



PD 16742



003112104

COBISS

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

NATAŠA E. MILADINOV

ANALIZA REGULACIJE PROTEINAZNIH GENA PRIRODNOG IZOLATA

Lactococcus lactis subsp. *lactis* BGIS29

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 1999

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, pod rukovodstvom prof. dr Ljubiše Topisirovića i Microbial Ingredients Section, NIZO Food Research, The Netherlands, pod rukovodstvom dr Oscar Kuipers-a. Ovom prilikom želim da se zahvalim:

prof. dr Ljubiši Topisiroviću, koji me je uveo u zanimljiv i neistražen svet bakterija mlečne kiseline, na ukazanom poverenju, podršci i razumevanju, na brojnim korisnim diskusijama, savetima i sugestijama, koje su doprinele brznoj i efikasnoj izradi ovog rada, kao i za kritičku ocenu ovog rada;

prof. dr Dragi Simić, koja me je još u toku studija zainteresovala za čudesan svet mikroorganizama, za prva znanja iz oblasti mikrobiologije kao i za kritičku ocenu ovog rada;

prof. dr Jeleni Knežević, koja mi je pomogla u savladavanju prvih koraka u radu sa mikroorganizmima, za prva praktična znanja iz mikrobiologije, kao i za kritičku ocenu ovog rada;

mr Bojani Bojović, za strpljenje i nesebičnu pomoć u savladavanju osnovnih tehnika molekularne genetike;

dr Oscar Kuipers-u, koji mi je omogućio da deo ovog rada uradim u njegovoj laboratoriji u NIZO-u, Holandija, za nesebičnu pomoć, brojne korisne diskusije i drugarsku atmosferu koji su mi olakšali rad u novoj laboratoriji;

Ivani, Đorđu, Raci, Oliveri, Slavici, Nataši, Ireni, Vanesi, Maji i Jeleni, sa kojima sam delila sve uspone i padove, za nesebičnu pomoć, razgovore, strpljenje i drugarsku atmosferu, bez kojih bi rad u laboratoriji bio nezamisliv;

Mariji, Patriku i Ričardu, koji su mi pomogli u savladavanju novih metoda i koji su doprineli da moj rad i boravak u laboratoriji u Holandiji budu mnogo više od običnog studijskog boravka;

Miladinu, za sve skenirane slike u ovom radu;

mojim roditeljima; i

mom Goranu, za razumevanje, podršku i strpljenje...

i svim ostalima koji su na bilo koji način omogućili i olakšali izradu ovog rada.

APSTRAKT

Prirodni izolat *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29 proizvodi kiselinu proteinazu tipa PI i bakteriocin IS29. Prisustvo kazitona u minimalnom medijumu (MM) ima specifičan uticaj na regulaciju aktivnosti gena za proteinazu soja BGIS29. Transkripcione genske fuzije sa *E. coli* β -glukuronidaznim genom (*gusA*) su korišćene za izučavanje medijum zavisne ekspresije promotora *prt* gena (P_{prtP} i P_{prtM}). Merenjem aktivnosti enzima β -glukuronidaze i kvantitativnom Northern blot analizom je pokazano da je aktivnost oba (P_{prtP} i P_{prtM}) promotora kontrolisana kazitonom na transkripcionom nivou, ali je stepen njihove regulacije različit. Kada P_{prtP} promotor kontroliše ekspresiju *gusA* gena, aktivnost enzima β -glukuronidaze linearno opada sa porastom koncentracije kazitona u medijumu za rast bakterija (0.1% do 2%). U slučaju P_{prtM} promotora regulacija nije tako jaka kao u slučaju P_{prtP} promotora. Visoka koncentracija kazitona prisutna u MM ima inhibitoran efekat na aktivnost P_{prtM} promotora, ali nema linearne korelacije. Deleciona analiza regulatornog regiona *prt* gena je pokazala da je celokupna informacija neophodna za punu aktivnost i regulaciju P_{prtM} promotora sadržana u sekvenci regiona dužine 180 bp koji sadrži oba *prt* promotora.

Izučavan je uticaj nukleotidne sekvence na krivljenje DNK. Eksperimenti pokretljivosti DNK fragmenata u gelu su korišćeni u kombinaciji sa kompjuterskom predikcijom potencijalnih zakrivljenih regiona DNK. Kompjuterska predikcija krivljenja DNK je pokazala da region uzvodno od -35 i -10 regiona P_{prtP} promotora sadrži potencijalni centar krivljenja. Eksperimenti pokretljivosti DNK fragmenata u gelu su pokazali da je PCR fragment veličine 350 bp, koji sadrži kompletan regulatorni region, zakrivljen. Koeficijent retardacije (R) je 1.2 u odsustvu $MgCl_2$ i 1.4 u prisustvu $MgCl_2$. Kraći PCR fragment (270 bp) koji sadrži oba *prt* promotora je, takođe, zakrivljen, R je 1.1 u odsustvu $MgCl_2$ i 1.5 u prisustvu $MgCl_2$.

Inaktivacija ("knock-out") potencijalnog regulatornog gena, *prtR*, je urađena insercijom plazmida $pG^+host9::ISS1$ u hromozom soja *Lactococcus lactis* NZ9000. Merenjem aktivnosti enzima β -glukuronidaze je pokazano da nema aktivnosti P_{prtP} promotora u "knock-out" soju. Rezultati ukazuju da je potencijalni regulatorni gen aktivator.

ABSTRACT

Natural isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29 produces the PI-type proteinase and bacteriocin IS29. The presence of casitone in chemically defined medium (CDM) has a specific influence on the regulation of the proteinase activity in the strain BGIS29. Transcriptional gene fusion's with *E. coli* β -glucuronidase gene (*gusA*) were used to study medium dependent expression of both P_{prtP} and P_{prtM} promoters. The β -glucuronidase assays and the quantitative Northern blot analysis showed that activities of P_{prtP} and P_{prtM} promoters are controlled by casitone at the transcriptional level but their regulation is occurring in different manner. When the P_{prtP} promoter controlled the *gusA* gene expression, the β -glucuronidase activity was gradually decreasing with increase of casitone in the growth medium (0.1% to 2%). In the case of the P_{prtM} promoter the regulation is not that strong as in the case of the P_{prtP} promoter. Higher concentrations of casitone present in CDM had an inhibitory effect on the P_{prtM} promoter but there is no linear correlation. Deletion analysis of regulatory region of the *prt* genes revealed that all information needed for full activity and regulation of the P_{prtM} promoter is retained within 180-bp region that contains both the P_{prtP} and P_{prtM} promoters sequences.

The influence of nucleotide sequence context on the DNA bending was investigated. Gel mobility experiments are used together with the computer-assisted prediction of a putative DNA bending. Computer-assisted prediction of the DNA bending showed that the region upstream of the -35 and -10 regions of the P_{prtP} promoter contains a putative center of the bending. Gel mobility experiments revealed that the PCR fragment of 350 bp containing intact regulatory region is curved, the retardation value (R) was 1.2 in the absence of the $MgCl_2$ and 1.4 in the presence of the $MgCl_2$. Shorter PCR fragment (270 bp) containing both *prt* promoters is also curved, R were 1.1 and 1.5 in the absence and presence of $MgCl_2$, respectively.

A knockout of a putative regulatory gene, *prtR*, was done by insertion of the plasmid pG⁺host9::IS_{S1} into chromosome of the strain *Lactococcus lactis* NZ9000. There was no the β -glucuronidase activity controlled by P_{prtP} promoter in the knock-out strain. The results indicates that a putative regulatory gene could be an activator.

UVOD	1
PROTEOLITIČKI SISTEM BAKTERIJA MLEČNE KISELINE	2
PROTEINAZE BAKTERIJA MLEČNE KISELINE	4
Genetička i biohemijska svojstva.....	4
Lokalizacija proteinaze	5
TRANSPORT AMINOKISELINA I OLIGOPEPTIDA U ĆELIJU	6
Transport aminokiselina.....	6
Transport oligopeptida	7
Transport hidrofилnih di/tripeptida (DtpT)	8
Transport hidrofobnih di/tripeptida.....	9
PEPTIDAZE BAKTERIJA MLEČNE KISELINE	9
Aminopeptidaze	9
Peptidaze koje vrše hidrolizu peptida koji sadrže prolin	10
Posebne aminopeptidaze	11
Endopeptidaze.....	11
Karboksipeptidaze.....	12
Lokacija peptidaza	12
KONTROLA GENSKE EKSPRESIJE U BAKTERIJA MLEČNE KISELINE.....	12
Bakterijski promotori	12
Mesto inicijacije transkripcije.....	14
Signali za inicijaciju translacije	14
Promotori proteinaznih gena laktokoka	14
REGULACIJA GENSKE EKSPRESIJE KOD BAKTERIJA.....	15
Regulacija na nivou transkripcije.....	16
Krivljenje DNK i kontrola transkripcije	18
REGULACIJA EKSPRESIJE <i>prt</i> GENA	20
PROTEINAZNI REGION PRIRODNOG IZOLATA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGIS29	21
CILJ RADA	24
MATERIJAL I METODE	25
1. BAKTERIJSKI SOJEVI	25
2. KORIŠĆENI I KONSTRUISANI PLAZMIDI.....	26

3. KULTIVISANJE BAKTERIJA.....	26
4. METODE IZOLACIJE DNK.....	26
4.1. Mini-metoda izolacije velikih plazmida iz laktokoka.....	26
4.2. Mini-metoda izolacije plazmida iz laktokoka.....	27
4.3. Prečišćavanje DNK fenolom (PCI procedura).....	27
4.4. Metoda izolacije totalne DNK iz laktokoka.....	28
4.5. Metoda izolacije velike količine plazmidne DNK iz laktokoka.....	28
4.6. Prečišćavanje PCR fragmenata.....	29
5. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK.....	29
5.1. Sečenje restrikcionim enzimima.....	29
5.2. Ligacija DNK fragmenata.....	30
5.3. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom (“Polymerase Chain Reaction”).....	30
6. STRUKTURNA ANALIZA DNK.....	31
6.1. Teorijska analiza strukture DNK.....	31
7. ELEKTROFOREZA DNK.....	31
7.1. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu.....	31
7.2. Vertikalna elektroforeza DNK na poliakrilamidnom gelu.....	31
8. TRANSFORMACIJA ĆELIJA SA DNK.....	33
8.1. Transformacija laktokoka elektroporacijom.....	33
9. DNK/DNK HIBRIDIZACIJA (SOUTHERN BLOT).....	33
9.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane.....	33
9.2. Obeležavanje probe.....	34
9.3. Hibridizacija DNK.....	34
10. SEKVENCIRANJE DVOLANČANE DNK.....	35
10.1. Denaturisanje plazmidne DNK.....	35
10.2. Vezivanje matrice i prajmera i reakcije sekvenciranja.....	35
11. METODE RADA SA RNK.....	36
11.1. Izolacija totalne RNK iz laktokoka.....	36
11.2. Određivanje mesta početka transkripcije gena (“primer extension”).....	36
11.3. Elektroforeza RNK na formaldehidnom gelu.....	37
11.4. Hibridizacija DNK/RNK (“Northern blot”).....	37
11.5. Obeležavanje probe (“Nick”-translacija).....	38
11.6. Hibridizacija DNK/RNK.....	38
12. TEST AKTIVNOSTI β -GLUKURONIDAZE.....	39

12.1. Detekcija aktivnosti β -glukuronidaze na čvrstoj podlozi	39
12.2. Priprema ćelijskog ekstrakta za enzimski esej.....	39
12.3. Enzimski esej	39
12.4. Određivanje ukupne količine proteina	39
13. KONSTRUKCIJA “KNOCK-OUT” SOJEVA	40
13.1. Transformacija laktokoka plazmidom pGh9::ISS1	40
13.2. Transpozicija.....	40
13.3. Eliminacija plazmida pGh9::ISS1 iz hromozoma i fiksiranje mutacije.....	40
13.4. API test i kriva rasta.....	41
 REZULTATI	 42
1. KARAKTERIZACIJA REGULATORNOG REGIONA <i>prt</i> GENA SOJA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGIS29	42
1.1. Umnožavanje i kloniranje regulatornog regiona proteinaznih gena soja <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGIS29	42
1.2. Određivanje aktivnosti β -glukuronidaze transformanata <i>L. lactis</i> MPE701 i MPE705	44
1.3. Određivanje mesta početka transkripcije <i>prtP</i> i <i>prtM</i> gena.....	44
1.4. Kvantitativna "Northern blot" analiza	45
1.5. Deleciona analiza promotorskog regiona.....	48
2. STRUKTURNA ANALIZA REGULATORNOG REGIONA <i>prt</i> GENA SOJA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGIS29	49
2.1. Teorijska analiza strukture DNK u regulatornom regionu <i>prt</i> gena soja <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGIS29	49
3. INAKTIVACIJA POTENCIJALNOG REGULATORNOG GENA	52
3.1. Inerciona mutagenaza potencijalnog regulatornog gena	52
3.2. Analiza mutanata	52
3.3. Određivanje aktivnosti β -glukuronidaze mutanata <i>L. lactis</i> Gh Δ R194, Gh Δ R1910, Gh Δ R1911, Gh Δ R5711, Gh Δ R5720 i Gh Δ R5723	54
3.4. Praćenje uticaja mutacije na metabolizam šećera.....	54
3.5. Konstrukcija stabilne mutacije u potencijalnom regulatornom genu	56
3.6. Hibridizaciona analiza mutanata.....	57
 DISKUSIJA.....	 60

1. Karakterizacija regulatornog regiona <i>prt</i> gena soja <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGIS29	61
2. Strukturna analiza regulatornog regiona <i>prt</i> gena soja <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGIS29	63
3. Inaktivacija potencijalnog regulatornog gena	64
4. Model regulacije proteolitičkog sistema	65
5. Perspektive daljih istraživanja	68
ZAKLJUČAK	70
LITERATURA	71

UVOD

Bakterije mlečne kiseline predstavljaju heterogenu grupu Gram-pozitivnih mikroorganizama koji se širom sveta koriste u industriji mlečnih proizvoda. Osnovni razlog za njihovu široku primenu je njihova sposobnost proizvodnje mlečne kiseline koja inhibira rast patogenih i drugih štetnih mikroorganizama. Osim toga, sojevi korišćeni kao starter kulture određuju fizičku strukturu, ukus i aromu rezultujućeg mlečnog proizvoda. Formiranje ukusa i arome fermentisanih proizvoda je rezultat degradacije mlečnog proteina kazeina do malih peptida i aminokiselina, koja se vrši posredstvom proteolitičkog sistema prisutnog u nekim starter kulturama. Još jedna, takođe važna karakteristika bitna za formiranje ukusa mlečnih proizvoda čini ovu grupu mikroorganizama zanimljivim, je njihova sposobnost formiranja diacetila iz citrata ili laktoze.

U poslednjih deset godina mnoge biohemijske i genetičke studije su se bavile izučavanjem bakterija mlečne kiseline i kao rezultat toga kloniran je i okarakterisan veliki broj gena uključenih u metabolizam šećera, citrata i kazeina, rezistencije na bakteriofage, kao i proizvodnju bakteriocina (de Vos, 1996; Kunji *et al.* 1996; Gasson, 1996; Nes *et al.*, 1996). Identifikovan je, takođe, veliki broj promotora (van der Vossen *et al.* 1987; Slos *et al.* 1991; Djordjevic *et al.* 1994; Djordjevic *et al.* 1997), ali i pored toga nema mnogo podataka o regulaciji genske ekspresije u bakterija mlečne kiseline. Identifikacija i karakterizacija homologih, jakih i kontrolisanih promotora je od izuzetne važnosti za konstruisanje sojeva u kojima bi bila moguća kontrolisana ekspresija homologih i/ili heterologih gena. U cilju izučavanja regulacije gena bakterija mlečne kiseline u ovom radu je urađena karakterizacija divergentnih promotora proteinaznih gena prirodnog izolata *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29, kao i analiza njihove regulacije.

PROTEOLITIČKI SISTEM BAKTERIJA MLEČNE KISELINE

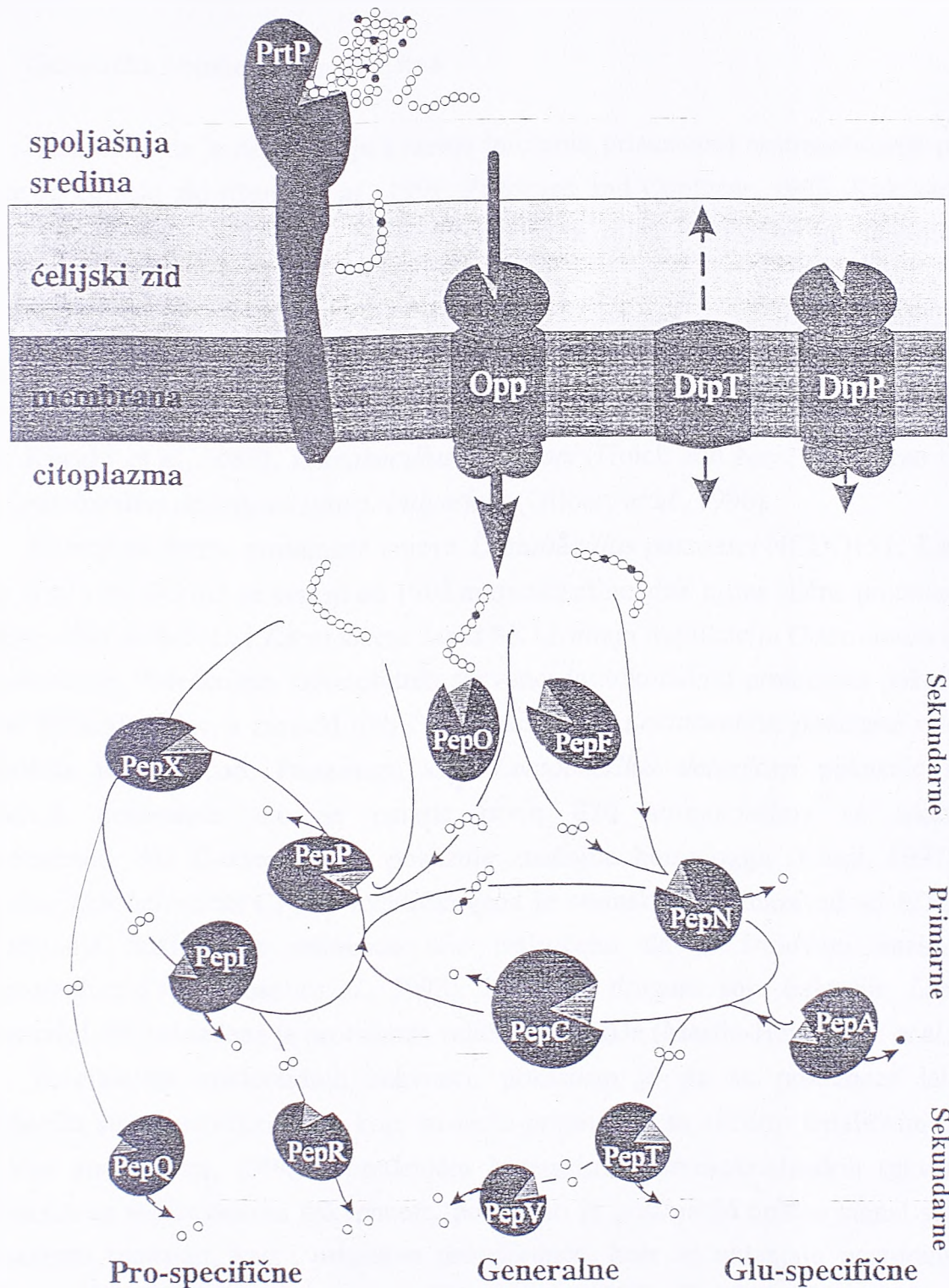
Poznato je da su mnoge bakterije mlečne kiseline, izolovane iz mlečnih proizvoda, višestruki aminokiselinski auksotrofi (Chopin, 1993). Zahtev za aminokiselinama se razlikuje od soja do soja i iznosi od 4 do 14 različitih aminokiselina. Količina slobodnih aminokiselina i peptida u mleku je nedovoljna da obezbedi normalan rast ovih bakterija i stoga rast bakterija mlečne kiseline zavisi od proteolitičkog sistema koji omogućava degradaciju mlečnih proteina (Juillard *et al.*, 1995). Od ukupnih proteina kravljeg mleka, kazein čini 80%. Pronađena su 4 različita tipa kazeina u mleku, α_{s1} -, α_{s2} -, β - i κ -kazein, koji organizovani u micelle formiraju rastvorljivi kompleks. Kazein se u rastvoru ponaša kao nekompaktna, velika, fleksibilna molekula sa velikim brojem dostupnih aminokiselina. Kazein sadrži sve aminokiseline potrebne za rast bakterija mlečne kiseline u mleku, ali se samo mali procenat zaista i koristi (manje od 1%).

Strukturne komponente proteolitičkog sistema bakterija mlečne kiseline mogu da se podele u tri grupe na osnovu njihove funkcije:

- proteinaze, koje vrše degradaciju kazeina do oligopeptida,
- transportni sistem, koji vrši translokaciju produkata degradacije kazeina kroz citoplazmatičnu membranu i
- peptidaze, koje vrše degradaciju peptida (Slika 1).

Proteinaze vrše početnu degradaciju kazeina pri čemu nastaje veliki broj različitih oligopeptida. Prve analize produkata hidrolize kazeina su pokazale da su peptidi koji nastaju degradacijom kazeina uglavnom velike molekulske mase (Pritchard and Coolbear, 1993). Pod pretpostavkom da su ovako dobijeni peptidi suviše veliki da bi se transportovali u ćeliju, ideja je bila da postoje ekstracelularne peptidaze koje vrše dalju degradaciju peptida. Biohemijskim i imunološkim eksperimentima je dokazana ekstracelularna lokalizacija proteinaze, što je u skladu i sa postojanjem tipičnog signal peptida na N-terminusu, dok je pokazano da su sve peptidaze locirane u citoplazmi. S obzirom da ekstracelularne peptidaze nisu pronađene dalja sudbina peptida može biti objašnjena na sledeći način:

- prisustvom još neopisanih ekstracelularnih peptidaza,
- nespecifičnom degradacijom proteinazom, ili
- aktivnošću membranskih nosača sposobnih za transport peptida većih od 5-6 aminokiselina (Pritchard and Coolbear, 1993).



Slika 1. Model proteolitičkog sistema *Lactococcus lactis*. PrtP – proteinaza; Opp, DtpT i DtpP – transportni sistemi za oligo, di- i tri-peptide; uloga primarnih (PepN, PepC, PepI, PepP i PepA) i sekundarnih (PepO, PepF, PepX, PepQ, PepR, PepV i PepT) peptidaza je predstavljena shematski (za većinu peptida su mogući različiti alternativni putevi); prolin u kazeinu ili peptidi koji su nastali od kazeina su predstavljeni belim kružićima, a Glu/Asp crnim.

PROTEINAZE BAKTERIJA MLEČNE KISELINE

Genetička i biohemijska svojstva

Poznato je da je degradacija kazeina inicirana prisustvom ekstracelularne proteinaze vezane za ćelijski zid (Smid *et al.*, 1991; Pritchard and Coolbear, 1993; Kok and de Vos, 1994). Proteinaze većeg broja različitih bakterija mlečne kiseline su identifikovane i biohemijski okarakterisane (Kunji, 1997).

Zrela proteinaza laktokoka je tipa serin-proteinaza, monomer, molekulske mase između 180-190 kDa (Laan and Konings, 1989). Gen koji kodira proteinazu, *prtP*, je kloniran i sekvenciran u brojnim sojevima vrsta *Lactococcus lactis* (Kok, 1987; Vos *et al.*, 1989; Kiwaki *et al.*, 1989), *Lactobacillus paracasei* (Holck and Næs, 1992) kao i *prtB* gen soja *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* (Gilbert *et al.*, 1996).

Neaktivna forma proteinaze soja *Lactobacillus paracasei* NCDO151, *Lactococcus lactis* Wg2 i NCDO763 se sastoji od 1902 aminokiseline, dok njima slične proteinaze soja *Lactobacillus delbrückii* i *Lactococcus lactis* SK11 imaju duplikaciju C-terminusa od 40 i 60 aminokiselina. Poređenjem nukleotidnih sekvenci laktokokalnih proteinaza pokazano je da su one 98% identične, a između njih i proteinaze soja *Lactobacillus paracasei* više od 95% nukleotida je identično. Proteinaza soja *Lactobacillus delbrückii* pokazuje oko 40% identičnih nukleotida ako se porede prvih 820 aminokiselina sa laktokokalnim proteinazama, dok C-terminus ne pokazuje značajnu homologiju (Kunji, 1997). U soju *Lactobacillus helveticus* CP790 identifikovana je serinska proteinaza od 45 kDa, ali zbog nepostojanja nukleotidne sekvence nije isključeno da je izolovani enzim produkt autoproteolize (Yamamoto *et al.*, 1993). Mada, u drugom soju bakterije *Lactobacillus helveticus* L89, pronađena je proteinaza veličine 180 kDa (Martin-Hernandez *et al.*, 1994).

Poređenjem nukleotidnih sekvenci, pokazano je da su proteinaze laktokoka i laktobacila slične subtilizinima, koje su serin-proteinaze sa sličnim kataličkim domenima (de Vos and Siezen, 1994). Poređenjem N-terminusa aminokiselinskih sekvenci zrelih proteinaza sa nukleotidnom sekvencom, pokazano je postojanje tipične signal sekvence za *sec*-zavisan transport, kao i prisustvo prosekvence, koje se uklanjaju post-translacionom obradom (Kok, 1987; Vos *et al.*, 1989; Kiwaki *et al.*, 1989; Holck and Næs, 1992; Gilbert *et al.*, 1996).

N-terminus zrele proteinaze sadrži katalitički domen i ima nekoliko konzervisanih aminokiselina koje učestvuju u katalizi i pozicioniranju supstrata (Ser₄₃₃, His₉₄, Asp₃₀ i Asn₁₉₆ u slučaju proteinaze soja SK11) (de Vos and Siezen, 1994). Aminokiseline iza

katalitičkog domena ne pokazuju homologiju sa bilo kojim proteinom poznate funkcije, ali je vrlo verovatno da obezbeđuju poziciju katalitičkog domena izvan ćelije.

C-terminus polipeptida je konzervisan u mnogim površinskim proteinima Gram-pozitivnih bakterija i sadrži topološke sekvence, LPXTG, praćene potencijalnim membranskim α -heliks domenom i malim naelektrisanim repom (Navarre and Schneewind, 1994). Nakon translokacije, sekvenca LPXT↓G se hidrolizuje (na poziciji označenom strelicom) (Navarre and Schneewind, 1994).

U sojevima *L. lactis* Wg2 i SK11, kao i *Lb. paracasei* NCDO151, pored *prtP* gena, identifikovan je gen koji kodira enzim uključen u maturaciju proteinaze, *prtM* (Haandrikman *et al.*, 1989; Vos *et al.*, 1989; Holck and Næs, 1992). Produkt *prtM* gena takođe ima signal sekvencu na N-terminusu polipeptida i konsenzus mesto za lipomodifikaciju (Haandrikman *et al.*, 1989; Vos *et al.*, 1989; Haandrikman *et al.*, 1991; Holck and Næs, 1992; Sankaran and Wu, 1994). PrtM protein pokazuje 30% homologije, na nivou aminokiselinske sekvence, sa PrsA proteinom iz bakterije *Bacillus subtilis*, za koji se zna da funkcioniše kao ekstracelularni šaperon (Kontinen *et al.*, 1991). Do danas, gen homolog *prtM* genu, nije identifikovan u soju *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* (Gilbert *et al.*, 1996).

Lokalizacija proteinaze

Različitim eksperimentalnim pristupima, dokazana je ekstraćelijska lokalizacija proteinaze. Prvo, proteinaza može da se ukloni sa ćelijskog zida tretiranjem ćelija puferom bez jona Ca^{2+} (Mills and Thomas, 1981) ili lizozimom (Laloi *et al.*, 1991; Coolbear *et al.*, 1992). Najveća forma laktokokalne proteinaze, detektovana posle odvajanja sa ćelijskog zida u puferu bez Ca^{2+} , je 165 kDa, za koju se pretpostavlja da je produkt intramolekularne autoproteolize (Laan and Konings, 1989). Kada se ćelije tretiraju lizozimom dobija se produkt od 180 kDa, koji je vrlo blizu veličini zrele proteinaze predviđene na osnovu primarne nukleotidne sekvence. Drugo, kombinacijom elektronske mikroskopije i imunoloških eksperimenata obeležavanja proteinaze zlatom, potvrđena je lokalizacija proteinaze na ćelijskom zidu (Hugenholtz *et al.*, 1987). Treće, bez izuzetka, produkt *prtP* gena, PrtP protein, sadrži specifičan N-terminus sa tipičnom signal sekvencom, koja omogućava proteinu da izađe van ćelije do ćelijskog zida (Kok and de Vos, 1994; de Vos and Siezen, 1994).

Supstratna specifičnost proteinaza

Prema načinu degradacije α_{s1} -, β - i κ -kazeina pokazano je da postoje dva tipa proteinaza, PI i PIII (Visser *et al.*, 1986). Primarni supstrat proteinaza PI tipa je β -kazein i u manjoj meri κ -kazein, dok proteinaze PIII tipa vrše degradaciju sve tri vrste kazeina (Pritchard and Coolbear, 1993).

S obzirom da su proteinaze PI i PIII tipa u vrstama roda *Lactococcus* više od 98% identične, bilo je moguće konstruisati hibridne proteinaze kombinacijom regiona proteinaze PI tipa soja *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2 i proteinaze PIII tipa soja *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11. Ove studije su ograničile razlike u proteinaznoj specifičnosti na dva regiona (Vos *et al.*, 1991). Studije vezivanja supstrata za enzim i kompjutersko modeliranje, zasnovano na trodimenzionalnoj strukturi subtilizina, ukazuju da je prvi region, (čine ga aminokiseline 131, 138, 142, 144 i 166 u soju SK11) deo džepa PrtP proteina za vezivanje supstrata. Drugi region (čine ga aminokiseline 747 i 748) je veoma važan i moguće je da je uključen u elektrostatičke interakcije sa supstratom, kazeinom.

