

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Brankica V. Filipić

**Funkcionalna karakterizacija CmbT  
transportera odgovornog za višestruke  
rezistencije na strukturno različite  
supstrate u soju *Lactococcus lactis*  
subsp. *cremoris* MG1363**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Brankica V. Filipić

**Functional characterization of the CmbT  
transporter responsible for multidrug  
resistance on structurally different  
substrates of the strain *Lactococcus  
lactis* subsp. *cremoris* MG1363**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

## MENTORI:

---

dr sc. Jelena Antić-Stanković (mentor), vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

dr sc. Nataša Golić (mentor), naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu – Institut za molekularnu genetiku  
i genetičko inženjerstvo

## ČLANOVI KOMISIJE:

---

dr sc. Milan Kojić, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu – Institut za molekularnu genetiku  
i genetičko inženjerstvo

---

dr sc. Branko Jovčić, docent  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

---

dr sc. Katarina Nikolić, docent  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama, u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Ovom prilikom želim da se zahvalim:*

*Mentoru, prof. dr Jeleni Antić Stanković, na velikoj podršci, podsticajima, savetima i razumevanju na putu mog naučnog usavršavanja, na ukazanom poverenju u mene lično i ishod ovog rada. Takođe, želim da se zahvalim na preduzimljivosti, velikoj slobodi koju sam imala u radu, kao i na kritičkoj oceni teze.*

*Mentoru, dr Nataši Golić, što mi je otvorila vrata sveta molekularne mikrobiologije i omogućila da napravim značajne korake u svom naučno-istraživačkom radu. Istovremeno, beskrajno hvala Nati na strpljenju, savetima i brojnim diskusijama koje su bile od neprocenjivog značaja za savladavanje svih teškoća u radu, kao i za izradu, a potom i pisanje teze. Takođe, zahvaljujem se na kritičkoj oceni rada.*

*Dr Milanu Kojiću, rukovodiocu Laboratorije, kome dugujem posebnu zahvalnost što je svojim velikim naučnim znanjem i iskustvom doprineo rešavanju problema nastalih tokom eksperimentalnog rada. Zahvaljujem mu se na bezgraničnoj pomoći i dostupnosti u svakome trenutku, kao i na kritičkoj oceni teze.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem doc. dr Branku Jovčiću za svu pomoć, savete i pruženo znanje u toku istraživačkog rada i pisanja teze, a posebno na prijateljskoj saradnji i iskrenoj podršci. Dragom profesoru posebno hvala na britkom umu i vedrom duhu kojima je naučni rad učinio zanimljivijim.*

*Zahvaljujem se doc. dr Katarini Nikolić na uloženom trudu, vremenu i velikom iskustvu koje je bilo od neprocenjivog značaja u primeni kompjuterskih metoda, kao i na nesebičnoj pomoći tokom pisanja rada i doktorske disertacije iz oblasti QSAR-a.*

*Koristim priliku da se zahvalim prof. dr Raymond Turner i dr. Denice Bay sa Katedre za biološke nauke, Univerziteta u Kalgariju, Kalgari, Kanada, na stručnoj pomoći u savladavanju metoda koje su omogućile dobijanje dela rezultata predstavljenih u tezi. Takođe, hvala svima koji su me toplo prihvatili tokom hladnih zimskih dana u Kanadi i učinili moj boravak nezaboravnim.*

*Veliko hvala svim članovima Katedre za mikrobiologiju i imunologiju, profesorkama dr Marini Milenković, dr Neveni Arsenović Ranin i dr Zorici Stojić Vukanić na razumevanju i podršci, mojim dragim kolegama Gagi, Bilji, Ewelini i Ivanu na jedinstvenom humoru koji me je dovodio do suza čak i kada nije bio na moj račun, Nataši i Vesnama.*

*Najiskrenije hvala Ivki i Amareli, Đorđu, dragim plavušama Jeleni i Jelki, mojim devojčkama Kaći, Maji i Mici koje su mi bile bezgranična podrška, Makiju na dugotrajnim razgovorima, Sanji, Jovanki, Goci, Nemanji, Goranu i Kaći uz koje je rad bio lakši i lepši. Hvala laboratoriji 06 za sve naučne, a posebno nenaučne teme o kojima se diskutovalo i koje su me svakodnevno uveseljavale.*

*Prijateljima, jer su imali razumevanja poslednjih godina.*

*A posebno mami, tati i mojoj Caci. Ne postoje reči... Ovu doktorsku disertaciju posvećujem vama, mojim najmilijima.*

**Funkcionalna karakterizacija CmbT transportera odgovornog za višestruke rezistencije na strukturno različite supstrate u soju *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363**

**REZIME**

*Lactococcus lactis* pripada grupi bakterija mlečne kiseline (BMK) i ima dugotrajnu primenu u prehrambenoj industriji kao starter kultura, najviše u proizvodnji tvrdih i polutvrdih sireva. Kako *L. lactis* ima ključnu ulogu u formiranju ukusa i teksture finalnog proizvoda, a doprinosi i produženju trajnosti namirnica, veliki ekonomski i industrijski značaj doveo je do toga da su laktokoke predmet stalnog izučavanja. Iako se generalno smatraju bezbednim mikroorganizmima, mnogi istraživači ukazuju na činjenicu da laktokoke, kao i druge bakterije mlečne kiseline mogu biti rezervoar gena za rezistenciju. U cilju sprečavanja širenja ovakvih gena na druge bakterije intestinalnog trakta ili patogene bakterije prisutne u hrani, od velikog značaja je izučavanje mehanizama rezistencije, posebno kod laktokoka namenjenih za prehrambenu industriju.

Analizom genoma *L. lactis* detektovano je prisustvo 40 potencijalnih gena za MDR (eng. multidrug resistance) transportere, od čega su svega dva ABC transportera, LmrA i LmrCD i jedan MFS transporter, LmrP funkcionalno okarakterisani.

Istraživanja prikazana u ovom radu su imala za cilj da se okarakteriše CmbT (eng. Cysteine and Methionine Biosynthesis Transporter) protein, potencijalno novi MDR transporter u soju *L. lactis*.

Gen *cmbT* identifikovan je po prvi put prilikom izučavanja regulacije metabolizma sumpora u *L. lactis*. Primenom različitih kompjuterskih programa, pokazano je da *cmbT* kodira transmembranski integralni efluks protein (veliĉine 454 aminokiseline) koji pokazuje homologiju sa članovima 2.A.1.3.X supstrat/H<sup>+</sup> antiporter-2 subfamilije.

Prvi korak u funkcionalnoj karakterizaciji CmbT proteina bio je kloniranje i ekspresija *cmbT* gena pomoću precizno regulisanog NICE (eng. NIsin Controlled gene

Expression) sistema. Rezultati dobijeni RT-PCR i Western blot analizama pokazuju da su pojačana ekspresija *cmbT* gena i povećana količina CmbT proteina dobijeni nakon dodatka subinhibitornih koncentracija nizina u medijum.

Transportni eseji urađeni u prisustvu velikog broja strukturno različitih supstrata pokazali su da CmbT obezbeđuje rezistenciju laktokoka na linkomicin, holat, sulbaktam, etidijum bromid, Hoechst 33342, sulfadiazin, streptomycin, rifampicin, puromicin i sulfametoksazol. Pored toga, in vitro transportni eseji pokazali su da pojačana ekspresija CmbT proteina dovodi do pojačanog izbacivanja etidijum bromida i Hoechst 33342 iz ćelije, u poređenju sa kontrolnim sojem, čime je potvrđena efluks aktivnost CmbT transportera. Pored toga, dodatak jonofora valinomicina i nigericina, inhibira efluks Hoechst 33342 iz ćelije, na osnovu čega se može zaključiti da CmbT transporter pripada grupi protonskih pumpi.

U cilju određivanja fiziološke uloge CmbT transportera kod laktokoka, merena je produkcija tiola kod soja koji pojačano eksprimira CmbT i *L. lactis* NZ9000 kontrolnog soja u prisustvu i odsustvu metionina i cisteina ( $10 \times$  metionin/cistein i  $0,1 \times$  metionin). Rezultati su pokazali da povećana sinteza CmbT proteina značajno utiče na produkciju tiola u medijumu sa  $0,1 \times$  metioninom.

Pored toga, praćen je rast sojeva *L. lactis* NZ9000 i *L. lactis* NZ9000/pCT50 koji pojačano eksprimira *cmbT* u bogatom i hemijski definisanom medijumu u prisustvu metionina i metionina i cisteina. Napravljene su krive rasta, a nakon izračunavanja odgovarajućih vremena generacije, dobijeno je da *L. lactis* NZ9000/pCT50 koji pojačano eksprimira *cmbT*, brže raste u odnosu na divlji soj. Ovakva razlika može biti posledica aktivnosti CmbT transportera koji doprinosi izbacivanju toksičnih agenasa iz ćelije.

Jedan od ciljeva ove studije bio je i ispitivanje specifičnosti supstrata za CmbT protein na molekularnom nivou. Korišćen je indirektan pristup, koji se zasniva na strukturnim karakteristikama samih supstrata i obuhvata 3D-QSAR studije (eng. 3D-Quantitative Structure-Activity Relationship).

Formiran je homologni model CmbT proteina, optimizovan i ispitivan molekulsko dinamičkim studijama. Relativne rezistencije 21 testiranog jedinjenja korišćene su za formiranje 3D-QSAR modela i selekciju molekulskih determinanti koje CmbT prepoznaje.

Dobijeni rezultati pokazali su da je visok afinitet CmbT proteina za etidijum bromid, sulbaktam i sulfatiazol povezan sa odsustvom nekoliko značajnih nefavorizovanih interakcija, dok je prisustvo veoma specifičnih nefavorizovanih interakcija između tercijernog i kvaternernog N atoma u bacitracinu, apramicinu, novobiocinu, vankomicinu, kanamicinu, gentamicinu i tobramicinu, prepoznato kao glavni razlog smanjene RR vrednosti. Pored toga, lokalizacija CmbT vezujućeg mesta u membrani, kao i pozitivna korelacija između lipofilnosti ( $\log D_{pH5,0}$ ) i RR vrednosti, ukazuju na to da CmbT prepoznaje supstrate unutar lipidnog dvosloja. Leu331, Val357, i Leu360 prepoznati su kao aminokiseline uključene u vezivanje liganda u aktivnom mestu CmbT proteina.

Uzimajući u obzir dobijene rezultate, može se zaključiti da je CmbT novi MDR transporter u *L. lactis*, sa mogućom ulogom u metabolizmu sumpora, koji prepoznaje supstrate unutar membrane.

**Ključne reči:** *Lactococcus lactis*, CmbT transporter, višestruka rezistencija, metabolizam sumpora, krive rasta, QSAR

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska mikrobiologija

**UDK broj:** 579.25 : 579.86 : 615.33 (043.3)

**Functional characterization of the CmbT transporter responsible for multidrug resistance on structurally different substrates of the strain *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363**

**SUMMARY**

*Lactococcus lactis* is a lactic acid bacterium (LAB) widely used as a constituent of many industrial and artisanal starter cultures in dairy industry, especially for fermentation of hard and semi hard cheeses. This organism plays a key role in the formation of flavour and texture of cheese and its preservation and because of the great industrial importance it has been the subject of numerous studies. Although they have acquired the „Generally Regarded As Safe“ (GRAS) status, many investigators have speculated that lactococci as well as other LAB may act as reservoirs of antibiotic resistance genes. The main threat associated with these bacteria is that they can transfer resistance genes to intestinal microorganisms and food-associated pathogenic bacteria. In order to prevent and reduce the spreading of the resistance genes, more studies of multidrug resistance (MDR) transporters in lactococci intended for use in food systems are needed.

The genome analysis of *L. lactis* indicated the presence of at least 40 putative drug transporter genes, but only two ABC transporters, LmrA, and LmrCD, and one MFS transporter, LmrP, have been studied in detail and all three have demonstrated MDR activity experimentally.

The aim of this thesis was to investigate and characterize new MDR transporter CmbT (Cysteine and Methionine Biosynthesis Transporter) in *L. lactis*.

The *cmbT* gene was originally identified from a random mutagenesis study of cysteine and methionine biosynthesis regulation in *L. lactis*. This gene is predicted to encode an integral membrane efflux protein (454 amino acids) with homology to members of the 2.A.1.3.X drug/H<sup>+</sup> antiporter-2 subfamily of the major facilitator superfamily (MFS).

In order to follow the transport function of the CmbT protein, the *cmbT* gene was cloned and over-expressed in *L. lactis* NZ9000 using the nisin controlled gene



expression (NICE) system. Reverse-transcription polymerase chain reaction and western blot analysis revealed that *cmbT* transcript was successfully over-expressed after addition of sub-inhibitory amounts of nisin in growing medium.

The results from cell growth studies revealed that the CmbT protein has an effect on the host cell resistance to lincomycin, cholate, sulbactam, ethidium bromide, Hoechst 33342, sulfadiazine, streptomycin, rifampicin, puromycin, and sulfamethoxazole. Moreover, in vitro transport assays showed that over-expressed CmbT-mediated extrusion of ethidium bromide and Hoechst 33342 was higher than in the control *L. lactis* NZ9000 strain. The CmbT-mediated extrusion of Hoechst 33342 was inhibited by ionophores nigericin and valinomycin known to dissipate the proton motive force, which indicates that the CmbT-mediated extrusion is based on a drug-proton antiport mechanism.

To elucidate the physiological role of the CmbT transporter in lactococcal cells, the level of thiol groups in the supernatants of strain over-producing CmbT and *L. lactis* NZ9000 control strain, in the presence and absence of methionine and cysteine ( $10 \times$  Met/Cys and  $0.1 \times$  Met, respectively) was monitored. The results showed that thiol production in  $0.1 \times$  Met was significantly influenced by CmbT over-production.

Also, the growth curves of *L. lactis* NZ9000 and *L. lactis* NZ9000/pCT50 overexpressing *cmbT* in the rich and chemically defined medium were determined. Resulting doubling times revealed that *L. lactis* NZ9000/pCT50 overexpressing *cmbT* gene had higher growth rate comparing to wild type, probably due to the CmbT efflux activity which contributes to the toxin extrusion from the cell.

One of the aims of this study was the investigation of the CmbT substrate specificity and its role as a proton motive force-driven drug efflux pump at a molecular level. In that order, 3D-quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) study was applied for selection of molecular determinants of multidrug recognition by CmbT.

Homology model of CmbT protein was constructed, further optimized and finally examined by molecular dynamics study. The relative resistance (RR) of 21 antibiotics (representing the CmbT affinity/substrate specificity to various drugs) were used for the 3D-QSAR study and prediction of the CmbT binding sites.

The obtained results showed that high CmbT affinities to ethidium, sulbactam, and sulfathiazole could be related to the absence of significant unfavourable

interactions. In contrast, the presence of specific unfavourable interaction between two hydrogen bond donor groups in bacitracin, apramycin, novobiocin, vancomycin, kanamycin, gentamycin, and tobramycin is found to be the main reason for their lower CmbT affinities. In addition, membrane position of the CmbT binding site and positive correlation between substrates lipophilicity ( $\log D_{\text{pH}5.5}$ ) and CmbT affinity strongly indicates that CmbT recognizes its substrates within the membrane. Leu331, Val357, and Leu360 residues were selected as amino acids involved in ligand binding in the active site of the CmbT.

Taking together these results, it can be concluded that CmbT is a novel major facilitator multidrug resistance transporter candidate in *L. lactis* with a possible signalling role in sulphur metabolism, which recognize the substrates within the membrane.

**Key words:** *Lactococcus lactis*, CmbT transporter, multidrug resistance, sulphur metabolism, growth curves, QSAR

**Scientific field:** Pharmacy

**Narrow scientific field:** Pharmaceutical Microbiology

**UDC number:** 579.25 : 579.86 : 615.33 (043.3)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Bakterije mlečne kiseline - Rod <i>Lactococcus</i></b> .....	2
1.1.1. Taksonomija i klasifikacija laktokoka.....	3
1.1.2. Značaj <i>L. lactis</i> vrsta.....	5
<b>1.2. NICE sistem (eng. NIsin Controlled gene Expression system)</b> .....	7
1.2.1. Komponente i funkcionisanje NICE sistema.....	7
1.2.2. Primena NICE sistema.....	11
<b>1.3. Rezistencija na antibiotike</b> .....	13
1.3.1. MDR transporteri.....	15
1.3.1.1. Primarni, ATP-zavisni transporteri.....	17
1.3.1.2. Sekundarni transporteri.....	19
1.3.1.2.1. Izvor energije za funkcionisanje sekundarnih transportera.....	26
1.3.2. MDR transporteri vrste <i>L. Lactis</i> .....	26
1.3.3. Mehanizam transporta supstrata.....	31
1.3.4. Klinički značaj MDR transportera.....	33
1.3.5. Fiziološka uloga MDR transportera.....	34
<b>1.4. Kvantitativni odnosi strukture i dejstva (eng. Quantitative Structure Activity Relationships - QSAR)</b> .....	34
<b>2. CILJ RADA</b> .....	37
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	38
<b>3.1. Bakterijski sojevi i plazmidi</b> .....	38
<b>3.2. Medijumi za gajenje (rast) bakterija</b> .....	39
<b>3.3. Metode za izolovanje DNK</b> .....	40
3.3.1. Metoda za izolaciju ukupne DNK iz laktokoka.....	40
3.3.2. Mini-metoda za izolaciju plazmidne DNK iz laktokoka i <i>E. Coli</i> .....	41
<b>3.4. Enzimske reakcije sa DNK</b> .....	42
3.4.1. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom (eng. Polymerase Chain Reaction).....	42
3.4.2. Sečenje DNK restrikcionim enzimima.....	43
3.4.3. Ligacija DNK fragmenata.....	43
3.4.4. Sekvenciranje DNK.....	44
<b>3.5. Elektroforeza i elucija DNK</b> .....	44
3.5.1. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu.....	44
3.5.2. Elucija DNK fragmenata.....	45
<b>3.6. Transformacija ćelija sa DNK</b> .....	45
3.6.1. Transformacija <i>E. coli</i> .....	45
3.6.1.1. Priprema <i>E. coli</i> kompetentnih ćelija.....	45
3.6.1.2. Transformacija <i>E. coli</i> kompetentnih ćelija toplotnim šokom (eng. „Heat shock“)......	46
3.6.2. Transformacija laktokoka elektroporacijom.....	46
<b>3.7. Metode rada sa RNK</b> .....	47
3.7.1. Izolacija ukupne RNK iz laktokoka.....	47
3.7.2. Reakcija lančanog umnožavanja DNK reverznom transkripcijom (RT- PCR).....	47
<b>3.8. Metode rada sa proteinima</b> .....	47
3.8.1. Analiza sekvence proteina.....	47

3.8.2. Ekspresija proteina pomoću NICE sistema (eng. NIsin Controlled gene Expression system).....	48
3.8.2.1. Priprema nizina.....	48
3.8.2.2. Ekspresija proteina.....	48
3.8.3. Izolacija totalnih proteina iz laktokoka.....	48
3.8.4. Izolacija His6-CmbT proteina iz <i>L. lactis</i> .....	49
3.8.4.1. Određivanje koncentracije proteina.....	49
3.8.5. Elektroforeza proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu.....	50
<b>3.9. Western blot analiza.....</b>	<b>51</b>
<b>3.10. Određivanje krive rasta kod laktokoka.....</b>	<b>51</b>
3.10.1. Izračunavanje srednjeg vremena generacije.....	51
<b>3.11. Ispitivanje osteljivosti laktokoka na različite toksične agense.....</b>	<b>52</b>
<b>3.12. Transportni eseji.....</b>	<b>53</b>
<b>3.13. Detekcija tiola.....</b>	<b>54</b>
<b>3.14. Određivanje H<sub>2</sub>S.....</b>	<b>55</b>
<b>3.15. Modeliranje, optimizacija i molekulska dinamička studija CmbT Proteina.....</b>	<b>55</b>
<b>3.16. Molekulska modeliranje.....</b>	<b>57</b>
<b>3.17. 3D-QSAR studija.....</b>	<b>61</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>64</b>
<b>4.1. Kompjuterska analiza CmbT proteina.....</b>	<b>64</b>
<b>4.2. Kloniranje i ekspresija <i>cmbT</i> gena.....</b>	<b>66</b>
4.2.1. Kloniranje <i>cmbT</i> gena.....	66
4.2.2. Kontrolisana ekspresija <i>cmbT</i> gena.....	68
<b>4.3. Funkcionalna karakterizacija CmbT proteina.....</b>	<b>70</b>
4.3.1. Utvrđivanje odnosa između povećane ekspresije <i>cmbT</i> gena i rezistencije u soju <i>L. lactis</i> NZ9000.....	70
<b>4.4. Uticaj povećane ekspresije <i>cmbT</i> gena na rast <i>L. lactis</i> NZ9000.....</b>	<b>72</b>
<b>4.5. Efluks etidijum bromida i Hoechst 33342 posredovan CmbT proteinom.....</b>	<b>74</b>
<b>4.6. Uloga CmbT proteina u metabolizmu sumpora.....</b>	<b>76</b>
<b>4.7. Modeliranje, optimizacija i molekulska dinamička studija CmbT proteina.....</b>	<b>77</b>
<b>4.8. 3D-QSAR studija.....</b>	<b>80</b>
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>88</b>
<b>5.1. Kompjuterska analiza CmbT proteina.....</b>	<b>88</b>
<b>5.2. Kloniranje i ekspresija <i>cmbT</i> gena.....</b>	<b>89</b>
<b>5.3. Funkcionalna karakterizacija CmbT proteina.....</b>	<b>90</b>
<b>5.4. Uticaj povećane ekspresije <i>cmbT</i> gena na rast <i>L. lactis</i> NZ9000.....</b>	<b>92</b>
<b>5.5. Efluks etidijum bromida i Hoechst 33342 posredovan CmbT proteinom.....</b>	<b>93</b>
<b>5.6. Uloga CmbT proteina u metabolizmu sumpora.....</b>	<b>94</b>
<b>5.7. Modeliranje, optimizacija i molekulska dinamička studija CmbT proteina QSAR analizom.....</b>	<b>97</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>99</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>101</b>
<b>8. PRILOG: Spisak publikovanih radova i saopštenja.....</b>	<b>130</b>
<b>9. BIOGRAFIJA.....</b>	<b>132</b>

## **LISTA SKRAĆENICA:**

ANN - *Artificial Neural Networks* (veštačke neuronske mreže)

GRAS - *Generally Recognized As Safe* (generalno se smatraju bezbednim)

MDR - *Multidrug Resistance* (višestruka rezistencija)

MLR - *Multiple Linear Regression* (multilinearna regresija)

NICE - *Nisin Controlled Gene Expression System* (nizinom kontrolisan sistem za gensku ekspresiju)

ORF - *Open Reading Frame* (otvoren okvir čitanja)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (lančana reakcija polimeraze)

PLS - *Partial Least Squares Regression* (analiza parcijalnih najmanjih kvadrata)

QSAR - *Quantitative Structure Activity Relationships* (kvantitativni odnosi strukture i dejstva)

RMSE - *Root Mean Square Error* (srednja kvadratna greška)

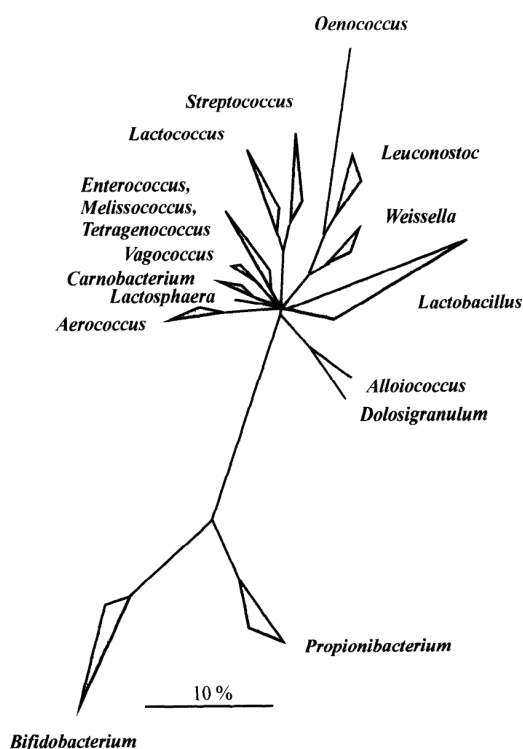
RMSEE - *Root Mean Squared Error of Estimation* (srednja kvadratna greška procene)

RMSEP - *Root Mean Squared Error of Prediction* (srednja kvadratna greška predviđanja)

TMS – *Transmembrane Segments* (transmembranski domeni)

## 1. UVOD

Bakterije mlečne kiseline (BMK) predstavljaju heterogenu grupu mikroorganizama objedinjenih zajedničkom osobinom da proizvode mlečnu kiselinu iz laktoze. One imaju važnu ulogu u industriji hrane i procesima fermentacije, a mlečna kiselina i drugi produkti metabolizma poboljšavaju ukus, aromu i teksturu finalnog proizvoda. Pored navedenog, snižavanjem pH vrednosti, usled sinteze mlečne kiseline, kao i produkcijom bakteriocina koje sintetišu neke BMK, zaustavlja se razvoj patogenih mikroorganizama, čime se produžava trajnost proizvoda. Rodovi koji se svrstavaju u BMK pripadaju redu *Lactobacillales* i uključuju: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* i *Streptococcus*, kao i rodove *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella*. Vrste roda *Bifidobacterium*, ranije označavane kao *Lactobacillus bifidus*, razdvojene su od bakterija mlečne kiseline na osnovu sadržaja guanina i citozina (55-67 mol%) i svrstane u „Actinomyces“ granu bakterija (Slika 1) (Schleifer and Ludvig, 1995).



**Slika 1.** Glavne filogenetske grupe bakterija mlečne kiseline i srodnih Gram-pozitivnih bakterija sa niskim (gornji deo) i visokim (donji deo) mol% G+C sadržajem u DNK (modifikacija prema Schleifer i Ludwig 1995).

### 1.1. Bakterije mlečne kiseline - Rod *Lactococcus*

Bakterije koje pripadaju rodu *Lactococcus* uglavnom se mogu izolovati sa biljnog materijala ili kože životinja, zbog čega se smatra da je njihovo prisustvo u mleku posledica kontaminacije u toku muže. Najčešće prisutne laktokoke u svežem mleku, siru i drugim mlečnim proizvodima su *L. lactis* subsp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris* koje dostižu brojnost ( $> 10^8$  CFU/g) već prvog dana proizvodnje i održavaju ga tokom zrenja različitih sireva (Corroler et al., 1999). *L. garvieae* i *L. raffinolactis* su takođe detektovani u svežem mleku, kao i na koži i u salivi krava (Perez Elortondo et al., 1999; Lopez-Diaz et al., 2002). *L. piscium* je izolovan iz lososa (Williams et al., 1990) i vakumirane smrznute govedine (Sakala et al., 2002), dok se *L. plantarum* uglavnom može naći u biljnom materijalu. Kod ljudi ili životinja, laktokoke su prisutne najčešće prolazno, jer nisu detektovane u značajnom broju u fekalnom materijalu ili zemljištu (Roissart and Luquet, 1994).

*L. lactis* subsp. *lactis* i u manjoj meri *L. lactis* subsp. *cremoris* imaju dugotrajnu primenu u prehrambenoj industriji kao starter kulture i mogu se koristiti pojedinačno ili u kombinaciji sa drugim bakterijama mlečne kiseline. Njihova glavna uloga u proizvodnji hrane je snižavanje pH sredine, uglavnom produkcijom L-mlečne kiseline. Takođe, one doprinose konzistenciji proizvoda produkcijom egzopolisaharida, kao i poboljšanju ukusa proizvodnjom aromatičnih jedinjenja (alkohola, ketona, aldehida) ili sintezom citrata metabolizmom aminokiselina (Smit et al., 2005). Mogu se koristiti i kao konzervansi u prehrambenim proizvodima, jer imaju sposobnost sinteze organskih kiselina i bakteriocina, od kojih je najviše korišćen i najbolje okarakterisan lantibiotik nizin (Delves-Broughton et al., 1996). Njihova uloga kao probiotika je takođe razmatrana (Ouwehand et al., 1999).

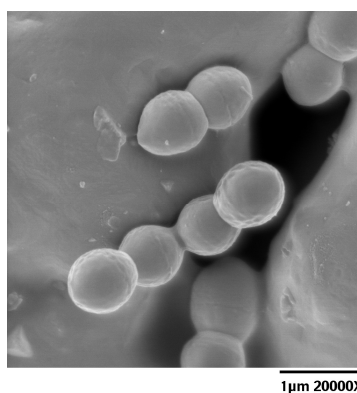
Pored velikog značaja u prehrambenoj industriji, pojedine bakterije mlečne kiseline predstavljaju dobre kandidate za razvoj živih oralnih vakcina. *Lactococcus lactis*, najviše izučavana BMK, ima veliku primenu u proizvodnji heterolognih proteina, uključujući neke antigene bakterijskog i virusnog porekla (Enouf et al., 2001; Bermúdez-Humarán and Langella, 2010). *L. lactis* je od posebnog značaja za sintezu funkcionalnih proteina koji se primenjuju oralno, jer predstavlja nekomensalnu bakteriju iz hrane, koja ne preživljava u digestivnom traktu ljudi i životinja (Drouault et al., 1999;

Geoffroy et al., 2000). Ranija istraživanja su pokazala da genetički modificirana bakterija uneta oralno, može stimulirati lokalni imunski odgovor i sprečiti digestivne poremećaje, čak i ako je antigen lokalizovan u citoplazmi (Wells et al., 1996). Pretpostavlja se, da nakon lize bakterijske ćelije u digestivnom traktu, dolazi do oslobađanja citoplazmatskog sadržaja, zbog čega intenzitet lize ćelija može biti od ključnog značaja za adekvatan imunski odgovor (Drouault et al., 1999).

Vrste roda *Lactococcus* su najčešće klasifikovane kao GRAS (engl. Generally Recognized As Safe) mikroorganizmi (Salminen et al., 1998). *L. lactis* se ne može smatrati oportunističkim patogenom, pošto su registrovana samo dva slučaja endokarditisa u periodu od preko pedeset godina (Wood et al., 1955; Mannion and Rothburn, 1990). *L. garvieae* je etiološki agens laktokokoze, oboljenja koje zahvata mnoge vrste riba u morskim i slatkovodnim sredinama i uzrokuje značajne ekonomske gubitke, posebno u proizvodnji pastrmke (Vendrell et al., 2006). Takođe se povezuje sa mastitisom kod krava (Teixeira et al., 1996). Humane infekcije uzrokovane *L. garvieae* su retke, s obzirom da je registrovano samo šest slučajeva endokarditisa i to kod starijih ili imunokompromitovanih pacijenata (Fihman et al., 2006).

### 1.1.1. Taksonomija i klasifikacija laktokoka

Predstavnici roda *Lactococcus* su Gram-pozitivne, katalaza negativne, asporogene, fakultativno anaerobne bakterije. Ćelije su okruglog oblika (koke) prečnika 0,5-1  $\mu\text{m}$ , a mogu biti pojedinačne, u parovima ili grupisane u lance (Slika 2).



**Slika 2.** Elektronska mikrofografija *Lactococcus lactis*, preuzeto: <http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/L-lactis04.jpg>.



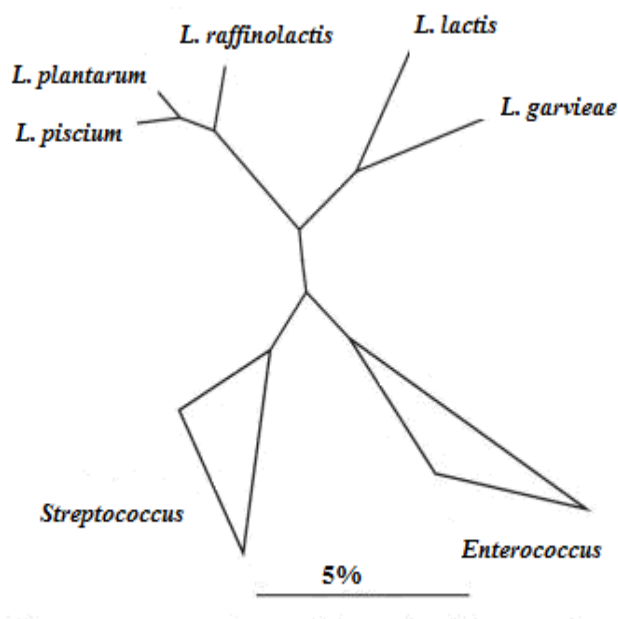
Sadržaj G+C u njihovom genomu je 34-43 mol% (Schleifer et al., 1985), dok im je veličina genoma između 2300 i 2600 kb (Le Bourgeois et al., 1992). Homofermentativni su mikroorganizmi, jer proizvode L(+)-mlečnu kiselinu, kao jedini produkt metabolizma glukoze.

Vrste roda *Lactococcus* pripadaju mezofilnim bakterijama i rastu na temperaturama u rasponu od 10°C do 40°C, ali ne rastu na 45°C po čemu se razlikuju od enterokoka (Elliott et al., 1991). Akerberg i saradnici (1998) pokazali su da *L. lactis* proizvodi najveću količinu mlečne kiseline iz glukoze pri temperaturi od 33,5°C. Pored toga, *L. lactis* subsp. *cremoris* je osetljiv na temperaturu od 40°C, po čemu se razlikuje od *L. lactis* subsp. *lactis*.

