog razresenja, segregacije u recipijentnoj celiji. Ovaj nacin prenosa nazvan je kondukcija ili sprovodjenje (Porter, 1988; Lucey *et al*, 1993).

Kod Gram negativnih bakterija geni za konjugacioni prenos (seks ili fertilizacioni faktor) nalaze se originalno na plazmidima (Jawetz, *et al*, 1989). U nekim slucajevima kao sto je kod F(ω T) faktora *E. coli* on se moze reverzno naci i u hromozomu, zahvaljujuci insercionim elementima koje poseduje (dve kopije IS3, jednu kopiju IS2 i jednu kopiju Tn1000), dajuci pri tome Hfr donore. F faktor *E. coli* je velicine oko 100kb, dok region koji ga cini samokonjugativnim je oko 33kb. Ovaj region sadrzi *oriT* sekvencu od koje otpocinje DNK prenos i jos najmanje 35 gena od kojih je vecina oznacena sa *tra*, a neki sa *trb*. Svi se oni sem *traM* i *traJ* transkribuju sa jedinstvenog operona (Porter, 1988; Lucey *et al*, 1993; Dreiseikelmann, 1994). Konjugacioni prenos plazmidne DNK u Gram negativnim bakterijama ukljucuje prekid DNK i inicijaciju prenosa vezivanjem proteina za prekinutu DNK na mestu zvanom *oriT*, razdvajanje lanaca plazmidne DNK, prenos jednog lanca DNK kroz konjugacioni kanal, sintezu drugog lanca DNK u donorskoj i recipijentnoj celiji i recirkularizaciju plazmida. Za uspesan konjugacioni prenos DNK neophodno je potrebna *cis* pozicija *oriT*-a i brojne funkcije produkata drugih gena u *trans* poziciji za procese kao sto su celijski kontakt, formiranje konjugacionog kanala ili pore i za prenos i sintezu DNK. Produkt *traA* gena, pilin, predstavlja gradivni protein pilusa. U obradi pilina iz preforme izdvajanjem pedeset i jedne amininokiseline sa N-terminusa polipeptida kroz nekoliko stupnjeva, ucestvuje *traQ* genski proizvod, pri cemu nastaje gradivni blok pilusa. Najmanje jos jedanaest gena je ukljuceno u struktuiranje pilusa. Prvi kontakt dveju celija u konjugaciji odvija se preko pilusa, ali u stabilizaciji konjugacionog para ucestvuju proizvod *traG* i *traN* gena. Da ne bi doslo do uspostavljanja konjugacionog para izmedju dve donorske celije odgovorni su *traS* i *traT* genski proizvodi koji su locirani u spoljasnjoj membrani. Tacna priroda interakcije celija svojim površinama u konjugacionom paru nije jos uvek dobro proucena, mada se zna da je proizvod *traD* gena ukljucen u formiranje pore izmedju dveju untrasnjih membrana kroz koju se odvija prenos DNK. Sto se tice znanja o prekidu konjugacionog para to je jos uvek misterija. Pored mehanickih razdvajanja usled kretanja tecnosti smatra se da glavnu ulogu igra ekspresija gena sa seks faktora u recipijentnoj celiji cime se njeno stanje menja, tako da tada on postaje konjugacioni par dve donorske celije. Kada se uspostavi kontakt izmedju celija u donorskoj celiji prvo dolazi do prekida jednog lanca u *oriT* sekvenci uz pomoc specificne endonukleaze, proizvodi *tral* i *traZ* gena. Pored nukleazne proizvod *tral* gena poseduje i helikaznu aktivnost kojom razdvaja lance DNK. Prekid DNK u *oriT* sekvenci vrsi se tako da poslednji u konjugaciji prelazi *tra* operon. Misli se da je proizvod *traM* gena okidac za sintezu DNK u donorskoj celiji nakon prekida jednog lanca. Sintezom novog lanca sa RNK prajmera, dolazi do odvajanja prekinutog lanca koji prelazi u recipijentnu celiju. Usmeravanje ovog lanca prema pori i negovo kretanje vrsi se uz pomoc proteina, koji su nadjeni i u recipijentnoj celiji, cak i u odsustvu sinteze drugog lanca DNK u donorskoj celiji. Stabilizacija prenesene DNK u recipijentu vrsi se RecA funkcijama domacina (Porter, 1988; Dreiseikelmann, 1994).

Kod Gram pozitivnih bakterija fertilizacioni faktori mogu biti locirani kako na samokonjugativnim plazmidima tako i na hromozomu. Hromozomalna lokacija seks faktora kod

Gram pozitivnih bakterija može također kao i kod F faktora *E. coli* poticati usled njegove integracije u hromozom. Kao i kod *E. coli* on može omogućiti mobilizaciju hromozomalnih gena, ali sa daleko manjom frekvencom (McKay *et al.*, 1980; Fitzgerald and Gasson, 1988; van der Lelie *et al.*, 1991; Torres *et al.*, 1991; Bringel *et al.*, 1992; Lucey *et al.*, 1993). O fertilizacionom faktoru Gram pozitivnih bakterija se mnogo manje zna. Na osnovu do sada objavljenih rezultata može se zaključiti da je fertilizacioni region Gram pozitivnih bakterija za oko 1/2 manji od fertilizacionog regiona na F plazmidu *E. coli* (Lucey *et al.*, 1993). Kod stafilokokalnog plazmida pGO1 region koji nosi sve neophodne gene za konjugacioni prenos iznosi 14,5kb (Thomas and Archer, 1989). Kod streptokokalnog plazmida širokog opsega pIP501 pronađena su dva regiona odgovorna za konjugacioni prenos, jedan od 7,5kb, a drugi od 8,8kb (Krah and Marcina, 1989). Kod *Enterococcus faecalis* taj region je oko 15kb. Kod Gram pozitivnih bakterija konjugacioni pilusi najverovatnije ne igraju važnu ulogu u stvaranju kontakta između ćelija i prenosu DNK, odnosno oni kod ovih bakterija do sada nisu ni uočeni, a uspešnost konjugacije najviše zavisi od agregacije indukovane feromonima (Clewel and Weaver, 1989; Dunny *et al.*, 1990; Ruhfel *et al.*, 1993; Andrup *et al.*, 1993). Seks feromoni su proteini male molekulske mase kodirani genima lociranim na plazmidima. Recipijentne ćelije proizvode takođe feromone koji indukuju donorske ćelije da proizvode površinski protein koji povećava agregaciju ćelija (Dunny *et al.*, 1979; Porter, 1988; Clewel and Weaver, 1989; Dunny *et al.*, 1990). Činjenica da se uspešan konjugacioni prenos dobija između Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija govori da su mehanizmi prenosa u ove dve grupe bakterija slični. Veliku razliku predstavlja odsustvo konjugacionih pilusa kod Gram pozitivnih bakterija i velicina *tra* operona. Objašnjenje za ovo može biti veoma jednostavno, da *tra* operoni obe grupe bakterija imaju isto poreklo, a da je kod Gram pozitivnih bakterija došlo do delecije gena za sintezu pilina, njegovu obradu i polimerizaciju (oko 15 gena je uključeno u ove procese), a da je funkcija ćelijskog kontakta nadomestena sintezom seks feromona. Kod laktokoka je fertilizacioni faktor velicine oko 50kb i može biti lociran na samokonjugativnim plazmidima (*clu*) i na hromozomu (*laff*) (Bringel *et al.*, 1992). Kod laktokoka ćelijska agregacija koja povećava frekvencu konjugacije, uzrokovana je sa dve komponente ćelijske površine kodirane *clu* genom sa plazmida i *agg* genom sa hromozoma (Gasson and Daves, 1980; van der Lelie *et al.*, 1991). Moguće da *clu* sadrži i *agg* i *laff* sistem.

3. 3. 2. Konjugativni plazmidi laktokoka

Samokonjugativni plazmidi laktokoka moraju biti velicine iznad 20kb s obzirom na veličinu *tra* operona Gram pozitivnih bakterija. Veliki broj sojeva laktokoka poseduje velike plazmide (veće od 20kb). Za sada još nije poznato koliki je najmanji region koji na sebi nosi sve neophodne gene za konjugativni prenos (*tra* operon) kod laktokoka, posto još nije kloniran, ali se ipak sa izvesnom sigurnošću može tvrditi da je neki plazmid samokonjugabilan ukoliko poseduje sposobnost konjugativnog prenosa u soju koji ne poseduje hromozomalno lociran fertilizacioni faktor. Brojni plazmidi laktokoka koji na sebi nose gene bitne za prehrambenu industriju (proteinazni, za fagnu rezistenciju, sintezu bakteriocina, imunost na bakteriocin, katabolizam secera) mogu se konjugacionim prenosom prebaciti u druge sojeve (Kok, 1987; Klaenhammer and Sanozky, 1985; Neve *et al.*, 1984; Davey, 1984; Gupta and Batish, 1992). Pored plazmida koji su samokonjugativni u laktokokama su otkriveni i oni koji mogu biti preneti u recipijentnu ćeliju zahvaljujući *Tra* funkcijama sa hromozoma ili drugih plazmida. Ovi plazmidi poseduju *oriT* i *mob* sekvence koje im omogućavaju da budu preneti. *Mob* protein je veoma važan za inicijaciju konjugacionog prenosa (Lucey *et al.*, 1993).

3. 3. 3. Konjugativni transpozoni

Sedamdesetih godina ovog veka pocela se pojavljivati multipna rezistencija na antibiotike medju streptokokama koja se veoma brzo sirila u populaciji. Ustanovljeno je da je za pojavu ove multipne rezistencije odgovorna nova klasa mobilnih genetskih elemenata zvanih konjugativni transpozoni (Vijayakumar and Ayalew, 1993). Kasnije su ovi mobilni genetski elementi otkriveni i kod drugih rodova bakterija, ali su oni daleko prisutniji u Gram pozitivnim bakterijama. Vecina od njih nosi *tetM* gen dok neki na sebi nose gene za rezistenciju na vise antibiotika (Scott, 1992). Konjugativni transpozoni se karakterisu time sto kada su locirani na nekom replikonu u celiji, plazmidu ili hromozomu, sposobni su da se prenose u drugu celiju procesom koji zahteva celijski kontakt (konjugativna transpozicija) (Dreiseikelmann, 1994). Veoma se malo zna o celijskoj interakciji prilikom prenosa konjugativnih transpozona. Ovi transpozoni se prenose iz jedne bakterijske celije u drugu najverovatnije u formi dvolančanog cirkularnog intermedijera. Ovaj cirkularni intermedijer se moze i izolovati (Scott *et al*, 1988; Poyart-Salmeron *et al*, 1990; Dunny *et al*, 1991; Scott, 1992). Pojedini od njih mogu da mobilisu delove hromozoma, zatim nekonjugativne plazmide i da aktiviraju transpoziciju homologih transpozona (Dunny *et al*, 1991; Flanagan and Clewell, 1991; Torres *et al*, 1991). Do sada otkriveni konjugativni transpozoni klasifikovani su u dve grupe na osnovu njihove velicine (Murphy, 1989; Scott, 1992; Vijayakumar and Ayalew, 1993; Kilic *et al*, 1994). Prvu grupu konjugativnih transpozona cine mali konjugativni transpozoni, koji su medjusobno veoma slicni, imaju širok opseg domacina (ne samo da se konjugativno prenose izmedju vrsta slicnih rodova, vec se transponiraju u genome veceg broja kako Gram pozitivnih tako i Gram negativnih bakterija) i integrisu se u genom domacina na vise mesta. Transpozoni ove grupe potpuno su razliciti od klasicnih transpozona zato sto poseduju jedinstven mehanizam transpozicije kojim ne dovode do duplikacije ciljne sekvence u koju se integrisu (Scott, 1991; Rauch, 1993). Najbolje izuceni konjugativni transpozoni ove grupe su: Tn916 i Tn1545. Tn916 je najmanji konjugativni transpozoni i velicine je 16,4kb. Drugu grupu konjugativnih transpozona cine kompozitni transpozoni velicine iznad 50kb kao sto su Tn3701, Tn5253 itd. Oni takodje pokazuju širok opseg domacina, ali se najcesce ugradjuju u genom domacina na jedno mesto i to sekvencno specifcno. Kompozitni konjugativni transpozoni mogu se transponirati kao jedinstven element, ali se i interne jedinice transpozona mogu nezavisno transponirati (Scott, 1992).

3. 3. 4. Konjugativni transpozoni laktokoka

Posto su konjugativni transpozoni veoma promiskuitetni, logicko je da se neki konjugativni transpozoni originalno izolovani iz drugih sojeva, mogu naci i u laktokokama. Takav je slucaj sa siroko rasprostranjenim i najbolje izucenim konjugativnim transpozonom Tn916 (Bringel *et al*, 1992). Pored siroko rasprostranjenih konjugativnih transpozona laktokoke poseduju i svoje originalne konjugativne transpozone kao sto su Tn5301 i Tn5276 (Horn *et al*, 1991; Rauch and de Vos, 1992). Ovi konjugativni transpozoni pripadaju grupi velikih transpozona i velicine su 68kb. Oba transpozona su originalno izolovana iz *L. lactis* subsp. *lactis*. Ovi transpozoni su oiviceni invertovanim ponovcima, a na sebi nose jednu kopiju insercione sekvence IS904, gene za biosintezu polipeptidnog antibiotika nizina i za imunost na njega i gene za transport i hidrolizu sahara. Transpozoni Tn5301 i Tn5276 pokazuju veliku medjusobnu slicnost iako su izolovani iz razlicitih sojeva *L. lactis* subsp. *lactis*. Pored medjusobne slicnosti oni pokazuju i veliku slicnost sa transpozonom Tn916 grupe, mada predstavljaju novu grupu transpozona. Kod soja *L. lactis* subsp. *lactis* NCFB894, koji poseduje hromozomalno lociran Tn5301, inserciona sekvenca IS904 je locirana oko 800bp od nizinskog operona i cini jedan kraj transpozona i verovatno ima



ulogu u prenosu transpozona (Dodd *et al*, 1990; Horn *et al*, 1991). Transpozon Tn5276 iz soja *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO R5 prilikom konjugativne transpozicije u *L. lactis* subsp. *lactis* MG1614 insertuje se na više mesta, ali je pokazano da postoji predominantno mesto insercije (Rauch and de Vos, 1992). Prisustvo više od jedne kopije transpozona u recipijentnom genomu posle konjugacionog prenosa primećeno je i kod Tn916, po čemu ovi transpozoni pokazuju sličnost sa Tn916 grupom transpozona posto ne pokazuju imunitet na novu transpoziciju. Ekscizija i insercija odigravaju se reciprocnom mesto specifičnom rekombinacijom. Transpozoni Tn5301 i Tn5276 oivčeni su invertovanim ponovcima ...TTTTTG.... sekvence kako u originalnom soju tako i u konjugantima. Analizom cirkularnog intermedijera transpozona Tn5276 utvrđeno je da on nosi jednu kopiju ove ponovljene sekvence (jedna kopija je deo transpozona, a druga je deo genoma domaćina), što potvrđuje da konjugativni transpozoni ne dovode do umnozavanja target sekvence (Rauch, 1993).

4. PROTEINAZE LAKTOKOKA

Veći broj aminokiselina je esencijalan za laktokoke, odnosno one te aminokiseline ne mogu da sintetisu, tako da moraju da ih obezbede iz sredine u kojoj žive za sintezu sopstvenih proteina (Kok, 1987; Jansen and Hammer, 1993). Mleko, kao primarna sredina ovih bakterija, siromasno je aminokiselinama u slobodnom obliku, ali sadrži visok procenat proteina (predominantan je kazein) koji predstavljaju izvor aminokiselina. Da bi laktokoke mogle koristiti aminokiseline iz proteina mleka potrebno je da poseduju funkcionalan proteinazni sistem. Neki sojevi laktokoka koji ne poseduju proteinazni sistem ne mogu da rastu u mleku bez dodatih aminokiselina, dok većina raste sporije (Gasson, 1983; Tynkkynen *et al*, 1989). Proteinaze laktokoka katalizuju prvi korak u degradaciji proteina mleka i kodirane su jednim genom (*prtP*) koji se kod najvećeg broja sojeva nalazi na plazmidu (Kok, 1987; Pritchard and Coolbear, 1993). Pored značaja laktokokalnih proteinaza u obezbeđivanju ćelija peptidima koji idu u dalju degradaciju do aminokiselina potrebnih za sopstvenu sintezu, proizvodi degradacije (oligopeptidi) fermentisanim proizvodima daju i specifičan ukus (Hill and Gasson, 1986; Olson, 1990). Proteinaze laktokoka vezane su za ćelijski zid C-terminusom polipeptida, sem kod soja *L. lactis* subsp. *cremoris* ML1 i velike su molekulske mase (Thomas and Pritchard; Kok and Venema, 1988). Odvajanje proteinaze od ćelijskog zida vrši se autokatalitičkom degradacijom u odsustvu Ca⁺⁺ jona (Laan and Konings, 1989; Haandrikman *et al*, 1991; Laan and Konings, 1991). Proteinaze laktokoka su enzimi serinskog tipa i pokazuju u tri regiona veliku sličnost sa subtilizinom (Siezen *et al*, 1991). To su veoma specifični enzimi i hidrolizuju samo proteine mleka, najveći broj samo β-kazein (proteinaze PI tipa, sojevi *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2 i *L. lactis* subsp. *lactis* 712), dok druge degraduju sve tri glavne frakcije kazeina (α_{s1}, β i κ) (proteinaze PIII tipa, soj *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11), a postoje i sojevi koji poseduju proteinaze intermedijernog tipa [koje hidrolizuju sve tri frakcije kazeina (α_{s1}, β i κ), ali se razlikuju po produktima degradacije β-kazeina od proteinaza PIII tipa (hidrolizuju ga kao proteinaze PI tipa)] kao što je *L. lacis* subsp. *lactis* NCDO763 (Kok, 1987; Pritchard and Coolbear, 1993). Neposredno uz gen koji kodira proteinazu (*prtP*), u suprotnoj orijentaciji nalazi se *prtM* gen čiji je proizvod lipoprotein odgovoran za aktivaciju proteinaze (Haandrikman *et al*, 1989; Pritchard and Coolbear, 1993). Na nukleotidnom nivou sva tri tipa proteinaza pokazuju izuzetno visoku homologiju, veću od 98%, koja se održava i na aminokiselinskom nivou. Razlike u aminokiselinskom sastavu koje postoje između proteinaza ovih sojeva odgovorne su za razlike u specifičnoj sposobnosti hidrolize različitih frakcija kazeina mleka. Proteinaze intermedijerne specifičnosti hidrolize (soj *L. lacis* subsp. *lactis* NCDO763) pokazuju

intermedijerne razlike i na nukleotidnom i aminokiselinskom nivou izmedju Wg2 i SK11 proteinaza, sto govori u prilog ovom zakljucku (Pritchard and Coolbear, 1993). Da se ne radi o specifičnoj aktivnosti vezanoj za soj govore podaci da kada se klonirana proteinaza uvede u novog domacina njena supstratna specifičnost se ne menja, jedino se u soju MG1820 konstatuje povecanje aktivnosti za oko tri puta u odnosu na ishodni soj (Bruinenberg *et al*, 1992). Takodje u eksperimentima u kojima su konstruisane hibridne proteinaze potvrđeno je da su regioni u kojima postoje razlike odgovorni za supstratnu specifičnost proteinaza (Vos *et al*, 1991).

5. BAKTERIOCINI LAKTOKOKA

Bakteriocini su molekuli proteinske prirode, najcesce male molekulske mase, koji ispoljavaju inhibitorni efekat na srodne bakterije (Tagg *et al*, 1976). Laktokoke sintetisu veliki broj razlicitih inhibitornih molekula proteinske prirode. Sto se tice ucestalosti, Geis i saradnici su ustanovili analizom 280 sojeva da samo 5% njih sintetise inhibitorne supstance proteinske prirode (Geis *et al*, 1983). Geni za sintezu bakteriocina i za imunost na njega najcesce su locirani na plazmidima koji poseduju konjugativne elemente (Neve *et al*, 1984). Bakteriocini laktokoka su na osnovu strukture, temperaturne i pH stabilnosti, senzitivnosti na enzime i opsegu domacina podeljeni u pet grupa: 1) laktokokcini, 2) diplokokcini, 3) kompleksni bakteriocini laktokoka, 4) lantibiotici i 5) laktostrepcini (Klaenhammer, 1993).

Laktokokcini

Laktokokcini su temperaturno stabilni peptidi koje produkuju sojevi vrste *L. lactis*, koji poseduju inhibitorni efekat na druge laktokoke. Kod vecine sojeva geni za imunost i sintezu laktokokcina nalaze se na samokonjugativnim plazmidima (Scerwitz *et al*, 1983; Neve *et al*, 1984; Gupta and Batish, 1992). Na plazmidu pNP2 (131kb) nalaze se geni za sintezu tri razlicita laktokokcina (laktokokcin A, B i M) (Scherwitz-Harmon and McKay, 1987; Stoddard *et al*, 1992), zatim na plazmidu p9B4-6 (60kb) nalaze se geni za sintezu dva tipa laktokokcina (A i B) (Neve *et al*, 1984), dok se u soju *L. lactis* subsp. *cremoris* LMG2130 na plazmidu od 55kb nalaze geni za sintezu samo laktokokcina A (Holo *et al*, 1991). Geni za sintezu bakteriocina organizovani u operone (u tri, odnosno u dva i jedan zaseban operon). Svaki od ovih operona pored gena za sintezu poseduje i gen za imunost posto ne postoji unakrsna rezistencija na druge bakteriocine. Sva tri bakteriocina su hidrofobni peptidi koji ne pokazuju medjusobnu homologiju na DNK, a ni aminokiselinskom nivou, osim prve 21 aminokiseline koje su identicne u sva tri prekursora i koje se isecaju prilikom obrade preforme laktokokcina.

Laktokokcin A je polipeptid od 54 aminokiseline koji je izolovan i preciscen iz soja *L. lactis* subsp. *cremoris* LMG2130, a zatim je uradjena aminokiselinska sekvenca. Na osnovu aminokiselinske sekvence sintetisana je DNK proba koja je koriscena za hibridizaciju. U hibridizaciji je ustanovljeno da je operon za laktokokcin A lociran na plazmidu od 55kb. Sa ovog plazmida je kloniran fragment u *E. coli*, koji je nosio ovaj operon, a zatim sekvenciran. Laktokokcin A se sintetise kao prekursor od 75 aminokiseline kodiran od strane *lcnA* gena. Prilikom njegove obrade dolazi do isecanja 21 aminokiseline na amino terminusu. Nizvodno od *lcnA* gena nalazi se *lciA* gen za imunost koji kodira protein od 98 aminokiseline (Holo *et al*, 1991). Ovaj protein se integriše u membranu i to u velikom broju kopija (do 10⁵ po celiji) i omogucava imunost blokirajuci receptore za laktokokcin A (Nissen-Meyer *et al*, 1993). Uzvodno od *lcnA* gena u istom operonu nalaze se geni odgovorni za maturaciju i sekreciju bakteriocina, *lcnC* (716 aminokiseline) i *lcnD* (474 aminokiseline). Laktokokcin izaziva smrt senzitivne bakterije tako sto permeabilizuje membranu senzitivne celije najverovatnije stvarajuci poru, prilikom cega se gubi protonski potencijal i nastaje curenje jona i drugih celijskih konstituenata

(van Balkum *et al*, 1991; Klaenhammer, 1993).

Laktokokcin B je hidrofobni ali i pozitivno naelektrisani peptid koji takodje formira pore u membrani senzitivne laktokokalne celije izazivajuci njenu smrt. LcnB operon sastoji se iz dva gena, *lcnB* za sintezu bakteriocina i *lciB* za imunost (Venema *et al*, 1993; Klaenhammer, 1993).

Laktokokcin M je bakteriocin sa malom antimikrobijalnom aktivnoscu. U LcnM operonu su konstatovana dva gena *lcnM* i *lcnN* ciji su proizvodi potrebni za dobijanje aktivnog bakteriocina i gen za imunost *lciM*. Ne zna se da li je laktokokcin M kompleksni bakteriocin ili proizvod *lcnN* gena ucestvuje u obradi proizvoda *lcnM* gena. (Klaenhammer, 1993).

Diplokokcini

Prvi otkriveni bakteriocin laktokoka, jos 1933. godine, bio je diplokokcin. Diplokokcin je protein molekulske mase 5,3kDa, temperaturno je stabilan na pH 9,4 i poseduje brz baktericidan efekat na druge sojeve laktokoka. Diplokokcin sintetise nekoliko sojeva *L. lactis* subsp. *cremoris*. Geni za biosintezu diplokokcina i za imunost na njega locirani su na konjugativnom plazmidu velicine 81kb (Davey,1984; Klaenhammer, 1993).

Kompleksni bakteriocini laktokoka

Laktokokcin G je kompleksni bakteriocin koji se sastoji od dva polipeptida (α_1 i β). On je prvi bakteriocin ovog tipa otkriven kod prokariota. Polipeptidi α_1 i β su razlicite molekulske mase i pojedinačno ispoljavaju jedva vidljivu inhibitornu aktivnost. U kompleksu koga cine ovi polipeptidi u odnosu $7\alpha_1 : 1\beta$ antimikrobijalna aktivnost se povecava za pet puta. Ovaj dvokomponentni bakteriocin deluje kao porin u membrani i pokazuje inhibitornu aktivnost na razlicite klostridije i bakterije mlecno kiselinskog vrenja, a sintetise ga soj *L. lactis* subsp. *lactis* LMG2081 (Nissen-Meyer *et al*, 1992a; Klaenhammer, 1993).

Lantibiotici

Lantibiotici su polipeptidi male molekulske mase (manji od 5kDa) koji deluju na membranu, temperaturno su stabilni na niskom pH i u svom sastavu sadrze modifikovane aminokiseline. Najpoznatiji bakteriocin ove klase je nizin. Nizin poseduje antimikrobijalnu aktivnost sirokog spektra delovanja i prvi je poceo da se komercijalno upotrebljava kao prezervativ za hranu. Nizin je hidrofobni polipeptid molekulske mase oko 3,5kDa koji u membrani formira pore, i javlja se u formi dimera i oligomera (Liu and Hansen, 1990). Nizinski operon, koji se sastoji od strukturnog gena (*nisA*), gena za obradu primarnog transkripta i transport nizina kroz membranu (*nisB*, *nisC*, *nisP* i *nisT*) i gena za imunost (*nisI*), zajedno sa genom za prenos i katabolizam saharoze, lociran je na konjugativnom transpozonu velicine oko 70kb (Horn *et al*, 1991; Rauch and de Vos, 1992). U prirodi se mogu naci dve forme nizina (Z i A) koje se razlikuju po aminokiselini na 27. mestu (kod nizina Z je na 27. mestu aminokiselina histidin, dok je kod nizina A asparagin)(De Vos *et al*, 1993; Klaenhammer, 1993).

Laktostrepcini

Laktostrepcini su bakteriocini koji pokazuju inhibitorni efekat samo na sojeve u okviru bakterija mlecno kiselinskog vrenja i to u opsegu od pH4,5 do pH5, a neaktivni su vec na pH7. Senzitivni su na proteinaze i na fosfolipazuD, a zadrzavaju aktivnost posle izlaganja temperaturi od 100-121°C i nakon 10 minuta. Najpoznatiji laktostrepcin je Las5 koga sintetise *L. lactis* subsp. *cremoris* 202 (Zajdel *et al*, 1985; Klaenhammer, 1993).

II CILJ ISTRAZIVANJA

Za Gram negativne bakterije (*Agrobacterium*, *Pseudomonas* ..) je poznato da poseduju cirkularne plazmide velicine i preko 200kb, ali u laktokokama i Gram pozitivnim bakterijama uopste, sem linearnih plazmida streptomiceta (Sakaguchi,1990; Kinashi and Shimaji-Murayama,1991), tako veliki plazmidi jos nisu otkriveni. Najveci izolovan plazmid laktokoka je Bac Tra plazmid pNP2 velicine 131kb iz soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* WM4 i kointegrativni pPF144 plazmid (144kb)(Scherwitz-Harmon and McKay, 1987; Prevots *et al*, 1994). Preliminarni rezultati dobijeni u izucavanju bakteriocinske i proteoliticke aktivnosti u soju *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50 su pokazali da su geni za proteinazu PI tipa i bakteriocin S50 najverovatnije locirani na cirkularnom plazmidu od 290kb (Kojic *et al*, 1993). Hromozomi laktokoka su cirkularni i velicine su izmedju 2,15 i 2,6 Mb (Le Bourgeois *et al*, 1989; Tanskanen *et al*, 1990; Tulloch *et al*, 1991; Le Bourgeois *et al*, 1992). Posedovanje plazmida od 290kb koji predstavlja 1/8 ukupnog genoma bilo bi najverovatnije energetski neekonomicno za celiju ukoliko ta DNK ne bi doprinosila selektivnoj prednosti, tako da je znacajno otkriti koje su to prednosti soja koje obezbedjuje ovaj plazmid. Pored toga rezultati dobijeni na fundamentalnim izucavanjima ovako velikih plazmida doprineli bi upotpunjavanju znanja o molekularnim mehanizmima replikacije, particije i stabilnosti plazmida.

Istrazivanja, prikazana u ovom radu, su pokusaj da se da odgovor na pitanje zasto tako veliki plazmid postoji u soju *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50 i da li su tako veliki plazmidi kao sto je pS50-290 izuzetak ili je metodologija koriscena u ovom radu omogucila vizuelizovanje neceg uobicajenog u ovim bakterijama.

Stoga su ciljevi rada bili:

- da se potvrdi prisustvo velikog cirkularnog plazmida od 290kb u soju *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50,
- da se konstruise preliminarna restrikciona mapa plazmida i da se utvrdi priblizna lokacija proteinaznog gena i gena za bakteriocin S50, na plazmidu,
- da se ustanovi da li je plazmid pS50-290 autokonjugabilan (Tra+ plazmid), odnosno da li poseduje gene za sve konjugativne funkcije,
- da se uradi analiza ekspresije bakteriocinskog i proteinaznog gena u konjugantima,
- da se testira medjusobni odnos plazmida prisutnih u soju S50 (pS50-7, pS50-10a, pS50-10b i pS50-290) i rezultujucih plazmida u konjugantima,
- da se analizira stabilnost plazmida (pS50-7, pS50-10a, pS50-10b i pS50-290) soja S50.

III MATERIJAL I METODE

1. EKSPERIMENTALNI MATERIJAL

1. 1. Bioloski materijal-Bakterijski sojevi i vektori

Sojevi laktokoka i vektori (fazi i plazmidi) korisćeni u ovom radu dati su u Tabeli 1.