Specifičnost proteinaza je dalje analizirana upotrebom enzima izolovanih iz 16 različitih sojeva *Lactococcus lactis* i fragmenta (od 1. do 23. aminokiseline α_{s1} -kazeina kao supstrata (Exterkate *et al.*, 1993). Na osnovu ovih studija, laktokokalne proteinaze su klasifikovane u 7 grupa, sa različitom specifičnošću prema supstratu, za razliku od dva ekstremna tipa (PI i PIII). Pokazano je da se male izmene u specifičnostima javljaju kao rezultat malih genetičkih varijacija u strukturnom genu proteinaze (*prtP*). Katalitički domen proteinaze PrtP nije samo visoko konzervisan među laktokokalnim sojevima, već takođe i među laktobacilima. Proteinaza soja *Lactobacillus paracasei* NCDO151 se razlikuje od proteinaze soja Wg2 samo u dve aminokiseline bitne za supstratnu specifičnost i vezivanje supstrata (Holck and Næs, 1992). Proteinaza soja *Lb. delbrückii* ima značajne supstitucije na pozicijama 138, 166 i 747, a slične aminokiseline na ostalim pozicijama. Na kraju, proteinaza soja *Lb. helveticus* L89, veličine 180 kDa, hidrolizuje iste veze kao i laktokokalne proteinaze, ali je relativna količina fragmenata potpuno drugačija (Martin-Hernández *et al.*, 1994).

TRANSPORT AMINOKISELINA I OLIGOPEPTIDA U ČELIJU

Transport aminokiselina

Da bi se obezbedile aminokiseline za biosintetske reakcije, degradacioni produkti kazeina treba da se transportuju kroz citoplazmatičnu membranu. Laktokoke poseduju

najmanje 10 transportnih sistema za aminokiseline, koji pokazuju specifičnost za strukturno slične aminokiseline, npr. Glu/Gln, Leu/Ile/Val, Ser/Thr, Ala/Gly, Lys/Arg/Orn, (Kunji, 1997). Pokazano je da postoje dve vrste transportnih sistema, prema načinu na koji se obezbeđuje energija za transport. Na primer, Glu/Gln, Asn i Pro/Glycine-Betaine se transportuju preko sistema koji obezbeđuje energiju za transport hidrolizom ATP-a (Konings *et al.*, 1989; Poolman, 1993; Molenaar *et al.*, 1993). Transportni sistem preko koga se transportuju aminokiseline Leu/Val/Ile, Ala/Gly/ Ser/Thr i Met radi na principu protonske pumpe, dok se Arg/Orn antiporter pokreće na osnovu gradijenta koncentracija (Konings *et al.*, 1989). Geni koji kodiraju transport aminokiselina, u laktokoka, do danas nisu klonirani.

Transport oligopeptida

Analizom mutanata, pokazano je da *L. lactis* poseduje transporter specifičan za oligopeptide (Opp). Eksperimenti rasta u hemijski definisanom medijumu, koji je sadržao peptide različitih dužina, pokazano je da Opp vrši transport oligopeptida do 8 aminokiselina (Tynkkynen *et al.*, 1993). Najnoviji eksperimenti, u kojima je analizirana translokacija peptida dobijenih hidrolizom β -kazeina u prisustvu PrtP proteinaze, ukazuju da se u ćeliju transportuju oligopeptidi do 10 aminokiselina (Kunji, 1997). Na osnovu rezultata dobijenih u eksperimentima sa metaboličkim inhibitorima zaključeno je da se transport oligopeptida odvija pomoću hidrolize ATP-a, a ne preko mehanizma protonske pumpe (Kunji, 1997).

Geni koji kodiraju transport oligopeptida su klonirani, sekvencirani i funkcionalno ekprimirani u soju *L. lactis* (Tynkkynen *et al.*, 1993). Pet otvorenih okvira čitanja odgovara polipeptidima koji su tipične komponente transportnog sistema zavisnog od prisustva vezujućeg proteina (OppDFBCA). Poređenjem sekvenci sa bazom podataka ovaj transportni sistem je klasifikovan kao član ABC (ATP-Binding Cassete) superfamilije (Higgins, 1992). Pet subjedinica transportnog sistema za transport oligopeptida uključuju: peptid-vezujući protein (OppA), dva integralna membranska proteina (OppB i OppC) i dva ATP-vezujuća proteina (OppD i OppF). Šesti gen ovog operona, lociran uzvodno od *oppA* gena, kodira endopeptidazu PepO (Mierau *et al.*, 1993; Tynkkynen *et al.*, 1993).

Protein OppA služi kao receptorni protein koji dovodi peptide do translokatorskog kompleksa u membrani. Aminokiselinska sekvenca OppA proteina ima konsenzus za mesto za isecanje prolipoproteina Leu-Ser-Ala↓Cys (Tynkkynen *et al.*, 1993), preko koga se lipomodifikacijom cisteina (Cys₂₄) na N-terminusu polipeptida, zreo protein vezuje na spoljašnju površinu citoplazmatične membrane (Von Heijne, 1989; Sankaran and Wu, 1994).

Analiza tercijarne strukture OppA proteina bakterije *Salmonella typhimurium*, je pokazala da se protein sastoji od tri domena: domen I i domen III, uključeni u vezivanje oligopeptida i domen II, tipičan za peptid-vezujuće proteine, ali njegova funkcija još nije ispitana (Tame *et al.*, 1994). OppA proteini *S. typhimurium* i *L. lactis* su homologni, ali je identičnost između ova dva gena samo 25%. Laktokokalni OppA protein je oko 60 aminokiselina veći i moguće je da ima ekstra petlju na N-terminusu polipeptida koja bi mogla da funkcioniše kao veza proteina sa membranom.

Proteini OppB i OppC su izuzetno hidrofobni proteini i zahvaljujući tome mogu da formiraju α -heliks i 6 puta prolaze kroz membranu. Ovi proteini obrazuju mesto za translokaciju peptida kroz membranu.

Proteini OppD i OppF su homologni ATP-vezujućim proteinima iz ABC superfamilije transportera (Higgins, 1992). Ovi proteini najverovatnije povezuju hidrolizu ATP-a sa konformacionim promenama OppB/C proteina što omogućava prolazak peptida kroz membranu.

Da bi se razdvojile funkcije OppDFBCA i PepO, kao esencijalnih komponenti proteolitičkog sistema u *L. lactis*, metodom integracije su konstruisana dva mutanta: jedan defektan u OppA i drugi u PepO proteinima. Rastom ovih mutanata u mleku i hemijski definisanim medijumima, u prisustvu oligopeptida, pokazano je da je OppDFBCA sistem, a ne PepO, esencijalan za korišćenje proteina i oligopeptida (Tynkkynen *et al.*, 1993).

Transport hidrofilnih di/tripeptida (DtpT)

Izučavanja transporta di- i tripeptida su vršena u membranskim vezikulama *L. lactis*, bez peptidaza, pri čemu je pokazano da se relativno hidrofilni di- i tripeptidi transportuju mehanizmom protonske pumpe (Smid *et al.*, 1989). Gen (*dtpT*), koji kodira protein za transport di/tripeptida, kloniran je komplementacijom i eksprimiran u *E. coli* i *L. lactis* (Hagting *et al.*, 1994). Aminokiselinska sekvenca ovog proteina, dobijena na osnovu translacije nukleotidne sekvence, ne pokazuje sličnost ni sa jednim poznatim bakterijskim transportnim sistemom za transport peptida, koji pripadaju ABC superfamiliji i kod kojih je transport povezan sa hidrolizom ATP-a (Higgins, 1992). U stvari, DtpT pripada novoj familiji transportnih sistema za transport peptida, koji rade na principu protonskih pumpi, označenih kao PTR familija, koja je do sada bila poznata jedino kod eukariota (Steiner *et al.*, 1995).

Najnoviji podaci su pokazali da neki sekvencirani otvoreni okviri čitanja (ORF) imaju značajnu sličnost sa DtpT proteinom (Nakajima *et al.*, 1997). Jedan od ovih ORF-ova odgovara delu sekvence lociranom nizvodno od gena za aminopeptidazu N u soju *Lb. helveticus* (Christensen *et al.*, 1995). Sekundarna struktura proteina DtpT je slična proteinima sekundarnog transporta proteina koji se pokreću mehanizmom protonске pumpe i sastoji se od 12 potencijalnih membranskih α -heliksa. Koristeći okolne regione, *dtpT* gen je deletiran iz hromozoma homologom rekombinacijom. Karakterizacija $\Delta dtpT$ sojeva je ukazala da je DtpT jedini protein koji vrši transport hidrofilnih di- i tripeptida u *L. lactis*.

Transport hidrofobnih di/tripeptida

Mutanti defektni u Opp i DtpT proteinima ne mogu da koriste hidrofilne oligopeptide i di/tripeptide, ali i dalje mogu da koriste hidrofobne di- i tripeptide. Ovo zapažanje je dovelo do pronalaska trećeg transportnog sistema za transport peptida, označenog kao DtpP (Foucaud *et al.*, 1995). Eksperimenti sa metaboličkim inhibitorima su pokazali da ovaj sistem koristi hidrolizu ATP-a i na sličan način obezbeđuje energiju kao Opp. Geni koji kodiraju DtpP nisu klonirani, ali inhibicija DtpP proteina *ortho*-vanadatom ukazuje da ovaj protein pripada familiji ATP-zavisnih transportera (Higgins, 1992).

PEPTIDAZE BAKTERIJA MLEČNE KISELINE

Treći, i poslednji korak, proteolitičkog puta je degradacija peptida prispelih u ćeliju, do aminokiselina. Peptidaze mogu da se podele u dve grupe: endopeptidaze, koje hidrolizuju supstrat unutar polipeptida, i aminopeptidaze, koje zahtevaju slobodan N-terminus i hidrolizuju jednu ili dve aminokiseline iz polipeptida. Do danas, u rodu *Lactococcus*, nisu pronađene karboksipeptidaze, koje hidrolizuju aminokiseline sa C-terminusa polipeptida.

Aminopeptidaze

Aminopeptidaza N (PepN) je monomerni metaloprotein, veličine oko 95 kDa. Poređenjem nukleotidnih sekvenci pokazano je da je gen za ovu peptidazu konzervisan među bakterijama mlečne kiseline, kao i da je homolog sisarskoj aminopeptidazi N (Tan *et al.*, 1992; Strøman, 1992; Klein *et al.*, 1993; Christensen *et al.*, 1995). PepN pripada subklasi Zn^{2+} -zavisnih metalopeptidaza i iseca aminokiseline sa N-terminusa polipeptida iz širokog spektra peptida, različitih po veličini i aminokiselinskom sastavu, ali nema afinitet za di- i tripeptide (Tan and Konings, 1990).

Aminopeptidaza C (PepC) je tiol-peptidaza veličine oko 50 kDa (Chapot-Chartier *et al.*, 1993). Gen za PepC peptidazu je takođe visoko konzervisan među bakterijama mlečne kiseline, a pokazuje i sličnost sa sisarskim genom za bleomicin hidrolazu, koja je verovatno uključena u degradaciju glikopeptidnog antibiotika bleomicina. PepC ima sličnu aktivnost kao PepN, ali se razlikuju po nekim specifičnim supstratima. Ne hidrolizuje heksa- i pentapeptide, mada gornja granica veličine peptidnog supstrata još nije jasno definisana.

Pored ove dve navedene aminopeptidaze, identifikovane su i dve tripeptidaze u soju *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, ali nisu pronađene u drugim mlečno kiselinskim bakterijama. Gen koji kodira PepT tripeptidazu je kloniran i sekvenciran (Mierau *et al.*, 1994). Druga tripeptidaza, označena kao peptidaza 53, je trimer od 72 kDa (Sahlstrøm *et al.*, 1993). Specifičnost PepT peptidaze je strogo ograničena na tripeptide i nema afiniteta za di- i oligopeptide. PepT ima široku specifičnost za sve tripeptide, ali nije u mogućnosti da hidrolizuje tripeptide koji imaju prolin na drugoj poziciji. Peptidaza 53 se jasno razlikuje od PepT po supstratnoj specifičnosti. Najveći afinitet ima za tripeptide, ali može da hidrolizuje i di- i oligopeptide, mada sa manjom aktivnošću. Dejstvo peptidaze 53 na tripeptide sa prolinom nije ispitivano.

Identifikovana je i jedna generalna dipeptidaza (PepV). Ovaj enzim je monomer, metaloprotein, veličine 51 kDa, mada je u soju *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H61 pokazano da se radi o homodimeru (Vongerichten *et al.*, 1994). U novije vreme, kloniran je gen *pepD/pepDA*, koji kodira potpuno drugačiju dipeptidazu, iz dva soja bakterije *Lb. helveticus* (Dudley *et al.*, 1996; Vesanto *et al.*, 1996). Mada slične po veličini subjedinića, dipeptidaze PepV i PepD/PepDA se razlikuju po pH optimumu (6 ili 8), kvaternarnoj strukturi (oktamer ili monomer) i katalitičkim svojstvima (tiol-peptidaza ili metalopeptidaza).

Peptidaze koje vrše hidrolizu peptida koji sadrže prolin

S obzirom da većina gore pomenutih peptidaza ne pokazuje aktivnost prema supstratima koji sadrže prolin, pretpostavljeno je da postoje specijalizovane peptidaze koje prepoznaju ovakav supstrat, jer se zna da je kazein veoma bogat ovom aminokiselinom. Identifikovane su jedna aminopeptidaza (PepP) i dve prolidaze (PepQ) (Kunji, 1997). PepP i PepQ su metaloproteini, monomeri veličine 42 kDa. PepP hidrolizuje oligopeptide do 10 aminokiselina koje sadrže prolin. Ne hidrolizuje di- i tripeptide. Pored njih identifikovane su i iminopeptidaza, koja prepoznaje tri- i oligopeptide sa prolinom na N-terminusu, i prolinaza koja prepoznaje dipeptide sa prolinom na N-terminusu.

Najzanimljivija od svih peptidaza koje vrše hidrolizu peptida koji u sebi sadrže prolin je X-prolil-dipeptidil aminopeptidaza (PepX). Ova peptidaza je okarakterisana kao serin-peptidaza. Obično, PepX hidrolizuje X-Pro dipeptide (gde X predstavlja bilo koju aminokiselinu) iz tri- i oligopeptida do 11 aminokiselina. Međutim, specifičnost ove peptidaze nije ograničena samo na ovaj tip supstrata već može da hidrolizuje i supstrate bez prolina pri čemu kao produkti nastaju dipeptidi i pojedinačne aminokiseline (Mayo *et al.*, 1991; Mayo *et al.*, 1993).

Posebne aminopeptidaze

Pored generalnih aminopeptidaza, identifikovane su i brojne posebne aminopeptidaze, koje prepoznaju vrlo specifične supstrate, npr. glutamil aminopeptidaza (PepA), koja prepoznaje Glu ili Asp na N-terminusu polipeptida, leucil aminopeptidaza (PepL), koja prepoznaje Leu na N-terminusu di- i tripeptida i pirolidone karboksil peptidaza (Pcp), koja prepoznaje pirolidon karboksilil aminokiseline na N-terminusu peptida (Kunji, 1997).

Endopeptidaze

U soju *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* identifikovane su dve endopeptidaze. Jedna je monomer, veličine 70 kDa, metaloprotein sposoban da hidrolizuje oligopeptide, ali ne može da hidrolizuje kazein (PepO) (Tan *et al.*, 1991). Gen koji kodira ovaj enzim je kloniran i sekvenciran, a produkt tog gena pokazuje značajan stepen identičnosti sa sisarskom enkefalinazom (27% istih aminokiselina) (Mierau *et al.*, 1993). Analizom primarne aminokiselinske sekvence pokazano je prisustvo His-Glu-X-X-His konsenzus sekvence, tipične za Zn^{2+} -zavisne metaloproteinaze. Zanimljivo je da je *pepO* gen lociran neposredno iza gena za oligopeptidni transport (*oppDFBCA*) (Tynkkynen *et al.*, 1993). Inaktivacijom *pepO* gena pokazano je prisustvo još jednog enzima slične aktivnosti, molekulske mase i imunoloških svojstava (Kunji, 1997). Kloniranjem, sekvenciranjem i analizom primarne sekvence pokazano je 88% identičnosti između ova dva gena na aminokiselinskom nivou.

Identifikovana je još jedna endopeptidaza sa drugačijom specifičnom aktivnošću (Monnet *et al.*, 1994). Ova endopeptidaza, označena kao PepF, je monomerna metalopeptidaza od 70 kDa. Analizom sekvence je pokazano da je ova peptidaza različita od PepO. Ovaj enzim takode sadrži vezujuće mesto za Zn^{2+} i spada u grupu Zn^{2+} -zavisnih metalopeptidaza. PepF hidrolizuje peptide veličine 7 do 17 aminokiselina. Nedavno je



pronađena druga kopija ovog gena na plazmidu na kome se nalaze geni za metabolizam laktoze i gen za proteinazu (*pepF2*) (Kunji, 1997).

Pored laktokokalnih, opisane su i dve endopeptidaze u sojevima vrste *Lactobacillus helveticus* (Kunji, 1997).

Karboksipeptidaze

Do danas nisu pronađene i okarakterisane karboksipeptidaze u bakterija mlečne kiseline.

Lokacija peptidaza

Dok je nesumnjivo pokazano da su proteinaze bakterija mlečne kiseline locirane izvan ćelije, lokacija peptidaza je još uvek predmet izučavanja. Analizom frakcije ćelijskog zida pokazano je prisustvo nekih peptidaza, a na osnovu činjenice da su produkti hidrolize kazeina proteinazom suviše veliki da prođu kroz ćelijski zid, logično je očekivati ekstraćelijske peptidaze u proteolitičkom sistemu. Nasuprot tome, mnogi genetički, biohemijski i imunološki podaci pokazuju da su sve, do sada opisane peptidaze, locirane u ćeliji.

KONTROLA GENSKE EKSPRESIJE U BAKTERIJA MLEČNE KISELINE

Proteolitički sistem bakterija mlečne kiseline predstavlja novi model sistem za izučavanje proteolize kod bakterija. Nove genetičke i biohemijske tehnike omogućavaju dalju manipulaciju elementima proteolitičkog sistema u cilju dobijanja detaljnih informacija o načinu korišćenja egzogenih proteina kao izvora azota. Iako su strukturni elementi ovog sistema skoro do detalja proučeni i opisani, još uvek nema mnogo podataka o njihovoj regulaciji.

Bakterijski promotori

Transkripcija gena i sinteza iRNK predstavlja jedan od vidova regulacije genske aktivnosti. Sintaza iRNK je regulisana različitim specifičnim signalima na DNK, kao što su specifična mesta za otpočinjanje (promotori) ili zaustavljanje transkripcije (terminatori) koje prepoznaje RNK polimeraza. Primarna struktura mesta sa kojima interaguje RNK polimeraza u velikoj meri određuje efikasnost, odnosno jačinu, datog promotora.

Do danas su najbolje proučeni promotori bakterije *E. coli*. Poređenjem velikog broja

promotorskih sekvenci primećeno je da postoje dve konsenzus sekvence promotora, u vidu heksanukleotida TATAAT smeštenih oko 10 nukleotida uzvodno od mesta početka transkripcije (-10 region) i heksanukleotida TTGACA u regionu oko 35 nukleotida uzvodno od mesta početka transkripcije (-35 region) (McClure, 1985).

5' - - - TTGACA - 16-18 bp - TATAAT - 5-9 bp - RNK start - - - 3'

Ovakav konsenzus promotora prepoznaje *E. coli* RNK polimeraza u kojoj jezgro enzima ($\beta\beta'\alpha_2$) interaguje sa σ^{70} subjedinicom polimeraze (McClure, 1985). Interakcijom RNK polimeraze sa promotorom dolazi do vezivanja enzima i promotora u zatvoreni kompleks, a potom sledi izomerizacija zatvorenog u otvoreni kompleks, odnosno vrši se lokalna denaturacija DNK kako bi ona služila kao matrica za sintezu RNK. Početak elongacije transkripta omogućava pristup novim molekulima RNK polimeraze promotoru i označen je kao oslobađanje promotora.

Pored -10 i -35 regiona primećeno je prisustvo trećeg elementa u promotorima *E. coli* koji je takođe odgovoran za aktivaciju transkripcije ("UP element"). Ovaj 20 bp dug A/T bogati region smešten je uzvodno od -10 i -35 regiona i odgovoran je za vezivanje α -subjedinice RNK polimeraze. Mada interakcija između "UP elementa" i α -subjedinice RNK polimeraze nije esencijalna za aktivaciju transkripcije, pretpostavlja se da ova interakcija ima ulogu pozitivnog regulatora i pojačava aktivnost *E. coli* promotora (Ross *et al.* 1993).

Najbolje proučena klasa promotora Gram-pozitivnih bakterija su promotori bakterije *Bacillus subtilis*. Konsenzus sekvence vegetativnih promotora u potpunosti odgovaraju konsenzusima viđenim u *E. coli*, a prepoznaje ih σ^{43} subjedinica RNK polimeraze ove bakterije. U promotorima Gram-pozitivnih bakterija pored konzervisanosti -35 i -10 heksamera zapaženi su još neki konzervisani regioni. Uočen je niz adeninskih nukleotida (A) u regionu -41 do -45, kao i prisustvo TG dinukleotida uzvodno od -10 regiona. U nekoliko slučajeva je zapažen TGTG duplet (Moran *et al.*, 1982).

Iz sekvenci do sada objavljenih promotora laktokoka može da se zaključi da konsenzus laktokokalnih promotora odgovara onom određenom za vegetativne promotore *Bacillus subtilis* i uopšte promotore Gram-pozitivnih bakterija (Moran *et al.*, 1982; Graves and Rabinowitz, 1986). Analizirani promotori laktokoka pokazuju sličnost sa tipičnim -35 i -10 konsenzus heksamerima TTGACA i TATAAT. Razmak između -35 i -10 heksamera iznosi od 16 do 18 nukleotida. Čest je slučaj pojavljivanja TG dinukleotida uzvodno od -10 sekvence, na pozicijama -16 i -15. Zapažen je i visok procenat AT bp u okviru 50 bp uzvodno od -35 sekvence (van der Vosen *et al.*, 1987).

Mesto inicijacije transkripcije

Analizom većeg broja *E. coli* promotora je utvrđeno da je mesto početka transkripcije purin na sedmoj poziciji nizvodno od -10 heksamera. U slučaju da purinska baza nije prisutna na sedmoj poziciji, sinteza RNK otpočinje purinom na susednim pozicijama (Aoyama and Takanami, 1985). Kod laktokokalnih promotora je S1 mapiranjem ili reverznom transkriptazom utvrđen start transkripcije i pokazalo se da je situacija slična kao i u *E. coli*. Mesto inicijacije transkripcije je purin 5-8 nukleotida nizvodno od -10 heksamera (van der Vosen *et al.*, 1987).

Signali za inicijaciju translacije

Proces translacije otpočinje vezivanjem iRNK, 30S subjedinice ribozoma i fMet-tRNK u 30S kompleks, koji zajedno sa 50S subjedinicom ribozoma i šaržiranom tRNK (za koju je vezana odgovarajuća aminokiselina) na A mestu u ribozomu čine 70S kompleks inicijacije. Posle delovanja peptidil transferaze kompleks ulazi u fazu elongacije (Gold and Stromo, 1981). Signale za inicijaciju translacije kod *E. coli* predstavljaju: mesto za vezivanje ribozoma (RBS) koji se još označava i kao Šajn-Dalgarno sekvenca, kodon inicijacije i razmak između njih (Shine and Dalgarno, 1974; Gold and Stromo, 1981). Najčešći kodon inicijacije je AUG (Gold and Stromo, 1981). RBS sekvenca predstavlja polipurinski niz (3-10 nukleotida), koja je komplementarna 3'-kraju 16S rRNK i locirana je 5-9 nukleotida uzvodno od inicijacionog kodona (Shine and Dalgarno, 1974; Gold and Stromo, 1981).

Ribozomi *E. coli* su sposobni da prepoznaju translacione signale u iRNK Gram-pozitivnih bakterija dok obrnut slučaj nije čest, što ukazuje na postojanje razlika između translacionih signala Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Ribozomi *B. subtilis* i drugih Gram-pozitivnih bakterija zahtevaju veću komplementarnost između RBS sekvence i 16S rRNK nego što je slučaj sa ribozomima *E. coli*.

Promotori proteinaznih gena laktokoka

Analizom proteinaznih gena sojeva *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2 i SK11 i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO763 utvrđeno je da se *prtP* i *prtM* geni divergentno transkribuju iz promotorskog regiona identifikovanog unutar *Clal* fragmenta veličine 345 bp (Vos *et al.*, 1989; van der Vosen *et al.*, 1992). U poređenju sa jačinama hromozomalnih laktokokalnih promotora, promotori *prtP* (P_{prtP}) i *prtM* (P_{prtM}) gena su relativno slabi. Jačina promotora je određena kloniranjem divergentnih promotora *prt* gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2 u obe orijentacije u vektor pGKV210. Konstruisanim plazmidima su

transformisani *Bacillus subtilis* i *L. lactis* MG1363. Ispitivanjem nivoa rezistencije na hloramfenikol (Cm) i merenjem aktivnosti enzima hloramfenikol acetil transferaze (CAT), pokazano je da je promotor *prtM* gena slabiji od promotora *prtP* gena u *Bacillus subtilis*, a jači u *L. lactis* MG1363 (van der Vosen *et al.*, 1992).

Clal fragment, u okviru koga se nalazi regulatorni region, je bogat AT baznim parovima i sadrži dugu palindromsku sekvencu sa mogućnošću formiranja petlje ($dG=-7.6$ kcal). U okviru ove strukture nalaze se mesta početka transkripcije oba gena. Smatra se da bi uloga moguće petlje bila u regulaciji ekspresije proteinaznih gena. Sami promotori se delimično preklapaju. U regionu -38 do -27 uzvodno od mesta početka transkripcije *prtP* gena su prisutna dva moguća -35 heksanukleotida. Razmak između -35 i -10 regiona iznosi 16, odnosno 21 bp, zavisno od toga koji -35 heksamer se uzima u obzir, što se razlikuje od standardnih promotora Gram-pozitivnih bakterija. Ova razlika u veličini, kao i odsustvo TG dinukleotida uzvodno od -10 regiona u oba promotora, što je svojstvo jakih promotora laktokoka, moguć je uzrok njihove relativne slabosti. Pokazano je da transkripcija *prtP* gena počinje 6 bp nizvodno od -10 sekvence promotora, a tačka početka transkripcije *prtM* gena je na 8 do 9 bp nizvodno od promotora *prtM* gena (van der Vosen *et al.*, 1992).

Kloniranjem i sekvenciranjem *prt* gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11, pokazano je da su promotori smešteni u okviru AT bogatog regulatornog regiona, veličine 324 bp. U okviru ovog regiona je utvrđeno prisustvo nekoliko potencijalnih -35 i -10 regiona u obe orijentacije. Na poziciji -126 uzvodno od *prtP* gena nalaze se tri konsenzus sekvence -35 regiona (TTGACA) praćene sa pet tandemskih i delimično preklapajućih -10 regiona (TATAAT). Rastojanje između -35 i -10 regiona iznosi od 15 do 19 nukleotida. Druga karakteristika ovog regulatornog regiona je prisustvo nekoliko direktnih i invertovanih ponovaka. Na kraju, utvrđeno je i prisustvo strukture petlje sa slobodnom energijom $dG=-15.5$ kcal. Određeno je mesto početka transkripcije *prtP* gena i pokazalo se da se ono nalazi 8 bp nizvodno od prvog -10 regiona, ukazujući da je, verovatno, prvi -10 region funkcionalan. Što se tiče pozicije promotora *prtM* gena, iz sekvence se vidi prisustvo nekoliko potencijalnih -10 i -35 regiona. Delecioni eksperimenti su pokazali da potencijalni promotor smešten 40 do 80 nukleotida uzvodno od inicijacionog kodona *prtM* gena nije funkcionalan (Vos *et al.*, 1989).

REGULACIJA GENSKE EKSPRESIJE KOD BAKTERIJA

U bakterijskim ćelijama genetičku informaciju čini oko 2500 - 3000 gena. Od toga, samo mali broj gena se eksprimira u datom momentu života ćelije kao rezultat promena u

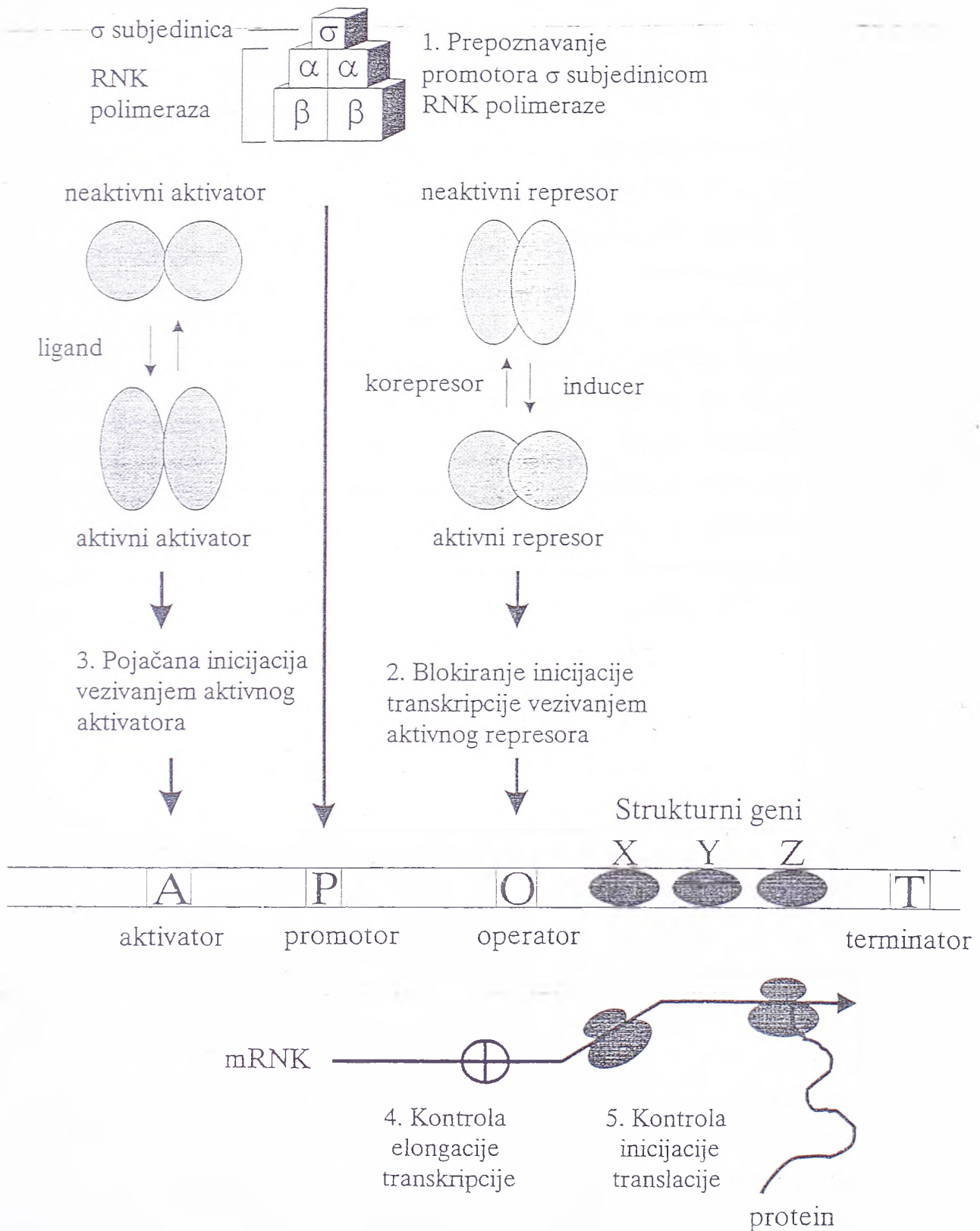
spoljašnjoj sredini. Čelije reaguju na signale prispele iz spoljašnje sredine formiranjem intracelijskih signala tzv. sekundarnih glasnika ("second messenger", Botsford and Harman, 1992) koji utiču na ekspresiju ciljnih gena. Genska ekspresija može da bude regulisana na transkripcionom (Slika 2, mesta od 1-4) ili translacionom nivou (Slika 2, mesto 5) i to na sledeće načine:

1. inicijacija transkripcije RNK polimerazom zasnovana na prepoznavanju promotora od strane odgovarajućeg sigma faktora RNK polimeraze (Busby and Ebright, 1994);
2. inhibicija inicijacije transkripcije vezivanjem represora za operator (van Rooijen, 1993);
3. pojačavanje inicijacije transkripcije vezivanjem aktivatora (van Rooijen, 1993);
4. kontrola elongacije transkripcije koja podrazumeva dva regulatorna sistema: a) transkripciona atenuacija i b) anti-terminacija (Yanofsky and Crawford, 1987). Mnogi biosintetski operoni su regulisani mehanizmom atenuacije transkripcije (Yanofski and Kolter, 1982);
5. kontrola inicijacije translacije. Do sada su opisana tri tipa regulacije na translacionom nivou: a) proteini koji negativno regulišu translaciju (van Rooijen, 1993); b) antisens iRNK (Inouye, 1988; Simons, 1988) i c) atenuacija translacije (Lovett, 1990).