Optimalna pH vrednost za rast laktokoka je između 6,3 i 6,9, ali je donja granica u opsegu od 4,0 do 5,0, u zavisnosti od soja i sastava medijuma (Kashket, 1987; Hutkins and Nannen, 1993; Rallu et al., 1996). Kako je bitna karakteristika BMK produkcija mlečne kiseline i snižavanje pH vrednosti medijuma, od velikog značaja za primenu laktokoka u industriji je njihova otpornost na kiselu sredinu. Primarni mehanizam, kojim bakterije održavaju pH homeostazu zasniva se na izbacivanju protona iz citoplazme pomoću H<sup>+</sup>-ATP-aze (Kobayashi, 1985). Glutamat dekarboksilaza  $\gamma$ -aminobutirat antiporter, arginin deaminazni put i razgradnja citrata su dodatni procesi koji doprinose održavanju pH homeostaze kod *L. lactis* (Starrenburg and Hugenholtz, 1991; Sanders et al., 1998; Konings, 2002; Budin-Verneuil et al., 2004).

Laktokoke je prvi opisao Joseph Lister (1873), izolujući prvi put u istoriji čistu bakterijsku kulturu. Nova bakterija je označena kao „*Bacterium lactis*“, da bi kasnije bila preimenovana u *Streptococcus lactis* (Orla-Jensen, 1919). Tokom 1980-ih godina na osnovu sekvenciranja 16S rRNK izvršena je podela streptokoka na tri genetički različite grupe: *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* i *Lactococcus* (Slika 3) (Schleifer and Kilpper-Balz, 1984, 1987). Većina vrsta koje su pripadale N grupi streptokoka (Lancefield, 1933), prevedene su u novi rod *Lactococcus* i na taj način razdvojene od oralnih streptokoka, enterokoka i hemolitičnih streptokoka (Schleifer et al., 1985). Ovoidni oblik laktokoka, nekada je teško tumačiti, jer ćelije mogu biti izdužene i grupisane u lance (podsećajući na kokobacile), što je dovodilo do grešaka u klasifikaciji nekih laktokoka i laktobacila (Stiles and Holzappel, 1997). Studija koju su sproveli Schleifer i saradnici (1985) dovela je do revolucionarnih reklasifikacija

*Lactobacillus xylosus* u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *Lactobacillus hordniae* u *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*.



**Slika 3.** Filogenetičko stablo vrsta iz roda *Lactococcus* na osnovu 16S rRNK dendograma (Vos et al., 2009).

Prema sadašnjoj klasifikaciji rod *Lactococcus* obuhvata 5 vrsta od kojih su neke dosta neuobičajene: *L. garvieae*, koji je povezan sa nastankom oboljenja kod riba u morskim i slatkovodnim sredinama, *L. piscium* izolovan iz lososa, *L. plantarum* iz smrznutog graška, *L. raffinolactis* iz neobrađenog mleka i *L. lactis* koji je podeljen u tri podvrste *cremoris*, *lactis* i *hordniae* (Schleifer et al., 1985; Williams et al., 1990; [www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr)). Neki sojevi *L. lactis* subsp. *lactis* imaju sposobnost da razlažu citrat i sintetišu komponentu diacetil koja doprinosi ukusu fermentisanih proizvoda, zbog čega su označeni kao *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (Schleifer et al., 1985).

### 1.1.2. Značaj *L. lactis* vrsta

*L. lactis* podvrste su od velikog ekonomskog značaja i predstavljaju najviše komercijalno korišćene BMK, zbog čega su njihove biohemijske i fiziološke osobine

predmet stalnog izučavanja (Teuber et al., 1991). Mogu se izolovati iz različitih sredinskih izvora, ali se najčešće vezuju za biljni materijal (Sandine et al., 1972), dok su im mleko i mlečni proizvodi najprepoznatljivija staništa. Sojevi koji pokazuju genotip *lactis* podvrste, češće se mogu izolovati iz navedenih niša u odnosu na *cremoris* genotip (Klijn et al., 1995; Salama et al., 1995). Nekoliko studija pokazalo je da se sojevi izolovani sa biljnog materijala razlikuju od mlečnih izolata po nemogućnosti degradacije kazeina, visokom nivou produkcije antimikrobnih supstanci i slabijoj aktivnosti zakišeljavanja (Smit et al., 2005).

Fenotipovi *L. lactis* subsp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris* međusobno se razlikuju po tome što podvrsta *lactis* proizvodi amonijak iz arginina, raste na 40°C i 4% NaCl (Schleifer et al., 1985; Rademaker et al., 2007). Biovar *diacetylactis* ima dodatnu sposobnost da razlaže citrat, a kako je ova osobina nestabilna, jer je kodirana genima lociranim na plazmidu, klasifikovane su kao varijetet podvrste *L. lactis* subsp. *lactis*. Međutim, iako postoje brojne metode za razdvajanje genotipa *lactis* i *cremoris*, genotip i fenotip nisu uvek u korelaciji, što je dovelo do brojnih poteškoća u taksonomiji ovih vrsta (Tailliez et al., 1998). Usled toga, potrebno je definisati genotip (*cremoris* ili *lactis*), kao i fenotip (*cremoris*, *lactis* ili *diacetylactis*) da bi se adekvatno opisao svaki pojedinačni soj (Kelly et al., 2010).

*L. lactis* subsp. *lactis* i u manjoj meri *L. lactis* subsp. *cremoris* imaju dugotrajnu primenu u prehrambenoj industriji kao starter kulture i mogu se koristiti pojedinačno ili u kombinaciji sa drugim bakterijama mlečne kiseline. *L. lactis* subsp. *lactis* se više koristi u proizvodnji mekih sireva, dok se *L. lactis* subsp. *cremoris* koristi za dobijanje tvrdih sireva (Bolotin et al., 2001). Sojevi *L. lactis* subsp. *cremoris* imaju veliku primenu u proizvodnji „Cheddar“ sira, kao deo tačno definisanih starter kultura, jer ne uzrokuju nastanak gorkog ukusa (Heap, 1998). Biovarijetet *diacetylactis* razgradnjom citrata doprinosi ukusu i aromi niza fermentisanih mlečnih proizvoda, zbog čega je takođe česta komponenta starter mešavina u industriji mleka (Heap and Lawrence, 1984).

Zbog svog industrijskog značaja, *L. lactis* je najviše izučavan u okviru bakterija mlečne kiseline i postao je model organizam za ovu grupu, iako je većina istraživanja izvedena na malom broju laboratorijskih sojeva poreklom iz mleka. Objavljene su kompletne genomske sekvence četiri soja. Među njima su dva soja bez plazmida

(IL1403 i MG1363) na kojima se baziraju detaljna biohemijska i genetička izučavanja *L. lactis* vrste (Bolotin et al., 2001; Wegmann et al., 2007). Treći sekvencirani soj (SK11) koristi se kao starter kultura u proizvodnji sireva i poseduje *cremoris* i genotip i fenotip (Makarova et al., 2006). Četvrta sekvenca pripada *L. lactis* subsp. *lactis* soju biljnog porekla (KF147), a takođe je dostupan deo sekvence za drugi biljni izolat (KF282) (Siezen et al., 2008, 2010). Poređenjem genoma biljnih i mlečnih izolata, naglašene su razlike u sadržaju gena koje se mogu javiti između pojedinih sojeva u okviru iste vrste (Siezen et al., 2008) i pokazano da sekvenciranje jednog reprezentativnog genoma, ne daje kompletnu sliku genetičkog repertoara vrste.

Pored primene u prehrambenoj industriji, *L. lactis* ima veliki biotehnološki i medicinski značaj u proizvodnji heterolognih proteina (enzima i antigena), a takođe ima potencijal da se primenjuje i kao živa vakcina (Langella and Le Loir, 1999). Postoji nekoliko inducibilnih i konstitutivnih ekspresionih sistema dostupnih za *L. lactis* (Holmgren and Czerkinsky, 2005; Wells and Mercenier, 2008; Bermudez-Humaran and Langella 2010). Jedan od najčešće korišćenih ekspresionih sistema je NICE sistem (engl. NIsin Controlled gene Expression system) čija je glavna komponenta nizinski inducibilni promotor ( $P_{nisA}$ ) (de Ruyter et al., 1996b).

## **1.2. NICE sistem (engl. NIsin Controlled gene Expression system)**

Pored tradicionalne primene u prehrambenoj industriji, sojevi *L. lactis* se sve više koriste u biotehnološkim procesima. Zbog dostupnosti sekvence i lakoće rukovanja, sojevi *L. lactis* vrste su našli primenu u ekspresiji heterolognih gena. Dostupni su različiti, fino regulisani sistemi za gensku ekspresiju kod Gram-pozitivnih bakterija. Jedan od najboljih i najviše korišćenih je NICE sistem u kojem nizin služi kao inducibilni molekul (de Ruyter et al, 1996b).

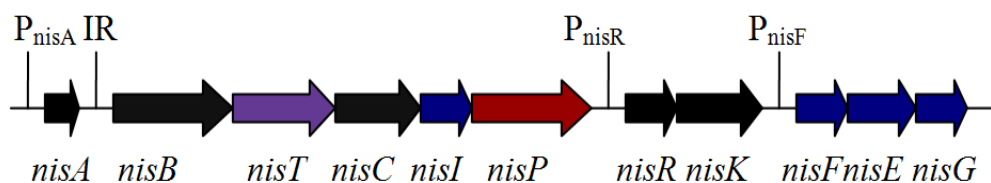
### **1.2.1. Komponente i funkcionisanje NICE sistema**

Efikasan NICE sistem sastoji se od tri osnovna elementa: (1) Gram-pozitivnog soja koji eksprimira *nisRK* gene u dovoljnoj količini; (2) nizina, kao inducibilniog molekula i (3) plazmida koji sadrži promotorski region *nisA* ili *nisF* gena, praćen

odgovarajućim restrikcionim mestima za kloniranje ciljnog gena (de Ruyter et al., 1996b).

**Nizin i regulacija biosinteze nizina.** Nizin je antimikrobni peptid koji se sastoji od 34 aminokiseline i proizvode ga neki sojevi vrste *L. lactis*. Pripada klasi I bakteriocina (poznatih pod nazivom – lantibiotici) i usled širokog spektra dejstva, ima veliku primenu u prehrambenoj industriji kao prirodni konzervans (Dodd and Gasson, 1994; van Kraaij et al., 1999). Lantibiotici su mali (<5 kDa) baktericidni peptidi, za koje je karakteristično prisustvo neuobičajenih aminokiselina lantionina,  $\beta$ -metil-lantionina i brojnih dehidratisanih aminokiselina (Jack et al., 1995; Nes et al., 1996). Nizin je mali (3353 Da), katjonski, hidrofobni peptid koji poseduje jedan lantioninski i četiri  $\beta$ -metil-lantioninska prstena i neuobičajene ostatke poput dehidroalanina i dehidrobutirina (de Vos et al., 1995; Kuipers et al., 1995). Postoje dve prirodne varijante nizina, nizin A i nizin Z, koje se razlikuju samo po aminokiselini na poziciji 27 (histidin kod nizina A i asparagin kod nizina Z) (Mulders et al., 1991).

Nizin se inicijalno sintetisuje na ribozomima kao prekursor, a potom podleže enzimskim modifikacijama, nakon čega se transportuje kroz citoplazmatičnu membranu kao zreo molekul (Kleerebezem et al., 1997b). Biosinteza nizina je kodirana klasterom od 11 gena (Slika 4), od kojih je prvi gen *nisA(Z)* odgovoran za sintezu prekursora nizina. Ostali geni uključeni u sintezu proteina imaju ulogu u posttranslacionoj modifikaciji, translokaciji i obradi nizina (*nisB*, *nisC*, *nisP* i *nisT*), imunosti na nizin (*nisI*, *nisF*, *nisE* i *nisG*) i u regulaciji ekspresije nizinskih gena (*nisR* i *nisK*) (Kuipers et al., 1995; Kleerebezem et al., 1999). Genski klaster sadrži tri promotora,  $P_{nisA}$ ,  $P_{nisF}$  i  $P_{nisR}$ , od kojih  $P_{nisR}$  pokreće ekspresiju *nisR* i *nisK* gena, dok  $P_{nisA}$  i  $P_{nisF}$  promotori učestvuju u nizinom posredovanoj autoregulaciji.



**Slika 4.** Nizinski genski klaster. P-promotor, IR-interval region,  $P_{nisA}$  i  $P_{nisF}$  mogu se indukovati nizinom.

Tokom ovog autoregulatornog procesa, nizin indukuje transkripciju genskog klastera za biosintezu nizina posredstvom dvokomponentnog regulatornog sistema, koji uključuje histidin protein kinazu NisK i regulatorni protein NisR (Engelke et al., 1994; Kuipers et al., 1995). Kada se nizin veže za ekstracelularni domen NisK, NisK se autofosforiliše i dalje prenosi fosfatnu grupu na intracelularni regulatorni protein NisR, koji potom deluje kao transkripcioni aktivator NisA/NisF i indukuje ekspresiju gena (Kuipers et al., 1993).

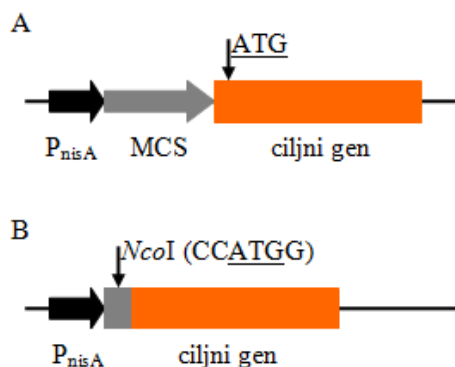
**Ćelija domaćin.** Kao ćelije domaćini u okviru NICE sistema, najčešće se koriste derivati *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363, soj NZ9700 (Kuipers et al., 1993, 1998) koji se često koristi kao izvor nizina za indukciju u NICE sistemu i soj NZ9800 koji je derivat NZ9700 i u kome su deletirana četiri nukleotida *nisA* gena (Kuipers et al., 1993), zbog čega ovaj soj ne produkuje nizin. Transkripcija nizinskog operona u ovom soju može biti reaktivirana dodatkom subinhibitornih količina nizina u medijum u toku logaritamske faze rasta (Kuipers et al., 1995). Ovo je jedan od prvih sojeva korišćenih u NICE sistemu, jer obezbeđuje potrebne regulatorne gene (*nisK* i *nisR*) i imunost na nizin. Danas, jedan od najčešće korišćenih sojeva za gensku ekspresiju indukovanu nizinom je NZ9000, dobijen ugradnjom *nisK* i *nisR* gena u *pepN* gen soja MG1363 (Kuipers et al., 1998).

Osim kod *L. lactis*, NICE sistem se može primeniti i kod nekih drugih Gram-pozitivnih bakterija sa niskim GC-sadržajem poput: *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* i *Bacillus subtilis* (Kleerebezem et al., 1997a; Pavan et al., 2000).

**Plazmidni vektor.** Plazmid za ekspresiju gena indukovanu nizinom mora da sadrži  $P_{nisA}$  ili  $P_{nisF}$  promotorski region koji omogućava nizinsku indukciju. Postoji veliki broj dostupnih plazmida (Kuipers et al., 1998), a najčešće korišćeni plazmidi zasnivaju se na pSH71 replikonu koji nosi genetičku determinantu rezistencije na hloramfenikol i može da replikuje u različitim Gram-pozitivnim bakterijama kao i u vrsti *Escherichia coli* (de Ruyter et al., 1996b; Eichenbaum et al., 1998).

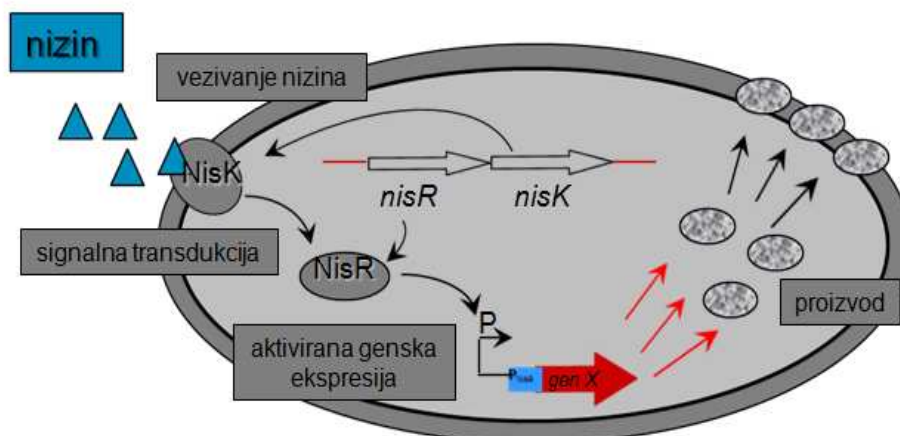
Konstruisana su dva tipa vektora: (1) transkripcioni fuzioni vektor korišćenjem *gusA* ( $\beta$ -glukuronidaza) gena kao reporterskog gena (npr. pNZ8020) i (2)  $P_{nisA}$  translacioni fuzioni vektor (npr. pNZ8048) (de Ruyter et al., 1996b). Translacioni

fuzioni vektor sadrži  $P_{nisA}$  promotorski region, mesto za kloniranje neposredno nizvodno, a ciljni gen poseduje sopstveni start kodon ili *NcoI* restrikciono mesto (CCATGG) koje sadrži start kodon ATG uneto nizvodno od promotorskog regiona (Slika 5) (Zhou et al., 2006).



**Slika 5.** Vektori za ekspresiju ciljnog gena: (A) ciljni gen poseduje sopstveni start kodon; (B) start kodon u okviru *NcoI* restrikcionog mesta.  $P_{nisA}$ : inducibilni promotor za *nisA*; MCS: mesto za kloniranje; *NcoI*: restrikciono mesto za inserciju ciljnog gena.

**Funkcionisanje NICE sistema.** Funkcionisanje NICE sistema, zasniva se na mehanizmu auto-regulacije nizinske genske ekspresije. Geni dvokomponentnog signalnog sistema *nisK* i *nisR* izolovani su iz nizinskog genskog klastera i ugrađeni u hromozom *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (nizin-negativan) i dobijen je soj NZ9000 (Kuipers et al., 1998). Dodavanjem subinhibitorne koncentracije nizina (0,01-10 ng/ml) u medijum u toku logaritamske faze rasta ćelija, dolazi do vezivanja nizina za receptor NisK, koji fosforilacijom aktivira NisR. Aktivirani NisR indukuje  $P_{nisA}$  promotor na plazmidu (npr. pNZ8113) iza koga se nalazi ciljni gen, a sintetisani produkt se može zadržati u citoplazmi, membrani ili se osloboditi u okolni medijum (Slika 6) (Mierau and Kleerebezem, 2005).



**Slika 6.** Princip rada NICE sistema.

### 1.2.2. Primena NICE sistema

NICE sistem se pokazao kao veoma praktičan i našao je primenu u oblasti farmacije, medicine i prehrambene industrije (Le Loir et al., 2001).

**Ekspresija prokariotskih i eukariotskih membranskih proteina.** Osobine koje NICE sistem u *L. lactis* čine pogodnim za ekspresiju i prečišćavanje proteina su:

- a) brz rast laktokoka koji ne zahteva aeraciju;
- b) zadovoljavajuća efikasnost transformacije i stabilnost konstruisanih vektora za genetičke manipulacije;
- c) dostupni su fino regulisani promotorski sistemi, koji omogućavaju ekspresiju toksičnih genskih produkata;
- d) nivo ekspresije membranskih proteina je reproducibilan;
- e) eksprimirani membranski proteini su vezani isključivo za citoplazmatičnu membranu i do sada nije opisano prisustvo inkluzonih tela;
- f) laktokoke imaju slabu proteolitičku aktivnost;
- g) poseduju jednu (citoplazmatičnu) membranu, što omogućava direktnu primenu jonofora, liganada i metaboličkih inhibitora za proučavanje aktivnosti proteina u intaktnoj ćeliji;



h) membranski proteini se lako ekstrahuju iz membrane u širokom spektru blagih deterdženata (Kunji et al., 2003).

Pored toga,  $P_{nisA}$  promotor je izuzetno fino regulisan i nivo ekspresije može biti kontrolisan količinom dodatog nizona.

Mnogi prokariotski i eukariotski membranski proteini su eksprimirani korišćenjem NICE sistema, uključujući ABC transportere, ABC efluks pumpe, MFS transportere i humani KDEL receptor i transporter (Kunji et al., 2003). Nivo ekspresije ovih proteina se značajno razlikuje i najčešće je u opsegu 1-10% od ukupnih membranskih proteina, ali su uvek dobijeni u funkcionalnoj formi i u dovoljnim količinama za biohemijske i biofizičke analize (Zhou et al., 2006).

**Ekspresija homolognih i heterolognih gena.** NICE sistem je korišćen za ekspresiju gena različitog porekla (iz Gram-pozitivnih, Gram-negativnih i eukariotskih ćelija) u cilju proučavanja metaboličke i enzimske funkcije, kao i za proizvodnju većih količina nekih enzima koji se primenjuju u medicini, tehnologiji ili prehrambenoj industriji. Na primeru homolognog *pepN* gena kod *L. lactis* pokazano je da je moguća produkcija proteina i do 50% od ukupnih ćelijskih proteina bez formiranja inkluzionih tela (de Ruyter et al., 1996b). Beta-glukuronidazni gen je u Gram-negativnoj bakteriji *E. coli* eksprimiran u količini i do 20% od ukupnih ćelijskih proteina (de Ruyter et al., 1996a). Pored toga, NICE sistem je korišćen i za izučavanje genetike i biologije patogenih bakterija (Waters et al., 2004; Rigoulay et al., 2004).

**Kloniranje i ekspresija toksičnih gena.** Ekspresija gena u NICE sistemu je striktno regulisana, bez vidljive ekspresije u neindukovanom stanju, što omogućava sintezu letalnih proteina. U tom smislu, veliki potencijal primene je u razvoju autolitičkih starter kultura da bi se ubrzalo zrenje sira. Liza ćelija starter kultura u toku fermentacije i procesa zrenja, igra važnu ulogu u kasnijem razvoju ukusa sira. Kontrola nivoa autolize je od velikog značaja, jer zrenje sira prirodnim putem može biti spor i skup proces. Proizvodnja litičkih proteina i eksterno stimulisani inducibilni sistem za lizu ćelije, predstavljaju atraktivan pristup za preciznu kontrolu lize ćelija starter kulture u toku zrenja sira (Hickey et al., 2004). De Ruyter i saradnici (1996b) primenili su NICE sistem za ekspresiju holina i lizina poreklom iz faga  $\Phi$ US3 u *L. lactis*.

**Ekspresija bakteriocina.** Sa povećanjem svesti o štetnosti patogena i hemijskih konzervansa poreklom iz hrane, bakteriocini dobijaju sve veći značaj kao prirodni

antimikrobni agensi koji produžavaju trajnost namirnica. Razvoj NICE sistema omogućio je povećanu ekspresiju bakteriocina i prenos gena za biosintezu bakteriocina u druge vrste (Horn et al., 1998). Na primer, pediocin PA-1 je pripada klasi II bakteriocina koji proizvodi *Pediococcus acidilactici* i pokazuje snažnu antimikrobnu aktivnost prema vrstama roda *Listeria*, često prisutnim u hrani. Zbog toga je ekspresija pediocina PA-1 u soju poreklom iz mleka od velikog značaja (Rodriguez et al., 2002). Horn i saradnici (2004) eksprimirali su aktivan PA-1 u *L. lactis* pod kontrolom P<sub>nisA</sub> promotora.

### 1.3. Rezistencija na antibiotike

Od uvođenja antibiotika, najveću pretnju za primenu antimikrobnih agenasa predstavlja razvoj rezistentnih patogenih bakterija. Poseban problem je u nepravilnoj primeni antibiotika kao i u mogućnosti bakterija da vrše horizontalnu razmenu gena odgovornih za rezistenciju. Iako se *L. lactis* smatra nepatogenim mikroorganizmom, usled duge istorije bezbedne primene u industriji hrane, novije hipoteze o rezervoarima rezistencije ukazuju da korisne i komensalne bakterijske populacije u hrani i gastrointestinalnom traktu (GIT) ljudi i životinja mogu imati ulogu u horizontalnom transferu genetičkih determinanti rezistencije na antibiotike (Salysers et al., 2004). Potvrđeno je da je transfer gena široko rasprostranjen u *in vivo* uslovima između bakterija gastrointestinalnog trakta, kao i između bakterija gastrointestinalnog trakta i patogena, jer su identični geni za rezistenciju pronađeni u različitim bakterijskim vrstama (Scott, 2002). Zapravo, suočavamo se sa mogućnošću da će većina patogenih bakterija štetnih po ljudsko zdravlje postati rezistentna na postojeće antibiotike.

Lanac ishrane se smatra jednim od glavnih puteva transmisije rezistencije bakterija na antibiotike u okviru životinjskih i populacija ljudi (Witte, 1997). Odnosno, fermentisani mlečni proizvodi i meso, koji se pre upotrebe ne obrađuju termički, predstavljaju direktnu vezu između animalne mikroflore i bakterija gastrointestinalnog trakta ljudi čoveka. 1998. godine pokrenut je ROAR (engl. Reservoirs Of Antibiotic Resistance) projekat (<http://www.apua.org>) u cilju unapređenja studija o selekciji i širenju nepatogenih bakterija koje pokazuju rezistenciju na antibiotike među ljudima i u prirodnom okruženju. Iako većina bakterija mlečne kiseline poseduje GRAS status,

potencijalni rizik po zdravlje, usled transfera gena za determinante rezistencije na antibiotike sa BMK sojeva na bakterije koje su deo GIT-a, a time i na patogene, ipak postoji.

Fermentisani mlečni proizvodi sadrže starter kulture i ove bakterije dospevaju u gastrointestinalni trakt ljudi gde interaguju sa crevnom florom (Mathur and Singh, 2005). Usled toga, izučavanje prisustva gena za rezistenciju kod sojeva koji se koriste kao starter kulture, kao i potencijalnog transfera ovih gena na patogene su od velikog značaja.

Laktokoke se generalno smatraju nepatogenim mikroorganizmima, ali su evidentirani pojedini slučajevi nastanka infekcije. *L. garvieae* može dovesti do pojave mastitisa kod krava, infekcija kod riba kao i do nastanka humanih infekcija poput septikemije, osteomijelitisa i endokarditisa kod imunokompromitovanih pacijenata (James et al., 2000; Mofredj et al., 2000). U takvim slučajevima, uspešna terapija antibioticima je neophodna. Kako antibiotici imaju veliku primenu i u veterini, npr. u prevenciji i terapiji mastitisa kod krava, može doći do sticanja rezistencije kod vrsta roda *Lactococcus* pod dejstvom selektivnog pritiska. Walther i saradnici (2008) testirali su osetljivost na antibiotike predstavnika vrsta roda *Lactococcus* (*L. lactis* i *L. garvieae*) izolovanih iz kravljeg mleka i detektovali rezistenciju na tetracikline, klindamicin, eritromicin, streptomycin i nitrofurantoin. Tetraciklin rezistentni sojevi *L. garvieae* i *L. lactis* posedovali su *tet(M)* i *tet(S)* gene. *L. lactis* sojevi rezistentni na klindamicin pokazivali su i rezistenciju na eritromicin i posedovali su *erm(B)* gen. Rezistentni sojevi laktokoka izolovani su i iz sira (Florez et al., 2008). Jedan od tih sojeva *L. lactis* K214 nosi plazmid pK214 na kome se nalazi gen za rezistenciju na tetraciklin *tet(S)*, zatim gen za hloramfenikol acetiltransferazu *cat<sub>pC223</sub>*, gen za streptomycin adenil transferazu *str* i gen za MDR (engl. multidrug resistance) transporter *mdt(A)* (Perreten et al., 1997). Za Mdt(A) protein pokazano je da doprinosi rezistenciji na makrolide, linkozamide, streptogramine i tetracikline kod *L. lactis* (Perreten et al., 2001). Drugi MDR transporteri opisani kod *L. lactis* su LmrA, LmrP i LmrCD.

### 1.3.1. MDR transporteri

Otkriće i primena antibiotika, predstavljaju jedan od najznačajnijih koraka u kontroli infektivnih bolesti u dvadesetom veku. Međutim, pojava i širenje rezistencije na antibiotike kod patogenih bakterija učinilo je mnoge dostupne antimikrobne agense neaktivnim. Rezistencija ovih mikroorganizama nije bila ograničena samo na određeni lek ili njegove analoge, već i na strukturno i funkcionalno različita jedinjenja i ovaj fenomen je nazvan višestruka rezistencija (engl. multidrug resistance - MDR). Bakterije su razvile različite mehanizme da bi izbegle toksične efekte antibiotika i drugih agenasa, a kratak pregled dat je u nastavku.

(1) **Inaktivacija** antibiotika je jedan od glavnih mehanizama rezistencije na  $\beta$ -laktamske antibiotike. Mnoge Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije proizvode ovakve enzime i identifikovano je više od 200 različitih  $\beta$ -laktamaza. Na primer, inaktivacija penicilina posredovana je penicilinzama koje katalizuju hidrolizu  $\beta$ -laktamskog prstena (Rasmussen and Bush, 1997). Drugi poznati enzimi koji dovode do inaktivacije leka su hloramfenikol transferaze, kao i enzimi koji vrše fosforilaciju, adenilaciju ili acetilovanje aminoglikozidnih antibiotika (Shaw et al., 1993).

(2) Drugi značajan mehanizam rezistencije je **izmena ciljnog mesta** delovanja antibiotika, mutacijom ili enzimskom modifikacijom, usled čega se antibiotik ne može adekvatno vezati i ispoljiti svoje toksično dejstvo (Spratt, 1994). Rezistencija na peniciline, može biti posledica mutacije u penicilin vezujućem proteinima (PBP) koji imaju važnu ulogu u sintezi peptidoglikana (Spratt, 1994).

(3) Pored toga, **slabo propustljiva spoljašnja membrana** Gram-negativnih bakterija ograničava difuziju različitih toksičnih agenasa u ćeliju (Nikaido, 1994). Gram-pozitivne bakterije su obavijene debelim slojem peptidoglikana koji je manje efikasan kao barijera u poređenju sa spoljašnjom membranom Gram-negativnih bakterija. To je i jedan od razloga što su Gram-pozitivne bakterije osetljivije na dejstvo različitih toksičnih agenasa (Vaara, 1992). Propustljivost spoljašnje membrane može dodatno biti smanjena gubitkom porina (Medeiros et al., 1987). Međutim, ove barijere ne mogu sprečiti agens da ispolji svoj toksični efekat kada jednom uđe u ćeliju.

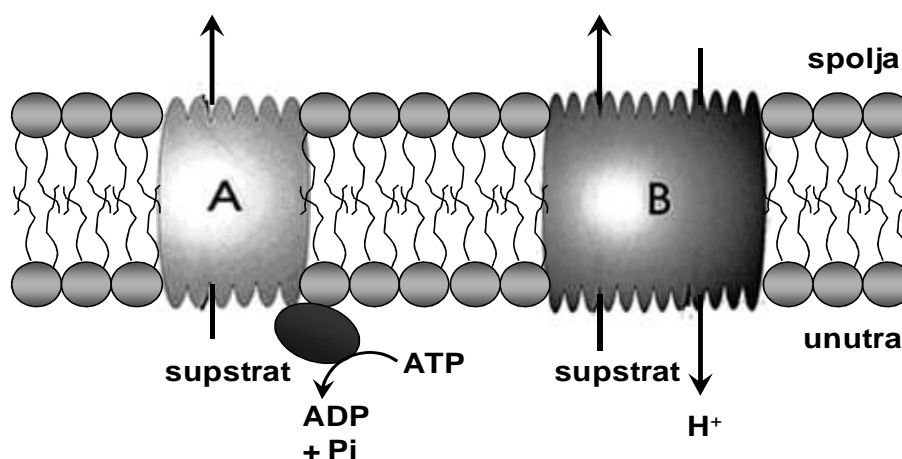
(4) **Aktivni efluks supstrata** je jedan od esencijalnih mehanizama kojim se obezbeđuje značajan nivo rezistencije (Levy, 1992). Efluksne pumpe su membranski

proteini koji izbacuju antibiotike i druge toksične agense iz ćelije i tako smanjuju njihovu intracelularnu koncentraciju. Neki transporteri, poput tetraciklinskih efluks proteina, specifični su za tačno određeni lek ili grupu (engl. specific drug transporters-SDR). Nasuprot njima, postoje transporteri koji prepoznaju supstrate različitih hemijskih struktura (engl. multidrug resistance transporters-MDR) (Lewis et al., 1997).

Mnogi antikancerogeni lekovi, poput vinka alkaloida (vinkristin, vinblastin), antraciklina (daunorubicin, doksorubicin) i citotoksičnih jedinjenja kao što su kolhicin, rodamin i etidijum bromid (EtBr) se izbacuju iz različitih tipova ćelija (Bradley et al., 1988). Aktivni efluks supstrata kao mehanizam rezistencije prvi put je opisan kod MDR tumorskih ćelija (Danø, 1973).

Kod bakterija, rezistencija na antibiotike uzrokovana izbacivanjem leka prvi put je otkrivena kod sojeva *E. coli* otpornih na tetraciklin (McMurry et al., 1980). Zatim, nekoliko rezistentnih sojeva bakterija je izolovano selekcijom rasta na pojedinačnim toksičnim agensima (poput tetrafenilfosfonijuma ( $\text{TPP}^+$ ), etidijum bromida, rodamina 6G), koji su pokazivali ukrštenu rezistenciju na brojne strukturno različite agense, zbog čega su označeni kao MDR mutanti (Midgley, 1986; Bolhuis et al., 1994).

Na osnovu bioenergetskih i strukturnih kriterijuma, do sada poznati eukariotski i prokariotski transporteri su podeljeni u dve grupe (Slika 7):



**Slika 7.** Šematski prikaz dve glavne klase MDR transportera. (A) ABC-tip transportera koristi energiju dobijenu hidrolizom adenozin trifosfata (ATP) za izbacivanje supstrata izvan ćelije. (B) Sekundarni MDR transporter posreduje u izbacivanju strukturno različitih supstrata u zamenu za pozitivno naelektrisan jon.