Tabela 1. Lista sojeva laktokoka i vektora

SOJEVI	KARAKTERISTIKE	IZVOR/REFERENCA
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetiyactis</i>		
S50	Prt ⁺ , Bac ⁺ , Bac ^r , Rif ^r	Kojic <i>et al.</i> , (1991)
S50-1	Prt ⁻ , Bac ⁻ , Bac ^s , Rif ^r	Kojic, (1992)
S50-1SM	Prt ⁻ , Bac ⁻ , Bac ^s , Rif ^r , Sm ^r	ovaj rad
S50-1SMSP	Prt ⁻ , Bac ⁻ , Bac ^s , Rif ^r , Sm ^r , Spc ^r	ovaj rad
SS1	Prt ⁻ , Bac ⁺ , Bac ^r , Rif ^r , Sm ^r , Spc ^r	ovaj rad
MS1	Prt ⁺ , Bac ^s , Bac ^r , Rif ^r , Sm ^r , Spc ^r	ovaj rad
MS3	Prt ⁺ , Bac ⁺ , Bac ^r , Rif ^r , Sm ^r , Spc ^r	ovaj rad
RS6	Prt ⁺ , Bac ⁺ , Bac ^r , Rif ^r , Sm ^r , Spc ^r	ovaj rad
S50-20	Prt ⁺ , Bac ⁺ , Bac ^r , Rif ^r	ovaj rad
S50-20-62	Prt ⁻ , Bac ⁻ , Bac ^s , Rif ^r	ovaj rad
S50-20-62SM	Prt ⁻ , Bac ⁻ , Bac ^s , Rif ^r , Sm ^r	ovaj rad
S50-20-62SMSP	Prt ⁻ , Bac ⁻ , Bac ^s , Rif ^r , Sm ^r , Spc ^r	ovaj rad
R6	Prt ⁺ , Bac ⁺ , Bac ^r , Rif ^r , Sm ^r	ovaj rad
K31	Prt ⁺ , Bac ⁺ , Bac ^r , Rif ^r , Sm ^r , Spc ^r	ovaj rad
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
NCDO712	Prt ⁺ , Lac ⁺ , Bac ^s	Gasson, (1983)
MG1363	Prt ⁻ , Lac ⁻ , Bac ^s	Gasson, (1983)
MG7284	Prt ⁻ , Lac ⁻ , Bac ^s , Fus ^r , Spc ^r	Gasson
MG10	Prt ⁺ , Lac ⁻ , Bac ⁺ , Bac ^r , Fus ^r , Spc ^r	ovaj rad
RM1	Prt ⁺ , Lac ⁻ , Bac ⁺ , Bac ^r , Fus ^r , Spc ^r	ovaj rad
VEL1122	Prt ⁻ , Lac ⁻ , Bac ^s , Tet ^r , RecA ⁻	Duwat <i>et al.</i> , (1992)
SVEL5	Prt ⁺ , Lac ⁻ , Bac ⁺ , Bac ^r , Tet ^r , RecA ⁻	ovaj rad
SVEL11	Prt ⁺ , Lac ⁻ , Bac ⁺ , Bac ^r , Tet ^r , RecA ⁻	ovaj rad
IL1403 (soj IL594 bez plazmida)	Prt ⁻ , Bac ^s	Chopin <i>et al.</i> , (1984)
IL1403SM	Prt ⁻ , Bac ^s , Sm ^r	ovaj rad
IL1403SMSP	Prt ⁻ , Bac ^s , Sm ^r , Spc ^r	ovaj rad
SIL21	Prt ⁺ , Bac ⁺ , Bac ^r , Sm ^r , Spc ^r	ovaj rad
SIL102	Prt ⁺ , Bac ⁺ , Bac ^r , Sm ^r , Spc ^r	ovaj rad
RMIL1	Prt ⁺ , Bac ⁺ , Bac ^r , Sm ^r , Spc ^r	ovaj rad

VEKTORI	KARAKTERISTIKE	IZVOR/REFERENCA
pUC19	Amp, <i>lacZ</i> , 2,7kb	Yanish-Perron <i>et al.</i> (1984)
pON7	pUC18+pIL253 + <i>RsaI-HindIII</i> 1,2kb <i>lcnA</i> gen	Holo <i>et al.</i> (1991)
pRL12	pUC18+ <i>BbI</i> - <i>AccI</i> 1,7kb <i>ISS1</i> gen	Haandrikman <i>et al.</i> (1990)
pS1AC052	pUC19+ <i>AatII-ClaI</i> 520bp <i>ISS1</i>	ovaj rad
pS1XHC1	pUC19+ <i>HindIII-ClaI</i> 1kb <i>ISS1</i> + X gen	ovaj rad
pXRR05	pUC19+ <i>RsaI-RsaI</i> 500bp Xgen	ovaj rad
pXHR02	pUC19+ <i>HindIII-RsaI</i> 200bp Xgen	ovaj rad
pS7HP425	pUC19+ <i>HpaII</i> 4,25kb plazmida pS50-7	ovaj rad
pS7HP118	pUC19+ <i>HpaII</i> 1,18kb plazmida pS50-7	ovaj rad
pS7HP086	pUC19+ <i>HpaII</i> 860bp plazmida pS50-7	ovaj rad
pS7HP029	pUC19+ <i>HpaII</i> 290bp plazmida pS50-7	ovaj rad
pS7HP016	pUC19+ <i>HpaII</i> 160bp plazmida pS50-7	ovaj rad
pS7BE640	pUC19+ <i>BamHI-EcoRI</i> 6,4kb plazmida pS50-7	ovaj rad
pS7BE030	pUC19+ <i>BamHI-EcoRI</i> 300bp plazmida pS50-7	ovaj rad
pS7T76	pUC19+ <i>TaqI</i> 480bp plazmida pS50-7	ovaj rad
pUB10T64	pUC19+ <i>TaqI</i> 600bp <i>BamHI</i> 10kb plazmida pS50-290	ovaj rad
pUB10T17	pUC19+ <i>TaqI-TaqI</i> 870bp <i>BamHI</i> 10kb pS50-290	ovaj rad
M13mp18	7250 bp	Yanish-Perron <i>et al.</i> (1984)
M13mp19	7250 bp	Yanish-Perron <i>et al.</i> (1984)
M13mp10-Q ₁	M13mp10+ <i>HindIII-ClaI</i> 886bp <i>prtM</i> gen	Kok, (1987)
M13mp10-Q ₆	M13mp10+ <i>ClaI-BamHI</i> 1055bp <i>prtP</i> gen	Kok, (1987)
M13mp10-Q ₉₂	M13mp10+ <i>EcoRI-HindIII</i> 1339bp <i>prtP</i> gen	Kok, (1987)
M13mp18T76	M13mp18+ <i>TaqI</i> 480bp plazmida pS50-7	ovaj rad
M13mp19T76	M13mp19+ <i>TaqI</i> 480bp plazmida pS50-7	ovaj rad
M13mp18T64	M13mp18+ <i>TaqI</i> 600bp <i>BamHI</i> 10kb plazmida pS50-290	ovaj rad
M13mp19T64	M13mp18+ <i>TaqI</i> 600bp <i>BamHI</i> 10kb plazmida pS50-290	ovaj rad

Prt⁺ - prisustvo proteinazne aktivnosti; Prt⁻ - odsustvo proteinazne aktivnosti; Bac⁺ - prisustvo bakteriocinske aktivnosti; Bac⁻ - odsustvo bakteriocinske aktivnosti; Bac[±] - smanjena sposobnost sinteze bakteriocina S50; Bac^r - rezistencija na bakteriocin S50; Bac^s - senzitivnost na bakteriocin S50; Rif^r - rezistencija na rifampicin; Sm^r - rezistencija na streptomycin; Spc^r - rezistencija na spektinomycin; Tet^r - rezistencija na tetraciklin; Fus^r - rezistencija na fusidicnu kiselinu; Lac⁺ - sposobnost katabolizma secera laktoze; Lac⁻ - odsustvo sposobnosti katabolizma secera laktoze; RecA⁻ - mutant u *recA* genu.

Pored sojeva laktokoka u ovom radu korisceni su i sojevi *Escherichia coli* :

JM101 - *supE, thi, Δ(lac-proAB), F', traD36, proAB, lacI qZΔM15* (Messing, 1979).

NM522 - *supE, thi, Δ(hsdMS-mcrB)5, Δ(lac-proAB), F' [proAB⁺, lacIq, lacZΔM15]* (Gough and Murray, 1983)

1. 2. Medijumi za rast bakterija

Za rast laktokoka koriscen je GM17 medijum (Terzaghi and Sandine, 1975) koji sadrzi: polipepton (5g), fiton pepton (5g), mesni ekstrakt (5g), ekstakt kvasca (2,5g), L-askorbinska kiselina (0,5g), 1M MgSO₄ x 7 H₂O (1ml), Na-β-glicerofosfat (19g) i glukozu (5g) na 1l destilovane vode. Radi izbegavanja karamelizacije, sterilizacija glukoze (40%), vrsena je odvojeno i dodavana je neposredno pred upotrebu medijuma (finalno 0,5%). Za dobijanje cvrste

podloge dodavan je agar (1,5-2%). Temperatura inkubacije je bila 30°C.

Za analizu proteolitičke aktivnosti sojevi laktokoka su gajeni na cvrstoj podlozi CMA (citrarno-mlečni agar) koji sadrži: obrano mleko u prahu (44g), Na-citrat x 2H₂O (8g), ekstrakt kvasca (1g), glukozu (5g) i agar (15g) na litar destilovane vode.

Sojevi laktokoka su čuvani na -80°C (u GM17 medijumu sa 15% glicerola) ili liofilizovani i čuvani na 4°C.

Za rast *E. coli* bakterija koriscen je LB (Luria broth) (Lennox, 1955) bogati medijum koji sadži: tripton (10g), ekstrakt kvasca (5g), NaCl (5g) na 1l destilovane vode. Cvrsta podloga za rast ovih sojeva na petri solji dobijana je dodavanjem agara (1,5-2%). Sojevi *E. coli* sa vektorom gajeni su u LB medijumu koji je sadržavao odgovarajuću koncentraciju antibiotika.

Za rast *E. coli* JM101 bakterija u kojima su propagirani M13 fazi koriscen je 2xTY tečni medijum koji sadrži: tripton (16g), ekstrakt kvasca (10g) i NaCl (5g). Za rast na cvrstoj podlozi koriscen je M9 minimalni agar: Na₂HPO₄ (6g), KH₂PO₄ (3g), NH₄Cl (1g), NaCl (0,5g), 1M MgSO₄ (1ml), 0,1M CaCl₂ (1ml), 1M tiamin (1ml), 40% glukozu (5ml) i agar (15g) na 1l destilovane vode. Sojevi *E. coli* su gajeni na 37°C.

Sojevi *E. coli* su čuvani u medijumu koji sadrži Nutrient broth (8g) i agar (7g) na 1l destilovane vode, na sobnoj temperaturi.

λ fazi su čuvani i diluirani u SM puferu koji sadrži: NaCl (5,8g), MgSO₄ (2g), 1M Tris-HCl pH 7,5 (50ml), 2% želatin (5ml) na 1l destilovane vode. Fazi su čuvani na temperaturi od 4°C.

2. METODE

2. 1. METODE ZA IZOLOVANJE DNK

2. 1. 1. Mini-metoda izolacije plazmidne DNK iz *E. coli*

Za brzu izolaciju plazmida iz *E. coli* koriscena je metoda alkalne lize (Birboim and Doly, 1979). Pojedinačne bakterijske kolonije zasejavane su u 5ml LB medijuma u koga je dodat odgovarajući antibiotik. Talog dobijen centrifugiranjem noćne kulture bakterija pran je u TEN puferu (50mM Tris HCl pH 8,0; 10mM EDTA pH 8; 50mM NaCl) i resuspendovan u 100μl STE pufera (20% saharoza; 0,1M Tris pH 8,0; 20mM EDTA) sa 2mg/ml lizozima. Posle inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi dodavano je 200μl sveže pripremljene smese 1% SDS u 0,2M NaOH. Nakon laganog mešanja u dobijeni lizat je dodavan 3M Na-acetat pH 4.5 (150μl), smesa je inkubirana 10 min na -20°C, a zatim centrifugirana 20 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na 4°C, pri čemu su istaloženi ostaci bakterijskih ćelija i visokomolekularna DNK. Dobijeni supernatant u kome se nalazi plazmidna DNK, prebacivan je u čiste Eppendorf epruvete. Zatim je vrsena precipitacija DNK dodavanjem 2,5 volumena hladnog 96% etanola (-20°C). Precipitat je prikupljan u talogu posle centrifugiranja u trajanju od 20 min na 13000

obrt/min na 4°C (BiofugaA, Heraeus). Dobijeni talog je ispiran hladnim 70% etanolom (1ml; -20°C), zatim osusen u "Speed vac"-u, resuspendovan u 50µl TE pufera (10mM Tris pH 7,5 i 1mM EDTA pH 7,5). Degradacija RNK u uzorcima je vrsena inkubacijom uzoraka 15 min sa 1µl RNK-aze (10mg/ml) na 37°C. Da bi na ovaj nacin dobijena plazmidna DNK mogla da se digerira restrikcionim enzimima bilo je potrebno da se precisti fenolom.

2. 1. 2. Mini-metoda izolacije plazmidne DNK iz laktokoka

Za izolaciju plazmida iz male kolicine bakterija laktokoka koriscena je modifikovana metoda alkalne lize Birboim-a i Doly-a (Birboim and Doly, 1979). Talog iz logaritamske kulture bakterija ($OD_{600nm}=0,6-0,8$) je pran u TEN puferu i resuspendovan u 100µl PP pufera (0,5M saharoza, 40mM NH_4 -acetat, 10mM Mg-acetat, pH7) sa lizozimom (4 mg/ml). Posle inkubacije 15 min na 37°C, dodavano je 200µl sveze pripremljene smese 1% SDS-a u TE1 puferu (100mM Tris, 10mM EDTA; pH ~12). Smesa je lagano mesana do vidljive lize nakon cega je dodavano 100µl glacialne sircetne kiseline i 125µl 5M NaCl. Nakon kratkog mesanja (nekoliko laganih obrtaja) smesa je centrifugirana 15 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na sobnoj temperaturi. Dobijeni supernatant je prebacen u nove Eppendorf epruvete, dodavano je 2,5 volumena hladnog 96% etanola (-20°C). Plazmidna DNK je talozena centrifugiranjem 15 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na sobnoj temperaturi, a zatim prana sa 1ml 70% etanola (-20°C). Talog je osusen i resuspendovan u 20µl vode. Degradacija RNK u uzorcima je vrsena inkubacijom uzoraka 15 min sa 1µl RNKaze (10mg/ml) na 37°C. Da bi ovako dobijena plazmidna DNK mogla da se sece restrikcijom enzimima, neophodno je izvršiti preciscavanje fenolom.

2. 1. 3. Preciscavanje DNK fenolom (PCI procedura)

Uzorak DNK razblazivan je vodom do finalne zapremine od 200µl. Dodavano je 200µl PCI smese (fenol, hloroform, izoamil alkohol, u zapreminskom odnosu 10:9:1) dobro promesano i centrifugirano 7 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na sobnoj temperaturi. Vodena-gornja faza je pazljivo prebacivana u ciste Eppendorf epruvete i u nju je dodavano 200 µl etil-etra.

Posle mesanja i centrifugiranja 1-2 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus), odstranjivana je gornja faza i u donju fazu je dodavan finalno 0,3M Na-acetata i 2,5 volumena hladnog 96% etanola (-20°C). Posle inkubacije smese 20 min na -80°C i centrifugiranja 20 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na 4°C, dobijeni talog je ispiran 1ml hladnog 70% etanola (-20°C), osusen pod vakuumom u "Speed vac"-u i resuspendovan u 30µl vode. Na ovaj nacin preciscena DNK mogla je da se koristi za digestije restrikcionim enzimima, ligacije, transformacije, itd.

2. 1. 4. Mini-metoda izolacije dvolančanih formi M13 faga

Izolacija dvolančanih formi M13 faga iz male kolicine kulture *E. coli* bakterija radjena je CTAB (Cetil metil amonijum bromid) metodom. Talog dobijen centrifugiranjem bakterija iz 3-5ml kulture je opran u TEN puferu, a zatim resuspendovan u 200µl STET pufera (8% saharoza, 50mM Tris-HCl pH8, 50mM EDTA pH8, 0,1% Triton X-100) sa lizozimom (1mg/ml). Posle inkubacije 5 min na sobnoj temperaturi suspenzija celija je kuvana 45 sekundi u ključaloj vodi, a

zatim su ostaci celija obarani centrifugiranjem 10 min na 13000 obr/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na sobnoj temperaturi. Dobijeni supernatant je prebacivan u nove Eppendorf epruvete. Digestija RNK u supernatantu je vrsena dodavanjem 1 μ l RNKaze (10mg/ml) i inkubacijom 10 min na 68°C. Posle tretmana RNKazom supernatant je ohladjen na sobnu temperaturu i dodavano mu je 20 μ l 5% CTAB-a. Nakon inkubacije 5 min na sobnoj temperaturi i centrifugiranja 5 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus), talog je resuspendovan u 300 μ l 1,2M NaCl. DNK je precipitirana dodavanjem 2,5 volumena hladnog 96% etanola (-20°C) i centrifugiranjem 10 min na 13000 obr/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na 4°C. Visak istalozenih soli je odstranjivan pranjem DNK taloga sa 1ml 70% etanola (-20°C), a zatim je talog osusen i resuspendovan u 10-20 μ l vode. Na ovaj nacin izolovana DNK je direktno koriscena za analizu restrikcionim enzimima.

2. 1. 5. Izolovanje velike kolicine plazmidne DNK iz laktokoka

Izolacija velike kolicine plazmidne DNK iz laktokoka vrsena je metodom alkalne lize koju su opisali Anderson i McKay (1983) i to na sledeci nacin. Talog bakterija dobijen centrifugiranjem 10 min na 7000 obrt/min u GS3 rotoru (Sorvall RC-5B) 500ml logaritamske kulture bakterija ($OD_{600}=0,6-0,8$) opran je u TEN puferu, a zatim resuspendovan u 30ml PP pufera, u kome je sveze rastvoren lizozim u koncentraciji 4mg/ml. Suspenzija celija sa lizozimom inkubirana je 15 min na 37°C. Suspenziji je zatim dodato 3,5ml 20% rastvora SDS-a u 50mM Trisu i 200mM EDTA pH8. Smesa je odmah izmesana obrtanjem epruvete i inkubirana 5 min na 37°C, a zatim je snazno muckana 30 sek. Nakon muckanja smesama je dodavano po 2,5ml sveze pripremljenog 3N NaOH i sadrzaj je mesan laganim obrtanjem epruveta 10 min. Zatim je u epruvete dodavano po 3,9ml 2M Tris-HCl pH7 i nastavljeno sa laganim mesanjem jos 3 min. Nakon toga dodavano je po 5,7ml 5M NaCl i po 10ml fenola, izmesano dobro i centrifugirano 10min na 8000 obrt/min u SS34 rotoru (Sorvall RC-5B). Gornja faza je prenetu u nove epruvete. Fenolna ekstrakcija proteina je ponovljena vise puta do gubitka interfaze, a zatim je DNK precipitirana 96% hladnim etanolom (-20°C), oprana 70% hladnim etanolom (-20°C), osusena i resuspendovana u 5ml vode. Ovako dobijena plazmidna DNK je preciscavana u gadjentu CsCl.

2. 1. 6. Izolovanje velike kolicine plazmidne DNK i dvolancane forme M13 faga iz *E. coli*

Bakterije iz prekonocne kulture su talozene centrifugiranjem 15 min na 6000 obrt/min u GSA ili GS3 rotoru (Sorvall RC-5B). Zatim su lizirane po proceduri alkalne lize koju su opisali Birnboim i Doly (1979). Talog iz 500ml bakterijske kulture rastvaran je u 10ml BI pufera (50mM glukoza, 25mM Tris-HCl pH8,0 i 10mM EDTA), sa sveze rastvorenim lizozimom u koncentraciji 5mg/ml. Ova suspenzija inkubirana je 5 min na sobnoj temperaturi. Zatim je kap po kap dodavano 20ml rastvora 0,2N NaOH u 1% SDS-u. Posle inkubacije od 10 min na ledu, dodavano je 15ml ledenog 5M rastvora K-acetata pH4,8 i inkubirano na ledu 10-60 minuta. Bakterijski lizat centrifugiran je 30 min na 18000 obrt/min u SS34 rotoru (Sorvall RC-5B) na 4°C. Plazmidna DNK precipitirana je iz supernatanta dodavanjem 0,6 volumena izopropanola sa sobne temperature. Nakon inkubacije 15 min na sobnoj temperaturi DNK je talozena centrifugiranjem 20 min na 8000 obrt/min u SS34 rotoru (Sorvall RC-5B) na sobnoj temperaturi. Talog je ispiran hladnim 70% etanolom (-20°C), susen i resuspendovan u 5ml TE pufera.

2. 1. 7. Preciscavanje DNK u gradijentu CsCl

Izopiknicko centrifugiranje u gradijentu gustine CsCl-etidijum bromida radjeno je na sledeci nacin. Po svakom mililitru dobijenog rastvora nepreciscene plazmidne DNK dodavano je 1g CsCl i 0,05ml rastvora etidijum bromida (10mg/ml). Ova smesa je prenosena u epruvete za rotore Ti50, SW50.1 ili VTi65 (Beckman L-55). U slucajevima kada epruvete nisu zatopljavane rastvor plazmidne DNK prekrivan je slojem parafinskog ulja. Centrifugiranje u VTi65 rotoru trajalo je 18 sati na 45000 obrt/min, a u drugim rotorima 36 sati na istoj brzini, na temperaturi od 20°C.

Posle završenog centrifugiranja sadrzaj donje fluorescirajuće, plazmidne trake izvlacen je bocnom punkcijom epruvete i prebacivan u Eppendorf epruvete. Ekstrakcija etidijum bromida vrsena je izoamilalkoholom zasicenim TE puferom 6-10 puta u zapreminskom odnosu 1:1. Posle ekstrakcije vodena faza je dijalizirana u TE puferu sa 7-8 promena pufera. Koncentracija izolovane plazmidne DNK merena je spektrofotometrijski.

2. 1. 8. Brza izolacija ukupne DNK

Ukupna DNK iz laktokoka je izolovana po mini metodi koju su opisali Hopwood *at al.* (1985) i izvodjena je na sledeci nacin. Talog dobijen centrifugiranjem bakterija iz 3ml logaritamske faze kulture ($OD_{600}=0,6-0,8$) pran je u 1ml TEN pufera, a zatim resuspendovan u 0,5ml PP pufera, koji je sadrzavao 4mg/ml lizozima i 50µg/ml RNKaze. Zatim je vrsena inkubacija 30 min u vodenom kupatilu na 37°C ili dok celije nisu postajale translucetne, nakon cega je dodavano 250µl 2% SDS i suspenzija intenzivno izmesana na vibratoru u trajanju od jednog minuta ili dok viskozitet nije postajao приметно manji. Posle ovog koraka vrseno je odstranjivanje proteina visestrukom (do potpunog gubitka medjufaze) fenolskom ekstrakcijom pri cemu je svaki put dodavano 250 µl neutralnog fenol-hloroforma, rastvor intenzivno izmesan u trajanju od 30 sec i centrifugiran 2 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na sobnoj temperaturi. Pazljivo sakupljenom supernatantu dodavana je 1/10 volumena 3M Na-acetata pH 4,8 i 1 volumen izopropanola, a zatim je lagano mesan i inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi. Ukupna DNK je talozena centrifugiranjem 2 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na sobnoj temperaturi, a talog je rastvaran u 0,5 ml TE pufera. Posle dodavanja 25µl 100 mM spermin-HCl rastvor je inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi i ponovo centrifugiran kao u predhodnom koraku. Dobijeni talog je resuspendovan u 300µl ratvora koji sadrzi (890µl vode, 100µl 3M Na-acetata i 10µl 1M $MgCl_2$), a zatim je rastvoru dodavano 2,5 volumena 96% etanola sa sobne temperature, smesa lagano mesana i inkubirana 60 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja 2 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) supernatant je potpuno odstranjivan, a talog totalne DNK je susen i resuspendovan u 100µl TE pufera. Ovako izolovana DNK je bila stabilna i pogodna za digestiju restrikcionim enzimima.

2. 1. 9. Izolovanje jednolancane DNK iz M13 faga

Sojevi *E. coli* JM serije, mogu da sluze kao domacin za umnozavanje M13 faga. M13 je umereni fag koji preko specificnih bakterijskih pilusa inficira ove sojeve, umnozava se u bakterijama i bez lize celije oslobadja se u medijum. Genom ovih faga u celijama *E. coli* nalazi se u replikativnoj formi dvolancane DNK, dok je u virusnim partikulama jednolancana DNK pogodna za razlicite manipulacije (npr. sekvenciranje Sanger-ovom metodom, mutageneza).

Genom M13 faga modifikovan je tako da služi kao vektor sa mestima za kloniranje i sistemom za identifikaciju klonova preko alfa komplementacije *lacZ* gena. Takođe su konstruisani i plazmidni vektori koji sadrže kloniran *ori* region M13 faga koji im omogućava replikaciju i pakovanje u virusne čestice nakon superinfekcije soja koji sadrži ovakav plazmid M13 pomoćnim virusima.

2. 1. 9. 1. Mini-metoda izolacije jednolancane DNK iz M13 faga

Za izolovanje M13 jednolancane DNK korišćena je procedura Messing (1983). Po 10ml 2XTY medijuma bez antibiotika inokulisano je sa 0,1ml sveže prekonocne kulture JM101 ćelija. Zatim su ove kulture inficirane M13 fazi iz svežih plaka pomoću sterilne cackalice i inkubirane je 5 sati na 37°C uz aeraciju. Kulture su centrifugirane 20 min na 4000 obrt/min u kliničkoj centrifugi da bi se odstranile bakterije, a zatim su supernatanti alikvotirani (po 1,3ml) u Eppendorf epruvete i centrifugirani još 15 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na sobnoj temperaturi. Pazljivo je uzimano po 0,9 ml supernatanta izbegavajući i najmanje uzimanje taloga i prebacivano u nove Eppendorf epruvete. U epruvete je dodavano po 0,2ml rastvora (2,5M NaCl u 20% PEG6000), čime su precipitirani fazi posle inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja 5 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na sobnoj temperaturi dobijeni su talozi M13 faga (bele boje). Ostaci PEG-a na zidovima epruvete odstranjivani su vatenim stapićima, a talog faga rastvaran je u 100µl TE pufera. Proteinski omotac faga je razaran dodavanjem 50µl fenola zasićenog TE puferom. Smesa faga i fenola je snažno muckana a zatim inkubirana 15 min. na sobnoj temperaturi. Faze su razdvajane centrifugiranjem 5 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na sobnoj temperaturi. Vodena faza prenosena je u čiste epruvete i dodavana je 1/10 volumena 3M Na-acetata. Precipitacija je vršena sa 2,5 volumena 96% etanola preko noci, na -20°C. Nakon centrifugiranja 15 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na 4°C dobijeni talozi su ispirani hladnim 70% etanolom (-20°C), suseni i resuspendovani u ukupno 50µl vode (iz 10 ml početne kulture).

2. 1. 10. Izolacija DNK *in-situ* iz laktokoka

Izolacija DNK *in-situ* iz laktokoka vršena je na sledeći način. Pelet bakterija dobijen centrifugiranjem 1,5ml kulture, rane logaritamske faze ($OD_{600}=0,3-0,4$) je opran u 1ml EET pufera (100mM EDTA, 10mM EGTA, 10mM Tris HCl, pH8), a zatim resuspendovan u 300µl EET pufera. Rastvor ćelija je zagrejan na 37°C i dodat mu je isti volumen 2% agaroze (FMC, InCert® Agarose, u kojoj mogu da se vrše enzimске reakcije) koja je prethodno otopljena i ohladjena na 42°C, a zatim je smesa dobro izmesana i razlivena u male kalupe 4x10x2 mm. Kalupi za formiranje agaroznih blokova inkubirani su 20 min na 4°C da bi agarosa polimerisala. Ovako imobilisane ćelije u agaroznim blokovima su lizirane u 5ml rastvora-I (EET sa 2mg/ml lizozima, 10U/ml mutanolizina i 0,05% Sarkozila) inkubacijom 2h na 30°C. Zatim su agarozni blokovi prebaceni u 5ml rastvora-II (EET sa 0,5% SDS-a i 1mg/ml proteinazeK) i u njemu inkubirani preko noci na 50°C. Inaktivacija proteinazeK vršena je tretiranjem agaroznih blokova PMSF-om 2x30 min u po 50ml rastvora (0,01mM PMSF u TE puferu). Oslobođanje od PMSF-a vršeno je dijalizom agaroznih blokova u TE puferu (2x30 min u po 50ml TE pufera). Agarozni blokovi su do upotrebe čuvani u TE puferu na 4°C.

2. 2. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK

2. 2 .1 . Digestije DNK restrikcionim enzimima

Za digestije DNK restrikcionim endonukleazama koriscen je sistem od tri pufera razlicite jonske jacine opisan u Maniatis *et al.* (1982), osim za digestije enzimom *SmaI*, za koje je koriscen poseban pufer. Puferi su pravljени u 10 puta koncentrovanim stokovima i u reakcije dodavani u sledecim finalnim koncentracijama:

L (pufer niske jonske jacine): 10mM Tris-HCl pH7,5, 10mM MgCl₂, 1mM ditioneitol (DTT);

M (pufer srednje jonske jacine): 10mM Tris-HCl pH7,5, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT;

H (pufer visoke jonske jacine): 50mM TrisHCl pH7,5, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT;

S (pufer za *SmaI* enzim): 10mM Tris-HCl pH8,0, 20mM KCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT.

Enzimi su dodavani u reakcione smese u koncentraciji 1U/μg DNK, a zatim su smese inkubirane na optimalnoj temperaturi za restrikcioni enzim. Temperatura na kojoj su inkubirane reakcione smese za vecinu enzima je bila 37°C, izuzev za enzime *SmaI* i *ApaI*, za koje je optimalna tempeartura 30°C i *TaqI*, za koji je optimalna temperatura 65°C. Inaktivacija enzima nakon završene digestije vrsena je inkubacijom 10 min na 70°C ili fenolskom ekstrakcijom.

2. 2. 2. Digestija DNK restrikcionim enzimima *in-situ* u agaroznim blokovima

Agarozni blokovi cuvani u TE puferu na 4°C su seceni pokrovnim mikroskopskim staklom na 4 dela, a zatim ekvilibrisani u 500μl 1x pufera za restrikcioni enzim kojim se zeli seci DNK, inkubacijom 30 min na 4°C. Nakon toga pufer je prosipan, a u Eppendorf epruvetu je dodavano 60μl svezeg pufera i uzorci inkubirani 10 min na optimalnoj temperaturi za restrikcioni enzim. Zatim je dodavan u smesu restrikcioni enzim (~20U po uzorku) i uzorci inkubirani 2h na optimalnoj temperaturi. Nakon isteka vremena enzimska reakcija je prekidana prosipanjem pufera za digestiju i dodavanjem stop pufera (40% saharoza, 100mM EDTA i 0,002% BPB). Uzorci su odmah korisceni za PFGE ili su cuvani na 4°C.

2. 2. 3. Popunjavanje DNK krajeva Klenow-im fragmentom DNK polimeraze I

Za popunjavanje uvucenih 3' OH krajeva DNK, nastalih nakon asimetričnog preseka restrikcionim enzimima, koriscen je Klenow fragment DNK polimeraze I. Ovaj enzim poseduje 5'-3' polimeraznu, i 3'-5' egzonukleaznu aktivnost, sto omogucava generisanje ravnih krajeva pogodnih za medjusobno ligiranje DNK molekula, ciji lepljivi krajevi nisu komplementarni.

Reakciona smesa, pored 0,1-1μg DNK prethodno obradjene restrikcionim enzimom sadrzavala je 60mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl₂, 10 mM β-merkaptoetanol, 0,2 mM dNTP smesu, 2,5U Klenow polimeraze. Reakciona smesa je inkubirana 1h na 12°C i zaustavljena inkubacijom 10 minuta na 68°C. Zatim je reakcionoj smesi dodavana voda do 200μl, 1/10 volumena Na-acetata i 2,5 volumena hladnog 96% etanola (-20°C). Nakon inkubacije 10 min na -70°C, DNK je precipitirana centrifugiranjem 10 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraes) na 4°C, oprana hladnim 70% etanolom, osusena i rastvarana u 5μl TE pufera.

2. 2. 4. Ligiranje DNK

Za ligiranje komplementarnih lepljivih krajeva DNK koriscen je pufer sastava 50mM Tris-HCl pH 7,6, 10mM MgCl₂, 20mM DTT, 1mM ATP i 5% PEG 8000. Ligacija DNK je vrsena u volumenu od 20 μ l. Fragmenti su ligirani u brojcanom odnosu vektor : insert = 1 : 1 kada su posedovali lepljive krajeve i u odnosu 1 : 2 kada su posedovali ravne krajeve. Koncentracija plazmidne DNK dodavane u reakcionu smesu bila je oko 0,1 μ g/ μ l i na tu kolicinu DNK dodavana je 1U enzima T4 ligaze. Ligaciona smesa je inkubirana preko noci na 16°C.

2. 3. ELEKTROFOREZA DNK

2. 3. 1. Klasicna horizontalna elektroforeza DNK

Elektroforeza DNK je radjena na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su pravljene otapanjem agaroze u TBE puferu (89mM Tris, 89mM borna kiselina, 2mM EDTA, finalni pH 8,3) i dodavanjem etidium bromida (0,5 μ g/ml). Kao elektrolit za elektroforezu koriscen je pufer istog sastava sa 0,5 μ g/ml etidium bromida. Agarozni gelovi razlicitog procenta (0,7, 1, ili 1,2) korisceni su u zavisnosti od toga koje velicine DNK molekula je trebalo razdvojiti. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 5-10 V/cm gela.

Velicine linearnih DNK fragmenata dobijenih posle digestije restrikcijom enzimima odredjivane su na agaroznim gelovima uporedjivanjem migracija DNK trake koja se ispituje u odnosu na duzinu puta koju su presli DNK fragmenti poznate velicine (standard). U eksperimentalnom radu su korisceni sledeci standardi:

λ - DNK digerirana *Hind*III i *Eco*RI restrikcijom enzimima pri cemu su dobijani fragmenti DNK duzine 21400 bp, 5370 bp, 5170 bp, 4310 bp, 3530 bp, 2020 bp, 1940 bp, 1610 bp, 1360 bp, 940 bp, 860 bp, 564 bp i 150bp.

λ - DNK digerirana *Hind*III restrikcijom enzimom pri cemu su dobijani fragmenti duzine 23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2072 bp, 564 bp i 125 bp.

Za odredjivanje velicine cirkularnih molekula DNK korisceni su cirkularni plazmidi poznate velicine iz soja *E. coli* V517 (Macrina *et al*, 1978).

2. 3. 2. Elektroforeza DNK u pulsirajucem polju (PFGE)

Elektroforeza totalne DNK izolovane *in-situ* u agaroznim blokovima vrsena je u specijalnim aparaturnama za PFGE (Lkb-BROMA, 2015 Pulsaphor PLUS Control Unit-kontroler pulsa, Lkb-BROMA, 2015 Pulsaphor Electrophoresis Unit-kadice) u kojima se obezbedjuje konstantna temperatura i kontrolisana promena elektricnog polja. Gelovi su pravljene otapanjem agaroze u 0,5xTBE. Korisceni su gelovi razlicitih procenata (1, 1,2 i 1,4%) u zavisnosti od velicine fragmenata DNK koje je trebalo razdvojiti. Pufer koriscen za elektroforezu bio je 0,5xTBE. Elektroforeza je tekla na 9°C. Duzina trajanja i jacina elektricnog polja kao i duzina trajanja elektroforeze su zavisili od velicine DNK fragmenata koje je trebalo razdvojiti (za nesecenu DNK uslovi su bili sledeci: 170V, puls N/S=21-30s, puls E/W=21-30s, 48h; a za secenu DNK: 300V, Puls N/S=8-19s, puls E/W=8-19s, 15h. U oba slucaja je koriscen heksagonalni polozej elektroda, a elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu.

Detekcija DNK u gelu vrsena je bojenjem gelova u 0,5xTBE sa 1 μ g/ml etidijum bromida,

30 min na sobnoj temperaturi u mraku uz lagano muckanje. Nakon bojenja gelovi su odbojavani 1^h u 0,5xTBE uz muckanje, a zatim fotografisani.