Regulacija na nivou transkripcije

Nivo transkripcije može da bude regulisan vezivanjem regulatornih proteina koji deluju pozitivno ili negativno na promotor datog gena.

a. Regulatorni proteini koji negativno deluju (represori). Represori predstavljaju grupu proteina koji se vezuju za određenu sekvencu na DNK (operator) i smanjuju stepen inicijacije transkripcije promotora koji regulišu. Operatori mogu da budu različito udaljeni od odgovarajućeg promotora, ali najčešće je mesto za vezivanje represora smešteno između -40 i +1 pozicije u odnosu na mesto inicijacije transkripcije (Collado-vides *et al.*, 1991). S obzirom da represori kompetiraju za mesto vezivanja RNK polimeraze, pokazane pozicije operatora su u potpunosti u skladu sa načinom delovanja represora. Da bi represori bili fiziološki korisni potrebno je da njihova aktivnost može da se menja u skladu sa promenama u spoljašnjoj sredini. Tako su mnogi represori alosterički proteini koji u prisustvu ili odsustvu indukujće molekule (efektora) zauzimaju konformaciju koja obezbeđuje visok ili nizak afinitet za operator (Slika 2). Na primer, regulatori mogu da budu kovalentno modifikovani. Članovi PhoB/OmpR regulatorne superfamilije, koja obuhvata represore i



Slika 2. Bitna mesta kontrole genske ekspresije kod bakterija.

aktivatore, se konvertuju iz aktivne u neaktivnu formu reverzibilnom fosforilacijom (Stock *et al.*, 1989). U slučaju LexA represora ta promena je mnogo drastičnija i ogleda se u ireverzibilnom proteolitičkom isecanju (Brent and Pthasne, 1981). Veliki broj DNK vezujućih proteina (represora i aktivatora) pokazuje homologiju na aminokiselinskom nivou u domenu koji prepoznaje DNK. DNK-vezujući proteini prepoznaju DNK zahvaljujući strukturnom aranžmanu DNK, označenom kao “helix-turn-helix” motiv. Familije represornih proteina koji pokazuju homologiju na aminokiselinskom nivou u regionu “helix-turn-helix” DNK vezujućeg domena uključuju LacI/GalR i DeoR familije (Rooijen, 1993).

b. Regulatorni proteini koji pozitivno deluju (aktivatori). Pozitivna regulacija transkripcije podrazumeva vezivanje aktivatora u blizini -35 regiona promotora. Najčešće se aktivatori vezuju na pozicijama između -40 i -70 (Collado-vides *et al.*, 1991). Promotori koji su regulisani aktivatorima obično imaju veoma nizak bazalni nivo ekspresije. Aktivatori povećavaju stepen vezivanja polimeraze ili pospešuju formiranje otvorenog kompleksa krivljenjem DNK molekule (van Rooijen, 1993). Detaljni mehanizmi ovakvog načina aktivacije još nisu dovoljno razjašnjeni. Najbolje okarakterisan aktivator, do danas, je cAMP-vezujući protein (CAP), generalni aktivator, koji je uključen u kontrolu *E. coli lacZYA* operona (van Rooijen, 1993). Do sada su opisane familije aktivatora, koje takođe sadrže i represore i one uključuju LysR i OmpR/PhoB familije (Stock *et al.*, 1989).

Krivljenje DNK i kontrola transkripcije

Biološki procesi uključeni u kontrolu transkripcije zavise od lokalnih distorzija strukture DNK koje povećavaju specifičnost prepoznavanja i vezivanja proteina za DNK. Ovi procesi se najčešće odvijaju u prisustvu proteinskih faktora koji se specifično vezuju za DNK i lokalno je savijaju. Tako je i proces transkripcije iniciran vezivanjem multiproteinskih kompleksa za određena mesta na DNK. Uloga proteina koji vrše krivljenje DNK je da smanje rastojanje između različitih mesta prepoznavanja tako da regulatorni proteini mogu da interaguju jedan sa drugim tokom procesa vezivanja za DNK. Ovaj problem je naročito aktuelan u eukariotskim sistemima kod pakovanja hromatina u nukleosome, ali je takođe veoma značajan i u prokariotskim i eukariotskim sistemima u regulaciji transkripcije. U poslednje vreme određivanjem trodimenzionalnih struktura nekih DNK-protein kompleksa, uključujući neke arhitekturne i regulatorne proteine, pokazano je da interkaliranje proteina u mali žleb DNK heliksa ima značajnu ulogu u mehanizmu krivljenja i savijanja DNK. Distorzije DNK strukture indukovane proteinima predstavljaju važnu komponentu obrade informacija kodirane u DNK. Postoje dva tipa interkalacija:

delimična i kompletna. Oba tipa interkalacije pomeraju bazne parove za jedno ili više mesta odvrćući DNK i menjajući smer ose heliksa. Savijanje DNK interkaliranjem jedne ili više aminokiselina u mali žljeb DNK heliksa pokazano je jedino kod proteina uključenih u transkripcionu regulaciju (Werner *et al.*, 1996). Jedan od njih je i purin represor protein PurR u *E. coli*, DNK-vezujući protein od 341 aminokiseline, koji funkcioniše kao vodeći regulator *de novo* biosinteze purina u *E. coli* (Schumacher *et al.*, 1994). PurR specifično reprimira transkripciju iz 10 policistronskih i monocistronskih operona koji kodiraju enzime za *de novo* biosintezu purina. Takođe, PurR reguliše transkripciju *glyA* gena koji kodira sintezu glicina. Osim toga, PurR je autoregulisan (Rolfes and Zalkin, 1990). PurR pripada LacI familiji transkripcionih regulatora. Genetičke i biohemijske studije su pokazale da se ovi proteini sastoje iz dva funkcionalna domena: DNK-vezujući domen na N-terminusu polipeptida i veći domen na C-terminusu polipeptida koji služi kao efektor vezivanja i oligomerizacije. LacI proteini funkcionišu kao represori tako što se vezuju za mesta na DNK (od 16 do 18 bp) poznata kao operatori, koji takođe pokazuju homologiju na nivou primarne sekvence. Vezivanje PurR za operator je zavisno od prisustva korepresora (hipoksantina i guanina) koji se vezuju kooperativno. Nekoliko studija je pokazalo da je struktura domena za koji se veže efektor članova LacI familije slična bakterijskim periplazmatičnim vezujućim proteinima (PBPs). Na bazi ovih studija konstruisani su trodimenzionalni modeli domena za vezivanje efektor LacI i GalR represora. Ove studije ipak nisu dale odgovor na pitanje kako se signal, u formi male efektorne molekule, transdukuje i dovodi do genske regulacije (Schumacher *et al.*, 1994).

Poslednjih godina korišćenjem raznih eksperimentalnih tehnika pokazane su strukturne varijacije DNK zavisne od primarne sekvence. Iako je primarna struktura DNK uslovljena kombinacijama samo 4 različita strukturna elementa i ima relativno jednostavnu sekundarnu strukturu, DNK pokazuje veliki opseg konformacija u poređenju sa proteinima, koje su moguće zahvaljujući finim varijacijama u mikrostrukturi. Konfiguracija DNK predstavlja vektorski zbir malih helikalnih defleksija (krivljenja) uslovljenih hodom pojedinačnih baza. Jedna od najvažnijih uloga lokalne zakrivljenosti DNK, osim arhitektonske, je mogućnost formiranja lako prepoznatljivih mesta za vezivanje proteina u cilju snižavanja termodinamičkih zahteva za deformacijama DNK i povećanje verovatnoće prepoznavanja DNK i proteina. Iz tog razloga poznavanje lokalnih DNK struktura predstavlja značajnu pomoć u razumevanju procesa prepoznavanja DNK od strane proteina (Parvin *et al.*, 1995; Dlakic and Harrington, 1998).

REGULACIJA EKSPRESIJE *prt* GENA

Najnoviji podaci su pokazali da je nivo ekspresije oba promotora proteinaznih gena regulisan prisustvom peptida u medijumu. Nivo ekspresije promotora je praćen preko fuzija oba promotora sa *gusA* genom u *L. lactis* MG1363, merenjem aktivnosti enzima β -glukuronidaze. Pokazano je da je aktivnost ovog enzima bila najviša u uslovima niske koncentracije peptida u medijumu, dok je sa povećanjem koncentracije peptida dolazilo do pada aktivnosti ovog enzima (Marugg *et al.*, 1995).

Poređenjem nivoa *prtP* ili *prtM* specifičnih iRNK sintetisanih kada su bakterije rasle u medijumu sa visokom ili niskom koncentracijom dipeptida dobijeni su rezultati koji pokazuju veliku sličnost sa rezultatima dobijenim merenjem aktivnosti β -glukuronidaze (Marugg *et al.*, 1996).

Pretpostavka je da je medijum-zavisna ekspresija promotora *prt* gena kontrolisana na nivou inicijacije transkripcije. Sličnost u regulaciji divergentnih i delimično preklapajućih promotora *prtP* i *prtM* gena ukazuje na prisustvo jedinstvenog kontrolnog mehanizma transkripcione mašinerije u ćeliji, pri čemu se dobija ista količina PrtP i PrtM produkata. Delecionim eksperimentima je pokazano da prisustvo ili odsustvo petlje utiče na medijum zavisnu regulaciju. Takođe je potvrđeno da je kontrolni mehanizam nezavisan od domaćina. S obzirom da je soj *Lactococcus lactis* MG1363 bez plazmida, moguće je da je regulacija kontrolisana genima lociranim na hromozomu domaćina (Marugg *et al.*, 1996).

Eksperimenti sa mutantima u transportnom sistemu su pokazali da je specifičan sistem za transport di- i tripeptida esencijalan za kontrolu proteinaznih promotora. Represija proteinaznog sistema dipeptidima je brz i efikasan proces. Nakon unošenja dipeptida u ćeliju signal se prenosi do *prt* promotora. Pretpostavlja se da se ova regulacija odvija posredstvom interakcije dipeptida ili njihovih derivata sa regulatornim proteinom odgovornim za regulaciju inicijacije transkripcije P_{prtP} i P_{prtM} promotora (Marugg *et al.*, 1995).

Ostaje otvoreno pitanje da li se P_{prtP} i P_{prtM} promotori aktiviraju ili reprimiraju ovim sistemom. Interakcija dipeptida kao efektor sa potencijalnim regulatorom može da utiče na njegov afinitet za operator *prt* regiona rezultujući u indukciji ili represiji ekspresije *prt* gena. Takođe, još nije jasno da li je potencijalni regulatorni protein specifičan za *prt* gene, ili je u pitanju neki plejotropni faktor, kao što je slučaj sa Lrp regulatornim proteinom *E. coli* (Calvo and Matthews, 1994). Lrp ("leucine-responsive regulatory protein") je autoregulisan plejotropni faktor koji kontroliše brojne gene metaboličkog puta kao odgovor na dostupnost leucina.

Po analogiji sa *E. coli* sugeriše se prisustvo sličnog globalnog regulatora u *Lactococcus lactis*, koji bi mogao da reguliše brojne gene uključene u metabolizam azota, uključujući i gene za proteinaze i peptidaze, kao i gene za transport azota kroz membranu (Marugg *et al.*, 1995).

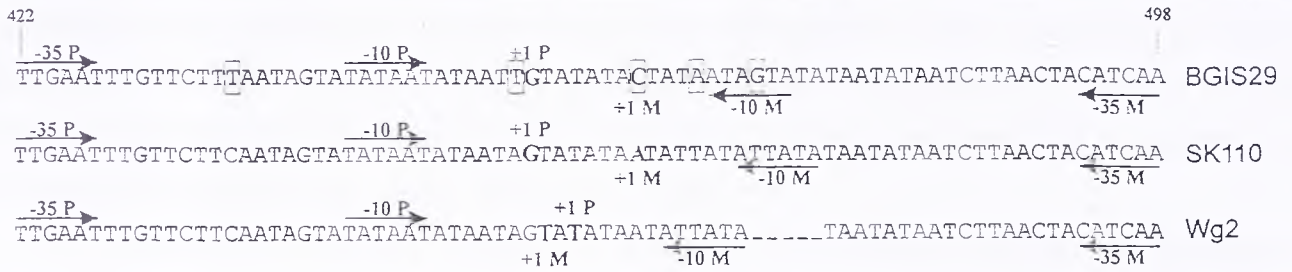
PROTEINAZNI REGION PRIRODNOG IZOLATA *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29

Soj *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29 je prirodni izolat, dobijen iz sira proizvedenog u domaćinstvu (Ilijaš). Eksperimentalno je utvrđeno da ovaj soj poseduje nekoliko plazmida, od kojih je većina kriptična. Neki od plazmida determinišu vidljive fenotipske karakteristike, kao što su sposobnost sinteze bakteriocina uskog spektra delovanja, rezistencija na sopstveni bakteriocin, kao i sposobnost sinteze specifičnih proteinaza (Musafija, neobjavljeni rezultati).

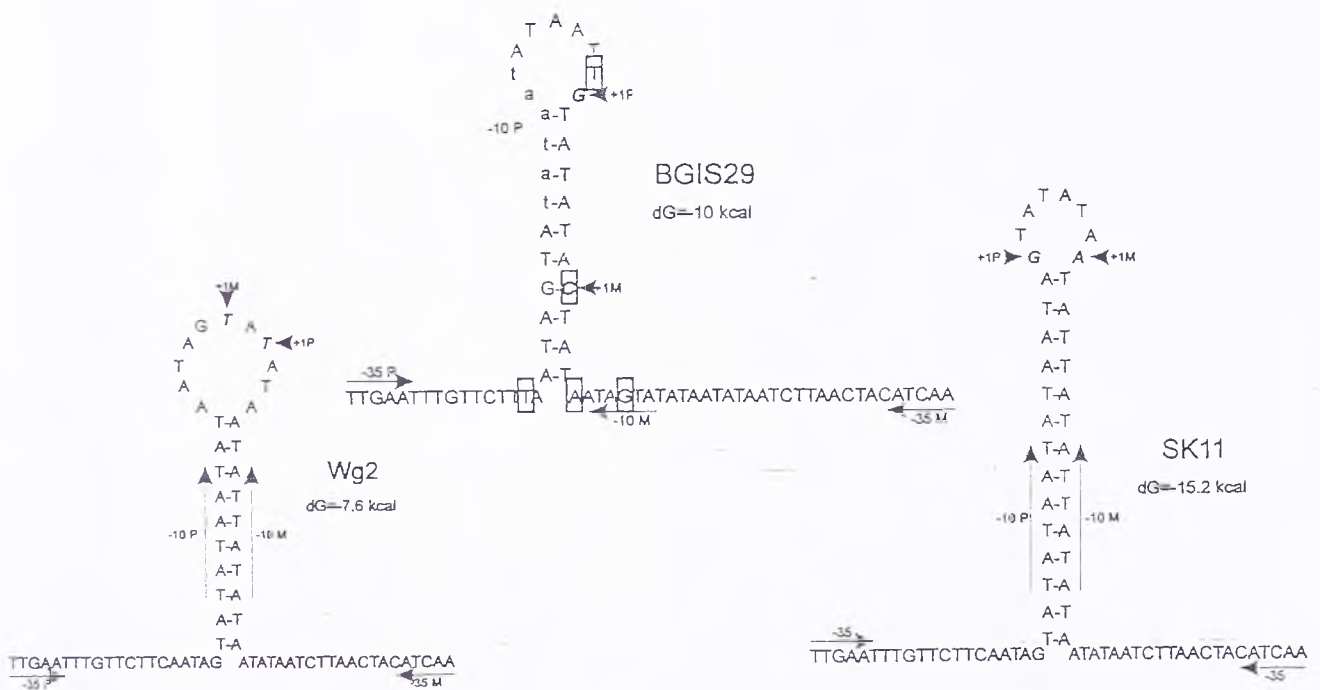
Eksperimenti su pokazali da soj *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29 produkuje kiselu proteinazu PI tipa, koja hidrolizuje samo β -kazein, sa temperaturnim optimumom od 30°C. U poređenju sa dobro proučenim sojevima *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2 i SK11, soj BGIS29 poseduje istu organizaciju proteinaznih gena. Proteinazni geni *prtP* i *prtM* su locirani na velikom plazmidu, veličine preko 130 kb. Restrikciona mapa proteinaznih gena je u velikoj meri slična restrikcionoju mapi istog regiona soja Wg2 (Kojić i Fira, 1995 i 1996). Regulatorni region proteinaznih gena ovog soja je kloniran i sekvenciran. Analizom sekvence i poređenjem sa sekvencom istog regiona u sojevima *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2 i SK11, pokazano je da postoje razlike u primarnoj i sekundarnoj strukturi. Uočeno je da se regulatorni region sojeva BGIS29 i SK11 razlikuju u 5 baznih parova, dok je regulatorni region soja Wg2 po baznom sastavu identičan kao isti region soja SK11, ali je od njega kraći za 5 baznih parova (Slika 3) (Miladinov, 1996).

S druge strane analiza sekundarne strukture istog regiona za sva tri soja je pokazala da regulatorni regioni *prt* gena sojeva SK11 i Wg2 prave istu sekundarnu strukturu, samo različite dužine. -10 i -35 regioni se nalaze na istim pozicijama u petljama oba soja. Sekundarna struktura ovog regiona soja BGIS29 je potpuno drugačija (Slika 4) (Miladinov, 1996).

Analizom hidrolize β -kazeina proteinazama sojeva BGIS29, SK11 i Wg2 pokazano je da postoje razlike između ova tri soja i u pogledu regulacije kazitonom. Aktivnost



Slika 3. Deo regulatornog regiona *prt* gena sojeva BGIS29, Wg2 i SK11. Uokvireni nukleotidi predstavljaju razlike u baznom sastavu između regulatornih regiona sojeva BGIS29 i SK11. Crtice označavaju nukleotide koji nedostaju u soju Wg2.



Slika 4. Sekundarne strukture dela regulatornog regiona *prt* gena sojeva BGIS29, Wg2 i SK11 čija je primarna struktura predstavljena na Slici 3. Strelice u smeru kazaljke na satu predstavljaju potencijalne -10 i -35 regione P_{prtP} promotora, a strelice u suprotnom smeru predstavljaju potencijalne -10 i -35 regione P_{prtM} promotora. Potencijalni -10 region P_{prtP} promotora soja BGIS29 je predstavljen malim slovima. Male strelice i oznake +1P i +1M označavaju mesta početka transkripcije *prtP* i *prtM* gena. dG predstavlja vrednost slobodne energije petlje.

proteinaze soja SK11 linearno zavisi od prisustva kazitona u medijumu. Više koncentracije kazitona imaju inhibitoran efekat na ovu proteinazu. U soju BGIS29 ova regulacija nije tako izražena. Najjača proteinazna aktivnost je registrovana u slučaju kada su ćelije rasle na MCA čvrstoj podlozi i MM sa 0.1% kazitonom. Nešto niža proteinazna aktivnost je detektovana kada su ćelije rasle na MM sa 0.5% ili 2% kazitona, dok je najslabija aktivnost proteinaze bila kada su ćelije prethodno gajene na MM sa 1% kazitona ili na GM17 čvrstoj podlozi. Hidroliza β -kazeina proteinazom soja Wg2 je bila nezavisna od koncentracije kazitona u minimalnom medijumu (Miladinov, 1996).

S obzirom na pokazane razlike u primarnoj i sekundarnoj strukturi regulatornih regiona proteinaznih gena prirodnog izolata BGIS29 u odnosu na prethodno opisane industrijske sojeve SK11 i Wg2, kao i na razlike u regulaciji proteinazne aktivnosti prisustvom kazitona u minimalnom medijumu, bilo je zanimljivo dalje analizirati regulatorni region proteinaznih gena soja BGIS29 i pratiti njegovu regulaciju.

CILJ RADA

Cilj ovog rada je bio:

1. Kloniranje regulatornog regiona *prt* gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29 u vektor za transkripcione fuzije pNZ273;
2. Praćenje uticaja kazitona na regulatorni region proteinaznih gena merenjem aktivnosti *gusA* reporter gena, koji kodira β -glukuronidazu;
3. Određivanje mesta otpočinjanja transkripcije *prtP* i *prtM* gena;
4. Kvantitativna analiza količine iRNK ("Northern blot") u zavisnosti od koncentracije kazitona u medijumu u cilju testiranja mogućeg transkripcionog nivoa regulacije;
5. Deleciona analiza regulatornog regiona i određivanje užeg regiona odgovornog za regulaciju kazitonom;
6. Strukturna analiza regulatornog regiona *prt* gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29;
7. Inaktivacija potencijalnog regulatornog gena proteinaznih gena metodom nespecifične integracije plazmida pG⁺host9::*ISS1*.

MATERIJAL I METODE

1. BAKTERIJSKI SOJEVI

Bakterijski sojevi korišćeni u ovom radu predstavljeni su u Tabeli 1.

Tabela 1.

Bakterijski soj	Genotip ili fenotip	Izvor ili referenca
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
BGIS29	Prirodni izolat, Ilijaš	Musafija i Topisirović, 1990
NZ9000	derivat soja MG1363, bez plazmida, Lac ⁻ , Prt ⁻ , sa integrisanim <i>nisR</i> i <i>nisK</i> genima u hromozomu	De Ruyter <i>et al.</i> , 1996
MPE701	Cm ^r , derivat soja NZ9000 sa plazmidom pMPE701	ovaj rad
MPE705	Cm ^r , derivat soja NZ9000 sa plazmidom pMPE705	ovaj rad
Gh7019	Cm ^r , Em ^r , derivat soja MPE701 sa plazmidom pGh9:: <i>ISSI</i> u replikativnoj formi	ovaj rad
Gh7057	Cm ^r , Em ^r , derivat soja MPE705 sa plazmidom pGh9:: <i>ISSI</i> u replikativnoj formi	ovaj rad
GhΔR194, GhΔR1910, GhΔR1911	Cm ^r , Em ^r , derivati soja Gh7019 sa integrisanim plazmidom pGh9:: <i>ISSI</i> u hromozomu	ovaj rad
GhΔR5711, GhΔR5720, GhΔR5723	Cm ^r , Em ^r , derivati soja Gh7057 sa integrisanim plazmidom pGh9:: <i>ISSI</i> u hromozomu	ovaj rad
MPE194, MPE1910, MPE1911	derivati soja NZ9000 sa retransformisanim plazmidima pMPE701 izolovanog iz sojeva GhΔR194, GhΔR1910 i GhΔR1911	ovaj rad
MPE5711, MPE5720, MPE5723	derivati soja NZ9000 sa retransformisanim plazmidom pMPE705 izolovanog iz sojeva GhΔR5711, GhΔR5720 i GhΔR5723	ovaj rad
GhΔR9, GhΔR19, GhΔR45, GhΔR46, GhΔR85, GhΔR95	Cm ^r , Em ^s , derivati soja ΔR5723, očišćeni od plazmida pGh9:: <i>ISSI</i> , sadrže samo jednu kopiju <i>ISSI</i> elementa u hromozomu	ovaj rad

2. KORIŠĆENI I KONSTRUISANI PLAZMIDI

Plazmidi korišćeni u ovom radu su predstavljeni u Tabeli 2.

Tabela 2.

Plazmidi	Relevantne karakteristike	Referenca
pIPT27	Amp ^r , 3 kb, derivat plazmida pUC18 sa kloniranim <i>TaqI</i> fragmentom (350 bp) regulatornog regiona <i>prt</i> gena soja BGIS29	Miladinov, 1996
pNZ273	Cm ^r , 4.6 kb, vektor za selekciju promotora sa <i>gusA</i> reporter genom bez sopstvenog promotora	Platteeuw <i>et al.</i> , 1994
pMPE701	Cm ^r , 5.3 kb, derivat plazmida pNZ273 sa kloniranim PRTM-PRTP fragmentom (720 bp) koji sadrži P _{<i>prtM</i>} promotor ispred <i>gusA</i> gena	ovaj rad
pMPE705	Cm ^r , 5.3 kb, derivat plazmida pNZ273 sa kloniranim PRTM-PRTP fragmentom (720 bp) koji sadrži P _{<i>prtP</i>} promotor ispred <i>gusA</i> gena	ovaj rad
pGh9::ISS1	Em ^r , 4.6 kb, vektor za nespecifičnu integraciju u hromozom Gram-pozitivnih bakterija	Maguin <i>et al.</i> , 1996

3. KULTIVISANJE BAKTERIJA

Za rast laktokoka korišćen je M17 tečni medijum (Merck GmbH Darmstadt, Germany) sa 0.5% glukozom. Čvrsta podloga za rast dobijena je dodavanjem 1.5% agara. Bakterije su gajene na 30°C.

Za testiranje aktivnosti enzima β-glukuronidaze bakterije su gajene u minimalnom medijumu (MM): (NH₄)₂SO₄ 2 g/l, Na₂HPO₄ 6 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, Na₂SO₄ 0.011 g/l, NaCl 1 g/l, MgCl₂ 0.2 g/l, CaCl₂ 0.01 g/l, FeCl₃ 0.0006 g/l, glukoza 5 g/l, Na-acetat 2 g/l, asparagin 0.08 g/l, biotin 0.1 mg/l, folna kiselina 1 mg/l, riboflavin 1 mg/l, nikotinska kiselina 1 mg/l, Na-pantotenat 1 mg/l i piridoksal 2 mg/l. Čvrsta podloga je dobijana dodavanjem 2% agara. Temperatura kultivacije bakterija je bila 30°C.

4. METODE IZOLACIJE DNK

4.1. Mini-metoda izolacije velikih plazmida iz laktokoka

Veliki plazmidi su izolovani po proceduri koju su opisali O'Sullivan i Klaenhammer (1993). Talog noćne kulture bakterija je resuspendovan u 25% saharozi koja sadrži 30 mg/ml lizozima (200 μl). Smeša je inkubirana 15 min na 37°C, a zatim je dodavano 400 μl alkalnog rastvora SDS-a (3% SDS, 0.2 N NaOH) i inkubirano 7 min na sobnoj temperaturi.

Posle dodavanja 3 M Na-acetata, pH 4.8, ohlađenog na ledu (300 μ l), centrifugirano je 15 min na 4°C (13000 rpm u BiofugiA). Supernatant je prebacivan u čiste mikrotube uz dodavanje 650 μ l izopropanola i centrifugiran 15 min na 4°C na 13000 rpm u BiofugiA. Dobijeni talog je resuspendovan u 320 μ l bidestilovane vode i 200 μ l 7.5 M NH_4 -acetata sa 0.5 mg/ml etidijum-bromida. Smeši je dodato 350 μ l fenol-hloroforma, vorteksovano i centrifugirano na sobnoj temperaturi 5 min. Gornja (vodena) faza je prebacivana u nove mikrotube i DNK je precipitirana hladnim etanolom (96%, -20°C) preko noći na -20°C. Posle centrifugiranja 15 min na 4°C (13000 rpm u BiofugiA) talog je ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C) centrifugiran 5 min na 4°C (13000 rpm u BiofugiA), sušen i resuspendovan u 40 μ l bidestilovane vode. RNK je odstranjivana inkubacijom uzoraka sa RNK-azom (1 μ l, 10 mg/ml) 30 min na 37°C.

4.2. Mini-metoda izolacije plazmida iz laktokoka

Za mini-metodu izolacije plazmida iz laktokoka korišćena je modifikacija metode alkalne lize (Bojovic *et al.*, 1991). Talog iz 5 ml logaritamske kulture bakterija ($\text{OD}_{600}=0.6-0.8$) je opran u TEN puferu (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, finalno pH 8.0) i resuspendovan u 100 μ l PP pufera (0.5 M saharoza, 40 mM NH_4 -acetat, 10 mM Mg-acetat, finalno pH 7.0) sa lizozimom (4 mg/ml). Posle inkubacije na 37°C (15 min), dodavano je 200 μ l sveže pripremljene smeše 1% SDS-a u TE1 puferu (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, finalno pH 12.0). Posle laganog mešanja dodavan je 3 M Na-acetat pH 4.5 (150 μ l), smeša je inkubirana na -20°C (10 min) i zatim centrifugirana (20 min na 13000 rpm na 4°C u BiofugiA). Dobijeni supernatant je prebacivan u čiste mikrotube, dodavano je 2 zapremine etanola (96%, -20°C) i posle centrifugiranja (20 min na 13000 rpm na 4°C u BiofugiA) talog je ispran hladnim etanolom (75%, -20°C) i centrifugiran (5 min na 13000 rpm na 4°C u BiofugiA). Talog je osušen i resuspendovan u 20 μ l H_2O . RNK je odstranjivana inkubacijom uzoraka sa RNK-azom (1 μ l, 10 mg/ml). Da bi ovako dobijena plazmidna DNK mogla da se seče restrikcionim enzimima bilo je potrebno da se prečisti fenolom (PCI).