(1) primarni transporteri, koji dobijaju energiju hidrolizom ATP-a (engl. ATP-Binding Cassette-**ABC**) (Putman et al., 2000) i

(2) sekundarni transporteri kod kojih je transport supstrata povezan sa razmenom protona (engl. Proton Motive Force - **PMF**/ Sodium Motive Force - **SMF**) (Marger and Saier, 1993; Lewis, 1994).

### ***1.3.1.1. Primarni, ATP-zavisni transporteri***

ABC transporteri su integralni membranski proteini koji aktivno transportuju hemijski različite supstrate kroz lipidni dvosloj ćelijske membrane (Holland et al., 2003). Klinički značajni predstavnici ABC transportera kod ljudi su P-glikoprotein i ABCC1 protein koji doprinose rezistenciji kancerogenih ćelija katalizujući izbacivanje citotoksičnih jedinjenja koja se primenjuju u terapiji kancera (Gottesman and Ambudkar, 2001). U bakterijama, ABC efluks proteini izbacuju različite supstrate, uključujući i antibiotike, dok importeri omogućavaju preuzimanje esencijalnih hranljivih materija. Prvi okarakterisan bakterijski ABC efluks transporter je LmrA kod *L. lactis* (Bolhuis et al., 1994), za koji je pokazano da može biti funkcionalna zamena za P-glikoprotein kada se eksprimira u fibroblastima pluća (van Veen et al., 1998).

Tipičan ABC transporter sastoji se iz četiri domena: dva transmembranska (TMD), koji omogućavaju transport supstrata kroz membranu i dva citoplazmatična NBD (engl. Nucleotide-Binding Domains-NBD) domena, koja obezbeđuju energiju za transport supstrata hidrolizom ATP-a (Hyde et al., 1990). Strukturna organizacija ovih domena može biti u obliku pojedinačnog proteina, homo- ili heterodimera ili multikomponentnog sistema (Higgins and Gottesman, 1992).

TMD domeni se najčešće sastoje od šest transmembranskih  $\alpha$ -heliksa. Ovakva organizacija je potvrđena u kristalnoj strukturi MDR transportera iz *Staphylococcus aureus* Sav1866 (Dawson and Locher, 2006). Međutim, neki ABC transporteri odstupaju od uobičajene 6 + 6 organizacije, poput BtuCD subjedinica sistema za preuzimanje vitamina B<sub>12</sub>, koje poseduju po 10 transmembranskih  $\alpha$ -heliksa (Locher et al., 2002). Pokazano je da ne moraju svi  $\alpha$ -heliksi da učestvuju u osnovnoj funkciji transporta kroz membranu, već mogu imati ulogu u regulaciji ili ubacivanju supstrata kroz membranu (Higgins, 2001). Transmembranski domeni formiraju prolaz za

supstrate i odgovorni su za specifičnost transportera posedovanjem mesta za vezivanje supstrata. Nivo identičnosti sekvence između TMD različitih ABC transportera je dosta nizak, čime se objašnjava velika razlika u supstratima koje prepoznaju (Lubelski et al., 2007).

Zbog mesta za vezivanje nukleotida, NBD predstavlja najveći konzervisani domen ABC transportera. On deluje kao pokretački deo, koji vezuje i hidrolizuje ATP u cilju obezbeđivanja konformacionih promena u TMD, koje potom omogućavaju transport supstrata kroz membranu (Lubelski et al., 2007). NBD domen sadrži visoko konzervisane aminokiselinske sekvence, Walker A i B motive za vezivanje nukleotida. Fosfat vezujuća petlja (P-petlja) ili Walker A motiv (G-X-S/T-G-X-G-K-S/T-S/T) je bogat glicinom i praćen jednim  $\alpha$ -heliksom. Ostali delovi u okviru ove strukture interaguju sa fosfatnim grupama i magnezijumovim jonom vezanog  $Mg^{2+}$ -nukleotidnog kompleksa (Smith and Rayment, 1996). Walker B motiv je označen kao h-h-h-h-D, gde je „h“ hidrofobni ostatak. Mutagenezom gena za ABC transporter dobijeno je da su lizin (unutar Walker A domena) i aspartat (u okviru Walker B domena) esencijalni za hidrolizu ATP-a i zamena ovih aminokiselina dovodi do smanjene hidrolize (Schneider and Hunke, 1998).

Pored toga, ABC transporteri sadrže veliki broj jedinstvenih motiva, poput C petlje (L-S-G-G-Q), koja je dijagnostički motiv za celu superfamiliju.

Kod bakterija, ABC transporteri mogu imati mnogobrojne uloge. Oni nose različite supstrate, poput ugljenih hidrata (Schneider, 2001), aminokiselina (Hosie and Poole, 2001), peptida (Detmers et al., 2001), poliamina (Igarashi et al., 2001), jona (Claverys, 2001), sulfata (Kertesz, 2001), gvožđa (Koster, 2001) i molibdata (Self et al., 2001). ABC transporteri su takođe odgovorni za ciljni eksport nekih drugih supstrata kroz citoplazmatičnu membranu kao što je kapsularni polisaharid Gram-negativnih bakterija (Silver et al., 2001). Neki eksporteri učestvuju u sekreciji antibiotika kod rezistentnih bakterija ili omogućavaju oslobađanje ekstracelularnih toksina (Garmory and Titball, 2004).

Može se pretpostaviti da bakterijske vrste koje žive u promenljivom okruženju moraju da se prilagode različitim uslovima, zbog čega zahtevaju prisustvo brojnih ABC sistema. Pokazano je da je broj ABC transportera značajno veći kod ekstracelularnih bakterija i bakterija iz prirodne sredine u poređenju sa intracelularnim bakterijama.

Činjenica da bakterijski genom jedne vrste kodira različit broj ABC transportera, ukazuje da su ABC transporteri neophodni za rast i/ili preživljavanje bakterija u ekološkim nišama (Garmory and Titball, 2004).

### 1.3.1.2. Sekundarni transporteri

Većina bakterijskih MDR transportera poznatih do danas je osjetljiva na agense koji remete elektrohemijski protonski gradijent, ukazujući da ovi transporteri posreduju u izbacivanju toksičnih jedinjenja iz ćelije u zamenu za jedan ili više protona. Prema veličini i sličnosti u primarnoj i sekundarnoj strukturi, mogu biti podjeljeni na nekoliko različitih familija transportnih proteina: MFS (engl. Major Facilitator Superfamily), SMR (engl. Small Multidrug Resistance family), RND (engl. Resistance-Nodulation-cell Division) i MATE (eng. Multidrug And Toxic Compound Extrusion Family) (Tabela 1).

**I MFS superfamilija.** MFS familiju čine membranski transportni proteini prisutni u bakterijama i višim eukariotskim organizmima koji učestvuju u transportu različitih supstrata pomoću uniport, simport ili antiport mehanizama. Marger i Saier (1993) su identifikovali pet različitih familija membranskih transportnih proteina u okviru MFS superfamilije uključenih u (1) rezistenciju na supstrate, (2) preuzimanje šećera, (3) preuzimanje intermedijera Krebsovog ciklusa, (4) fosfatni estar/fosfat antiport i (5) preuzimanje oligosaharida.

Eksperimentalne analize (Calamia and Manoil, 1990; Hresko et al., 1994) proteina iz familija 2 i 5, pokazale su da oni dele zajedničku strukturu, koja uključuje 12 transmembranskih segmenata (TMS). Nasuprot tome, filogenetske analize ukazale su na mogućnost da proteini 1. familije, koji posreduju u rezistenciji na toksične agense, mogu biti podjeljeni u dve različite familije sa 12 i 14 TMS (Paulsen and Skurray, 1993). Ova hipoteza potvrđena je eksperimentalno opisivanjem karakterističnih predstavnika za svaku od dve familije. Usled toga, došlo je do promena u klasifikaciji i zaključeno je da se MFS superfamilija sastoji iz najmanje šest različitih familija.

**12-TMS familija.** NorA protein kod *S. aureus* je prvi put detektovan kod kliničkih izolata rezistentnih na hinolone i meticilin (Ubukata et al., 1989). Sekvenciranje i karakterizacija *norA* gena pokazali su da je NorA membranski protein



veliĉine 388 aminokiselina koji dovodi do rezistencije na hidrofilne supstrate, a vrlo slabo ili nikako na hidrofobne lekove (Yamada et al., 1997).

Strukturni i funkcionalni homolog NorA detektovan je kod soja *Bacillus subtilis* selektovanog na povećanim koncentracijama rodamina 6G i nazvan je Bmr (Neyfakh et al., 1991). Drugi opisani MDR transporter kod *B. subtilis* je Blt, koji pokazuje visok stepen homologije sa Bmr i dovodi do rezistencije na sličnu grupu supstrata (Ahmed et al., 1995).

PMF-zavisni transporter kod *L. lactis*, detektovan je kod sojeva izloženih povećanim koncentracijama daunomicina i rodamina 6G (Bolhuis et al., 1994). Gen odgovoran za ovu aktivnost, *lmrP*, kodira integralni membranski protein koji pokazuje 19 i 24% homologije sa Bmr i NorA (Bolhuis et al., 1995).

Transporter Bcr u *E. coli* dovodi do rezistencije na diketopiperazinski antibiotik biciklomicin (Bentley et al., 1993) i sulfatazol (Lewis, 1994). EmrD, *E. coli* homolog Bcr proteina, uzrokuje rezistenciju na različite hidrofobne supstrate (Naroditskaya et al., 1993). Ekspresija EmrD štiti ćeliju od CCCP (karbonil cijanid *m*-hlorofenilhidrazon) i tetrahlorosalicilanilida (TCSA), dok ne deluje na biciklomicin, hinolone ili hloramfenikol, ukazujući da EmrD ima priliĉno uzak spektar supstrata (Nakamura, 1968). Još jedan MDR transporter pronađen kod *E. coli* je MdfA (Edgar and Bibi, 1997) takođe poznat kao Cmr (Nilsen et al., 1996) i CmlA (Reeve and Suttie, 1968) koji je otkriven kao efluks pumpa specifiĉna za hloramfenikol. Detaljnije analize su pokazale da MdfA obezbeđuje rezistenciju na širok spektar neutralnih i pozitivno naelektrisanih supstrata. Međutim, povećana ekspresija MdfA proteina dovodi do povećanja osetljivosti na spektinomycin (Bohn and Bouloc, 1998), na osnovu ĉega se može zakljuĉiti da MDR pumpa može dovesti do rezistencije na različite toksiĉne agense, ali i povećati osetljivost na druge.

MDR transporter Cmr nepatogenog organizma *Corynebacterium glutamicum* znaĉajno povećava rezistenciju na nekoliko strukturno razliĉitih antibiotika kada se eksprimira u *E. coli*, ali nema uticaja kada je sintetisan u većim koliĉinama u *C. glutamicum*. Pretpostavlja se da je nemogućnost Cmr proteina da izazove rezistenciju kod originalnog domaćina posledica nižeg nivoa ekspresije (Jager et al., 1997).

Mikobakterije su uzročnici nekoliko razliĉitih oboljenja, među kojima i tuberkuloze i lepre. Terapija ovih infekcija je ĉesto otežana, jer mikobakterije poseduju

unutrašnju rezistenciju na većinu poznatih antibiotika. Tap efluks pumpa kod *Mycobacterium fortuitum* i *Mycobacterium tuberculosis* dovodi do rezistencije na aminoglikozide i tetracikline i poseduje 12-TMS (Ainsa et al., 1998).

Povećana ekspresija PmrA proteina kod *Streptococcus pneumoniae* uzrokuje rezistenciju na akriflavin, etidijum bromid i fluorohinolone ciprofloksacin i norfloksacin (Gill et al., 1999).

**14-TMS familija.** Otpornost na antiseptike i dezinficijense, uključujući boje i kvaternerna amonijum jedinjenja je široko rasprostranjena među rezistentnim sojevima *S. aureus*. Jedan od energetski zavisnih eksportnih mehanizama koji uzrokuju ovaj tip rezistencije kodiran je *qacA* genom (Tennent et al., 1989). Topološke analize pokazale su da QacA protein ima 14-TMS. Dok QacA obezbeđuje rezistenciju na monovalentne i divalentne organske katjone, QacB uzrokuje rezistenciju samo na monovalentne organske katjone (Paulsen et al., 1996a). Spekuliše se da je prekomerna upotreba bakteriostatskih divalentnih katjona u bolničkim uslovima, poput hlorheksidina, dovela do evolucije *qacA* iz *qacB* (Paulsen et al., 1998a).

Sekvenciranjem *E. coli* lokusa za MDR rezistenciju, detektovana su dva gena, *emrB*, koji kodira protein veličine 513 aminokiselina i *emrA* koji kodira membranski fuzioni protein koji formira kanal između unutrašnje i spoljašnje membrane (Lomovskaya and Lewis, 1992). EmrAB dovodi do rezistencije na neka hidrofobna jedinjenja i antibiotike (Furukawa et al., 1993).

Bmr3, treći MDR transporter kod *B. subtilis* pokazuje umerenu homologiju sa EmrB (25% identičnosti). Bmr3 doprinosi rezistenciji na antibiotike puromicin i norfloksacin (Ohki and Murata, 1997).

Ubrzo posle primene fluorohinolona u terapiji tuberkuloze, detektovani su rezistentni klinički izolati *M. tuberculosis*. Kao model sistem za izučavanje genetike mikobakterija, korišćen je brzorastući *M. smegmatis* kod kojeg je izolovan *lfrA* gen odgovoran za rezistenciju na hinolone. LfrA uzrokuje otpornost na hidrofilne hinolone, ali ne i na hidrofobne hinolone (Liu et al., 1996). Hibridizacijom je dobijeno da su LfrA homolozi prisutni kod *M. tuberculosis* i *M. avium* (Takiff et al., 1996).

Colmer i saradnici (1998) identifikovali su MDR pumpu, VceAB kod Gram-negativnog patogena *Vibrio cholerae* koja dovodi do rezistencije na deoksiholate i antibiotike poput nalidiksične kiseline i hloramfenikola.

**II SMR familija.** Najmanji poznati sekundarni transporteri pripadaju SMR familiji. Ovi proteini najčešće su veličine oko 110 aminokiselina koje kodiraju 4-TMS i ne pokazuju homologiju sa članovima 12-TMS i 14-TMS familija koje su prethodno opisane (Paulsen et al., 1996c). Kako su ovi proteini male veličine, pretpostavlja se da funkcionišu kao oligomerni kompleksi (Paulsen et al., 1996c).

Prvi gen koji kodira MDR transporter SMR familije otkriven je na konjugativnim i nekonjugativnim plazmidima kliničkih izolata *S. aureus* i drugih stafilokoka (Littlejohn et al., 1991; Leelaporn et al., 1994). Ovaj gen, prvo opisan kao *qacC*, a takođe poznat i kao *qacD* (Littlejohn et al., 1991) i *ebr* (Sasatsu et al., 1989), preimenovan je u *smr* (Wiener et al., 1996). U stafilokokama izolovanim iz prehrambenih proizvoda, pronađeni su plazmidi pST94 i p2H6 kod kojih su analizom sekvence pronađene determinante koje kodiraju još dva člana SMR familije, *QacG* i *QacH* (Heir et al., 1998, 1999). *QacG* i *QacH* pokazuju 69 i 76% identičnosti sa *Smr*. Oba transportera obezbeđuju rezistenciju na etidijum bromid i kvaternerna amonijumova jedinjenja.

*E. coli* MDR transporter *EmrE* (poznat i kao *MvrC*) je identifikovan i kloniran na osnovu toga što obezbeđuje rezistenciju na etidijum bromid i metil viologen (Purewal, 1991; Morimyo et al., 1992). Analize su pokazale da *EmrE* funkcioniše kao homooligomer, najverovatnije izgrađen od tri monomera (Yerushalmi et al., 1996).

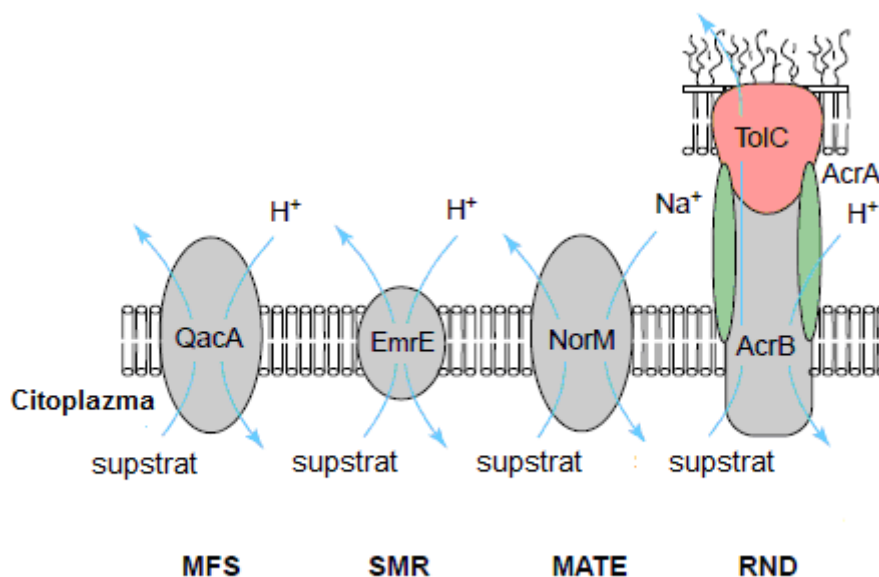
Genetičke determinante rezistencije na antiseptike, *qacE* i *qacEΔ1*, su po pravilu locirani u okviru integrona. Usled toga, ovi geni su široko rasprostranjeni među Gram-negativnim bakterijama (Kazama et al., 1998a). *qacEΔ1* gen, ali ne i *qacE* je detektovan kod kliničkih izolata Gram-pozitivnih bakterija (Kazama et al., 1998b). *qacE* gen je prvobitno pronađen na plazmidu R751 kod *Klebsiella aerogenes* (Paulsen et al., 1993).

MDR transporter *Mmr* kod *M. tuberculosis* obezbeđuje rezistenciju na tetrafenil fosfonijum (TPP<sup>+</sup>), etidijum bromid, eritromicin i akriflavin (De Rossi et al., 1998). Hibridizacijom je potvrđeno prisustvo *mmr*-sličnih gena kod drugih *Mycobacterium* vrsta, *M. simiae*, *M. gordonae*, *M. marinum* i *M. bovis* (De Rossi et al., 1998).

Genom *Bacillus subtilis* kodira sedam SMR proteina (Paulsen et al., 1998b). Zanimljivo je da je šest ovih proteina kodirano genskim parovima u okviru tri posebna operona, *ebrAB*, *ykkCD* i *yvdRS*. Masaoka i saradnici (2000), pokazali su da ni *EbrA* ni *EbrB* nisu dovoljni za ispoljavanje rezistencije pojedinačno. Međutim, zajednička

ekspresija ova dva proteina uzrokuje MDR fenotip i kod *E. coli* i *B. subtilis*. Slično je pokazano i za YkkCD par. Samo kada su geni *ykkC* i *ykkD* eksprimirani zajedno, uočava se rezistencija prema širokom spektru supstrata uključujući katjonske boje i neutralne i anjonske antibiotike (Jack et al., 2000). Za razliku od ostalih SMR transportera, koji najverovatnije funkcionišu kao homooligomeri, EbrAB i YkkCD su izgrađeni od dve različite, ali homologne subjedinice. Jedan član svakog para je kratak (105 do 106 aminokiselina), dok je drugi duži (111 do 117 aminokiselina). Ova razlika je posledica hidrofilne ekstenzije na C-terminalnom kraju (Jack et al., 2000).

**III RND familija.** Transporteri koji pripadaju RND familiji interaguju sa membranskim fuzionim proteinom (MFP) i jednim proteinom spoljašnje membrane da bi omogućili transport i kroz unutrašnju i spoljašnju membranu Gram-negativnih bakterija. Sekundarna struktura RND-tipa efluks proteina sastoji se iz 12-TMS sa dve velike petlje između TMS 1 i 2 i TMS 7 i 8 (Paulsen et al., 1996a). Analize strukture RND proteina MexB kod *Pseudomonas aeruginosa* potvrdile su ovaj model (Guan et al., 1999).



**Slika 8.** Glavni predstavnici četiri familije MDR transportera (Paulsen, 2003).

Poznato je da hromozomalni *acrA* lokus kod *E. coli* obezbeđuje rezistenciju na akriflavin i druge katjonske boje, kao i na neke deterdžente i antibiotike (Nakamura, 1965). Karakterizacija ovog lokusa ukazala je na prisustvo dva gena *acrA* i *acrB* u

okviru istog operona (Ma et al., 1993). Da bi se ispoljila rezistencija, neophodno je prisustvo oba proteina i AcrA i AcrB. Treća komponenta AcrAB efluks sistema je TolC protein iz spoljašnje membrane (Kronakis et al., 2000). TolC formira kontinuirani kanal koji povezuje spoljašnju membranu i periplazmatični prostor. Ovaj kanal se može otvoriti pod uticajem aktiviranog transportera unutrašnje membrane i uspostaviti vezu između citoplazme i spoljašnje sredine (Slika 8).

*P. aeruginosa* je klinički značajan oportunistički patogen sa relativno visokom unutrašnjom rezistencijom prema različitim antimikrobnim agensima. Zaključeno je da je ova osobina posledica slabe propustljivosti spoljašnje membrane i prisustva najmanje četiri RND efluks sistema. U početku je smatrano da *mexAB-oprM* operon ima ulogu u eksportu siderofore pioverdina (Poole et al., 1993a), ali dalja karakterizacija ovog operona pokazala je da povećana ekspresija MexAB-OprM povećava rezistenciju *P. aeruginosa* na različite antibiotike (Poole et al., 1993b). MexA ima ulogu membranskog fuzionog proteina, dok MexB pripada RND familiji. Treći gen operona je prvobitno identifikovan kao *oprK*, ali su Gotoh i saradnici (1995) pokazali da je komponenta spoljašnje membrane ovog efluks sistema OprM, pre nego OprK.

Rezistencija na hidrofobne agense kod *Neisseria gonorrhoeae* posredovana je MtrRCDE efluksnim sistemom. *mtrRCDE* region u hromozomu gonokoka čine gen za transkripcioni regulator (*mtrR*) i tri povezana gena (*mtrC*, *mtrD* i *mtrE*) koji kodiraju MFP, RND proteine i protein spoljašnje membrane (Hagman et al., 1995). Inerciona inaktivacija *mtrC* (Hagman et al., 1995) ili *mtrE* gena (Delahay et al., 1997) dovodi do značajnog smanjenja rezistencije na eritromicin, penicilin i masne kiseline, ukazujući da su oba proteina potrebna za efluks supstrata.

Sekvenciranje genoma *Haemophilus influenzae* identifikovan je klaster od tri gena, izgrađen od HI0893, HI0894 i HI0895, koji pokazuje homologiju sa *acrAB* klasterom kod *E. coli* (Fleischmann et al., 1995). Inaktivacija HI0894 (*acrA* homolog) ili HI0895 (*acrB* homolog) dovodi do povećane osetljivosti na eritromicin, rifampin, novobiocin i katjonske boje (Sánchez et al., 1997).

Transporteri koji pripadaju MFS i SMR familijama pronađeni su i u Gram-pozitivnim i u Gram-negativnim bakterijama, dok, za sada, RND-tip transportera je identifikovan samo u Gram-negativnim bakterija. Neke bakterije, npr. *B. subtilis*, *E. coli* i *S. aureus* poseduju veći broj transportera koji pripadaju različitim familijama.

**IV MATE familija.** Eksperimenti sa norfloksacinom pokazali su da *Vibrio parahaemolyticus* poseduje energetski zavisani efluks sistem, označen kao NorM (Morita et al., 1998). NorM i njegov *E. coli* homolog YdhE, posreduju u rezistenciji na boje, hidrofilne fluorohinolone i aminoglikozide. NorM poseduje 12-TMS, na osnovu čega je prvobitno klasifikovan u MFS familiju (Morita et al., 1998). Međutim, NorM i YdhE, ne pokazuju sličnost u sekvenci sa bilo kojim članom MFS familije, zbog čega su svrstani u MATE familiju koja sadrži preko 30 proteina (Brown et al., 1999).

**Tabela 1.** Glavne klase MDR transportera i njihovi predstavnici (Bolhuis et al., 1997)

MDR familija	Protein	Organizam	Referenca
<b>MFS familija</b>			
12-TMS klaster	NorA	<i>S. aureus</i>	Yoshida et al., 1990
	BmrR	<i>B. subtilis</i>	Neyfakh, 1992
	LmrP	<i>L. lactis</i>	Bolhuis et al., 1995
	Bcr	<i>E. coli</i>	Bentley et al., 1993
	EmrD	<i>E. coli</i>	Naroditskaya et al., 1993
	MdfA	<i>E. coli</i>	Edgar and Bibi, 1997
	Tap	<i>M. fortium</i> <i>M. tuberculosis</i>	Ainsa et al., 1998
14-TMS klaster	QacA	<i>S. aureus</i>	Rouch et al., 1990
	QacB	<i>S. aureus</i>	Paulsen et al., 1996b
	Bmr3	<i>B. subtilis</i>	Ohki and Murata, 1997
	EmrB	<i>E. coli</i>	Lomovskaya and Lewis, 1992
<b>SMR familija</b>			
	EmrE	<i>E. coli</i>	Morimyo et al., 1992
	Mmr	<i>M. tuberculosis</i>	De Rossi et al., 1998
	Smr	<i>S. aureus</i>	Grinius et al., 1992
	QacE	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Paulsen et al., 1993
	EbrA	<i>B. subtilis</i>	Masaoka et al., 2000
	EbrB	<i>B. subtilis</i>	Masaoka et al., 2000
	YkkC YkkD	<i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i>	Jack et al., 2000 Jack et al., 2000
<b>RND familija</b>			
	MexB	<i>P. aeruginosa</i>	Poole et al., 1993b
	MexD	<i>P. aeruginosa</i>	Poole et al., 1993b
	MexF	<i>P. aeruginosa</i>	Kohler et al., 1999
	MexY	<i>P. aeruginosa</i>	Mine et al., 1999
	AcrB	<i>E. coli</i>	Ma et al., 1993
	AcrF	<i>E. coli</i>	Klein et al., 1991
	YhiV	<i>E. coli</i>	Ma et al., 1995

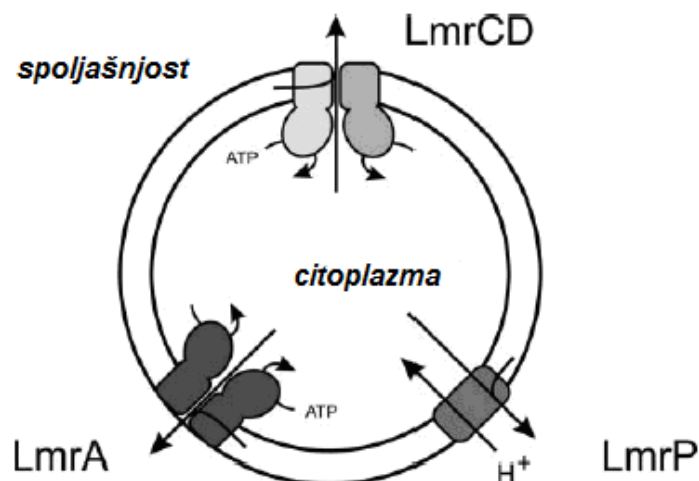
### 1.3.1.2.1. Izvor energije za funkcionisanje sekundarnih transportera

Kao što je ranije opisano, MFS transporteri funkcionišu kao supstrat/H<sup>+</sup> antiporteri. H<sup>+</sup>-zavistan transport (engl. Proton Motive Force - PMF) može biti pokrenut gradijentom koncentracije protona ( $\Delta\text{pH}$  – bazan u unutrašnjosti ćelije) i/ili membranskim potencijalom ( $\Delta\psi$  – negativan unutar ćelije) (Fluman and Bibi, 2009). Supstrati MFS transportera se razlikuju u naelektrisanju i mogu biti neutralni, monovalentni ili divalentni katjoni, dok je izbacivanje supstrata sa većim naelektrisanjem značajno energetski zahtevnije. Isti MFS transporter može posredovati u efluksu supstrata različitih naelektrisanja. Studije na MdfA proteinu pokazale su da transport neutralnih jedinjenja pokreću i  $\Delta\text{pH}$  i  $\Delta\psi$ , dok transport monokatjonskih jedinjenja pokreće samo  $\Delta\text{pH}$  (Lewinson et al., 2003). Kod LmrP posredovanog transporta i  $\Delta\text{pH}$  i  $\Delta\psi$  obezbeđuju energiju za razmenu jednog lipofilnog katjona u zamenu za dva ili više protona (Putman et al., 1999). Supstrat/nH<sup>+</sup> ( $n \geq 2$ ) antiport mehanizam zabeležen je i kod NorA, QacA i Smr proteina što ukazuje da je prisutan kod MFS i SMR familija, a može se javiti i kod RND-tipa transportera (Putman et al., 2000). **Valinomycin**, koji remeti  $\Delta\text{pH}$  i **nigericin**, koji deluje na  $\Delta\psi$  imaju veliki značaj u izučavanju tipa energije koja pokreće sekundarne MDR transportere (Putman et al., 2000).

### 1.3.2. MDR transporteri vrste *L. lactis*

*L. lactis* je nepatogena bakterija i predstavlja odličan model sistem za izučavanje bakterijskih MDR proteina. U genomu *L. lactis* detektovano je prisustvo 40 potencijalnih gena za MDR transportere, od čega je svega nekoliko funkcionalno okarakterisano (Lubelski et al., 2006a). Selekcijom *L. lactis* mutanata koji rastu u prisustvu toksičnih agenasa, poput etidijum bromida, rodamina i daunomicina, dobijeni su sojevi koji ne pokazuju rezistenciju samo na selektovane agense, već pokazuju ukrštenu rezistenciju na strukturno različite supstrate (Bolhuis et al., 1994). Utvrđeno je da rezistencija potiče bar delimično od aktivnog efluksa ovih supstrata. Pored toga, bioenergetska izučavanja dovela su do zaključka da je efluksna aktivnost i ATP i PMF zavisna (Bolhuis et al., 1994). Među okarakterisanim transporterima je prvi opisan

ATP-zavisni MDR transporter prokariota, LmrA (van Veen et al., 1996), član MFS familije LmrP (Bolhuis et al., 1995) i heterodimerni ABC-MDR transporter LmrCD (Lubelski et al., 2004) (Slika 9).



**Slika 9.** Funkcionalno okarakterisani MDR transporteri kod *L. lactis* (Lubelski et al., 2007).

**LmrA.** Većina do danas poznatih ABC transportera su eukariotskog porekla, poput P-glikoproteina. Prvi dobro okarakterisan bakterijski ABC transporter je LmrA (Bolhuis et al., 1994). Na osnovu strukturnih i funkcionalnih karakteristika, ovaj bakterijski protein je svrstan u P-glikoproteinski klaster ABC transporter superfamilije. Pokazano je da LmrA čak može zameniti P-glikoprotein u humanim fibroblastima pluća, a funkcionalna sličnost je dodatno potvrđena zajedničkim spektrom supstrata, koji uključuje uglavnom hidrofobna katjonska jedinjenja (Poelarends et al., 2002). Pored toga, LmrA obezbeđuje rezistenciju na osam klasa antibiotika širokog spektra, a homoloji LmrA proteina su pronađeni i kod patogenih bakterija, zbog čega je izučavanje ovog proteina od kliničkog značaja (Poelarends et al., 2002).

LmrA protein je prvi put otkriven u etidijum bromid-rezistentnim mutanatima *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363. Efluks etidijum bromida u ovim mutanatima bio je inhibiran **orto-vanadatom**, inhibitorom ABC transportera i P-tipa ATP-aze, ali ne i narušavanjem protonskog gradijenta (Bolhuis et al., 1994). Izučavanje strukture ovog proteina ukazalo je da je veličine 590 aminokiselina sa izračunatom molekulskom



masom od 64,6 kDa. Sekundarna struktura LmrA proteina sadrži šest transmembranskih  $\alpha$ -heliksa, koji su povezani sa hidrofilnim, citoplazmatičnim domenom koji poseduje ATP-vezujuće mesto (van Veen et al., 1996). Posmatrano iz ugla da se ABC transporteri sastoje iz četiri domena, dva transmembranska i dva citosolna koja vezuju nukleotide, LmrA se može definisati kao polu-transporter, što ukazuje da funkcioniše kao homodimer formirajući funkcionalni protein sa četiri jezgra (van Veen et al., 2000).

Pretpostavlja se da LmrA funkcioniše kao „hidrofobni vakuum čistač“, koji izbacuje toksična lipofilna jedinjenja sa unutrašnje strane lipidnog dvosloja direktno u spoljašnju vodenu fazu (Bolhuis et al., 1996).

LmrA može vršiti efluks različitih amfifilnih toksičnih jedinjenja i njegova klasifikacija kao MDR transportera je opravdana, ako se uzmu u obzir do sada opisani supstrati na koje deluje. LmrA supstrati uključuju antikancerogene lekove poput vinka alkaloida (vinblastin i vinkristin) i antraciklina (daunomicin, doksorubicin) ili citotoksičnih agenasa poput antimikrotubularnih lekova (kolhicin) i DNK interkalatora (etidijum bromid), fluorescentne membranske probe (Hoechst 33342, difenil-heksatrien) i fluorescentnih boja kao što su rodamin 6G i rodamin 123 (van Veen et al., 1996, 1998, Margolles et al., 1999). LmrA modulatori su takođe strukturno različita jedinjenja i uključuju blokatore kalcijumovih kanala (verapamil), 1,4-dihidropiridine (nikardipin), antimalarike (hinin i hinidin), imunosupresive (ciklosporin A) i alkaloida (rezerpin) (van Veen et al., 1996, 1999).