Velicine DNK fragmenata u gelovima odredjivane su uporedjivanjem njihove migracije sa migracijom fragmenata DNK poznate velicine. Kao standard za odredjivanje velicine nepoznatih fragmenata u ovom radu korisцени su λ -konkatemeri čiji su molekuli DNK sledeće velicine: 48,5; 97; 145,5; 194; 242,5; 291; 339,5; 388; 436,5; 485; 533,5; 582 kb. Konkatemeri λ DNK formirani su po proceduri koju su objavili Waterbury i Lane (1987). λ fazi koji su čuvani u SM puferu (koncentracija faga oko 10^{12}) su zagrevani na 45°C u vodenom kupatilu. Ugrejanom rastvoru faga dodavan je isti volumen 2% agaroze (FMC, InCert® Agarose) približno iste temperature. Smesa je dobro mesana obrtanjem epruvete, a zatim je razlivena u kalupe 4x10x2mm koji su zatim ostavljeni na hladnom da agarozu polimerise. Ovako imobilisani λ fazi u agarozu su inkubirani u 5ml rastvorall (EET sa 0,5% SDS-a i 1mg/ml proteinazeK) preko noci na 50°C. Nakon inkubacije λ konkatemeri su bili spremni za elektroforezu, a čuvani su na 4°C u EET rastvoru.

2. 4. ELUCIJA DNK FRAGMENTATA

2. 4. 1. Elektroelucija DNK fragmenata

Izolacija plazmidnih restrikcionih fragmenata, klononiranih gena i proba za hibridizaciju vrsena je elektroelucijom. Zeljena traka je isecana iz preparativnog gela za elektroforezu i elektroeluirana. Elektroelucija je radjena u specijalnim kadicama za elektroeluciju. Posle eluiranja DNK iz gela (60 min pri konstantnom naponu od 100 V), promenom smera struje (15 sec) DNK je oslobadjana u rastvor sa najlonske membrane, a zatim je pufer sa rastvorenim DNK prebacivan u Eppendorf epruvete. Ekstrakcija etidium bromida iz uzoraka vrsena je izoamil alkoholom saturisanim sa TE puferom (pH 7,5) i preciscavana PCI metodom. Koncentrovanje eluirane DNK vrseno je etanolnom precipitacijom dodavanjem 1/10 volumena 3M Na-cetata i 2,5 volumena hladnog 96% etanola (-20°C) i centrifugiranjem 10 min na 13000 obr/min u miktocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na 4°C. Visak soli je odstranjivan pranjem DNK taloga 1ml hladnog 70% etanola (-20°C), a zatim je DNK susena i resuspendovana u sterilnoj bidestilovanoj vodi ili TE puferu. Na ovakav nacin izolovani i precisceni DNK restrikcioni fragmenti korisцени su za ligacije i za obelezavanje kao probe za hibridizaciju.

2. 4. 2. Elucija DNK fragmenata iz agaroze niske tacke topljenja

Nakon preparativne elektroforeze, fluorescirajuće DNK trake koje sadrže zeljene restrikcione fragmente su isecane sa gelova koji su pravljени od agaroze niske tacke topljenja. Isecene trake su stavljane u Eppendorf epruvete i otapane 20-30 min u vodenom kupatilu na 70°C. U otoplјenu agarozu dodavan je na 37°C isti volumen 0,5% rastvora cetiltrimetil-amonium bromida (CTAB) u vodi saturisanoj butanolom i isti volumen 0,5% CTAB-a rastvorenog u butanolu saturisanog vodom. Posle mesanja, rastvor je centrifugiran 1 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na sobnoj temperaturi. Gornja faza koja sadrži DNK vezanu za jone CTAB-a je prebacivana u nove Eppendorf epruvete i rastvoru je dodavana 1/4 volumena 0,3M Na-acetata pH 7. Nakon mesanja i centrifugiranja 1 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na sobnoj temperaturi, pazljivo je sakupljana donja faza i prebacivana u nove Eppendorf epruvete. Posle dodavanja 3M Na-acetata (2-4% finalno) i 3

volumena hladnog 96% etanola (-20°C) uzorci su inkubirani 10 min na -80°C, a zatim centrifugirani 20 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na 4°C. Posle pranja sa hladnim 70% etanolom (-20°C) DNK je susena pod vakumom i rastvarana u vodi.

2. 5. OBELEZAVANJE DNK METODOM "NICK-TRANSLACIJE"

"Nick translacija" je postupak pri kome se DNK blago tretira DNKazom kako bi se napravili jednolančani prekidi. Egzonukleazna aktivnost DNK polimerazel zatim prosirojuje ove prekide, a sa druge strane ih popunjava svojom polimeraznom aktivnoscu. Ukoliko se u reakciju polimerizacije stave, pored neobebezenih, i dezoksinukleozidtrifosfati obebezeni biotinom, DNK polimeraza prilikom replikacije ce i njih ugradjivati u novi lanac DNK, sto ce rezultirati u dobijanju fragmenata obebezenih biotinom. Za obebezavanje DNK sa biotinom koriscen je "Bio Nick™ Labeling System" (Gibco BRL). Reakcija obebezavanja vrsena je po upustu proizvođačaca, 1h na 16°C. U cilju uklanjanja neugradjenih obebezenih nukleotida, DNK je dva puta precipitirana etanolom. Pre hibridizacije proba je denaturisana inkubacijom 10 min na 100°C.

2. 6. "SOUTHERN" HIBRIDIZACIJA

2. 6. 1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane

Po završenoj elektroforezi DNK je prenosena na najlonske membrane po metodi Southern-a (1975), postupkom opisanim kod Herrmana (1986). Da bi se olaksao prenos i velikih molekula DNK, po završetku elektroforeze, agarozni gelovi su tretirani sa 20 volumena 0,25M HCl tokom 15 min, da bi se ostvarilo delimično razlaganje DNK uzrokovano depurinizacijom. Gel je zatim ispiran u destilovanoj vodi, a denaturacija DNK je vrsena potapanjem gela 2X20 min u rastvor koji sadrzi 0,5M NaOH i 1,5M NaCl (denaturacioni rastvor). Neutralizacija je vrsena potapanjem gela 2X20 min u neutralizacioni pufer (1,5M NaOH; 1,0M Tris pH 7,5). Najlonska membrana (PhotoGene ili Hybond N) na koju ce DNK biti prenet, potapana je na kratko u destilovanoj vodi, a zatim 15 min u 10XSSC puferu (1,5M NaCl, 0,15M Na-citrat). Takodje su pripremane i trake Whatman 3MM filter papira. Dve trake 3MM papira, vecih od gela, su potapani u 10XSSC i slagani jedan na drugi. Na njih je stavljan tretirani gel, tako da mu je strana sa bunarcicima okrenuta na dole i oko gela su stavljeni najlonski granicnici. Najlonska membrana je polagana na gel i preko nje jos tri 3MM papira velicine membrane, navlazena SSC-om. Pri stavljanju papira vodjeno je racuna da ne ostanu mehurici vazduha zarobljeni medju njima ili izmedju membrane i njih. Preko 3MM papira je stavljan 5-10cm debeo sloj upijajućeg papira i opterećeno ravnomerno tegom od 1 kg. Transfer je vrsen preko noci na sobnoj temperaturi.

Posle završenog prenosa najlonski filter je skidan i pran 5 min u 5XSSC na sobnoj temperaturi uz blago muckanje, a zatim susen 30 min na sobnoj temperaturi polaganjem membrane, DNK stranom okrenutom na gore, na filter papir. Nakon susenja membrana je po upstvu proizvođačaca pakovana izmedju 2 lista 3MM papira i pecena 2 sata na 80°C (PhotoGene) ili je umotavana u prijanjajucu foliju i ozracena 3-5 min pod UV svetloscu (HybondN i HybondN+). Ovako pripremljene membrane se mogu upotrebiti odmah za hibridizaciju ili cuvati na sobnoj temperaturi (PhotoGene) ili na 4°C (HybondN i HybondN+), a mogu se rehibridizovati do 5 puta.

Kod transfera DNK iz gelova u kojima je DNK razdvajana u pulsirajućem polju postupak se razlikovao od prethodno opisanog samo u jednom koraku obrade gela za transfer. Nakon

odbojavanja gela, depurinacija DNK nije vršena tretiranjem gela 15 min u 0,25 N HCl, već je ozračivan pod UV svetlom (254nm) 3 minuta. Dalji tok u obradi gela i transferu DNK bio je identican.

2. 6. 2. Hibridizacija

DNK prenesena na najlonsku membranu sa agaroznih gelova hibridizovana je sa komplementarnim probama obeleženim biotinom. Sam postupak hibridizacije sastojao se od tri faze: prehibridizacije i denaturisanja probe, hibridizacije i pranja.

Prehibridizacija je radjena 1-2h na 65°C u prehibridizacionom puferu (5xSSC, 0,1% Sarkozil, 0.02% SDS i 1% Bloking reagens-totalni kazein), a zatim je prehibridizacioni pufer odlivan i u kesice nalivan hibridizacioni pufer (isti kao i prehibridizacioni) i predhodno denaturisana proba kuvanjem 10 min na ~100°C. Hibridizacija je radjena 16h na 65°C.

Posle završene hibridizacije odlivan je hibridizacioni pufer i filteri prani najpre 2X po 5 min u 5XSSC sa 0,5% SDS na 65°C, a zatim 30 min na 65°C u 0,1XSSC sa 1% SDS i na kraju 5 min na sobnoj temperaturi u 2XSSC.

Za detekciju hibrida koriscen je Gibco BRL "PhotoGene™ Nucleic Acid Detection System". Proces detekcije ukljucuje dva osnovna koraka: 1) vezivanje konjugata streptavidin-alkalne fosfataze (SA-AP) za biotinske grupe sadrzane u probi vezanoj za DNK; 2) inkubiranje membrane sa supstratom za alkalnu fosfatazu i njegovu defosforilaciju uz luminiscenciju koja se detektuje eksponiranjem "X-ray" filma. Detekcija hibrida vršena je po upustu proizvođača (Gibco BRL).

2. 7. SEKVENCIRANJE DNK

Redosled nukleotida u DNK odredjivan je metodom Sanger *et al.* (1977). Metoda se zasniva na sposobnosti Klenovog fragmenta DNK polimeraze I, odnosno T7 polimeraze, da, nastavljajući "primer" sintetise komplementarni lanac DNK koristeći jednolancanu hibridnu DNK kao matricu. Reakcija sinteze komplementarnog lanca se zaustavlja ugradjivanjem dideoksinukleozidtrifosfata (ddNTP) koji ne poseduju 3'-OH grupu na molekulu dezoksiriboze neophodnu za elongaciju DNK molekula. Protokol i reagensi za sekvenciranje korisceni su od proizvođača (US Biochemicals). Sekvenciranje je radjeno sa jednolancanom DNK ili sa denaturisanom dvolancanom plazmidnom DNK kao matricom. Plazmidi su denaturisani alkalijama pre reakcije sekvenciranja i to na sledeci nacin.

a) Denaturisanje plazmidne DNK

Oko 2 µg plazmidne DNK (izolovane na CsCl-EtBr gradijentu) rastvarano je u 20µl vode. Rastvoru RNK dodavano je 2µl 2M NaOH koji sadrzi 2mM EDTA i smesa je inkubirana 25 min na 37°C. Zatim je rastvor DNK neutralisan dodavanjem 3µl 3M Na-acetata pH4,5. Posle dodavanja 7µl vode, DNK je precipitirana dodavanjem 2,5 volumena hladnog 96% etanola (-20°C), inkubacijom 5 min na -70°C i centrifugiranjem 20 min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na 4°C. Denaturisana plazmidna DNK resuspendovana je u 7µl vode.

b) Vezivanje matrice i "primer"-a i reakcije sekvenciranja

Ovako pripremljena dvolancana ili jednolancana DNK izolovana iz M13 faga, ulazile su u reakciju spajanja sa odgovarajucim oligonukleotidnim "primer"-om, koji je komplementaran odredjenoj sekvenci na vektorskoj DNK. Oko 1 μ g DNK mesano je sa 2-5ng prajmera u odgovarajucem puferu, inkubirano 2 min na 65°C, a zatim sporo hladjeno na sobnoj temperaturi do ispod 35°C. U reakciju je zatim dodavana smesa nukleotida i 0,5 μ l ³⁵S tio-dATP (Amersham) (spec. akt. >1000Ci/mmol) i Klenow polimeraza (1U). Reakciona smesa razdvajana je u 4 Eppendorf epruvete u koje su prethodno dodani razliciti dideoksinukleotidi, nakon cije ugradnje se zaustavlja proces sinteze DNK. Reakcije su zaustavljane dodavanjem pufera za nanosenje na elektroforezu (formamid, EDTA, bromfenol plavo i ksilen cijanol). Uzorci su kuvani 2 minuta na 75°C i mogu biti cuvani do elektroforeze na -20°C.

2. 8. METODE RADA SA PROTEINIMA

2. 8. 1. Dobijanje aktivnog proteinaznog ekstrakta

Aktivni ekstrakt proteinaza dobijan je pranjem celija u puferu bez jona kalcijuma i to na sledeci nacin. Bakterijski tepih sacinjen od mikrokolonija na CMA petri soljama je sakupljan ezom (oko 100mg) i prenesen u Eppendorf epruvete. Celije su zatim resuspendovane u puferu bez jona kalcijuma Ca⁺⁺ (100mM Na-fosfatni pufer pH 7,2 5 μ l/mg celija) i inkubirane 30 min na 30°C. Nakon inkubacije celije su obarane centrifugiranjem 5 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi (BiofugeA, Heraeus) na sobnoj temperaturi, a supernatant sa proteinazom je prenesen u nove epruvete. Pranje celija je ponovljeno jos jednom na isti nacin, a dobijeni supernatant je spajan sa prethodnim. Ovako dobijeni ekstrakt je koriscen za testiranje proteoliticke aktivnosti.

2. 8. 2. Hidroliza kazeina

Analiza proteoliticke aktivnosti je vrsena modifikovanom metodom koju su opisali Hill i Gasson (1986). Posle nekoliko sukcesivnih presejavanja bakterija na CMA petri soljama celije su sakupljane u Eppendorf epruvete i resuspendovane u Na-fosfatnom puferu pH7,2 u odnosu 10 μ l pufera na 1mg celija. Suspenzija celija je mesana sa istim volumenom rastvora α_{s1} -, β -, ili κ -kazeina (5mg/ml u istom puferu) i inkubirana na 30°C. Posle isteka predvidjenog vremena uzimani su alikvoti smese i centrifugirani. Supernatantu je dodavan isti volumen 2x koncentrovanog pufera za uzorak (125mM Tris-HCl pH 6,8, 10mM EDTA, 4% SDS, 25% glicerol, 5% β -merkaptotanol i 0,07% BPB). Uzorci su kuvani 3 min na 100°C i analizirani na SDS-PAGE.

Analiza proteoliticke aktivnosti ekstrakta dobijenog pranjem celija u puferu bez jona kalcijuma je vrsena na slican nacin. Aktivni ekstrakt je mesan sa rastvorom kazeina u odnosu 1:1 i inkubiran na 30°C. Nakon isteka vremena u smesu je dodavan isti volumen 2X koncentrovanog pufera za uzorak. Degradacija kazeina je analizirana na SDS-PAGE.

2. 8. 3. Elektroforeza proteina (SDS-PAGE)

Razdvajanje proteina, kako kompletnih kazeina tako i njihovih degradacionih produkata dobijenih aktivnoscu proteinaza, vrseno je elektroforezom u akrilamidnom gelu po proceduri koju su opisali Laemmli i Favre (1973). Aparatura za vertikalnu elektroforezu bila je od firme Gibco BRL. Koriscen je diskontinuiran sistem gela, koji se sastojao od gela za koncentrovanje, i gela za razdvajanje. Debljina gela bila je 1,5mm. Koncentracije komponenti u gelu za koncentrovanje bile su: 3,9% akrilamid/bisakrilamid, 0,125M Tris-HCl pH6,8, 0,1% SDS, 0,07% amonijum persulfat, 0,005% TEMED; u gelu za razdvajanje koncentracija akrilamida (akrilamid/bisakrilamid) bila je finalno 12,5% ili 15%, a pufer je bio 0,38M Tris-HCl pH8,8, 0,1% SDS, 0,1% amonijum persulfat, 0,01% TEMED. Gel za razdvajanje nalivan je 1,5 h ranije do oko 4/5 zapremine, a gel za koncentrovanje nalivan je 30 min pre elektroforeze. Pufer za elektroforezu bio je sastava 0,6% Tris baza, 2,8% glicin i 0,2% SDS. Elektroforeza je tekla kroz gel za koncentrovanje pri konstantnoj struji od 15mA, a kroz gel za razdvajanje od 25mA dok indikatorska boja (bromfenol plavo) nije dosla oko 0,5cm od dna (kraja) gela. Gelovi su bojeni sa komasi plavo (Comassie blue) u rastvoru sastava: metanol 45%, voda 45%, sircetna kiselina 10%, 0,25% komasi plavo, 3-4h uz mesanje. Odbojavanje gelova vrseno je u rastvoru sastava: metanol 25%, voda 68%, sircetna kiselina 7%, uz mesanje. Rastvor za odbojavanje manjan je svakih 3-4h. Obnavljanje rastvora za odbojavanje vrseno je njegovim propustanjem kroz aktivni ugalj koji za sebe vezuje komasi plavo. Nakon odbojavanja gelovi su cuvani u odbojivacu na 4°C.

2. 9. METODE RADA SA BAKTERIJAMA I FAZIMA

2. 9. 1. Transformacija *E. coli* kompetentnih celija plazmidnom i fagnom DNK

Kompetentne celije *E. coli* pripremane su na sledeci nacin. Pojedinačna bakterijska kolonija je zasejavana u 5ml LB medijuma. Nakon prekonocne inkubacije kultura je razblazivana 20 puta u svezem LB medijumu i inkubirana na 37°C uz aeraciju do srednje logaritamske faze rasta ($OD_{620}=0,3-0,4$). Zatim je tako izrasla kultura razblazivana 10 puta u 20ml LB medijuma i ponovo inkubirana do srednje logaritamske faze rasta. Rast celija je zaustavljan inkubacijom kulture 10 min na ledu. Posle centrifugiranja 5 min na 7000 obrt/min u SS34 rotoru (Sorvall RC-5B) na 4°C talog celija je resuspendovan u 10ml na ledu ohladjenog 0,1M $CaCl_2$. Suspenzija je inkubirana 10 min na ledu i posle centrifugiranja 10 min na 5000 obrt/min u SS34 rotoru (Sorvall RC-5B) na 4°C dobijeni talog je pazljivo resuspendovan u 2ml hladnog 0,1M $CaCl_2$ koji je sadrzavao 15% glicerola. Na ovakav nacin pripremljene kompetentne celije su deljene u alikvote od po 250 μ l i koriscene odmah ili su zamrzavane u suvom ledu i cuvane na -80°C do koriscenja.

Transformacija kompetentnih celija je radjena tako sto je u rastvor plazmidne DNK ili u ligacionu smesu dodavano 20 μ l hladnog 5X TNE pufera (50mM Tris-HCl pH7,5; 5mM EDTA pH7,5; 50mM NaCl) i dopunjavano do 100 μ l hladnom sterilnom bidestilovanom vodom. Zatim je u tu smesu dodavano 3,2 μ l 1M $CaCl_2$ i 200 μ l neposredno pripremljenih ili sa -80°C odmrznutih kompetentnih celija. Posle inkubacije na ledu (60 min) i povremenog blagog mesanja, zatim inkubacije 2 min na 42°C i 5 min na ledu, transformaciona smesa je prebacivana u 2ml LB medijuma i inkubirana bez aeracije 30 min na 37°C i uz aeraciju sledecih 30 min.

Transformacija *E. coli* JM101 kompetentnih celija radjena je prema proceduri firme "Amersham" (1987). Procedura je u osnovi ista kao i predhodno opisana, ali sa sledecim razlikama. Bakterije *E. coli* su gajene u 2XTY medijumu. U 200 μ l svezih kompetentnih celija koje

su dobijene iz logaritamske fazel dodavana je ligaciona smesa replikacione forme M13 faga i zeljenog fragmenta (u molarnom odnosu 1:5, pri cemu je uvek radjeno sa 50 μ g vektora-M13 faga) i takva smesa je inkubirana na ledu 40 min, a zatim 2 min na 42°C. Selekcija transformanata je vrsena na minimalnoj M9 cvrstoj podlozi. Podloga je prelivana TA7 mekim agarom (3ml) u koji su predhodno dodani transformaciona smesa (220 μ l), logaritamska kultura (logII) JM101 celija (240 μ l), 2% X-gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid u dimetilformamidu) (24 μ l) i 0,1M IPTG (izopropil- β -D-tio-galaktopiranozid)(15,6 μ l). Selekcija se zasniva na prisustvu ili odsustvu enzima β -galaktozidaze. *E. coli* JM 101 celije inficirane intaktnim M13 fagom produkuju aktivnu β -galaktozidazu koja hidrolizuje supstrat X-gal cime se dobijaju plake plave boje. Inercija zeljenog DNK fragmenta u polilinkerski region M13 fagne DNK interferira sa produkcijom β -galaktozidaze, tako da celije transformisane hibridnim M13 fazima daju bele plake, jer se ne vrsi razlaganje X-gala.

2. 9. 2. Transformacija laktokoka elektroporacijom

Talog bakterija dobijen centrifugiranjem 10ml logaritamske kulture (OD₆₀₀=0,5-0,6) laktokoka (~3x10⁸ bakterija/ml) opran je dva puta u po 10ml sterilne bidestilovane vode i resuspendovan u 200 μ l vode (takodje bidestilovane i sterilne). Rastvoru celija dodavan je 1 μ g plazmidne DNK ili fenolom preciscene ligacione smese, suspenzija je mesana i prebacivana u kivete za elektroporaciju dijametra 0,2cm. Elektroporacija je vrsena u GENE PULSER™ aparatu sa "puls kontrolerom" (Bio-Rad Laboratories) sa podesenim uslovima od 2,5 KV, 25 μ F i 200 Ω . Odmah nakon saopstavanja pulsa, suspenzija celija je prebacivana u epruvete i dodavana joj je MMP smesa (M17, 0.5% glukoza, 10mM MgCl₂, 2,5mM KCl). Oporavljanje celija nakon strujnog pulsa vrseno je inkubiranjem transformacione smese 1h na 30°C. Alikvoti transformacione smese od po 0,1ml su zatim razmazivani na selektivne podloge koje su inkubirane ~48h na 30 ili 37°C.

2. 9. 3. Ciscenje plazmida iz laktokoka

Ciscenje plazmida iz sojeva laktokoka koji poseduju plazmide vrseno je tretmanom sojeva povisenom temperaturom i subletalnom koncentracijom antibiotika novobiocina. Prekonocna kultura tretiranog soja razblazivana je svezim medijumom za rast koji je sadrzavao subletalnu koncentraciju antibiotika novobiocina (5-10 μ g/ml), u zapreminskom odnosu tako da poseduje oko 10⁷ celija/ml medijuma i gajena 16h na povisenoj temperaturi (40-42°C). Nakon treceg kultivisanja alikvoti kulture tretiranog soja su razmazivani na petri solje. Izrasle kolonije su analizirane, metodom za brzu izolaciju, na prisustvo plazmida.

Kod ciscenja plazmida koji nose gene za sintezu i imunost na bakteriocin koriscena je nesto modifikovana prethodno opisana metoda da bi se izbeglo usmrcivanje celija koje su izgubile plazmid (takodje i imunost na bakteriocin) od strane okolnih celija koje su mnogostruko prisutnije. Prekonocna kultura tretiranog soja diluirana je svezim medijumom za rast koji je sadrzavao subletalnu koncentraciju novobiocina (5-10 μ g/ml) u zapreminskom odnosu tako da poseduje oko 10³ celija/ml medijuma i inkubirana 2h na povisenoj temperaturi (40-42°C). Nakon inkubacije celije su obarane centrifugiranjem 10 min na 4000 obr/min (klinicka centrifuga) na sobnoj temperaturi. Talog bakterija resuspendovan je u istom volumenu svezeg medijuma koji je sadrzavao subletalnu koncentraciju novobiocina i inkubiran novih 2h na povisenoj temperaturi. Ovaj postupak je ponavljan vise puta (5-6X) i alikvoti kulture nakon poslednjeg tretmana su razmazivani na petri solje i gajeni na optimalnoj temperaturi. Utrvdjivanje da li su neke kolonije i u kom su procentu izgubile sposobnost sinteze bakteriocina (izgubile Bac plazmid) vrseno je

bakteriocinskim testom.

2. 9. 4. Bakteriocinski test

Za detekciju proizvodnje bakteriocina koriscene su dve metode koje je opsao Harris (Harris *at al*, 1989): (1) modifikovana metoda iskapavanja kulture proizvođača bakteriocina na razmaz senzitivnih celija, za brzu analizu i (2) difuzioni metod u bunarcicima, koji je precizniji i koriscen je za proveru rezultata dobijenih koriscenjem prethodno navedene metode.

Metod iskapavanja - Na dobro osusene GM17 petri solje je iskapavano 5-10 μ l prekonocne kulture testiranog soja i sacekano da se kap bakterijske kulture osusi, na sobnoj temperaturi. Nakon susenja petri solje su prelivane sa 2,5 ml soft agara (GM17 koji sadrzi 0,7% agara) ohladjenog na 42°C koji sadrzi oko 10⁵-10⁶ bakteriocin senzitivnih bakterija po mililitru soft agara. Petri solje su ostavljane na sobnoj temperaturi da se agar stegne, a zatim su u obrnutom polozaju inkubirane preko noci na 30°C. Proizvodnja bakteriocina je detektovana pojavom zone inhibicije rasta senzitivnog soja u soft agaru oko kolonija koja se vidi kao svetla zona.

Kod analize bakterijskih kolonija na sposobnost sinteze bakteriocina koriscen je nesto izmenjen metod. Izrasle bakterijske kolonije su sterilnim cackalicama prenosene na nove dobro osusene petri solje. Petri solje su ostavljane 15min na sobnoj temperaturi da se kolonije vezu za podlogu, a zatim prelivane sa 2,5ml soft agara koji sadrzi senzitivni soj (sa ~10⁵-10⁶ bakterijskih celija) i inkubirane preko noci na optimalnoj temperaturi. Sposobnost sinteze bakteriocina je detektovana pojavom zone inhibicije senzitivnog soja oko izrasle kolonije, koja se vidi kao svetla zona.

Difuzioni metod u bunarcicima - GM17 petri solje su prelivane soft GM17 agarom (5ml) koji sadrzi 10⁵-10⁶ bakterija senzitivnog soja po mililitru agara. U soft agaru su pravljene bunarcici precnika 5mm u koje je sipano po 50 μ l supernatanta oslobodjenog celija centrifugiranjem i filtriranjem kroz sterilne filtere 0,45 μ m i neutrлизованog na pH7 sa 1M NaOH. Petri solje su zatim inkubirane preko noci na 30°C. Prisustvo bakteriocina u supernatantu je konstatovano pojavom zone inhibicije rasta senzitivnog soja oko bunarcica u precniku od nekoliko milimetara.

2. 9. 5. Konjugacioni transfer

Konjugacioni eksperimenti su radjeni na petri solji modifikovanom procedurom koju je su opisali Gasson i Davies (1980). Konjugaciona smesa je pravljena spajanjem donorskih i recipijentnih kultura u logaritamskoj fazi u odnosu 1:10 i 1:50. Smesa je inkubirana 20 min na sobnoj temperaturi, a zatim je propustana kroz sterilan filter 0,45 μ m. Filteri su prani sa istim volumenom GM17 medijuma, a zatim prenoseni na suve petri solje površinom na kojoj su bakterije okrenutom na gore i inkubirani na 30°C. Nakon svakih 2^h menjan je polozaj filtera na petri solji. Vreme trajanja konjugacije je bilo od 4-24^h. Nakon zavrsetka konjugacionog transfera bakterije sa filtera su resuspendovane u 500 μ l GM17 medijuma, a zatim razmazane na selektivne podloge za utvrđivanje broja donorskih celija, recipijentnih celija i konjuganata (selekcija za konjugante bila je imunost na bakteriocin). Frekvenca konjugacije je izrazavana kao broj izraslih kolonija transkonjuganata na broj recipijentnih celija na kraju konjugacionog transfera.

IV REZULTATI

1. Karakterizacija soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50

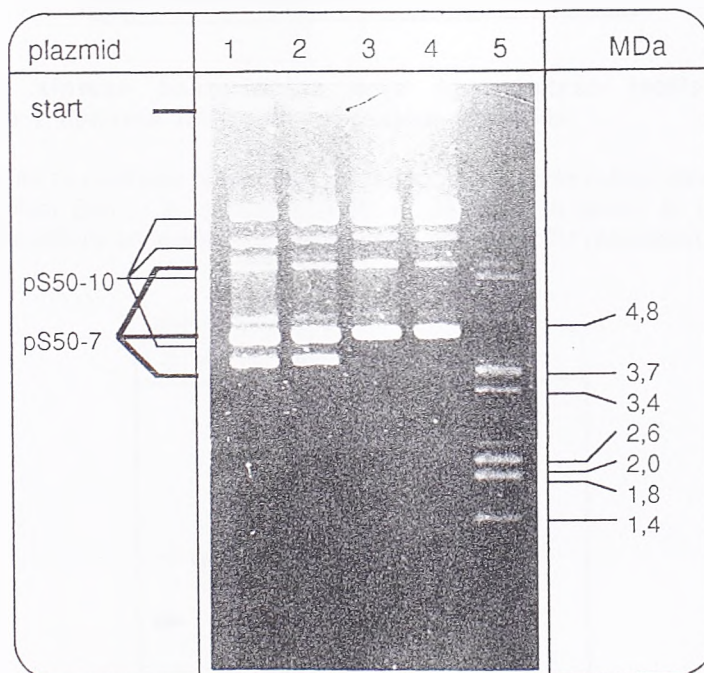
Soj *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50 izolovan je, klasičnim mikrobiološkim metodama za izolaciju laktokoka, iz maslacne mase. Determinacija soja izvršena je analizom fermentacionih sposobnosti različitih secera, koriscenjem API 50CH-S (API System S. A.; Montelieu-Vercieu, France) sistema. Soj S50 najpre je izolovan kao proizvođač antimikrobijalnih supstanci-bakteriocina (Kojic *et al*, 1991). Pored sposobnosti sinteze bakteriocina nazvanog baktericin S50, ovaj soj sintetise i proteinazu PI tipa (hidrolizuje samo β -kazein), koja je veoma homologa sa do sada opisanim proteinazama kod laktokoka (Kojic, 1992). Soj poseduje tri vidljiva plazmida velicine od (6,7kb) pS50-7, pS50-10a i pS50-10b (oba po 8,2kb). Radi lakšeg pracenja i smanjenja kontaminacija soj je obeležen rifampicinskom rezistencijom (100 μ g/ml).

2. Lokacija gena za proteoliticku i bakteriocinsku aktivnost

Soj *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50 sintetise baktericin uskog spektra delovanja i proteinazu PI tipa. Analizom bakteriocina pokazano je da je to proteinski molekul senzitan na proteinazu K, pronazu E, pepsin, tripsin i α -himotripsin, stabilan u širokom opsegu pH od 1-11 i na visokoj temperaturi (Kojic *et al*, 1991). Analizom antimikrobijalnog spektra i prvih desetak amino kiselina koje poseduje u svojoj strukturi ustanovljeno je da baktericin S50 pripada grupi laktokokcina i to laktokokcinima A (Nes, 1994). Proteinaza PI tipa soja S50 je veoma homologa sa kloniranim proteinazama drugih laktokoka (Kojic, 1992). Posto soj S50 poseduje tri plazmida pS50-7, pS50-10a i pS50-10b, koji se mogu veoma lako izolovati klasičnim metodama izolacije, zelelo se videti da li neki od njih na sebi nosi genetičke determinante za jedan od ovih karaktera ili oni imaju drugu lokaciju. Da bi se doslo do odgovora na ovo pitanje koriscena su dve metode: ciscenje plazmida i hibridizacioni eksperimenti sa proteinaznim probama vec kloniranih proteinaznih gena laktokoka.

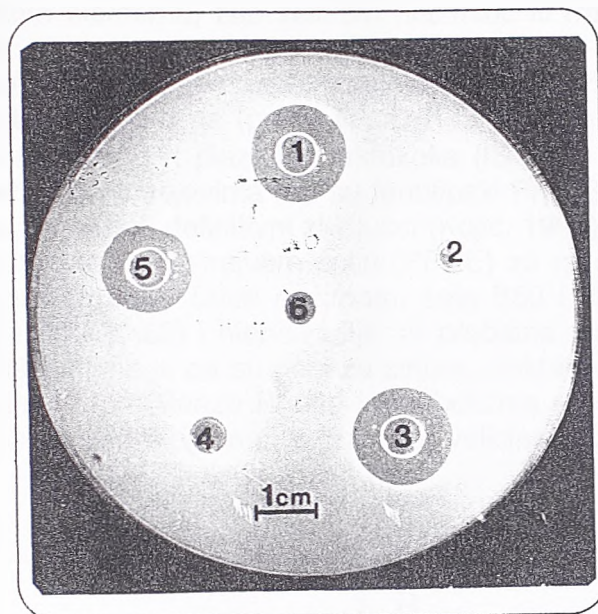
Proteinazni geni, a takodje i geni za sintezu bakteriocina i katabolizam secera kod laktokoka najcesce su locirani na plazmidima (Kok, 1987; Petzel and McKay, 1992; Pritchard and Coolbear, 1993; Klaenhammer, 1993), tako da se najpre pristupilo ciscenju plazmida, kako bi se dobili derivati koji su izgubili neki od ovih karaktera (ciji se gubitak moze detektovati), da bi se zatim utvrdila njihova vezanost za prisustvo nekog od plazmida. Posto je najlakši marker za pracenje sposobnost sinteze bakteriocina prvo su trazeni derivati soja S50 koji su izgubili sposobnost sinteze bakteriocina (Bac- derivati). Ciscenje plazmida soja S50 vrseno je razlicitim metodama (protoplastiranjem, tretmanom etidijum bromidom, akriflavinom i drugim agensima), ali samo u eksperimentima u kojima je koriscen istovremeni tretman soja S50 povišenom temperaturom i subletalnom koncentracijom novobiocina (Materijal i metode) dobijeni su Bac-derivati (S50-1). Frekvencija gubljenja Bac⁺ fenotipa u ovom eksperimentu bila je 1,67‰ (od 3000 analiziranih kolonija samo 5 nije posedovalo sposobnost sinteze bakteriocina). Daljom analizom derivata S50-1 ustanovljeno je da je on pored gubitka sposobnosti sinteze bakteriocina pokazao i odsustvo imunosti na njega kao i odsustvo sposobnosti sinteze proteinaze PI tipa i katabolizma

secera β -gentibioze. Medjutim, derivat S50-1 je dalje posedovao plazmide pS50-7 i pS50-10a i pS50-10b kao i roditeljski soj S50. Medju analiziranim kolonijama koje su zadržale sposobnost sinteze bakteriocina nadjen je jedan derivat (S50-20) koji je posedovao izmenjen plazmidni sastav. Derivat S50-20 zadržao je sva svojstva soja S50, ali je izgubio plazmide od 6,7kb (pS50-7) i jedan plazmid od 8,2kb (pS50-10b). Analizom ovog soja ustanovljeno je da nije doslo do gubitka ili promena vitalnih svojstava ove bakterije, koji bi se odrazavali na brzinu rasta i preživljavanje, na osnovu cega je zakljuceno da su plazmidi pS50-7 i pS50-10b najverovatnije kripticni. U ponovnom ciscenju plazmida iz derivata S50-20, po istom postupku kao i za soj S50, sa vrlo slicnom frekvencom je dobijen derivat S50-20-62, ciji je plazmidni sastav ostao isti kao i u soju S50-20, ali je izgubio sposobnost sinteze bakteriocina, imunost na njega kao i sposobnost sinteze proteinaze PI tipa i katabolizma secera β -gentibioze kao i derivat S50-1 (Slika 3, 4 i 5).