4.3. Prečišćavanje DNK fenolom (PCI procedura)

Uzorak DNK je razblaživan vodom do finalne zapremine 200 μ l. Dodavano je 200 μ l PCI smeše (fenol, hloroform, izoamil alkohol u zapreminskom odnosu 10:9:1), dobro promešano i centrifugirano 7 min na 13000 rpm u BiofugiA. Vodena faza je pažljivo prebacivana u čiste mikrotube i u nju je dodavano 200 μ l etiletra. Posle mešanja i centrifugiranja (1-2 min na 13000 rpm u BiofugiA), odstranjivana je gornja faza i u donju

fazu je dodavan finalno 0.3 M Na-acetat i 2.5 zapremine hladnog etanola (96%, -20°C). Posle inkubacije na -80°C (20 min) i centrifugiranja (20 min na 13000 rpm na 4°C u BiofugiA), dobijeni talog je ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C), centrifugiran (5 min na 13000 rpm na 4°C u BiofugiA), sušen i resuspendovan u vodi. Na ovaj način prečišćena DNK može da se koristi za digestije restrikcionim enzimima, za ligacije, transformacije itd.

4.4. Metoda izolacije totalne DNK iz laktokoka

Ukupna DNK iz laktokoka je izolovana na sledeći način: Talog logaritamske kulture bakterija ($OD_{600}=0.6-0.8$) je resuspendovan u 0.5 ml rastvora za lizozim (6.7% saharoza, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, finalno pH 8.0). Dodat je lizozim u koncentraciji od 4 mg/ml i 50 µg/ml RNK-aze. Rastvor je inkubiran 30 min na 37°C, ili dok ćelije nisu postale translucetne, a zatim je dodavano 250 µl 2% SDS-a. Suspenzija je intenzivno mešana na vorteksu u trajanju od jednog minuta ili dok viskozitet rastvora nije postao primetno manji. Posle ovog koraka vršeno je odstranjivanje proteina višestrukom fenolskom ekstrakcijom (do potpunog gubitka međufaze) dodavanjem 250 µl neutralnog fenol-hloroforma. Posle svakog dodavanja fenola, rastvor je intenzivno mešan na vorteksu 30 sec i centrifugiran 2 min na 13000 rpm u BiofugiA. Pažljivo sakupljenom supernatantu je dodavana 1/10 zapremine 3 M Na-acetata, pH 4.8, i 1 zapremina izopropanola, a zatim je rastvor lagano mešan i inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi. Ukupna DNK je taložena centrifugiranjem (2 min na 13000 rpm u BiofugiA), a talog je rastvaran u 0.5 ml TE pufera. Posle dodavanja 25 µl 100 mM Spermidin-HCl rastvor je inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi i ponovo centrifugiran kao u prethodnom koraku. Dobijeni talog je resuspendovan u 300 µl 0.3 M Na-acetata u 10 mM MgCl₂, a zatim je rastvoru dodavano 0.7 ml etanola (96%, -20°C), sve lagano izmešano i inkubirano 60 min na sobnoj temperaturi. Posle centrifugiranja (2 min na 13000 rpm u BiofugiA) talog je ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C), centrifugiran (2 min na 13000 rpm u BiofugiA), sušen i resuspendovan u 100 µl bidestilovane vode. Ovako pripremljena DNK može da se koristi za digestije restrikcionim enzimima (Hopwood *et al.*, 1985).

4.5. Metoda izolacije velike količine plazmidne DNK iz laktokoka

Velika količina plazmidne DNK iz laktokoka je izolovana po izmenjenoj proceduri za JETSTAR Plasmid Kit. Talog iz 200 ml (maxi-prep) logaritamske kulture bakterija ($OD_{600}=1.0$) je resuspendovan u 10 ml rastvora za lizozim (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 20% saharoza, finalno pH 8.0) sa 4 mg/ml lizozima. Dobijena homogena suspenzija je inkubirana 1 h na 55°C, a potom je dodavano 10 ml rastvora za lizu ćelija,

(200 mM NaOH i 1% SDS). Rastvor je mešan dok suspenzija nije postala homogena, a zatim inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi. Neutralizacija rastvora je izvršena dodavanjem 10 ml 3 M K-acetata pH 5.5 i centrifugirano 10 min na 20°C na 18000 rpm u Sorvall centrifugi. Supernatant je zatim propuštan kroz JETSTAR kolonu za maxi-prep izolaciju plazmida. Prečišćavanje DNK u koloni je vršeno dodavanjem 60 ml rastvora za pranje (800 mM NaCl, 100 mM Na-acetat, finalno pH 5.0). Elucija DNK sa kolone je vršena dodavanjem 15 ml rastvora za eluciju (1.25 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, finalno pH 8.5). Ovako dobijena DNK je precipitirana dodavanjem 1/10 zapremine 3 M Na-acetata pH 4.5 i 2.5 zapremine hladnog 100% etanola. Precipitacija je vršena preko noći na -20°C. Precipitirana DNK je centrifugirana 30 min na 4°C na 18000 rpm u Sorvall centrifugi. Nakon centrifugiranja supernatant je odliven, a talog opran sa 20 ml 75% etanola i centrifugirano 5 min na 4°C na 18000 rpm u Sorvall centrifugi. Talog je sušen na vazduhu i resuspendovan u 500 µl bidestilovane vode.

4.6. Prečišćavanje PCR fragmenata

Prečišćavanje DNK fragmenata dobijenih PCR metodom i njihova elucija iz agaroznog gela je vršeno po uputstvu za Gibco BRL "GlassMax DNA Matrix System". Posle preparativne elektroforeze isečen je deo gela sa odgovarajućim fragmentom DNK. Izmerena je težina gela i dodata su 3 ml 6 M Na-jodida ("Binding Solution") i 200 µl "TBE Enhancing" pufera po gramu gela. Smeša je inkubirana 10 min na 55°C ili do potpunog rastvaranja gela. Dobijenom rastvoru je dodato 10 µl "GlassMax Matrix-a" i suspenzija je inkubirana 15 min na ledu. Nakon toga suspenzija je centrifugirana 20 sec na 13000 rpm u BiofugiA. Supernatant je uklonjen, a talog je opran tri puta sa 500 µl 1 x "Wash" pufera. Nakon svakog pranja suspenzija je centrifugirana (20 sec, 13000 rpm, BiofugaA) i supernatant odstranjen. Posle trećeg pranja talog je osušen na vazduhu i resuspendovan u 20 µl bidestilovane vode. Rastvor je inkubiran 3 min na 50°C da bi se DNK odvojila od "GlassMax Matrix-a". Nakon centrifugiranja (20 sec, 13000 rpm, BiofugaA) supernatant sa prečišćenom DNK je prebačen u novu mikrotubu.

5. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK

5.1. Sečenje restrikcionim enzimima

Sečenje restrikcionim enzimima je rađeno u komercijalnim puferima u zavisnosti od korišćenih enzima. Uslovi za sečenje DNK restrikcionim enzimima kao što su količina enzima, pufer i temperatura inkubacije, određivani su prema savetu proizvođača. Količina DNK je bila 1 µg na 10 µl reakcione smeše.

5.2. Ligacija DNK fragmenata

Ligacija fragmenata DNK (Maniatis *et al.*, 1982) je rađena tako što su DNK fragmenti sa komplementarnim lepljivim krajevima u finalnoj količini od 1 µg u ligacionom puferu (10 mM MgCl₂, 10 mM ditiotritol, 1 mM spermidin, 1 mM ATP, 100 µg/ml BSA, 50 mM Tris-HCl, finalno pH 7.4) sa jednom jedinicom T4 DNK ligaze, inkubirani 16 h na 16°C.

5.3. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom ("Polymerase Chain Reaction")

Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom je vršeno tako što su totalnoj ili plazmidnoj DNK (0.1-1 µg) u 1x reakcionom puferu (RP: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100 finalno pH 9.0 na 25°C) dodavani MgCl₂ u finalnoj koncentraciji 2.5 mM, dNTP smeša (svaki dNTP po 200 µM), prajmeri (svaki po 2.5 µM) i DNK *Taq* polimeraza (1 U). U smešu je dodavano pola zapremine parafinskog ulja. PCR je rađen po sledećem programu: ciklus 1: denaturacija 5 min na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 45°C ili 55°C (zavisno od nukleotidnog sastava prajmera), polimerizacija 1 min na 72°C; ciklusi 2-29: denaturacija 1 min na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 45°C ili 55°C, polimerizacija 1 min na 72°C; ciklus 30: denaturacija 1 min na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 45°C ili 55°C, polimerizacija 5 min na 72°C. Sekvence korišćenih prajmera date su u Tabeli 3.

Tabela 3. Sekvence prajmera korišćenih u ovom radu (sekvence koje prepoznaju restrikcioni enzimi su podvučene)

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera
PRTP700	5'-GCTTGAATTCGTTGTCGCTGC GGTTGT-3'
PRTM700	5'-GCATGAATTC AATGCACGATAAATGAG-3'
PRTP300	5'-AGCAGTCGGATCCGTCGACGTATTTGCGAG-3'
ΔM300	5'-TAAAGAATTC CGCTAAAAGTTAATTTACAG-3'
18745	5'-GGGTTGGGGTTTCTTACAGGACGTA-3'
930512	5'-CCGCCGGAATTCTTTTCGTTGAATTTGTTCTT
930513	5'-AAATTGGTCGACATAGCCCTTTCTTTTTCCTTTGCATCC-3'
P10	5'-GTCTGTAAACGGCTAAA-3'
P10C	5'-TTTAGCCGTTTACAGAC-3'
P17C	5'-TGGCAAGACAGCCAGCG-3'
P40	5'-ATTTCCGTTGAATTTGC-3'
P40C	5'-AGAAGCAAATTC AACGG-3'

6. STRUKTURNA ANALIZA DNK

6.1. Teorijska analiza strukture DNK

Teorijska analiza prisustva lokalne zakrivljenosti DNK u regulatornom regionu soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29 urađena je na osnovu parametara krivljenja koji su određeni na osnovu učestalosti sečenja određenih tripleta nukleotida DNK-azom I (Tabela 4). 3-D grafički prikaz zakrivljenih DNK regiona je urađen pomoću programa DIAMOND (Dlakic and Harrington, 1998).

7. ELEKTROFOREZA DNK

7.1. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Elektroforeza DNK je rađena na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani rastvaranjem agaroze u TBE puferu (89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA, finalno pH 8.3) i dodavanjem etidijum bromida (0.5 mg/ml). Kao pufer za elektroforezu korišćen je TBE pufer sa 0.5 mg/ml etidijum bromida. Agarozni gelovi različitog procenta (1% ili 2%) su korišćeni u zavisnosti od veličine DNK traka koje je trebalo razdvojiti. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela.

Veličine fragmenata DNK dobijenih posle sečenja restrikcionim enzimima određivane su na agaroznim gelovima upoređivanjem dužine puta DNK trake koja se ispituje u odnosu na dužinu puta koju su prešli DNK fragmenti poznate veličine. Korišćeni su sledeći DNK standardi:

- λ DNK sečena *Hind*III i *Eco*RI restrikcionim enzimima pri čemu su dobijani fragmenti DNK dužina: 22400 bp, 5370 bp, 4310 bp, 3530 bp, 2020 bp, 1940 bp, 1610 bp, 1360 bp, 940 bp, 860 bp, 580 bp, 150 bp.
- ϕ X174 RF DNA sečena *Hae*III restrikcionim enzimom: 1353 bp, 1078 bp, 872 bp, 603 bp, 310 bp, 281 bp, 271 bp, 234 bp, 194 bp, 118 bp, 72 bp.

7.2. Vertikalna elektroforeza DNK na poliakrilamidnom gelu

Mobilnost DNK fragmenata je ispitivana na vertikalnoj poliakrilamidnoj gel elektroforezi (PAGE). Gelovi su pravljani na sledeći način: od 40% stoka akrilamida (38 g akrilamida i 2 g bisakrilamida u 100 ml vode), pravljani su 8% gel dodavanjem TBE pufera (89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA, finalno pH 8.3) sa ili bez $MgCl_2$ (finalno 10 mM) i faktora polimerizacije (TEMED i amonijum persulfat). Kao pufer za elektroforezu

Tabela 4. Parametri krivljenja DNK

Trinukleotid	Učestalost sečenja	Parametar (ln p)
AAT/ATT	89	-0.280
AAA/TTT	278	-0.274
CCA/TGG	45	-0.246
AAC/GTT	81	-0.205
ACT/AGT	77	-0.183
CCG/CGG	73	-0.136
ATC/GAT	112	-0.110
AAG/CTT	110	-0.081
CGC/GCG	84	-0.077
AGG/CCT	101	-0.057
GAA/TTC	117	-0.037
ACG/CGT	84	-0.033
ACC/GGT	87	-0.032
GAC/GTC	81	-0.013
CCC/GGG	141	-0.012
ACA/TGT	52	-0.006
CGA/TCG	84	-0.003
GGA/TCC	71	0.013
CAA/TTG	74	0.015
AGC/GCT	35	0.017
GTA/TAC	83	0.025
AGA/TCT	127	0.027
CTC/GAG	102	0.031
CAC/GTG	55	0.040
TAA/TTA	99	0.068
GCA/TGC	34	0.076
CTA/TAG	64	0.090
GCC/GGC	57	0.107
ATG/CAT	71	0.134
CAG/CTG	61	0.175
ATA/TAT	80	0.182
TCA/TGA	127	0.194

Parametri u tabeli su dati u arbitrarnim jedinicama.

korišćen je TBE pufer sa ili bez $MgCl_2$ (finalno 10 mM). Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 150 V na sobnoj temperaturi u trajanju od 16 h.

Mobilnost DNK fragmenata je određivana upoređivanjem dužine pređenog puta DNK fragmenta koji se ispituje u odnosu na dužinu puta koju su prešli DNK fragmenti poznate veličine. Korišćeni su sledeći DNK standardi:

- ϕ X174 RF DNA sečena *Hae*III restrikcionim enzimom: 1353 bp, 1078 bp, 872 bp, 603 bp, 310 bp, 281 bp, 271 bp, 234 bp, 194 bp, 118 bp, 72 bp;
- λ DNK sečena *Pst*I restrikcionim enzimom: 805 bp, 516 bp, 467 bp, 448 bp, 339 bp;
- pBR322 sečen *Hin*FI restrikcionim enzimom: 1631 bp, 516 bp, 506 bp, 394 bp, 344 bp, 298 bp, 220 bp.

Koeficijent retardacije (R) je izračunavan po sledećoj formuli:

$$R = X_M / Z$$

gde X_M predstavlja dobijenu veličinu fragmenta (bp) na osnovu standarda, a Z poznatu veličinu fragmenta (bp) na osnovu DNK sekvence.

8. TRANSFORMACIJA ĆELIJA SA DNK

8.1. Transformacija laktokoka elektroporacijom

Elektroporacija laktokoka je rađena prema proceduri koju su opisali Holo i Nes (1989). Logaritamska kultura laktokoka ($OD_{600}=0.5-0.8$) je razblažena 100 puta u GM17 sa 2% glicinom. Kultura je ponovo inkubirana na 30°C do $OD_{600}=0.2-0.7$. Talog bakterija iz 4 ml kulture je ispran dva puta u istoj zapremini 0.5 M saharoze sa 10% glicerolom i resuspendovan u 40 μ l istog rastvora. Dodavan je 1 μ g plazmidne DNK ili ligacione smeše, suspenzija je mešana i prebacivana u kivete za elektroporaciju dijametra 0.2 cm. Puls je rađen u GENE PULSER aparatu sa "puls kontrolerom" (Bio-Rad Laboratories) sa podešenim uslovima od 12.5 kV/cm, 25 μ F i 200 Ω . Odmah zatim pulsirana suspenzija ćelija je prebacivana u epruvete i dodavana joj je smeša za regeneraciju (M17, 0.5 M saharoza, 0.5% glukoza, 20 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$). Nakon toga smeša je inkubirana 2 h na 30°C (28°C u eksperimentu sa pGh9::ISS1 plazmidom) posle čega su alikvoti transformacione smeše razmazivani na GM17 selektivne podloge sa odgovarajućim antibiotikom, koje su inkubirane na 30°C do pojave transformanata (obično 2-3 dana).

9. DNK/DNK HIBRIDIZACIJA (Southern blot)

9.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane

Po završenoj elektroforezi DNK je prenošena na najlonske membrane po metodi Southern-a (1975). Da bi se olakšao prenos i velikih DNK, po završetku elektroforeze,

agarozni gel je tretiran 0.25 M HCl tokom 15 min, da bi se ostvarilo delimično prekidanje molekula DNK uzrokovano depurinacijom. Gel je zatim ispiran u destilovanoj vodi, a denaturacija DNK je vršena potapanjem gela 2 puta po 15 min u rastvor koji sadrži 0.5 M NaOH i 1.5 M NaCl (denaturacioni rastvor). Najlonska membrana (Gene screen filter), na koju će DNK biti prenet, je potapana na kratko u vodu, a zatim u denaturacioni rastvor. Pre transfera gel je neutralisan u neutralizacionom puferu (1.5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, finalno pH 7.5) 2 puta po 20 min. Pripremani su listovi Whatman 3 MM filter papira. Dva lista 3 MM papira, veći od gela, su potapani u denaturacioni rastvor i slagani jedan na drugi. Na njih je stavljan tretiran gel, tako da mu je strana sa DNK bila okrenuta na gore, a oko gela su stavljeni graničnici. Na njega je stavljena najlonska membrana dimenzija kao i sam gel i preko nje još dva navlažena 3 MM papira. Pri stavljanju papira vođeno je računa da ne ostanu mehurići vazduha zarobljeni među njima. Preko svega je stavljan 10 cm deo sloj upijajućeg papira i sve je ravnomerno opterećeno tegom od 1 kg. Transfer je vršen preko noći u 10 x SSC puferu (1.5 M NaCl, 0.15 M Na-citrat, finalno pH 7.0).

Posle završenog transfera najlonska membrana je skidana i potapana u 5 x SSC 2 puta po 15 min. Prosušena membrana je stavljena između dva 3 MM papira i pečena 2 h na 80°C.

9.2. Obeležavanje probe

Za obeležavanje DNK probe je korišćen Gibco BRL "Bio Nick Labeling System". U 1 µg probe su dodavani dNTP smeša (dCTP, dGTP, dTTP, svaki 0.02 mM, dATP 0.01 mM, biotin 14-dATP 0.01 mM, MgCl₂ 5 mM, β-merkaptioetanol 10 mM, BSA 10 µg/ml, Tris-HCl 50 mM, finalno pH 7.8) i smeša enzima (DNK Polimeraza I 0.05 U/µl, DNaza I 0.00075 U/µl, Mg-acetat 0.5 mM, β-merkaptioetanol 0.1 mM, fenilmetilsulfonil fluorid 0.01 mM, glicerol 5% (v/v), BSA 10 µg/ml, Tris-HCl 5 mM, finalno pH 7.5). Dobijena smeša je inkubirana 1 h na 16°C. Reakcija je zaustavljena, a neugrađeni nukleotidi su odstranjeni tako što je proba precipitirana 96% etanolom. Proba je resuspendovana u sterilisanoj bidestilovanoj vodi. Pre hibridizacije proba je denaturisana kuvanjem 10 min na 100°C.

9.3. Hibridizacija DNK

Hibridizacija DNK sa neradioaktivno obeleženim probama je vršena na sledeći način: filteri su pakovani u kesice i inkubirani 1-2 h na 65°C u 10 ml hibridizacionog pufera (0.1% N-lauril sarkozil, 0.02% SDS, 1% "bloking" reagens). Nakon toga, u kesice je sipano 1 ml svežeg hibridizacionog pufera po cm² membrane i prethodno obeležena i denaturisana proba. Hibridizacija i pranje membrane su rađeni 16 h na 65°C. Hibridizacija je vršena preko noći (16 h).

Za detekciju hibrida korišćen je Gibco BRL "PhotoGene Detection System". Proces detekcije uključuje tri osnovna koraka: 1. hibridizacija biotinom obeležene probe sa DNK imobilisanom na membrani; 2. vezivanje streptavidin alkalne fosfatase konjugata (SA-AP) za biotinske grupe.; 3. inkubiranje membrane sa supstratom za alkalnu fosfatazu koji daje luminescenciju kada se defosforiliše.

Pranje filtera i detekcija hibrida su vršeni po uputstvu proizvođača (Gibco BRL).

10. SEKVENCIRANJE DVOLANČANE DNK

Redosled nukleotida u DNK je određivan po metodi koju su opisali Sanger *et al.* (1977). Metoda se zasniva na sposobnosti Klenow fragmenta polimeraze I, odnosno T7 polimeraze, da nadovezujući se na prajmer sintetiše komplementarni lanac DNK koristeći jednolančanu komplementarnu DNK kao matricu. Reakcija sinteze komplementarnog lanca se zaustavlja ugrađivanjem ddNTP koji nemaju 3'-OH grupu neophodnu za izduživanje lanca. Protokol i reagensi za sekvenciranje su korišćeni po preporuci proizvođača (USB, Lucern, Švajcarska). Sekvenciranje je rađeno sa denaturisanim plazmidima kao matricom.

10.1. Denaturisanje plazmidne DNK

Plazmidna DNK (3-5 µg) rastvarana je u 20 µl vode. Dodavano je 2 µl 2 M NaOH, 2 mM EDTA i inkubirano 30 min na 37°C. Rastvor je neutralisan sa 3 µl 3 M Na-acetata pH 4.5. Posle dodavanja 7 µl vode DNK je precipitirana sa 75 µl hladnog etanola (96%, -20°C) 15 min na -70°C i centrifugirana 20 min na 4°C (13000 rpm, BiofugaA). Denaturisana plazmidna DNK je resuspendovana u 7 µl vode.

10.2. Vezivanje matrice i prajmera i reakcije sekvenciranja

Ovako pripremljena DNK je ulazila u reakciju sparivanja sa odgovarajućim oligonukleotidnim prajmerom koji je komplementaran određenoj sekvenci na vektorskoj DNK. Oko 1 µg DNK je pomešano sa 2-5 ng prajmera u odgovarajućem puferu i inkubirano 30 min na 37°C. U reakciju je zatim dodata smeša nukleotida i 0.5 µl α -³⁵S tio-dATP (Amersham) (spec. akt. >1000Ci/mmol) i Sequenase (1 U, USB). Reakciona smeša je zatim podeljena u 4 mikrotube u koje su prethodno dodati različiti dideoksinukleotidi. Reakcije su zaustavljane dodavanjem pufera za nanošenje na akrilamidnu gel elektroforezu (formamid, EDTA, bromfenol plavo i ksilen cijanol). Uzorci su kuvani 2 min na 75°C i čuvani na -20°C do nanošenja na gel.

Za analizu reakcija je korišćen 6% poliakrilamidni gel.

11. METODE RADA SA RNK

11.1. Izolacija totalne RNK iz laktokoka

Totalna RNK iz laktokoka je izolovana po "Macaloid" proceduri (Kuipers *et al.*, 1993). Talog logaritamske kulture bakterija ($OD_{600nm}=1.0$) je resuspendovan u 500 μ l hladnog TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, finalno pH 8.0). Suspenzija ćelija je prebačena u kivete za razbijanje ćelija prethodno sterilisane sa 0.8 g cirkonijumskih kuglica, 0.18 g 4% Macaloid stoka (Macaloid-Rheological additive, Rheox, Scotland, UK rastvoren u TE puferu pH 7.5) i 50 μ l 10% SDS-a. U kivete je takođe dodato i 500 μ l fenola pH 7.5. Ćelije su razbijane 3 x 1 min u "Mini Bead Beater" (Biospec Products, Bartlesville, Oklahoma), a između svakog ciklusa ćelije su hladene na ledu 1 min. Nakon toga suspenzija je centrifugirana (15 min, 13000 rpm, +4°C, Eppendorf centrifuga), vodena faza je prebačena u novu mikrotubu i dodatno prečišćena dodavanjem 1 zapremine fenola i 1 zapremine hloroforma. Rastvor je vorteksovan i centrifugiran (5 min, 13000 rpm, 4°C, Eppendorf centrifuga), vodena faza prebačena u novu mikrotubu, a zaostali fenol je odstranjen dodavanjem 1 zapremine hloroforma. Rastvor je vorteksovan, centrifugiran i vodena faza prebačena u novu mikrotubu. RNK je precipitirana dodavanjem 1.5 zapremine izopropanola na -20°C preko noći ili duže. Pre upotrebe alikvot je centrifugiran, supernatant je izbačen i talog resuspendovan u bidestilovanoj vodi. Količina i čistoća RNK su proveravani spektrofotometrijski na 260 nm i 280 nm, pri čemu je kao čista RNK uzimana ona gde je odnos vrednosti dobijenih merenjem na 260 nm i 280 nm bio između 1.5 i 2.

11.2. Određivanje mesta početka transkripcije gena ("primer extension")

Određivanje mesta početka transkripcije gena ("primer extension") je vršeno na sledeći način: 30-80 μ g RNK je pomešano sa 2 pmola prajmera. Za određivanje mesta otpočinjanja transkripcije *prtP* gena korišćen je prajmer 930513, a za start transkripcije *prtM* gena korišćen je prajmer P10 (vezivanje prajmera i templeta je vršeno u "Annealing" puferu (10 mM Hepes, 50 mM KCl, finalno pH 7.0) 2 min na 90°C, a zatim je smeša postepeno hladena na sobnoj temperaturi do 37°C. Koncentracija magnezijumovih jona je povećana dodavanjem polovine zapremine "AnnealingM" pufera (10 mM Hepes, 50 mM KCl, 30 mM MgCl₂, finalno pH 7.0) nakon čega je smeša inkubirana 20 min na sobnoj temperaturi. U 4.5 μ l "annealing" smeše je dodato 4.5 μ l RT smeše (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 0.25 mM dNTP (dTTP, dGTP, dCTP), 3.2 μ Ci α -[³⁵S]dATP, 1u AMV

reverzne transkriptaze [BRL], finalno pH 8.3) i sve zajedno inkubirano 15 min na 42°C. Posle dodavanja 2 μ l “chase” smeše (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), finalno pH 8.3) reakciona smeša je dodatno inkubirana u trajanju od 20 min. Reakcije su zaustavljane dodavanjem pufera za nanošenje na gel (formamid, EDTA, bromfenol plavo i ksilen cijanol). Uzorci su čuvani na -20°C, i denaturisani 3 min na 75°C pre nanošenja na gel.

Za analizu reakcija sa reverznom transkriptazom korišćen je 6% poliakrilamidni gel na koji su paralelno nanošeni uzorci iz reakcija sekvenciranja DNK sa istim prajmerom koji je korišćen i za “primer extension”.

11.3. Elektroforeza RNK na formaldehidnom gelu

Elektroforeza RNK je rađena na horizontalnim agaroznim gelovima (Sambrook *et al.*, 1989). Gelovi su pravljani rastvaranjem agaroze (1%) u MOPS puferu (20 mM MOPS, 5 mM Na-acetat, 0.1 mM EDTA, finalno pH 7.0) uz dodavanje 7.4% formaldehida. Uzorci za elektroforezu su pripremani na sledeći način: 4.5 μ l RNK (\leq 20 μ g), 2 μ l 5 x MOPS pufera, 3.5 μ l formaldehida (37%), 10 μ l formamida (dejonizovan, sa 4°C) i 2 μ l EtBr (stok 10 mg/ml). Ovako pripremljeni uzorci su inkubirani 15 min na 55°C. Pred nanošenje na gel uzorcima je dodavano 2 μ l “loading” pufera (na vrh špatule bromfenolplavo rastvoren u 50% saharozi). Kao pufer za elektroforezu korišćen je MOPS pufer. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 5 V/cm gela.

Veličine RNK transkripata su određivane na agaroznim gelovima upoređivanjem dužine puta RNK trake koja se ispituje u odnosu na dužinu puta koju su prešli RNK fragmenti poznate veličine. Korišćen je sledeći RNK standard: 9.49 kb, 7.46 kb, 4.40 kb, 2.37 kb, 1.35 kb, 0.24 kb.

11.4. Hibridizacija DNK/RNK (“Northern blot”)

Po završenoj elektroforezi RNK je prenošena na Gene Screen Plus (Dupont, Boston, Mass.) najlonske membrane po metodi Southern-a (1975). Denaturacija RNK je vršena potapanjem gela 20 min u 5 mM NaOH. Pre transfera gel je neutralisan u 1 M Tris-HCl pH 7.0, u trajanju od 20 min, a zatim pran 20 min u 20 x SSC puferu. Blot aparat je delimično napunjen 10 x SSC puferom, a platforma na koju će biti stavljen gel je prekrivena parčetom Watman 3MM filter papira ukrojenog tako da bude iste širine kao platforma, ali duži. Krajevi filter papira su potopljeni u pufer i na taj način je papir kapilarnim silama saturisan puferom. Na filter papir je stavljan tretiran gel, tako da mu je strana sa RNK bila okrenuta na gore, a oko gela su stavljeni graničnici. Na njega je stavljana membrana dimenzija kao i

sam gel i preko nje još dva navlažena 3 MM papira. Pri stavljanju papira vođeno je računa da ne ostanu mehurići vazduha zarobljeni među njima. Preko svega je stavljan 10 cm deo sloj upijajućeg papira i sve je ravnomerno opterećeno tegom od 1 kg. Transfer je vršen preko noći u 10 x SSC puferu (87.2 g/l NaCl i 44.1 g/l tri-natrium-citrata).

Posle završenog transfera najlonska membrana je skidana i potapana 15 min u 20 x SSC. Prosušena membrana je stavljana između dva 3 MM papira i pečena 2 h na 80°C.

11.5. Obeležavanje probe ("Nick"-translacija)

Obeležavanje DNK probe za hibridizaciju sa RNK je rađeno "nick"-translacijom radioaktivnim izotopom $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP (Amersham International plc, UK) (Sambrook *et al.*, 1989). U 500 ng probe je dodavano: pufer za "nick"-translaciju (10 mM MgSO_4 , 0.1 mM DTT, 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 50 mM Tris-HCl, finalno pH 7.2), smeša dNTP (dGTP, dCTP, dTTP - 0.05 mM svaki), radioaktivni $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP i enzim Polimeraza/DNK-aza I (1 U). Dobijena smeša je inkubirana 1 h na 15°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 1/10 zapremine 0.5 M EDTA, a neugrađeni nukleotidi su odstranjeni tako što je proba prečišćena "GlassMax Matrix System-om" i precipitirana 96% etanolom. Proba je resuspendovana u 100 μl bidestilovane vode. Pre hibridizacije proba je denaturisana kuvanjem 5 min na 100°C.