Uloga LmrA proteina ispitivana je i u citotoksičnim esejima u kojima je testirana osetljivost *E. coli* CS1562 ćelija koje ekspimiraju transporter (CS1562-pGKLmrA) u poređenju sa kontrolnim ćelijama CS1562 koje ne ekspimiraju LmrA (CS1562-pGK13). Soj CS1562 je korišćen u ovom eseju zbog velike osetljivosti na različite supstrate. Uočeno je da LmrA ekspresija u CS1562 ćelijama uzrokuje povećanu rezistenciju na 17 od 21 najčešće klinički korišćenih antibiotika, uključujući klase aminoglikozida, linkozamida, makrolida, hinolona, streptogramina i tetraciklina (Putman et al., 2000).

Međutim, povećana ekspresija LmrA u senzitivnom soju *L. lactis*  $\Delta$ lmrA  $\Delta$ lmrCD, nije dovela do značajnog nivoa rezistencije, ukazujući da LmrA nije glavni MDR transporter kod ove bakterije, a da je ovakav rezultat najverovatnije posledica

kompenzatornog povećanja nivoa ekspresije drugih MDR transportera (Lubelski et al., 2007).

**LmrCD.** LmrCD je heterodimerni MDR transporter koji pripada ABC superfamiliji. Sastoji se od dva ABC polu-transportera, LmrC i LmrD, čiji su geni lokalizovani na istom operonu, a oba sadrže po šest transmembranskih segmenata praćenih citosolno lokalizovanim NBD domenom (Lubelski et al., 2004). Ovi proteini pokazuju homologiju sa ostalim transporterima ABC-tipa, poput LmrA, humanog P-glikoproteina i BmrA kod *B. subtilis* (Lubelski et al., 2007).

U cilju izučavanja uloge LmrC i LmrD proteini su pojačano eksprimirani u *L. lactis* ćelijama, pojedinačno i zajedno. Ćelije koje su eksprimirale i LmrC i LmrD pokazale su povećanu otpornost prema etidijum bromidu, BCECF-AM, daunomicinu i Hoechst-u 33342, dok ta aktivnost nije dobijena kada su proteini eksprimirani pojedinačno (Lubelski et al., 2004). Može se zaključiti da LmrC i LmrD dimerizuju da bi formirali funkcionalni ABC transporter. Heterodimerna organizacija je dodatno potvrđena činjenicom da LmrCD kompleks aktivno hidrolizuje ATP, dok LmrC i LmrD odvojeno pokazuju vrlo slabu ATP-aznu aktivnost (Lubelski et al., 2004).

LmrCD je prvi bakterijski ABC MDR transporter u formi heterodimera, dok je takva organizacija transportera je češća kod eukariota (Lubelski et al., 2004).

**LmrP.** LmrP je 408-aminokiselina dug protein koji pripada MFS familiji sekundarnih transportera. Sekundarnu strukturu LmrP proteina čini 12 transmembranskih domena, međusobno povezanih petljama i sa N- i C- terminalnim krajevima orijentisanim ka citoplazmi (Bolhuis et al., 1995). *lmrP* gen pokazuje 19 i 24% homologije sa MDR transporterima Bmr i NorA (Bolhuis et al., 1995). LmrP prepoznaje širok spektar različitih supstrata i posreduje u transportu brojnih lipofilnih katjonskih toksičnih jedinjenja, poput etidijum bromida, rodamina, daunomicina i tetrafenilfosfonijum jona (TPP<sup>+</sup>) (Bolhuis et al., 1995; Putman et al., 1999). Transportni eseji u intaktnim ćelijama, kao i u membranskim vezikulama pokazali su da se izbacivanje toksičnih katjona odvija pod dejstvom i membranskog potencijala ( $\Delta\psi$ ) i transmembranskog protonskog gradijenta ( $\Delta\text{pH}$ ), tj. proces je inhibiran u prisustvu nigericina i valinomicina (Putman et al., 1999).

Specifičnost LmrP proteina prema različitim antibioticima ispitana je u citotoksičnim esejima u kojima je poređena osetljivost ćelija koje pojačano eksprimiraju

LmrP u odnosu na kontrolni soj koji ne eksprimira ovaj protein. Kako povećana ekspresija LmrP proteina ima detrimentalni efekat na ćeliju domaćina (Putman et al., 1999), eksperimenti su izvedeni u ćelijama *E. coli* sa niskim nivoom ekspresije LmrP (Putman et al., 2001).

Pokazano je da LmrP povećava rezistenciju na linkozamide i makrolide poput azitromicina, klaritromicina, eritromicina i roksitromicina (Putman et al., 2001). Ovi makrolidni antibiotici sadrže 14- ili 15- člani laktonski prsten za koji je vezan jedan ili više deoksišećera (Woodward, 1957; Ballow and Amsden, 1992). Zanimljivo je da LmrP nije pokazao rezistenciju prema 16-članom makrolidnom antibiotiku spiramicinu (Putman et al., 2001). LmrP ekspresija povećala je rezistenciju prema streptograminima dalfopristinu i RP 59500, ali nije imala uticaja na rezistenciju prema kvinpristinu (Putman et al., 2001). Četvrta generacija antibiotika RP 59500 je kombinacija dalfopristina i kvinpristina, koja ispoljava sinergistički i baktericidni efekat prema Gram-pozitivnim patogenima, uključujući i meticilin rezistentni *S. aureus* (Aumercier et al., 1992; Kang and Rybak, 1995).

Iako se makrolidi, linkozamidi i streptogramini razlikuju po svojoj strukturi, ovi antibiotici su često grupisani zajedno (MLS antibiotici), zbog sličnog mehanizma dejstva koje uključuje inhibiciju sinteze proteina vezivanjem za 50S subjedinicu bakterijskih ribozoma (Contreras and Vasquez, 1977). Najčešći mehanizam rezistencije na MLS-grupu antibiotika je izmena ciljnog mesta (Weisblum, 1995), međutim istraživanja su pokazala da rezistencija na MLS-grupu antibiotika može biti i posledica pojačanog efluksa antibiotika (Leclercq and Courvalin, 1991; Clancy et al., 1996; Putman et al., 2001).

Ćelije koje pojačano ekspimiraju LmrP pokazale su veću rezistenciju na različite antibiotike iz grupe tetraciklina, ukazujući da supstituenti na 5., 6. ili 7. ugljenikovom atomu ne utiču na interakciju između LmrP proteina i tetraciklina. LmrP ne dovodi do rezistencije na aminoglikozide,  $\beta$ -laktame, glikopeptide, hinolone i hloramfenikol (Putman et al., 2001).

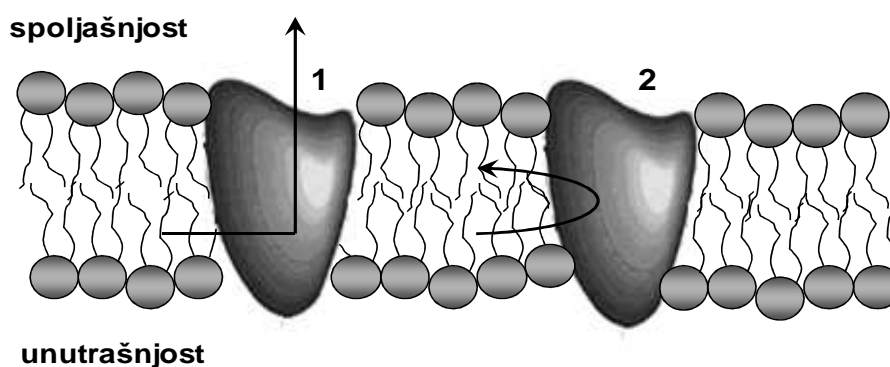
Specifičnost LmrP proteina prema različitim antibioticima ukazala je da PMF-zavisni MDR transporteri mogu narušiti efikasnost brojnih klinički značajnih antibiotika. S obzirom da je i LmrA ABC transporter specifičan za širok spektar antibiotika, dalja izučavanja mogućnosti prenosa hromozomalnih gena za rezistenciju,

poput *lmrA* i *lmrP*, na druge bakterije u hrani i digestivnom traktu su od velikog značaja.

### 1.3.3. Mehanizam transporta supstrata

Iako supstrati koji interaguju sa MDR transporterima imaju različite hemijske strukture, poseduju određene zajedničke osobine poput izražene hidrofobnosti, amfifilne prirode i pozitivnog ili neutralnog naelektrisanja (Bolhuis et al., 1997). Ove fizičke osobine omogućavaju molekulima da prodru u fosfolipidni dvosloj membrane i da se dalje transportuju u spoljašnju sredinu, što je dovelo do pretpostavke da MDR transporteri vrše transport supstrata iz lipidnog dvosloja (Raviv et al., 1990; Higgins and Gottesman, 1992) pre nego iz citoplazme (Altenberg et al., 1994). Model prema kome MDR transporteri vezuju i uklanjaju hidrofobni supstrat na nivou membrane, ukazuje na moguću fiziološku ulogu MDR transportera u očuvanju integriteta membrane i njene funkcije kao barijere.

MDR transporteri mogu funkcionisati kao „hidrofobni usisivači“ koji vezuju amfifilni supstrat u citoplazmatskoj membrani (na njenom unutrašnjem citoplazmatskom delu) i transportuju ga direktno u spoljašnju vodenu fazu (Gottesman and Pastan, 1993) ili mogu delovati kao flipaza, translokacijom supstrata unutar membrane, posle čega molekul difunduje u spoljašnji medijum (Higgins and Gottesman, 1992) (Slika 10).



**Slika 10.** Molekularni model efluksa supstrata pomoću MDR transportera. 1. „hidrofobni usisivač“, 2. flipaza model.

Najbolja potvrda da se efluks supstrata vrši iz membrane u vodenu fazu, pre nego iz citoplazme, dobijena je transportnim esejima u prisustvu fluorescentnih jedinjenja poput 1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenilheksa-1,3,5-triena (TMA-DPH) i Hoechst-a 33342, koji fluoresciraju u hidrofobnom okruženju, ali ne emituju fluorescenciju u vodenoj fazi (Putman et al., 2000). Transport ovih jedinjenja iz membrane u vodenu fazu praćen je smanjenjem fluorescencije u vremenu (Bolhuis et al., 1996).

Mehanizam transporta LmrA (Bolhuis et al., 1996), LmrP (Bolhuis et al., 1996) i QacA (Mitchell et al., 1999) proteina izučavan je u prisustvu TMA-DPH. TMA-DPH je amfifilna, katjonska membranska proba koja fluorescira samo kada je u membrani (Prendergast et al., 1981). Povećanje intenziteta fluorescencije usled ulaska TMA-DPH u fosfolipidni dvosloj je dvofazni proces (Bolhuis et al., 1996) koji uključuje brzi ulazak (1-2 s) TMA-DPH u fosfolipidni dvosloj i spori prolazak (nekoliko minuta) kroz membranu (Poelarends et al., 2002). Početni nivo izbacivanja TMA-DPH povećava se sa porastom koncentracije TMA-DPH u donjem delu citoplazmatične membrane, ukazujući da LmrA transportuje supstrat iz donjeg dela lipidnog dvosloja (Bolhuis et al., 1996), a slični rezultati dobijeni su i kod LmrP (Bolhuis et al., 1996) i QacA (Mitchell et al., 1999) proteina. Može se zaključiti da uprkos razlikama u izvoru energije, ATP- i PMF- zavisne efluks pumpe imaju isti mehanizam transporta hidrofobnih supstrata.

Postoji nekoliko dokaza o prisustvu više od jednog mesta za vezivanje supstrata kod LmrA i LmrP proteina. Kod LmrP proteina, transportni eseji u membranskim vezikulama *L. lactis* ukazali su da neki supstrati inhibiraju LmrP-posredovan transport Hoechst 33342, kompetitivno sa Hoechst u vezivanju za isto mesto na LmrP proteinu ili nekompetitivno, vezivanjem za mesto koje je različito od onog gde se vezuje Hoechst 33342 (Putman et al., 1999). Slično je pokazano i za stafilokokni MDR protein QacA (Mitchell et al., 1999). Istraživanja su pokazala da QacA-posredovan transport etidijum bromida kompetitivno inhibiraju monovalentni katjoni, a nekompetitivno divalentni katjoni, što ukazuje da se monovalentni i divalentni katjoni vezuju za različita mesta QacA proteina. Kinetičke studije na LmrA proteinu, potvrdile su prisustvo najmanje dva različita, alosterno povezana vezujuća mesta (van Veen et al., 1998).

### 1.3.4. Klinički značaj MDR transportera

Bakterijski MDR efluks sistemi predstavljaju ozbiljan problem u farmakološkoj terapiji pacijenata sa infektivnim bolestima, zbog toga što spektar supstrata mnogih MDR transportera uključuje klinički značajne antibiotike. MDR transporteri su povezani i sa urođenom i sa stečenom rezistencijom na antibiotike kod bakterija. Mutacijom gena koji kodiraju AcrAB, MexAB-OprM, HI0894/HI0895, NorA i druge proteine dolazi do povećane osetljivosti na nekoliko antibiotika, na osnovu čega se može zaključiti da ovi transporteri dovode do urođene rezistencije na antibiotike kod *E. coli*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* i *S. aureus* (Poole et al., 1993b; Ma et al., 1995; Sanchez et al., 1997; Yamada et al., 1997). Stečena MDR rezistencija može nastati na tri načina: (1) umnožavanjem i mutacijom gena koji kodiraju MDR transportere, čime se menja nivo njihove ekspresije (Ng et al., 1994) ili aktivnost (Knol et al., 1996), (2) mutacijom specifičnih regulatornih gena, što dovodi do povećane ekspresije MDR transportera ili (3) međucelijskim transferom gena posredstvom transpozona ili plazmida.

Klinički značaj MDR transportera u velikoj meri zavisi od spektra antibiotika na koje obezbeđuju rezistenciju. MexAB-OprM kod *P. aeruginosa* i ABC-tip transportera LmrA kod *L. lactis* pokazuju specifičnost prema širokom spektru antibiotika, što ukazuje da i sekundarni i ATP-zavisni transporteri mogu ozbiljno narušiti efikasnost mnogih antibiotika. Plazmidom kodiran MDR transporter HorA uzrokuje rezistenciju na manji broj antibiotika nego hromozomalni LmrA. Međutim, kako je dostupan ograničen broj podataka za druge plazmidom kodirane transportere, poput QacA, QacB i EmrE, ne može se zaključiti da li je uži spektar dejstva opšta osobina plazmidom kodiranih MDR. NorA i Bmr obezbeđuju viši nivo rezistencije na hidrofилne hinolone, poput norfloksacina i ciprofloksacina, nego na hidrofobne poput sparfloksacina i ofloksacina. Ova specifičnost za hidrofилne hinolone je takođe uočena i kod PmrA i NorM (Morita et al., 1998; Gill et al., 1999). Pored obezbeđivanja rezistencije, neki MDR transporteri kada su eksprimirani u većim količinama mogu dovesti do povećane osetljivosti na pojedine antibiotike. *E. coli* MDR transporter MdfA dovodi do rezistencije na aminoglikozide neomicin i kanamicin, ali i do povećane osetljivosti na spektinomicin (Bohn and Bouloc, 1998). Mehanizam povećane osetljivosti predmet je daljih analiza.

### 1.3.5. Fiziološka uloga MDR transportera

Efluks širokog spektra strukturno nesrodnih toksičnih jedinjenja može biti primarna fiziološka funkcija MDR transportera, ili je verovatno samo slučajni sporedni efekat transporta specifičnog nepoznatog fiziološkog supstrata (Neyfakh, 1997). Dobar primer kojim se potvrđuje fiziološka uloga MDR transportera u efluksu specifičnih supstrata je Blt transporter kod *B. subtilis*-a. Pokazano je da povećana ekspresija Blt dovodi do povećanog efluksa spermidina u medijum (Woolridge et al., 1997). Gen *blt* se prepisuje zajedno sa nizvodnim genom, *btlD*, koji kodira spermidin acetiltransferazu (Ahmed et al., 1995). Ovakva organizacija u genomu ukazuje da je efluks spermidina fiziološka uloga Blt transportera, dok je prepoznavanje različitih supstrata verovatno sporedni efekat. Sposobnost nekih MDR transportera da posreduju u prenosu lipida ili fluorescentnih lipidnih derivata, može ukazati da je fiziološka uloga ovih transportera u translokaciji fosfolipida ili transportu lipidnih prekursora peptidoglikana (Höltje, 1998; Margolles et al., 1999). Pored toga, supstrati koje prepoznaju neki MDR transporteri uključuju deterdžente (Doige et al., 1993; Putman et al., 1999), žučne soli (Hagman et al., 1995; Ma et al., 1995), organske rastvarače (White et al., 1997) i jonofore (Sharom et al., 1995; Sami et al., 1997), usled čega se može zaključiti da ovi transporteri imaju ulogu u zaštiti integriteta membrane ili energetskog stanja ćelije.

### 1.4. Kvantitativni odnosi strukture i dejstva (engl. Quantitative Structure Activity Relationships - QSAR)

Nasuprot različitim eksperimentalnim pristupima koji se mogu koristiti za karakterizaciju supstrata, a koji su primenjeni za LmrP, LmrA i LmrCD proteine (Mazurkiewicz et al., 2005; Lubelski et al., 2006b), danas sve veći značaj dobijaju i kompjuterske (teorijske) metode koje su uspešno primenjene za ispitivanje specifičnosti supstrata za P-glikoprotein (P-gp) (Xue et al., 2004; de Cerqueira Lima et al., 2006; Cabrera et al., 2006; Huang et al., 2007).

Primena kompjuterskih metoda u izučavanju specifičnosti supstrata za određeni protein može imati dva pristupa:

1) **direktan pristup** koji se zasniva na poznatoj trodimenzionalnoj strukturi ciljnog proteina („*docking*“ studije);

2) **indirektan pristup** koji se zasniva na strukturnim karakteristikama samih supstrata i obuhvata studije kvantitativnih odnosa strukture i dejstva (engl. Quantitative Structure Activity Relationships - QSAR), trodimenzionalni QSAR (3D-QSAR) i određivanje 3D-strukture farmakofore.

Kvantitativni odnosi strukture i dejstva (QSAR) predstavljaju oblast kompjuterskog istraživanja koja razvojem matematičkih modela omogućava uspostavljanje korelacije između hemijske strukture i biološke aktivnosti grupe ispitivanih jedinjenja. Odgovarajući QSAR model se može opisati funkcijom:

$$\text{QSAR: Aktivnost} = f(\text{strukture}) \quad (1)$$

ili

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n) \quad (2)$$

gde je Y zavisno promenljiva (biološka aktivnost), a X nezavisno promenljiva koja predstavlja strukturne osobine ispitivanih jedinjenja (molekulske deskriptore). Biološka aktivnost jedinjenja može biti izražena kao koncentracija leka u organizmu (c), konstanta vezivanja leka za ciljni makromolekul ( $K_i$ ), koncentracija pri kojoj se ispoljava 50% maksimalnog inhibitornog dejstva ( $IC_{50}$ ) itd.

U klasičnoj QSAR analizi biološka aktivnost se dovodi u korelaciju sa molekulskim osobinama kao što su lipofilnost, elektronske i sterne osobine. Jedan od nedostataka ovog pristupa je što ne uzima u obzir 3D strukturu molekula. Brz napredak kompjuterske hemije i odgovarajućih programskih paketa doprineo je da se klasični QSAR pristup danas sve više zamenjuje trodimenzionalnom QSAR analizom. 3D-QSAR analiza se zasniva na principu da biološka aktivnost molekule zavisi od njegove konformacije, fleksibilnosti, veličine i raspodele naelektrisanja. Ovi parametri se na osnovu trodimenzionalne strukture molekula mogu kompjuterski kvantifikovati, a važna područja biološki aktivnih molekula kao što su hidrofobnost, prisustvo donora i akceptora vodoničnih veza se na poseban način označavaju u 3D obliku. Ovim putem se dobija trodimenzionalni uzorak funkcionalno značajnih područja za supstrate.



Statističke metode poput multilinearne regresione analize (engl. Multiple Linear Regression - MLR), metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (engl. Partial Least Squares Regression - PLS) i veštačkih neuronskih mreža (engl. Artificial Neural Networks - ANN) predstavljaju najčešće korišćene statističke metode za formiranje QSAR modela. Pored odabira odgovarajućeg hemometrijskog pristupa veoma je važno da formirani modeli budu validirani kako bi se mogli koristiti za pouzdano predviđanje aktivnosti novih jedinjenja. Najznačajniji validacioni parametri koji se koriste za procenu kvaliteta formiranih modela su: koeficijent determinacije ( $R^2$ ), srednja kvadratna greška (engl. Root Mean Square Error - **RMSE**), Fisherov odnos varijansi (**F-vrednost**), unakrsni validacijski koeficijent korelacije ( $Q^2$ ), nivo statističke značajnosti, verovatnoća (**p-vrednost**).

## 2. CILJ RADA

MDR transporteri imaju veoma značajnu ulogu u obezbeđivanju rezistencije prokariotskih i eukariotskih ćelija na različite citotoksične agense i mogu učestvovati u transportu velikog broja strukturno različitih supstrata (Dushi et al., 2011). Iako laktokoke poseduju GRAS status (engl. Generally Regarded As Safe), novija istraživanja ukazuju da laktokoke kao i druge BMK mogu da budu rezervoari gena za rezistenciju na antibiotike, koji se horizontalnim transferom mogu preneti na druge bakterijske vrste, uključujući i patogene. Da bi se sprečilo širenje gena odgovornih za višestruke rezistencije, neophodno je intenzivnije proučavanje MDR transportera kod laktokoka namenjenih za korišćenje u prehrambenoj industriji.

Istraživanja prikazana u ovom radu su imala za cilj da se okarakterišu CmbT (engl. Cysteine and Methionine Biosynthesis Transporter) protein, potencijalno novi MDR transporter u soju *L. lactis*.

Stoga, ciljevi ove studije bili su:

1. Kloniranje *cmbT* gena u plazmid pNZ8113, nizvodno od fino regulisanog inducibilnog  $P_{nisA}$  promotora;
2. Ekspresija *cmbT* gena pomoću NICE sistema;
3. Ispitivanje uticaja povećane ekspresije CmbT proteina na preživljavanje soja *L. lactis* NZ9000;
4. Analiza uloge CmbT proteina u rezistenciji *L. lactis* na različite supstrate;
5. Molekularna karakterizacija mehanizma delovanja CmbT transportera;
6. Ispitivanje specifičnosti supstrata za CmbT pomoću 3D-QSAR studije;
7. Ispitivanje potencijalne uloge CmbT proteina u metabolizmu sumpora.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Bakterijski sojevi i plazmidi

Bakterijski sojevi i plazmidi korišćeni u ovom radu navedeni su u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Lista sojeva i plazmida

Bakterijski soj	Odgovarajuće osobine <sup>a</sup>	Izvor ili referenca
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	(Sambrook et al., 1989)
DH5 $\alpha$ /pCTE2	Derivat soja DH5 $\alpha$ koji sadrži plazmid pCTE2	Ova studija
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
NZ9000	Derivat soja <i>L. lactis</i> MG1363, bez plazmida, Lac <sup>-</sup> , Prt <sup>-</sup> , sa integrisanim <i>nisR</i> i <i>nisK</i> genima u hromozomu	(Kuipers et al., 1998)
NZ9000/pNZ8113	Derivat soja NZ9000 sa plazmidom pNZ8113	Ova studija
NZ9000/pCT50	Derivat soja NZ9000 sa plazmidom pCT50, za kontrolisanu ekspresiju CmbT proteina pod P <sub>nisA</sub> promotorom	Ova studija
<b>Plazmidi</b>		
PTZ57R/T	Amp <sup>r</sup> , 2,8-kb vektor za kloniranje PCR fragmenata	Fermentas, Lithuania
pCTE2	pTZ57R/T derivat sa kloniranim <i>cmbT</i> genom	Ova studija
pNZ8113	Cm <sup>r</sup> , pNZ8048 derivat koji poseduje P <sub>nisA</sub> i His tag	(Golic et al., 2005)
pCT50	Cm <sup>r</sup> , pNZ8113 derivat sa kloniranim <i>cmbT</i> genom	Ova studija

<sup>a</sup>Amp<sup>r</sup>, rezistencija na ampicilin; Cm<sup>r</sup>, rezistencija na hloramfenikol.

### 3.2. Medijumi za gajenje (rast) bakterija

Za rast laktokoka korišćen je M17 tečni medijum (Merck, GmbH Darmštad, Nemačka) sa 0,5% glukozom (GM17). U sastav **GM17** medijuma ulaze: polipepton 5 g/l, fitopepton 5 g/l, mesni ekstrakt 5 g/l, ekstrakt kvasca 2,5 g/l, L-askorbinska kiselina 0,5 g/l, Mg-sulfat 0,25 g/l, Na-β-glicerofosfat 19 g/l i glukoza 5 g/l; pH 6,8.

Sojevi laktokoka transformisani odgovarajućim vektorom, gajeni su u GM17 medijumu sa hloramfenikolom 5 µg/ml. Bakterije su gajene na 30°C u toku 24 h.

U cilju utvrđivanja uloge CmbT proteina u metabolizmu sumpora, kao i njegovog uticaja na rast soja *Lactococcus lactis* NZ9000, sojevi *L. lactis* NZ9000 i *L. lactis* NZ9000 koji pojačano ekspirira *cmbT* gajeni su u **hemijski definisanom medijumu (CDM)** sa različitim koncentracijama metionina i cisteina. CDM bez sumpora predstavlja modifikaciju minimalnog medijuma za laktokoke (Jensen and Hammer, 1998; Poolman and Konings, 1988) i čine ga:

- 883 ml rastvora pufera (3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g Na-acetata, 0,6 g (NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-citrata, 0,25 g tirozina, bidestilovana voda do 883 ml),
- 5 ml rastvora askorbata (0,6 g askorbata rastvoreno u 6 ml bidestilovane vode),
- 10 ml smeše nukleotida (11 mg adenina, 11 mg guanina, 11 mg uracila, 11 mg ksantina, bidestilovana voda do 11 ml),
- 1 ml rastvora elemenata u tragovima (20,5 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1 g CaCl<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O, 1,6 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,5 g ZnCl<sub>2</sub>, 0,25 g CuCl<sub>2</sub>, 0,25 g CoCl<sub>2</sub>, 0,4 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,06 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,02 g FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, bidestilovana voda do 100 ml). U svrhu ispitivanja efekata sumpora, sulfatni joni su zamenjeni hloridnim jonima.
- 100 ml rastvora aminokiselina (420 mg Na-aspartata, 350 mg asparagina, 390 mg glutamina, 340 mg serina, 225 mg treonina, 175 mg glicina, 125 mg arginina, 475 mg leucina, 210 mg izoleucina, 50 mg triptofana, 275 mg fenilalanina, 440 mg lizina, 150 mg histidina, 200 mg tirozina, 303 mg alanina, 299 mg prolina, 105 mg valina, bidestilovane vode do 100 ml). Rastvor aminokiselina je napravljen bez metionina i cisteina kako bi koncentracije ovih aminokiselina mogle da se variraju.
- 1 ml smeše vitamina (1 mg biotina, 10 mg folne kiseline, 10 mg riboflavina, 10 mg nikotinske kiseline, 10 mg pantotenske kiseline, 20 mg piridoksala, na 10 ml bidestilovane vode).

U ovako pripremljen hemijski definisan medijum dodavana je glukoza (2%) i 0,1 x metionin ili 10 x metionin/cistein. Kao vrednosti za 1 x metionin i 1 x cistein uzete su optimalne vrednosti za rast laktokoka – 0,84 mM metionin i 0,82 mM cistein.

Za rast bakterija roda *Escherichia coli* korišćen je **Luria broth (LB)** medijum, koji sadrži: tripton 10 g/l, ekstrakt kvasca 5 g/l i NaCl 5 g/l.

Rast *E. coli* odvijao se u trajanju od 16 h na 37°C uz aeraciju. Ampicilin je dodavan u koncentraciji 100 µg/ml, za gajenje sojeva koji su transformisani odgovarajućim vektorom.

Odgovarajuće čvrste podloge su dobijane dodavanjem 15 g/l agara (Torlak, Srbija) u tečni medijum. Svi medijumi sterilisani su u autoklavu u trajanju od 15 min na 121°C. Sojevi laktokoka su čuvani u odgovarajućem medijumu za rast sa 15% glicerola na -80°C.

### **3.3. Metode za izolovanje DNK**

#### **3.3.1. Metoda za izolaciju ukupne DNK iz laktokoka**

Ukupna DNK iz laktokoka izolovana je metodom koju su opisali Hopwood i saradnici (1985) uz odgovarajuće modifikacije.

- Talog dobijen centrifugiranjem 10 ml kulture u logaritamskoj fazi rasta ( $OD_{600} = 0,6-0,8$ ) opran je u 500 µl TEN pufera (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl) i resuspendovan u 500 µl PP pufera (0,5 M saharoza, 40 mM  $NH_4$ -acetat, 10 mM Mg-acetat pH 7,0) sa lizozimom (7 mg/ml).
- Čelijska suspenzija je zatim inkubirana na 37°C 30 min.
- Dodato je 250 µl rastvora SDS-a (2%) i smeša je intenzivno mešana na vorteksu sve dok viskozitet nije postao приметно manji (prosečno u trajanju od 1 min).
- Za uklanjanje proteina, rađena je višestruka fenolska ekstrakcija do gubitka međufaze. Dodavano je po 250 µl neutralnog fenol-hloroforma, nakon čega je rastvor intenzivno mešan u trajanju od 30 s, a potom centrifugiran (15 min na 13000 rpm u centrifugi 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemačka).
- Supernatant je pažljivo sakupljen, prebačen u nove mikrotube, a potom su dodati 3 M Na-acetat pH 4,5 (1/10 volumena) i izopropanol (1 volumen).

- Smeša je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi uz lagano mešanje, a potom je ukupna DNK istaložena centrifugiranjem (20 min na 13000 rpm u centrifugi 5424).
- Višak soli iz taloga ukupne DNK uklonjen je pranjem u hladnom etanolu (75%, -20°C).
- DNK je zatim sušena na 37°C i resuspendovana u 50 µl bidestilovane vode. RNK je odstranjivana dodavanjem 1 µl RN-aze (10 mg/ml) i inkubacijom uzorka na 37°C u trajanju od 30 min.
- Količina ukupne DNK je proveravana spektrofotometrijski merenjem optičke gustine (OD<sub>260</sub> i OD<sub>280</sub>) (NanoVue Spectrophotometer GE Healthcare, UK) kvalitet izolovane DNK je procenjen na osnovu izračunavanja odnosa OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>.

### **3.3.2. Mini-metoda za izolaciju plazmidne DNK iz laktokoka i *E. coli***

Izolacija malih količina plazmidne DNK iz *E. coli* i transformisanih laktokoka rađena je po modifikovanoj metodi „JETSTAR Plasmid Kit-MINI“ (Genomed, GmbH, Austrija):

- Čelije iz prekonocne kulture (3 ml za *E. coli* i 10 ml za laktokoke) su taložene centrifugiranjem, a zatim resuspendovane u 200 µl E1 rastvora (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, finalno pH 8,0) koji sadrži RN-azu (100 µg/ml). Za izolaciju plazmidne DNK iz laktokoka, rastvoru E1 je pored RN-aze dodat i lizozim u koncentraciji 4 mg/ml.
- Smeša je potom inkubirana na 37°C u trajanju od 30 min (samo za izolaciju plazmidne DNK kod laktokoka).
- Liza ćelija postignuta je dodatkom 200 µl rastvora E2 (200 mM NaOH i 1% SDS), koji je kod *E. coli* dodat odmah nakon rastvora E1, a u slučaju laktokoka posle inkubacije ćelija na 37°C u prisustvu lizozima.
- Dobijena suspenzija je lagano mešana do homogenizacije lizata, na sobnoj temperaturi, u trajanju od 2 do 5 min.
- Dodavanjem 200 µl rastvora E3 (3,1 M K-acetat, sirćetna kiselina, finalno pH 5,5) uz intenzivno mešanje postignuta je neutralizacija liziranih ćelija.
- Smeša je zatim centrifugirana (10 min, 13000 rpm, centrifuga 5424).

- Dobijeni supernatant prenet je u novu mikrotubu, u koju je dodato 200  $\mu$ l fenol-hloroforma, smeša je intenzivno promešana i centrifugirana 5 min na 13000 rpm u centrifugi 5424.

- Gornja (vodena) faza je prenet u novu mikrotubu, a plazmidna DNK iz rastvora je taložena dodavanjem 0,7 volumena izopropanola i centrifugiranjem (10 min, 13000 rpm, centrifuga 5424).

- Pranje DNK je vršeno hladnim etanolom (75%, -20°C).

- Nakon sušenja na 37°C, plazmidna DNK je resuspendovana u bidestilovanoj H<sub>2</sub>O. RNK je odstranjivana dodatkom 1  $\mu$ L RN-aze (10 mg/ml) i inkubiranjem uzorka na 37°C u trajanju od 30 min.

Izolacija plazmidne DNK koja je korišćena za sekvenciranje rađena je „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden, Nemačka) kitom, uz modifikaciju za laktokoke (dodatak lizozima u pufer za resuspendovanje ćelija i inkubacija na 37°C u trajanju od 1 h).

Količina plazmidne DNK je proveravana spektrofotometrijski merenjem optičke gustine (OD<sub>260</sub> i OD<sub>280</sub>) (NanoVue Spectrophotometer GE Healthcare, UK) kvalitet izolovane DNK je procenjen na osnovu izračunavanja odnosa OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>.

### **3.4. Enzimske reakcije sa DNK**

#### ***3.4.1. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom (engl. Polymerase Chain Reaction)***

Umnožavanje *cmbT* gena PCR metodom urađeno je korišćenjem hromozomalne DNK izolovane iz *L. lactis* NZ9000 kao matrice. Pripremljena je reakciona smeša koja sadrži: 1 x reakcioni pufer (KAPA *Taq* Buffer A sa 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 200  $\mu$ M svakog dezoksinukleotida (dNTP), prajmere (svaki po 2,5  $\mu$ M) i 1 U Kapa *Taq* DNK polimeraze (Kapa Biosystems, USA). Količina DNK matrice u eksperimentima bila je 1 ng.