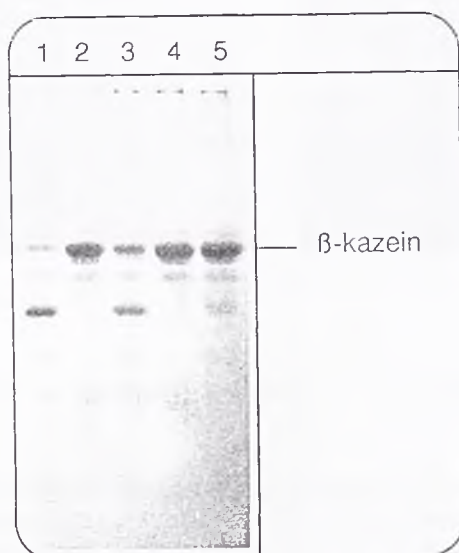
Slika 3. Plazmidni sastav soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50 i derivata dobijenih ciscenjem plazmida na 1% agaroznom gelu

1, sojS50; 2, derivat S50-1; 3, derivat S50-20; 4, derivat S50-20-62; 5, plazmidi *E. coli* V517 (cirkularni plazmidi poznatih velicina)



Slika 4. Sposobnost sinteze bakteriocina soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50 i derivata dobijenih ciscenjem plazmida.

Senzitivni soj koriscen za testiranje proizvodnje bakteriocina je *L. lactis* subsp. *cremoris* NS1 1, soj S50; 2, derivat S50-1; 3, derivat S50-20; 4, derivat S50-20-62; 5, *L. lactis* subsp. *lactis* NP45 (proizvodjac nizina-pozitivna kontrola); 6, *L. lactis* subsp. *cremoris* NS1 (negativna kontrola)

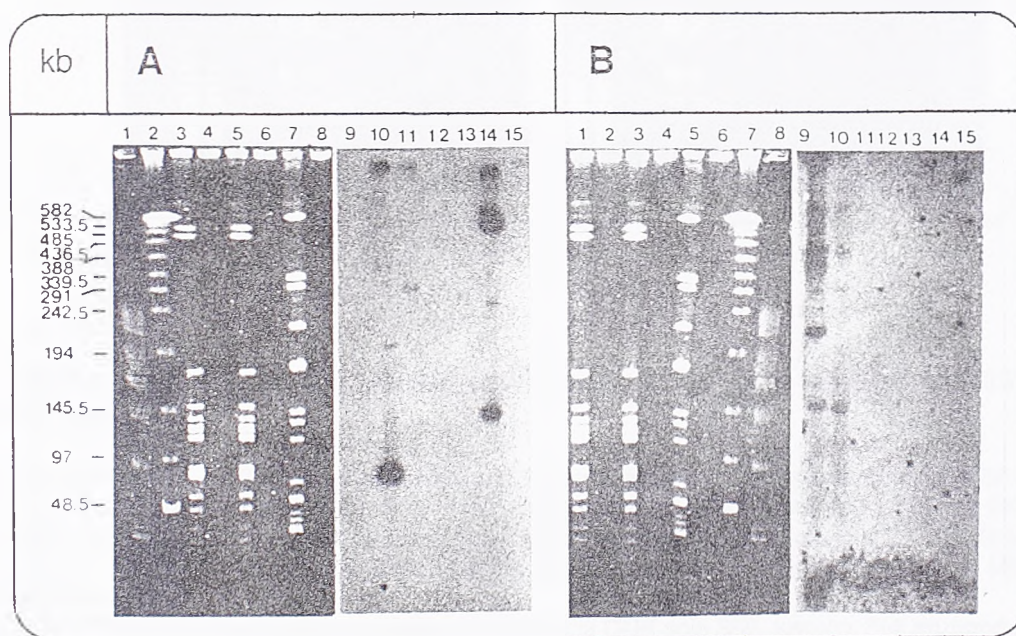


Slika 5. Sposobnost hidrolize β -kazeina soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50 i derivata dobijenih ciscenjem plazmida analizirana na SDS-PAGE

1, soj S50; 2, derivat S50-1; 3, derivat S50-20; 4, derivat S50-20-62; 5, supstrat β -kazein

Na osnovu ovih rezultata zakljuceno je da su geni za sva tri fenotipska karaktera locirani na jedinstvenom genetiickom elementu, bilo velikom plazmidu ili transpozonu, posto se u dva nezavisna eksperimenta ciscenja plazmida gube istovremeno sva tri kao vezani geni. Hibridizacionim eksperimentima sa digeriranom totalnom i plazmidnom DNK, u kojima su kao probe korisneci delovi proteinaznog gena (probe Q₁, Q₆ i Q₉₂) i inserciona sekvenca ISS1 koja je locirana uz proteinazni gen kod Prt plazmida laktokoka (ISS1 W iz plazmida pRL12 proba), potvrđeno je prisustvo ovih gena u sojevima koji su fenotipski Prt⁺ (S50 i S50-20), ali sto se tice blize lokacije gena nisu se mogli dati definitivni zakljucici (Kojic, 1992).

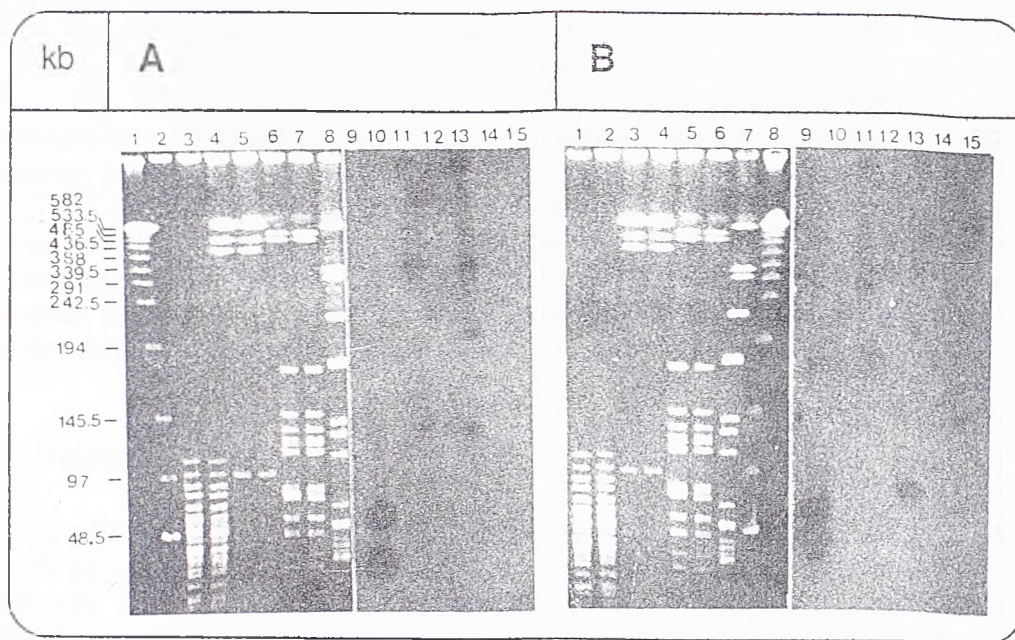
Koriscenjem elektroforeze u pulsirajuem polju (PFGE) za razdvajanje velikih fragmenata genomske DNK, dobijenih digestijom *Sma*I enzimom, soja S50 i derivata dobijenih ciscenjem plazmida (S50-1, S50-20 i S50-20-62) i hibridizacije sa probama za *prt* gen i ISS1 insercionu sekvencu (Slika 6 i 7), ustanovljeno je da su geni za sintezu bakteriocina S50, za rezistenciju na njega kao i sposobnost sinteze proteinaze PI tipa i katabolizma secera β-gentibioze locirani na cirkularnom ekstrahromozomalnom elementu (plazmidu) velicine oko 290kb (pS50-290).



Slika 6. Southern hibridizacija sa probom za ISS1 W insercioni element (A) i proteinaznom probom Q₆ (B)

(A) Od 1-8 PFGE, a od 9-15 autoradiografija: 1, ccc standard od 2-16Kbp; 2 i 9, λ-konkatameri; 3 i 10, totalna DNK soja S50, secena *Sma*I enzimom; 4 i 11, totalna DNK soja S50, neseccena; 5 i 12, totalna DNK derivata S50-1, secena *Sma*I enzimom; 6 i 13, totalna DNK derivata S50-1, neseccena; 7 i 14, totalna DNK soja MG1614, secena *Sma*I enzimom; 8 i 15, totalna DNK soja MG1614, neseccena.

(B). Od 1-8 PFGE, a od 9-15 autoradiografija. 1 i 9, totalna DNK soja S50, secena *Sma*I enzimom; 2 i 10, totalna DNK soja S50, neseccena; 3 i 11, totalna DNK derivata S50-1, secena *Sma*I enzimom; 4 i 12, totalna DNK derivata S50-1, neseccena; 5 i 13, totalna DNK soja MG1614, secena *Sma*I enzimom; 6 i 14, totalna DNK soja MG1614, neseccena; 7 i 15, λ-konkatameri; 8, ccc standard od 2-16Kbp.



Slika 7. Southern hibridizacija sa proteinaznom probom Q₆ (A) i probom za ISS1 insercioni element (B).

(A). Od 1-8 PFGE, a od 9-15 autoradiografija. 1, λ-konkatameri; 2 i 9, totalna DNK soja S50, secena *Bgl*I enzimom; 3 i 10, totalna DNK derivata S50-1, secena *Bgl*I enzimom; 4 i 11, totalna DNK soja S50, secena *Not*I enzimom; 5 i 12, totalna DNK derivata S50-1, secena *Not*I enzimom; 6 i 13, totalna DNK soja S50, secena *Sma*I enzimom; 7 i 14, totalna DNK derivata S50-1, secena *Sma*I enzimom; 8 i 15, totalna DNK soja MG1614, secena *Sma*I enzimom.

(B). Od 1-8 PFGE, a od 9-15 autoradiografija. 1 i 9, totalna DNK soja S50, secena *Bgl*I enzimom; 2 i 10, totalna DNK derivata S50-1, secena *Bgl*I enzimom; 3 i 11, totalna DNK soja S50, secena *Not*I enzimom; 4 i 12, totalna DNK derivata S50-1, secena *Not*I enzimom; 5 i 13, totalna DNK soja S50, secena *Sma*I enzimom; 6 i 14, totalna DNK derivata S50-1, secena *Sma*I enzimom; 7 i 15, totalna DNK soja MG1614, secena *Sma*I enzimom; 8, λ-konkatameri.

Da se radi o ekstrahromozomalnom elementu može se zaključiti na osnovu broja DNK fragmenata dobijenih digestijom totalne DNK izolovane *in-situ* i razdvojene elektroforezom u pulsirajućem polju soja S50 i njegovog derivata S50-1, gde se vidi razlika samo u broju DNK fragmenata (ekstra DNK fragmenti) na kojima se nalaze geni homologni korišćenim probama (Slika 6 i 7). Ukoliko bi se radilo o hromozomalno lociranom elementu, kao što su konjugativni transpozoni, razlike u sojevima bi se manifestovale ne samo u broju već i u veličini DNK fragmenata, odnosno derivati (S50-1 i S50-20-62) koji su izgubili gene za sintezu bakteriocina S50 i proteinaze PI tipa, odnosno transpozona, posedovali bi skraćeni hromozom za veličinu izgubljenog konjugativnog transpozona (Dodd *et al*, 1990; Horn *et al*, 1991).

3. Analiza velikog plazmida pS50-290

Plazmid pS50-290 je cirkularan plazmid, što se može zaključiti na osnovu analize nedigerirane totalne DNK soja S50 izolovane *in-situ* i hibridizacije sa koriscenim probama gde se konstatuje veći broj formi ovog plazmida, koje mogu postojati samo ukoliko je plazmid cirkularan (Slika 6: A 4 i 11; B 2 i 10). Koristeći metode za izolaciju velikih cirkularnih plazmida kako iz laktokoka (Anderson and McKay, 1983) tako i iz drugih srodnih ili udaljenih vrsta bakterija (Wheatcroft and Williams, 1981), u cilju izolacije velikog plazmida pS50-290 za njegovu detaljniju analizu, pokazalo se da ovaj plazmid nije moguće izolovati kao celovit molekul u okviru plazmidne DNK, tako da je analiza pS50-290 plazmida uradjena koristeći digestije *in-situ* izolovane totalne DNK i razdvajanjem dobijenih fragmenata elektroforezom u pulsirajućem polju (PFGE). S obzirom da je plazmid pS50-290 analiziran u okviru totalne DNK soja S50 u svim eksperimentima paralelno je koriscen kao kontrola derivat S50-1 čiji se genom prema rezultatima hibridizacije razlikuje samo po odsustvu plazmida pS50-290.

3. 1. Velicina plazmida

Plazmid pS50-290 je veliki plazmid i najverovatnije se nalazi u jednoj ili dve kopije po celiji, tako da se očekuje da fragmenti digerirane plazmidne DNK na gelu (PFGE) budu nešto jačeg intenziteta od fragmenata hromozomalne DNK. Velicina plazmida pS50-290 bila bi jednaka zbiru svih fragmenata digerirane DNK koji su prisutni u soju S50, a odsutni u njegovom derivatu S50-1. Za preciznije određivanje velicine plazmida bilo je potrebno izabrati (pronaci) restrikcioni enzim koji ga linearizuje ili ga sece na malom broju mesta. Restrikcioni enzim koji linearizuje plazmid pS50-290 nije pronadjen, ali se pokazalo da je za određivanje velicine plazmida pogodan enzim *SmaI*. Enzim *SmaI* sece plazmid pS50-290 na dva mesta dajući pri tome dva fragmenta DNK velicine od 210kb i 80kb. Problem u određivanju velicine nastao je iz razloga što se fragment od 210kb ne vidi na PFGE agaroznom gelu, mada bi teorijski trebalo da bude jačeg intenziteta od trake koja potice od fragmenta od 80kb, koji se dobro vidi na istom gelu (Slika 6 i 7). Prisustvo fragmenta od 210kb konstatovano je hibridizacijom sa *prt* probom (Q₆), dok fragment od 80kb hibridizuje sa *ISS1* probom od 1700bp. U hibridizaciji sa *prt* probom (Q₆) veći deo signala nalazi se u nivou bunarcica, a manji u nivou 210kb, što govori da fragment od 210kb u najvećoj meri zaostaje u bunarcicu te se i ne vidi na gelu (Slika 6 i 7). Zaostajanje fragmenta od 210kb najverovatnije nastaje usled vezivanja proteina za njega. Pokazalo se da je protein (proteini) koji je vezan za ovaj fragment DNK rezistentan na proteinazu K i pronazu E. Na osnovu *SmaI* digestije plazmida pS50-290 može se tvrditi da je on najverovatnije velicine oko 290kb. U digestijama restrikcionim enzimima koji cesce seku i koriscenjem specifičnih proba koje poseduju homologe sekvence na plazmidu pS50-290 (Q₁ i Q₉₂-proteinazne probe, *ISS1* W proba za insercioni element iz plazmida pRL12 i *LcnA* proba za bakteriocinski gen iz plazmida pON7) pokazano je da se dobijaju sledeći specifični fragmenti DNK poreklom iz plazmida pS50-290: *NcoI* (140 + 50 = 190kb), *BamHI* (60 + 40 + 35 + 30 + 10 + 12 = 187kb), *BglI* (65 + 40 + 30 + 25 = 160kb), *KpnI* (65 + 50 + 35 + 7 = 157kb), iz kojih se može preklapati samo oko 190kb plazmida pS50-290. Svi ovde navedeni enzimi seku DNK dosta cesce od *SmaI* enzima, tako da je tesko sa navedenim probama preklapati celokupnu velicinu plazmida dobijenu u *SmaI* digestiji, ali su i velicine od 157-192kb zadovoljavajuće (55-65%) posto su u hibridizaciji koriscene probe (velicine oko 1kb) i to samo za tri gena. Enzimi koji prepoznaju sekvencu od više nukleotida i koji redje seku DNK kao što je *NotI* ne seku plazmid pS50-290. Stoga rezultat dobijen na osnovu *SmaI* digestije plazmida pS50-290 daje osnovu da se preliminarno zaključuje

da je ovaj plazmid velicine oko 290kb i da poseduje dva *Sma*I restrikciona mesta.

3. 2. Restrikciona mapa i lokacija gena na plazmidu pS50-290

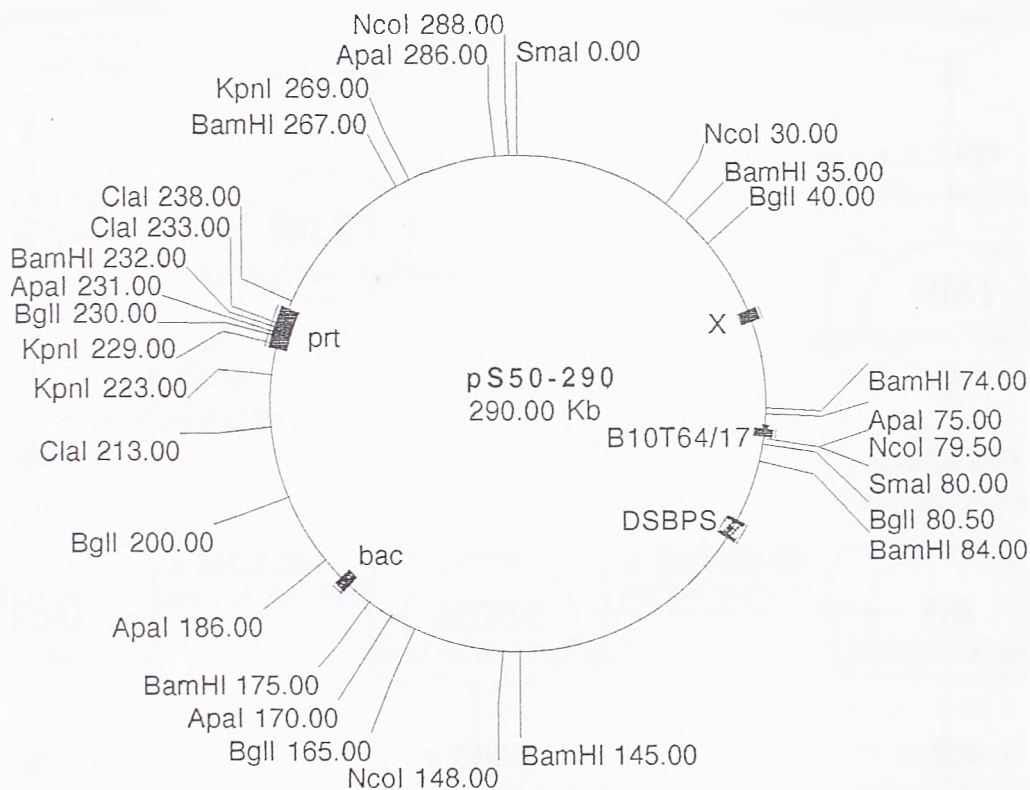
Restrikciona mapa plazmida pS50-290 i lokacija gena na njemu uradjena je na osnovu totalnih digestija jednim (*Sma*I, *Bam*HI, *Kpn*I, *Nco*I, *Apa*I, *Bgl*II, *Cl*aI) ili sa dva restrikciona enzima (*Sma*I-*Bam*HI, *Bam*HI-*Nco*I, *Kpn*I-*Nco*I, *Sma*I-*Nco*I), zatim na osnovu parcijalnih digestija jednim restrikcionim enzimom (*Bam*HI), razdvajanjem fragmenata elektroforezom u pulsirajucem polju i hibridizacijom sa vec pomenutim probama (Q_1 i Q_{92} -proteinazne probe, ISS1 W proba za insercioni element iz plazmida pRL12 i *LcnA* proba za bakteriocinski gen iz plazmida pON7). Mapiranje proteinaznog i bakteriocinskog gena koji se nalaze na *Nco*I fragmentu od 140kb (obe probe hibridizuju sa ovim fragmentom) je provereno i mapiranjem samog eluiranog *Nco*I fragmenta od 140kb. Ovu eluciju je bilo moguće uraditi bez kontaminacija drugim fragmentima DNK posto se *Nco*I fragment od 140kb na gelu nalazi izdvojen iznad svih ostalih fragmenata, kako plazmidne tako i hromozomalne DNK. Elucija je radjena isecanjem agaroznog bloka koji je sadrzavao fragment DNK od 140kb i dalji postupci sa ovim fragmentom su radjeni direkno u samom agaroznom bloku koji je dijaliziran u vodi da bi se oslobodio jona pufera za elektroforezu. Eluirani *Nco*I fragment u agarozu je zatim digeriran drugim restrikcionim enzimima (*Bgl*II, *Bam*HI, *Kpn*I, *Cl*aI, *Apa*I i *Sma*I), a potom dobijeni fragmenti DNK su razdvajani na elektroforezi u pulsirajucem polju i hibridizovani sa probama za proteinazni (Q_1 i Q_{92}) i bakteriocinski gen (*LcnA*). Upoređivanjem velicine fragmenata, koji hibridizuju sa navedenim probama, dobijenih secenjem *Nco*I fragmenta od 140kb sa velicinom fragmenata dobijenih secenjem celog plazmida istim restrikcionim enzimom odredjen je relativni položaj i medjusobna udaljenost gena za sintezu proteinaze PI tipa i bakteriocina S50 na ovom fragmentu. Fragment koji povezuje ova dva gena i ujedno determinise njihovu maksimalnu udaljenost je *Bam*HI fragment od oko 40kb. Prilikom mapiranja insercione sekvence ISS1 na plazmidu pS50-290 uz pomoc ISS1 W probe od 1700bp iz plazmida pRL12, ustanovljeno je da region koji hibridizuje sa plazmidom pS50-290 ne pripada samoj insercionoj sekvenci vec nizvodnom regionu u okviru probe iz cega je zakljuceno da plazmid pS50-290 ne poseduje ISS1 insercionu sekvencu. Posto nije poznato sta se nalazi u regionu ISS1 W probe koji hibridizuje sa plazmidom pS50-290, konstruisane su dve probe *Rsa*I-*Rsa*I od 500bp nazvana XRR05 i *Rsa*I-*Hind*III od 200bp nazvana XHR02, koje su koriscene u daljim hibridizacionim eksperimentima. Lokaciju regiona homolog ovim probama na plazmidu pS50-290 nije bilo moguće precizno mapirati na *Nco*I fragmentu od 50kb posto nije pronadjen restrikcioni enzim koji sece unutar samih proba, a da daje velike fragmente koji se mogu razdvojiti na PFGE. Na osnovu rezultata dobijenih u ovim eksperimentima konstruisana je preliminarna restrikciona mapa plazmida pS50-290 (Slika 8).

4. Konjugacioni eksperimenti

4. 1. Konjugativna svojstva plazmida pS50-290

Autokonjugativni ili Tra⁺ plazmidi na sebi nose celokupnu genetsku informaciju koja im omogucuje sve neophodne strukture i funkcije za konjugativni transfer u drugu celiju koja ne poseduje taj plazmid. Kod Gram pozitivnih bakterija *tra* operon je velicine oko 15kb (Krah and Marcina, 1989; Thomas and Archer, 1989; Lucey *et al.*, 1993). Plazmid pS50-290 za razliku od ostalih plazmida ovog soja (pS50-7; pS50-10a; pS50-10b cija autokonjugativnost nije

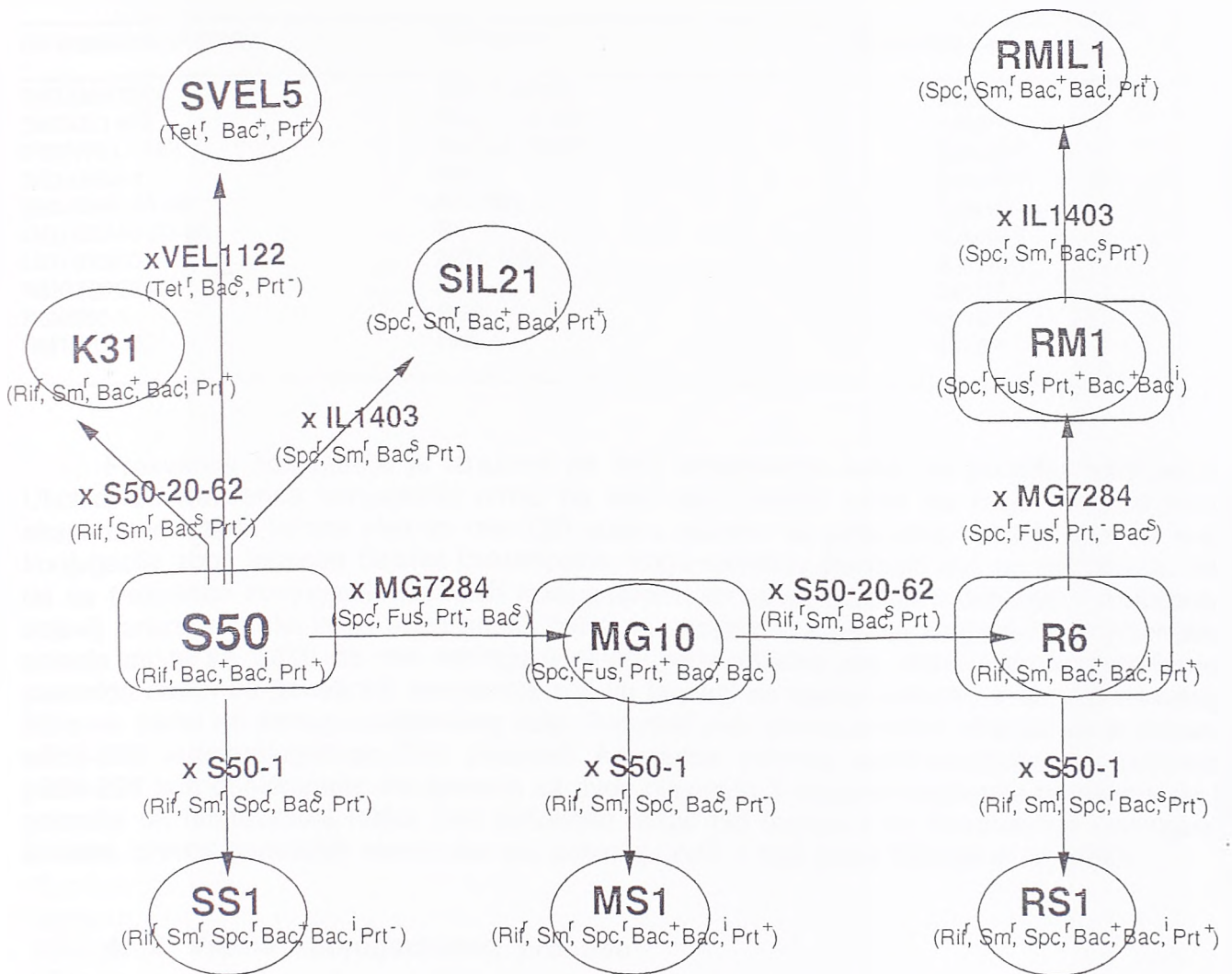
analizirana) poseduje dovoljno DNK da na sebi moze nositi ceo *tra* operon, odnosno moze biti autokonjugativan.



Slika 8. Preliminarna restrikciona mapa plazmida pS50-290 konstruisana na bazi PFGE i hibridizacija sa probama.

Crnim površinama su naznacene pozicije mapiranih gena i regiona sa kojima hibridizuju probe (prt- proteinazni gen; bac-operon za bakteriocin S50; x- region sa kojim hibridizuju XRR05 i XHR02 probe; B10T64/17-region koji hibridizuje sa probama B10T64 i B10T17 kloniranih sa *Bam*HI fragmenta velicine10kb iz tog regiona. Zasencenom površinom je naznacena moguća pozicija vezivanja proteina (DSBPS50- double strand binding protein S50)

Plazmid pS50-290 na sebi nosi gene za koje se moze vršiti selekcija [sposobnost katabolizma secera β -gentibioze (API 50CH-S, API System S. A.; Montelieu-Vercieu, France) i rezistencija ili imunost na bakteriocin S50] tako da su oni mogli biti iskorisceni kao selekcionni marker pri prenosu plazmida pS50-290 u konjugacionim eksperimentima. Kao selektivni marker u svim konjugacionim ukrstanjima koriscena je rezistencija na bakteriocin S50. Soj S50 je konjugiran sa vecim brojem recipijentnih sojeva laktokoka (MG7284, IL1403, S50-1, S50-20-62 i VEL1122)(Slika 9).



Slika 9. Shema konjugacionih ukrstanja

Kvadratima su uokvireni donorski sojevi; krugovima su uokvireni konjuganti; recipijentni sojevi nisu uokvireni.

U konjugaciji je koriscen veci broj recipijentnih sojeva da bi se ustanovile eventualne razlike u frekvenci konjugacije zavisne od donorsog i recipijentnog soja koje bi ukazivale na konjugativna svojstva plazmida pS50-290. Rezultati konjugacija sa razlicitim donorima i recipijentima su pokazale da postoje minimalne varijacije u frekvenci konjugacije (Tabela 2).

Tabela 2. Prikaz konjugacionih ukrstanja razlicitih donora i recipijenata

Konjugaciona ukrstanja	Konjuganti	Frekvencija konjugacije
S50XMG7284	MG10, MG13	3×10^{-7}
S50XIL1403	SIL21, SIL102	1×10^{-7}
S50XVEL1122	SVEL5, SVEL11	$2,5 \times 10^{-7}$
S50XS50-1	SS1	$2,7 \times 10^{-7}$
S50XS50-20-62	K6, K31	$1,5 \times 10^{-7}$
MG10XS50-20-62	R6	$3,5 \times 10^{-7}$
MG10XS50-1	MS1, MS3	$2,8 \times 10^{-7}$
R6XMG7284	RM1	3×10^{-7}
R6XS50-1	RS6	2×10^{-7}
RM1XIL1403	RMIL1	5×10^{-8}

Frekvencija konjugacije je izražena na broj recipijentnih ćelija na početku konjugacije. Ukoliko se frekvencija konjugacije izrazi na broj recipijentnih ćelija na kraju konjugacionog eksperimenta tada je ona viša za oko 100 puta u odnosu na prikazano. Ona je viša na kraju konjugacije zbog letalnog dejstva bakteriocina, koga sintetise donorski soj, na recipijenta. Bilo da se frekvencije konjugacije razlicitih konjugacionih kroseva, (razliciti i donorski i recipijentni sojevi) izražene preko broja recipijentnih ćelija na početku ili na kraju konjugacije, medjusobno porede može se videti da one variraju u okviru reda velicine sto ukazuje da konjugativnost plazmida zavisi od genetskih elemenata koji su locirani na njemu samom, a da najverovatnije bitno ne zavisi od samog recipijentnog soja. Rezultati ovih eksperimenata ukazuju da je plazmid pS50-290 autokonjugativan *Tra*⁺ plazmid. Apsolutna potvrda autokonjugativnosti plazmida pS50-290 bila bi kloniranje *tra* operona sa ovog plazmida ili njegovo mapiranje na njemu, jer je poznato da fertilizacioni faktor kod laktokoka može biti lociran i na hromozomu i omogućiti *in-trans* prenos genetskih elemenata koji poseduju *oriT* i *mob* gene (Bringel *et al*, 1992).