11.6. Hibridizacija DNK/RNK

Hibridizacija RNK sa radioaktivno obeleženim DNK probama je vršena na sledeći način: filteri su pakovani u Falcon epruvete i inkubirani 1 h na 65°C u 10 ml hibridizacionog pufera (0.5 M NaHPO_4 , 1% BSA Frakcija V, 1 mM EDTA, 7% SDS, finalno pH 7.2). Nakon prehibridizacije, u pufer za hibridizaciju je dodata prethodno obeležena i denaturisana proba. Hibridizacija je rađena 16 h na 65°C. Nespecifični signali su eliminisani pranjem membrane u 6 x SSC, 2 x SSC i 0.1 x SSC puferima uz postepeno povišavanje temperature od 50°C do 65°C.

12. TEST AKTIVNOSTI β -GLUKURONIDAZE

12.1. Detekcija aktivnosti β -glukuronidaze na čvrstoj podlozi

Na čvrste GM17 podloge sa odgovarajućim antibiotikom utrljano je 50 μl 100 mM X-glukuronida rastvorenog u dimetilformamidu (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA). Kolonije koje produkuju β -glukuronidazu su plave boje.

12.2. Priprema ćelijskog ekstrakta za enzimski esej

Ćelijski ekstrakt za enzimski esej je pripreman prema ranije opisanoj proceduri (Kuipers *et al.*, 1995). Talog prekonoćne kulture bakterija je resuspendovan u 1 ml Na-fosfatnog pufera (50 mM NaHPO₄, pH 7.0) tako da je finalni OD_{600nm}=2.0. Ćelije su permeabilisane dodavanjem 50 µl acetona/toluena (9:1) po ml ćelija, nakon čega su ćelije inkubirane 10 min na 37°C. Dobijeni ekstrakt je odmah korišćen za enzimski esej.

12.3. Enzimski esej

Praćenje aktivnosti enzima β-glukuronidaze je rađeno po proceduri koju su opisali Kuipers *et al.* (1995). U 40 µl ćelijskog ekstrakta je dodato 950 µl reakcionog pufera (50 mM NaHPO₄, 10 mM β-merkaptotanol, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, finalno pH 7.0) i 10 µl 100 mM p-nitro-β-D-glukuronske kiseline (Clontech, Palo Alto, CA). Smeša je inkubirana u termostatiranoj ćeliji spektrofotometra (Uvikon 810, Kontron, Zurich, Switzerland) na 37°C i praćena je promena OD_{405nm}. Dobijene vrednosti su standardizovane prema ukupnoj količini proteina u reakcionoj smeši određenoj po metodi koju je opisao Bradford (1976). Jedinica aktivnosti β-glukuronidaze predstavlja promenu OD_{405nm} u jedinici vremena (min) po mg proteina.

12.4. Određivanje ukupne količine proteina

Ukupna količina proteina je određivana po metodi koju je opisao Bradford (1976). U 200 µl ćelijskog ekstrakta je dodato 800 µl Bradford reagensa (BioRad Laboratories Ges.m.b.H, Wien, Austria). Smeša je inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi, a nakon toga je meren OD_{595nm} na spektrofotometru. Koncentracija proteina je određivana u odnosu na standardnu krivu dobijenu sa govedim serum albuminom (BSA). Napravljena je serija uzoraka sa različitim koncentracijama BSA (2-20 µg) i izmerene su njihove vrednosti OD_{595nm}. Zatim je kompjuterskim programom Excel 5.0 dobijena standardna kriva vrednosti OD_{595nm} BSA uzoraka u odnosu na koncentraciju, metodom linearne regresije. Poređenjem poznatih vrednosti BSA sa standardne krive sa nepoznatim vrednostima OD_{595nm} za uzorak određivana je koncentracija proteina (mg/ml) u uzorku koji se ispituje.

13. KONSTRUKCIJA “KNOCK-OUT” SOJEVA

13.1. Transformacija laktokoka plazmidom pGh9::ISS1

“Knock-out” sojevi su konstruisani metodom integracije plazmida pGh9::ISS1 u hromozom domaćina (Maguin *et al.*, 1996). Čelije laktokoka su transformisane po proceduri koju su opisali Holo i Nes (1989). Temperatura regeneracije je bila 28°C, da bi se omogućila replikacija plazmida pGh9::ISS1. (Replikacija plazmida pGh9::ISS1 zavisi od temperature, tj. ovaj plazmid replicira na 28°C, a na temperaturama iznad 37.5°C se integriše u hromozom domaćina). Transformanti su selektovani na čvrstim podlogama sa eritromicinom (Em – 2.5 µg/ml). Em^f transformanti su dalje korišćeni za transpoziciju.

13.2. Transpozicija

Prekonoćna kultura bakterija je razblažena 100 puta u GM17 medijumu bez antibiotika i gajena 2 h na 28°C, da kultura uđe u logaritamsku fazu. Nakon toga temperatura inkubacije je povišena na 37.5°C. S obzirom da je to nepermisivna temperatura za replikaciju plazmida pGh9::ISS1, plazmid se integriše u hromozom domaćina, ili se gubi iz populacije. Uzorci kulture (0.1 ml razblaženja 10⁻⁶) su utrljavani na čvrstu GM17 podlogu sa odgovarajućim antibioticima. Transpozanti su rasli na 37.5°C dva dana.

13.3. Eliminacija plazmida pGh9::ISS1 iz hromozoma i fiksiranje mutacije

Prekonoćna kultura bakterija je razblažena 10⁶ puta u 5 ml GM17 bez antibiotika i inkubirana na 28°C do saturacije. Saturisana kultura je razblažena 10⁶ puta i utrljana na čvrstu GM17 podlogu bez antibiotika. Temperatura kultivacije je bila 28°C. Čelije kod kojih je došlo do gubitka plazmida iz hromozoma su selektovane presejavanjem na čvrste GM17 podloge sa i bez Em (2.5 µg/ml). Dalji rad je nastavljen sa kolonijama koje su bile Em^s.

13.4. API test i kriva rasta

API 50 CHS galerija, kombinovana sa API 50 CHS medijumom je korišćena prema uputstvu proizvođača. Kriva rasta je rađena na sledeći način: prekonoćne kulture bakterija gajene u GM17 medijumu su razblaživane 100 puta u M17 medijumu sa različitim šećerima (0.5% glukoza, 0.5% maltoza ili 0.5% galaktoza) ili kombinacijama dva šećera (0.5%

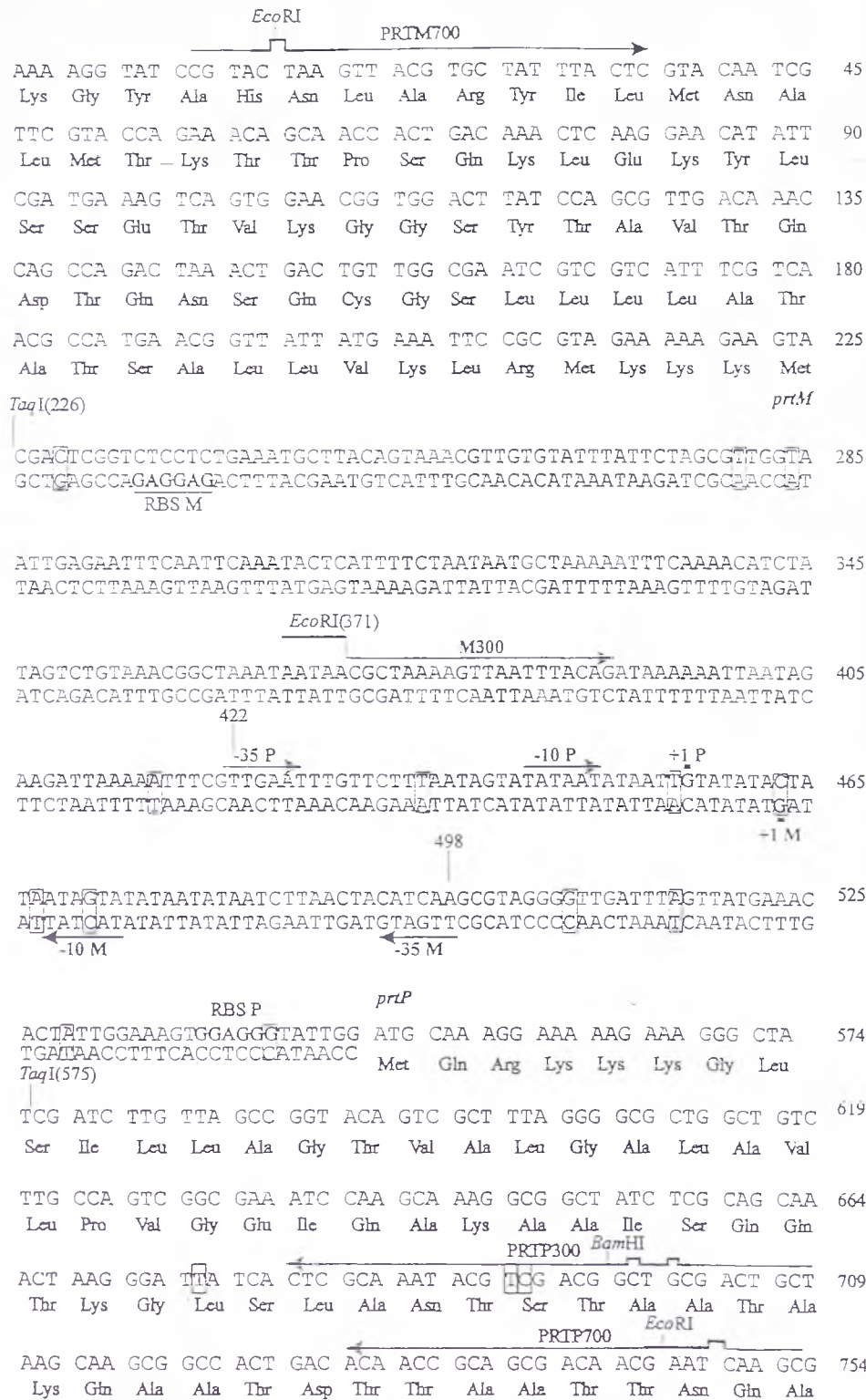
glukoza + 0.5% maltoza ili 0.5% glukoza + 0.5% galaktoza). Uzorci su uzimani svakih sat vremena i mereni na spektrofotometru (OD_{600nm}).

REZULTATI

1. KARAKTERIZACIJA REGULATORNOG REGIONA *prt* GENA SOJA *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS291.1. Umnožavanje i kloniranje regulatornog regiona proteinaznih gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29

Promotorski region proteinaznih gena je umnožen PCR metodom pomoću prajmera PRTM700 i PRTP700 sintetisanih prema sekvenci 5'-krajeva proteinaznih gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Ovi prajmeri ovičavaju deo DNK dužine 720 bp koji u sebi sadrži regulatorni region i 5'-krajeve *prtP* i *prtM* gena (Slika 5). Prajmeri PRTM700 i PRTP700 su dizajnirani tako da na svojim 5'-krajevima sadrže 6 bp koje prepoznaje *EcoRI* restrikcioni enzim (Tabela 3, podvučeni nukleotidi). Kao matrica za PCR su korišćeni veliki plazmidi izolovani iz soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29. Dobijeni DNK fragment je prečišćen "GlassMax Matrix" sistemom, a veličina fragmenta je potvrđena elektroforezom u prisustvu λ DNK standarda sečenog *HindIII-EcoRI* restrikcionim enzimima. Umnožen i prečišćen DNK fragment i vektor za transkripcione fuzije pNZ273 su sećeni *EcoRI* restrikcionim enzimom i ligirani u molarnom odnosu 5:1. Dobijenom ligacionom smešom je transformisan soj *L. lactis* NZ9000 metodom elektroporacije. Transformanti su selektovani na GM17 čvrstoj podlozi sa hloramfenikolom (Cm, 5 μ g/ml) i x-glukuronidom (X-gluc, 0.3 mM). Kao rezultat transformacije dobijeno je 8 plavih transformanata rezistentnih na hloramfenikol (Cm^r) po μ g DNK. Pojedinačne kolonije su prečišćene zasejavanjem na čvrste podloge sa Cm (5 μ g/ml).

U daljoj analizi iz svih plavih Cm^r transformanata su izolovani plazmidi koji su prečišćeni PCI metodom i sećeni restrikcionim enzimom *EcoRI*. Pokazano je da su samo 3 od 8 analiziranih transformanata nosili plazmide, označene kao pMPE701, pMPE702 i pMPE705 sa kloniranim fragmentom odgovarajuće veličine. Orijentacija dobijenih fragmenata kao i provera da su klonirani fragmenti poreklom iz proteinaznog regiona izvršena je PCR metodom, pri čemu su konstruisani plazmidi koji su imali fragment očekivane veličine korišćeni kao matrica. U sva tri slučaja su rađene dve reakcije sa sledećim kombinacijama prajmera: PRTP700 i 18745, ili PRTM700 i 18745, pri čemu 18745 prajmer odgovara sekvenci 5'-kraja *gusA* gena. Elektroforezom dobijenih PCR fragmenata je pokazano da plazmidi označeni kao pMPE701 i pMPE705

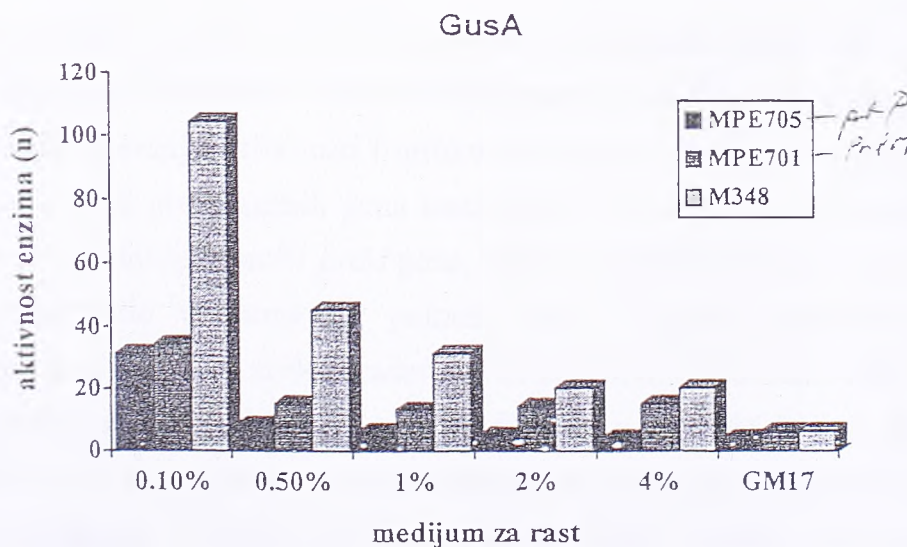


Slika 5. Sekvenca regulatornog regiona sa 5'-krajevima *prtP* i *prtM* gena. Duge strelice označavaju prajmere korišćene za kloniranje; zadebljanja na strelicama označavaju restrikciono mesto u prajmeru; zakrivljeni delovi strelice predstavljaju nukleotide u prajmeru koji nisu komplementarni sekvenci regulatornog regiona; kratke linije iznad prajmera i naziv restrikcionog enzima označavaju mesto kloniranja; kratke strelice označavaju -10 i -35 regione P_{prtP} (P) i P_{prtM} (M) promotora; kvadrati označavaju bazne parove koji se razlikuju u odnosu na soj SK11.

nose klonirane fragmente poreklom iz proteinaznog regiona pri čemu je u plazmidu pMPE701 promotor *prtM* gena ispred *gusA* reporter gena, dok je u plazmidu pMPE705 promotor *prtP* gena ispred *gusA* gena. Rezultati PCR-a su pokazali da klonirani fragment u plazmidu pMPE702 nije poreklom iz proteinaznog regiona, jer u reakciji nije dobijen PCR produkt ni sa jednom kombinacijom prajmera. Dalji rad je nastavljen sa konstruktima pMPE701 i pMPE705.

1.2. Određivanje aktivnosti β-glukuronidaze transformanata *L. lactis* MPE701 i MPE705

Najnoviji podaci o regulaciji proteinaznih gena ukazuju da koncentracija kazitona u medijumu dovodi do smanjenja aktivnosti promotora proteinaznih gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 (Marugg *et al.*, 1995). U cilju izučavanja regulacije ekspresije proteinaznih gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29 merena je aktivnost enzima β-glukuronidaze transformanata *L. lactis* MPE701 i MPE705, koji su prethodno gajeni u minimalnom medijumu sa rastućim koncentracijama kazitona (0.1%, 0.5%, 1%, 2% i 4%), kao i u GM17 medijumu (Slika 6).



Slika 6. Aktivnosti enzima β-glukuronidaze eksprimirane sa P_{prtP} u soju *L. lactis* MPE705 i P_{prtM} promotora u sojevima *L. lactis* MPE705 i MPE701ΔM348. Vrednosti na grafiku predstavljaju srednju vrednost 3 nezavisna eksperimenta.

Iz predstavljenih rezultata se vidi da su oba promotora proteinaznih gena regulisana kazitonom, ali je P_{prtP} promotor jače regulisan od P_{prtM} promotora. Poređenjem dobijenih rezultata sa podacima iz literature vidi se da postoji razlika u regulaciji proteinaznih gena sojeva SK11 i BGIS29.

1.3. Određivanje mesta početka transkripcije *prtP* i *prtM* gena

Određena su mesta otpočinjanja transkripcije iRNK oba proteinazna gena: *prtP* i *prtM*. Izolovana je ukupna RNK soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29 visoke čistoće ($A_{260nm}/A_{280nm}=1.4-1.8$). Za određivanje mesta otpočinjanja transkripcije *prtP* gena korišćen je prajmer 930513, a za start transkripcije *prtM* gena korišćen je prajmer P10. "Primer extension" reakcije su analizirane na 6% poliakrilamidnim gelovima na kojima je kao standard za određivanje dužine iRNK od mesta vezivanja prajmera do "+1" nukleotida korišćena sekvenca relevantnog regiona DNK iz plazmida pMPE705.

Dobijeni rezultati su pokazali da je mesto otpočinjanja transkripcije *prtP* gena G nukleotid 95 bp uzvodno od pretpostavljenog ATG kodona *prtP* gena, dok je mesto otpočinjanja transkripcije *prtM* gena G nukleotid 238 bp uzvodno od pretpostavljenog ATG kodona *prtM* gena (Slika 5).

1.4. Kvantitativna "Northern blot" analiza

Iz literature je poznato da su promotori proteinaznih gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 regulisani na transkripcionom nivou (Marugg *et al.*, 1996). S obzirom da je rezultatima merenja aktivnosti β -glukuronidaze pokazano da i u soju BGIS29 postoji regulacija promotora proteinaznih gena kazitonom i da sa porastom koncentracije kazitona opada aktivnost promotora *prtP* i *prtM* gena, kao i da postoji razlika u stepenu regulacije ova dva promotora, bilo je potrebno pokazati da li su oba promotora regulisana na transkripcionom nivou. U tu svrhu urađena je kvantitativna "Northern blot" analiza.

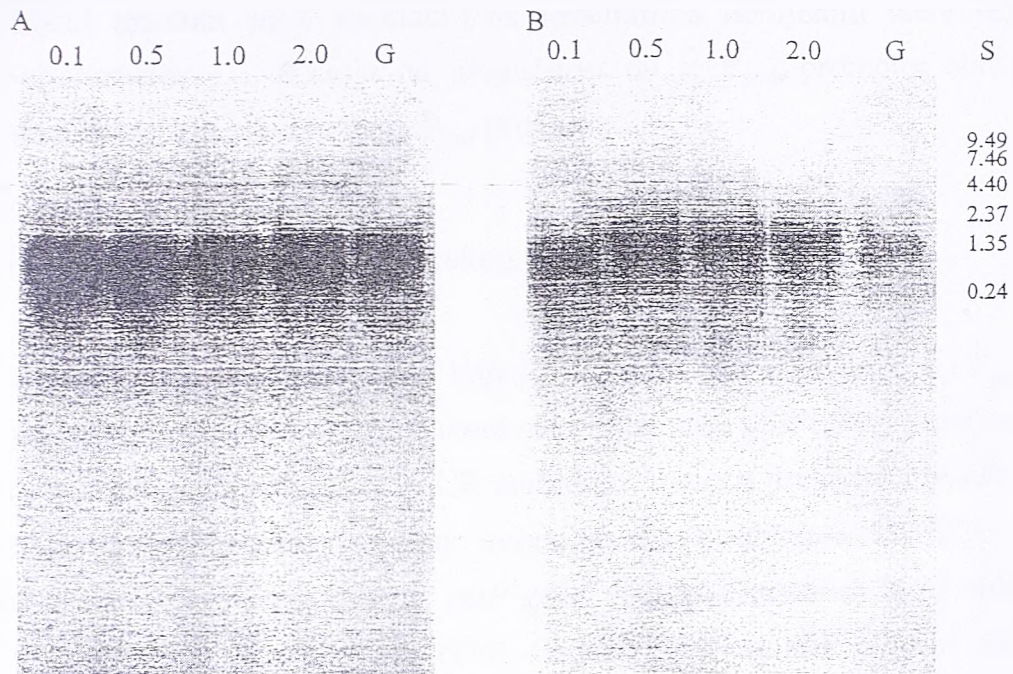
Izolovana je ukupna RNK iz sojeva MPE701 i MPE705 koji su prethodno gajeni u minimalnom medijumu sa rastućim koncentracijama kazitona (0.1%, 0.5%, 1% i 2%), kao i u GM17 medijumu. Jednake količine svakog RNK uzorka su razdvojene na 1% formaldehidnom gelu. Kao probe za RNK/DNK hibridizaciju korišćeni su DNK fragmenti dobijeni pomoću PCR-a, korišćenjem prajmera PRTP700 i 18745 (za detekciju transkripta $P_{prtP-gusA}$ fuzije) ili PRTM700 i 18745 (za detekciju transkripta $P_{prtM-gusA}$ fuzije). Dobijeni

DNK fragmenti sadrže 5'-krajeve transkripata $P_{prtP-gusA}$ ili $P_{prtM-gusA}$ fuzija. Za oba promotora utvrđena je korelacija između rezultata dobijenih merenjem aktivnosti β -glukuronidaze i količine obeleženih RNK/DNK hibrida u "Northern blot" analizi. U hibridizaciji sa $P_{prtP-gusA}$ fuzijom (RNK iz soja MPE705) pri svim koncentracijama kazitona primećena je jedna traka na autoradiogramu koja odgovara očekivanom transkriptu koji otpočinje sa mesta početka transkripcije *prtP* gena (Slika 7). Najjači intenzitet traka na autoradiogramu viđen je sa RNK uzorcima izolovanim iz kultura koje su rasle u minimalnom medijumu sa 0.1% i 0.5% kazitona. Veće koncentracije kazitona dovode do smanjenja količine *prtP-gusA* iRNK. Najniži nivo ekspresije *prtP* gena primećen je u uzorku RNK koja je izolovana iz kulture gajene u GM17 medijumu (Slika 7A).

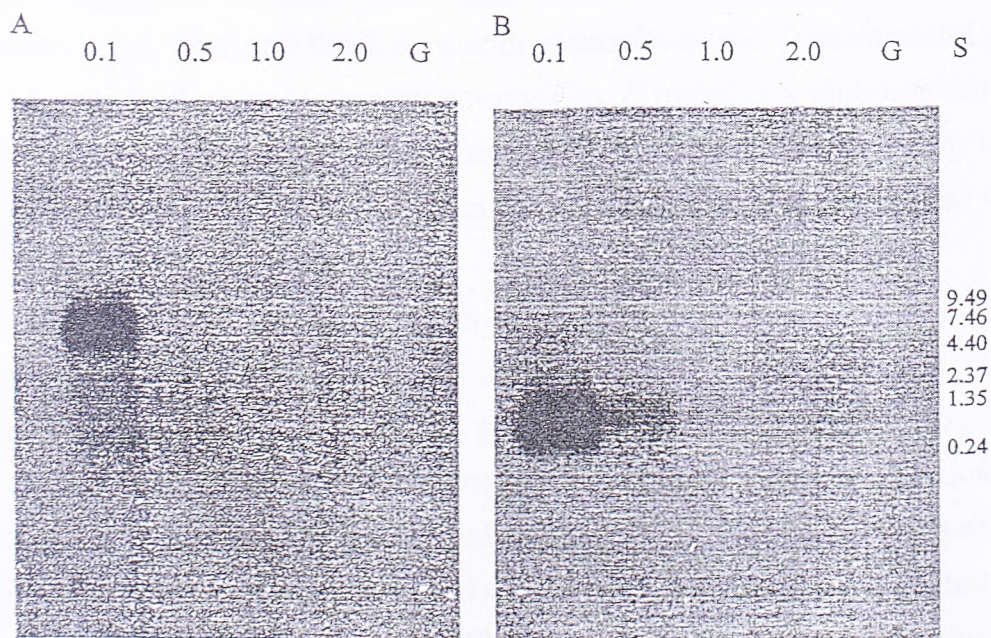
U hibridizaciji sa $P_{prtM-gusA}$ fuzijom (RNK iz soja MPE701) takođe je primećena samo jedna traka, očekivane veličine, koja odgovara dužini transkripta sa mestom početka transkripcije *prtM* gena. U slučaju $P_{prtM-gusA}$ fuzije nije primećena značajnija razlika između RNK izolovanih iz kultura koje su rasle u minimalnom medijumu sa različitim koncentracijama kazitona (Slika 7B).

S obzirom da se u slučaju transkripta $P_{prtM-gusA}$ ne vidi jasna razlika u količini iRNK izolovanih iz kultura koje su gajene u minimalnom medijumu sa različitim koncentracijama kazitona izolovana je ukupna RNK soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29, koji je prethodno gajen u minimalnom medijumu sa rastućim koncentracijama kazitona (0.1%, 0.5%, 1% i 2%), kao i u GM17 medijumu. Jednake količine svakog RNK uzorka su razdvojene na 1% formaldehidnom gelu. Kao probe za RNK/DNK hibridizaciju korišćeni su PCR fragmenti dobijeni sledećim kombinacijama prajmera: PRTP700 i 930512 (proba za detekciju *prtP* transkripta, veličine 330 bp) ili PRTM700 i P10C (proba za detekciju *prtM* transkripta, veličine 350 bp) prečišćeni GlassMax Matrix sistemom.

U slučaju kada je kao proba korišćena proba za detekciju *prtP* transkripta najjači signal je dobijen u uzorku RNK izolovanom iz kulture gajene u minimalnom medijumu sa 0.1% kazitona. Pri većim koncentracijama kazitona nije bilo vidljivih signala na autoradiografiji (Slika 8A). U slučaju kada je kao proba korišćena proba za detekciju *prtM* transkripta najjači signal je dobijen sa uzorkom RNK izolovanim iz kulture gajene u minimalnom medijumu sa 0.1% kazitona, kao i u slučaju *prtP* transkripta. Niži nivo iRNK detektovan je kada je uzorak izolovan iz kulture gde je bilo 0.5% kazitona u medijumu za rast. U uzorcima izolovanim iz kultura sa višim koncentracijama kazitona nije bilo vidljivih traka kao i u slučaju *prtP* transkripta (Slika 8B).



Slika 7. Elektroforeza RNK izolovane iz sojeva A: MPE705 i B: MPE701; hibridizacija sa *gusA* probom na 65°C. 0.1% kazitona; 0.5% kazitona; 1% kazitona; 2% kazitona; G - GM17; S - RNK standard.



Slika 8. Elektroforeza RNK izolovane iz soja BGIS29; A: hibridizacija sa *prtP* probom na 65°C; B: hibridizacija sa *prtM* probom na 65°C. 0.1% kazitona; 0.5% kazitona; 1% kazitona; 2% kazitona; G - GM17; S - RNK standard.

Dobijeni rezultati su u korelaciji sa rezultatima dobijenim merenjem aktivnosti enzima β -glukuronidaze i ukazuju na mogućnost da je P_{prtM} promotor slabije regulisan prisustvom kazitona u medijumu nego P_{prtP} promotor.

1.5. Deleciona analiza promotorskog regiona

Da bi se lokalizovao uži region koji je uključen u regulaciju P_{prtP} i P_{prtM} promotora deletiran je region nizvodno od P_{prtM} promotora u plazmidu pMPE701. Skraćeni regulatorni region proteinaznih gena je umnožen PCR metodom pomoću prajmera $\Delta M300$ dizajniranog prema sekvenci regulatornog regiona proteinaznih gena soja BGIS29 i PRTP300 dizajniranog prema sekvenci 5'-kraja *prtP* gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Ovi prajmeri ovičavaju deo DNK dužine 348 bp koji u sebi sadrži 180 bp regulatornog regiona i 5'-kraj *prtP* gena dok je 136 bp nizvodno od "+1" nukleotida *prtM* gena deletirano (Slika 5). Prajmeri $\Delta M300$ i PRTP300 su dizajnirani tako da na svojim 5'-krajevima sadrže 6 bp koje prepoznaju *EcoRI* ($\Delta M300$) ili *BamHI* (PRTP300) restrikcioni enzimi. Kao matrica za PCR je korišćen plazmid pMPE701. Umnožen i prečišćen PCR fragment i vektor za transkripcione fuzije pNZ273 su sečeni *EcoRI* i *BamHI* restrikcionim enzimima i ligirani u molarnom odnosu 5:1. Dobijenom ligacionom smešom je transformisan soj *L. lactis* NZ9000 metodom elektroporacije. Transformanti su selektovani na GM17 čvrstoj podlozi sa hloramfenikolom (Cm, 5 μ g/ml) i x-glukuronidom (X-gluc, 0.3 mM). Kao rezultat transformacije dobijeno je 12 Cm^r transformanata po μ g DNK, od kojih je samo jedan bio plav. Pojedinačne kolonije su prečišćene zasejavanjem na čvrste podloge sa Cm (5 μ g/ml).