Umnožavanje željenog fragmenta vršeno je pomoću odgovarajućih prajmera (Tabela 3).

**Tabela 3.** Sekvence prajmera korišćenih za umnožavanje ciljnog gena\*

Prajmer	Gen	Sekvenca prajmera 5'→3'	Th (°C)	Referenca
FcmbT-NcoI	<i>cmbT</i>	CATGCC <u>CATGG</u> AGGAGATTTTATTGCATG	58°C	Ova studija
RcmbT-XbaI	<i>cmbT</i>	GCTCTAG <u>AATG</u> ATTGGCTCTAATTTTTTTC	56°C	Ova studija

\*Sekvence koje prepoznaju restrikcioni enzimi su podvučene

PCR reakcija je rađena po sledećem programu: početna denaturacija 5 min na 94°C, umnožavanje DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacija 90 s na 94°C, vezivanje prajmera 30 s 55°C, polimerizacija 90 s 72°C i finalna polimerizacija 7 min na 72°C.

Dobijeni PCR produkti prečišćavani su propuštanjem kroz kolonice QIAquick PCR Purification KIT/250 (Qiagen GmbH, Nemačka).

#### 3.4.2. Sečenje DNK restrikcionim enzimima

Sečenje restrikcionim endonukleazama (Sambrook et al., 1989) je rađeno u komercijalnim puferima, koji su odgovarajući za korišćene enzime. Uslovi za sečenje DNK restrikcionim enzimima, kao što su količina enzima, pufer i temperatura inkubacije, određivani su prema uputstvu proizvođača.

#### 3.4.3. Ligacija DNK fragmenata

Ligacija DNK fragmenata (Maniatis et al., 1982) rađena je tako što su DNK fragment i vektor sa komplementarnim lepljivim krajevima pomešani u odgovarajućem odnosu u ligacionom puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ditiotreitol, 1 mM ATP). Ligacija DNK je vršena u volumenu od 20 µl. Koncentracija plazmidne DNK dodavane u reakcionu smešu bila je oko 0,1 µg/ml i na tu količinu DNK dodavan je 1 U enzima T4 ligaze (Agilent Technologies, SAD). Ligaciona smeša je inkubirana preko noći na 16°C.



### 3.4.4. Sekvenciranje DNK

Plazmidi izolovani iz *E. coli* i *L. lactis* pomoću „QIAprep Spin Miniprep Kit-a“, su uslužno sekvencirani u servisu za sekvenciranje (Macrogen, Seul, Koreja; Macrogen, Amsterdam, Holandija). Sekvence korišćenih prajmera prikazane su u Tabeli 4. Upoređivanje dobijenih nukleotidnih sekvenci rađeno je pomoću NCBI (engl. National Center for Biotechnology Information) baze podataka, BLAST programom za pretraživanje homologe nukleotidne sekvence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

**Tabela 4.** Sekvence prajmera korišćenih za sekvenciranje ciljnog gena

Prajmer	Gen	Sekvenca prajmera 5'→3'	Referenca
P <sub>nisA</sub> -F	<i>cmbT</i>	GATCTAGTCTTATAACTATACTG	Ova studija
CmbT-R-His	<i>cmbT</i>	AATTGCCATTTCAATTGAACGTTTCAAGCC	Ova studija
MDR-F	<i>cmbT</i>	GACGCCGGAGAGACATATC	Ova studija
MDR-R	<i>cmbT</i>	CTGGAAGGGCATCTCATC	Ova studija

## 3.5. Elektroforeza i elucija DNK

### 3.5.1. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Elektroforeza totalne DNK, plazmidne DNK i PCR-om umnoženih fragmenata rađena je na horizontalnim 1% agaroznim gelovima koji su pravljene rastvaranjem agaroze u 1xTAE puferu (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) uz dodatak etidijum bromida (0,5 µg/ml). Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela, a kao pufer za elektroforezu korišćen je 1xTAE.

Veličine analiziranih linearnih fragmenata određivane su na agaroznim gelovima upoređivanjem dužine puta DNK trake koja se ispituje sa dužinom puta koju su prešli DNK fragmenti poznate veličine. Korišćen je „Gene Ruler™ DNA 1 kb Ladder Mix“ (Fermentas, Litvanija) kao DNK standard.

### **3.5.2. Elucija DNK fragmenata**

Elucija linearizovanih delova DNK dobijenih nakon sečenja restrikcionim enzimima rađena je tako što je posle elektroforeze, isecan deo agaroznog gela u okviru koga se nalazi fragment DNK željene dužine. Potom je iz isečka gela, DNK ekstrahovana pomoću QIAquick Gel extraction kit-a/250 primenom protokola „MiniElute Gel Extraction“ (Qiagen GmbH, Nemačka).

## **3.6. Transformacija ćelija sa DNK**

### **3.6.1. Transformacija *E. coli***

#### **3.6.1.1. Priprema *E. coli* kompetentnih ćelija**

Kompetentne *E. coli* ćelije pripremane su prema modifikovanoj proceduri sa rubidijum hloridom (Hanahan, 1985):

- 100 ml LB medijuma inokulisano je sa 1 ml kulture, dobijene resuspendovanjem 10 kolonija sa sveže, prekonoćne, LA Petri šolje. Ćelije su gajene na 37°C, uz snažnu aeraciju na 180 rpm, do optičke gustine kulture od 0,4 na 600 nm.
- Dalji rast bakterija zaustavljen je hlađenjem kulture na ledu 15 min, a potom su ćelije obarane (25 ml kulture po epruveti) centrifugiranjem (10 min, 5000 rpm, 4°C, centrifuga 5804R Eppendorf, Hamburg, Nemačka).
- Supernatant je odlivan, a talog resuspendovan u 25 ml rashlađenog 0,1 M CaCl<sub>2</sub> uz lagano mešanje i ostavljen na ledu 15 min.
- Nakon ponovnog centrifugiranja (10 min, 5000 rpm, 4°C, centrifuga 5804R), talog je resuspendovan u 2 ml RF2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 15 % glicerol, finalna pH vrednost 6,8).
- Dobijena suspenzija ćelija je, posle hlađenja na ledu od 15 min, raspodeljena u alikvote od po 200 µl. Alikvoti su naglo zamrzavani u tečnom azotu, a zatim čuvani na -80°C do korišćenja.

**3.6.1.2. Transformacija *E. coli* kompetentnih ćelija toplotnim šokom (engl. „Heat shock“)**

- Prilikom korišćenja, prethodno pripremljene kompetentne ćelije *E. coli*, najpre se otapane u ruci, a potom je u njih dodavana DNK (ne više od 200 ng ukupne DNK, u zapremini do 20 µl).
- Smeša je potom prenošena na led 60 min, uz povremeno mešanje.
- Ćelije su izložene termičkom stresu (42°C) u trajanju od 90 s, a potom prenete na led dodatnih 5 min.
- Posttransformaciono oživljavanje ćelija omogućeno je dodavanjem 300 µl LB medijuma i inkubiranjem na 37°C od 30 do 60 min uz intenzivnu aeraciju.
- Alikvoti transformacione smeše utrljani su na odgovarajuće čvrste selektivne LB podloge, koje su inkubirane na 37°C do pojave transformanata (u proseku 24 h).

**3.6.2. Transformacija laktokoka elektroporacijom**

Priprema elektrokompetentnih ćelija i elektroporacija laktokoka rađena je prema proceduri koju su opisali Holo i Nes (1989):

- Iz pojedinačne kolonije sa GM17 šolje zasejana je kultura laktokoka u GM17 tečni medijum i gajena na 30°C preko noći. Prekonoćna kultura je razblažena 100 puta u GM17 medijumu sa 1% glicinom. Posle inkubacije na 30°C do postizanja  $OD_{600nm}=0,2 - 0,6$ , kultura je prenetna na led 15 min.
- Talog ćelija dobijen centrifugiranjem 10 ml kulture (10 min, 4500 rpm, 4°C, centrifuga 5804R), ispiran je dva puta u 5 ml 0,5 M rastvora saharoze i resuspendovan u 200 µl istog rastvora.
- U smešu je dodato 1 µg plazmidne DNK, a nakon stajanja na ledu u trajanju od 15 min, uz povremeno mešanje, suspenzija je prenetna u kivete za elektroporaciju (dijametara 0,2 cm).
- Elektropulsiranje bakterija rađeno je u GENE PULSER aparatu (Eppendorf, Nemačka) sa podešenim uslovima od 24,5 kV/cm, 25 µF i 200 Ω. U kivetu sa suspenzijom pulsiranih ćelija odmah je dodat medijum za regeneraciju (GM17).
- Smeša je prenetna na led 5 min, a potom inkubirana 2 h na 30°C.

- Alikvoti transformacione smeše razmazivani su na čvrste GM17 podloge sa odgovarajućim antibiotikom (hloramfenikol, 5 µg/ml), koje su potom inkubirane na 30°C do pojave transformanata (najčešće 2 – 4 dana).

### **3.7. Metode rada sa RNK**

#### **3.7.1. Izolacija ukupne RNK iz laktokoka**

Izolacija ukupne RNK iz laktokoka rađena je prema „SV Total RNA Isolation Kit“ (Promega, USA) protokolu. Koncentracije izolovanih RNK određivane su pomoću NanoVue spektrofotometra (GE Healthcare, UK).

#### **3.7.2. Reakcija lančanog umnožavanja DNK reverznom transkripcijom (RT-PCR)**

RT-PCR je korišćen da bi se odredio nivo ekspresije *cmbT* gena nakon indukcije  $P_{nisA}$  promotora dodatkom različitih koncentracija nizina. Reverzna transkripcija urađena je pomoću RevertAid reverzne transkriptaze (Fermentas, Litvanija) prema uputstvu proizvođača, koristeći 1 µg ukupne RNK kao matricu i prajmer komplementaran sa šest ostataka histidina (Histag) prisutnih na 3' kraju eksprimiranog CmbT proteina (HISTAG prajmer: 5'-GTGATGGTGATGGTGATG-3'). Ovako sintetisana cDNK uzeta je kao matrica za amplifikaciju PCR metodom u 25 sukcesivnih ciklusa, primenom prajmera FcmbT-NcoI (5'-CATGCCATGGAGGAGATTTTATTGCATG-3') i HISTAG.

### **3.8. Metode rada sa proteinima**

#### **3.8.1. Analiza sekvence proteina**

Primenom različitih kompjuterskih programa, analizirana je sekvenca proteina, njegove potencijalne karakteristike i moguća lokalizacija u ćeliji. Proučavanje proteinske sekvence urađeno je pomoću SUPERFAMILY baze podataka - <http://supfam.org/SUPERFAMILY/cgi-bin/scop.cgi?sunid=103473> (Madera et al., 2004). Za predviđanje lokalizacije proteina u bakterijskoj ćeliji korišćen je PSORT

kompjuterski program - <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/> (Nakai and Horton, 1999), a prisustvo transmembranskih domena u proteinu analizirano je primenom TMHMM softvera <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM> (Sonnhammer et al., 1998). Predviđanje trodimenzionalne strukture proteina rađeno je pomoću Phyre2 servera (Kelley and Sternberg, 2009).

### ***3.8.2. Ekspresija proteina pomoću NICE sistema (engl. Nisin Controlled gene Expression system)***

#### ***3.8.2.1. Priprema nizina***

Kao inducibilni agens za ekspresiju proteina pomoću NICE sistema korišćen je nizin iz *L. lactis* (Sigma, Aldrich, Nemačka). Kako je sadržaj nizina u komercijalnom preparatu 2,5%, za dobijanje stoka koji sadrži 1 mg/ml čistog nizina, pravi se rastvor 40 mg/ml nizina u 0,05% sirćetnoj kiselini. Smeša se ostavi na sobnoj temperaturi 5-10 min, a potom se centrifugira da bi se istaložio nerastvorni materijal. Nizin se potpuno rastvori u bistrom supernatantu. Alikvoti od po 1 ml nizina koncentracije 1 mg/ml, raspodeljeni su u mikrotube i zamrzavani na -20°C do korišćenja. Smrznuti alikvoti su stabilni najmanje godinu dana.

#### ***3.8.2.2. Ekspresija proteina***

Prekonoćne kulture laktokoka, inokulisane su u svež medijum u razblaženju 1:100, gajene do optičke gustine  $OD_{600}=0,2 - 0,5$  i indukovane nizinom (0,1 - 10 ng/ml) (de Ruyter et al., 1996b). Subinhibitorne koncentracije nizina u medijumu omogućavaju ekspresiju ciljnog gena, kloniranog iza inducibilnog  $P_{nisA}$  promotora. Kulture su dalje gajene 2 h, a potom su ćelije sakupljene za dalje analize.

#### ***3.8.3. Izolacija totalnih proteina iz laktokoka***

Nakon indukcije nizinom, ćelije su sakupljene centrifugiranjem (10 min, 4500 rpm, centrifuga 5804R), resuspendovane u puferu za lizu ćelija (8 M urea, 0,1 M  $NaH_2PO_4$ , 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0) i inkubirane 30 min na 37°C. Uzorak je

sonifikovan (Soniprep 150, Engleska) 5 puta po 10 s i alikvoti su uzeti za analizu na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) (50 µg) i afinitetnu hromatografiju na kolonici koja sadrži Ni-NTA agarozu (200 µg). Koncentracija ukupnih proteina određena je BCA testom (Biorad, Nemačka) u kome se koristi bicinhonična kiselina (Smith et al., 1985).

#### ***3.8.4. Izolacija His6-CmbT proteina iz L. lactis***

Za prečišćavanje ciljnog proteina (koji na C-terminalnom kraju poseduje polihistidinski ostatak), iz suspenzije ukupnih proteina korišćena je afinitetna hromatografija na kolonici. Sadržaj kolone ispunjen je nitrilo-tri-sirćetnom kiselinom (NTA) u 6% agaroznom matriksu. NTA je helatni agens i vezuje jone nikla ( $\text{Ni}^{2+}$ ) pomoću četiri koordinativne veze. Polihistidinska sekvenca proteina (6 histidina u nizu) vezuje se za jone nikla, i na taj način se rekombinantni protein zadržava na kolonici do kasnije ekstrakcije.

Alikvot suspenzije dobijen prilikom izolacije totalnih proteina je centrifugiran 20 min na 13000 rpm i 4°C (Eppendorf, centrifuga 5417R). Od supernatanta je odvojeno 20 µl za proveru na SDS-PAGE, a u ostatak je dodato 1 ml Ni-NTA agaroznog matriksa i smeša je inkubirana 1 h uz konstantno mešanje na 4°C. Smeša je nakon inkubacije nanošena na kolonu koja je zatim 3 puta prana sa po 300 µl pufera za pranje (8 M urea, 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 M Tris-HCl, pH 6,3). Protein je eluiran sa kolonice propuštanjem pufera sa kiselim pH (8 M urea, 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 M Tris-HCl, pH 4,5). Posle svakog koraka prečišćavanja proteina, uziman je alikvot koji je korišćen za SDS-PAGE i Western blot analize.

##### ***3.8.4.1. Određivanje koncentracije proteina***

Koncentracija proteina određivana je Bradfordovim esejom (Bradford, 1976). Kao standard za pravljenje standardne krive korišćen je BSA protein poznatih koncentracija. Pripremljeno je nekoliko razblaženja proteinskog standarda u opsegu 1-25 µg/ml proteina. U 0,8 ml standarda, uzorka i blanka dodavano je 0,2 ml 5 x Bradfordovog reagensa. Nakon inkubacije 5 min na sobnoj temperaturi merena je

optička gustina na 595 nm na UltraSpec 3300 pro aparatu (Amersham Biosciences, Biochrom Ltd., Cambridge, Engleska). Iz standardne krive je očitavana koncentracija proteina. Bradfordov reagens (5 x) je pravljen na sledeći način: 100 mg boje Comassie brilliant blue G 250 rastvarano je u 50 ml 95% etanola, tome je dodavano 100 ml 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i 50 ml bidestilovane H<sub>2</sub>O, smeša je filtrirana kroz filter papir i čuvana na 4°C.

### ***3.8.5. Elektroforeza proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu***

Totalni proteini izolovani iz laktokoka, kao i alikvoti uzeti u svakom koraku prilikom prečišćavanja ciljnog proteina, analizirani su pomoću SDS-poliakrilamidne elektroforeze. Pri elektroforezi u prisustvu SDS-a proteini vezuju za sebe molekule deterđenta, postaju negativno naelektrisani i putuju ka anodi. Pređeni put kroz gel je u direktnoj korelaciji sa njihovim molekulskim masama.

Na aparaturi za vertikalnu elektroforezu (Hofer, Minesota, SAD) korišćen je diskontinuirani sistem gelova, koji podrazumeva gel za koncentrisanje i gel za razdvajanje.

U sastav gela za koncentrisanje ulaze:

- 4% akrilamid, 0,2% bisakrilamid, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% TEMED i 0,1% NH<sub>4</sub>-persulfat; a gel za razdvajanje sadrži: 15% akrilamid, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS 0,1% TEMED i 0,1% NH<sub>4</sub>.persulfat.

Elektroforeza je tekla 16 h pri konstantnoj jačini struje od 10 mA po gelu. Puffer za elektroforezu sadržavao je 0,025 M Tris baze, 0,192 M glicina i 0,1% SDS, finalno pH 8,3. Kada indikatorska boja (bromfenol plavo) dođe do 0,5 cm od ivice gela, sa ploče za elektroforezu je odstranjivan gel za koncentrisanje. Gel za razdvajanje je fiksiran i bojen preko noći u rastvoru koji sadrži 45% metanola, 47% vode, 8% sirćetne kiseline i 0,5% komazi-plave (Coomassie brilliant blue R250) uz lagano mešanje na mešalici. Odbojavanje gela je vršeno u rastvoru koji sadrži 10% metanola, 82% vode i 8% sirćetne kiseline uz lagano mešanje. Rastvor za odbojavanje je menjan na 2 do 3 h, a regenerisan je propuštanjem kroz aktivni ugalj koji za sebe vezuje Coomassie brilliant blue R250.

### 3.9. Western blot analiza

Transfer proteina sa SDS-PAGE gela na polivinil difluorid (PVDF) membranu (Millipore, USA) urađen je pomoću “Semi-dry Fast blot” (Fast blot B43, Biometra, Germany) aparata prema uputstvu proizvođača. Nakon transfera proteina, PVDF membrana je sušena na vazduhu, a potom inkubirana preko noći na 4°C u modifikovanom fosfatnom puferu sa solima (PBS) (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, do 1 l H<sub>2</sub>O) koji sadrži 0,1% (v/v) Tween-a 20 i 5% (w/v) mlečnog praha. Posle zasićenja, membrana je inkubirana 1 h u PBS-u sa 0.1% (v/v) Tween-om 20 i Anti-His6-peroksidaza antitelom konjugovanim sa peroksidazom rena (HRP) (Roche, Nemačka) u odnosu 1:1000. Signal je detektovan pomoću SIGMA FAST™ 3, 3'-Diaminobenzidin tableta (Sigma Aldrich Chemie, Nemačka).

### 3.10. Određivanje krive rasta kod laktokoka

Prekonoćne kulture *L. lactis* NZ9000 i *L. lactis* NZ9000/pCT50 sojeva razblažene su u svežem GM17 medijumu i CDM medijumu koji sadrži 0,1 x metionin i 10 x metionin/10 x cistein. Nakon postizanja eksponencijalne faze rasta, dodavan je nizin u finalnoj koncentraciji 1 ng/ml. U cilju postizanja istih eksperimentalnih uslova, nizin je dodavan i u medijum sa kontrolnim sojem. Zapremine od 100 µl kultura korišćene su za pravljenje serijskih razblaženja u fiziološkom rastvoru i nakapavanje ćelija na čvrste GM17 šolje (uz dodatak hloramfenikola kada je potrebno). Postupak je ponavljan svakog sata. Napravljene su krive rasta za *L. lactis* NZ9000 i *L. lactis* NZ9000/pCT50 u odgovarajućem medijumu i izračunato vreme generacije za svaki soj.

#### 3.10.1. Izračunavanje srednjeg vremena generacije

Srednje vreme generacije (*g*) je prosečno vreme potrebno da se broj ćelija u kulturi udvostruči. Računa se prema sledećoj jednačini:

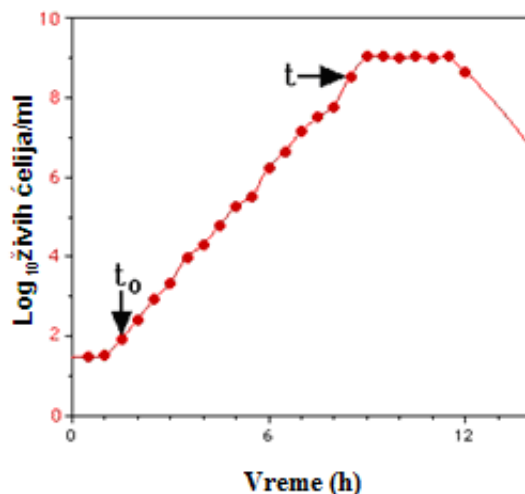
$$\log_{10}N_t = \log_{10}N_0 + g \log_{10}2 \quad (3)$$

ili

$$g = (\log_{10}N_t - \log_{10}N_0) / \log_{10}2 \quad (4)$$



gde  $N_t$  i  $N_0$  predstavljaju broj ćelija u vremenu  $t$  i  $t_0$  (Slika 11).



**Slika 11.** Kriva rasta bakterija.

Izračunata  $g$  vrednost predstavlja broj generacija u vremenu  $t - t_0$ .

### 3.11. Ispitivanje osetljivosti laktokoka na različite toksične agense

Osetljivost sojeva *L. lactis* NZ9000/pNZ8113 i *L. lactis* NZ9000/pCT50 na različite toksične agense ispitivana je u GM17 tečnom medijumu (Sakamoto et al., 2001). Prekonoćne kulture laktokoka, razblažene su u svežem medijumu i gajene na 30°C do postizanja eksponencijalne faze rasta. Potom su kulture razblažene do OD<sub>660</sub> od 0,05, dodat je nizin u koncentraciji 1 ng/ml i alikvoti (150 µl) su preneti u mikrotitar ploču sa 96 polja. U ploči su se nalazile rastuće koncentracije različitih toksičnih agenasa (150 µl): etidijum bromid, holat (natrijum tauro dezoksi holat), Hoechst 33342, rodamin 6G, kanamicin, streptomycin, apramicin sulfat, tobramicin, gentamicin sulfat, geneticin disulfat, spektinomycin, puromicin, eritromicin, azitromicin, ampicilin, penicilin G i penicilin V, tetraciklin, doksiciklin, rifampicin, bacitracin, cefalosporin C, cefalotin (natrijumova so), novobiocin, nalidiksinska kiselina, linkomicin, vankomicin, ciprofloksacin, norfloksacin i pipemidinska kiselina (u opsegu od 0 do 256 µg/ml), sulbaktam, sulfametoksazol, sulfizoksazol (sulfafurazol), sulfanilamid, sulfadiazin,

sulfakinoxalin (natrijumova so), sulfametizol, sulfametoksipiridan, sulfapiridin (u koncentracijama od 0 do 50 mg/ml) u GM17 medijumu. U analize nije uključen hloramfenikol, jer se na vektoru pCT50 nalazi gen za hloramfenikolsku rezistenciju. Gustina ćelija, praćena je merenjem na OD<sub>620</sub> svakih 30 min u toku 24 h na uređaju Multiscan RC (Labsystems, UK). Eksperimenti su urađeni u triplikatu. Koncentracija antimikrobnog agensa koja inhibira rast 50% ćelija u uzorku (IC<sub>50</sub>), određena je korišćenjem Graph Pad Prism 5 softvera, korišćenjem nelinearne regresije (Dose-response curves – Inhibition, „log(inhibitor) vs. normalised response“):

$$Y=100/(1+10^{((X-\text{LogIC}_{50}))}) \quad (5)$$

izvedene iz Michaelis-Menten jednačine koja opisuje enzimsku aktivnost kao funkciju koncentracije supstrata i to

$$Y=V_{\text{max}}*X/(K_m+X) \quad (6)$$

gde je Y aktivnost enzima izražena u različitim jedinicama, u zavisnosti od enzima. X je koncentracija supstrata izražena u različitim jedinicama za koncentraciju.

U svrhu procene postojanja statistički značajne razlike između dve srednje vrednosti dva niza rezultata korišćen je Studentov t-test.

### 3.12. Transportni eseji

U cilju dokazivanja da je CmbT posredovan efluks supstrata energetski zavisna, praćen je transport etidijum bromida (EtBr) i boje Hoechst 33342 merenjem intracelularnih koncentracija ovih jedinjenja u *L. lactis*. EtBr i Hoechst 33342 imaju sposobnost da nakon vezivanja za DNK fluoresciraju, usled čega je njihov efluks praćen merenjem fluorescence pomoću spektrofluorimetra.

*L. lactis* NZ9000 i *L. lactis* NZ9000/pCT50 ćelije indukovane nizinom sakupljene su centrifugiranjem, oprane tri puta sa po 10 ml 50 mM K-HEPES, pH=7,0, uz dodatak 5 mM MgSO<sub>4</sub> i resuspendovane do OD<sub>660</sub>=0,5 u istom puferu radi merenja fluorescencije.

Za merenje transporta EtBr ćelije su tretirane 5 min sa 20 mM glukozom, pre dodatka EtBr u finalnoj koncentraciji 10 μM. Pored toga, praćen je uticaj ATP-aznog inhibitora orto-vanadata na efluks EtBr. U tom slučaju, ćelije su prvo tretirane sa 10 mM L-argininom u prisustvu 0,5 mM orto-vanadata (Sakamoto et al., 2001).

Fluorescencija kompleksa EtBr-DNK merena je korišćenjem ekscitacione i emisione talasne dužine od 500 i 580 nm (Bolhuis et al., 1995).

Za merenje fluorescencije Hoechst-a 33342 (Fluka, Biochemica, Switzerland) ćelije su najpre tretirane glukozom u prisustvu i odsustvu jonofora valinomicina i nigericina (svaka u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$ ) (Putman et al., 1999). Intenzitet fluorescencije praćen je u vremenskom intervalu od 5 min na spektrofluorimetru (Jobin Yvon, Horiba Group, France) korišćenjem eksitacionih i emisionih talasnih dužina 355 i 457 nm.

Kinetika fluorescencije EtBr i Hoechst-a određena je nelinearnom regresionom analizom, primenom Graph Pad Prism 5 sofvera.

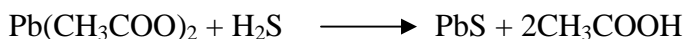
### **3.13. Detekcija tiola**

Određivanje slobodnih tiolnih grupa rađeno je primenom 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoeve kiseline (DTNB) prema metodi koju je opisao Uren (1987), sa određenim modifikacijama:

- prekončne kulture laktokoka su razblažene u hemijski definisanom medijumu (CDM) koji sadrži 0,1 x metionin i 10 x metionin/10 x cistein i inkubirane na 30°C do optičke gustine od  $\text{OD}_{600}$  0,5;
- ekspresija CmbT proteina indukovana je dodatkom nizina u finalnoj koncentraciji 1 ng/ml i inkubacijom 2 h na 30°C;
- alikvoti (500  $\mu\text{l}$ ) kulture su preneti u nove mikrotube, dodato je 250  $\mu\text{l}$  trihlorsirćetne kiseline (TCA) i ćelije su oborene centrifugiranjem (1500 rpm, 15 min, centrifuga 5424);
- supernatant (100  $\mu\text{l}$ ) je pomešan sa 400  $\mu\text{l}$  Tris HCl pH 8,8 i 40  $\mu\text{l}$  DTNB;
- suspenzija je inkubirana na 37°C 1 h, a intenzitet dobijene žute boje određen je pomoću spektrofotometra (Ultrospec 500- 1100 pro, Amersham, Biosciences, UK), merenjem apsorbance na 412 nm.

### 3.14. Određivanje H<sub>2</sub>S

Određivanje slobodnog vodonik sulfida zasniva se na reakciji:



pri čemu je intenzitet braon boje taloga (PbS) srazmeran količini oslobođenog H<sub>2</sub>S.

Prekonoćne kulture *L. lactis* NZ9000 i *L. lactis* NZ9000/pCT50 sojeva razblažene su u svežem GM17 medijumu i CDM medijumu koji sadrži 0,1 x metionin i 10 x metionin/10 x cistein. Nakon postizanja eksponencijalne faze rasta, dodavan je nizin u finalnoj koncentraciji 1 ng/ml. U cilju postizanja istih eksperimentalnih uslova, nizin je dodavan i u medijum sa kontrolnim sojem. Filter papir natopljen je sa 100 µl 0,25M Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> i postavljen na vrh epruvete tako da ne dodiruje medijum. Kulture su inkubirane na 30°C preko noći.

### 3.15. Modeliranje, optimizacija i molekulska dinamička studija CmbT proteina

Homologni model CmbT proteina dobijen je korišćenjem Phyre2 (engl. Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0) servera (Kelley and Sternberg, 2009). Detaljan opis metoda primenjenih u Phyre2 serveru dali su Bennett-Lovsey i saradnici (2008). Phyre2 server koristi baze podataka poznatih struktura proteina, poput Strukturne klasifikacije proteina (engl. Structural Classification of Proteins - SCOP) i Proteinske baze podataka (engl. Protein Data Bank - PDB) (Berman et al., 2000). Prilikom fomiranja homolog proteina vršeno je poređenje primarne strukture ispitivanog proteina i svih proteina iz baza podataka. U bazi podataka je takođe smeštena i poznata i predviđena sekundarna struktura ovih proteina. Sekvenca CmbT proteina je upoređena sa bazom podataka i pomoću PSI-Blast programa dobijene su sekvence sa višim i nižim stepenom homologije u odnosu na CmbT (Bennett-Lovsey et al., 2008). Precizno upoređivanje CmbT sekvence sa bazom podataka je ključni korak u formiranju ispravnog 3D modela ispitivanog proteina. Validiran metod za automatsku procenu usklađenosti sekvenci (Tress et al., 2003) je implementiran u Phyre2 server. Svakom delu CmbT strukture koji se podudario sa delom strukture poredbenog proteina, dodeljena je vrednost pouzdanosti predviđanja. Regioni CmbT proteina sa

odgovarajućom pouzdanošću predviđanja su obeleženi bojama, od crvene (visok stepen pouzdanosti) do plave (veoma mala pouzdanost).

Homologi model CmbT proteina je formiran na osnovu struktura poredbenih proteina: d1pw4a, c2gfpA, c4apsB, c2xutc, c3o7pA, a1pv7a, c2g9pA, c3b9yA, c3v5uA, d3proc1 i c2vxhF. Za korekciju mogućih strukturnih grešaka i formiranje pouzdanog CmbT modela korišćen je Schrödinger-Protein Preparation Wizard (Schrödinger, 2011 Protein Preparation Wizard, Epic version 2.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011, Impact version 5.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011, Prime version 3.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011), u okviru Maestro 2011 programa (Maestro, version 9.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011). Dobijeni model je dalje optimizovan kombinacijom OPLS polja sila i GB/SA efektivnog solvacionog modela u MacroModel programu (MacroModel, version 9.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011).

Polazeći od optimizovane strukture CmbT proteina, molekulske dinamičke simulacije su izvršene primenom MacroModel programa. Proteinski parametri su opisani standardnim AMBER poljem sila za bioorganske sisteme (Duan et al., 2003). Model CmbT je ispitivan u vodenom rastvoru. Maksimalna vrednost rastojanja od 7 Å za Van der Waals-ove, 12 Å za elektrostatičke interakcije i 4 Å za vodonične veze su korišćena za izračunavanje intermolekulskih interakcija. SHAKE je korišćen za veze u kojima učestvuju vodonikovi atomi (Ryckaert et al., 1977). Sistemi sa najnižom energijom su postepeno zagrevani do 300 K pri konstantnoj sili, pri čemu je usledio period konstantnog pritiska od 50 ps u cilju povećanja gustine, dok su zadržana ograničenja za kompleksne atome. Posle toga je usledila faza molekulske dinamičke simulacije, koja je trajala 4 ns sa intervalima od 1,5 fs.