4. 2. Vreme konjugacionog prenosa

U cilju dobijanja eventualnih skracenih formi plazmida pS50-290 radi mapiranja gena na njemu i odredjivanja smera prenosa plazmida u konjugaciji, radjena je prekinuta konjugacija. U ovom eksperimentu je kao recipijent koriscen soj VEL1122, dok je duzina trajanja konjugacije varirala od 4-24 casa, a selekcija je i ovoga puta bila rezistencija na bakteriocin. Konjuganti su dobijeni i nakon 4^h konjugacije (sa frekvencom $1,25 \times 10^{-7}$), ali frekvencija konjugacije je bila najvisa nakon 8^h trajanja konjugacije ($2,5 \times 10^{-7}$), a zatim je opadala [2×10^{-7} (12h); $1,25 \times 10^{-7}$ (16h); 1×10^{-7} (24h)]. Analizom dobijenih konjuganata nakon 4^h konjugacije ustanovljeno je da su oni primili plazmid iste velicine kao i konjuganti koji su dobijeni u konjugaciji koja je trajala 8, 12, 16 i 24 casa. Na osnovu ovih rezultata može se zakljuciti da ceo plazmid pS50-290 može da se konjugira za 4^h u recipijentnu ćeliju. Medju analiziranim konjugantima nisu nadjeni derivati koji bi posedovali plazmid skracene velicine sto ukazuje da najverovatnije nije moguće dobiti skracenu verziju plazmida pS50-290.

4. 3. Analiza konjuganata

Kao što je već rečeno selekcija za konjugante u svim konjugacionim ukrstanjima bila je rezistencija na bakteriocin S50, tako da su svi izolovani konjuganti morali posedovati genetičke determinante za rezistenciju na bakteriocin S50. Konjuganti su dalje proveravani da li poseduju i ostala svojstva vezana za plazmid pS50-290 (sinteza bakteriocina, proteinaze PI tipa i sposobnost katabolizma secera β -gentibioze). Pored analize konjuganata za fenotipsku ekspresiju gena koji su u konjugaciji preneti uradjena je i analiza plazmidnog sastava: a) plazmida izolovanih klasičnim metodama izolacije (Slika 10), na osnovu koje je konstatovana mogućnost koprenosa ostalih plazmida soja S50 i b) elektroforezom u pulsirajućem polju (PFGE). Hibridizacijom sa probama za proteinazni (probe Q₁, Q₆, Q₉₂) i bakteriocinski (proba LcnA operon iz plazmida pON7) gen, zatim sa XRR05 i XHR02 probama i sa plazmidom pS50-7 kao probom ispitivano je da li su ili nisu preneti pojedini geni i homologe sekvence probama u recipijentne ćelije. Upoređenjem rezultata dobijenih hibridizacijom i drugim metodama analize moglo se čak pratiti da li prilikom konjugacije dolazi do promena aktivnosti nekih od gena (tj. da su geni prisutni, a da je njihova fenotipska ekspresija odsutna ili smanjena).

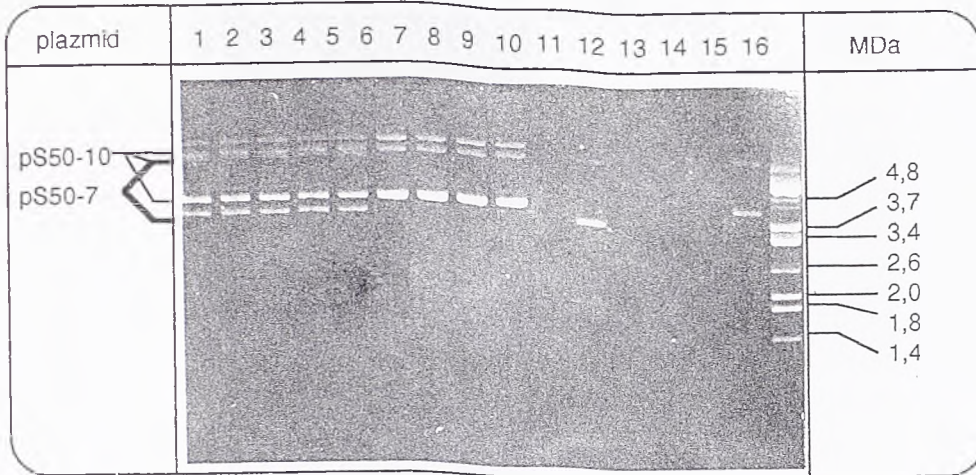
4. 3. 1. Plazmidni sastav konjuganata

Soj S50 i derivati nastali ciscenjem plazmida (S50-1, S50-20 i S50-20-62) poseduju plazmide (Slika 1). Ostali sojevi korisćeni kao recipijenti u konjugaciji (MG7284, IL1403 i VEL1122) ne poseduju plazmide. Izbor sojeva koji ne poseduju plazmide za recipijente u konjugaciji izvršen je da bi analiza konjuganata bila, lakša jer u tom slučaju svi plazmidi koji se nađu u konjugantu poticu iz donorske ćelije. Analizom plazmidnog sastava konjuganata ustanovljeno je da se plazmidi pS50-7 i pS50-10b takodje mogu preneti konjugacijom u recipijentni soj, odnosno ovi plazmidi su pasivno prenosni jer najverovatnije poseduju samo gene za *oriT* i Mob protein. Plazmid pS50-7 biva u visokoj frekvenci prenet samo u soj MG7284 [svi analizirani konjuganti iz dva nezavisna konjugaciona ukrstanja S50xMG7284 su posedovali plazmid pS50-7 (iz oba ukrstanja testirano je po 14 konjuganata)], dok u ostalim sojevima nije konstatovan prenos ovog plazmida u procesu konjugacije plazmida pS50-290. Prilikom konjugacije, takodje, biva prenesen i plazmid pS50-10b u sojeve IL1403 (SIL102 sa frekvencom 30%; tri konjuganta od deset analiziranih su ga posedovali) i VEL1122 (SVEL11 sa frekvencom 7%; jedan konjugant od cetnaest analiziranih ga je posedovao) (Slika 10).

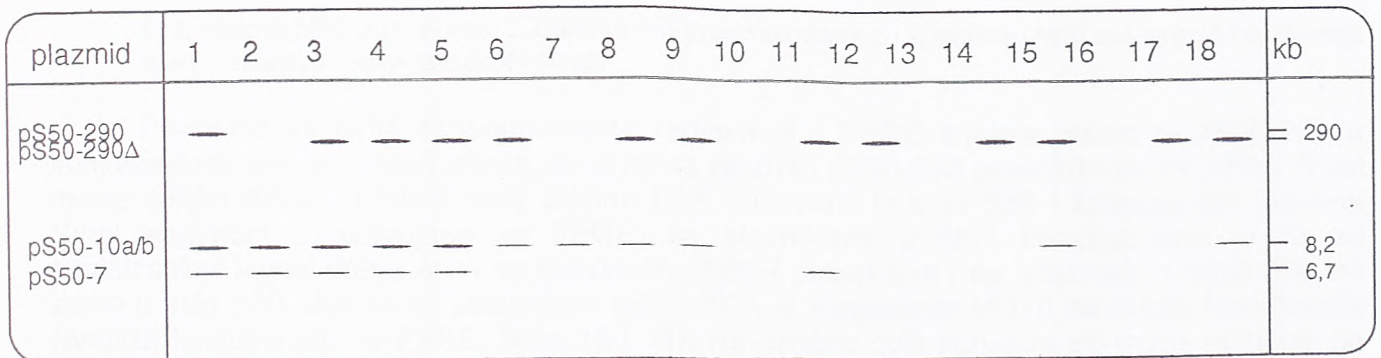
Konjuganti soja MG7284

Konjuganti soja MG7284 dobijeni su iz dva konjugaciona ukrstanja (S50xMG7284 i R6xMG7284)(Slika 9). U konjugacionom ukrstanju dobijeni konjuganti (MG10 i MG13) su posedovali pored plazmida od 290kb i plazmid od 6,7kb koji je izolovan klasičnim metodama izolacije plazmida (Slika 10).

A)



B)

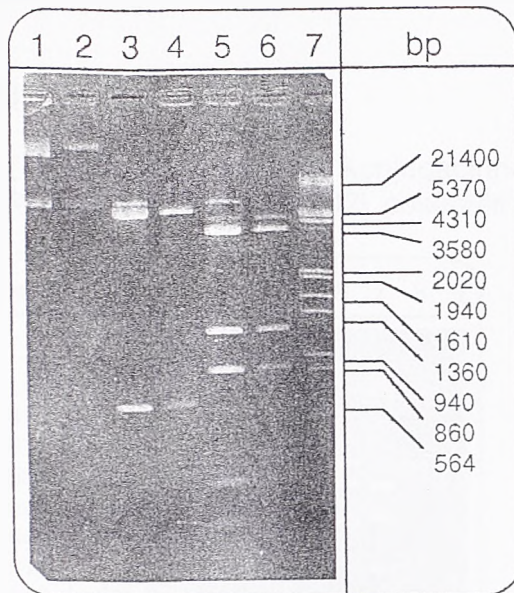


Slika 10. Plazmidni sastav konjuganata analiziran na 1% agaroznom gelu (A) i sematski prikaz svih plazmida soja S50 u konjugantima i derivatima dobijenim ciscenjem plazmida (B)

(A). 1, soj S50; 2, derivat S50-1; 3, konjugant SS1; 4, konjugant MS1; 5, konjugant RS6; 6, derivat S50-20; 7, derivat S50-20-62; 8, konjugant R6; 9, konjugant K31; 10, soj MG7284; 11, konjugant MG10; 12, konjugant RM1; 13, soj IL1403; 14, konjugant SIL21; 15, konjugant SIL102; 16, plazmidi *E. coli* V517

(B). 1, soj S50; 2, derivat S50-1; 3, konjugant SS1; 4, konjugant MS3; 5, konjugant RS6; 6, derivat S50-20; 7, derivat S50-20-62; 8, konjugant R6; 9, konjugant K31; 10, soj MG728; 11, konjugant MG10; 12, konjugant RM1; 13, soj IL1403; 14, konjugant SIL21; 15, konjugant SIL102; 16, soj VEL1122; 17, konjugant SVEL5; 18, konjugant SVEL11

Restrikcijom analizom plazmida od 6,7kb izolovanog iz konjuganta MG10 i plazmida pS50-7 iz donorskog soja S50, ustanovljeno je da ova dva plazmida poseduju identicnu restrikcijonu semu. Stoga je i plazmid od 6,7kb izolovan iz konjuganta MG10, takodje nazvan pS50-7 (Slika 11).



Slika 11. Restrikciona analiza plazmida pS50-7 izolovanog iz soja S50 (1, 3 i 5) i konjuganta MG10 (2, 4 i 6)

1 i 2, plazmid pS50-7 (1, eluiran; 2, izolovan mini prep metodom); 3 i 4, digestija *NcoI* enzimom; 5 i 6, digestija *HpaII* enzimom; 7, λ -standard *EcoRI-HindIII*

Paralelno sa ovim eksperimentima radjena je i PFGE analiza plazmida pS50-290 u konjugantima gde je ustanovljeno da u njima plazmid pS50-290 poseduje samo jedno *SmaI* mesto (pS50-290 Δ). U hibridizaciji totalne DNK izolovane iz soja S50 i konjuganata (secene *SmaI* enzimom i razdvojene na PFGE) sa plazmidom pS50-7 konstatovano je da se hibridizacioni signal dobija osim sa slobodnim pS50-7 plazmidom i sa plazmidom pS50-290, ali samo u soju S50, dok se sa plazmidom pS50-290 Δ iz konjuganta MG10 ne dobija hibridizacija (Analiza konjuganata na PFGE; Slika 15 i 18). Na osnovu ovih rezultata se moze zakljuciti da postoji eventualna mogucnost da plazmidi pS50-7 i pS50-290 grade stabilan kointegrat, gde plazmid pS50-7 doprinosi svojim *SmaI* restrikcionim mestom postojanju dva *SmaI* mesta u plazmidu pS50-290 prisutnom u originalnom soju S50 (odnosno plazmid pS50-7 postoji i kao integrisan u plazmid pS50-290 i kao slobodan u soju S50). Konjugant RM1 iz konjugacionog ukrstanja R6xMG7284 ne poseduje male plazmide, a i ostali analizirani konjuganti iz ovog konjugacionog ukrstanja, sto govori da se koprenos drugih plazmida soja S50 najverovatnije ne odvija u konjugaciji sa sojem MG7284.

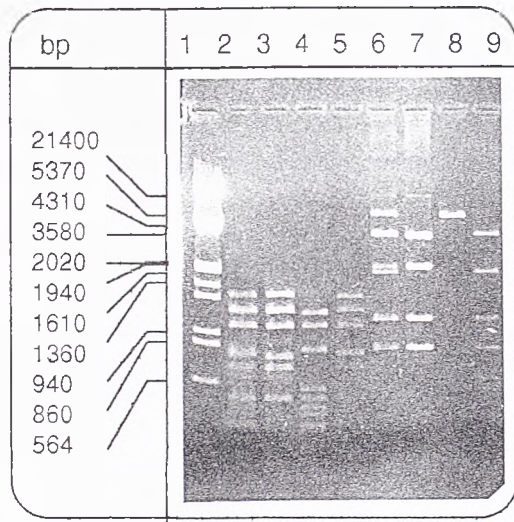
Konjuganti derivata soja S50

Kao sto je vec receno soj S50 poseduje cetiri plazmida pS50-7, pS50-10a, pS5010b i pS50-290, od kojih se samo prva tri mogu izolovati klasicnim metodama izolacije plazmida. Derivat S50-1 ne poseduje samo plazmid pS50-290, a S50-20 ne poseduje plazmid pS50-7, dok S50-20-62 ne poseduje plazmide pS50-7 i pS50-290 (Slika 10). Klasicnim metodama izolacije plazmida ustanovljeno je da konjuganti SS1, MS1, MS3 i RS1 (derivata S50-1) i R6 i K31 (derivata S50-20-62) poseduju isti plazmidni sastav kao i sam recipijent (Slika 10). U

konjuganti derivata S50-20-62 nije konstatovano prisustvo plazmida pS50-7. Ovim je pokazano da prenos plazmida od 6,7kb nije moguc unutar iste geneticke osnove (S50-20-62 nije povratio plazmid pS50-7).

Konjuganti soja IL1403

Vecina konjuganata (70%) soja IL1403 iz konjugacionog ukrstanja S50xIL1403 ne poseduje "male" plazmide (SIL21), dok 30% (SIL102) poseduje plazmid pS50-10b (Slika 10 i 12).



Slika 12. Restrikciona analiza plazmida soja S50 (2 i 6), derivata S50-20-62 (3 i 7) i konjuganata MG10 (4 i 8) i SIL102 (5 i 9)

1, λ -standard *EcoRI-HindIII*, 2-5, digestija *TaqI* enzimom; 6-9, digestija *EcoRI* enzimom

Plazmid pS50-10b najverovatnije poseduje *oriT* sekvencu i gen za Mob protein sto mu omogucava da *In-trans* funkcijama seks faktora bude prenet u recipijentnu celiju. Konjuganti iz ukrstanja RM1x IL1403 (RMIL) ne poseduju vidljive "male" plazmide.

Konjuganti soja VEL1122

Konjuganti soja VEL1122 pored velikog plazmida od 290kb poseduju u 7% slucajeva i plazmid pS50-10b (SVEL11), dok vecina ne poseduje male plazmide (SVEL5). Sema plazmidnog sastava donorskih sojeva, recipijenata i konjuganata data je na slici 10. Iz plazmidnog sastava konjuganata moze se zakljuciti da je prenos plazmida soja S50 zavisan od recipijentne celije. Moguce je da se prenos svih plazmida soja S50 u razlicite recipijente odigrava, ali da opstanak pojedinih plazmida kao nezavisnog replikona zavisi od same geneticke strukture recipijenta.

4. 3. 2. Proteoliticka svojstva konjuganata

Soj S50 sintetise proteinazu PI tipa (koja hidrolizuje samo β -kazein), koja je kodirana genima koji se nalaze na plazmidu od 290kb. Soj S50 po proteolitickoj aktivnosti, u poredjenju

sa drugim Prt⁺ sojevima, može se svrstati u sojeve sa srednje aktivnim proteinazama. Derivati soja S50 (S50-1 i S50-20-62) koji su izgubili plazmid pS50-290 ne poseduju proteinaznu aktivnost. Proteolitička aktivnost derivata S50-20 koji ne poseduje plazmide pS50-7 i pS50-10b je za oko 30-50% manja u poredjenju sa sojem S50. Recipijentni sojevi u konjugaciji (MG7284, IL1403 i VEL1122), pored toga što su senzitivni na bakteriocin, ne poseduju ni proteolitičku aktivnost.

Proteolitička aktivnost konjuganata sojeva MG7284 i VEL1122

Sojevi MG7284 i VEL1122 imaju isto poreklo (oba su derivati soja MG1363), a jedina razlika je u tome što je MG7284 markiran rezistencijom na spektinomycin i fusaricnu kiselinu, a VEL1122 je RecA⁻ derivat dobijen transpozonskom mutagenezom. Proteolitička aktivnost konjuganata MG10 i RM1 (soja MG7284) i SVEL5 i SVEL11 (soja VEL1122) je za oko deset puta veća u poredjenju sa sojem S50, bilo da su u testu aktivnosti korišćene cele ćelije ili bezćelijski ekstrakt (Slika 13).



Slika 13. Sposobnost hidrolize β -kazeina od strane celih celija konjuganata

1 i 17, supstrat β -kazein; 2, soj S50; 3, derivat S50-1; 4, konjugant SS1; 5, konjugant MS1; 6, konjugant RS6; 7, derivat S50-20; 8, derivat S50-20-62; 9, konjugant R6; 10, konjugant K31; 11, soj MG7284; 12, konjugant MG10; 13, konjugant RM1; 14, soj IL1403; 15, konjugant SIL21; 16, konjugant SIL102. Digestija kazeina je radjena 5^h na 30°C.

Povećana proteolitička aktivnost u derivatima soja MG1363 (za oko tri puta) kada se u njima eksprimira klonirani proteinazni gen, primećena je i ranije (Bruinenberg *et al*, 1992) i vezana je za genetičku osnovu ovog soja. Zasto je proteolitička aktivnost povećana za oko deset puta kada ovi sojevi poseduju plazmid pS50-290, nije trenutno moguće odgovoriti. Ono što se sa sigurnošću može tvrditi je da plazmidi pS50-7 (MG10) i pS50-10b (SVEL11) nemaju uticaja na

proteoliticku aktivnost u ovim sojevima.

Proteoliticka aktivnost konjuganata derivata soja S50

Derivati soja S50 u koje je konjugiran plazmid pS50-290 su S50-1 (rezultirajući konjuganti SS1, MS1, MS3 i RS1) i S50-20-62 (rezultirajući konjuganti R6 i K31) (Slika 9). Proteoliticka aktivnosti konjuganata u ovim sojevima su veoma razlicite, od potpunog odsustva do one koja je kao i u soju S50 (Tabela 3).

Tabela 3. Proteoliticka aktivnost derivata soja S50 i konjuganata derivata S50-1 i S50-20-62

Konjuganti/Sojevi	S50	S50-1	SS1	MS1	MS3	RS6	S50-20	S50-20-62	R6	K31
Proteoliticka aktivnost ^a	100	0	0	70-100	60	50-60	50-70	0	40	40

^a Proteoliticka aktivnost konjuganata izrazena je u procentima proteoliticke aktivnosti soja S50

Razlicito ispoljavanje proteoliticke aktivnosti u istom domacinu u zavisnosti iz kog je soja plazmid pS50-290 prenesen je za sada neobjasnjivo. Odsustvo proteoliticke aktivnosti kod konjuganta SS1 nije izuzetak jer svi analizirani konjuganti iz SS grupe (analizirano 14 konjuganata) nisu je posedovali, sto govori da je za odsustvo proteoliticke aktivnosti kod ove grupe konjuganata odgovoran tip konjugacionog ukrstanja. Detaljna analiza *prt* gena u konjugantima nije uradjena da bi se videlo da li je doslo do nekih mutacionih ili delecionih promena, koje su odgovorne za izmenjenu proteoliticku aktivnost. Uticaj drugih plazmida soja S50 na proteoliticku aktivnost i kod ovih konjuganata takodje nije primecen.

Proteoliticka aktivnost konjuganata soja IL1403

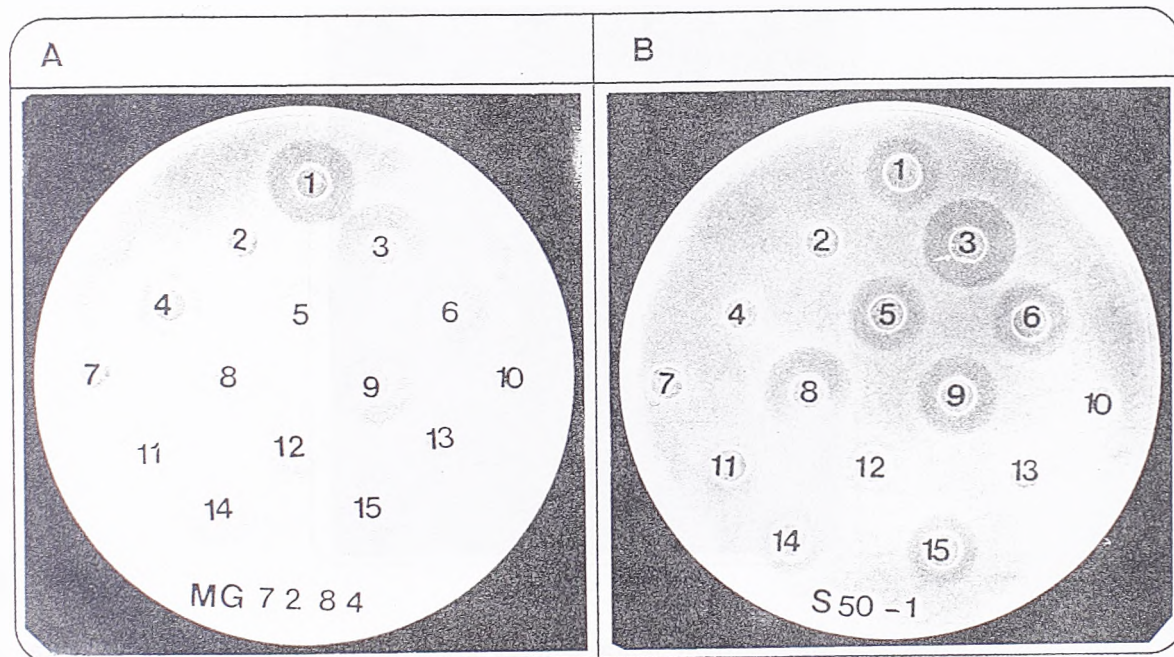
Konjuganti soja IL1403 (SIL21, SIL102 i RMIL1) medjusobno poseduju identicnu proteoliticku aktivnost koja je negde oko 30% aktivnosti soja S50. Ujednacena i smanjena proteoliticka aktivnost konjuganata u soju IL1403 je posledica geneticke osnove samog soja. Prisustvo plazmida pS50-10b u soju SIL102 nema uticaja na ekspresiju *prt* gena u ovom konjugantu (Slika 13).

4. 3. 3. Analiza sposobnosti sinteze bakteriocina u konjugantima

Soj S50 sintetise bakteriocin S50. Geni za sintezu bakteriocina i rezistencija na njega locirani su na plazmidu pS50-290, na *Bam*HI-*Ap*al fragmentu velicine oko 10kb (Slika 8). Derivati soja S50 (S50-1 i S50-20-62) koji su izgubili plazmid pS50-290 ne sintetisu bakteriocin S50 (Slika 4), a i senzitivni su na njega. Recipijentni sojevi korisceni u konjugaciji (MG7284, IL1403 i VEL1122) su takodje senzitivni na bakteriocin S50.

Selekcija konjuganata u konjugaciji je bila za imunost na bakteriocin S50, tako da su svi dobijeni konjuganti rezistentni na njega. Sto se tice sposobnosti sinteze bakteriocina (koja je merena precnikom zone inhibicije senzitivnih sojeva u testu bakteriocinske aktivnosti) konjuganti pokazuju razlicite sposobnosti (Slika 14). Konjuganti sojeva MG7284 i VEL1122 sintetisu nesto manju kolicinu bakteriocina od soja S50. Medjusobna razlika izmedju konjuganata u ovim

sojevima (MG10, RM1, SVEL5 i SVEL11) nije primećena. Bakteriocinska aktivnost konjuganata u soju IL1403 (SVEL21, SVEL102 i RMIL1) je nešto viša od bakteriocinske aktivnosti konjuganata u derivatima soja MG1363, ali niža od aktivnosti u soju S50. Razlika u bakteriocinskoj aktivnosti između konjuganata IL1403 grupe također nije primećena. Konjuganti u derivatima S50-1 i S50-20-62 pokazuju međusobne razlike. Konjugant MS1 sintetise malu količinu bakteriocina, mnogo manju od svih konjuganata, koji inhibira rast soja MG7284, a ne inhibira rast soja S50-1. Konjuganti SS1 i RS1 sintetise veću količinu bakteriocina i od soja S50. Ostali konjuganti sintetise bakteriocin u približno istoj količini kao i soj S50 (Slika 14).



Slika 14. Bakteriocinska aktivnost različitih konjuganata.

Senzitivni soj koriscen za testiranje proizvodnje bakteriocina je *L. lactis* subsp. *lactis* MG7284 (A) i derivat *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50-1 (B).

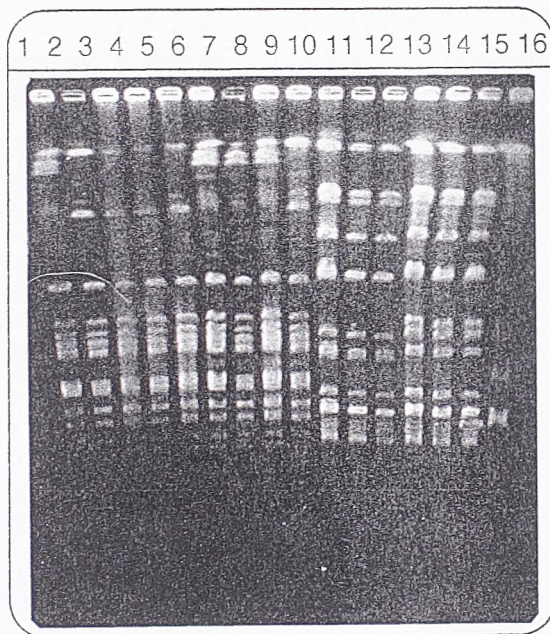
1, soj S50; 2, derivat S50-1; 3, konjugant SS1; 4, konjugant MS1; konjugant RS6 ; 6, derivat S50-20 ; 7, derivat S50-20-62; 8, konjugant R6; 9, konjugant K31; 10, soj MG7284; 11, konjugant MG10; 12, konjugant RM1; 13, soj IL1403; 14, konjugant SIL21; 15, konjugant SIL102.

4. 3. 4. Analiza konjuganata na elektroforezi u pulsirajućem polju (PFGE)

Plazmid pS50-290 nije moguće izolovati u okviru plazmidne DNK čak ni metodama za izolaciju velikih plazmida, tako da se uporedna analiza plazmida pS50-290 u soju S50 i konjugantima morala raditi na elektroforezi u pulsirajućem polju kojom se mogu razdvojiti molekuli DNK velike molekulske mase. Totalna DNK izolovana *in-situ* iz donorskih, recipijentnih sojeva i konjuganata na PFGE je nanosena nedigerirana i digerirana restrikcionim enzimima

*Sma*I, *Nco*I, *Bam*HI i *Bgl*II. Analiza recipijentnih sojeva na PFGE je radjena da bi se videlo da konjuganti poseduju identicne hromozomalne fragmente kao i recipijenti.

Enzim *Sma*I sece plazmid pS550-290 poreklom iz soja S50 na dva mesta dajuci dva fragmenta velicine 80 i 210kb. Fragment od 80kb se dobro vidi na gelu tako da se lako moze na osnovu PFGE videti da li konjuganti poseduju plazmid pS50-290 iste organizacije kao i donorski soj S50. U digestiji DNK konjuganata *Sma*I enzimom konstatovano je da kod svih ne dolazi do izdvajanja fragmenta od 80kb, a ni do pojave nekog drugog fragmenta. Pored toga *Sma*I fragment od 80kb nije moguće detektovati ni u derivatu S50-20 (Slika 15).

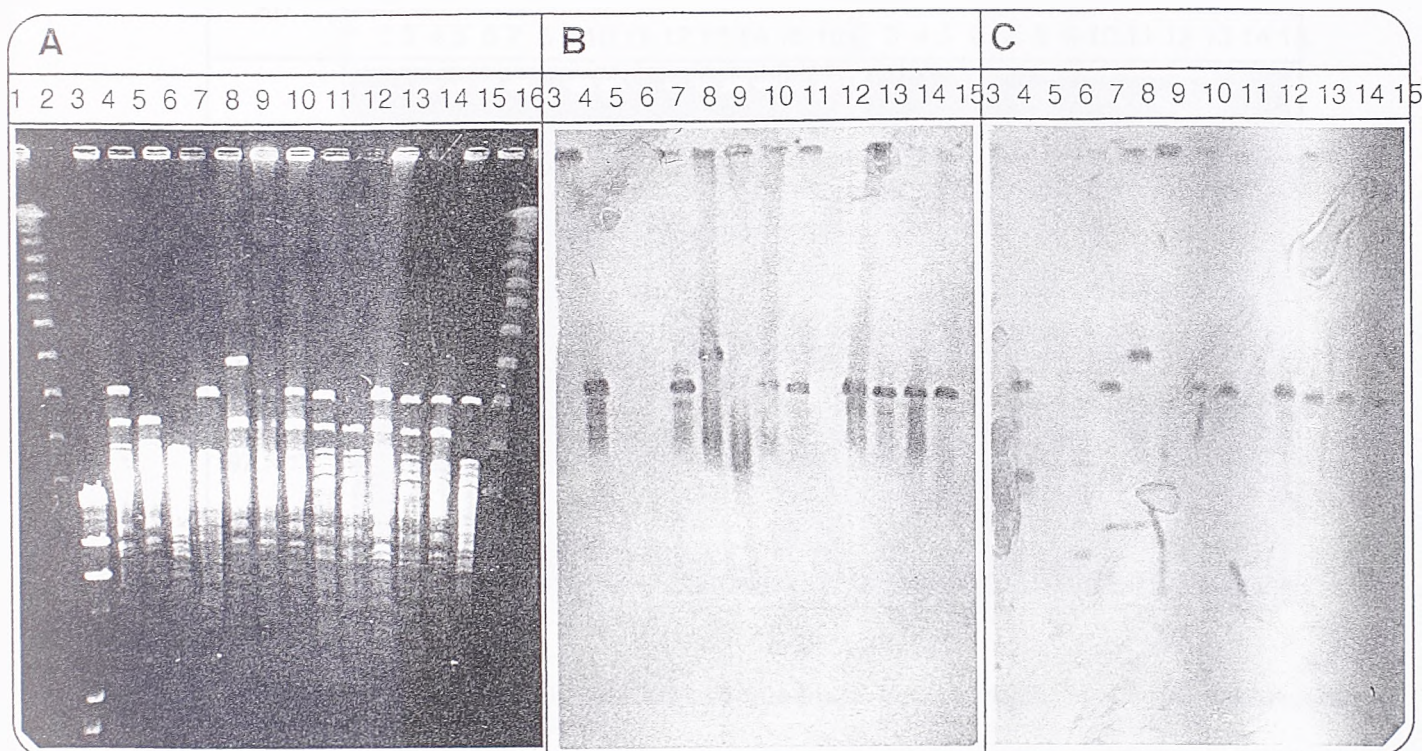


Slika 15. PFGE totalne DNK konjuganata secene *Sma*I restikcionim enzimom

1, soj S50; 2, derivat S50-1SMSP; 3, konjugant SS1; 4, konjugant MS1; 5, konjugant RS6; 6, derivat S50-20; 7, derivat S50-20-62; 8, konjugant R6; 9, konjugant K31; 10, soj MG7284; 11, konjugant MG10; 12, konjugant RM1; 13, soj IL1403; 14, konjugant SIL21; 15, konjugant SIL102; 16, λ -konkatamer

Ovi rezultati ukazuju da prilikom konjugacije ili ciscenja plazmida naverovatnije dolazi do gubljenja regiona velicine nekoliko kilobaza u okolini *Sma*I restikcionog mesta, za koji je kasnije pokazano da je homolog plazmidu pS50-7, tako da rezultujuci plazmid je nesto kraci i poseduje samo jedno *Sma*I mesto. To sto se linearizovan skracen pS50-290 ne vidi na gelu je posledica toga sto ga zadrzava protein u bunarcicu kao i *Sma*I fragment od 210kb (Slika 6 i 7). U slucaju plazmida pS50-290 iz soja S50 dolazi do retardacije *Sma*I fragmenta od 210kb, a u konjugantima zaostaje linearizovan ceo plazmid. Da bi se potvrdilo da je u konjugantima prisutan pS50-290 plazmid uradjena je digestija DNK konjuganata *Nco*I enzimom u kojoj dolazi do izdvajanja fragmenta od 140kb na kome se nalaze proteinazni i bakteriocinski geni. U digestiji sa *Nco*I enzimom je pokazano da svi konjuganti poseduju *Nco*I fragment od 140kb poreklom iz plazmida pS50-290. Izuzetak je konjugant MS1 gde digestija *Nco*I enzimom daje DNK fragment velicine 170kb poreklom iz plazmida pS50-290 (Slika 16 i 17). Na osnovu ovih rezultata moze se zakljuciti da svi konjuganti, sem MS1, najverovatnije poseduju skraceni

plazmid pS50-290. Moguce je da je kod konjuganta MS1 doslo do integracije fragmenta od oko 30kb u bakteriocinski gen usled cega je *NcoI* fragment otezao (ujedno i plazmid za 30kb na oko 315kb) i doveo do izmenjene sinteze bakteriocina (Slika 14).