U daljoj analizi iz svih Cm^r transformanata su izolovani plazmidi koji su prečišćeni PCI metodom i sečeni restrikcionim enzimom *EcoRI*. Pokazano je da je samo jedan analizirani transformant, koji je davao plave kolonije na podlozi sa X-glukom, sadržao plazmid sa kloniranim fragmentom odgovarajuće veličine. Provera da je klonirani fragment poreklom iz proteinaznog regiona izvršena je PCR metodom korišćenjem prajmera PRTP700 i 18745, pri čemu je plazmid sa fragmentom očekivane veličine korišćen kao matrica. Elektroforezom dobijenog PCR fragmenta je pokazano da dobijeni plazmid označen kao pMPE701 Δ M348 nosi klonirani fragment poreklom iz proteinaznog regiona sa promotorom *prtM* gena ispred *gusA* reporter gena.

Merenjem aktivnosti enzima β -glukuronidaze transformanata *L. lactis* MPE701 Δ M348, koji je prethodno gajen u minimalnom medijumu sa rastućim

koncentracijama kazitona (0.1%, 0.5%, 1%, 2% i 4%) kao i u GM17 medijumu, pokazano je da je deo regulatornog regiona koji je prisutan u plazmidu pMPE701 Δ M348 uključen u regulaciju kazitonom (Slika 6).

2. STRUKTURNA ANALIZA REGULATORNOG REGIONA *p_{rt}* GENA SOJA *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29

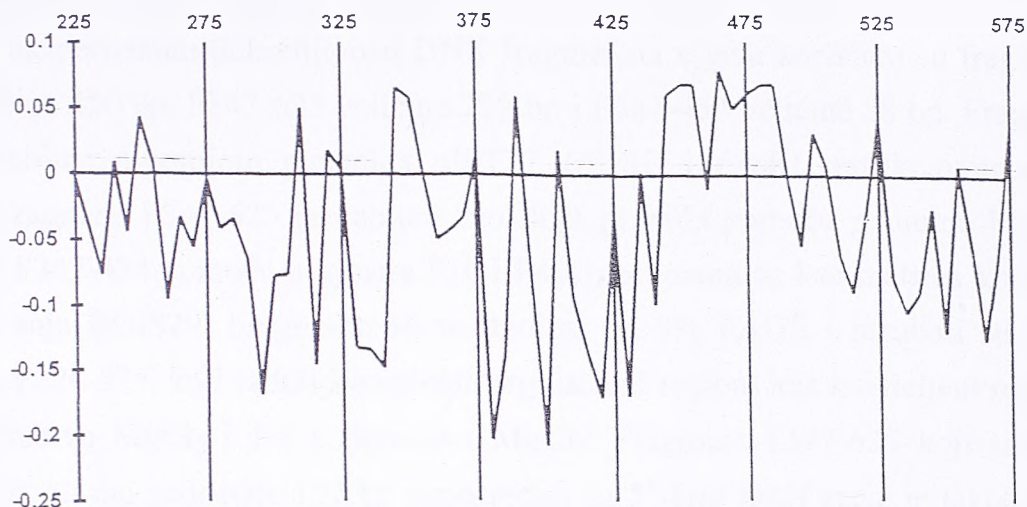
2.1. Teorijska analiza strukture DNK u regulatornom regionu *p_{rt}* gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29

S obzirom da su prethodni rezultati pokazali da je ekspresija *p_{rt}* gena regulisana prisustvom kazitona u minimalnom medijumu može se očekivati da u regulatornom regionu ovih gena postoji mesto za vezivanje nekog potencijalnog regulatora. U cilju određivanja moguće pozicije vezivanja potencijalnog regulatora u regulatornom regionu *p_{rt}* gena urađena je teorijska analiza prisustva lokalne zakrivljenosti DNK u ovom regionu soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29. Za svaki triplet nukleotida u nukleotidnoj sekvenci regulatornog regiona *p_{rt}* gena soja BGIS29, sa preklapanjem, pridružen je odgovarajući parametar iz Tabele 4. Izračunata je srednja vrednost 5 susednih tripleta (zbog bolje preglednosti grafika). Rezultati teorijske analize lokalne zakrivljenosti regulatornog regiona *p_{rt}* gena soja BGIS29 su pokazali da postoji potencijalni centar krivljenja u regionu između 375 bp i 425 bp, neposredno uzvodno od P_{*p_{rt}*} promotora, obuhvatajući i njegov -35 region (Slika 9).

S obzirom da su rezultati teorijske analize zakrivljenosti DNK pokazali da postoji potencijalni centar krivljenja urađena je i 3-D analiza nukleotidne sekvence regulatornog regiona *p_{rt}* gena soja BGIS29. Rezultati 3-D strukturne analize regulatornog regiona jasno pokazuju da je ovaj region lokalno zakrivljen u delu sekvence koji je u teorijskoj analizi pokazan kao potencijalni centar krivljenja. 3-D grafički prikaz dela sekvence od 347 bp do 434 bp ukazuje da u tom delu nukleotidne sekvence postoji moguć centar krivljenja, kao i da regionu uzvodno (225 bp – 347 bp) i nizvodno (434 bp – 575 bp) od centra krivljenja nisu zakrivljeni (Slika 10).

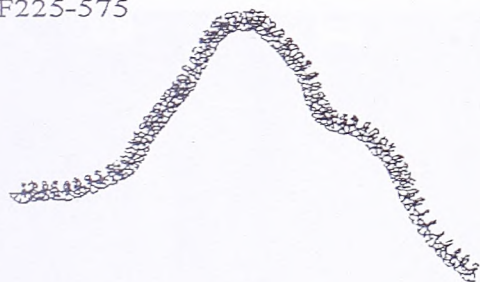
2.2 Analiza pokretljivosti DNK fragmenata u gelu

Da bi se i eksperimentalno potvrdilo postojanje lokalno zakrivljenih regiona u regulatornom regionu *p_{rt}* gena soja BGIS29 urađeni su eksperimenti pokretljivosti DNK fragmenata koji sadrže različite delove regulatornog regiona u gelu.



Slika 9. Grafički prikaz lokalne zakrivljenosti DNK. Vrednosti na Y osi predstavljaju srednju vrednost parametara zakrivljenosti za 5 susjednih tripleta u arbitrarnim jedinicama, a vrednosti na X osi predstavljaju broj nukleotida u sekvenci TaqI(226-575) DNK fragmenta (Slika 5).

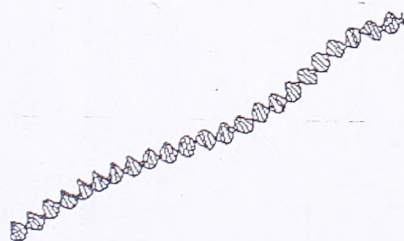
F225-575



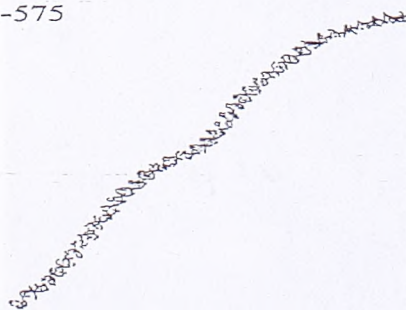
F347-434



F225-347

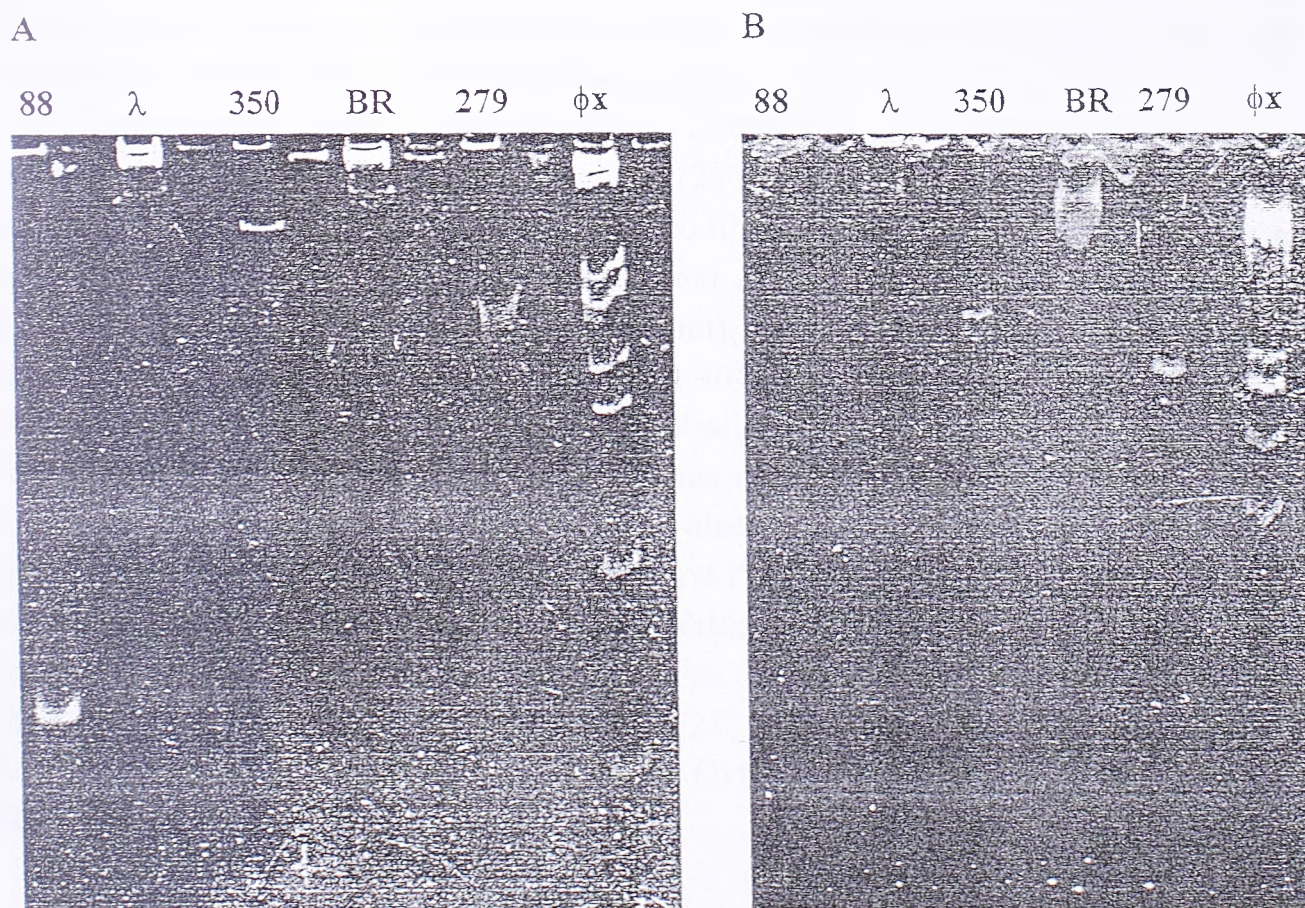


F434-575



Slika 10. 3-D grafički prikazi delova nukleotidne sekvence regulatornog regiona *prt* gena soja BGIS29 sa mogućim lokalno zakrivljenim regionima. Oznake F225-575, F347-434, F225-347 i F434-575 predstavljaju fragmente DNK iz regulatornog regiona *prt* gena. Brojevi označavaju tačnu poziciju fragmenta u odnosu na nukleotidnu sekvencu proteinaznog regiona predstavljenu na Slici 5.

U eksperimentu pokretljivosti DNK fragmenata u gelu korišćeni su fragmenti F226-575, veličine 350 bp, F347-625 veličine 279 bp i F347-434 veličine 88 bp. Fragment F226-575 je dobijen digestijom plazmida pIPT27 *Hind*III i *Eco*RI restrikcijom enzimima i eluiran. Fragment F347-625 je dobijen kao PCR produkt pomoću prajmera P10 i P17C, a fragment F347-434 pomoću prajmera P10 i P40C, pri čemu su kao matrica korišćeni veliki plazmidi soja BGIS29. Fragmenti su razdvojeni na 8% PAGE i rezultati su pokazali da fragment F226-575, koji sadrži kompletan regulatorni region, ima koeficijent retardacije (R) 1.2 u odsustvu $MgCl_2$ i 1.4 u prisustvu $MgCl_2$. Fragment F347-625 koji sadrži oba *prt* promotora, ali mu nedostaje 122 bp neposredno uz 5'-kraj *prtM* gena, je takođe zakrivljen. R koeficijent je 1.1 u odsustvu $MgCl_2$ i 1.5 u prisustvu $MgCl_2$. Fragment F347-434 ima koeficijent R 1.06 u prisustvu i odsustvu $MgCl_2$. Sva tri pomenuta fragmenta sadrže pretpostavljeni centar krivljenja (Slika 11).



Slika 11. Elektroforeza DNK fragmenata poreklom iz regulatornog regiona *prt* gena soja BGIS29. A: u prisustvu $MgCl_2$; B: bez $MgCl_2$; 88 - fragment F347-434; λ - λ DNK sečena *Pst*I restrikcijom enzimom; 350 - fragment F226-575; BR - plazmid pBR322 sečen *Hin*I restrikcijom enzimom; 279 - fragment F347-625, ϕx - ϕx DNK sečena *Hae*III restrikcijom enzimom.

3. INAKTIVACIJA POTENCIJALNOG REGULATORNOG GENA

3.1. Inserciona mutageneza potencijalnog regulatornog gena

U cilju daljeg izučavanja regulacije ekspresije proteinaznih gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29 urađena je nasumična mutageneza potencijalnog regulatornog gena. Sojevi MPE701 i MPE705 su transformisani plazmidom pGh9::ISS1 metodom elektroporacije. Transformanti su selektovani na GM17 čvrstoj podlozi sa hloramfenikolom (Cm, 5 µg/ml) eritromicinom (Em, 2.5 µg/ml) i x-glukuronidom (0.3 mM). Kao rezultat transformacija dobijeno je 10^5 plavih transformanata (Cm^r, Em^r) u obe transformacije. Pojedinačne kolonije su prečišćene zasejavanjem na čvrste podloge sa Cm (5 µg/ml) i Em (2.5 µg/ml).

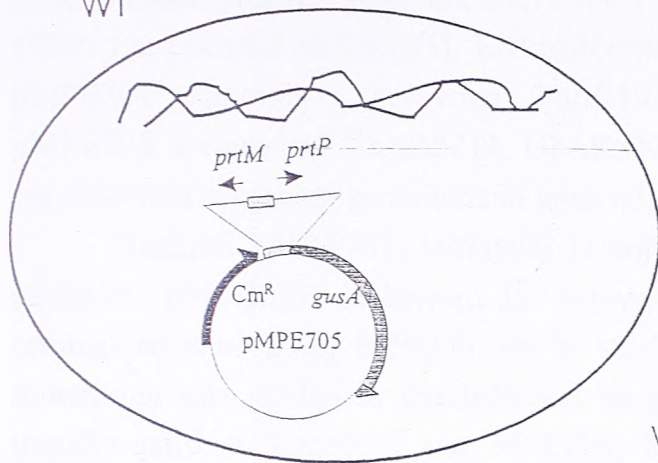
U daljoj analizi iz 6 Cm^rEm^r transformanata (po 3 iz svake transformacije) su izolovani plazmidi koji su prečišćeni PCI metodom i sečeni restrikcionim enzimima *EcoRI* i *HindIII*. Pokazano je da su u transformantima Gh7019 i Gh7057 prisutna oba plazmida. Ova dva soja su korišćena u eksperimentima transpozicije.

Logaritamske kulture sojeva Gh7019 i Gh7057 su gajene 2.5 h na permisivnoj temperaturi za replikaciju pGh9::ISS1 plazmida (28°C), a zatim prebačene na nepermisivnu temperaturu (37°C) da bi se omogućila nespecifična integracija plazmida u hromozom domaćina. Mutanti u potencijalnom regulatornom genu *prt* gena su selektovani na MM podlogama sa 0.1% i 2% kazitona sa Cm (5 µg/ml), Em (2.5 µg/ml) i x-glukuronidom (0.3 mM). Čelije su nanošene u razblaženjima 10^{-3} i 10^{-4} . Preživljavanje je testirano na GM17 podlogama sa Cm (5 µg/ml). Nakon 3 dana inkubacije na 37°C dobijeno je 5 mutanata soja Gh7057 koji su bili beli na MM sa 0.1% kazitona i GM17 (WT fenotip je tamno plav na MM sa 0.1% kazitona i svetlo plav na GM17). U slučaju soja Gh7019 dobijena su 3 mutanta koji su pokazivali tamno plavi fenotip na MM sa 0.1% kazitona i GM17. U daljoj analizi iz svih 8 mutanata su izolovani plazmidi koji su prečišćeni PCI metodom i sečeni restrikcionim enzimima *EcoRI* i *HindIII*. Pokazano je da su u mutantima GhΔR194, GhΔR1910, GhΔR1911, GhΔR5711, GhΔR5720 i GhΔR5723 prisutni samo plazmidi pMPE701 ili pMPE705 dok je plazmid pGh9::ISS1 integrisan. Ovi sojevi su korišćeni u daljim analizama (Slika 12).

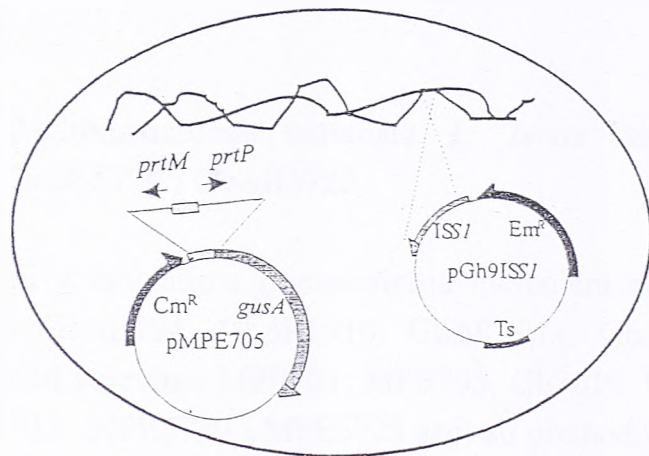
3.2. Analiza mutanata

Dobijeni mutanti su dalje analizirani PCR metodom da bi se potvrdilo da razlike u fenotipu nisu rezultat nekih rearanžmana na plazmidima pMPE701 i pMPE705.

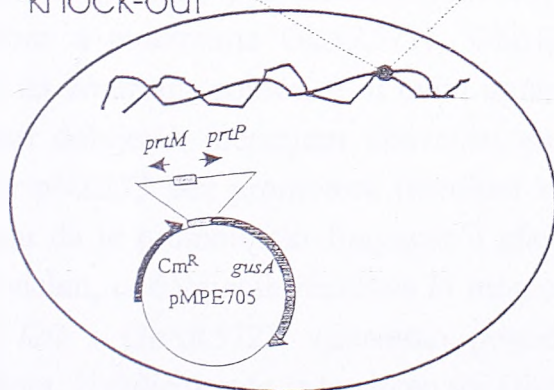
WT



WT + pGh9ISS1



"knock-out"



Slika 12. Konstrukcija "knock-out" sojeva insercionom mutagenezom plazmida pGh9::ISS1 u hromozom bakterije *L. lactis* MPE705. Em^R predstavlja gen za rezistenciju na eritromicin; Cm^R predstavlja gen za rezistenciju na hloramfenikol; Ts predstavlja *repA* gen čiji produkt (RepA protein) obezbeđuje temperaturno zavisnu replikaciju.

PCR je raden pomoću prajmera PRTP700 i 18745 (za plazmid pMPE701), ili PRTM700 i 18745 (za plazmid pMPE705). Elektroforezom dobijenih PCR fragmenata je pokazano da pMPE701 plazmidi u sojevima Gh Δ R194, Gh Δ R1910, Gh Δ R1911, kao i plazmidi pMPE705 u sojevima Gh Δ R5711, Gh Δ R5720 i Gh Δ R5723 nose fragmente sa kloniranim regulatornim regionom proteinaznih gena odgovarajuće veličine.

Plazmidi pMPE701, izolovani iz sojeva Gh Δ R194, Gh Δ R1910, Gh Δ R1911, kao i plazmidi pMPE705 izolovani iz sojeva Gh Δ R5711, Gh Δ R5720 i Gh Δ R5723 su retransformisani u soj NZ9000, da bi se dobila još jedna potvrda da različit fenotip u mutantima nije posledica rearanžmana na plazmidima pMPE701 ili pMPE705. Dobijeni transformanti su označeni kao MPE194, MPE1910, MPE1911, MPE5711, MPE5720 i MPE5723 i korišćeni su u daljoj analizi.

3.3. Određivanje aktivnosti β -glukuronidaze mutanata *L. lactis* Gh Δ R194, Gh Δ R1910, Gh Δ R1911, Gh Δ R5711, Gh Δ R5720 i Gh Δ R5723

Regulacija P_{prtP} i P_{prtM} promotora u mutantima je analizirana merenjem aktivnosti enzima β -glukuronidaze u mutantima Gh Δ R194, Gh Δ R1910, Gh Δ R1911, Gh Δ R5711, Gh Δ R5720 i Gh Δ R5723, kao i kontrolnim sojevima MPE701, MPE705, Gh7019, Gh7057, MPE194, MPE1910, MPE1911, MPE5711, MPE5720 i MPE5723 koji su prethodno gajeni u minimalnom medijumu sa rastućim koncentracijama kazitona (0.1%, 0.5%, 1%, 2% i 4%), kao i u GM17 medijumu (Tabela 5).

Iz predstavljenih rezultata se vidi da se aktivnost P_{prtM} promotora u mutantima Gh Δ R194, Gh Δ R1910, Gh Δ R1911 ne razlikuje mnogo od aktivnosti istog promotora u kontrolnim sojevima, tj. zadržana je regulacija kazitonom. Za razliku od njih, aktivnost P_{prtP} promotora u mutantima Gh Δ R5711, Gh Δ R5720 i Gh Δ R5723 je drastično smanjena u odnosu na kontrolne sojeve, tj. u ovim mutantima aktivnost promotora je jednaka ili blizu vrednosti dobijenih merenjem aktivnosti enzima β -glukuronidaze u soju koji nosi samo plazmid pNZ273 bez promotora (rezultati nisu prikazani). S obzirom da kontrolni sojevi pokazuju da je promotorski fragment u plazmidu pMPE705 koji je prisutan u mutantima funkcionalan, iz dobijenih rezultata bi moglo da se zaključi da je u mutantima Gh Δ R5711, Gh Δ R5720 i Gh Δ R5723 verovatno pogođen neki gen odgovoran za aktivaciju P_{prtP} promotora. U daljem radu je korišćen soj Gh Δ R5723.

3.4. Praćenje uticaja mutacije na metabolizam šećera

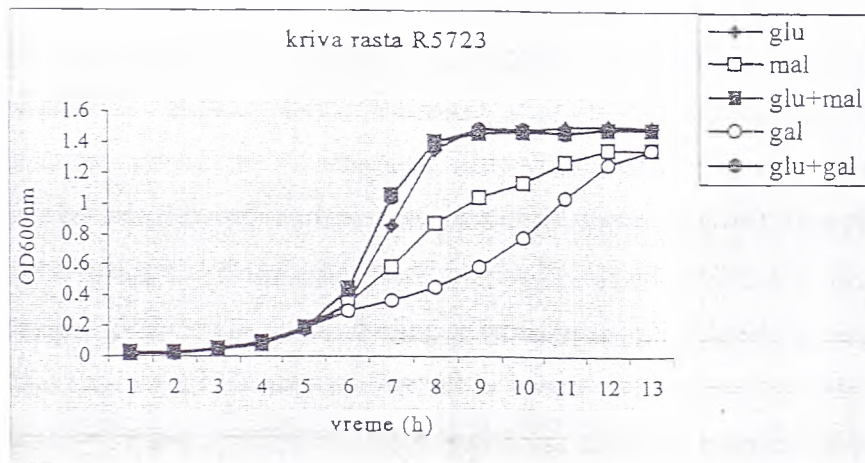
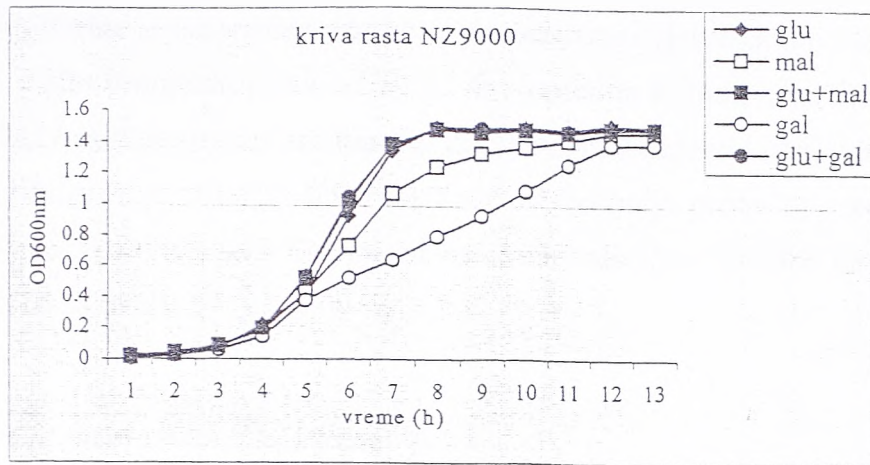
Da bi se pokazalo da li konstruisana mutacija u hromozomu soja Gh Δ R5723 ima globalni efekat i da li ima uticaja na metabolizam šećera urađen je API test. Prekonoćne

Tabela 5. Aktivnost enzima β -glukuronidaze u mutantima Gh Δ R9, Gh Δ R19, Gh Δ R45, Gh Δ R46, Gh Δ R85 i Gh Δ R95. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost 3 ponovljena eksperimenta izraženi u arbitrarnim jedinicama (U), kada su bakterije prethodno gajene u MM sa 0.1%, 0.5%, 1% i 2% kazitona i GM17 medijumu. Jedinica aktivnosti β -glukuronidaze predstavlja promenu OD₄₀₅ u jedinici vremena po mg proteina.

	GusA	0.1%	0.5%	1%	2%	GM17
<i>P_{prtM}</i>	MPE701	69	24	28	20	35
	Gh7019	2.2	1.2	0.7	0.5	0.4
	Gh Δ R194	14	4	2	3	1
	MPE194	18	6	0.9	0.2	0
	Gh Δ R1910	32	3	2	9	2
	MPE1910	28	3	1	0.1	0
	Gh Δ R1911	14	2	3	3	2
	MPE1911	23	2	0.5	0.2	0
<i>P_{prtP}</i>	MPE705	37	39	22	20	4
	Gh7057	40	0.1	0	0.2	0
	Gh Δ R5711	0	0	1	0.6	0.6
	MPE5711	62	30	26	34	28
	Gh Δ R5720	0.8	0.4	0.4	0.2	0
	MPE5720	17	11	10	9	0.9
	Gh Δ R5723	0.3	0.2	0.3	0.3	0.1
	MPE5723	14	7	5	3	3

kulture sojeva NZ9000 i Gh Δ R5723 prethodno gajene u GM17 medijumu su aplicirane u galerije API 50 CHS i inkubirane na 37°C 24 h, 48 h i 72 h. Rezultati su dali tipičnu sliku fermentacije šećera karakterističnih za laktokoke, ali su u slučaju soja Gh Δ R5723 primećene i neke razlike. Soj Gh Δ R5723 samo delimično fermentiše galaktozu i posle 72 h, dok je soj NZ9000 potpuno fermentiše posle 72 h. Takođe, soj Gh Δ R5723 delimično fermentiše maltozu posle 24 h, a totalno posle 48 h dok je soj NZ9000 potpuno fermentiše već posle 24 h.

Da bi se potvrdili rezultati dobijeni API testom i da bi se proverile razlike između njih urađene su krive rasta u medijumima sa različitim šećerima. Prekonoćne kulture sojeva NZ9000 i Gh Δ R5723 su razblažene u M17 medijumu sa različitim šećerima. Rezultati su pokazali da postoje razlike u brzini rasta ova dva soja u prisustvu različitih šećera (Slika 13).



Slika 13. Krive rasta sojeva NZ9000 i $Gh\Delta R5723$ (označen kao R5723) u M17 medijumu za rast bakterija sa glukozom (glu), maltozom (mal), galaktozom (gal) ili kombinacijama glukoze i maltoze (glu+mal) ili glukoze i galaktoze (glu+gal).

Soj NZ9000 podjednako dobro raste u M17 medijumu sa glukozom u prisustvu ili odsustvu maltoze ili galaktoze. U M17 medijumu koji je sadržao samo maltozu ovaj soj raste nešto sporije, a u M17 medijumu koji je sadržao galaktozu soj NZ9000 raste vrlo sporo. Soj $Gh\Delta R5723$ pokazuje sličan rast kao soj NZ9000 u M17 medijumu sa glukozom u prisustvu i odsustvu maltoze ili galaktoze, dok u medijumima koji su sadržali samo maltozu ili galaktozu ovaj soj raste znatno sporije.