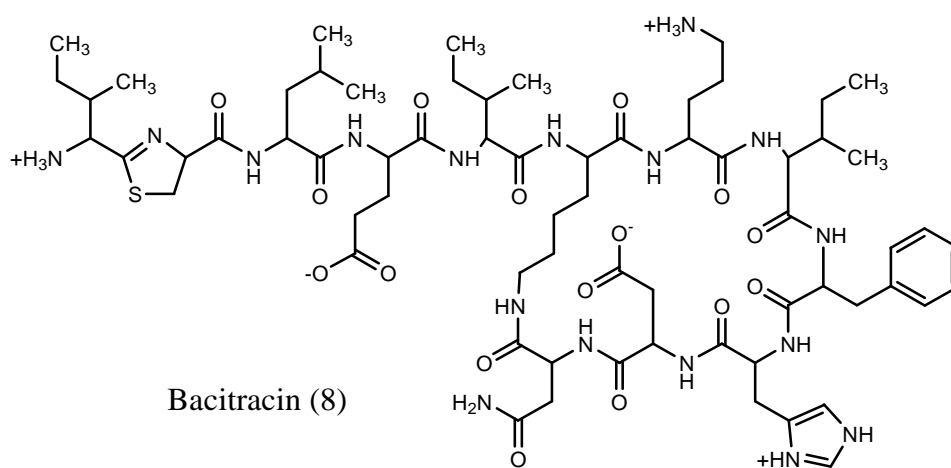
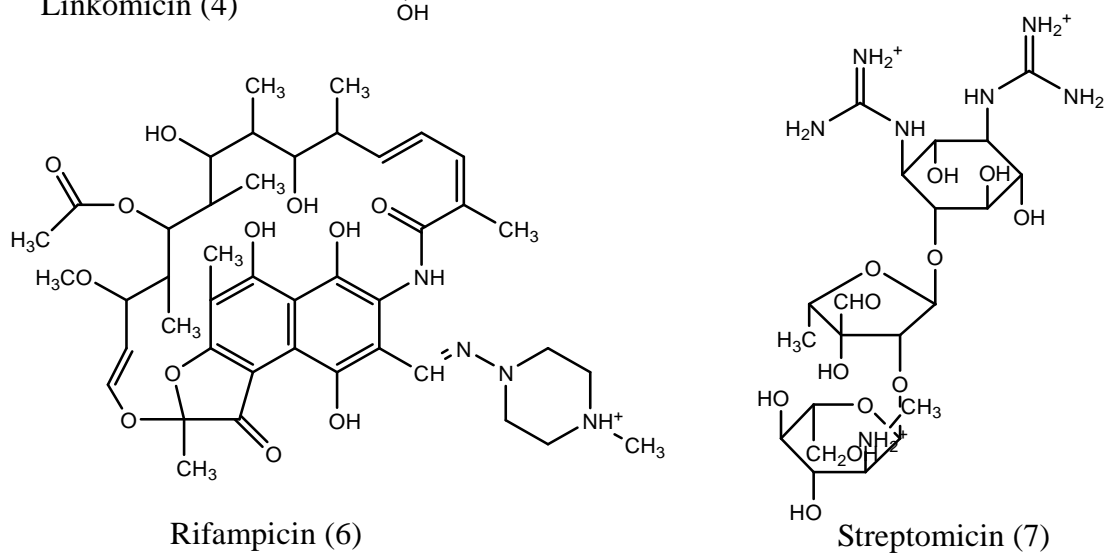
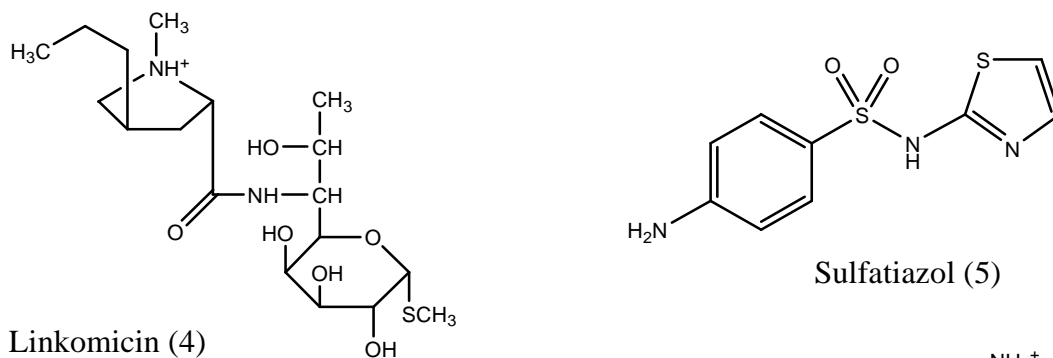
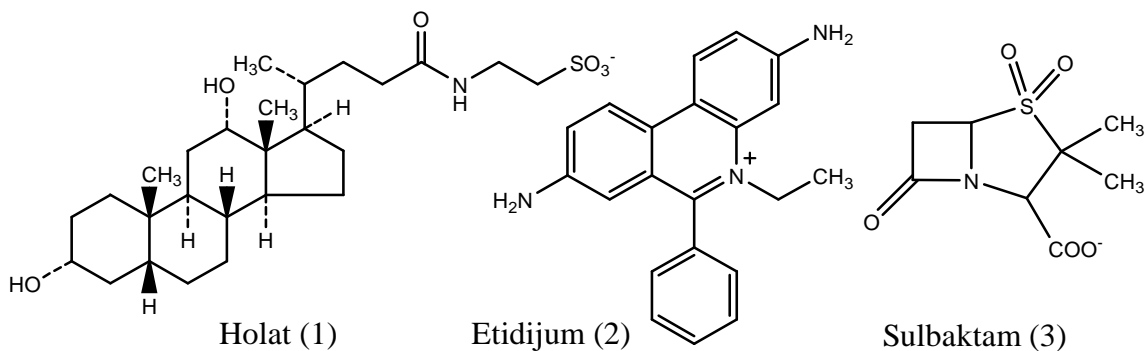
Primenjeni postupak omogućio je preciznu procenu energija optimizovanog CmbT modela koji je na kraju ispitan primenom Ramachandran grafika (Maestro, version 9.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011).

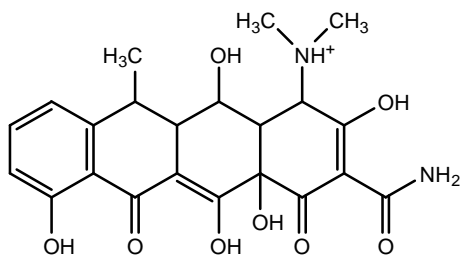
Za predviđanje CmbT ligand-vezujućih mesta primenjen je 3DLigandSite web server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dligandsite>) koji se zasniva na uspešnim manuelnim metodama koje se koriste za procenu tehnika za predviđanje strukture proteina (engl. Critical Assessment of techniques for protein Structure Prediction -

CASP8). Ligandi vezani za strukture slične ispitivanom CmbT proteinu se superponiraju na model i koriste za predviđanje mesta vezivanja (Wass et al., 2010).

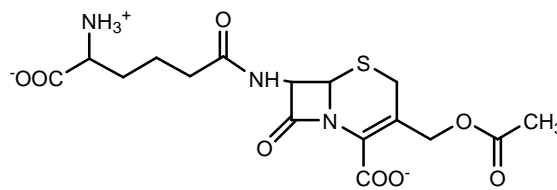
### **3.16. Molekulsko modeliranje**

Vrednosti relativnih rezistencija (RR) dobijene su na osnovu  $IC_{50}$  vrednosti kontrolnog (*L. lactis* NZ9000) i indukovanog (*L. lactis* NZ9000/pCT50) soja u prisustvu različitih ispitivanih jedinjenja. Negativan logaritam relativne rezistencije je izračunat i korišćen kao **zavisno** (Y) promenljiva u QSAR analizi. Za sva ispitivana jedinjenja izračunate su  $pK_a$  vrednosti i odabrani dominantni molekularni/katjonski oblici pri pH 5,0 pomoću MarvinSketch 5.5.1.0 programa (ChemAxon MarvinSketch 5.5.1.0 program, Budapest, Hungary, 2011. [www.chemaxon.com/products.html](http://www.chemaxon.com/products.html)). Dominantne forme testiranih jedinjenja (Slika 12), korišćene su za 3D-strukturnu optimizaciju.

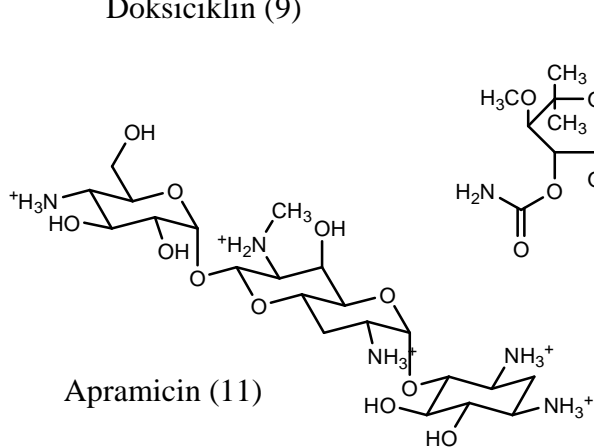




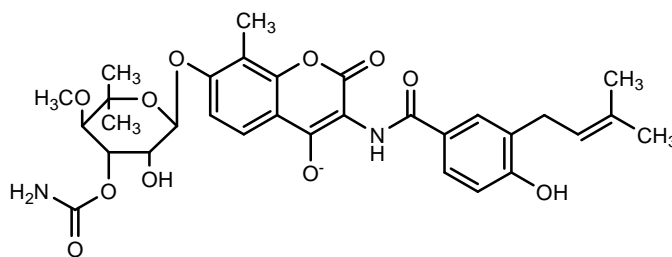
Doksiciklin (9)



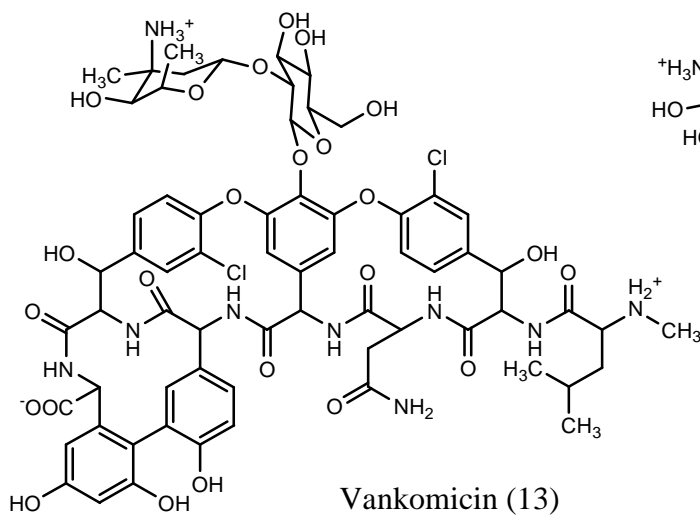
Cefalosporin C (10)



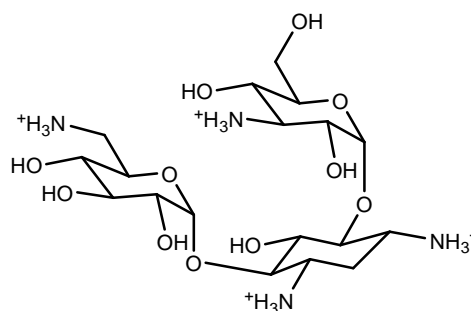
Apramicin (11)



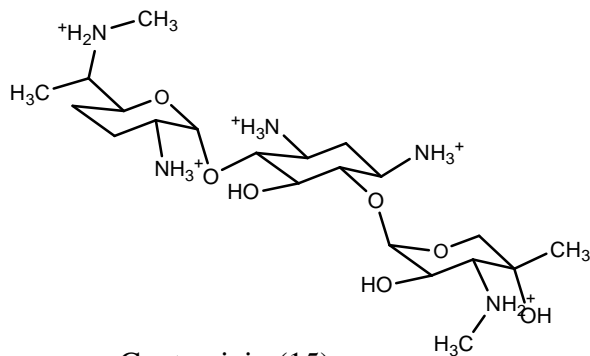
Novobiocin (12)



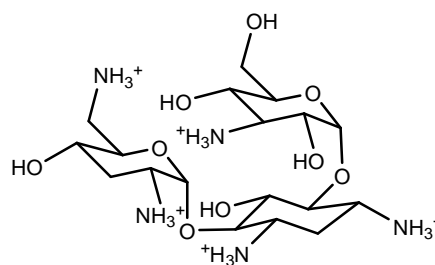
Vankomicin (13)



Kanamicin (14)

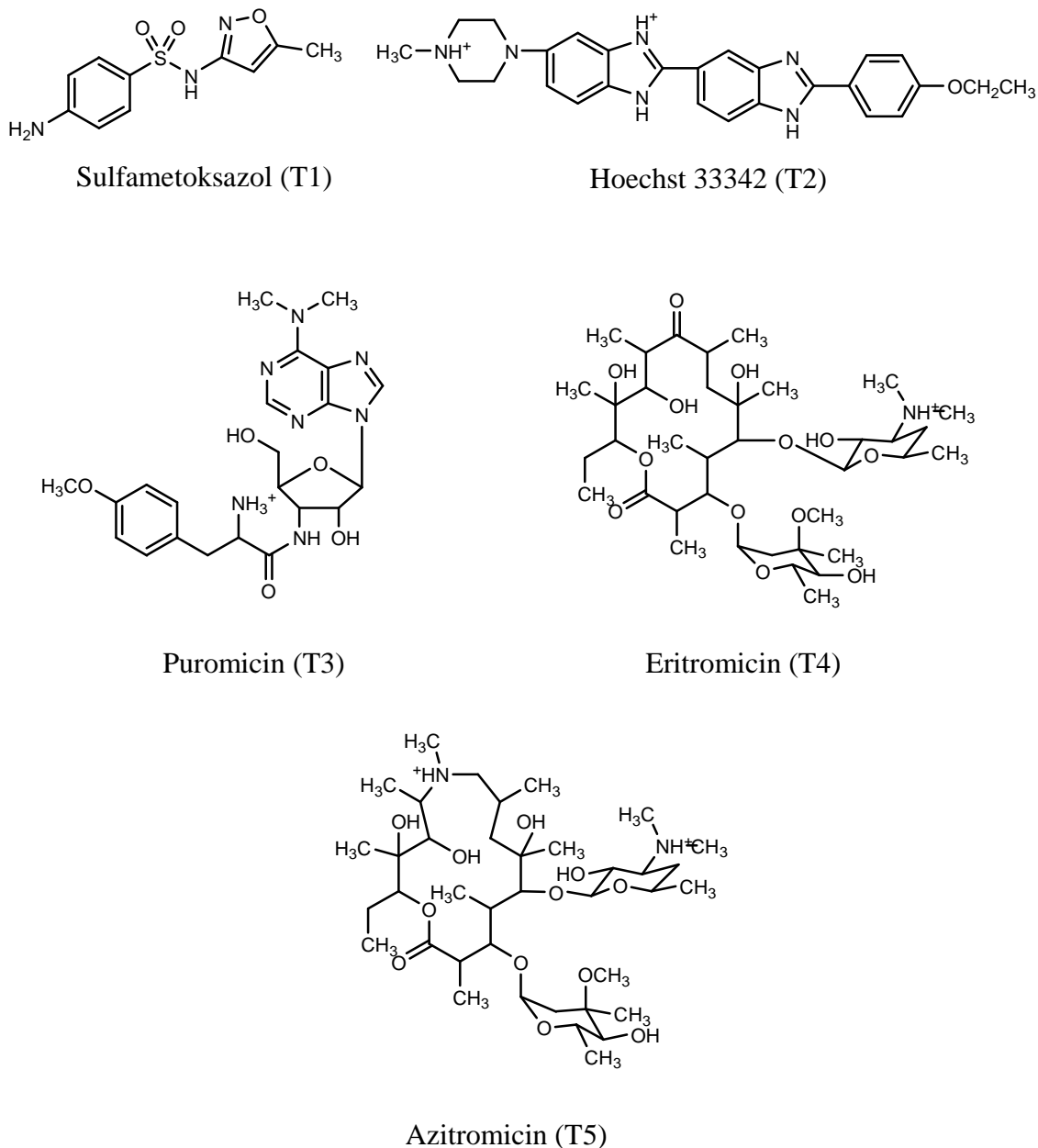


Gentamicin (15)



Tobramicin (16)





**Slika 12.** Strukturne formule jedinjenja korišćenih za 3D-QSAR studiju. Prikazane strukture predstavljaju najdominantnije forme jedinjenja pri pH 5,0.

Kompletna geometrijska optimizacija odabranih dominantnih oblika izvršena je prvo primenom semi-empirijskog PM3 metoda (Stewart, 1989a, 1989b), a zatim HF/3-21G nivoa *ab initio* teorije (Fischer, 1977) u Gaussian 98 programu (Gaussian 98 (Revision A.7) Frisch MJ et al Gaussian, Inc., 1998, Pittsburgh PA). Usled velike molekulske mase, optimizacija konformacije rifampicina, bacitracina i vankomicina je izvršena samo primenom PM3 metoda. Odabrane metode i bazni setovi su uspešno

korišćeni za optimizaciju srodnih organskih jedinjenja (Nikolic et al., 2009; Barone et al., 2013).

### 3.17. 3D-QSAR studija

3D-QSAR studije ispitivanih jedinjenja izvedene su u Pentacle 1.0.6 programu (Pentacle, Version 1.0.6.; Molecular Discovery Ltd, Perugia, Italy, 2009. [http://www.moldiscovery.com/soft\\_pentacle.php](http://www.moldiscovery.com/soft_pentacle.php)) i Schrödinger-Phase software (LigPrep, version 2.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011 and Phase, version 3.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011) u okviru Maestro 2011 programa (Maestro, version 9.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011).

3D-QSAR analiza započeta je izračunavanjem trodimenzionalnih mapa energija (engl. GRID based Molecular Interaction Fields-MIFs) između ispitivanih molekula i četiri hemijske „probe“, koje predstavljaju male hemijske grupe sa definisanim osobinama: DRY „proba“ predstavlja hidrofobne interakcije; O „proba“ je  $sp^2$  karbonilni kiseonikov atom, akceptor vodonične veze; N1 je neutralni planarni NH, kao u amidu, donor vodonične veze i TIP „proba“ je deskriptor molekuskog oblika. Rastojanje u mreži je podešeno na 0,5 Å, a MACC2 korekcija geometrije na 1,6 Å. Energija interakcije između probe i molekula je izračunata u svakoj tački mreže kao zbir Lennard-Jones energije ( $E_{lj}$ ), energije vodoničnih veza ( $E_{hb}$ ), energije elektrostatičkih interakcija ( $E_{el}$ ) i entropije (S) (Pastor et al., 2000):

$$E_{xyz} = \sum E_{ij} + \sum E_{el} + \sum E_{hb} \quad (7)$$

Pentacle program automatski prevodi dobijene mape interakcionih energija u deskriptore nezavisne od preklapanja mapa ispitivanih jedinjenja (engl. GRID Independent Descriptors - GRIND i GRIND2 deskriptori). GRIND pristup ima za cilj da izdvoji podatke sadržane u MIF i prevede ih u nove tipove promenljivih čije vrednosti ne zavise od orijentacije molekula. To se postiže primenom optimizacionog algoritma koji kao funkciju procene (engl. scoring function) koristi intenzitet polja i uzajamna rastojanja između izabranih čvorova. Dobijene promenljive formiraju matricu deskriptora koja se može analizirati primenom PCA (engl. Principal Component Analysis) i PLS (engl. Partial Least Squares) regresione analize. Analiza osnovnih

komponenti (PCA) je korišćena za dobijanje mape koja opisuje sličnosti i razlike između analiziranih jedinjenja, dok je analiza parcijalno najmanjih kvadrata (PLS) regresiona analiza primenjena za formiranje 3D-QSAR modela (Eriksson et al., 2001). Procena kvaliteta i predviđajuće sposobnosti formiranih modela je izvršena na osnovu vrednosti parametara: ukrštene validacije (engl. Leave-One-Out Cross-Validation - LOO-CV) ( $Q^2(Y)$ ) (Allen, 1974), koeficijenta korelacije ( $R^2_{\text{Observed vs. Predicted}}$ ), srednje kvadratne greške procene (engl. Root Mean Squared Error of Estimation - RMSEE) i srednje kvadratne greške predviđanja (engl. Root Mean Squared Error of Prediction - RMSEP).

Ukrštena validacija se zasniva na isključivanju jednog para podataka ( $X_i, Y_i$ ) iz ispitivanog seta, a zatim formiranju nove regresione jednačine korišćenjem preostalih  $n-1$  podataka. Dobijeni regresioni model sa  $n-1$  podataka se zatim koristi za predviđanje vrednosti  $Y_i$  isključenog jedinjenja. Razlika između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti  $Y$  se računa za svaki model prema formuli  $e_{(i)=y_i - \hat{y}_i}$ . Na osnovu predviđene rezidualne sume kvadrata, PRESS (engl. Predicted Residual Sum of Squares) i ukupne sume kvadrata, SSTo (engl. Sum of Squares Total) izračunata je vrednost  $Q^2(Y)$ :

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2 \quad (8)$$

$$SSTo = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (9)$$

gde je  $\bar{y} = \sum_{i=1}^n \frac{y_i}{n}$  (10)

$$Q^2(Y) = 1 - \frac{PRESS}{SSTo} \quad (11)$$

U prikazanim formulama  $n$  predstavlja broj podataka koji formiraju regresionu jednačinu,  $y_i$  eksperimentalno dobijenu vrednost i  $\hat{y}_i$  vrednost predviđenu datim regresionim modelom.

PLS modeli sa  $Q^2(Y) \geq 0.5$  se smatraju dovoljno pouzdanim za predviđanje zavisne promenljive  $Y$  (Wold et al., 1993).

Sposobnost modela da izvrši predviđanje jedinjenja u trening setu procenjena je na osnovu vrednosti RMSEE:

$$RMSEE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (12)$$

gde je  $n$  broj uzoraka u trening setu, a  $y_i$  i  $\hat{y}_i$  predstavljaju redom eksperimentalne i predviđene vrednosti jedinjenja u trening setu.

Sposobnost modela da izvrši predviđanje jedinjenja u test setu procenjena je na osnovu vrednosti RMSEP:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (13)$$

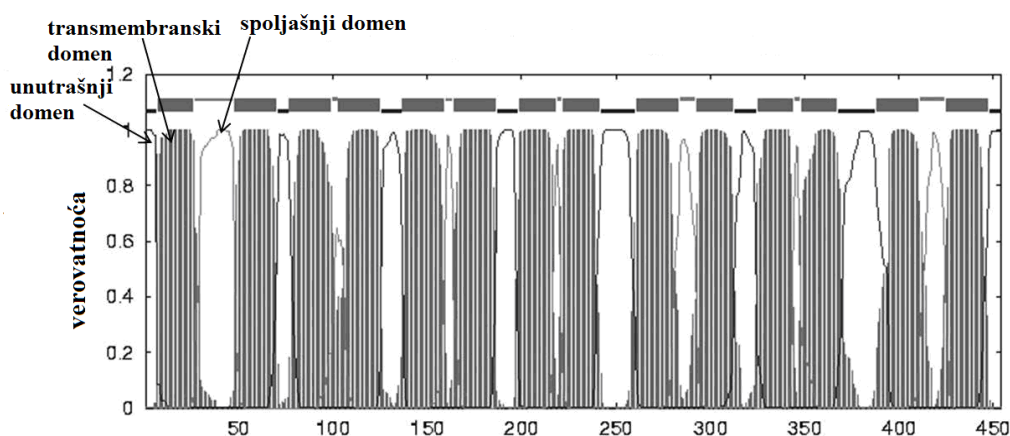
gde je  $n$  broj uzoraka u test setu, a  $y_i$  i  $\hat{y}_i$  predstavljaju redom eksperimentalne i predviđene vrednosti jedinjenja u test setu.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Kompjuterska analiza CmbT proteina

U cilju karakterizacije potencijalne strukture i lokalizacije CmbT proteina u bakterijskoj ćeliji urađena je kompjuterska analiza aminokiselinske sekvence CmbT proteina. U genomu *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 *cmbT* gen je anotiran kao *llmg1104* i kodira transmembranski integralni protein veličine 454 aminokiseline i pokazuje homologiju sa 2.A.1.3.X supstrat/H<sup>+</sup> antiporter-2 subfamilijom.

Analiza proteinske sekvence pomoću Superfamily baze podataka <http://supfam.org/SUPERFAMILY/cgi-bin/scop.cgi?sunid=103473> (Madera et al., 2004) pokazala je da je CmbT potencijalni transporter koji pripada MFS familiji proteina. Pored toga, predviđanje ćelijske lokalizacije proteina urađeno pomoću PSORT programa pokazalo je da je CmbT **membranski** protein sa **12** hidrofobnih transmembranskih domena (TMS). Međutim, model sekundarne strukture CmbT proteina, dobijen analizom pomoću TMHMM softvera ukazuje na prisustvo **14** hidrofobnih domena (Slike 13 i 14). I amino i karboksilni krajevi proteina su orijentisani ka citoplazmatičnoj strani membrane, a većina ekstramembranskih lukova je male dužine, što je karakteristično za MFS transportere



**Slika 13.** Grafički prikaz transmembranskih domena u CmbT proteinu dobijen analizom pomoću TMHMM softvera.

```

MNKNNHFHLL GAVIATGILS FSGVLIETAM NVTFPTLINE FGLSTSKIQW
VTTIYLLVIA ITIPLSSYFN ERFSARKLFL VANLIFLVGV LTNCFSPNFA
MLLFGRLQG VGTGIGLPLM FHLILTKAPL HKRGMGGIG TLTTSIAPAI
GPTYGGIISN SLDWRYIYIF LLPLVWISLV LGLACLREG EKTPKKLALR
PVIALSIMFF AFISALSAEH LMTFALLFIV GLVGAFLFVQ FNRKESLIDL
GILKNHRFVA LIFSLLVYQA LLLGLSFVLP SFIQVSAGFS SSVAGLFMFS
GALIGAVLAP ISGKVLQIG ARKPITGLI LAALGLALIF VFLPTKSLAL
LLGAHIVLML GLGISYSNLM TCSSLTATD QLSGALNVN TLQQFIGAVA
TAVVATLSI FQGLNGFKVG TSHGTSIILA LFFILIIIVSL IVSFPNLKKI
RANH

```

ALOM: Klein et al's method for TM region allocation

Init position for calculation: 1

Tentative number of TMS(s) for the threshold 0.5: 12

INTEGRAL	Likelihood = -4.94	Transmembrane	10 - 26
INTEGRAL	Likelihood = -3.24	Transmembrane	51 - 67
INTEGRAL	Likelihood = -5.84	Transmembrane	78 - 94
INTEGRAL	Likelihood = -11.57	Transmembrane	169 - 185
INTEGRAL	Likelihood = -7.17	Transmembrane	202 - 218
INTEGRAL	Likelihood = -9.92	Transmembrane	223 - 239
INTEGRAL	Likelihood = -6.90	Transmembrane	259 - 275
INTEGRAL	Likelihood = -5.36	Transmembrane	293 - 309
INTEGRAL	Likelihood = -9.87	Transmembrane	327 - 343
INTEGRAL	Likelihood = -7.43	Transmembrane	348 - 364
INTEGRAL	Likelihood = -4.25	Transmembrane	395 - 411
INTEGRAL	Likelihood = -15.66	Transmembrane	426 - 442
PERIPHERAL	Likelihood = 0.85	(at 110)	

ALOM score: -15.66 (number of TMSs: 12)

**Slika 14.** Aminokiselinska sekvenca CmbT proteina. Transmembranski domeni u proteinu dobijeni TMHMM programom.

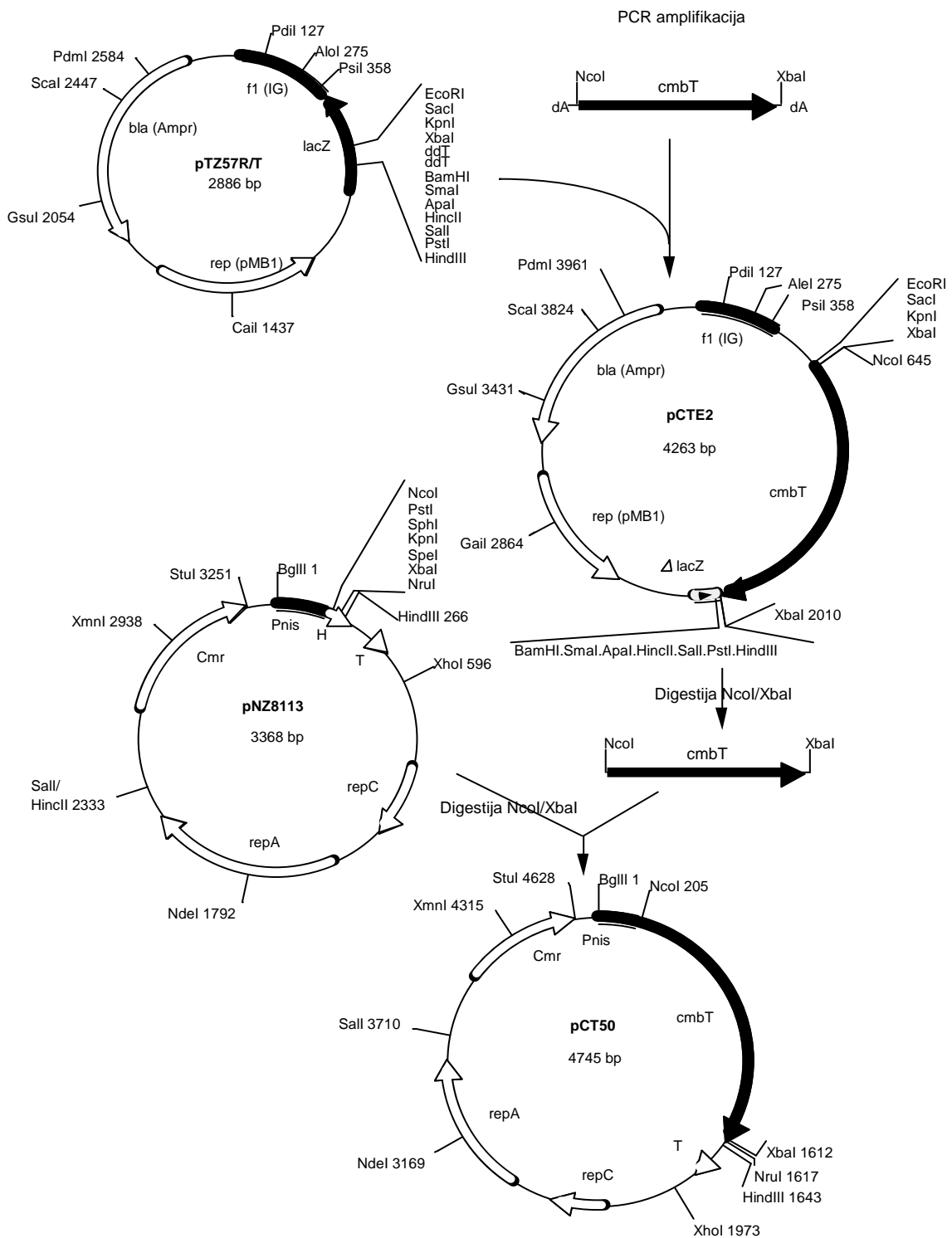
Upoređivanjem proteinske sekvence pomoću NCBI baze podataka, BLAST programom, dobijeno je da CmbT pokazuje visok stepen homologije sa dva laktokokalna MFS proteina, YniG prisutnim u soju *L. lactis* subsp. *lactis* KF147 (91% identičnosti, 413/454 AA) (Siezen et al., 2010) i MFS permeazom soja *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11 (99% identičnosti, 450/454 AA) (Makarova et al., 2006). Navedeni laktokokalni proteini, koji pokazuju homologiju sa CmbT proteinom do danas nisu funkcionalno okarakterisani.

## 4.2. Kloniranje i ekspresija *cmbT* gena

### 4.2.1. Kloniranje *cmbT* gena

PCR reakcijom je umnožen *cmbT* gen na osnovu hromozomalne DNK izolovane iz *L. lactis* NZ9000 (derivat soja *L. lactis* MG1363, sa integrisanim *nisR* i *nisK* genima u hromozomu). PCR produkt veličine 1377 baznih parova (bp) je kloniran u pTZ57R/T (Fermentas, Litvanija) vektor za kloniranje PCR fragmenata formirajući konstrukt pCTE2. Konstruktom pCTE2 transformisan je soj *E. coli* DH5 $\alpha$ . Potom je *cmbT* gen subkloniran u pNZ8113-ekspresioni vektor, sečen *NcoI*-*XbaI* restrikcionim enzimima, nizvodno od P<sub>nisA</sub> promotora (slika 15) i dobijen je konstrukt **pCT50**. Kloniranjem u pNZ8113 vektor, omogućena je kontrolisana ekspresija CmbT proteina koji na C-terminalnom kraju sadrži 6 ostataka histidina.

Dobijenim pCT50 konstruktom, transformisan je soj *L. lactis* NZ9000, a dodatkom subinhibitornih koncentracija nizina u medijum, omogućena je povećana ekspresija CmbT proteina pomoću NICE sistema.



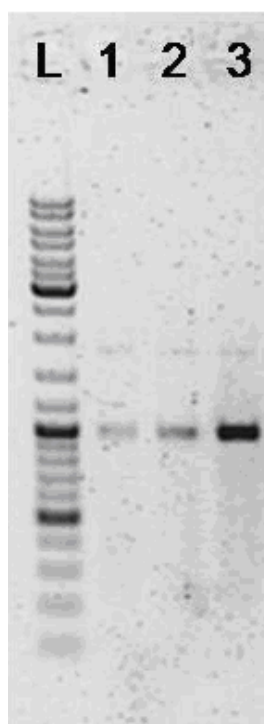
Slika 15. Šematski prikaz konstrukcije pCT50 vektora.



#### 4.2.2. Kontrolisana ekspresija *cmbT* gena

Kloniranjem *cmbT* gena u pNZ8113 ekspresioni vektor nizvodno od inducibilnog  $P_{nisA}$  promotora omogućena je njegova fino regulisana ekspresija (Kuipers et al., 1998). Da bi se ustanovilo koja koncentracija nizina daje najoptimalniju ekspresiju, ćelije su gajene u prisustvu rastućih koncentracija nizina (0; 0,1; 1 ng/ml), a nakon indukcije ukupna RNK i proteini su izolovani za analizu ekspresije.

RT-PCR analize pokazale su da je *cmbT* transkript uspešno eksprimiran u povećanim količinama, i to najviše pri koncentraciji nizina od 1 ng/ml (Slika 16).