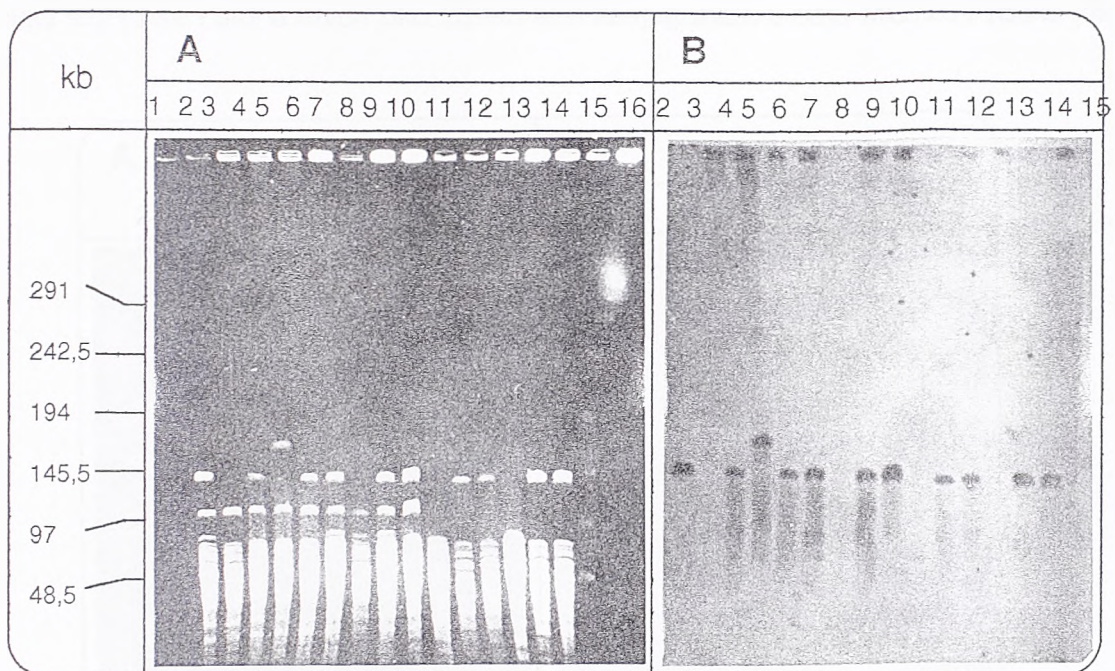


Slika 16. Southern hibridizacija totalne DNK konjuganata secene *NcoI* restrikcijom, razdvojene na PFGE (A) sa Q_6 proteinaznom probom (B) i XRR05 probom (C)

1 i 16, λ -konkatamer; 2, λ -standard *HindIII*; 3, soj S50; 4, derivat 50-1; 5, soj MG7284; 6, konjugant MG10; 7, konjugant MS1; 8, konjugant MS3; 9, konjugant SS1; 10, konjugant RS6; 11, derivat S50-20-62; 12, derivat S50-20; 13, konjugant R6; 14, konjugant K31; 15, konjugant RM1

U PFGE analizi recipijentnih sojeva i konjuganata konstatovano je da derivat S50-1 obelezen spektinomicinskom rezistencijom (S50-1SMSP) poseduje inverzije u hromozomu koja je konstatovana *SmaI* i *NcoI* digestijom DNK izolovane iz ovog derivata (Slika 15, 16 i 17). Da je inverzija u neposrednoj korelaciji sa visokom rezistencijom na spektinomicin (500 μ g/ml) ukazala je i cinjenica da je izolovani derivat S50-20-62 visoko rezistentan na spektinomicin (S50-20-62SMSP) posedovao inverziju identicnog regiona hromozoma (Slika 15, 16 i 17). Derivati obelezeni nizom rezistencijom na spektinomicin (150 μ g/ml) nisu posedovali inverziju u hromozomu, mada je i nivo rezistencije na spektinomicin od 150 μ g/ml za laktokoze dovoljno visok. Velicinu inverzije nije bilo moguće precizno odrediti, jer je za to potrebno imati klonirane krajeve inverzije, ali je na osnovu fragmenata dobijenih *SmaI* digestijom DNK derivata S50-1SMSP utvrdjen moguci raspon velicina na hromozomalnoj DNK ovog derivata u okviru koga se

mogla odigrati inverzija i on se kreće između 180 i 790kb. Najverovatnije da je veličina inverzije negde između ove dve krajnje vrednosti, ali u svakom slučaju je velika i u najmanjoj alternativni iznosi oko 1/12 dok u najvećoj 1/4 hromozoma.



Slika 17. Southern hibridizacija totalne DNK konjuganata secene *NcoI* enzimom, razdvojene na PFGE (A) sa *LcnA* probom (B)

1, soj S50; 2, derivat S50-1SMSP; 3, konjugant SS1; 4, konjugant MS1; 5, konjugant RS6; 6, derivat S50-20; 7, derivat S50-20-62; 8, konjugant R6; 9, konjugant K31; 10, soj MG7284; 11, konjugant MG10; 12, konjugant RM1; 13, soj IL1403; 14, konjugant SIL21; 15, konjugant SIL102; 16, λ -konkatamer

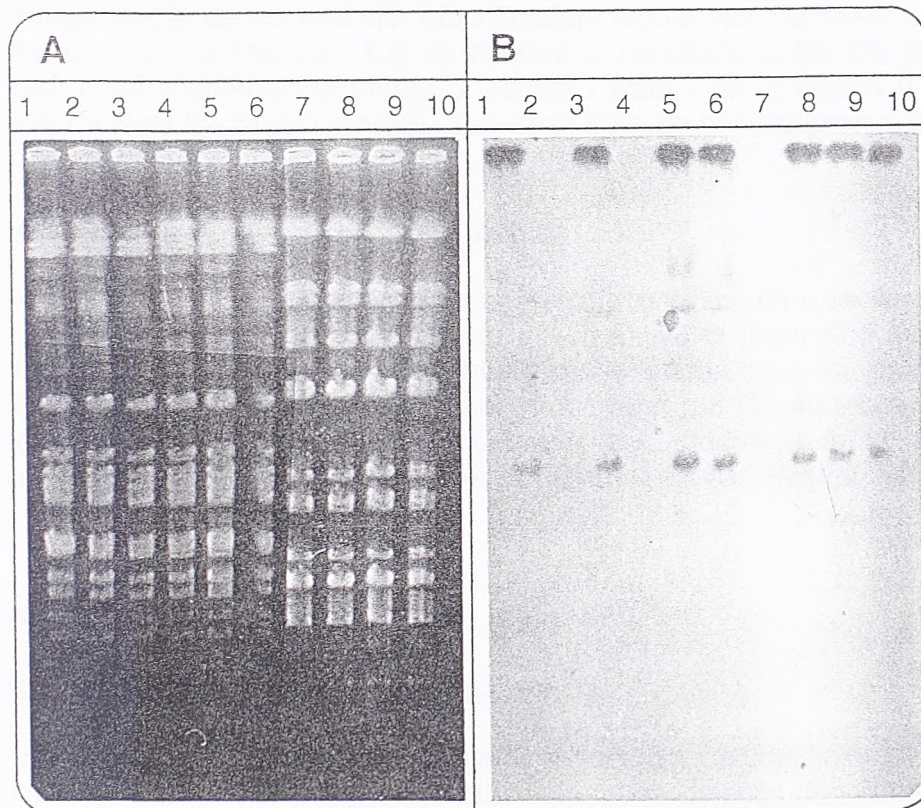
4. 3. 5. Hibridizacioni eksperimenti sa DNK izolovanom iz konjuganata

Totalna DNK izolovana *in-situ* iz konjuganata je digerirana restrikcionim enzimima *SmaI*, *NcoI*, *BamHI* i *BglI*, a zatim su fragmenti dobijeni u digestiji navedenim restrikcionim enzimima razdvajani na PFGE i hibridizovani sa probama za proteinazni (Q_6) i bakteriocinski gen (*lcnA* operon iz pON7 plazmida) i sa probom XRR05 koja poseduje homologe sekvence na plazmidu pS50-290.

Hibridizacija sa *prt* probom

U hibridizaciji sa *prt* probom (Q_6) ustanovljeno je da svi konjuganti poseduju proteinazni gen. On se nalazi na fragmentu iste veličine kod konjuganata i soja S50 u digestijama sa *NcoI*-140kb (sem kod MS1-170kb), *BamHI* (57kb i 35kb) i *BglI* (65kb i 30kb) restrikcionim enzimima. U hibridizaciji sa DNK secenom *SmaI* enzimom konstatovane su razlike. Kod soja S50 sa Q_6 probom najintenzivnije hibridizuje bunarčić, zatim nesecene forme pS50-290

plazmida (u nivou oko 140, 300 i 340kb) i *Sma*I fragment od 210kb. Kod konjuganata takodje najintenzivniji hibridizacioni signal je u nivou starta elektroforeze (bunarcici) Pored bunarcica hibridizacioni signal se dobija i sa nesecenim formama plazmida pS50-290 koje se nalaze u istom nivou kao i kod soja S50. U konjugantima odsustvuje hibridizacija u nivou od 210kb, ali to je i logicno posto u plazmidu pS50-290 Δ u konjugantima postoji samo jedno *Sma*I mesto. Hibridizacioni signal se i vidi u nivou oko 280kb kod konjuganata u soju MG7284 (Slika 18).



Slika 18. Southern hibridizacija totalne DNK konjuganata secene *Sma*I enzimom, razdvojene na PFGE (A) sa proteinaznom probom Q₆ (B)

1, soj S50; 2, derivat S50-1; 3, derivat S50-20; 4, derivat S50-20-62; 5, konjugant R5; 6, konjugant R6; 7, soj MG7284; 8, konjugant MG10; 9, konjugant MG13-1; 10, konjugant MG13-3 (konjuganti MG13-1 i MG13-3 su dobijeni u ponovljenom konjugacionom ukrstanju sojeva S50xMG7284)

Hibridizacija sa probom XRR05 i XHR02

Proba za insercionu sekvencu *ISS1* od 1700bp pored insercione sekvence od 908bp (Haandrikman *et al*, 1990) sadrzi i oko 800bp nepoznate sekvence. Iz regiona sekvence van *ISS1* elementa izolovane su dve probe *Rsa*I-*Rsa*I i *Rsa*I-*Hind*III nazvane XRR05 i XHR02. Takodje konstruisana je i proba koja je sadrzavala samo deo insercione sekvence ogranicene *Aat*II-*Cla*I restrikcionim mestima. U hibridizacionim eksperimentima u kojima su koriscene konstruisane probe ustanovljeno je da plazmid pS50-290 ne poseduje *ISS1* insercionu sekvencu vec sekvencu homologu XRR05 probi (videti: Mapiranje pS50-290 plazmida). Totalna

DNK konjuganata digerirana je enzimima *Sma*I, *Nco*I, *Bam*HI i *Bgl*I, a zatim hibridizovana sa probom XRR05. U digestiji enzimima *Bam*HI i *Bgl*I fragmenti DNK koji hibridizuju su iste velicine kao i kod soja S50, dok su u digestiji enzimima *Sma*I i *Nco*I razliciti (ne vide se na gelu). Kod *Sma*I digestije za ocekivanje je da se hibridizacioni signal vidi u nivou bunarcica jer plazmid pS50-290 linearizovan *Sma*I enzimom zaostaje usled vezivanja proteina u bunarcicama gela. U *Nco*I digestiji fragment koji hibridizuje sa XRR05 probom kod soja S50 je velicine oko 50kb. Pored fragmenta od 50kb slab signal se dobija i sa frgmentom od 140kb. Kod konjuganata slab signal se dobija sa fragmentom od 140kb (izuzev kod MS1 konjuganta). Ono sto se moze zapaziti kod konjuganata je da se kod njih hibridizacioni signal vidi i u nivou bunarcica (Slika 16). Ovaj rezultat ukazuje da fragment koji se deletira iz plazmida pS50-290 prilikom njegove konjugacije pored *Sma*I restriktionog mesta poseduje i *Nco*I i da je region u kom dolazi do vezivanja proteina na *Nco*I fragmentu izmedju sekvence koja se deletira prema bakteriocinskom genu (Slika 8).

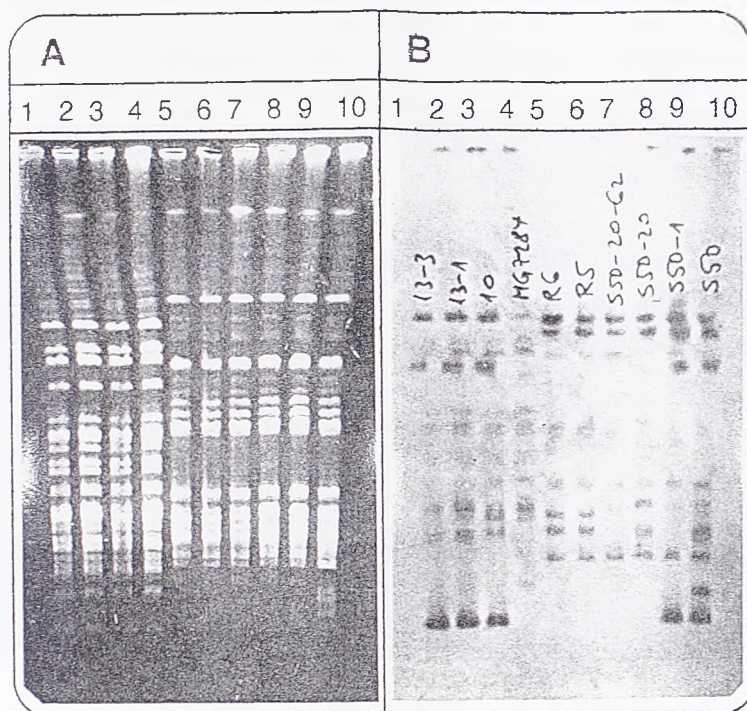
Hibridizacija sa probom za laktokokcinski operon

U hibridizaciji DNK konjuganata secenom *Nco*I restriktionim enzimom dobijeni su ocekivajuci rezultati. Fragmenti koji hibriduju su velicine 140kb (sem kod konjuganta MS1, 170kb) kao i kod soja S50 (Slika 17). Kod hibridizacije sa probom za bakteriocinski gen hibridizacioni signali su dobijeni tek na nesto nizoj temperaturi (58°C) sto ukazuje na nesto nizi stepen homologije kloniranog laktokokcinskog operona iz *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LMG2130 (Holo *et al*, 1991) i operona koji kodira sintezu bakteriocina S50 prisutnog na plazmidu pS50-290.

5. Medjusobna homologija plazmida soja S50

Hibridizacija sa plazmidom pS50-7 kao probom

Razlike u broju i velicini fragmenata dobijenih digestijom restriktionim enzimima koje su se pojavljivale izmedju soja S50 i konjuganata ukazivale su na deleciju malog fragmenta DNK u okolini *Sma*I restriktionog mesta. Deletirani fragment pored *Sma*I nosi i *Nco*I i *Bam*HI restriktiona mesta. Prva mogucnost koja je bila potkrepljena pojavom plazmida pS50-7 u svakom analiziranom konjugantu soja MG7284, je da plazmidi pS50-7 i pS50-290 grade stabilan himerni plazmid (kointegrat) koji se razresava u konjugaciji. Da bi se ova pretpostavka potvrdila plazmid pS50-7 (Slika 19 i 20) i njegov najveći *Hpa*II fragment (4250bp)(Slika 21) su korisni kao probe u hibridizaciji sa DNK konjuganata razdvojenom na PFGE. Posto se znalo da fragment koji se gubi u konjugaciji nosi *Sma*I, *Nco*I i *Bam*HI restriktiona mesta totalna DNK konjuganata je secena ovim restriktionim enzimima. U hibridizaciji sa plazmidom pS50-7 konstatovano je da fragment koji se deletira u konjugaciji i pri ciscenju plazmida poseduje homologiju sa ovim plazmidom i da se nalazi u neposrednoj okolini *Sma*I restriktionog mesta (na poziciji 80)(Slika 8). Fragmenti koji hibridizuju sa plazmidom pS50-7, a pripadaju plazmidu pS50-290 su *Bam*HI od 10kb (Slika 19 i 21) i *Sma*I od 80kb (Slika 20 i 21), dok *Nco*I fragment nije pronadjen (Slika 21). Ovi rezultati su ukazivali da plazmidi pS50-7 i pS50-290 grade stabilan kointegrat samo u soju S50, a da se on razresava u svim konjugantima i u derivatu S50-20. *Bam*HI fragment od 10kb koji hibridizuje sa plazmidom pS50-7 se veoma dobro vidi na PFGE (Slika 19 i 21). Odmah iznad njega se nalazi fragment velicine 12kb koji takodje ne postoji u soju S50-1 i konjugantima. Najverovatnije da ova dva fragmenta imaju jedno zajednicko *Bam*HI restriktiono mesto koje se gubi sa fragmentom.



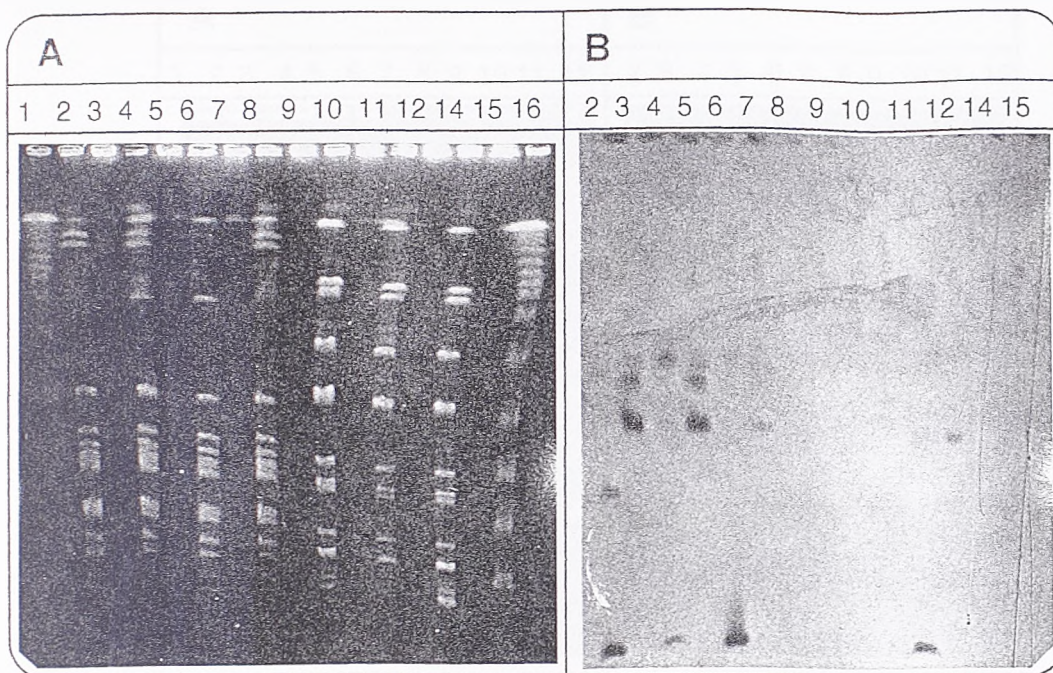
Slika 19. Southern hibridizacija totalne DNK konjuganata secene *Bam*HI enzimom, razdvojene na PFGE (A) sa plazmidom pS50-7 (B)

1, konjugant MG13-3; 2, konjugant MG13-1; 3, konjugant MG10; 4, soj MG7284; 5, konjugant R6; 6, konjugant R5; 7, derivat S50-20-62; 8, derivat S50-20; 9, derivat S50-1; 10, soj S50

Hibridizacioni eksperimenti u kojima je plazmid pS50-7 koriscen kao proba su uradjeni da bi se potvrdilo da li je prisustvo plazmida pS50-7 u konjugantima MG10 i MG13 posledica razresenja kointegrata (ukoliko plazmid pS50-290 u sebi poseduje integrisan plazmid pS50-7) ili koprenosa plazmida pS50-7 *in-trans* funkcijama *tra* operona koji je lociran na plazmidu pS50-290. Pored toga, u ovim eksperimentima je ustanovljeno da i plazmidi pS50-10a, 10b i plazmid pS50-290 poseduju sekvence homologe plazmidu pS50-7.

Da bi se lakse mogla pratiti medjusobna homologija plazmida soja S50 konstruisana je restrikciona mapa plazmida pS50-7 (Slika 22). Radi preciznijeg mapiranja delovi plazmida pS50-7 su klonirani u vektor pUC19 i to na dva nacina. Prvi nacin kloniranja plazmida pS50-7 bilo je kloniranje svih *Hpa*II fragmenata ovog plazmida u *Sma*I mesto pUC19 (klonovi pS7HP425, pS7HP118, pS7HP086, pS7HP029 i pS7HP016) (Slika 23). U drugom slucaju u pUC19 klonirani su *Eco*RI-*Bam*HI fragmenti ovog plazmida (klonovi pS7BE640 i pS7BE030).

U plazmidu pS50-10 hibridizuju dva od cetiri *Eco*RI fragmenta velicine oko 4,5 i 2,7kb i veci broj *Taq*I fragmenata. U plazmidu pS50-290 najmanji fragment koji hibridizuje je *Bam*HI od oko 10kb (Slika 19 i 21).

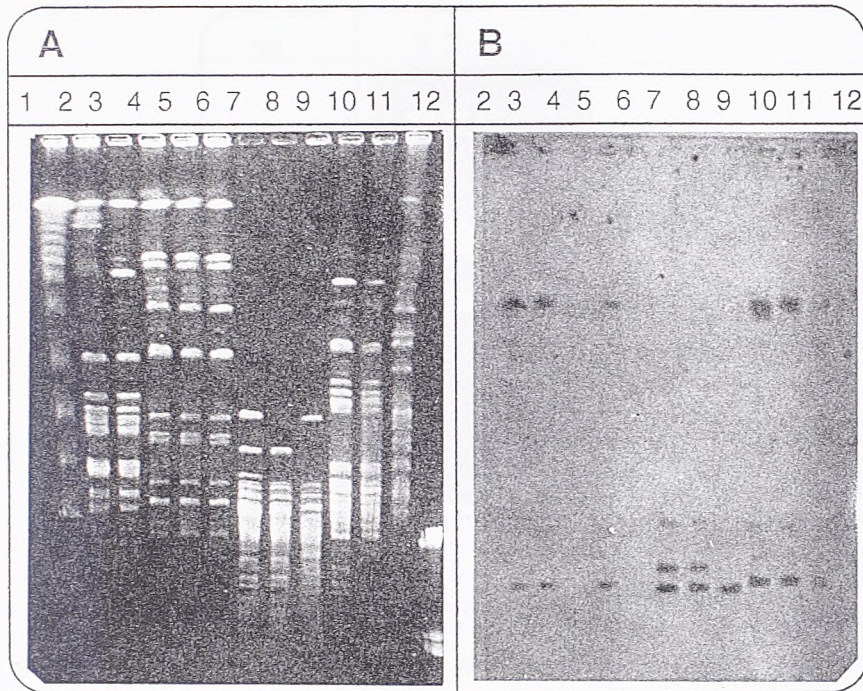


Slika 20. Southern hibridizacija totalne DNK konjuganata secene *Sma*I enzimom (2, 4, 6, 8, 10, 12 i 14) i nesecene (3, 5, 7, 9, 11, 13 i 15), razdvojene na PFGE (A) sa plazmidom pS50-7 (B)

1 i 16, λ -konkatamer; 2 i 3, soj S50; 4 i 5, derivat S50-1; 6 i 7, konjugant SS1; 8 i 9, derivat S50-20; 10 i 11, soj MG7284; 12 i 13, konjugant MG10; 14 i 15, konjugant RM1

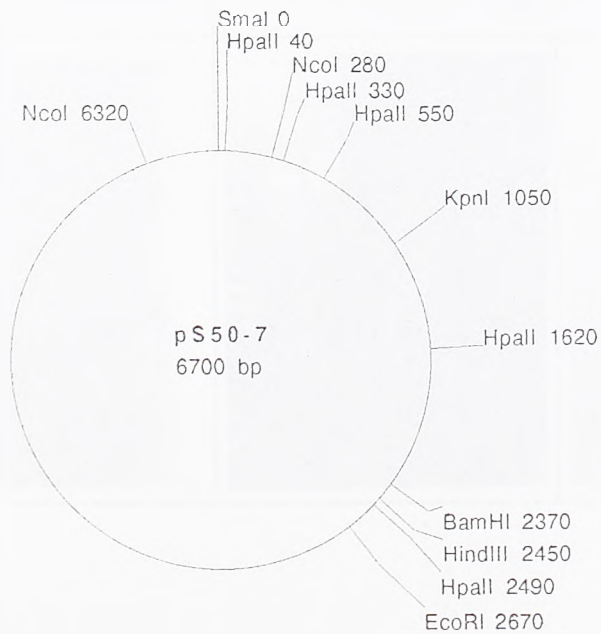
5. 1. Kloniranje homologih sekvenci plazmidu pS50-7 iz plazmida pS50-290

Da bi se doslo do najmanjeg DNK fragmenta plazmida pS50-290 koji u hibridizaciji pokazuje homologiju sa sekvencom plazmida pS50-7, eluiran je *Bam*HI fragment (10kb) koji hibridizuje sa plazmidom pS50-7, sa PFGE gela. Eluirani DNK fragment je digeriran *Taq*I restrikcijom i dobijeni fragmenti su klonirani u pUC19. U ovom eksperimentu je klonirano deset *Taq*I fragmenta razlicite velicine koji su hibridizovani sa plazmidom pS50-7. Dva klonirana *Taq*I fragmenata su hibridizovala sa plazmidom pS50-7, a istovremeno su bili vece duzine od bilo kog *Taq*I fragmenta samog plazmida pS50-7. Klonovi koji su hibridizovali bili su pUB10T17 i pUB10T64. Proba B10T17, poreklom iz klona pUB10T17, sadrzi dva *Taq*I fragmenta koji hibridizuju sa fragmentima iste velicine u plazmidu pS50-10b (Slika 24A). Proba B10T64, iz klona pUB10T64, sadrzi jedan *Taq*I fragment velicine oko 600bp. Fragment koji hibridizuje sa probom B10T64 u plazmidu pS50-7 je manji za oko 100bp (Slika 24B). Proba B10T17 koja se sastoji od dva *Taq*I fragmenta hibridizuje nesto slabije sa homologim *Taq*I fragmentima u plazmidima pS50-7 (850bp), pS50-10a (1200 i 1000bp) i pS50-10b (450 i 400bp) (Slika 24A), sto ukazuje da postoji signifikantna homologija izmedju fragmenata poreklom sa razlicitih plazmida, a da ipak nisu identicni.

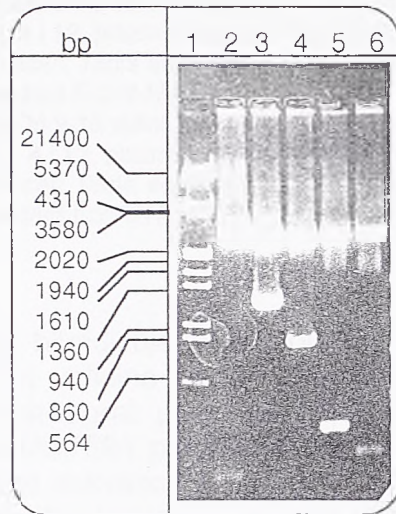


Slika 21. Southern hibridizacija totalne DNK konjuganata secene enzimima *Sma*I (2, 3, 4, 5 i 6), *Nco*I (7, 8 i 9) i *Bam*HI (10, 11 i 12) razdvojene na PFGE (A) sa probom S7HP425 (B)

1, λ -konkatamer; 2, 7 i 10, soj S50; 3,8 i 11, derivat S50-1SMSP; 4, soj MG7284; 5, 9 i 12, konjugant MG10; 6, konjugant RM1



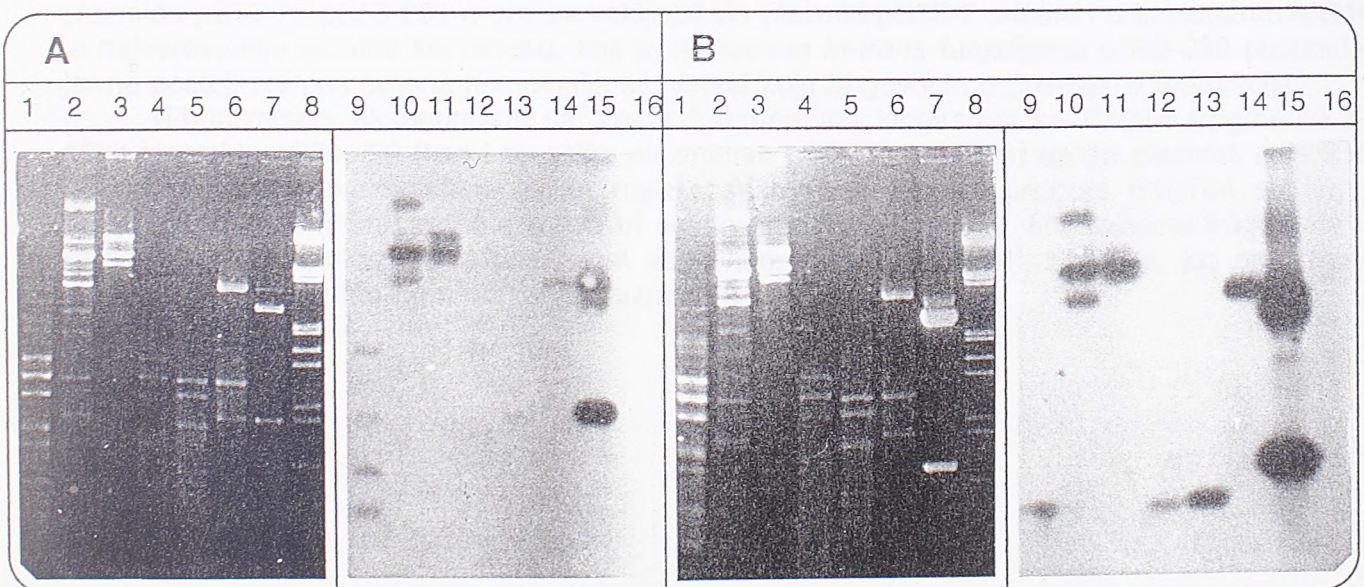
Slika 22. Restrikciona mapa plazmida pS50-7



Slika 23. Restrikciona analiza *Hpa*II klonova plazmida pS50-7.

Derivati pUC19 su seceni enzimima *Eco*RI-*Hind*III i analizirani na 1,2% agaroznom gelu

1, λ -standard *Eco*RI-*Hind*III; 2, pS7HP425; 3, pS7HP118; 4, pS7HP086; 5, pS7HP029; 6, pS7HP016



Slika 24. Southern hibridizacija sa probama B10T17 (A) i B10T64 (B)

(A) Od 1-8 elektroforeza DNK; Od 9-16 autoradiografija. 1-3 i 9-11, plazmidi soja S50 seceni *TaqI* enzimom (1 i 9); *HpaI* (2 i 10) i *NcoI* (3 i 11); 4 i 12, plazmidi derivata S50-20-62 seceni *TaqI* enzimom; 5, 6, 13 i 14, plazmid pS50-7 iz konjuganta MG10 secen *TaqI* enzimom (5 i 13) i *HpaI* (6 i 14); 7 i 15, klon pB10T17 secen *EcoRI-HindIII* enzimima; 8 i 16, λ -standard *EcoRI-HindIII*

(B) Od 1-8 elektroforeza DNK; Od 9-16 autoradiografija. 1-3 i 9-11, plazmidi soja S50 seceni *TaqI* enzimom (1 i 9); *HpaI* (2 i 10) i *NcoI* (3 i 11); 4 i 12, plazmidi derivata S50-20-62 seceni *TaqI* enzimom; 5,6,13 i 14, plazmid pS50-7 iz konjuganta MG10 secen *TaqI* enzimom (5 i 13) i *HpaI* (6 i 14); 7 i 15, klon pB10T64 secen *EcoRI-HindIII* enzimima; 8 i 16, λ -standard *EcoRI-HindIII*

Proba B10T64 od 600bp hibridizuje sa homologim *TaqI* fragmentom iz sva tri plazmida (pS50-7, pS50-10a i pS50-10b) velicine 480bp (Slika 24B). Ovi rezultati su ukazivali da je moguće da postoji stabilni kointegrat plazmida pS50-7 i pS50-290, koji se nakon ili pri konjugacionom prenosu u soj MG7284 precizno razresava. Iz ove pretpostavke je sledilo da otezan B10T64 fragment sadrži sekvence plazmida pS50-7 i pS50-290 (odnosno da uokviruje jednu stranu mesta integracije). Kloniranjem homologog *TaqI* fragmenta od 480bp iz plazmida pS50-7 i upoređenjem njihovih sekvenci moglo bi se videti da li B10T64 zaista uokviruje mesto integracije. *TaqI* fragment plazmida pS50-7 od 480bp je kloniran u plazmid pUC19 (klon pS7T76). Fragmenti S7T76 i B10T64 su sekvencirani (Dodatak 1). Upoređenjem sekvenci ova dva fragmenta ustanovljeno je da postoji veoma visoka homologija u tri regiona, ali su oni isprekidani regionima koji ne poseduju homologiju.

Ovi rezultati su samo pokazali da postoji homologija u pojedinim regionima ova dva fragmenta, ali ne i da fragment B10T64 uokviruje jedan kraj integracije jer u tom slučaju sekvenca ova dva fragmenta bi bila identična počev od jednog kraja fragmenta do mesta integracije, a zatim bi se razlikovale jer jedna pripada plazmidu pS50-7, a druga plazmidu pS50-290. S obzirom da fragment B10T64 najverovatnije ne predstavlja mesto integracije plazmida pS50-7 i pS50-290 može se zaključiti da plazmid pS50-7 prisutan u konjugantu MG10 je najverovatnije rezultat koprenosa, koji je realizovan *in-trans* funkcijama pS50-290 plazmida, jer ne postoji pretpostavljena homologija sekvence koja bi govorila o postojanju integracije.