3.5. Konstrukcija stabilne mutacije u potencijalnom regulatornom genu

S obzirom da je iz literature poznato da je plazmid pGh9::ISS1 nestabilan u integrisanoj formi, tj. da sa sniženjem temperature ispod 30°C plazmid može da se izvuče iz hromozoma domaćina, a ponovnim povišenjem temperature iznad 37°C može da se integriše na neko drugo mesto u hromozomu, bilo je potrebno konstruisati sojeve sa stabilnom

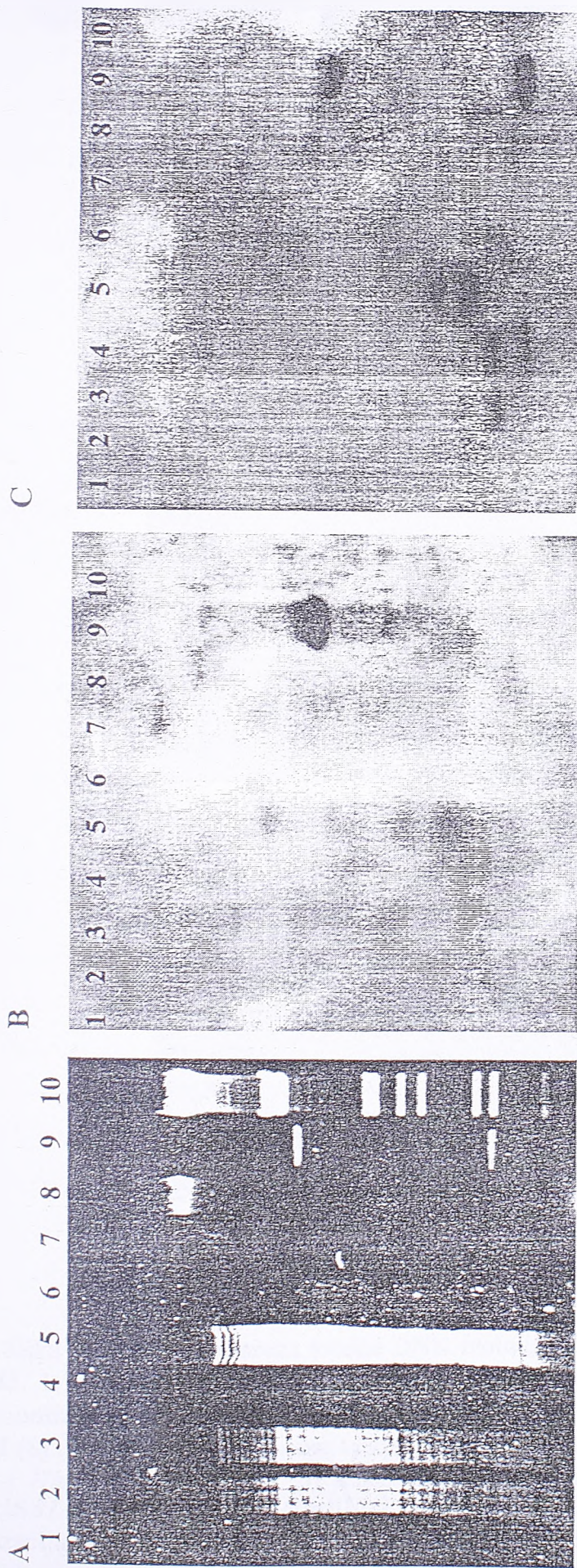
mutacijom. U tu svrhu je iskorišćeno upravo pomenuto svojstvo plazmida da se izvlači iz hromozoma na nižim temperaturama od 30°C. Prekonoćna kultura soja Gh Δ R5723 je posle inkubacije u GM17 medijumu bez antibiotika na 28°C, razblažena i utrljana na čvrstu GM17 podlogu bez antibiotika, a zatim je 100 pojedinačnih kolonija prebačeno na GM17 podlogu sa Em (2.5 μ g/ml). Dobijeno je 6 Em^s derivata označenih kao Gh Δ R9, Gh Δ R19, Gh Δ R45, Gh Δ R46, Gh Δ R85 i Gh Δ R95.

3.6. Hibridizaciona analiza mutanata

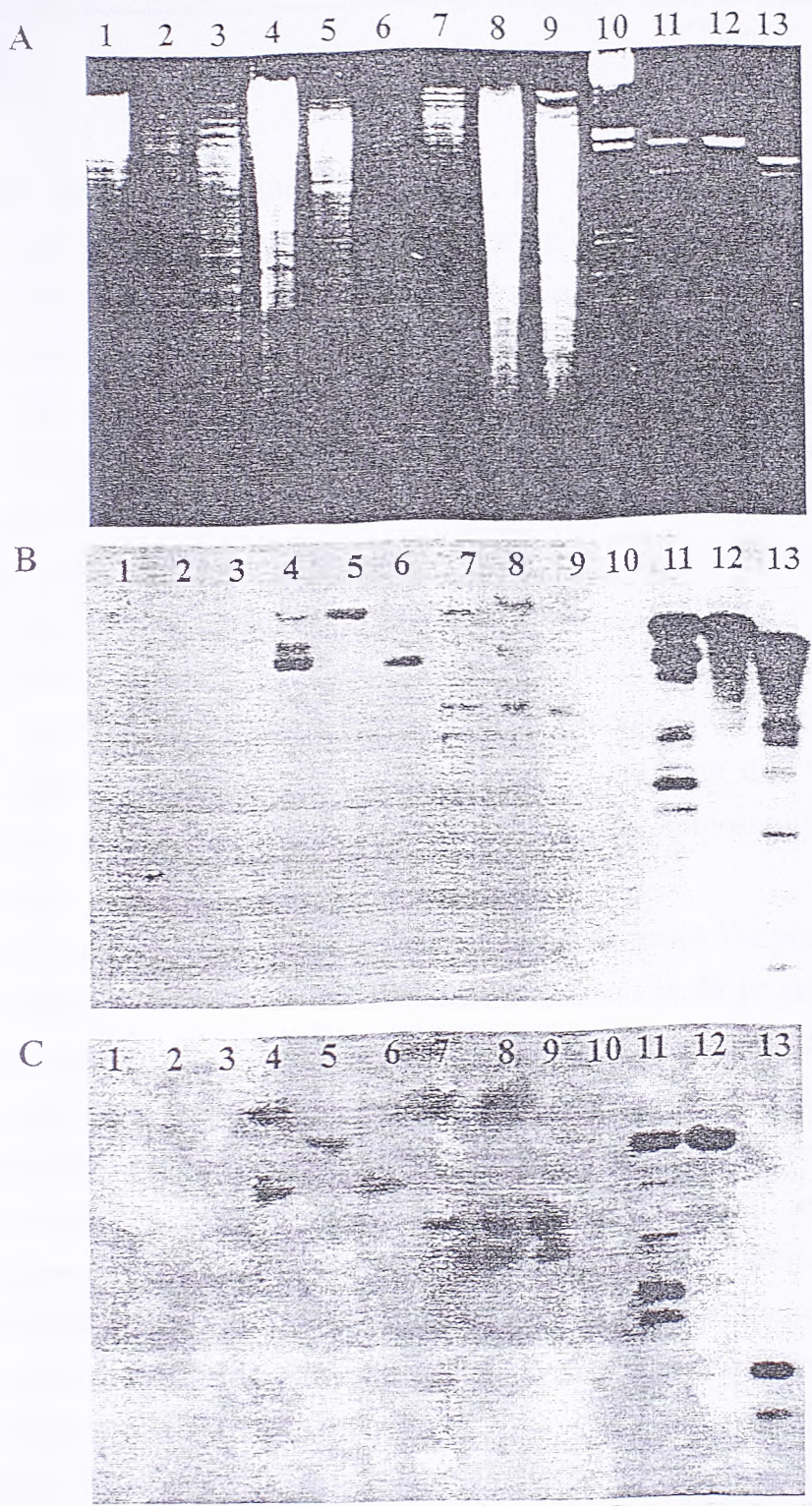
U cilju provere prisustva *ISS1* elementa u hromozomu sojeva Gh Δ R9, Gh Δ R19, Gh Δ R45, Gh Δ R46, Gh Δ R85 i Gh Δ R95, kao i odsustva vektorskog fragmenta urađeni su eksperimenti DNK/DNK hibridizacije. Plazmid pGh9::*ISS1* je sečen *Hind*III i *Eco*RI restrikcionim enzimima, pri čemu se dobijaju dva fragmenta: vektorski fragment veličine 3.6 kb koji čini PGh probu i fragment veličine 1000 bp koji nosi *ISS1* element (*ISS1* proba). Izvršena je hibridizacija totalne DNK sojeva Gh Δ R9, Gh Δ R19, Gh Δ R45, Gh Δ R46, Gh Δ R85 i Gh Δ R95 sečene *Eco*RI restrikcionim enzimom. Kao pozitivna kontrola hibridizacije korišćen je plazmid pGh9::*ISS1* sečen *Hind*III i *Eco*RI restrikcionim enzimima. U svim uzorcima su dobijeni pozitivni signali sa *ISS1* probom, a nije bilo signala sa probom PGh, što jasno pokazuje da je u svim mutiranim sojevima Gh Δ R9, Gh Δ R19, Gh Δ R45, Gh Δ R46, Gh Δ R85 i Gh Δ R95 fiksirana mutacija u potencijalnom regulatornom genu proteinaznih gena (Slika 14).

Hromozomalna lokacija plazmida pGh9::*ISS1* u mutiranom soju Gh Δ R5723 je takođe dokazana eksperimentima DNK/DNK hibridizacije. Kao probe za hibridizaciju su korišćene PGh proba i *ISS1* proba. Izvršena je hibridizacija totalne DNK sojeva NZ9000, Gh Δ R5723 i Gh Δ R45 sečene *Eco*RI, *Hind*III ili *Eco*RI i *Hind*III restrikcionim enzimima. Kao pozitivna kontrola hibridizacije korišćen je plazmid pGh9::*ISS1* sečen *Hind*III i *Eco*RI restrikcionim enzimima. Dobijeni rezultati su potvrdili hromozomalni lokaciju pGh9::*ISS1* plazmida u soju Gh Δ R5723 (Slika 15).

Dobijeni rezultati pokazuju da je konstrukcijom “knock-out” soja dobijen regulatorni mutant, koji je izgubio regulaciju *prt* gena kazitonom. S obzirom da su rezultati pokazali da nema aktivnosti P_{*prtP*} promotora može se zaključiti da je inaktiviran potencijalni regulatorni gen, *prtR*.



Slika 14. A: Elektroforeza totalnih DNK izolovanih iz sojeva: GhΔR9 (1), GhΔR19 (2), GhΔR45 (3), GhΔR46 (4), GhΔR85 (5), GhΔR95 (6) GhΔR5723 (7) i NZ9000 (8) sečenih *Hind*III restrikcionim enzimom; plazmid pGh9::ISS1 (9) sečen *Hind*III i *Eco*RI restrikcionim enzimima; λ DNK (10) sečena *Hind*III i *Eco*RI restrikcionim enzimima; B: hibridizacija sa PGh probom na 65°C; C: hibridizacija sa ISS1 probom na 65°C.



Slika 15. A: Elektroforeza totalne DNK izolovane iz sojeva NZ9000, Gh Δ 5723 sečena i Gh Δ R45. 1. totalna DNK soja NZ9000 sečena *Eco*RI (1), *Hind*III (2) i *Eco*RI i *Hind*III (3) restrikcionim enzimima; totalna DNK soja Gh Δ 5723 sečena *Eco*RI (4), *Hind*III (5) i *Eco*RI i *Hind*III (6) restrikcionim enzimima; totalna DNK soja Gh Δ R45 sečena *Eco*RI (7), *Hind*III (8) i *Eco*RI i *Hind*III (9); λ DNK (10) sečena *Hind*III i *Eco*RI restrikcionim enzimima; plazmid pGh9::ISS1 sečen *Eco*RI (11), *Hind*III (12) i *Eco*RI i *Hind*III (13) restrikcionim enzimima; B: hibridizacija sa PGh probom na 65°C; C: hibridizacija sa ISS1 probom na 65°C.

DISKUSIJA

Bakterije mlečne kiseline, izolovane iz mlečnih proizvoda, su višestruki aminokiselinski auktotrofi (Chopin, 1993). S obzirom da količina slobodnih aminokiselina i peptida u mleku nije dovoljna da obezbedi normalan rast ovih bakterija, one su prinuđene da kao izvor azota koriste protein mleka kazein. Zahvaljujući dobro razvijenom proteolitičkom sistemu, koga čini preko 30 različitih enzima i transportni sistem, kazein se prevodi do oligopeptida i aminokiselina. Ključni enzim u ovom sistemu je proteinaza, ekstracelularni protein vezan za ćelijski zid.

Za sintezu aktivne forme proteinaze potrebno je prisustvo najmanje dva gena: *prtP* gen, odgovoran za sintezu neaktivne forme proteinaze i *prtM* gen, odgovoran za sintezu maturacionog proteina koji vrši aktivaciju proteinaze. Analizom proteinaznih gena utvrđeno je da se *prtP* i *prtM* geni divergentno transkribuju iz promotorskog regiona identifikovanog unutar *Clal* fragmenta veličine 345 bp (Vos *et al.*, 1989; van der Vosen *et al.*, 1992). Pokazano je da je ovaj region u velikoj meri konzervisan i pretpostavlja se da učestvuje i u regulaciji ekspresije *prt* gena.

Noviji literaturni podaci su pokazali da je nivo ekspresije oba promotora proteinaznih gena regulisan prisustvom peptida u medijumu. Pokazano je da je aktivnost ovog enzima najviša u uslovima niske koncentracije peptida u medijumu, dok sa povećanjem koncentracije peptida pada aktivnost ovog enzima. Pretpostavka je da je medijum zavisna ekspresija promotora *prt* gena kontrolisana na nivou inicijacije transkripcije. Sličnost u regulaciji divergentnih i delimično preklapajućih promotora *prtP* i *prtM* gena ukazuje na prisustvo jedinstvenog kontrolnog mehanizma transkripcione mašinerije u ćeliji, pri čemu se dobija ista količina PrtP i PrtM produkata. Delecionim eksperimentima je pokazano da prisustvo ili odsustvo petlje utiče na medijum zavisnu regulaciju (Marugg *et al.*, 1995). Takođe je potvrđeno da je kontrolni mehanizam nezavisan od domaćina.

Poslednjih godina razvijene su brojne tehnike genetičkog inženjerstva koje su omogućile inaktivaciju hromozomalno lociranih gena laktokoka i laktobacila (Leenhouts, 1991). Ove metode omogućavaju analizu enzima *in vivo* i dovode do boljeg razumevanja uloge i funkcije pojedinih gena u proteolitičkom sistemu, kao i razumevanje njihove regulacije.

U cilju izučavanja regulacije *prt* gena u ovom radu je funkcionalno i strukturno okarakterisan regulatorni region proteinaznih gena prirodnog izolata *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29 i inaktiviran je potencijalni regulatorni gen proteinaznih gena laktokoka.

1. Karakterizacija regulatornog regiona *prt* gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29

S obzirom da je iz prethodnih rezultata bilo poznato da kaziton ima određeni uticaj na aktivnost promotora *prt* gena laktokoka (Marugg *et al.*, 1995), kao i da proteolitička aktivnost prirodnog izolata *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29 specifično zavisi od prisustva kazitona u minimalnom medijumu (Miladinov, 1996) u ovom radu je izučavan uticaj kazitona na ekspresiju *prt* gena soja BGIS29.

Regulatorni region proteinaznih gena soja BGIS29 je umnožen PCR metodom i dobijeni fragment je kloniran u vektor za genske fuzije pNZ273. Merenjima aktivnosti β -glukuronidaze je pokazano da je P_{prtP} promotor linearno regulisan prisustvom kazitona u medijumu, tj. da aktivnost P_{prtP} promotora linearno opada sa povećanjem koncentracije kazitona u minimalnom medijumu, kao što je pokazano za P_{prtP} promotor u soju SK11 (Marugg *et al.*, 1995). Za razliku od P_{prtP} promotora, aktivnost P_{prtM} promotora soja BGIS29 opada sa povećanjem koncentracije kazitona u minimalnom medijumu, ali nema linearne korelacije između aktivnosti promotora i koncentracije kazitona u medijumu (Slika 6) za razliku od aktivnosti P_{prtM} promotora soja SK11 (Marugg *et al.*, 1995). Ovi rezultati su potvrđeni "Northern blot" analizom, čime je ujedno i dokazano da je regulacija *prt* promotora na transkripcionom nivou. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost da je P_{prtM} promotor slabije regulisan prisustvom kazitona u medijumu nego P_{prtP} promotor. Iz navedenih podataka dolazi se do pretpostavke da je razlika u proteolitičkoj aktivnosti sojeva BGIS29 i SK11 posledica različite ekspresije P_{prtM} promotora, tj. različitog nivoa sinteze PrtM proteina.

Prethodne analize nukleotidnih sekvenci *prt* regulatornih regiona sojeva BGIS29, SK11 i Wg2 su pokazale razlike u primarnoj i sekundarnoj strukturi. Dužina *prt* regulatornog regiona soja BGIS29 odgovara dužini istog regiona u soju SK11 (Vos *et al.*, 1989a). Deo regulatornog regiona *prt* gena koji sadrži oba promotora (P_{prtP} i P_{prtM}) je dužine 77 bp u oba soja, ali je 5 baznih parova različito. U okviru ove sekvence isti regulatorni region soja Wg2 je 5 bp kraći nego u sojevima BGIS29 i SK11 (Kok *et al.*, 1988). S druge strane kompjuterska analiza regulatornog regiona *prt* gena sojeva BGIS29, SK11 i Wg2 pokazuje razliku u organizaciji i vrednosti slobodne energije sekundarnih struktura (Miladinov, 1996). U sojevima SK11 i Wg2 *prt* promotori su simetrično locirani u regionu petlje, mada je drška petlje 5 bp kraća u Wg2 nego u SK11. Činjenica da nema kaziton zavisne regulacije *prt* gena u soju Wg2 mogla bi da se objasni relativno niskom slobodnom energijom petlje (-7.6 kcal) u poređenju sa petljom u soju SK11 (-15.2 kcal). U sojevima

Wg2 i SK11 -10 regionu P_{prtP} i P_{prtM} su locirani simetrično u regionu drške petlje, dok u soju BGIS29 nisu. Ustvari, TATA sekvenca -10 heksamera P_{prtP} promotora je locirana u dršci petlje, a AT u omći, dok je kompletna sekvenca P_{prtM} promotora van regiona petlje (Miladinov, 1996). Prema tome, različite proteolitičke aktivnosti sojeva BGIS29 i SK11 u prisustvu kazitona, mogle bi biti posledica različite lokalizacije P_{prtP} i P_{prtM} promotora u petlji.

Deleciona analiza promotorskog regiona u soju SK11 je pokazala da je region dužine 90 bp koji sadrži delimično preklopljene P_{prtP} i P_{prtM} promotore dovoljan za punu aktivnost i regulaciju oba promotora. Delecija promotorskog regiona koja počinje neposredno nizvodno od P_{prtP} promotora (pozicija +10), kojom se uklanja polovina strukture petlje rezultuje u gotovo konstitutivnoj aktivnosti P_{prtP} promotora. Delecija uzrokuje derepresiju β -glukuronidazne aktivnosti i povećanje količine iRNK u ćelijama koje su rasle u medijumu sa visokom koncentracijom kazitona. Insercije kratkih DNK segmenata, koji narušavaju sekundarnu strukturu u okviru regulatornog regiona, rezultuju snažnom derepresijom β -glukuronidazne aktivnosti i povećanju količine iRNK u medijumu sa visokom koncentracijom kazitona, dok u medijumu sa niskom koncentracijom kazitona nije bilo nikakve promene (Marugg *et al.*, 1996).

Da bi se proverilo da li je različit nivo regulacije ekspresije P_{prtM} promotora u sojevima BGIS29 i SK11 posledica različite lokalizacije P_{prtP} i P_{prtM} promotora u petlji, tj. da li je deo regulatornog regiona koji nosi delimično preklopljene P_{prtP} i P_{prtM} promotore jedini odgovoran za razlike u regulaciji i samu regulaciju, urađena je deleciona analiza *prt* regulatornog regiona soja BGIS29. Rezultati ukazuju da 180 bp regulatornog regiona koji se nalaze u plazmidu pMPE701 Δ M348 zadržavaju regulaciju ekspresije *prtM* gena kazitonom (Slika 6), tj. da deletirani region veličine 136 bp (lociran između P_{prtM} promotora i ATG kodona *prtM* gena) nije uključen u regulaciju ekspresije *prtM* gena. Ipak, može se reći da delecija u plazmidu pMPE701 Δ M348 ima efekta na ekspresiju β -glukuronidaznog gena, pošto P_{prtM} promotor u ovom konstruktima ima 3 puta veću aktivnost nego u plazmidu pMPE701. Indukcioni faktor je oko 2 puta veći u plazmidu pMPE701 Δ M348 nego u plazmidu pMPE701 (Slika 6). Ova primetna razlika između β -glukuronidazne aktivnosti u ćelijama koje nose plazmid pMPE701 i pMPE701 Δ M348 može eventualno da se objasni prisustvom dva RBS-a u plazmidu pMPE701 i samo jednog RBS-a u plazmidu pMPE701 Δ M348. Uzimajući u obzir sve ove rezultate, može da se zaključi da su neke *cis* sekvence u blizini petlje, nizvodno od P_{prtM} promotora tj. uzvodno od P_{prtP} promotora, verovatno odgovorne za medijum zavisnu regulaciju ekspresije *prt* gena, a da je P_{prtM} promotor slabije regulisan zbog njegove lokacije u regionu petlje (-10 i -35 regionu P_{prtM} promotora se nalaze van petlje).

2. Strukturna analiza regulatornog regiona *prt* gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29

Iz literature je poznato da biološki procesi uključeni u kontrolu transkripcije zavise od lokalnih distorzija strukture DNK koje povećavaju specifičnost prepoznavanja i vezivanja proteina za DNK. Ovi procesi se najčešće odvijaju u prisustvu proteinskih faktora koji se specifično vezuju za DNK i lokalno je savijaju. Tako je i proces transkripcije iniciran vezivanjem multiproteinskih kompleksa za određena mesta na DNK. Uloga proteina koji vrše krivljenje DNK je da smanje rastojanje između različitih mesta prepoznavanja tako da regulatorni proteini mogu da interaguju jedan sa drugim tokom procesa vezivanja za DNK. S obzirom da su prethodni rezultati pokazali da je ekspresija *prt* gena regulisana prisustvom kazitona u minimalnom medijumu može se očekivati da u regulatornom regionu ovih gena postoji mesto za vezivanje nekog potencijalnog regulatora. U cilju određivanja moguće pozicije vezivanja potencijalnog regulatora u regulatornom regionu analizirano je prisustvo lokalne zakrivljenosti DNK u ovom regionu soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29.

Rezultati teorijske i 3-D strukturne analize lokalne zakrivljenosti regulatornog regiona *prt* gena soja BGIS29 su pokazali da postoji potencijalni centar krivljenja u regionu između 375 bp i 425 bp, neposredno uzvodno od P_{prtP} promotora, obuhvatajući i njegov -35 region (Slika 5 i Slika 10). Postojanje potencijalnog centra krivljenja je potvrđeno eksperimentom pokretljivosti DNK fragmenata u gelu, u prisustvu i odsustvu $MgCl_2$, pri čemu je pokazano da kompletan regulatorni region sa okolnim sekvencama ima vrlo visok koeficijent retardacije od 1.2 do 1.5 (svaka vrednost R veća od 1.2 se smatra značajnom). Deo regulatornog regiona koji se nalazi neposredno uz promotore (F347-434) koji po teorijskoj analizi pokazuje najveće zakrivljenje, sam po sebi nije mnogo zakrivljen jer ima neznatan koeficijent retardacije 1.06 (Slika 11).

Dobijeni rezultati ukazuju da je zakrivljenost regulatornog regiona verovatno posledica prisustva većeg broja potencijalnih centara krivljenja i predstavlja njihov vektorski zbir. Iz navedenih podataka može da se pretpostavi da se u okviru regulatornog regiona nalazi veći broj lokalno zakrivljenih regiona koji predstavljaju mesta za vezivanje većeg broja različitih transkripcionih faktora uključujući i potencijalni regulator *prt* gena. Pitanje tačne pozicije vezivanja regulatornog proteina i dalje ostaje otvoreno, ali podaci dobijeni u eksperimentima strukturne analize regulatornog regiona *prt* gena soja BGIS29 ukazuju da je verovatni region odgovoran za prepoznavanje i vezivanje potencijalnog regulatora deo sekvence neposredno uzvodno od P_{prtP} promotora. Činjenica da ovaj region obuhvata -40 do -70 regione P_{prtP} promotora ide u prilog hipotezi da je potencijalni regulator aktivator ekspresije *prt* gena.

3. Inaktivacija potencijalnog regulatornog gena

Generalno uzevši integracija genetičkih elemenata u genom različitih bakterija je do sada korišćena kao moćan metod za kloniranje gena, mapiranje neselektabilnih gena, izučavanje genske ekspresije, generisanje mutacija i stabilizaciju gena. Poslednjih godina konstruisani su novi vektori koji omogućavaju inaktivaciju hromozomalno lociranih gena laktokoka i laktobacila (Leenhouts, 1991; Maguin *et al.*, 1996). U ovom radu integracija je korišćena kao metod za pronalaženje potencijalnog regulatornog, *prtR* gena, odgovornog za medijum zavisnu regulaciju *prt* gena laktokoka.

Insercionom mutagenezom plazmida pG⁺host9::ISS1 u hromozom soja *L. lactis* MPE705 dobijen je "knock-out" soj kod koga je inaktiviran potencijalni regulatorni gen *prt* gena. Merenjema aktivnosti enzima β-glukuronidaze je pokazano da u ovom soju P_{*prtP*} promotor nije aktivan tj. aktivnost enzima β-glukuronidaze u "knock-out" soju, kontrolisana P_{*prtP*} promotorom, je bila zanemarljivo viša od aktivnosti samog plazmida pNZ273 bez promotora. Ovi rezultati jasno ukazuju da je pogođeni gen aktivator ili neki specifičan transkripcioni faktor. Dobijeni rezultati pokazuju da je konstrukcijom "knock-out" soja dobijen regulatorni mutant, koji je izgubio regulaciju *prt* gena kazitonom.

S obzirom da se rast ovog soja u M17 medijumu sa glukozom ne razlikuje od rasta ishodnog soja NZ9000, može da se zaključi da pogođeni gen najverovatnije nema uticaja na druge promotore već je u pitanju specifični efekat na *prt* promotore. Analizom kontrolnih sojeva pokazano je da je promotorski fragment u plazmidu pMPE705, koji je prisutan u mutantima, funkcionalan, što ukazuje da nije došlo do nekog dodatnog rearanžmana, već je niska aktivnost P_{*prtP*} promotora posledica nedostatka transkripcionog aktivatora. Iz literature je poznato da su u poređenju sa jačinama hromozomalnih laktokokalnih promotora P_{*prtP*} i P_{*prtM*} promotori relativno slabi (van der Vosen *et al.*, 1992). Ovi rezultati su dobijeni kada su bakterije gajene u GM17 medijumu. U ovom radu je pokazano da je promotorska aktivnost *prt* promotora kada se bakterije gaje u GM17 medijumu izuzetno niska u poređenju sa aktivnostima promotora kada se bakterije gaje u uslovima niske koncentracije peptida. Kada se svi ovi rezultati uzmu u obzir može da se izvuče zaključak da je bazalni nivo *prt* promotora nizak i tek kada bakterije dobiju informaciju da nema dovoljno peptida u medijumu dolazi do aktiviranja *prt* promotora dejstvom regulatornog proteina, koji se u ovom slučaju ponaša kao aktivator.

Iz literature je poznato da su ekspresije gena odgovornih za sintezu aminopeptidaze PepN i X-prolil-dipeptidil-peptidaze PepXP regulisane prisustvom peptida u medijumu za rast bakterija slično kao što je pokazano za *prt* gene tj. aktivnost peptidaze PepN je

reprimirana pet, a aktivnost peptidaze PepXP dva puta sa porastom koncentracije peptida u medijumu (Meijer *et al.*, lična komunikacija). Osim toga, najnoviji rezultati su pokazali da je i sinteza bakteriocina regulisana prisustvom peptida u medijumu za rast bakterija. Količina sintetisanog bakteriocina MN501 raste sa povećanjem koncentracije peptida u medijumu za rast bakterija (Gajić, 1998). Prikazani rezultati ukazuju na prisustvo globalnog regulatornog proteina koji na ova dva sistema deluje različito, kao represor sinteze bakteriocina i kao aktivator proteolitičkog sistema.

Da bi se proverilo da li ovaj regulator ima efekta i na druge metaboličke puteve, testiran je rast "knock-out" soja u prisustvu različitih šećera. API test i krive rasta u prisustvu glukoze, maltoze i galaktoze u medijumu za rast bakterija su pokazale da prisustvo glukoze nema efekta na rast "knock-out" soja, tj. nema kataboličke represije. Drugim rečima, do sada najbolje okarakterisan regulatorni protein CAP ("cAMP-binding protein"), odgovoran za regulaciju metabolizma šećera, nije inaktiviran, već je u pitanju neki drugi regulatorni protein. Međutim, poređenjem krivih rasta sojeva NZ9000 i Gh9ΔR5723 u prisustvu maltoze i galaktoze vidi se da "knock-out" soj slabije fermentiše ova dva šećera od ishodnog soja, mada iz dobijenih rezultata ne može da se tvrdi da je inaktivirani gen direktno uključen u ove metaboličke puteve.

4. Model regulacije proteolitičkog sistema

Na osnovu prikazanih rezultata i podataka iz literature predlažemo sledeći hipotetički model regulacije *prt* gena laktokoka:

Nivo ekspresije P_{prtP} i P_{prtM} promotora je regulisan prisustvom peptida u medijumu za rast bakterija. Pokazano je da je aktivnost ovih promotora najviša u uslovima niske koncentracije peptida u medijumu za rast bakterija, dok sa povećanjem koncentracije peptida njihova aktivnosti opada (Marugg *et al.*, 1995). Rezultati takođe ukazuju da je medijum zavisna ekspresija promotora *prt* gena kontrolisana na nivou inicijacije transkripcije. Sličnost u regulaciji divergentnih i delimično preklapajućih promotora *prtP* i *prtM* gena ukazuje na prisustvo jedinstvenog kontrolnog mehanizma transkripcione mašinerije u ćeliji. Delecionim eksperimentima je pokazano da prisustvo ili odsustvo sekundarnih struktura utiče na medijum zavisnu regulaciju. Slične sekundarne strukture su nađene u promotorskim regionima, ili u njihovoj blizini, kod mnogih prokariotskih gena i pokazano je da su uključeni u prepoznavanje i vezivanje transkripcionih faktora i regulatornih molekula (Beck and Warren, 1988; van Rooijen *et al.*, 1992). Rezultati su pokazali da svako narušavanje petlje ima uticaj na medijum zavisnu regulaciju. Uzimajući u

obzir prisustvo petlje koja sadrži oba P_{prtP} i P_{prtM} promotora kao i njihove TSP-e i gotovo konstitutivne ekspresije oba $Wg2$ prt promotora, može da se pretpostavi da je regulatorni protein aktivator. Takođe je potvrđeno da je kontrolni mehanizam nezavisan od domaćina (Marugg *et al.*, 1996).