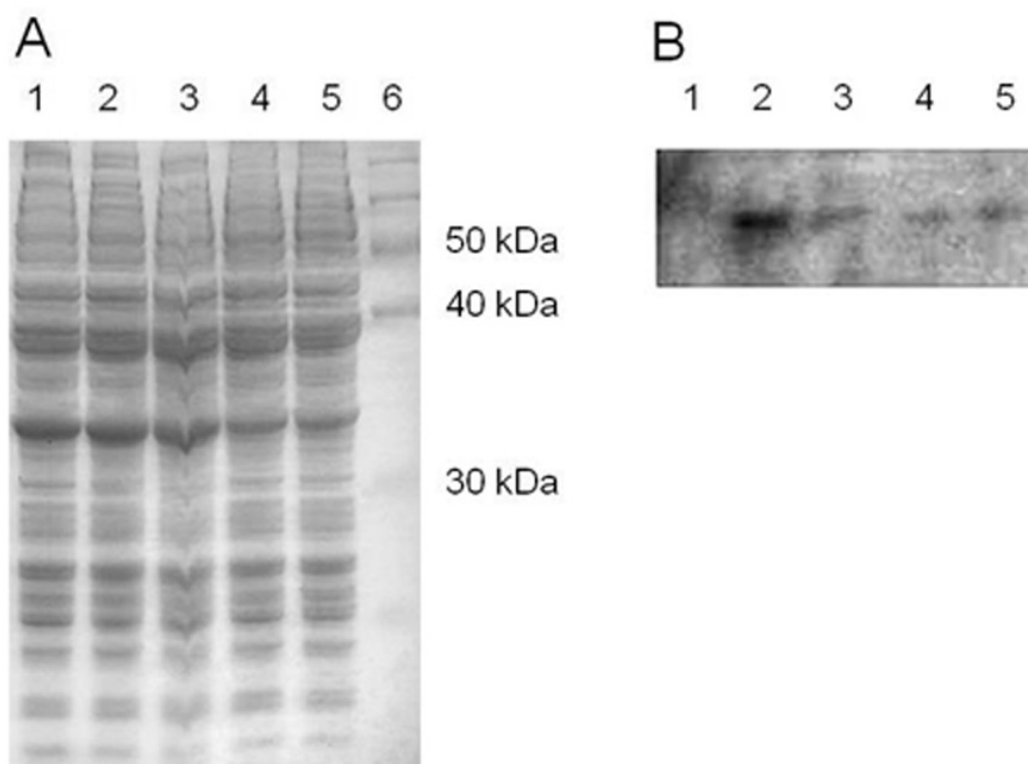


**Slika 16.** Pojačana ekspresija *cmbT* gena u soju *L. lactis* NZ9000/pCT50 nakon indukcije nizinom, praćena pomoću RT-PCR korišćenjem specifičnog Histag prajmera: L- Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas, Lithuania); Linija 1. 0 ng/ml; Linija 2. 0,1 ng/ml; Linija 3. 1 ng/ml.

U cilju analize prisustva povećane količine CmbT proteina SDS-PAGE metodom, ćelije su gajene u prisustvu rastućih koncentracija nizina (1, 3, 5 i 10 ng/ml), a rezultati su pokazali da izolacijom totalnih proteina iz *L. lactis* NZ9000/pCT50 nije moguće uočiti pojačanu proteinsku traku očekivane veličine (49 kDa) nakon bojenja

komazi-plavim ili srebro-bromidom (Slika 17A), u odnosu na kontrolni soj *L. lactis* NZ9000/pCT50 koji nije indukovani nizinom.

Prečišćavanje ciljnog proteina koji na C-terminalnom kraju sadrži polihistidinski ostatak, omogućeno je primenom Ni-NTA afinitetne hromatografije. Western blot analize sa antitelima koja prepoznaju histidinski ostatak, potvrdile su prisustvo CmbT proteina, nakon indukcije nizinom. Rezultati pokazuju da se najviši nivo povećane ekspresije CmbT proteina ostvaruje pri koncentraciji nizina od 1 ng/ml (Slika 17B).



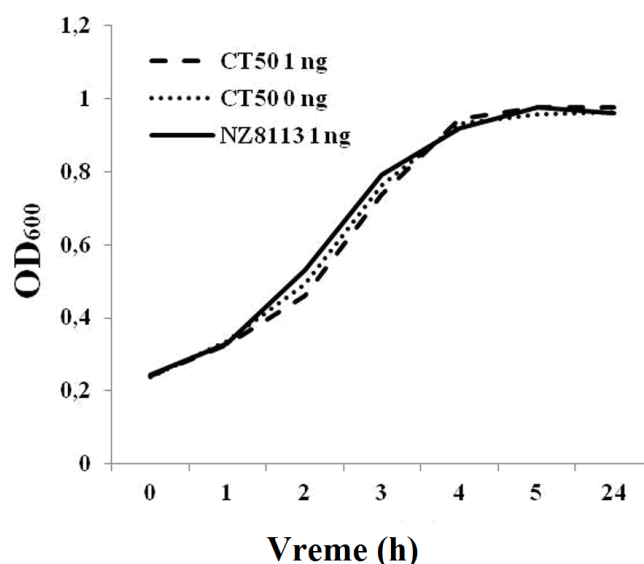
**Slika 17.** Analiza povećane ekspresije CmbT proteina indukovane nizinom.

Indukcija ekspresije CmbT proteina postignuta je dodatkom rastućih koncentracija nizina. Alikvoti (50  $\mu$ g) totalnih proteina izolovanih iz *L. lactis* NZ9000/pCT50 indukovanih rastućim koncentracijama nizina 0 ng/ml (linija 1), 1 ng/ml (linija 2), 3 ng/ml (linija 3), 5 ng/ml (linija 4) i 10 ng/ml (linija 5) paralelno su naneti na 12,5% w/v SDS/PAGE gelove (A) ili naneti na Ni-NTA agarozne kolonice za eluciju CmbT-His taga. Eluirani CmbT-His tag proteini detektovani su “Western blot” analizama pomoću anti-His-tag IgG1 antitela (B).

### 4.3. Funkcionalna karakterizacija CmbT proteina

#### 4.3.1. Utvrđivanje odnosa između povećane ekspresije *cmbT* gena i rezistencije u soju *L. lactis* NZ9000

Osetljivost ćelija koje pojačano ekspimiraju *cmbT* nakon indukcije nizinom u koncentraciji 1 ng/ml (CT50<sup>1</sup>), poređena je sa NZ9000/pNZ8113 tretiranim sa 1 ng/ml nizina, da bi se isključio uticaj citotoksičnog efekta nizina na ćelije (NZ8113<sup>1</sup>), kao i sa NZ9000/pCT50 bez nizina kao inducera (CT50<sup>0</sup>). Slično istraživanjima koja su sproveli Putman i saradnici (1999), proučavajući povećanu ekspresiju LmrP proteina kod laktokoka i ova studija je pokazala da ćelije rastu sporije u prisustvu nizina u koncentracijama višim od 5 ng/ml. Da bi se izbegao uticaj nizina na rast ćelija, u svim testovima je nizin dodavan u finalnoj koncentraciji od 1 ng/ml. Pri indukciji nizinom u koncentraciji od 1 ng/ml, u medijumu bez antimikrobnog supstrata, rast CT50<sup>1</sup> je bio bez većeg odstupanja u odnosu na rast kontrolnih sojeva: odnos brzine rasta sojeva NZ8113<sup>1</sup>/CT50<sup>1</sup> bio je 0,98, a odnos brzine rasta sojeva CT50<sup>0</sup>/CT50<sup>1</sup> je bio 0,99 (Slika 18).



**Slika 18.** Krive rasta soja *L. lactis* NZ9000/pCT50 u prisustvu (CT50 1 ng) i odsustvu (CT50 0 ng) nizina i kontrolnog soja NZ9000/pNZ8113 u prisustvu nizina kao inducibilnog agensa (NZ8113 1 ng). Brojevi 0, 1, 2, 3, 4 i 5 predstavljaju sate nakon indukcije nizinom (1 ng/ml).

Da bi se ispitao uticaj povećane ekspresije *cmbT* gena na efluks različitih supstrata, praćen je rast sojeva NZ8113<sup>1</sup>, CT50<sup>0</sup> i CT50<sup>1</sup> u prisustvu brojnih toksičnih agenasa. Koncentracija toksičnog agenasa, koja inhibira 50% ćelija u uzorku (IC<sub>50</sub>) određena je za svaki toksični agens. Vrednosti IC<sub>50</sub> koje su bile značajno povećane u odnosu na kontrolne sojeve, prikazane su u Tabeli 5.

**Tabela 5.** Osetljivost sojeva NZ8113<sup>1</sup>, CT50<sup>1</sup> i CT50<sup>0</sup> na različite supstrate

Supstrat	IC <sub>50</sub> za odgovarajući soj (µM)			Relativna rezistencija <sup>a</sup>	
	NZ8113 <sup>1</sup>	CT50 <sup>0</sup>	CT50 <sup>1</sup>	CT50 <sup>1</sup> /NZ8113 <sup>1</sup>	CT50 <sup>1</sup> /CT50 <sup>0</sup>
Linkomicin	1,40±0,07	1,08±0,05	2,01±0,06	1,44 <sup>***</sup>	1,86 <sup>***</sup>
Holat	1316±175	962±342	2827±175	2,15 <sup>***</sup>	2,94 <sup>**</sup>
Sulbaktam	40,02±10,38	51,45±19,87	106,72±8,89	2,67 <sup>***</sup>	2,07 <sup>**</sup>
Etidijum bromid	9,19±3,18	8,14±3,82	21,80±4,72	2,37 <sup>*</sup>	2,68 <sup>**</sup>
Hoechst 33342	14,72±4,11	14,65±1,37	24,52±2,52	1,67 <sup>*</sup>	1,67 <sup>**</sup>
Sulfadiazin	3669±827	3845±219	5004±414	1,36 <sup>**</sup>	1,30 <sup>*</sup>
Streptomycin	41,22±0,89	48,47±9,12	68,86±2,96	1,67 <sup>*</sup>	1,42 <sup>*</sup>
Rifampicin	37,01±16,28	36,60±13,5	55,20±6,09	1,49	1,51 <sup>*</sup>
Puromicin	34,45±1,04	27,63±7,50	41,64±5,70	1,21	1,51 <sup>*</sup>
Sulfametoksazol	83,22±45,82	168,05±62,87	393,74±118,36	2,34 <sup>*</sup>	1,95

<sup>a</sup>Relativna rezistencija pokazuje koliko je puta veća rezistencija soja *L. lactis* NZ9000/pCT50 u poređenju sa kontrolnim sojem *L. lactis* NZ9000. Kolone sa zvezdicom se statistički razlikuju (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001) od kontrolnog NZ8113<sup>1</sup> i CT50<sup>0</sup> soja prema Studentovom t-Testu.

Rast CT50<sup>1</sup> u prisustvu holata, Hoechst-a i etidijum bromida značajno je povećan (p vrednosti manje od 0,05, 0,01 ili 0,001) u poređenju sa kontrolnim sojevima NZ8113<sup>1</sup> i CT50<sup>0</sup>, ukazujući na mogući doprinos CmbT proteina u obezbeđivanju **rezistencije** ćelija na navedene supstrate (Tabela 5), dok je u prisustvu rodamina 6G rast ostao nepromenjen.

Osetljivost ćelija koje pojačano ekspimiraju CmbT protein u odnosu na kontrolne sojeve, takođe je testirana u prisustvu antimikrobnih agenasa. Zanimljivo je da su ćelije koje pojačano ekprimiraju CmbT pokazale značajno povećanje **rezistencije** (p vrednosti manje od 0,05, 0,01 ili 0,001) na sulfonamide sulbaktam, sulfametoksazol i sulfadiazin, linkozamidni antibiotik linkomicin, aminoglikozidni antibiotik

streptomycin, aminonukleozidni antibiotik puromicin i semisintetski antibiotik rifampicin (Tabela 5). Nasuprot tome, CmbT nije značajno doprineo rezistenciji ćelija (p vrednosti veće od 0,05) na sulfonamide sulfametizol i sulfizoksazol (sulfafurazol), aminoglikozidni antibiotik apramicin sulfat, makrolidne antibiotike eritromicin i azitromicin, poliketidne antibiotike tetraciklin i doksiciklin, polipeptidni antibiotik bacitracin, cefalosporinske antibiotike cefalosporin C i cefalotin (natrijumova so), aminokumarinski antibiotik novobiocin i hinolonski antibiotik nalidiksičnu kiselinu.

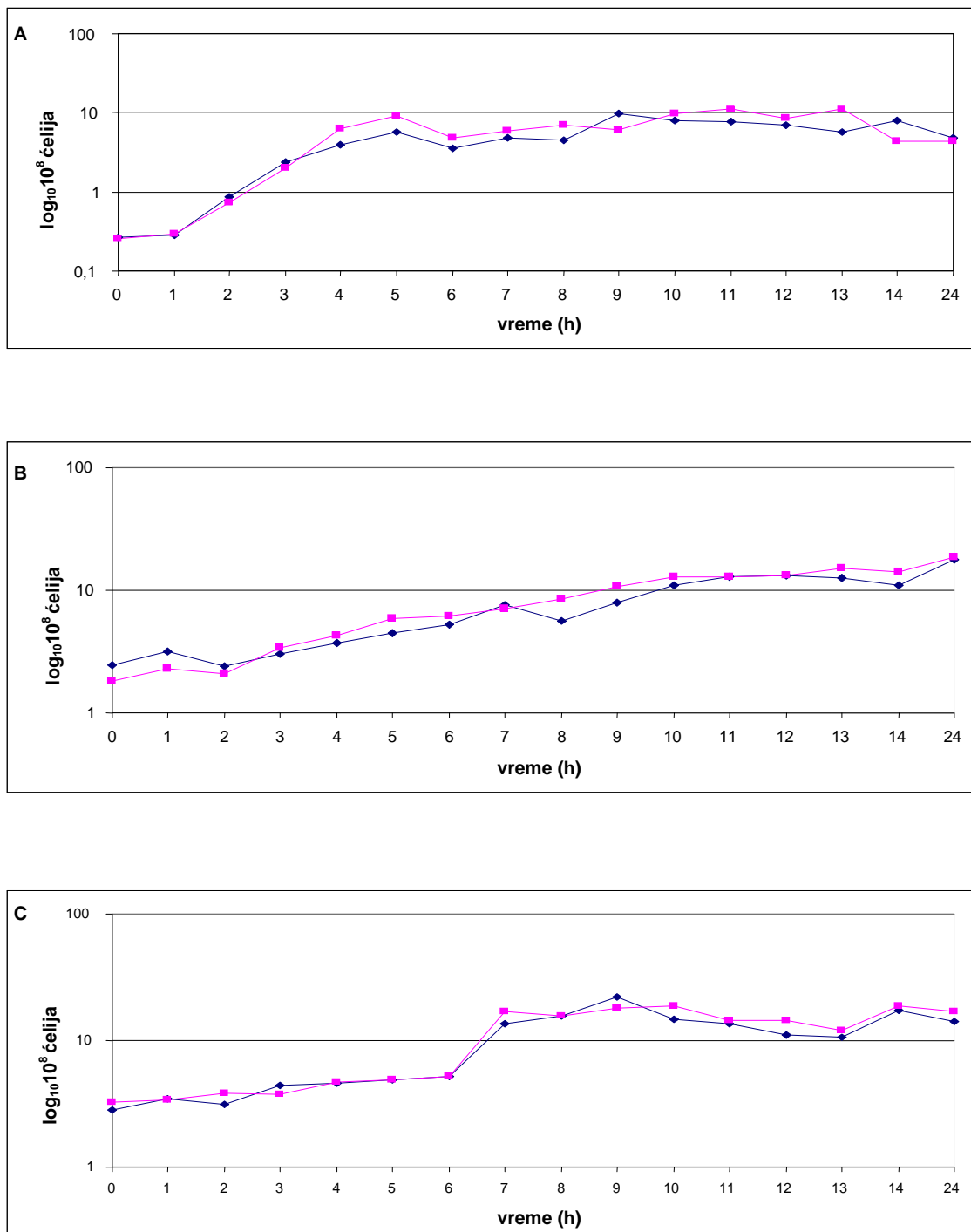
Važno je napomenuti da su sojevi sa povećanom sintezom CmbT proteina pokazali veću **osetljivost** na sulfonamidne antibiotike sulfakinoksalin, sulfametoksipiridan i sulfapiridin, aminoglikozidne antibiotike, kanamicin, gentamicin sulfat, geneticin disulfat i tobramicin, aminociklitol (blizak aminoglikozidima) spektinomycin,  $\beta$ -laktamske antibiotike ampicilin, penicilin G i penicilin V, glikopeptidni antibiotik vankomicin, hinolonske antibiotike ciprofloksacin i norfloksacin i piridopirimidinski antibiotik pipemidinsku kiselinu u poređenju sa kontrolnim sojevima.

#### **4.4. Uticaj povećane ekspresije *cmbT* gena na rast *L. lactis* NZ9000 u prisustvu metionina i cisteina**

Analiza rasta sojeva *L. lactis* NZ9000 i *L. lactis* NZ9000/pCT50 u GM17 i CDM medijumu (sa metioninom i sa metioninom i cisteinom) nakon indukcije nizinom, pokazala je da soj *L. lactis* NZ9000 sporije raste u odnosu na *L. lactis* NZ9000/pCT50 (Slike 19 A, B, C).

U GM17 medijumu, vreme generacije za *L. lactis* NZ9000/pCT50 bilo je 49 min (broj deoba po satu rasta = 1,22/h), dok je za *L. lactis* NZ9000 iznosilo 55,8 min (broj deoba po satu rasta = 1,08/h).

U CDM medijumu, vreme generacije za *L. lactis* NZ9000/pCT50 bilo je 222 min (broj deoba po satu rasta = 0,27/h) u prisustvu metionina i 109,8 min (broj deoba po satu rasta = 0,55/h) u medijumu koji je sadržao i metionin i cistein. Za *L. lactis* NZ9000 vremena generacije su bila 230 min i 114 min, a broj deoba po satu 0,26 i 0,53 u CDM medijumu sa metioninom i sa metioninom i cisteinom.



**Slika 19.** Krive rasta kontrolnog soja *L. lactis* NZ9000 (◆) i rekombinantnog *L. lactis* NZ9000/pCT50 (■) soja koji pojačano eksprimira CmbT u: GM17 bogatom medijumu (A), CDM medijumu sa 0,1 x metioninom (B) i CDM medijumom sa 10 x metioninom i 10 x cisteinom (C).

#### 4.5. Efluks etidijum bromida i Hoechst 33342 posredovan CmbT proteinom

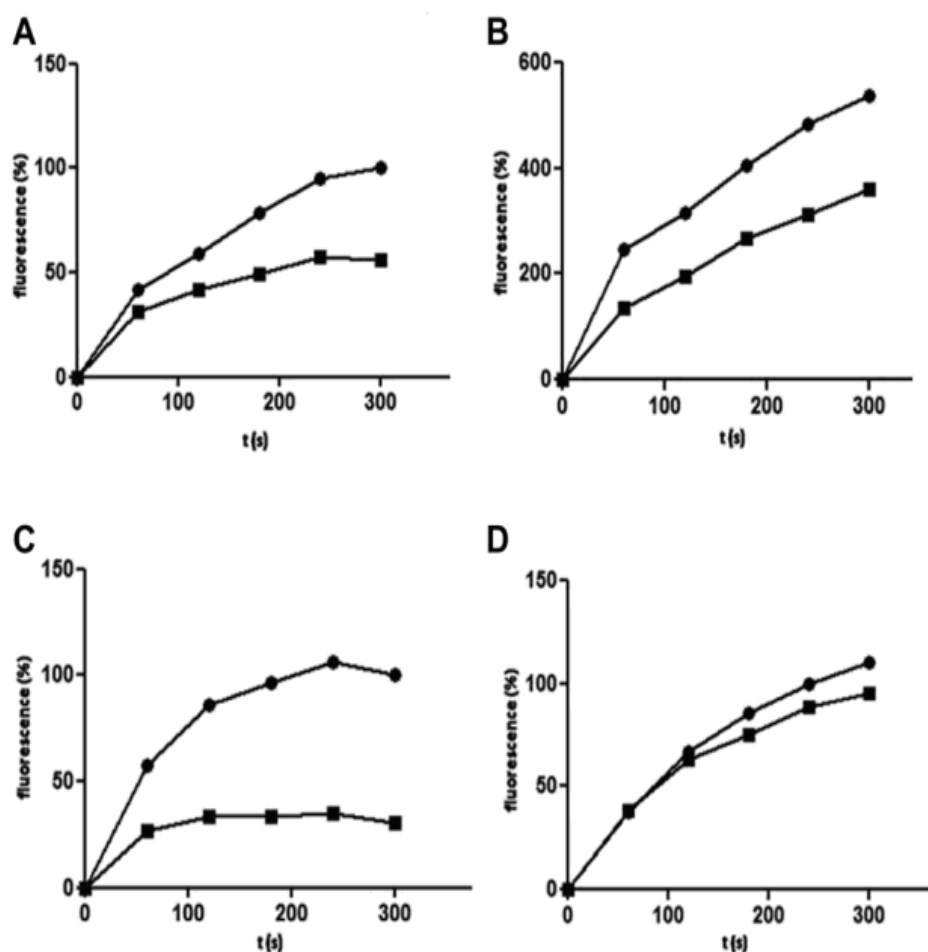
Da bi se utvrdilo da li povećana ekspresija CmbT proteina katalizuje energetski zavisian proces izbacivanja različitih supstrata, urađeni su transportni eseji sa etidijum bromidom (EtBr) i Hoechst 33342 u soju *L. lactis* NZ9000.

Zahvaljujući osobini da nakon interakcije sa DNK fluorescira, EtBr je jedan od najčešće korišćenih supstrata za ispitivanje aktivnosti MDR transportera (Bolhuis et al., 1995). Preuzimanje agensa posredstvom transportera praćeno je merenjem promene fluorescencije u vremenu koja je direktno zavisna od koncentracije intracelularnog supstrata. Dodavanje EtBr u prethodno glukozom tretirane ćelije *L. lactis* NZ9000/pCT50 dovelo je do pojave fluorescencije čiji je intenzitet dva puta manji u poređenju sa intenzitetom fluorescencije kod kontrolnog soja *L. lactis* NZ9000 (Slika 20A).

Pored toga, da bi se utvrdilo kom tipu transportera pripada CmbT protein, praćen je efluks EtBr u prisustvu ATP-aznog inhibitora, orto-vanadata. Dodatak orto-vanadata nije imao uticaj na izbacivanje EtBr iz ćelije (Slika 20B).

Drugi često korišćen supstrat za analizu MDR transportera je fluorescentna boja Hoechst 33342, koja usled lipofilne prirode ima sposobnost prolaska kroz ćelijsku membranu i nakon interakcije sa DNK fluorescira (Margolles et al., 1999). Dodatak Hoechst 33342 u glukozom tretirane ćelije NZ9000/pCT50, takođe dovodi do približno trostrukog smanjenja intenziteta fluorescencije u poređenju sa intenzitetom fluorescencije koja se emituje kod kontrolnog soja NZ9000, ukazujući da je Hoechst 33342 još jedan od supstrata za CmbT transporter (Slika 20C).

Prema literaturnim podacima, efluks posredovan sekundarnim transporterima može biti inhibiran dodatkom jonofora, usled narušavanja membranskog potencijala (Bolhuis et al., 1994). Da bi se utvrdilo da li jonofore imaju uticaja na aktivnost CmbT proteina, valinomycin (koji remeti protonski gradijent koncentracije,  $\Delta\text{pH}$ ) i nigericin (koji deluje na membranski potencijal,  $\Delta\psi$ ) su korišćeni u transportnim esejima. Rezultati pokazuju da dodatak jonofora valinomicina i nigericina inhibira efluks Hoechst 33342 (Slika 20D).



**Slika 20.** Efluks EtBr u odsustvu (A) i prisustvu (B) orto-vanadata i Hoechst 33342 u odsustvu (C) i prisustvu (D) valinomicina i nigericina. Kontrolni soj *L. lactis* NZ9000 (●) i rekombinantni soj koji povećano eksprimira CmbT *L. lactis* NZ9000/pCT50 (■). Procenat fluorescencije je predstavljen kao relativan procenat u odnosu na vrednost dobijenu za kontrolni soj *L. lactis* NZ9000 na 300 s u odsustvu inhibitora (100%).

#### 4.6. Uloga CmbT proteina u metabolizmu sumpora

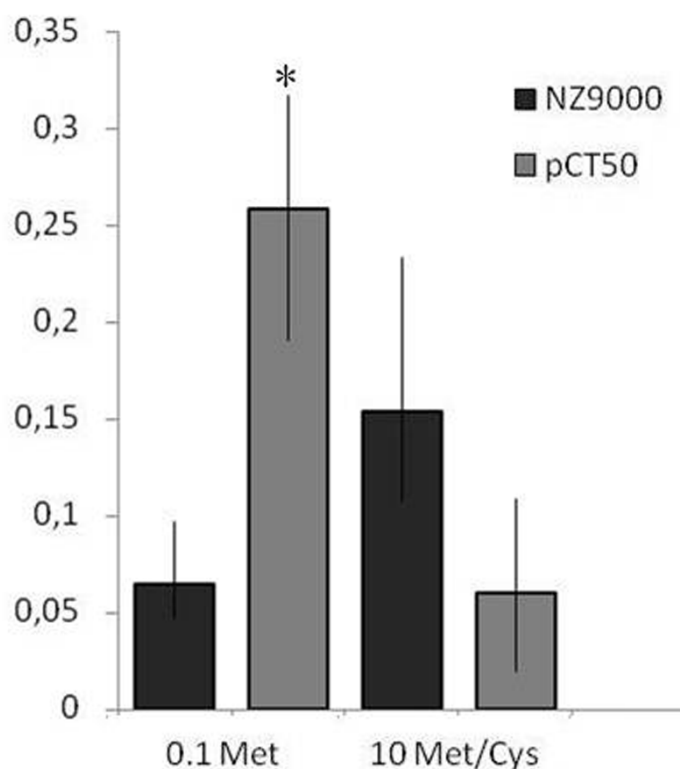
Dostupnost cisteina i metionina utiče na mnoge procese u ćeliji. Ranija istraživanja koja su sprovodili Sperandio i saradnici (2005) i Fernández i saradnici (2000, 2002) pokazala su da nakupljanje i sinteza tiola, kao posledica aktivnosti CysM (*O*-acetyl-L-serin (tiol)-liaza) i CysD (*O*-acetyl-L-homoserin (tiol)-liaza), sa jedne strane i aktivnosti cistation liaze koja deluje na cistein sa druge strane, imaju ključnu ulogu u metabolizmu sumpora kod *L. lactis*.



U cilju utvrđivanja fiziološke uloge CmbT transportera u ćeliji laktokoka, praćen je sadržaj tiolnih grupa u prisustvu i odsustvu metionina i cisteina ( $10 \times$  metionin/cistein i  $0,1 \times$  metionin) u supernatantu soja koji pojačano sintetizira CmbT (CT50<sup>1</sup>) u poređenju sa kontrolnim sojem *L. lactis* NZ9000 (NZ9000). Rezultati su pokazali da produkcija tiola u medijumu sa  $0,1 \times$  metioninom bila značajno ( $p < 0,05$ ) pod uticajem povećane produkcije CmbT proteina (Slika 21). Drugim rečima, produkcija tiola kod CT50<sup>1</sup> koji pojačano sintetizira CmbT je bila 3,78 puta ( $p < 0,05$ ) veća nego kod kontrolnog soja NZ9000, kada su gajeni u CDM medijumu sa  $0,1 \times$  metioninom. Pored toga, produkcija tiola kod CT50<sup>1</sup> je bila 4,3 puta veća ( $p < 0,05$ ) kada je soj rastao u CDM medijumu sa  $0,1 \times$  metioninom, nego u CDM medijumu obogaćenom sa  $10 \times$  metionin/cistein. Ipak, nema značajne razlike ( $p > 0,05$ ) između CT50<sup>1</sup> i NZ9000 kontrolnog soja u CDM medijumu sa  $10 \times$  metionin/cistein, kao i u produkciji tiola kod NZ9000 koji je rastao u uslovima niskih i visokih koncentracija metionina i cisteina u medijumu.

Dobijeni rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu CmbT proteina u metabolizmu sumpora kod *L. lactis* u toku rasta u medijumu sa ograničenim izvorom metionina i cisteina.

U reakciji sa olovo-acetatom nije detektovana značajna razlika u oslobađanju vodonik-sulfida između kontrolnog *L. lactis* NZ9000 i rekombinantnog *L. lactis* NZ9000/pCT50 soja.



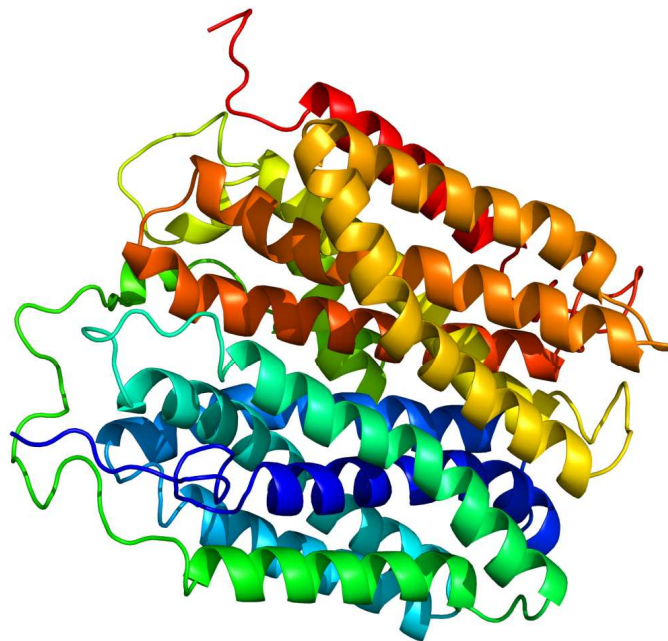
**Slika 21.** Određivanje sadržaja tiola. Formiranje tiolnih grupa praćeno je u *L. lactis* NZ9000/pCT50 (pCT50) soju i kontrolnom *L. lactis* NZ9000 (NZ9000) soju sa DTNB reagensom u prisustvu 0,1 x metionina (0.1 Met), ili 10 x metionina i 10 x cisteina (10 Met/Cys) (u cilju standardizacije, ćelije su oborene i resuspendovane u 50 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7,0 do finalnog OD<sub>600</sub> od 1,0) merenjem na OD<sub>412</sub>. Sva merenja urađena su u triplikatu, a prikazane su srednje vrednosti. Standardne greške su bile niže od 10% za prikazane vrednosti. Kolona sa zvezdicom je statistički različita ( $p < 0,05$ ) od kontrolnog NZ9000 soja prema Studentovom t-Testu.

#### 4.7. Modeliranje, optimizacija i molekulska dinamička studija CmbT proteina

Osnovni homologni model CmbT proteina formiran prema poredbenim proteinima: d1pw4a, c2gfpA, c4apsB, c2xutc, c3o7pA, d1pv7a, c2g9pA, c3b9yA, c3v5uA, d3proc1 i c2vxhF dobijen je pomoću Phyre2 servera (Kelley and Sternberg, 2009). Stepenn identičnosti sekvenci između CmbT homolognog modela i poredbenih

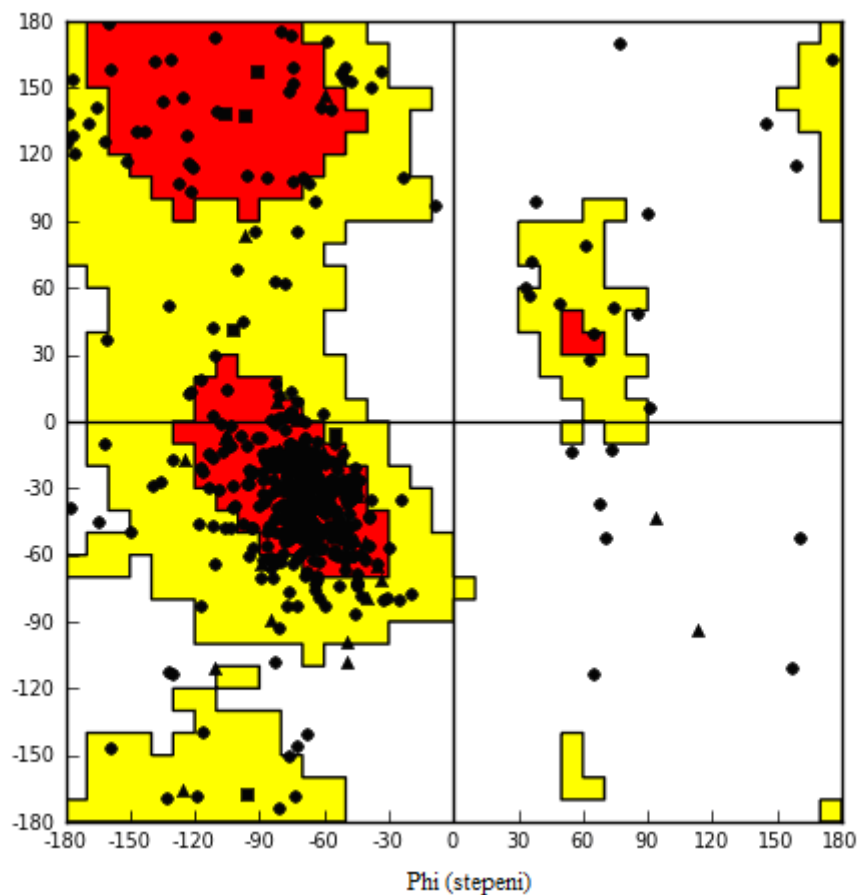
proteina d1pv7a i d1pw4a (MFS transporter; proton/šećer simporter sličan LacY-proteinu i Glicerol-3-fosfat transporter) je 15% i 14% sa 100% pouzdanosti. Identičnost sekvenci između homolognog modela CmbT proteina i c2gfpA poredbenog proteina (MDR membranski transporter u *E. coli*) je 17% sa 100% pouzdanosti. Identičnost sekvenci između homolognog modela CmbT proteina i poredbenog proteina c4apsB i c2xutC (transportni proteini; proton zavisni di-/tri- i oligopeptidni simporter) je 12% sa 100% pouzdanosti. Identičnost sekvenci između homolognog modela CmbT proteina i poredbenog proteina c3o7pA (transportni proteini; 1-fukoza-proton simporter) je 11% sa 100% pouzdanosti. Identičnost sekvenci između homolognog modela CmbT proteina i poredbenog proteina: antimikrobnog peptida latarcina 2a; rh-sličnog proteina pripadnika familije amonijum transportera; neokarakterisanog membranskog proteina mj0091;  $\alpha$ -litičke proteaze; i hlorit dismutaze je manja od 20% sa manje od 20% pouzdanosti.