Hibridizacioni eksperimenti sa *TaqI* fragmentima kloniranim sa *BamHI* fragmenta od 10kb plazmida pS50-290 (kao i sa celim plazmidom pS50-7) pokazuju da svi plazmidi soja S50 poseduju homologe sekvence. To je najizraženije u slučaju sa probom B10T64 sa kojim hibridizuju fragmenti iste velicine u sva tri ostala plazmida soja S50. Ista velicina fragmenta iz različitih plazmida ukazuje na očuvanost sekvence, koja može imati, za sada, još nepoznatu ulogu u prenosu ili stabilnom održanju plazmida u soju S50.

A)

TCGACACAAATCCAAAGGGGATAAAAGGGGAAAGTGAAACTTCCCCCTTTTCAAGCCACATTTGTAATACAAGAACGAAGTGCTTTGTATTACAATGTGATA 100
AGCTGTGTAGGGTTCCCCCTATTTTCCCTTTTCACTTTTGAAGGGGGAAAAGTTCCGGTGTAAACATTATGTTCTTTGCTTACGAAACATAAATGTTACACTAT

GCTTGCAGTATTTATGGTTTTATATHTTCTATTTTTGTTGTGAGGATTTGTAACCGAATAGGGCGCAATGCTTATTTACAAAATCAATGACAAAGGGCGAGTG 200
CGAACGTCATAAATACCAAAATATAAAGGATAAAACAACACTCTTACATTTGGCTTTATCCCGCTTACGAATAATGTTTTAGTTACTGTTTTCCCGCTCAC

AGGAATGAGCGCTGAGGCATTTTATCTTTGAGGAAGTTCTTTGATGGATCAGAAAAATGTATCAAAAATTTAAACAAGACTCACTCATTTAAGAGATGCT 300
TCCTTACTCGGACTCCGTAAAATAGAAAATCCTTCAAGAACTACCTAGTCTTTTTTACATAGTGTTTAAATTTGTTTTCTGAGTGTAGTAAAATTCCTACGA

ACTATCATGAAATTTTGTGTTGCGGATAAGCAACTTCTAATACACGATTTTTAGCCATTACATCACTCGTTTTTAGAGTGTATGTAAAGTGCGCATTGCA 400
TGATAGTACTTTAAAACAACAACGCTATTTGCTTGAAGATTTATGTGCTAAAATCGGTAATGTAGTGAGCAAAAATCTCACTACACATTTACCGGTAAAGCT

CTCTTTTTTAAAGAAACAAGCCGACCCAGGTTTTGAAACTCTTTAGTTTTTTCATCATTCTATTTTTAAAACGCTCTAAAACCTCGA 483
GAGAAAAAATTTGCTTTGTTCCGCTGGTTCGAAAATTTGAGAAATCAAAAAGTAGTAAGATAAAAATTTTGGGAGATTTTGTAGCT

B)

TCGAGCCCTTCCCGAGCCATGGTCAAGCGCCAGGGCGGAACATTCCTTTGCGAGCAACAAGGACGTGGGATATACCTACGCTACCTCCCTATCAGCGATCGGG 100
AGCTCGGGAAGGGCTCGGTACCAGTTTCGCGGTCCCGCCTTTGTAAGAACGCTCGTGTTCCTGACCCCTATATGGATGCGATGGAGGGGATAGTCTGCTAGCCC

GCCGTGGCTGGAAAGCAAATCCGACACAATCCAAAGGGGATAAAAAGGGGAAAAGTAAAACCTTCCCCCTTTTTCAAGCCACATTTGTAATACAAGAACGAAGTAG 200
CGGCACCGACCTTTGCTTTAGGCTGTGTTAGTTTTCCCTATTTTTCCCTTTTCATTTTTGAAGGGGGAAAAGTTCCGGTGTAAACATTTATGTTCTTTGCTTTCATC

TTTTGATTTACAATGTGATAGCTTGCAGTATTTATGGTTTTATATGGTCTATTTTTTTGTTATAAATGATTTGTAACCGAATAGGGCGCAATGCTTATTTACAAA 300
AAACATAATGTTACACTATCGAACCTCATAAATACCAAAATATACCAGATAAAAAACAATAATTACTAACATTTGGCTTTATCCCGCTTACGAATAATGTTTT

ATCAATGACAAAAGGGCGATTTGAGGAATGAGCGCTGGGGCATTTTATCTTTGAGGAGGCTATTTATGGATCAGAAAAATGTATCAAAAATCAAACAAGT 400
TAGTTACTGTTTCCCGCTAACTCCTTACTCGCGACCCCGTAAAATAGAAAATCCTCCGATAAAATACCTAGTCTTTTTTACATAGTGTTTTTAGTTTTGTTTTCA

ACATTCATTTTAGATTGCTGAAGAACAATACAATAAGCTGAAAATTTTCAAGGAGAACATATGGACTCTCTCCGAATCTTTTATGCGAAAAAATTAGCACA 500
TGTAAGTTAAATCTAACAGACTTCCTTTGTTATGTTATTTCGACTTTTTAAAGTCTCTTTGTTATACCTGAGAGAGGCTTAGAAAATACGCTTTTTTAAATCGTGT

AAAAATCTCATTTAAAAAAACCTTTATCTCGGCTGAATTACTGGGTTCCAGCGGATGAAGGATTTCTAAAGTCAGCTAAGGAACCGTATGACATTTGTGA 600
TTTTTGTAGTAAATTTTTTTTGAATAGAGCCGACTTAATGACCCAAAGTGTGCGCTACTTCTAAAGGATTTTCACTCGATTCCTTGCATACTGTAACT

TTGTCTGA 607
AACAGCT

Slika 25. Nukleotidna sekvenca Taqla-Taqla fragmenta S7T76 (A) i B10T64 (B)

V DISKUSIJA

Uspesnost rasta nekog soja laktokoka (u monokulturi) u mleku zavisi od njegove brzine rasta (koja je zavisna od sposobnosti katabolizma secera i degradacije proteina mleka, kako bi dosao do osnovnih gradivnih blokova za sintezu) i sposobnosti sinteze inhibitornih supstanci (bakteriocina) koje inhibiraju rast srodnih bakterija u istoj sredini. Za obezbedjivanje celija amino kiselinama iz mleka (koje je siromasno slobodnim aminokiselinama, ali bogato proteinima), odgovoran je proteoliticki sistem koji degraduje proteine mleka do oligopeptida male molekulske mase i slobodnih aminokiselina. Pored toga sto obezbedjuje celije neophodnim azotnim jedinjenjima, proteoliticki sistem poseduje jos jednu veoma vaznu ulogu koja se ogleda u davanju specificnog ukusa proizvodima od mleka koji je posledica prisutnih oligopeptida nastalih aktivnoscu ovog sistema (Hill and Gasson, 1986; Olson, 1990). Proteinaze su deo proteolitickog sistema koji se sastoji jos od peptidaza i transportnog sistema za aminokiseline i oligopeptide male molekulske mase. Kod laktokoka je pronadjena samo jedna vrsta proteinaze koja sa malim promenama na nukleotidnom, a ujedno i na aminokiselinskom nivou, daje tri vrste proteinazne aktivnosti (PI, intermedijerni tip i PIII). Kod svih analiziranih sojeva laktokoka koje sintetisu proteinaze, sem kod *L. lactis* subsp. *cremoris* BC101 kod koga se proteinazni gen nalazi na hromozomu (Nissen-Meyer *et al*, 1992b), proteinazni geni se nalaze na plazmidima razlicite velicine (Kok, 1987). Kod soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* S50 proteinazni gen se nalazi na plazmidu pS50-290 (290kb). Postoji mogucnost da je i kod soja BC101 (Nissen-Meyer *et al*, 1992) proteinazni gen lociran na velikom plazmidu koji nije moguće izolovati u intaktnom stanju procedurama za izolaciju plazmida. Ukoliko bi to bilo tacno u tom slucaju ni ovaj soj ne bi predstavljao izuzetak sto se tice lokacije proteinaznog gena, odnosno svi do sada otkriveni proteinazni geni laktokoka bili bi locirani na plazmidima. Medjutim, autori su se opredelili, kao sto je receno za varijantu da je proteinazni gen u ovom soju lociran na hromozomu.

Bakterocini su inhibitorni molekuli proteinske prirode, najcesce male molekulske mase i uskog spektra delovanja (samo na srodne vrste bakterija). Oni igraju veoma znacajnu ulogu u zastiti monokultura od sekundarnih infekcija srodnim bakterijama. Veliki broj do sada otkrivenih bakterocinskih gena je lociran na plazmidima razlicite velicine (Klaenhammer, 1993). Na do sada najvećem opisanom plazmidu laktokoka pNP2 od 131kb u soju *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* WM4 nalaze se geni za laktokokcin A, B i M (Scherwitz-Harmon and McKay, 1987). Pokazano je da su i ostali otkriveni geni za laktokokcin A u drugim sojevima laktokoka, takodje, locirani na plazmidima (Neve *et al*, 1984; Holo *et al*, 1991; Stoddard *et al*, 1992; Klaenhammer, 1993). Medjutim u soju S50 geni za sintezu i za imunost na laktokokcin A su locirani na najvećem do sada otkrivenom plazmidu u laktokokama (plazmid pS50-290 od 290kb).

Da su geni za sintezu proteinaze i bakteriocina S50 locirani na plazmidu pS50-290 zakljuceno je na osnovu rezultata dobijenih ciscenjem plazmida. Ciscenje plazmida je radjeno razlicitim agensima (tretman etdijum bromidom, akriflavinom, akridin oranzom i protoplastiranjem), ali su derivati soja S50 bez nekog od plazmida dobijeni samo u tretmanu ovog soja povisenom temperaturom i subletalnom koncentracijom novobiocina. Najverovatnije da najveći efekat na replikacioni i particioni sistem plazmida laktokoka poseduju povisena temperatura i antibiotik novobiocin. U eksperimentima ciscenja plazmida iz soja S50 dobijeni su derivati S50-1 (koji je izgubio plazmid pS50-290 i postao Bac⁻, Prt⁻) i S50-20 (koji je izgubio plazmide pS50-7 i pS50-10b, a zadržao je sposobnost sinteze bakteriocina i protenaze (Bac⁺, Prt⁺)). Ciscenjem plazmida iz derivata S50-20 dobijen je novi derivat koji je izgubio plazmid

pS50-290 i postao Bac-, Prt-. Frekvenca ciscenja plazmida pS50-290 iz soja S50 je bila veoma niska (1,6‰) u poredjenju sa frekvencama dobijenim u ciscenju plazmida koji na sebi nose proteinazne gene (Gasson, 1983; Kok, 1987) ili gene za sintezu bakteriocina (Davey, 1984; Dufouret *al*, 1991; Gupta and Batish, 1992) na osnovu cega se moze zakljuciti da je plazmid pS50-290 veoma stabilan. Verovatno da ovako velikoj stabilnosti plazmida pS50-290 u populaciji bakterija pored bakteriocinskog ubilackog efekta na celije koje su izgubile plazmid doprinose jos neki mehanizmi.

Plazmid pS50-290 je cirkularan plazmid. Zakljucak da je ovaj plazmid cirkularan donet je na osnovu postojanja veceg broja traka nesecenih formi plazmida pS50-290 razdvojenih na PFGE, koje hibridizuju sa *prt* probom (Slika 6). Veci broj traka koje hibridizuju ili se vide moze poticati i od veceg broja homologih linearnih plazmida razlicite velicine, ali u tom slucaju veci broj traka bi se zadržao i nakon digestije restrikcionim enzimima. Najmanja traka nesecenog plazmida pS50-290 koja hibridizuje nalazi se u regionu od oko 140kb prema standardu linearne DNK (λ -konkatamer), a ostale trake koje hibridizuju su u nivou 290, 350 i 600kb. Ovaj rezultat je u potpunoj suprotosti sa onim sto je do sada poznato o migraciji cirkularnih plazmida na PFGE. Do sada je analizirana pokretljivost cirkularnih plazmida razlicite velicine (od 5-85kb) u pulsirajucem polju i ustanovljeno je da se oni krecu razlicito u zavisnosti od napona i duzine trajanja pulsa, ali uvek sporije od linearnih fragmenata iste velicine (Beverley, 1988). Plazmid pS50-290 pokazuje vrlo slicnu pokretljivost u pulsirajucem polju pri uslovima (konstantno 300V, puls N/S i W/E=8-19 sec) kao i cirkularni plazmidi male molske mase na klasicnoj agaroznoj elektroforezi. Kao i kod malih cirkularnih plazmida tako i kod plazmida pS50-290 najverovatnije da superspiralizovana forma plazmida putuje brze (u nivou 140kb) od linearne, a relaksirana sporije (u nivou 350 i 600kb) od linearne (290kb). Razlicito ponasanje plazmida pS50-290 na PFGE od do sada analiziranih plazmida verovatno potice od razlicite strukture i velicine ovog plazmida, jer do sada nisu analizirani tako veliki plazmida na PFGE. Da li je ovakvo migriranje plazmida vecih od 250kb u pulsirajucem polju pravilo ili ovakvo ponasanje pokazuje samo plazmid pS50-290 za sada nije moguće dati odgovor zato sto za sada nema podataka o migraciji tako velikih plazmida na elektroforezi u pulsirajucem polju. Tako velike cirkularne plazmide poseduju sojevi iz rodova *Pseudomonas* i *Agrobacterium* koji mogu biti velicine i do 430kb (Jouanin *et al*, 1986), ali do sada nisu analizirani na elektroforezi u pulsirajucem polju iz jednostavnog razloga sto ih je lako izolovati metodama za izolaciju velikih plazmida i analizirati na klasicnoj agaroznoj elektroforezi (Casse *et al*, 1979).

Plazmid pS50-290 nije bilo moguće izolovati u frakciji plazmidne DNK cak i kada su koriscene standardne metode za izolaciju velikih plazmida, najverovatnije zbog njegove velicine i strukture, tako da je analiza plazmida vrsena na PFGE. Procedure za izolaciju velikih plazmida koriscene u ovom radu pripadale su onima koje su bile prilagodjene za izolaciju plazmida kako iz Gram pozitivnih (Anderson and McKay, 1983) tako i iz Gram negativnih bakterija (Expert *et al*, 1982), ali uspesni rezultati najverovatnije nisu dobijeni u prvom slucaju zbog velicine, a u drugom usled toga sto su laktokoke Gram pozitivne bakterije koje poseduju drugaciju strukturu zida. Velicina plazmida pS50-290, s obzirom da je to ekstrahromozomalni genetički element, trebalo bi da bude jednaka zbiru fragmenata secene DNK koji postoje u soju S50, a odsutni su u derivatu S50-1 koji ne poseduje ovaj plazmid. Komplikacije kod odredjivanja velicine plazmida pS50-290 nastale su usled retardacije pojedinih fragmenata secene DNK ovog plazmida. Plazmid pS50-290 je najverovatnije velicine oko 290kb. Do velicine od 290kb doslo se na osnovu digestije *Sma*I restrikcionim enzimom pri kojoj se dobijaju dva fragmenta DNK velicine 80 i 210 kb poreklom od ovog plazmida. Fragment od 80kb se vidi na gelu i nesto je jaceg intenziteta od fragmenata hromozomalne DNK (Slika 6 i 7), dok se fragment od 210kb ne vidi (ostao je u bunarcicu), ali se deo DNK vizuelizuje u hibridizaciji sa probom za *prt* gen u nivou 210kb. Na osnovu digestija drugim restrikcionim enzimima i hibridizacijom (sa probama za

proteinazni, bakteriocinski gen, XRR500 probom i plazmidom pS50-7 kao probom) može se preklopiti oko 190kb plazmida pS50-290, što čini oko 65% od ukupne predviđene veličine plazmida. Ukoliko bi bio pronađen veći broj proba homologih sekvencama na plazmidu pS50-290 (s obzirom da je njihova optimalna veličina oko 1kb) verovatno da bi se i u digestijama nekim drugim restrikcionim enzimima vizuelizovali svi fragmenti dobijeni digestijom plazmida pS50-290, odnosno zbir veličina fragmenata iznosio bi najverovatnije 290kb.

Na osnovu intenziteta trake na gelu koja potice od fragmenta od 80kb plazmida pS50-290 i poredjenjem sa intenzitetom traka poreklom od fragmenata hromozomalne DNK iste veličine može se zaključiti da se plazmid pS50-290 najverovatnije u soju S50 nalazi u 2 kopije po hromozomu, što je i za očekivanje za plazmide veličine od preko 100kb.

Plazmid pS50-290 je najverovatnije autokonjugativni Tra⁺ plazmid. Veličina *tra* operona Gram pozitivnih bakterija je oko 15kb i on može biti lociran kako na plazmidu tako i na hromozomu domaćina i omogućiti prenos DNK na kojoj nije prisutan (Krah and Maricina, 1989; Thomas and Archar, 1989; Lucey *et al*, 1993; Mills *et al*, 1994). Da je plazmid pS50-290 autokonjugabilan zaključeno je na osnovu frekvenci konjugacije dobijenih u različitim konjugacionim ukrstanjima koja neznatno varira bez obzira na korisnici donorski i recipijentni soj (Tabela 2) što ukazuje da sposobnost prenosa DNK zavisi od gena lociranih na ovom plazmidu. Da bi se ovaj zaključak potvrdio potrebno je klonirati *tra* operon sa plazmida pS50-290, ili ga mapirati transpozonskom mutagenезom ili hibridizcijama sa homologom probom za *tra* operon iz drugih bakterija. S obzirom da do sada nije kloniran *tra* operon laktokoka mada je mapiran na nekim plazmidima (Mills *et al*, 1994), bilo bi poželjno klonirati ga sa plazmida pS50-290, a zatim odrediti njegov položaj na ovom plazmidu kako bi se mogalo ujedno i videti gde je mesto otpocinjavanja prenosa DNK pri konjugaciji. Vreme za koje plazmid pS50-290 predje u konjugaciji u recipijentnu ćeliju je manje od 4h posto se konjuganti sa visokom frekvencom dobijaju nakon trajanja konjugacije u trajanju od 4h. U sistemu *E. coli* fragment DNK iste veličine bi u recipijentnu ćeliju presao za oko 7 minuta (za 1 minut predje oko 1% hromozoma *E. coli* ili 47kb) (Porter, 1988) tako da se očekuje, iako je ovo sistem Gram pozitivnih bakterija, da se prenos plazmida pS50-290 u konjugaciji postize za kraće vreme. Najveći broj konjuganata dobijen je nakon 8h trajanja konjugacije i najverovatnije je to vreme konjugacije optimalno za najefikasniji prenos ovog plazmida u primenjenim uslovima konjugacije, a najverovatnije je rezultanta brzine uspostavljanja konjugacionih funkcija i usmrcivanja ćelija usled sinteze bakteriocina S50 od strane donorskih ćelija i već nastalih konjuganata u konjugacionoj smesi.

Analizom plazmidnog sastava konjuganata ustanovljeno je da pored plazmida pS50-290 sposobnost prenosa u recipijentnu ćeliju pri konjugaciji poseduju i plazmidi pS50-7 i pS50-10b (Slika 10), ali najverovatnije zahvaljujući proteinima kodiranim sa *tra* operona plazmida pS50-290. S obzirom na veličinu ova dva plazmida 6,7 i 8,2kb, oni na sebi ne mogu posedovati ceo *tra* operon i najverovatnije oni poseduju samo gen za Mob protein i *oriT* sekvencu od koje otpocinje prenos DNK. Poznato je da je minimalna veličina DNK, koja može nositi informaciju za konjugacioni prenos (koja sadrži neophodne sekvence za konjugacioni prenos *oriT* i *mob* gene) iznosi oko 2kb (Lucey *et al*, 1993). Da ovi plazmidi zaista poseduju region koji im omogućava konjugacioni prenos može se potvrditi kloniranjem ovog regiona, koji je najverovatnije i kod ovih plazmida oko 2kb, sa plazmida pS50-7 i pS50-10b. Analizom kloniranih regiona sa ova dva plazmida i poredjenjem sa već do sada kloniranim (Lucey *et al*, 1993) moglo bi se ustanoviti koliko su ovi regioni konzervativni s obzirom da su funkcionalni. S obzirom da medju konjugantima nisu nadjeni oni u koje je koprenesen plazmid pS50-10a, za sada nije moguće reci da li i ovaj plazmid poseduje funkcionalne elemente potrebne za konjugacioni prenos. Ono što je interesantno kod konjugacionog prenosa plazmida pS50-7 i pS50-10b je to da je on zavisen od domaćina, odnosno recipijenta u konjugaciji. Plazmid pS50-7 konstatovan je samo u konjugantima soja MG7284 (MG10), a plazmid pS50-10b u konjugantima soja IL1403 (SIL102).

Konjuganti soja VEL1122 takodje poseduju plazmid od 8,2kb (SVEL11), ali nije ustanovljeno o kojoj varijanti ovog plazmida se radi da li o pS50-10a ili pS50-10b. S obzirom da plazmidi pS50-7 i pS50-10b bivaju preneti u recipijentne celije, oni (oba) najverovatnije poseduju *oriT* i *mob* gene. Moguce je da u konjugaciji dolazi do prenosa ovih plazmida soja S50 koji poseduju gen za Mob protein i *oriT* sekvencu u recipijentnu celiju, ali da zavisno od recipijentnog soja u njemu opstaje kao nezavisan replikon samo onaj koji moze da se replikuje i precizno prenosi u cerke celije tokom deobe. Manja je verovatnoca da neki faktori recipijenta indukuju prenos samo pojedinih, ali uvek istih plazmida. Od cega zavisi koji ce replikon opstati u recipijentnom soju, s obzirom da oni nisu inkompatibilni u soju S50, da li od strukture oridzina replikacije ili od restrikciono modifikacionog sistema domacina ili neceg treceg za sada nije poznato.

Prema aktivnosti proteinaze ciji se gen nalazi na plazmidu pS50-290, soj S50 se moze svrstati u sojeve sa srednje aktivnom proteinazom PI tipa slicnu soju *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Derivat soja S50 dobijen ciscenjem plazmida, ali koji je zadržao plazmid pS50-290 (S50-20) poseduje nesto smanjenu proteoliticku sposobnost u poredjenju sa sojem S50 (za oko 30-40%). S obzirom da su i konjuganti dobijeni iz razlicitih konjugacionih ukrstanja primili plazmid pS50-290 na kome je lociran *prt* gen i posto se radi o plazmidu, ovaj gen ostaje okruzen identicnim uzvodnim i nizvodnim genima. Jedno od objasnjenja je da moze doći do rearanzmana plazmida ili razlicite superspiralizacije u novom domacinu koji mogu izmeniti aktivnost *prt* gena, zbog toga se zelelo videti da li i faktori domacina imaju uticaja na ekspresiju proteinaznog gena. Konjuganti derivata soja MG1363 (MG10, RM1, SVEL5 i SVEL11) poseduju za oko 10 puta vecu proteoliticku aktivost u poredjenju sa sojem S50 (Slika 13). Povecanje proteoliticke aktivnosti za oko 3 puta kada se u derivat MG1820 uvede klonirani proteinazni gen je vec primeceno (Bruinenberg *et al*, 1992) tako da je najverovatnije ovo povecanje u slucaju plazmida pS50-290 vezano za genetsku osnovu soja MG1363 jer se javlja i u svim njegovim derivatima. Takodje i smanjena proteoliticka aktivnost (za oko 50-70%) u konjugantima soja IL1403 (SIL21, SIL102, RMIL1) s obzirom da je u svim konjugantima ujednacena (Slika 13) najverovatnije je vezana za genetsku osnovu ovog soja. Konjuganti u derivatima soja S50 (SS1, MS1, MS3, RS6, R6 i K31) pokazuju raznoliku proteoliticku aktivnost (Tabela 3; Slika 13). Zasto je proteoliticka aktivnost u ovim konjugantima ovako razlicita iako se radi o identicnoj genetskoj osnovi za sada nije moguce dati definitivan odgovor. Da bi se doslo do odgovora sta je odgovorno za izmenjenu proteinaznu aktivnost potrebno je najpre utvrditi da li je doslo do promena u strukturnom i regulatornom regionu proteinaznog gena ili cak i njegovog okruzenja koje bi dovelo do promena aktivnosti. Ukoliko nije doslo do promena u strukturi proteinaznog gena, a ni njegove okoline interesantno bi bilo ustanoviti koji su to faktori koji mogu toliko izmeniti aktivnost jednog gena ili njegovog produkta. Ovo je posebno znacajno za industriju jer i pored fizicke prisutnosti gena moze izostati njegova funkcija ili biti smanjena. Uticaj drugih plazmida soja S50 (pS50-7, pS50-10a i pS50-10b) na proteoliticku aktivnost konjuganata u ovim eksperimentima nije primecena.

Svi konjuganti s obzirom da je selekcija u konjugaciji vrsena na bakteriocin S50 su rezistentni na bakteriocin S50, ali pokazuju razlicitu sposobnost sinteze bakteriocina. Konjuganati derivata soja MG1363 (MG10, RM1, SVEL5 i SVEL11) i soja IL1403 (SIL21, SIL102 i RMIL1) poseduju smanjenu sposobnost sinteze bakteriocina u odnosu na soj S50, ali je ujednacena u okviru iste grupe konjuganata sto ukazuje da je zavisna od soja u kome se nalazi plazmid pS50-290. Konjuganti derivata soja S50 poseduju razlicitu sposobnost sinteze bakteriocina. Najvecu kolicinu bakteriocina sintetise konjugant SS1 dok najmanju (manju i od konjuganata soja MG7384) bakteriocinsku aktivnost pokazuje konjugant MS1 (Slika 14). Unutar ove grupe konjuganata bakteriocinska aktivnost je obrnuto srazmerna proteolitickoj, ali ovaj zakljucak nije moguce izvesti za sve konjugante jer konjuganti soja IL1403 poseduju smanjenu i proteoliticku i bakteriocinsku aktivnost. Da li postoji uzrocna veza izmedju bakteriocinske i

protoliticke aktivnosti može se ustanoviti ukoliko se inaktivira proteinaza kao protein npr. PMSF-om i posmatra da li će doći do povećanja bakteriocinske aktivnosti.

Analizom strukture plazmida pS50-290 u konjugantima na PFGE zelelo se ustanoviti da li je u konjugantima prisutan ceo plazmid, kako bi se eventualno mogao dati odgovor za različitu ekspresiju gena lociranih na ovom plazmidu. Na osnovu PFGE secene DNK restrikcijom enzimima *Sma*I, *Nco*I i *Bam*HI i hibridizacija sa probama za proteinazni i bakteriocinski gen kao i za homologu sekvencu probi XRR500 i plazmidu pS50-7 ustanovljeno je da svi konjuganti, a i derivat S50-20 dobijen ciscenjem plazmida, poseduju deletiran plazmid pS50-290 u regionu oko *Sma*I restrikcionog mesta lociranog na 80kb od prvog *Sma*I restrikcionog mesta (pozicija 0kb)(Slika 8). Koliki je deletirani region i da li je kod svih konjuganata i derivata S50-20 iste velicine nije još uvek ustanovljeno. S obzirom da se kod svih konjuganata delecija odigrava u istom regionu i da konjuganti (sem konjuganta MS1) poseduju plazmid iste velicine najverovatnije je da se radi o fragmentu DNK iste velicine koji je se deletira preko specifičnih sekvenci. Pokusaj da se klonira ceo region koji se deletira iz plazmida pS50-290 u konjugaciji i ciscenju plazmida iz *Bam*HI fragmenata velicine 10 i 12kb pokazao se bezuspesnim. Moguci razlog neuspeha može biti bas u njegovom afinitetu da se deletira. Pored toga ovaj region pokazuje homologiju sa ostalim plazmidima soja S50. Kakva veza postoji izmedju regiona na plazmidu pS50-290 koji se deletira i ostalih plazmida soja S50 još nije otkrivena.

Analiza DNK fragmenata na PFGE, dobijenih secenjem plazmida u originalnom soju S50 i konjugantima, pokazala je da se najjaci signal u hibridizaciji dobija u nivou bunarcica (start PFGE). Naime, najveći deo plazmidne DNK ne migrira u gel. Medjutim, u *Sma*I digestiji plazmida pS50-290 u soju S50, može se detektovati fragment od oko 210kb koji hibridizuje sa *prt* i *lcnA* probama, ali signal hibridizacije ukazuje da fragment od 210kb nije kvantitativno prisutan u gelu u regionu 210kb (srazmerno fragmentu od 80kb) te je i u tom slucaju najjaci signal hibridizacije u nivou bunarcica (Slika 18). Iz ovih rezultata može se zakljuciti da se na *Sma*I fragmentu od 210kb nalazi sekvenca za koju se vezuje protein ili proteini koji je retardiraju, a ujedno i ceo plazmid kada je linearizovan ili nesecen. Unutar *Sma*I fragmenta od 210kb lociran je *Nco*I fragment od 140kb koji ne retardira na gelu (Slika 16 i 17), što govori da se u okviru ostalih 70kb van *Nco*I fragmenta od 140kb nalazi mesto za vezivanje proteina. Na osnovu rezultata dobijenih u hibridizaciji *Nco*I secene DNK soja S50 i konjuganata sa probom XRR500 (Slika 16) može se zakljuciti da se region za koji se vezuje protein (proteini) na plazmidu pS50-290 nalazi izmedju *Sma*I (80kb) i *Nco*I (148kb) restrikcionih mesta. Da bi se potvrdilo da li zaista postoji DNK sekvenca na plazmidu pS50-290 za koju se vezuje protein (proteini) ili do zaostajanja ovog plazmida u bunarcicu dolazi iz drugih, za sada nepoznatih razloga, potrebno je klonirati eventualni fragment DNK koji ostaje zasticen od dejstva DNKazel nakon tretmana, materijala zaostalog u bunarcicu nakon PFGE. Koriscenjem tog kloniranog fragmenta kao probe može se ustanoviti lokacija mesta vezivanja proteina na plazmidu pS50-290, a u eksperimentima gel retardacije sa ekstraktima soja S50, recipijenata i konjuganata da li je i sam protein (proteini) kodirani genom sa plazmida ili hromozoma. S obzirom da je ovaj kompleks rezistentan na dejstvo proteinaze K i pronaze E moguće je da u ovom kompleksu dolazi do kovalentnog vezivanja proteina preko serina za DNK. Za sada je poznato da se proteini kovalentno vezuju za DNK da bi ih zastitili od dejstva nukleaza, kao što je to slucaj kod linearnih plazmida i hromozoma streptomiceta (Sakaguchi, 1990; Lin *et al*, 1993). Moguci protein (proteini) koji se vezuju za pS50-290 plazmid mogu biti proteini koji ucestvuju u particiji ovog plazmida pri celijskoj deobi. Pokazano je da se proteini particionog sistema takodje cvrsto vezuju za plazmide koje razdvajaju u cerke celije tako što je kompleks plazmida i ovih proteina nadjen u membranskoj frakciji celija (Nordström and Austin, 1989). Najverovatnije da proteini particionog sistema cine vezu izmedju plazmida i citoskeleta bakterije cime se omogućuje ravnomerna raspodela plazmida u cerke celije. Slicno je primeceno i kod hromozoma bakterija da se veze za

membranu odnosno citoskelet bakterije (Drlica,1987).

Analizom hromozoma derivata S50-1SMSP i konjuganata ovog soja konstatovano je da oni poseduju inverziju u hromozomu velicine izmedju 180-790kb koja je otkrivena nakon indukovanja rezistencije na spektinomycin u ovom soju. Da li se radi o spektinomycin indukovanom inverziji, ili je ona nastala spontano u populaciji, a iselektirana je gajenjem ovog soja na spektinomycinu ne moze se sa sigurnoscu tvrditi, ali rezultat dobijen u ponovljenom eksperimentu sa derivatom S50-20-62 kod koga je nastala identicna inverzija nakon markiranja ovog soja spektinomycinom rezistencijom govori o korelaciji izmedju ovog hromozomskog rearanzmana i rezistencije na spektinomycin. Ova inverzija se konstatuje u digestiji DNK ovih derivata i konjuganata ovih sojeva *Sma*I i *Nco*I restrikcijom enzimima (Slika 15, 16, 17, 20 i 21). Sta nastaje kao posledica ovako velike inverzije sto omigucuje rezistenciju na spektinomycin jos nije utvrdjeno, ali ova inverzija nema nekog vidnijeg efekta na rast ovih derivata, mada je primecen nesto sporiji rast ovog derivata na cvrstoj podlozi. Za sada se najvise zna o inverzijama u hromozomu *E. coli* i *Salmonella typhimurium* gde je i konstatovano da su inverzije redak dogadjaj u prirodi i da se desavaju u okviru manjih regiona DNK (Ajdic, 1990) . Inverzija u derivatima S50-1 i S50-20-62 je velika inverzija (cak i ako je samo 180kb) a odgovorna je za rezistencije na spektinomycin. Inverzije su rearanzmani DNK koji odredjeni segment DNK dovode u obrnuti polozej u odnosu na polozej koji je posedovao u ishodnom domacinu, a najcesce se odigravaju izmedju homologih sekvenci koje su u obrnutoj orijentaciji jedna prema drugoj. S obzirom da je u dva nezavisna eksperimenta sa dva razlicita derivata soja S50 otkriven isti tip inverzije, to ukazuje da je do inverzije najverovatnije doslo izmedju homologih sekvenci koje mogu biti dve iste insercione sekvence ili dva operona za ribozomalne RNK. U hromozomu laktokoka (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DL11 i IL1403) nalazi se sest operona za ribozomalne RNK (Tulloch *et al*, 1991; Le Bourgeois *et al*, 1992) od kojih se samo *rrnF* nalazi u obrnutoj orijentaciji u odnosu na ostale. Ukoliko se operoni za ribozomalne RNK nalaze u slicnim pozicijama na hromozomu soja S50 u tom slucaju ona se mogla odigrati izmedju *rrnF* i jednog od ostalih sem *rrnE*. Inverzije izmedju dva operona za ribozomalne RNK mogu izazvati promena kako na samim genima za ribozomalnim RNK tako i na genima za transportne RNK koji se nalaze unutar operona, a sto se moze odraziti na strukturu ribozoma, na vernost tanslacije i rezistencije na antibiotike. Hromozomi laktokoka su, takodje, bogati i insercionim sekvencama (Polzin and Shimizu-Kadota,1987; Romero and Klaenhammer, 1990; Haandrikman *et al*, 1990; Schäfer *et al*, 1991; Polzin and McKay, 1991) izmedju kojih se mogla odigrati inverzija koja bi usled aktivacije nekih gena koji se nalaze locirani neposrednu uz IS sekvencu dovela do rezistencije na spektinomycin. Pored ovih mogucnosti kao posledica inverzije moze doci i do sinteze izmenjenih proteina ribozoma kao i proteina membrane koji mogu biti odgovorni za rezistenciju na spektinomycin. Tek kloniranjem krajeva inverzije moci ce se dati odgovor na pitanje izmedju kojih se struktura odigrala inverzija i do kojih je promena dovela koje omogucuju rast na spektinomycinu.