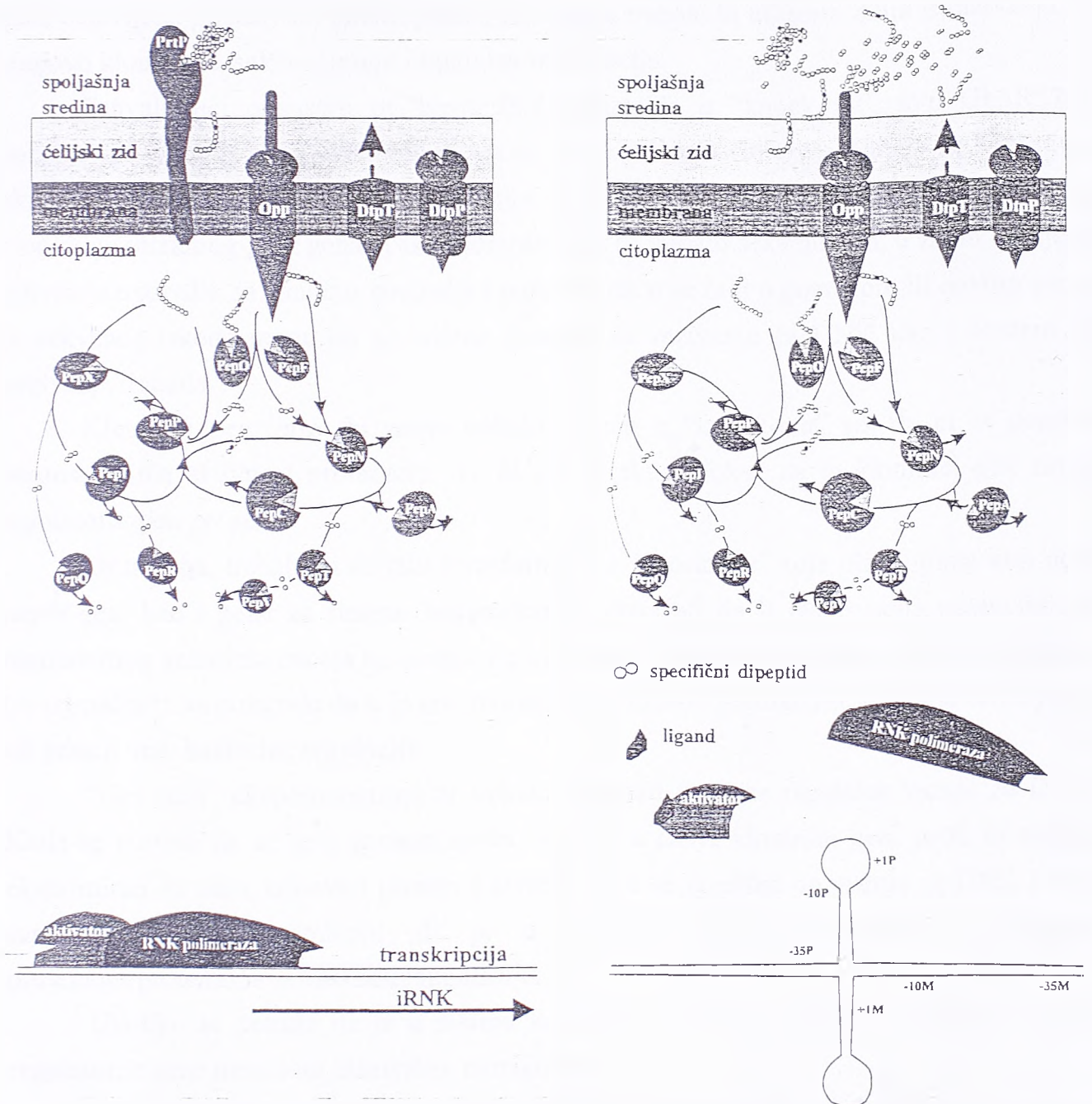
Eksperimenti sa mutantima u transportnom sistemu su pokazali da je specifičan sistem za transport di- i tripeptida esencijalan za kontrolu proteinaznih promotora. Represija proteinaznog sistema dipeptidima je brz i efikasan proces. Nakon unošenja dipeptida u ćeliju signal se prenosi do prt promotora. Pretpostavlja se da se ova regulacija odvija posredstvom interakcije dipeptida ili njihovih derivata sa regulatornim proteinom odgovornim za regulaciju inicijacije transkripcije P_{prtP} i P_{prtM} promotora. Prethodni rezultati su pokazali da specifični dipeptidi (prolil-leucin) mogu da deluju, direktno ili indirektno, kao efektorne molekule na potencijalni aktivator (Marugg *et al.*, 1995). Sve ovo ukazuje da nakon interakcije efektorne molekule sa aktivatorom, verovatno dolazi do njegove konformacione promene, kao i do promene afiniteta potencijalnog regulatora za prt operator tj. njegovog odvajanja od DNK. U uslovima niske koncentracije specifičnih dipeptida afinitet aktivatora za prt operator raste, nakon čega verovatno dolazi do vezivanja aktivatora za specifično mesto na DNK u regulatornom regionu prt gena pri čemu se sprečava mogućnost formiranja petlje i omogućava normalna transkripcija prt gena (Slika 16).

Direktan dokaz da se radi o aktivatoru, a ne represoru dobijen je eksperimentom insercione mutageneze potencijalnog regulatornog gena. Merenjem aktivnosti enzima β -glukuronidaze pokazano je da u mutiranim sojevima nema ekspresije ovog gena tj. detektovan je samo bazalni nivo ekspresije, što je, po podacima iz literature (van Rooijen *et al.*, 1992) slučaj sa promotorima koji su regulisani aktivatorom.

Na osnovu rezultata koji pokazuju zavisnost sinteze peptidaza i bakteriocina od količine peptida u medijumu za rast bakterija može da se pretpostavi da se radi o globalnom regulatoru koji bi mogao da reguliše brojne gene uključene u metabolizam azota, uključujući i gene za proteinaze i peptidaze, kao i gene odgovorne za transport azota kroz membranu (Marugg *et al.*, 1995).

niska koncentracija peptida

visoka koncentracija peptida



Slika 16. Predloženi hipotetički model regulacije *prt* gena *L. lactis*. Prikazani su krajnji stadijumi aktivne i neaktivne transkripcije *prt* gena u uslovima visoke i niske koncentracije peptida u spoljašnjoj sredini. Protein X predstavlja jedan ili više mogućih proteina koji su uključeni u regulaciju. -10P i -35P predstavljaju P_{prtP} promotor, a -10M i -35M P_{prtM} promotor. +1P predstavlja mesto otkočinjanja transkripcije *prtP*, a +1M *prtM* gena.

5. Perspektive daljih istraživanja

S obzirom da su rezultati ovog rada pokazali da je medijum zavisna regulacija *prt* gena uslovljena prisustvom potencijalnog aktivatora trebalo bi usmeriti dalja istraživanja na njegovo kloniranje, sekvenciranje i bližu karakterizaciju.

Zahvaljujući prisustvu pG⁺host9::IS*S1* plazmida u “knock-out” soju GhΔR5723 poznate sekvence iz ovog plazmida mogu da se iskoriste za sintezu prajmera za kloniranje okolnih regiona. Zatim se susedne sekvence iz hromozoma mogu iskoristiti kao proba za kloniranje intaktnog *prtR* gena. Tako klonirani gen bi trebalo sekvencirati, a zatim dobijenu sekvencu uporediti sa bankom podataka i pokazati da li se radi o poznatom ili novom genu. Iz sekvence takođe mogu da se odrede domeni za vezivanje za DNK kao i domeni za vezivanje liganda.

Klonirani gen, *prtR*, bi zatim trebalo ubaciti u “knock-out” soj da bi se ponovo rekonstituisala aktivnost promotora. To bi bio direktan dokaz da je klonirani gen zaista regulatorni gen *prt* gena.

Osim toga, trebalo bi izvršiti transformaciju “knock-out” soja plazmidima koji nose *pepN* gen, kao i gene za sintezu bakteriocina i pokazati da li inaktivacija potencijalnog regulatornog gena ima uticaja na ekspresiju ovih gena i njihovu medijum zavisnu regulaciju. Na taj način bi se pokazalo da li je inaktivirani gen globalni regulatorni gen ili je samo jedan od gena u nizu kaskadne regulacije.

“Gel shift” eksperimentima bi trebalo pokazati da li se regulator vezuje za DNK. Kada se potvrdi da se neki protein zaista vezuje za DNK klonirani gen, *prtR*, bi trebalo eksprimirati *in vitro*, izolovati protein i utvrditi da li se direktno on vezuje za DNK i da li sam učestvuje u regulaciji ili je u pitanju njegova interakcija sa drugim proteinom/proteinima iz kaskadne regulacije.

Ukoliko se pokaže da je u pitanju kaskadna regulacija trebalo bi pronaći i ostale regulatorne gene metodom insercione mutageneze.

S obzirom da su najnoviji rezultati pokazali da i kod nekih sojeva laktobacila postoji medijum zavisna regulacija, kao i da su neki regulatorni regioni *prt* gena laktobacila okarakterisani, trebalo bi pokazati da li potencijalni regulator *prt* gena laktokoka ima uticaja na ekspresiju i regulaciju *prt* gena laktobacila. Tačnije, trebalo bi pokazati da li laktokoke i laktobacili imaju isti tip medijum zavisne regulacije ili laktobacili u tu svrhu koriste neke druge gene. Ukoliko se pokaže da postoji razlika u regulaciji, trebalo bi klonirati regulatorne gene laktobacila.

Osim toga, pokazano je da totalne DNK izolovane iz nekih prirodnih izolata laktobacila ne hibridizuju sa *prr* probama laktokoka, tj. neki laktobacili imaju potpuno drugačiju organizaciju *prr* gena. Ove nove gene bi trebalo klonirati i sekvencirati.

Na kraju, kada se pobliže razjasni način regulacije *prr* gena, kao i kada se kloniraju nove proteinaze mogle bi da se konstruišu hibridne proteinaze sa različitim specifičnostima za supstrat, kao i različitim regulatornim regionima. Na taj način bi se dobio sistem koji bi mogao da se jednostavnim promenama komponenti u medijumu za rast bakterija kontroliše u industrijskim uslovima. Osim toga, sa poznavanjem regulacije *prr* promotora dobijaju se promotori koji mogu da se koriste za kontrolisanu ekspresiju drugih "korisnih" gena u cilju dobijanja probiotika, tj. novih bakterijskih sojeva sa poboljšanim svojstvima koji imaju pozitivan uticaj na zdravlje ljudi.

ZAKLJUČAK

1. Regulatorni region *p_{prt}* gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29 je kloniran u vektor za transkripcione fuzije pNZ273;
2. Merenjem aktivnosti enzima β -glukuronidaze je pokazano da aktivnost P_{prtP} promotora linearno opada sa povećanjem koncentracije kazitona u minimalnom medijumu, kao i da aktivnost P_{prtM} promotora soja BGIS29 opada sa povećanjem koncentracije kazitona u minimalnom medijumu, ali nema linearne korelacije između aktivnosti promotora i koncentracije kazitona u medijumu;
3. Određena su mesta otpočinjanja transkripcije *p_{prtP}* i *p_{prtM}* gena. Pokazano je da je mesto otpočinjanja transkripcije *p_{prtP}* gena G nukleotid 95 bp uzvodno od pretpostavljenog ATG kodona *p_{prtP}* gena, dok je mesto otpočinjanja transkripcije *p_{prtM}* gena G nukleotid 238 bp uzvodno od pretpostavljenog ATG kodona *p_{prtM}* gena;
4. Rezultati kvantitativne "Northern blot" analize su potvrdili rezultate dobijene merenjem aktivnosti enzima β -glukuronidaze, tj. pokazano je da je P_{prtP} promotor slabije regulisan prisustvom kazitona u medijumu. Ovom analizom je ujedno dokazano i da je regulacija *p_{prt}* promotora na transkripcionom nivou;
5. Deleciona analiza regulatornog regiona je pokazala da 180 bp regulatornog regiona *p_{prt}* gena koji se nalaze u plazmidu pMPE701 Δ M348 zadržavaju regulaciju ekspresije *p_{prtM}* gena kazitonom, tj. da deletirani region veličine 136 bp nije uključen u regulaciju ekspresije *p_{prtM}* gena;
6. Strukturna analiza regulatornog regiona *p_{prt}* gena soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29 je pokazala da postoji potencijalni centar krivljenja u regionu između 375 bp i 425 bp, neposredno uzvodno od P_{prtP} promotora, obuhvatajući i njegov -35 region;
7. Insercionom mutagenezom plazmida pG⁻host9::ISS1 u hromozom soja *L. lactis* MPE705 dobijen je "knock-out" soj kod koga je inaktiviran potencijalni regulatorni gen *p_{prt}* gena. Merenjem aktivnosti enzima β -glukuronidaze je pokazano da je inaktivirani gen aktivator.

LITERATURA

- Aoyama, T. and M. Takanami. 1985. Essential structure of *E. coli* promoter II. Effect of the sequences around the RNA start point on promoter function. *Nucleic Acids Res.*, 13: 4085-4096.
- Bojovic, B., G. Djordjevic and L. Topisirovic. 1991. Improved vector for promoter screening in lactococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 385-388.
- Botsford, J. L., and J. G. Harman. 1992. Cyclic AMP in Procaryotes. *Microbiol. Rev.*, 56: 100-122.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 12: 248-254.
- Brent, R., and M. Pthasne. 1981. Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 78: 4204-4208.
- Busby, S., and R. H. Ebright. 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in Procaryotes. *Cell*, 79: 743-746.
- Calvo, J. M. and R.G. Matthews. 1994. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 58: 466-490.
- Chapot-Chartier, M.-P., M. Nardi, M.-C. Chopin, A. Chopin, and J.-C. Gripon. 1993. Cloning and sequencing of *pepC*, a cysteine aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 330-333.
- Chopin, A. 1993. Organization and regulation of genes for amino acids biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 21-38.
- Christensen, J. E., D. Lin, A. Palva, J. L. Steele. 1995. Sequence analysis, distribution and expression of an aminopeptidase N-encoding gene from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Gene.*, 155: 89-93.
- Collado-vides, J., B. Magasanik and J. D. Gralla. 1991. Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 55: 371-394.
- Coolbear, T., J. R. Reid, and G. G. Pritchard. 1992. Stability and specificity of the cell wall-associated proteinase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H2 released by treatment with lysozyme in the presence of calcium ions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3263-3270.

- de Ruyter, P. G. G. A., O. P. Kuipers, M. M. Beerthuyzen, I. van Alen Boerrigter, and W. M. de Vos. 1996. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 178: 3434-3439.
- de Vos, W. M. 1996. Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. Proceeding of the Fifth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, pp. 127-146. Edited by G. Venema, J. H. J. Huis in 't Veld, J. Hugenholtz.
- de Vos, W. M. and R. J. Siezen. 1994. Engineering pivotal proteins for lactococcal proteolysis. *In* Biochemistry of milk products. Andrews, A. T. and J. Varley (eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, pp.56-71.
- Djordjevic, G., B. Bojovic, A. Banina, and Lj. Topisirovic. 1994. Cloning of promoter-like sequences from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CG11 and their expression in *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, and *Lactobacillus reuteri*. *Can. J. Microbiol.*, 40: 1043-1050.
- Djordjevic, G., B. Bojovic, N. Miladinov, and L. Topisirovic. 1997. Cloning and molecular analysis of promoter-like sequences isolated from the chromosomal DNA of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Can. J. Microbiol.*, 43: 61-69.
- Dlakic, M. and R. E. Harrington. 1998. DIAMOND: display and modeling of DNA bending. *Bioinformatics* 14 (in press).
- Dudley, E. G., A. C. Husgen, W. He, and J. L. Steele. 1996. Sequencing, distribution, and inactivation of the dipeptidase A gene (*pepDA*) from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.*, 178: 701-704.
- Exterkate, F. A., A. C. Alting, and P. G. Bruinenberg. 1993. Diversity of cell envelope proteinase specificity among strains of *Lactococcus lactis* and its relationship to charge characteristics of the substrate-binding region. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3640-3647.
- Foucaud, C., E. R. S. Kunji, A. Hagting, J. Richard, W. N. Konings, M. Desmazeaud, and B. Poolman. 1995. Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: Evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides. *J. Bacteriol.*, 177: 4652-4657.
- Gajić, O. 1998. Genetička i biohemijska karakterizacija soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, proizvođača bakteriocina. Magistarski rad. Univerzitet u Beogradu.
- Gasson, M. J. 1996. Lytic systems in lactic acid bacteria and their bacteriophages. Proceeding of the Fifth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism

- and Applications, pp. 51-63. Edited by G. Venema, J. H. J. Huis in 't Veld, J. Hugenholtz.
- Gilbert, C., D. Atlan, B. Blanc, R. Portalier, G. J. Germond, L. Lapierre, and B. Mollet. 1996. A new cell surface proteinase – sequencing and analysis of the *prtB* gene from *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus*. *J. Bacteriol.*, 178: 3059-3065.
- Gold, L. and G. Stromo. 1981. Translation initiation. U: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cell. molec. biol.*, 2: 1302-1307. (Editori: F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, H. E. Umbarger), ASM, Washington, D. C.
- Graves, M. C. and J. C. Rabinowitz. 1986. *In vivo* and *in vitro* transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene. *J. Biol. Chem.*, 261: 11409-11415.
- Hagting, A., E. R. S. Kunji, K. J. Leenhouts, B. Poolman, and W. N. Konings. 1994. The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, 269: 11391-11399.
- Haandrikman, A. J., J. Kok, H. Laan, S. Soemitro, A. M. Ledebøer, W. N. Koning, and G. Venema. 1989. Identification for a gene required for maturation of an extracellular lactococcal serine proteinase. *J. Bacteriol.*, 171: 2789-2794.
- Haandrikman, A. J., R. Meesters, H. Laan, W. N. Konings, J. Kok and G. Venema. 1991. Processing of the lactococcal extracellular serine proteinase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1899-1904.
- Hellendoorn, M. A. and I. Mierau. 1996. PepO2 of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Unpublished results.
- Higgins, C. F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 8: 67-113.
- Holck, A. and H. Næs. 1992. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 3119-3123.
- Holo, H. and I. F. Nes. 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 3119-3123.
- Hopwood, D. A., J. M. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, J. D. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward and H. Schrempf. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. Norwich, UK, The John Innes Foundation.

- Hugenholtz, H., D. van Sinderen, J. Kok, and W. N. Konings. 1987. Cell wall-associated proteases of *Streptococcus cremoris* Wg2. Appl. Environ. Microbiol. 53: 853-859.
- Inouye, M. 1988. Antisense RNA: its functions and applications in gene regulation - a review. Gene, 72: 25-34.
- Juillard, V., D. Le Bars, E. R. S. Kunji, W. N. Konings, J.-C. Gripon, and J. Richard. 1995. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. Appl. Environ. Microbiol., 61: 3024-3030.
- Kiwaki, M., H. Ikemura, M. Shimizu-Kadota and A. Hirashima. 1989. Molecular characterization of a cell wall-associated proteinase gene from *Streptococcus lactis* NCDO763. Molec. Microbiol., 3: 359-369.
- Klein, J.-R., U. Klein, M. Schad, and R. Plapp. 1993. Cloning, DNA sequence analysis and partial characterisation of *pepN*, a lysyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290. Eur. J. Biochem., 217: 105-114.
- Kojić, M., i Đ. Fira. 1995 i 1996. Neobjavljeni rezultati.
- Kok, J. 1987. Proteinases of lactic acid streptococci. Ph. D. thesis. University of Groningen, Groningen, The Netherlands.
- Kok, J. and W. M. de Vos. 1994. The proteolytic system of lactic acid bacteria. In Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria, Gasson, M. and de Vos, W. M. (eds.), Blackie and Professional. London, England, pp. 169-210.
- Konings, W. N., B. Poolman and A. J. M. Driessen. 1989. Bioenergetics and solute transport in Lactococci. CRC Crit. Rev. Microbiol., 16: 419-476.
- Kontinen, V. P., P. Saris, and M. Sarvas. 1991. A gene (*prsA*) of *Bacillus subtilis* is involved in a novel, late stage of protein export. Mol. Microbiol., 5: 1273-1283.
- Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, R. J. Siezen, and W. M. de Vos. 1993. Characterisation of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*: requirement of expression of *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. Eur. J. Biochem., 216: 281-291.
- Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, P. G. G. A. de Ruyter, E. J. Luesink, and W. M. de Vos. 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. J. Bacteriol., 270: 27299-27304.
- Kunji, E. R. S., I. Mierau, A. Hagting, B. Poolman, and W. N. Konings. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Proceeding of the Fifth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, pp. 91-125. Edited by G. Venema, J. H. J. Huis in 't Veld, J Hugenholtz.

- Kunji, E. R. S. 1997. The proteolytic system of *Lactococcus lactis*. PhD thesis. University of Groningen. The Netherlands.
- Laan, H. and W. N. Konings. 1989. Mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 3101-3106.
- Laloi, P., D. Atlan, B. Blanc, C. Gilbert, and R. Portalier. 1991. Cell-wall-associated proteinase of *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* CNRZ397: differential extraction, purification and properties of the enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 196-204.
- Leenhouts, K. J. 1991. Development and use of plasmid integration systems for Lactococci. Ph. D. thesis, University of Groningen.
- Lovvet, P. S. 1990. Translational attenuation as the regulator of inducible *cat* genes. *J. Bacteriol.*, 172: 1-6.
- Maguin, E., H. Prevost, S. D. Ehrlich, and A. Gruss. 1996. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.*, 178:931-935.
- Maniatis, T. E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Martín-Hernández, M. C., A. C. Alting and F. A. Exterkate. 1994. Purification and characterization of the mature, membrane-associated cell-envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* L89. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40: 828-834.
- Marugg, J. D., W. Meijer, R. van Kranenburg, P. Laverman, P. G. Bruinenberg and W. M. de Vos. 1995. Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*: control of transcription initiation by specific dipeptides. *J. Bacteriol.*, 177: 2982-2989.
- Marugg, J. D., R. van Kranenburg, P. Laverman, G. A. M. Rutten and W. M. de Vos. 1996. Identical transcriptional control of the divergently transcribed *prtP* and *prtM* genes that are required for proteinase production in *Lactococcus lactis* SK11. *J. Bacteriol.*, 178:1525-1531.
- Mayo, B., J. Kok, K. Venema, W. Bockelman, M. Teuber, H. Reinke, and G. Venema. 1991. Molecular cloning and sequence analysis of the X-prolyl dipeptidil aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 38-44.
- Mayo, B., J. Kok, W. Bockelman, A. Haandrikman, K. J. Leenhouts, and G. Venema. 1993. Effect of X-prolyl dipeptidil aminopeptidase deficiency on *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:156-161.

- McClure, W. R. 1985. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.*, 54: 171-204.
- Meijer, W., J. D. Marugg, and J. Hugenholtz. Regulation of proteolytic enzyme production in *Lactococcus lactis*. (submitted for publication.)
- Mierau, I., P. S. T. Tan, A. J. Haandrikman, J. Kok, K. J. Leenhouts, W. N. Konings, and G. Venema. 1993. Cloning and sequencing of the gene for a lactococcal endopeptidase, an enzyme with sequence similarity to mammalian enkephalinase. *J. Bacteriol.*, 175: 2087-2096.
- Mierau, I., A. J. Haandrikman, O. Velterop, P. S. T. Tan, K. L. Leenhouts, W. N. Konings, G. Venema, and J. Kok. 1994. Tripeptidases gene (*pepT*) of *Lactococcus lactis*: Molecular cloning and nucleotide sequencing of *pepT* and construction of a chromosomal deletion mutant. *J. Bacteriol.*, 176: 2854-2861.
- Miladinov, N. 1996. Kloniranje i analiza proteinaznog regiona prirodnog izolata *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29. Magistarski rad. Univerzitet u Beogradu.
- Mills, O. E. and T. D. Thomas. 1981. Nitrogen sources for growth of lactic streptococci in milk. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 16: 43-55.
- Molenaar, D., A. Hagting, H. Alkema, A. J. M. Driessen, and W. N. Konings. 1993. Characteristics and osmoregulatory roles of uptake systems for prolyne and glycine betaine in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 175:5438-5444.
- Monnet, V., M. Nardi, A. Chopin, M.-C. Chopin, and J.-C. Gripon. 1994. Biochemical and genetic characterisation of PepF, an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, 269: 32070-32076.
- Moran, C. P. Jr., N. Lang, S. F. J. LeGrice, G. Lee, M. Stephens, A. L. Sonenshein, J. Pero and R. Losick. 1982. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Molec. Gen. Genetics.*, 186: 339-346.
- Musafija, T., i Lj. Topisirović. Neobjavljeni rezultati.
- Nakajima, H., A. Hagting, E. R. S. Kunji, B. Poolman and W. N. Konings. 1997. Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of the gene specifying the di-tripeptide transport protein of *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2213-2217.
- Navarre, W. W. and O. Schneewind. 1994. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, 14: 115-121.

- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink, and H. Holo. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Proceeding of the Fifth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, pp. 17-32. Edited by G. Venema, J. H. J. Huis in 't Veld, J. Hugenholtz.
- O' Sullivan, D. J. and T. R. Klaenhammer. 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* ssp. Appl. Environ. Microbiol., 59: 2730-2733.
- Parvin J. D., R. J. McCormick, P. A. Sharp and D. E. Fisher. 1995. Pre-bending of a promoter sequence enhances affinity for the TATA-binding factor. Nature, 373: 724-727.
- Platteeuw, C., G. Simons, and W. M. de Vos. 1994. Use of the *Escherichia coli* β -glucuronidase (*gusA*) gene as a reporter gene for analyzing promoters in lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 60: 587-593.
- Poolman, B. 1993. Energy transduction in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12: 125-148.
- Pritchard, G. G. and T. Coolbear. 1993. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12: 179-206.
- Rolfes, R. J. and H. Zalkin. 1990. Autoregulation of *Escherichia coli purR* requires two control sites downstream of the promoter. J. Bacteriol., 172: 5758-5766.
- Ross, W., K. K. Gosink, J. Salomon, K. Igarashi, C. Zou, A. Ishihama, K. Severinov and R. I. Gourse. 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the α subunit of RNA polymerase. Science, 262: 1407-1413.
- Sahlstrøm, S., J. Chrzanowska, and T. Sørhaug. 1993. Purification and characterization of a cell wall peptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IMN-C12. Appl. Environ. Microbiol., 59: 3076-3082.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-termination. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 74: 5463-5467.
- Sankaran, K. and H. C. Wu. 1994. Lipid modification of bacterial prolipoprotein; transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. J. Biol. Chem., 269: 19701-19706.
- Schumacher, M. A., K. Y. Choi, H. Zalkin and R. G. Brennan. 1994. Crystal structure of LacI member, PurR, bound to DNA: Minor groove binding by α helices.

- Shine, J. and L. Dalgarno. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 71: 1342-1346.
- Simons, R. W. 1988. Naturally occurring antisense RNA control - a brief review. Gene, 72: 35-44.
- Slos, P., J. C. Bourquin, Y. Lemoine, and A. Mercenier. 1991. Isolation and characterisation of chromosomal promoters of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 57: 1333-1339.
- Smid, E. J., A. J. M. Driessen, and W. N. Konings. 1989. Mechanism and energetics of dipeptide transport in membrane vesicles of *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol., 172:5286-5292.
- Smid, E. J., B. Poolman, and W. N. Konings. 1991. Casein utilization by lactococci. Appl. Environ. Microbiol., 57: 2447-2452.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoreses. J. Molec. Biol., 98: 503-517.
- Steiner, H.-Y., F. Naider, and J. M. Becker. 1995. The PTR-family: a new group of peptide transporters. Mol. Microbiol. 16: 825-834.
- Stock, J. B., A. J. Ninfa, A. M. Stock. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol. Rev., 53: 450-490.
- Strøman, P. 1992. Sequence of a gene (*lap*) encoding a 95.3-kDa aminopeptidase from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* Wg2. Gene, 113: 107-112.
- Tame, J. R. H., G. N. Murshudov, E. J. Dodson, T. K. Neil, G. G. Dodson, C. F. Higgins, and A. J. Wilkinson. 1994. The structural basis of sequence-independent peptide binding by OppA protein. Science, 264: 1578-1581.
- Tan, P. S. T. and W. N. Konings. 1990. Purification and characterisation of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Appl. Environ. Microbiol., 56: 526-532.
- Tan, P. S. T. K. M. Pos, and W. N. Konings. 1991. Purification and characterisation of an endopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Appl. Environ. Microbiol., 57: 3593-3599.
- Tan, P. S. T., I. J. van Alen-Boerrigter, B. Poolman, R. J. Siezen, W. M. de Vos, and W. N. Konings. 1992. Characterisation of the *Lactococcus lactis pepN* gene encoding an aminopeptidase homologous to mammalian aminopeptidase N. FEBS Letters 306: 9-16.

- Tynkkynen, S., G. Buist, E. Kunji, J. Kok, B. Poolman, G. Venema and A. J. Haandrikman. 1993. Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 175:7523-7532.
- van der Vossen, J. M. B. M., D. van der Lelie and G. Venema. 1987. Isolation and characterisation of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2452-2457.
- van der Vossen, J. M. B. M., J. Kodde, A. J. Haandrikman, G. Venema and J. Kok. 1992. Characterisation of transcription initiation and termination signals of the proteinase genes of *Lactococcus lactis* Wg2 and enhancement of proteolysis in *L. lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3142-3149.
- van Rooijen, R. J. 1993. Characterisation of the *Lactococcus lactis* lactose genes and regulation of their expression. PhD thesis, Agricultural University in Wageningen.
- Vesanto, E., K. Peltoniemi, T. Purtsi, J. L. Steele, and A. Palva. 1996. Molecular characterization, overexpression and purification of a novel dipeptidase from *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 1162-1166.
- Visser, S., F. A. Exterkate, C. J. Slangen, and G. J. C. M. De Veer. 1986. Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine α_{s1} -, β -, and κ -casein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 1162-1166.
- Vongerichten, K. F., J. R. Klein, H. Matern, and R. Plapp. 1994. Cloning and nucleotide sequence analysis of *pepV*, a carnosinase gene from *Lactobacillus delbrückii* subsp. *Lactis* DSM7290, and partial characterisation of the enzyme. *Microbiol.*, 140: 2591-2600.
- Von Heijne, G. 1989. The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. *Prot. Engineer.*, 2: 531-534.
- Vos, P., G. Simons, R. J. Siezen and W. M. de Vos. 1989. Primary structure and organisation of the gene for a prokaryotic, cell envelope-located serine proteinase. *J. Biol. Chem.*, 264: 13579-13585.
- Vos, P., I. J. Boerrigter, G. Buist, A. J. Haandrikman, M. Nijhuis, M. B. de Reuver, R. J. Siezen, G. Venema, W. M. de Vos and J. Kok. 1991. Engineering of the *Lactococcus lactis* serine proteinase by construction of hybrid enzymes. *Prot. Engineer.*, 4: 479-484.
- Werner, M. H., A. M. Gronenborn and G. M. Clore. 1996. Intercalation, DNK kinking, and the control of transcription. *Science*, 271: 778-784.

- Yamamoto, N., A. Akino, and T. Takano. 1993. Purification and specificity of a cell-wall-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Biochem.*, 114: 740-745.
- Yanofski, C., and R. Kolter. 1982. Attenuation in amino acid biosynthetic operons. *Ann. Rev. Genetics*, 16: 113-134.
- Yanofsky, C., and I. P. Crawford, 1987. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, vol. 2, Neidhart, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umberger, H. E. (ed.) pp. 1453-1472, American Society for Microbiology, Washington DC.