Konjugant MS1 poseduje otezan *Nco*I fragment od 140kb za oko 30kb. Otezanje *Nco*I fragmenta od 140kb moglo je nastati usled insercije transpozona ili neke druge DNK velicine 30kb, ali i kao posledica inverzije unutar samog pS50-290 plazmida koja je udaljila jedno *Nco*I restrikciono mesto oko 30kb. Ukoliko se desila insercija fragmenta od 30kb najverovatnije da se taj dogadjaj odigrao unutar bakteriocinskog regiona, dok u slucaju inverzije ona je najverovatnije svojim jednim krajem zahvatila bakteriocinski operon prilikom cega je doslo do promena u bakteriocinskom operonu, a posledica je sinteza ili manje kolicine istog ili izmenjenog bakteriocina. Da bi se potvrdila jedna od navedenih pretpostavki potrebno je klonirati deo DNK koji doprinosi otezanju *Nco*I fragmenta od 140kb. Ukoliko se radi o inserciji transpozona hibridizacioni signal sa kloniranim fragmentom ce se dobiti na udaljenom fragmentu bilo hromozoma ili plazmida, dok ako se radi o inverziji hibridizovace susedni *Nco*I fragment na

plazmidu pS50-290. Tacan tip promene unutar bakteriocinskog operona (da li doslo do promena unutar regulatornog regiona, strukturnog gena za bakteriocin ili gena za obradu preforme bakteriocina) moze se ustanoviti ili kloniranjem bakteriocinskog operona iz konjuganta MS1 ili analizom bakteriocina na proteinskom nivou sintetisanog u konjugantu MS1.

Plazmidi soja S50 (pS50-7, pS50-10a, pS50-10b i pS50-290) poseduju medjusobnu homologiju koja moze biti posledica istog porekla svih plazmida prisutnih u ovom soju. Ukoliko svi plazmidi soja S50 imaju isto poreklo u tom slucaju bi trebalo da plazmid pS50-7 koji je najmanji plazmid u ovom soju bude sadržan u svim ostalim plazmidima, medjutim ukoliko je doslo do izdvajanja nezavisnih plazmida u daljoj proslosti mogu se pojaviti razlike koje su proporcionalne vremenu usled nagomilavanja promena. Razlike koje postoje medju sada prisutnim plazmidima u soju S50 najverovatnije su posledica promena u toku samostalnog postojanja svakog od plazmida. Najvece promene su najverovatnije doziveli regioni koji ne doprinose selektivnom odrzanju ove DNK. Na slicno poreklo ukazuje i cinjenica da su najverovatnije svi oni posredno ili neposredno konjugabilni. Najvecu slicnost na restrikcionom nivou pokazuju plazmidi pS50-10a i pS50-10b koji su i iste velicine. Najverovatnije da su razlike nastale izmedju ova dva plazmida posledica inverzije (Slika 12). Ukoliko je ovo tacno u tom slucaju moze se tvrditi da soj S50 na promene sredine veoma cesto odgovara inverzijama unutar svoga genoma. S obzirom da plazmid pS50-10a nije nadjen u konjugantima moguće je da je region u kome je nastala promena u odnosu na pS50-10b odgovoran za gubljenje sposobnosti koprenosa, odnosno da se inverzija odigrala u okviru *oriT* sekvence. Cinjenica da svi plazmidi soja S50 pokazuju medjusobnu homologiju, a i da su posredno ili neposredno konjugabilni, sem pS50-10a, ukazuje na mogucnost da imaju zajednicko poreklo i da pripadaju teta-replicirajucim plazmidima. Ukoliko je to tacno oni mogu poslužiti kao osnova za razvoj stabilnih vektora za kloniranje DNK u ove bakterije.

Region koji se deletira iz plazmida pS50-290 prilikom ciscenja plazmida i prilikom konjugacije pokazuje homologiju sa plazmidima pS50-7 i pS50-10. Ovaj region najverovatnije ima zajednicko poreklo sa plazmidima pS50-7 i pS50-10, ali kakvo za sada nije moguće odgovoriti. Odgovor na ovo pitanje pokusan je da se da kloniranjem fragmenata B10T17 i B10T64 iz plazmida pS50-290 koji su homologni plazmidima pS50-7 i pS50-10 i njihovim sekvenciranjem, ali se definitivni odgovor moze dati tek kloniranjem sireg regiona ako je moguće i celog fragmenta koji se deletira. Kloniranjem i analizom celog fragmenta mozda ce se moći dati i odgovor zasto se on gubi prilikom ciscenja plazmida i pri konjugaciji. Na osnovu rezultata dobijenih hibridizacijom plazmida soja S50 sa probama B10T17 i B10 T64 i sekvenciranjem fragmenata B10T64 i njemu homolognog fragmenta iz plazmida pS50-7 moze se zakljuciti da se sada samo moze govoriti o homolognim sekvencama unutar plazmida soja S50, ali ne i o himernim plazmidima. Za kompletniju studiju o poreklu i odnosu plazmida soja S50 potrebno je klonirati pored plazmida pS50-7 i plazmide pS50-10a i 10b i homologne sekvence iz plazmida pS50-290.

VI ZAKLJUCCI

Na osnovu rezultata iznetih u ovom radu mogu se doneti sledeci zakljucci:

1. Ciscenjem plazmida iz soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50 je pokazano da su geni za sintezu proteinaze PI tipa i bakteriocina S50 locirani na plazmidu nazvanom pS50-290. Plazmid pS50-290 je veoma stabilan plazmid i gubi se, u tretmanu soja S50 agensima za ciscenje plazmida, u veoma niskoj frekvenci (1,6‰).

2. Analizom plazmida pS50-290 na PFGE ustanovljeno je da je on velicine oko 290kb.

3. Na osnovu konjugacionih ukrstanja soja S50 sa vecim brojem recipijentnih sojeva ustanovljeno je da konjugativna svojstva plazmida pS50-290 zavise od gena lociranih na njemu samom, odnosno plazmid pS50-290 je najverovatnije autokonjugativan ili Tra⁺ plazmid.

4. Analizom plazmidnog sastava konjuganata ustanovljeno je da drugi plazmidi soja S50 (pS50-7 i pS50-10b) poseduju sposobnost posrednog konjugacionog prenosa tj. poseduju gen za Mob protein i *oriT* sekvencu.

5. Ispoljavanje proteinazne aktivnosti u derivatu S50-20 i konjugantima koji poseduju plazmid pS50-290 je razlicito u odnosu na proteinaznu aktivnost soja S50. Konjuganti soja MG7284 i VEL1122 imaju za oko 10 puta povecanu proteoliticku aktivnost koja je posledica specificne geneticke strukture samih ovih sojeva. Takodje i smanjena proteinazna aktivnost konjuganata soja IL1403 je posledica geneticke strukture ovog soja. Konjuganti derivata S50-1 i S50-20-62 kao i derivat S50-20 pokazuju veliku raznolikost proteinazne aktivnosti. Derivat S50-20 ima smanjenu proteinaznu aktivnost za oko 40%. Kod konjuganta SS1 proteinazna aktivnost je nedetektabilna, dok konjugant MS1 poseduje proteinaznu aktivnost skoro istog nivoa kao i soj S50.

6. Bakteriocinska aktivnost konjuganata je zavisna od soja u kome se nalazi plazmid pS50-290. Ona je generalno niza u konjugantima soja IL1403, MG7284 i VEL1122 u poredjenju sa sojem S50. Konjuganti derivata S50-1 i S50-20-62 poseduju povecanu (sem kod konjuganta MS1) bakteriocinsku aktivnost. U konjugantu MS1 u okviru *NcoI* fragmenta od 140kb doslo je do rearanzmana koji je odgovoran za smanjenu sintezu bakteriocina.

7. Analizom strukture plazmida pS50-290 u konjugantima ustanovljeno je da on u njima, a takodje i u derivatu S50-20, poseduje jedno *SmaI* restrikciono mesto, dok u soju S50 poseduje dva *SmaI* restrikciona mesta. Gubitak jednog *SmaI* restrikcionog mesta je posledica delecije u regionu oko *SmaI* restrikcionog mesta na poziciji 80kb. Fragment DNK koji se deletira pri konjugaciji i ciscenju plazmida pokazuje visok stepen homologije sa ostalim (pS50-7, pS50-10a i pS50-10b) plazmidima soja S50.

8. Obelezavanjem derivata S50-1 spektinomicinskom rezistencijom izolovani su mutanti koji pokazuju visok nivo rezistencije na ovaj antibiotik (500µg/ml) i koji poseduju inverziju u hromozomu. Mutanti sa istom inverzijom izolovani su i u derivatu S50-20-62 koji je takodje pokazivao visok nivo rezistencije na spektinomicin. Velicinu inverzije nije bilo moguće odrediti, a

može se kretati u opsegu između 180 i 790kb. Indukcija rezistencije na spektinomycin u drugim genetičkim osnovama (sojevi MG7284 i IL1403) nije koincidirala sa nastajanjem inverzije.

9. Plazmid pS50-290 pokazuje veoma jaku retardaciju na PFGE i zaostaje u bunarcicu. Takođe i fragmenti sečne plazmidne DNK, za koje se vezuju najverovatnije proteini partitionog sistema koji doprinose njegovoj stabilnosti, zaostaju u bunarcicu.

10. Plazmidi soja S50 (pS50-7, pS50-10a, pS50-10b i pS50-290) poseduju sekvence koje su međusobno homologe i koje ukazuju na zajedničko poreklo svih plazmida soja S50.



VII LITERATURA

- Ajdic, D. (1990). Kloniranje i analiza "levog" terminusa inverzije u laktoznom regionu hromozoma *E. coli* K12. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu
- Anderson, D. G. and McKay, L. L. (1983). Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 549-552
- Andrup, L., Damdaard, J. and Wassermann, K. (1993). Mobilization of small plasmids in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is accompanied by specific aggregation. *J. Bacteriol.* **175**, 6530-6536
- Batt, C. A. (1986). Genetic engineering of *Lactobacillus*. *Food Technology* **40**, 95-112
- van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Geis, A., Kok, J. and Venema, G. (1989). Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1187-1191
- van Belkum, M. J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N. and Abee, T. (1991). The bacteriocin lactococcin A specifically increases the permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.* **173**, 7934-7941
- Beverley, S. M. (1988). Characterization of the "unusual" mobility of large circular DNAs in pulsed field-gradient electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **16**, 925-930
- Birnboim, A. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523
- Bringel, F., van Alstine, G. L. and Scott, J. R. (1992). Transfer of Tn916 between *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains is nontranspositional: evidence for chromosomal fertility function in strain MG1363. *J. Bacteriol.* **174**, 5840-5847
- Brisson-Noël, A., Arthur, M. and Courvalin, P. (1988). Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 1739-1745
- Bruinenberg, P. G., Vos, P. and de Vos, V. M. (1992). Proteinase overproduction in *Lactococcus lactis* strains: Regulation and effect on growth and acidification in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 78-84
- Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. S., Michel, M. and Denarie, J. (1979). Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* **113**, 229-242
- Chopin, A., Chopin, M. C., Moillo-Batt, A. and Langella, P. (1984). Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* **11**, 260-263
- Clewell, D. B. and Weaver, K. E. (1989). Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*: a review. *Plasmid* **21**, 175-184
- Datta, N. (1985). Plasmids as organisms. In "Plasmids in bacteria". Vol. 30, 3-16. Basic life sciences; Plenum Press, New York
- Davey, G. P. (1984). Plasmid associated with diplococcin production in *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 895-896
- Dodd, H. M., Horn, N. and Gasson, M. J. (1990). Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 555-566
- Dreiseikermann, B. (1994). Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol. Rev.* **58**, 293-316
- Drlica, K. (1987). The nucleoid. In "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*" Neidhart C. F. (ed.) Vol. 1. p. 91-103. Cellular and molecular biology.
- Dufour, A., Thuault, D., Boulliou, A., Bourgeois, C. M. and Le Pennec, J. P. (1991).

- Plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in a *Lactococcus lactis* strain and purification of the inhibitory peptide. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2423-2429
- Dunny, G. M. (1990). Genetic functions and cell-cell interactions in the pheromone-inducible plasmid transfer system of *Streptococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **4**, 689-696
- Dunny, G. M., Brown, B. L. and Clewell, D. B. (1978). Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for bacterial sex pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **75**, 3479-3483
- Dunny, G. M., Chung, J. W., Gallo, J. C., Kao, S. M., Trotter, K. M., Korman, R. Z., Olmsted, S. B., Ruhfel, R., Torres, O. R. and Zahler, S. A. (1991). Cell-cell interactions and conjugal gene transfer events mediated by the pheromone-inducible plasmid transfer system and the conjugative transposon encoded by *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10. In "Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci and enterococci". G. M. Dunny, P. P. Cleary and L. L. McKay (eds.). p.9-15. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Dunny, G. M., Craig, R. A., Carron, R. L. and Clewell (1979). Plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: production of multiple pheromones by recipients. *Plasmid* **2**, 454-465
- Duwat, P., Ehrlich, S. D. and Gruss, A. (1992). Use of degenerate primers for polymerase chain reaction cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *recA* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2674-2678
- Expert, D., Riviere, F. and Tourneur, J. (1982). The state of phage ψ DNA in lysogenic cells of *Agrobacterium tumefaciens*. *Virology* **121**, 82-94
- Fitzgerald, G. F. and Gasson, M. J. (1988). In vivo gene transfer systems and transposons. *Biochimie* **70**, 489-502
- Flannagan, S. E. and Clewell, D. B. (1991). Conjugative transfer of Tn916 in *Enterococcus faecalis*: *trans* activation of homologous transposons. *J. Bacteriol.* **173**, 7136-7141
- Gasson, M. J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* **154**, 1-9
- Gasson, M. J. and Davies, F. L. (1980). High-frequency conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation. *J. bacteriol.* **143**, 1260-1264
- Geis, A. (1982). Transfection of protoplasts of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **15**, 119-122
- Geis, A., Singh, J. and Teuber, M. (1983). Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 205-211
- Gerdes, K. and Molin, S. (1986). Partitioning of plasmid R1 structural and functional analysis of the *parA* locus. *J. Mol. Biol.* **190**, 269-279
- Gilliland, S. E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 175-188
- Gilliland, S. E. And Speak, M. L. (1977). Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* towards intestinal and borne pathogens in associative culture. *J. Food Prot.* **40**, 820-823
- Gough, J. A. and Murray, N. E. (1983). Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **166**, 1-19
- Gruss, A. and Ehrlich, S. D. (1989) The family of highly interrelated single-stranded deoxiribonucleic acid plasmids. *Microbiol. Rev.* **53**, 231-241
- Gupta, R. K. and Batish, V. K. (1992) Genetic evidence for plasmid-encoded lactococcin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 484. *Curr. Microbiol.* **24**, 231-238
- Haandrikman, A. J., Kok, J., Laan, H., Soemitro, S., Ledebøer, A. M., Konings, W. N. and Venema, G. (1989). Identification of gene required for maturation of an extracellular lactococcal serine proteinase. *J. Bacteriol.* **171**, 2789-2794
- Haandrikman, A. J., van Leeuwen, C., Kok, J., Vos, P., de Vos, V. and Venema, G. (1990).

- Insertion elements on lactococcal plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1890-1896
- Haandrikman, A. J., Meesters, R., Laan, H., Konings, W. N., Kok, J. and Venema, G. (1991). Processing of the lactococcal extracellular serine proteinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1899-1904
- Harmon, K. S. and McKay, L. L. (1987). Restriction enzyme analysis of lactose and bacteriocin plasmids from *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* WM4 and cloning of *BclI* fragments coding for bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1171-1174
- Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E. and Klaenhammer, T. R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **52**, 384-387
- Heinemann, J. A. and Sprague, G. F. (1989). Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature (London)* **340**, 205-209
- Herrman, B., Bucan, M., Mains, P. E., Frischauf, A. M., Silver, L. M. and Lerach, H. (1986). Genetic analysis of the proximal portion of the mouse *t* complex: evidence for a second inversion within *t* haplotypes. *Cell* **44**, 469-476
- Hershfield, V. (1979). Plasmids mediating multiple drug resistance in group B *Streptococcus*: transferability and molecular properties. *Plasmid* **2**, 137-149
- Hill, S. H. A. and Gasson, M. J. (1986). A qualitative screening procedure for the detection of casein hydrolysis by bacteria, using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Res.* **53**, 625-629
- Holo, H. and Nes, I. F. (1989). High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilised media. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3119-3123
- Holo, H., Nilssen, Ø. and Nes, I. F. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: Isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* **173**, 3879-3887
- Hopwood, D. A., Bib, J. M., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, J. D., Smith, C. P., Ward, J. M., Schempf, H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. Norwich, UK, The John Innes Foundation
- Horn, N., Swindell, S., Dodd, N. and Gasson, M. J. (1991). Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 129-135
- Jansen, P. R. and Hammer, K. (1993). Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4363-4366
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., Brooks, G. F., Butel, J. S. and Ornston, L. N. (1989). Transfer of DNA. In "Medical Microbiology" 18th Edition, p.85-87. Appleton & Lange, East Norwalk
- Jouanin, L., Tourneur, J., Tourneur, C. and Casse-Delbart, F. (1986). Restriction maps and homologies of the three plasmids of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. *Plasmid* **16**, 124-134
- Kempler, G. M. and McKay, L. L. (1979). Genetic evidence for plasmid-linked lactose metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 1041-1043
- Kilic, A. O., Vijayakumar, M. N. and Al-Khaldi, S. F. (1994). Identification and nucleotide sequence analysis of a transfer-related region in the streptococcal conjugative transposon Tn5252. *J. Bacteriol.* **176**, 5145-5150
- Kinashi, H. and Shimaji-Murayama, M. (1991). Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **173**, 1523-1529
- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 337-349
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 39-86
- Klaenhammer, T. R. and Sanozky, R. B. (1985). Conjugal transfer from *Streptococcus lactis* ME2

- of plasmids encoding phage resistance, nisin resistance and lactose-fermenting ability: evidence for high-frequency conjugative plasmid responsible for abortive infection of virulent bacteriophage. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 1531-1541
- Kojic, M. (1992). Geneticka i biohemijska karakterizacija proteinaznog sistema bakterija mlecne kiseline. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu
- Kojic, M., Gasson, M. J. and Topisirovic, L. (1993). Characterization of large conjugative plasmid of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, p20
- Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A. and Topisirovic, L. (1991). Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1835-1837
- Kok, J. (1987). Proteinases of lactic acid streptococci. Ph. D thesis, University of Groningen
- Kok, J., Van der Vossen, J. M. B. M. and Venema, G. (1984). Construction of plasmid cloning vectors for lactic acid streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 726-731
- Kok, J. and Venema, G. (1988). Genetics of proteinases of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 475-488
- Kondo, J. K. and McKay, L. L. (1982). Transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1213-1215
- Kondo, J. K. and McKay, L. L. (1984). Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts: optimization and use in molecular cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 252-259
- Krah, E. R. III. and Marcina, F. L. (1989). Genetic analysis of the conjugal transfer determinants encoded by the streptococcal broad-host-range plasmid pIP501. *J. Bacteriol.* **171**, 6005-6012
- Kuhl, S. A., Larsen, L. D. and McKay, L. L. (1979). Plasmid profiles of lactose and proteinase-deficient mutants of *Streptococcus lactis* C10, M13 and M18. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 1193-1195
- Laan, H. and Konings, W. N. (1989). Mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3101-3106
- Laan, H. and Konings, W. N. (1991). Autoproteolysis of the extracellular serine proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2586-2590
- Lacks, S. (1979). Uptake of circular DNA and mechanism of DNA transport in genetic transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **138**, 404-409
- Laemmli, U. K. and Favre, M. (1983). Maturation of head of bacteriophage T4. 1. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* **80**, 575-599
- Le Bourgeois, P., Mata, M. and Ritzenthaler, P. (1989). Genome comparison of *Lactococcus* strain by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**, 65-70
- Le Boutgeois, P., Lautier, M., Mata, M. and Ritzenthaler, P. (1992). Physical and genetic map of the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *J. Bacteriol.* **174**, 6752-6762
- Leenhouts, K. J., Kok, J. and Venema, G. (1990). Stability of integrated plasmids in the chromosome of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2726-2735
- Leenhouts, K. J., Gitema, J., Kok, J. and Venema, G. (1991). Chromosomal stabilization of the proteinase genes in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2568-2575
- van der Lelie, D., Chavarri, F., Venema, G. and Gasson, M. J. (1991). Identification of new genetic determinant for cell aggregation associated with lactose plasmid transfer in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 201-206
- van der Lelie, D., van der Vossen, J. M. B. M. and Venema, G. (1988). Effect of plasmid incompatibility on DNA transfer to *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 865-871
- Lennox, E. S. (1955). Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1.

- Lin, Y., Kieser, H. M., Hopwood, D. A. and Chen, C. W. (1993). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.* **10**, 923-933
- Liu, W. and Hansen, J. N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2551-2558
- London, J. (1976). The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. *Ann. Rev. Microbiol.* **30**, 279-301
- Lucey, M., Daly, C. and Fitzgerald, G. F. (1992) Cell surface characteristics of *Lactococcus lactis* harbouring pCI528, a 46 kb plasmid encoding inhibition of bacteriophage adsorption. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2137-2143
- Lucey, M., Daly, C. and Fitzgerald, G. F. (1993). Analysis of a region from the bacteriophage resistance plasmid pCI528 involved in its conjugative mobilization between *Lactococcus* strains. *J. Bacteriol.* **175**, 6002-6009
- Macrina, F. L., Kopecko, D. J., Jones, K. R., Ayers, D. J. and McCowen, S. M. (1978). A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* **1**, 417-420
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory
- McIntyre, D. A. and Harlander, S. K. (1989). Genetic transformation of intact *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* by high-voltage electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 604-610
- McIntyre, D. A. and Harlander, S. K. (1989a). Improved electroporation efficiency of intact *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cells grown in defined media. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2621-2626
- McKay, L. L., Baldwin, K. A. and Walsh, P. M. (1980). Conjugal transfer of genetic information in group N streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 84-91
- McKay, L. L. and Baldwin, K. A. (1984). Conjugative 40-megadalton plasmid in *Streptococcus lactus* subsp. *diacetylactis* DRC3 is associated with resistance to nisin and bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 68-74
- Messing, J. (1979). A multipurpose cloning system based on single-stranded DNA bacteriophage M13. *Recomb. Dna Tech. Bull.* **2** (2), 43
- Messing, J. (1983). New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.* **101**, 20-78
- Mills, D. A., Choi, C. K., Dunny, G. M. and McKay, L. L. (1994). Genetic analysis of region of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* plasmid pRS01 involved in conjugative transfer. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4413-4420
- Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T. and Yura, T. (1981). Multiple nutritional requirements of lactobacilli: Genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *J. Bacteriol.* **148**, 64-71
- Mundt, L. J. O. (1986). Lactic acid streptococci. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol. 2, p.1065-1066. The Williams & Wilkins Co Baltimore, London, Los Angeles, Sydney
- Murphy, E. (1989). Transposable elements in Gram-positive bacteria. In "Mobile DNA". Berg, D. E. and Howe, M. M. (eds.), p.269-288. American Society for Microbiology, Washington
- Nes, I. F. (1994). Usmeno saopstenje
- Neve, H., Geis, A. and Teuber, M. (1984). Conjugal transfer and characterization of bacteriocin plasmids in group N (lactic acid) streptococci. *J. Bacteriol.* **157**, 833-838
- Nissen-Meyer, J. , Holo, H., Havarstein, L. S., Sletten, K. and Nes, I. F. (1992a). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* **174**, 5686-5692
- Nissen-Meyer, J. , Lillehaug, D. and Nes, I. F. (1992b). The plasmid-encoded lactococcal envelope-associated proteinase is encoded by chromosomal gene in *Lactococcus lactis*

- subsp. *cremoris* BC101. Appl. Environ. Microbiol. **58**, 750-753
- Nissen-Meyer, J., Håvarstein, L. S. Holo, H. Sletten, K. and Nes, I. F. (1993). Association of the lactococcal A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. J. Gen. Microbiol. **139**, 1503-1509
- Nordstöm, K. (1985). Replication, incompatibility and partition. In "Plasmids in bacteria". Vol. 30, p.119-123. Basic life sciences; Plenum Press, New York
- Nordstöm, K. and Austin, S. J. (1989). Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. Annu. Rev. Genet. **23**, 37-69
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. Microbiol. Rev. **51**, 381-395
- Olson, N. F. (1990). The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. FEMS Microbiol. Rev. **87**, 131-148
- Petzel, J. P. and McKay, L. L. (1992). Molecular characterization of the integration of the lactose plasmid from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 into the chromosome of *L. lactis* subsp. *lactis*. Appl. Environ. Microbiol. **58**, 125-131
- Polzin, K. M. and Shimizu-Kadota, M. (1987). Identification of a new insertion element, similar to Gram-negative IS26, on the lactose plasmid of *Streptococcus lactis* ML3. J. Bacteriol. **169**, 5481-5488
- Polzin, K. M. and McKay, L. L. (1991) Identification, DNA sequence, and distribution of IS981, a new, high-copy-number insertion sequence in lactococci. Appl. Environ. Microbiol. **57**, 734-743
- Porter, R. D. (1988). Modes of gene transfer in bacteria. In "Genetic Recombination" p. 1-47. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Powell, I. B., Achen, M. G., Hillier, A. J. and Davidson, B. E. (1988). A simple and rapid method for genetic transformation of lactic streptococci by electroporation. Appl. Environ. Microbiol. **54**, 655-660
- Poyart-Salmeron, C., Trieu-Cuot, P., Carlier, C, and Courvalin, P. (1990). The integration-excision system of the conjugative transposon Tn1545 is structurally and functionally related to those of lambdaoid phages. Mol. Microbiol. **4**, 1513-1521
- Prevots, F., Remy, E., Mata, M. and Ritzenthaler, P. (1994). Isolation and characterization of large lactococcal phage resistance plasmids by pulsed-field gel electrophoresis. FEMS Microbiol. Lett. **117**, 7-13
- Pritchard, G. G. and Coolbear, T. (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **12**, 179-206
- Rauch, P. J. G. (1993). The *Lactococcus lactis* nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276. Ph. D thesis, University of Wageningen
- Rauch, P. J. G. and deVos, W. M. (1992). Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. **174**, 1280-1287
- Romero, D. A., and Klaenhammer, T. R. (1990). Characterization of insertion sequence IS946, an iso-ISS1 element, isolated from the conjugative lactococcal plasmid pTR2030. J. Bacteriol. **172**, 4151-4160
- Ruhfel, R. E., Manias, D. A. and Dunny, G. M. (1993). Cloning and characterization of a region of the *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid, pCF10, encoding a sex pheromone-binding function. J. Bacteriol. **175**, 5253-5259
- Sakaguchi, K. (1990). Invertrons, a class of structurally and functionally related genetic elements that includes linear DNA plasmids, transposable elements, and genomes of adeno-type viruses. Microbiol. Rev. **54**, 66-74
- Sanders, M. E. and Nicholson, M. A. (1987). A method for genetic transformation of nonprotoplasted *Streptococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. **53**, 1730-1736
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating

- inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467
- Schäfer, A., Jahns, A., Geis, A. and Teuber, M. (1991). Distribution of the IS elements ISS1 and IS904 in lactococci. FEMS Microbiol. Lett. 80, 311-318
- Scherwitz, K. M., Baldwin, K. A. and McKay, L. L. (1983). Plasmid linkage of a bacteriocin-like substance in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* strain WM4: transferability to *Streptococcus lactus*. Appl. Environ. Microbiol. 45, 1506-1512
- Scherwitz-Harmon, K. S. and McKay, L. L. (1987). Restriction enzyme analysis of lactose and bacteriocin plasmids from *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* WM4 and cloning of *Bcl*I fragments coding for bacteriocin production. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1171-1174
- Scott, J. R. (1991). Mechanism of transposition of conjugative transposons. In "Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci and enterococci". G. M. Dunny, P. P. Cleary and L. L. McKay (eds.), p.28-33. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Scott, J. R. (1992). Sex and the single circle: conjugative transposition. J. Bacteriol. 174, 6005-6010
- Scott, J. R., Kirchman, P. A. and Caparon, M. G. (1988). An intermediate in transposition of the conjugative transposon Tn916. Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 4809-4813
- Seegers, J. F. M. L. (1994). Lactococcal plasmids. Ph. D thesis, University of Groningen
- Siezen, R. J., de Vos, W. M., Leunissen, J. A. M. and Dijkstra, B. W. (1991). Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, The family of subtilisin-like serine proteinases. Protein Engineering 4, 719-737
- Simon, D., Rouault, A. and Chopin, M. C. (1985). Protoplast transformation of group N streptococci with cryptic plasmids. FEMS Microbiol. Lett. 26, 239-241
- Simon, D., Rouault, A. and Chopin, M. C. (1986). High-efficiency transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA. Appl. Environ. Microbiol. 52, 394-395
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517
- Stanisich, V. A. (1988). Identification and analysis of plasmids at the genetic level. In "Methods in microbiology" Vol.21, Grinsted, J. & Bennet, P. M. (eds), p.11-14. Academic Press, New York
- Steele, J. L. and McKay, L. L. (1986). Partial characterization of the genetic basis for sucrose metabolism and nisin production in *Streptococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 51, 57-64
- Stoddard, G. W., Petzel, J. P., van Belkum, M. J., Kok, J. and McKay, L. L. (1992). Molecular analyses of the lactococcal A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* WM4. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1952-1961
- Tagg, J. R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 40, 722-756
- Tanskanen, E. I., Tulloch, D. L., Hillier, A. J. and Davidson, B. E. (1990). Pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I digests lactococcal genomic DNA, a novel method of strain identification. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3105-3111
- Terzaghi, B. E. and Sandine, W. E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl. Microbiol. 29, 807-813
- Thomas, T. D. and Pritchard, G. G. (1987). Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. FEMS Microbiol. Rev. 46, 245-268
- Thomas, W. D. and Archer, G. L. (1989). Identification and cloning of the conjugative transfer region of *Staphylococcus aureus* plasmid pGO1. J. Bacteriol. 171, 684-691
- Torres, O. R., Korman, R. Z., Zahler, S. A. and Dunny, G. M. (1991). The conjugative transposon Tn925: Enhancement of conjugal transfer by tetracycline in *Enterococcus faecalis* and mobilization of chromosomal genes in *Bacillus subtilis* and *E. faecalis*. Mol. Gen. Genet.

- Trieuquot, P., Derlot, E. and Courvalin, P. (1993). Enhanced conjugative transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol. Lett. **109**, 19-24
- Tulloch, D. L., Finch, L., Hillier, A. J. and Davidson, B. (1991). Physical map of the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DL11 and localization of six putative rRNA operons. J. Bacteriol. **173**, 2768-2775
- Tynkkynen, S., von Wright, A. and Syvaöja, E. (1989). Peptide utilization encoded by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* SSL135 chromosomal DNA. Appl. Environ. Microbiol. **55**, 2690-2695
- Venema, K., Abee, T., Haandrikman, A. J., Leenhouts, K.J., Kok, J., Konings, W. N. and Venema, G. (1993). Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. **59**, 1041-1048
- Vijayakumar, M. N. and Ayalew, S. (1993). Nucleotide sequence analysis of the termini and chromosomal locus involved in site-specific integration of the streptococcal conjugative transposon Tn5252. J. Bacteriol. **175**, 2713-2719
- Vos, P., Boerringer, I. J., Buist, G., Haandrikman, A. J., Nijhuis, M., de Reuver, M. B., Siezen, R. J., Venema, G., de Vos, W. M. and Kok, J. (1991). Engineering of the *Lactococcus lactis* proteinase by construction hybrid enzymes. Protein Engineering **4**, 479-484
- de Vos, W. M. (1987). Gene cloning and expression in lactic streptococci. FEMS Microbiol. Rev. **46**, 281-295
- de Vos, W. M., Mulders, J. W. M., Siezen, R. J., Hugenholtz, J. and Kuipers, O. P. (1993). Properties of nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. **59**, 213-218
- de Vos, W. M., Vos, P., de Haard, H. and Boerringer, I. (1989). Cloning and expression of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 gene encoding an extracellular serine proteinase. Gene **85**, 169-176
- Waterbury, P. G. and Lane, M. J. (1987). Generation of lambda concatemers for use as pulsed field electrophoresis size markers. Nucleic Acids Research **15**, 3930
- Wheatcroft, R. and Williams, P. A. (1981). Rapid methods for the study of both stable and unstable plasmids in *Pseudomonas*. J. Gen. Microbiol. **124**, 433-437
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1984). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene **33**, 103-119
- Zajdel, J. K., Ceglowski, P. and Dobrzanski, W. T. (1985). Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris* 202. Appl. Environ. Microbiol. **49**, 969-974