Dobijeni CmbT homologni model (Slika 22) je dalje optimizovan (MacroModel, version 9.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011) i ispitan molekularno dinamičkim simulacijama.



**Slika 22.** Homologni model CmbT proteina dobijen pomoću Phyre2 servera.

Optimizovani CmbT model je dalje ispitan i korišćenjem Ramachandran grafika (Slika 23) (Maestro, version 9.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011).

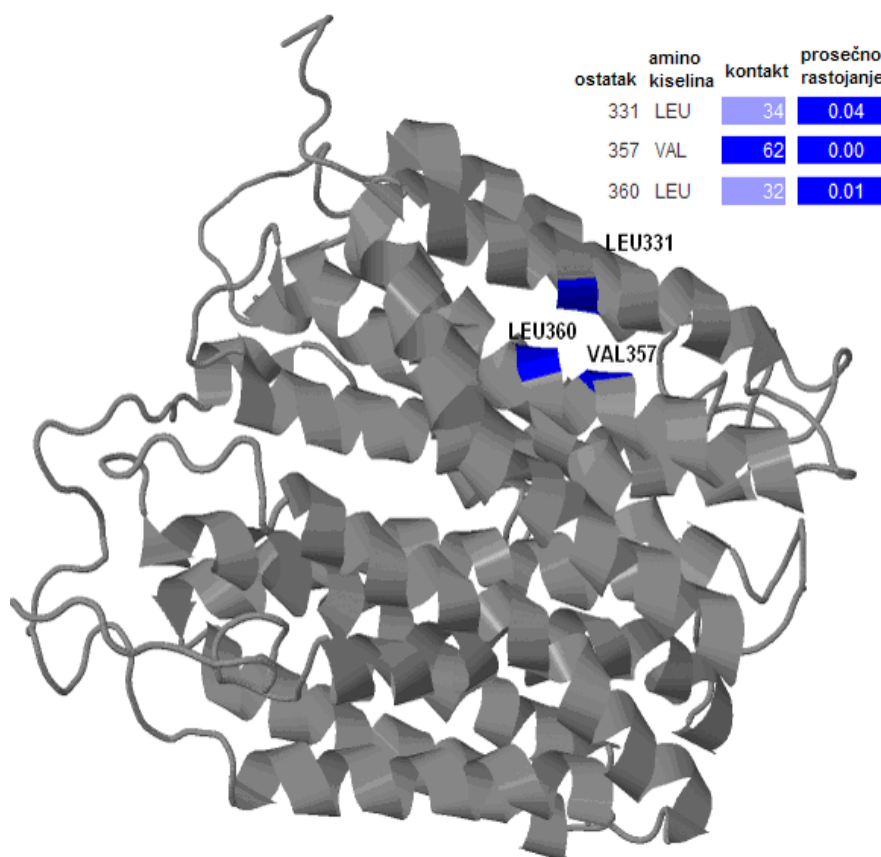


**Slika 23.** Ramachandran grafik optimizovanog modela CmbT proteina.

Ramachandran grafik pokazuje koje vrednosti  $\psi$  i  $\phi$  uglova su moguće za određeni aminokiselinski ostatak u CmbT proteinu i predstavlja empirijsku distribuciju tačaka dobijenih u CmbT proteinu. Sekundarna struktura CmbT proteina dobijena je na osnovu raspodele  $\psi$  i  $\phi$  torzionih uglova u Ramachandran prostoru (Karplus et al., 2005; Shackelford and Karplus, 2007; Katzman et al., 2008). Ramachandran grafik optimizovanog CmbT proteina ukazuje na postojanje  $\beta$  S ( $\beta$  lanca),  $\alpha$  R ( $\alpha$  heliksa),  $\delta$  R (3-10 heliksa), i  $\alpha$  L (levo orijentisanog heliksa).

Ligand-vezujući domeni CmbT proteina dobijeni su predviđanjem pomoću 3DLigandSite web servera (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dligandsite>). Ligandi vezani za strukture slične ispitivanom CmbT proteinu se superponiraju na model i koriste za

predviđanje mesta vezivanja na CmbT proteinu. Kao rezultat, Leu331, Val357 i Leu360 su označeni kao aminokiseline koje učestvuju u vezivanju liganda u aktivnom mestu CmbT proteina (Slika 24).



**Slika 24.** Vezujuća mesta u homolognom modelu CmbT proteina.

Analiza ćelijske lokalizacije proteina urađena pomoću PSORT programa pokazala je da se Leu331, Val357 i Leu360 nalaze u transmembranskom domenu CmbT proteina (Filipic et al., 2013b), ukazujući na mogućnost da CmbT prepoznaje supstrat unutar lipidnog dvosloja membrane.

#### 4.8. 3D-QSAR studija

Vrednosti relativnih rezistencija (RR) dobijenih na osnovu  $IC_{50}$  vrednosti kontrolnog (*L. lactis* NZ9000) i indukovano (i) (*L. lactis* NZ9000/pCT50) soja u prisustvu različitih agenasa, koje su korišćene za QSAR studiju, prikazane su u Tabeli 6. Ispitivani set jedinjenja pokazao je dobar raspon i distribuciju RR vrednosti od 2,33

logaritamske jedinice (od 2,67 do 0,34) što je bio važan preduslov za formiranje odgovarajućeg QSAR modela.

**Tabela 6.** Osetljivost sojeva *L. lactis* NZ9000/pCT50 i *L. lactis* NZ9000 na različite supstrate. Vrednosti relativnih rezistencija (RR) korišćenih za QSAR studiju

Supstrat	IC <sub>50</sub> odgovarajućeg soja (μM)		Relativna rezistencija (RR)
	<i>L. lactis</i> NZ9000	<i>L. lactis</i> NZ9000/pCT50	
Etidijum bromid	9,19±3,18	21,80±4,72	2,37
Holat	1316±175	2827±175	2,15
Hoechst 33342	14,72±4,11	24,52±2,52	1,67
Kanamycin	9,56±0,05	6,55±1,16	0,68
Streptomycin	41,22±0,89	68,86±2,96	1,67
Puromicin	34,45±1,04	41,64±5,70	1,21
Rifampicin	37,01±16,28	55,20±6,09	1,49
Linkomicin	1,40±0,07	2,01±0,06	1,44
Vankomicin	0,4470±0,1252	0,3184±0,1339	0,71
Eritromicin	0,05±0,00	0,05±0,01	1,04
Bacitracin	3,98±0,18	4,14±0,22	1,04
Cefalosporin C	0,054±0,59	0,05±0,64	0,96
Sulbaktam	40,02±10,38	106,72±8,89	2,67
Apramicin sulfat	26,12±0,28	24,22±0,24	0,93
Azitromicin	0,06± 0,10	0,05± 0,10	0,86
Novobiocin	0,16± 0,12	0,12± 0,13	0,74
Sulfametoksazol	83,22±45,82	393,74±118,36	2,34
Doksiciklin	0,02±0,10	0,02±0,13	1,02
Sulfatiazol	7568,00±0,16	13298,00±0,19	1,76
Tobramicin	17,78± 0,1779	5,962± 0,1727	0,34
Gentamicin sulfat	11,51±0,1765	4,921±0,1975	0,43

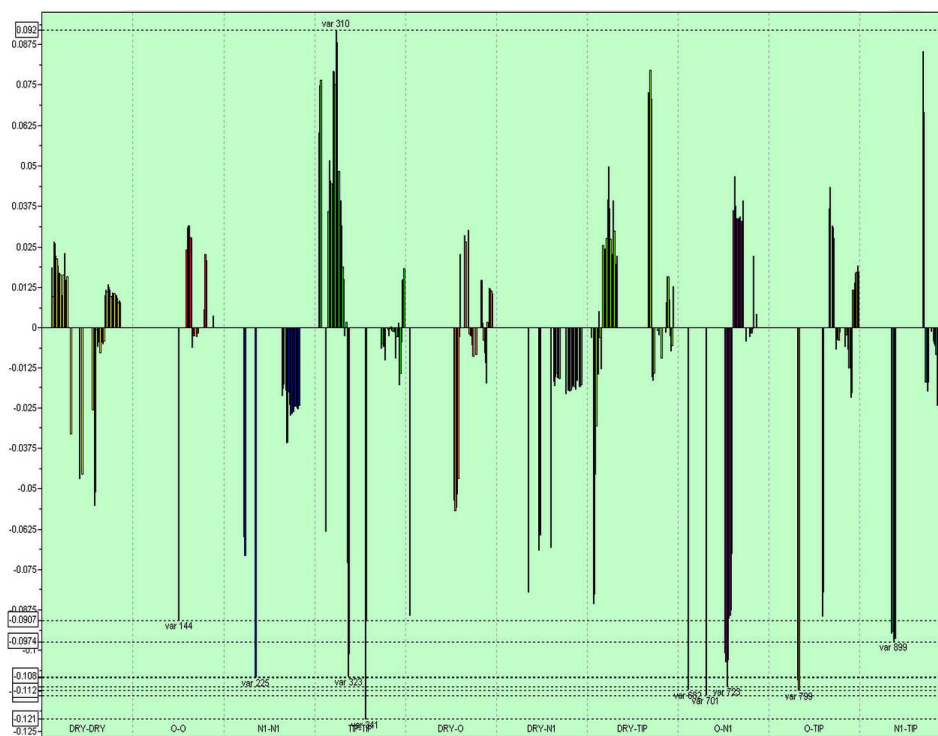
Optimalan 3D-QSAR model (RR) sa 2 značajne komponente (A=2), R<sup>2</sup>: 0,92 i Q<sup>2</sup>: 0,69 je formiran primenom Pentacle 1.0.6 programa (Tabela 7).

**Tabela 7.** Statistički parametri kreiranog 3D-QSAR modela. Predviđene RR vrednosti za eksterni validacioni set dobijene 3D-QSAR modelom

Trening Set				
ID	Jedinjenja	$\log D_{pH\ 5.0}$	RR	QSAR-om predviđena RR
1	Holat	-0,40	2,15	1,868
2	Etidijum bromid	-0,58	2,37	2,487
3	Sulbaktam	-3,42	2,67	2,567
4	Linkomicin	-2,77	1,44	1,326
5	Sulfatiazol	1,01	1,76	1,826
6	Rifampicin	1,29	1,49	1,341
7	Streptomicin	-14,71	1,67	1,739
8	Bacitracin	-13,30	1,04	1,034
9	Doksiciklin	-4,88	1,02	1,251
10	Cefalosporin C	-6,22	0,96	0,945
11	Apramicin sulfat	-23,03	0,93	0,970
12	Novobiocin	1,12	0,74	0,611
13	Vankomicin	-11,58	0,71	0,756
14	Kanamycin	-20,51	0,68	0,376
15	Gentamicin sulfat	-20,60	0,43	0,434
16	Tobramicin	-23,14	0,34	0,868
			$R^2$	0,92
			$Q^2$	0,69
			RMSEE	0,193
			$R^2_{Obs\ vs.\ Pred}$	0,918
Test Set				
	Jedinjenja	$\log D_{pH\ 5.0}$	RR	QSAR-om predviđena RR
T1	Sulfametoksazol	1,02	2,34	1,849
T2	Hoechst 33342	0,31	1,67	1,648
T3	Puromicin	-2,74	1,21	1,491
T4	Eritromicin	-2,03	1,04	1,316
T5	Azitromicin	-6,55	0,86	1,006
Korelacioni koeficijent, $r$ (RR/ $\log D_{pH\ 5.0}$ )		0,616	RMSEP	0,289
			$R^2_{Obs\ vs.\ Pred}$	0,704

Grafik koeficijenata sa najznačajnijim deskriptorima za RR kao što su: v310: TIP-TIP, v144: O-O, v225: N1-N1, v323: TIP-TIP, v341: TIP-TIP, v682: O-N1, v701: O-N1, v723: O-N1, v799: O-TIP i v899: N1-TIP je prikazan na Slici 25. Topološki deskriptor v310: TIP-TIP (između dve grupe koje ostvaruju sterne interakcije) je u pozitivnoj korelaciji sa RR, dok su deskriptori v144: O-O (između dve grupe koje su

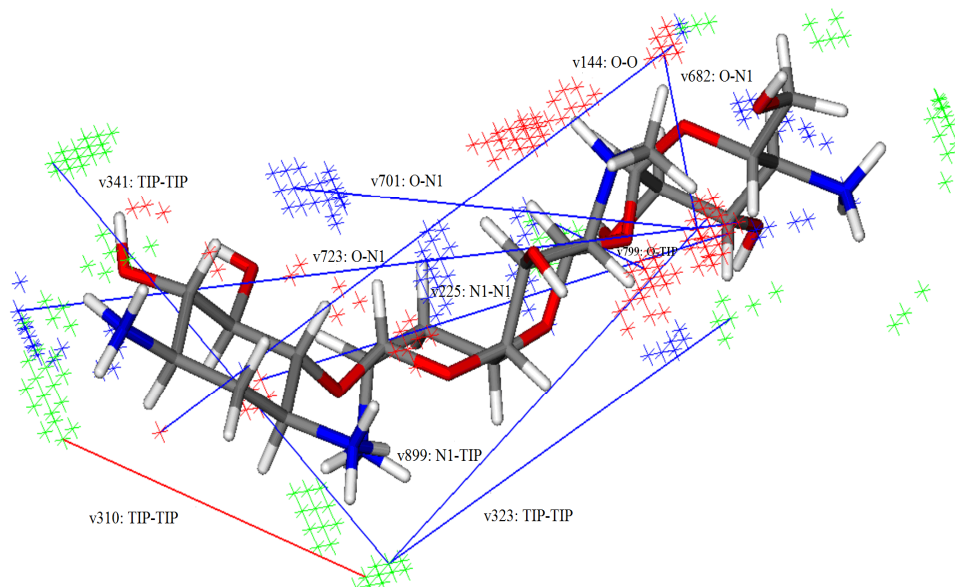
donori vodonične veze), v225: N1-N1 (između dve grupe koje su akceptori vodonične veze), v323: TIP-TIP, v341: TIP-TIP, v682: O-N1 (između grupe donora i grupe akceptora vodonične veze), v701: O-N1, v723: O-N1, v799: O-TIP (između grupe donora vodonične veze i grupe koja ostvaruje sterne interakcije) i v899: N1-TIP (između grupe akceptora vodonične veze i grupe koja ostvaruje sterne interakcije) su u negativnoj korelaciji sa RR (Tabela 8) (Slika 25).



**Slika 25.** PLS-grafik koeficijenata sa najznačajnijim deskriptorima kreiranog 3D-QSAR modela.

Deskriptori v310: TIP-TIP, v682: O-N1, v701: O-N1 i v799: O-TIP su prisutni u svim modelima ispitivanja jedinjenja, dok je deskriptor v144: O-O specifičan za bacitracin, apramicin, novobiocin, vankomicin, kanamicin, gentamicin i tobramicin (ID: 8, 11-16) (Tabela 8) (**apramicin**, Slika 26).



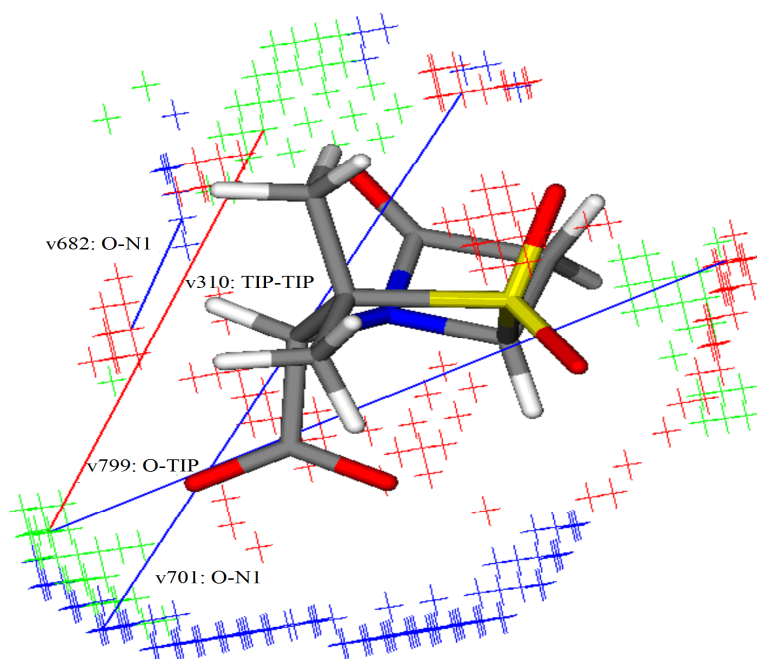


**Slika 26.** 3D-mapa interakcionih energija apramicina sa DRY-probom (žuto), TIP-probom (zeleno), O-probom (crveno) i N1-probom (plavo).

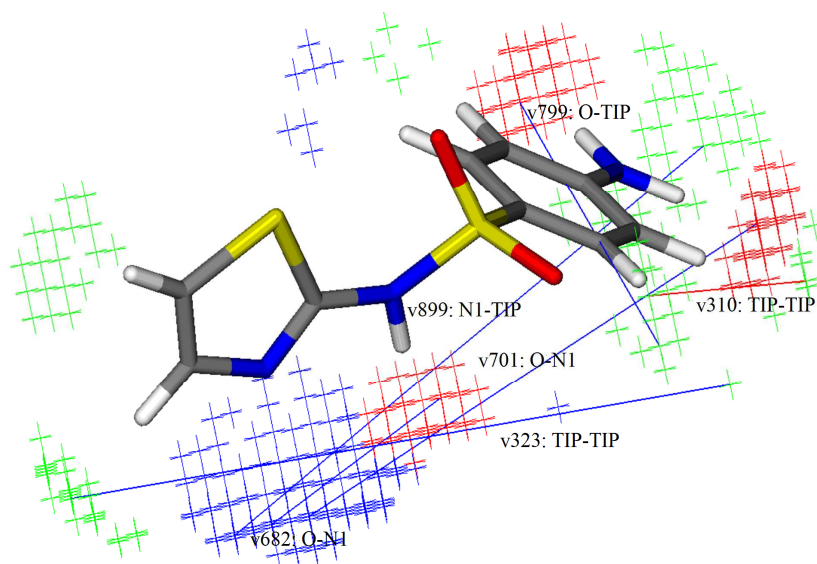
Prisustvo veoma specifičnih nepovoljnih v144: O-O interakcija između tercijarnih i kvaternernih N-atoma u bacitracinu, apramicinu, novobiocinu, vankomicinu, kanamicinu, gentamicinu i tobramicinu je osnovni razlog njihove niske RR aktivnosti (Tabela 8).

Sulbaktam ne sadrži v144: O-O, v225: N1-N1, v323: TIP-TIP, v341: TIP-TIP, v723: O-N1 i v899: N1-TIP deskriptore (**sulbaktam**, Slika 27).

Takođe, za etidijum bromid, sulbaktam i sulfatiazol je uočen sličan farmakoforni profil bez v144: O-O, v225: N1-N1, v341: TIP-TIP i v723: O-N1 deskriptora (**sulfatiazol**, Slika 28).



**Slika 27.** 3D-mapa interakcionih energija sulbaktama sa DRY-probom (žuto), TIP-probom (zeleno), O-probom (crveno) i N1-probom (plavo).



**Slika 28.** 3D-mapa interakcionih energija sulfatiazola sa DRY-probom (žuto), TIP-probom (zeleno), O-probom (crveno) i N1-probom (plavo). Favorizovane interakcije su obeležene crvenom linijom, a nefavorizovane interakcije su predstavljene plavom linijom.

**Tabela 8.** GRIND varijable sa najvećim uticajem na QSAR model, kao i odgovarajući strukturni delovi testiranih jedinjenja u vezi sa varijablama

3D-QSAR deskriptor	Varijable	Rastojanje (Å)	Uticaj	Strukturni elementi	Prisustvo
O-N1	682	4-4,4	-	tercijerni ili kvaternerni N-atom <i>sa</i> karbonilnim ili hidroksilnim O-atomom	sva jedinjenja
N1-N1	225	13,2-13,6	-	između karbonilnih ili hidroksilnih O-atoma	sva jedinjenja osim <b>2, 3, 5</b>
O-TIP	799	12,4-12,8	-	tercijerni ili kvaternerni N-atom <i>sa</i> alifatičnim bočnim lancem	sva jedinjenja
TIP-TIP	341	21,2-21,6	-	između supstituenata na prstenu	sva jedinjenja osim <b>2, 3, 5, 7</b>
N1-TIP	899	14-14,4	-	karbonilni ili hidroksilni O-atomi <i>sa</i> alifatičnim bočnim lancem	sva jedinjenja osim <b>3</b>
O-N1	723	20,4-20,8	-	tercijerni ili kvaternerni-N-atom <i>sa</i> karbonilnim ili hidroksilnim O-atomom	sva jedinjenja osim <b>2-6, 10</b>
O-O	144	19,2-19,6	-	između tercijernih ili kvaternernih-N-atoma	8, 11-16
O-N1	701	11,6-12	-	tercijerni ili kvaternerni-N-atom <i>sa</i> karbonilnim ili hidroksilnim O-atomom	sva jedinjenja
TIP-TIP	323	14-14,4	-	između supstituenata na prstenu	sva jedinjenja osim <b>1, 3</b>
TIP-TIP	310	8,8-9,2	+	supstituenti na prstenu <i>sa</i> alifatičnim bočnim lancem	sva jedinjenja

Odsustvo nekoliko važnih nepovoljnih interakcija (v144: O-O, v225: N1-N1, v341: TIP-TIP i v723: O-N1) u etidijum bromidu, sulbaktamu i sulfatiazolu doprinosi njihovoj visokoj RR aktivnosti (Tabela 8).

## 5. DISKUSIJA

Vrste roda *Lactococcus* imaju dugotrajnu primenu u prehrambenoj industriji kao starter kulture i najčešće su klasifikovane kao GRAS (engl. Generally Recognized As Safe) mikroorganizmi (Salminen et al., 1998). Međutim, kako se lanac ishrane smatra jednim od glavnih puteva prenosa rezistencije bakterija na antibiotike unutar humane i životinjske populacije, izučavanje nepatogenih bakterija koje pokazuju rezistenciju na antibiotike dobija sve veći značaj. Iako se generalno smatraju bezbednim mikroorganizmima, usled transfera gena za rezistenciju na antibiotike sa BMK sojeva na bakterije koje su deo GIT-a, a time i na patogene, potencijalni rizik po zdravlje ljudi ipak postoji.

Usled toga, izučavanje MDR transportera, kod laktokoka namenjenih za prehrambenu industriju je od velikog značaja.

Analizom genoma *L. lactis* Lubelski i saradnici (2006a) detektovali su prisustvo 40 potencijalnih gena za MDR transportere, od čega su funkcionalno okarakterisani LmrA, ATP-zavisni MDR transporter (van Veen et al., 1996), član MFS familije LmrP (Bolhuis et al., 1995) i heterodimerni ABC-MDR transporter LmrCD (Lubelski et al., 2004).

U ovom radu, prikazano je kloniranje, ekspresija i po prvi put funkcionalna karakterizacija CmbT (engl. Cysteine and Methionine Biosynthesis Transporter) proteina, novog MDR transportera u *L. lactis*.

### 5.1. Kompjuterska analiza CmbT proteina

Gen *cmbT* identifikovan je po prvi put prilikom izučavanja regulacije metabolizma sumpora u *L. lactis* (Fernández et al., 2002). Insercionom mutagenезom soja *L. lactis* MG1363 dobijen je mutant u otvorenom okviru čitanja (engl. Open Reading Frame - ORF) veličine 1,362-bp, koji potencijalno kodira efluks protein homolog članovima 2.A.1.3.X supstrat/H<sup>+</sup> antiporter-2 subfamilije, MFS (engl. Major Facilitator Superfamily) transportnih proteina (Saier, 2000). Mutirani ORF je označen kao *cmbT* (engl. Cysteine and Methionine Biosynthesis Transporter). Eksperimentalno je pokazano da je produkt *cmbT* gena uključen u regulaciju metabolizma sumpora i da

snižava aktivnost cistation  $\beta,\gamma$ -lijaze, ključnog enzima u biosintezi metionina i cisteina (Golic et al., 2005). Međutim, tačna uloga CmbT proteina u metabolizmu sumpora nije razjašnjena. S obzirom da se radi o transportnom proteinu pretpostavka je da CmbT deluje na regulaciju metabolizma sumpora indirektno putem transporta određenih komponenti iz ćelije laktokoka kao što je npr. acetilserin, što se negativno odražava na aktivaciju gena uključenih u biosintezu metionina i cisteina (Fernández et al., 2002).

U ovom radu, analizom nukleotidne sekvence *cmbT* gena utvrđeno je da kodira sintezu efluks proteina koji pokazuje homologiju sa članovima 2.A.1.3.X supstrat/H<sup>+</sup> antiporter-2 subfamilije MFS familije (engl. Major Facilitator Superfamily) MDR proteina. Predikcija pomoću PSORT programa pokazala je da CmbT protein poseduje 12 transmembranskih domena (engl. Transmembrane Segments - TMS), dok analiza TMHMM softverom ukazuje na prisustvo 14 hidrofobnih domena. Sekundarnu strukturu LmrP proteina, ranije okarakterisanog MDR transportera kod *L. lactis*, čini 12 transmembranskih domena.

## 5.2. Kloniranje i ekspresija *cmbT* gena

Prvi korak u funkcionalnoj karakterizaciji CmbT proteina bio je kloniranje i ekspresija *cmbT* gena pomoću precizno regulisanog NICE sistema (Kuipers et al., 1998). Rezultati dobijeni RT-PCR i Western blot analizama pokazuju da su najviša ekspresija *cmbT* gena i najveća količina CmbT proteina dobijeni nakon indukcije nizinom u koncentraciji 1 ng/ml, dok je pri višim koncentracijama nizina, nivo ekspresije CmbT proteina opadao. Pored toga, SDS-PAGE analizom povećane ekspresije CmbT proteina, nije uočena pojačana proteinska traka očekivane veličine (49 kDa), najverovatnije jer je u pitanju membranski protein. Ranije studije pokazale su da ekspresija membranskih proteina može biti dostignuta samo u malom procentu, svega oko 3% od totalnih proteina (Bernaudent et al., 2011). Povećana ekspresija membranskih proteina najčešće je toksična za ćeliju domaćina, usled narušavanja integriteta membrane i vitalnosti ćelije. Pored toga, postoji mogućnost da je povećana ekspresija membranskih proteina praćena brzom degradacijom posredstvom endogenih proteaza, lociranih u citoplazmi ili citoplazmatičnoj membrani, čime je nivo ekspimiranog proteina redukovan (Wagner et al., 2007).

Slično istraživanjima koja su sprovedli Putman i saradnici, proučavajući povećanu ekspresiju LmrP proteina kod laktokoka (Putman et al., 1999), i ova studija je pokazala da ćelije koje rastu u prisustvu nizina u koncentracijama višim od 5 ng/ml sporije rastu. Poređenjem rasta indukovanog CT50<sup>1</sup> soja i kontrolnih NZ8113<sup>1</sup> i CT50<sup>0</sup> sojeva, nije dobijeno značajno odstupanje, čime je pokazano da nizin nema uticaja na rast ćelija kada se doda u medijum u koncentraciji od 1 ng/ml. Eliminisanje potencijalnog citotoksičnog efekta nizina na ćelije pri koncentraciji od 1 ng/ml, od velikog je značaja, kako bi se pokazalo da je MDR profil indukovanog CT50<sup>1</sup> soja posledica efluksne aktivnosti CmbT proteina, a ne smrti ćelija usled dodatka nizina.

### 5.3. Funkcionalna karakterizacija CmbT proteina

Glavni cilj ove studije, bio je da se okarakteriše MDR aktivnost CmbT proteina, usled čega su urađeni transportni eseji u prisustvu velikog broja strukturno različitih antibiotika, kao i različitih toksičnih supstrata.

Rezultati pokazuju da CmbT statistički značajno ( $p$  vrednost manja od 0,001) obezbeđuje **rezistenciju** laktokoka na linkozamidni antibiotik linkomicin, koji u svojoj strukturi poseduje sumpor, i sulfonamidne antibiotike sulbaktam, sulfametoksazol i sulfadiazin ( $p$  vrednost manja od 0,05). Antibiotici koji u svojoj strukturi poseduju sumpor, uključeni su u studiju između ostalog i iz razloga što je u prethodnim radovima pokazana povezanost CmbT proteina sa metabolizmom sumpora u *L. lactis*.

Interesantno je takođe, da povećana ekspresija CmbT proteina značajno ( $p < 0,05$ ) doprinosi rezistenciji *L. lactis* na aminoglikozidni antibiotik streptomycin. Ovaj podatak je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim prilikom izučavanja LmrP proteina, jedinog do sada okarakterisanog MFS transportera u *L. lactis* (Putman et al., 2001), koji ne obezbeđuje rezistenciju na aminoglikozide. Pored toga, CmbT značajno ( $p < 0,05$ ) doprinosi rezistenciji i na aminonukleozidni antibiotik puromicin i semisintetski antibiotik rifampicin. U obezbeđivanju rezistencije na azitromicin, eritromicin i tetraciklin, koje prepoznaje LmrP, CmbT nije imao značajnu ulogu.

Uzimajući u obzir sve ove rezultate, može se zaključiti da LmrP i CmbT prepoznaju strukturno i funkcionalno različite supstrate.

U svakom slučaju, dobijeni rezultati pokazuju povećanu otpornost ćelije domaćina na nekoliko antimikrobnih agenasa, usled povećanog efluksa ciljnog molekula posredstvom pojačano eksprimiranog CmbT proteina u poređenju sa kontrolnim sojem.

Pored rezistencije na antibiotike, pokazano je da CmbT obezbeđuje otpornost ćelije domaćina i na druge strukturno različite supstrate. Najviša vrednost rezistencije posredovane CmbT proteinom dobijena je za holat (p vrednost manja od 0,01). Holat je jedna od najčešće korišćenih slobodnih žučnih kiselina u gastrointestinalnom traktu ljudi, koja snažno inhibira rast različitih intestinalnih bakterija (Binder et al., 1975). Ranije je pokazano da je ABC transporter LmrCD glavni transporter u *L. lactis* odgovoran za rezistenciju na žučne soli (Zaidi et al., 2008), mada uloga drugih transportera u rezistenciji na holat nije isključena. Analizom genoma koju su izvršili Zaidi i saradnici (2008), *cmbT* (*llmg* 1104) gen nije identifikovan među genima koji učestvuju u rezistenciji na holat. Međutim, rezultati dobijeni eksperimentalnim putem u ovoj studiji, ipak ukazuju da CmbT može delovati kao alternativni transporter koji doprinosi rezistenciji na holat.

Soj *L. lactis* NZ9000/pCT50 koji je pojačano eksprimirao *cmbT* gen, takođe je pokazao značajno ( $p < 0,05$ ) veću rezistenciju na Hoechst 33342 i EtBr u poređenju sa kontrolnim sojem *L. lactis* NZ9000.

Sa druge strane, vrednosti  $IC_{50}$  za soj pCT50<sup>1</sup>, koji je pojačano eksprimirao CmbT, bile su niže u poređenju sa kontrolnim sojevima za sulfonamidne antibiotike sulfakinoksalin, sulfametoksipiridan i sulfapiridin, aminoglikozidne antibiotike, kanamicin, gentamicin sulfat, geneticin disulfat i tobramicin, aminociklitol (blizak aminoglikozidima) spektinomycin,  $\beta$ -laktamske antibiotike ampicilin, penicilin G i penicilin V, glikopeptidni antibiotik vankomicin, hinolonske antibiotike ciprofloksacin i norfloksacin i piridopirimidinski antibiotik pipemidinsku kiselinu, usled čega se može pretpostaviti da CmbT povećava **osetljivost** ćelije domaćina na date antibiotike.

Međutim, efluks različitih supstrata je najverovatnije sporedna uloga CmbT proteina, pa se postavlja pitanje koja je njegova fiziološka uloga? S obzirom da je ranije pokazana povezanost između *cmbT* gena i regulacije *metCcysK* operona, može se pretpostaviti da je transport različitih fizioloških supstrata uključenih u metabolizam sumpora, fiziološka uloga CmbT proteina.



Iako se ne može isključiti uticaj drugih transportera na rezistenciju *L. lactis* NZ9000/pCT50, rezultati dobijeni u transportnim i citotoksičnim esejima, snažno ukazuju na značajan doprinos CmbT proteina u rezistenciji *L. lactis* na brojne supstrate.

#### 5.4. Uticaj povećane ekspresije *cmbT* gena na rast *L. lactis* NZ9000

Na osnovu dobijenih rezultata u analizi uticaja CmbT proteina na rezistenciju laktokoka na antibiotike, može se postaviti hipoteza, da pored transporta različitih fizioloških jedinjenja, CmbT protein ima i sporednu ulogu u izbacivanju različitih toksičnih supstrata. Pored toga, pokazano je da postojanje profila u kome se preklapaju povećana rezistencija i povećana osetljivost na različite supstrate pruža ćeliji veću fleksibilnost pri različitim fiziološkim uslovima, obezbeđujući veću verovatnoću preživljavanja (Tal and Schuldiner, 2009).

Stoga je jedan od ciljeva ove studije bio i da se utvrdi da li nagomilavanje pojačano eksprimiranog MDR CmbT proteina u ćeliji, koji dovodi do povećane osetljivosti *L. lactis* na neke supstrate, ima uticaja na biološki fitnes ćelije.

Jedan od značajnih aspekata fitnesa *L. lactis* je omogućavanje preživljavanja i opstanka u različitim sredinama, kao što su humani i životinjski organizam, hrana i kisela sredina. Usled toga, razumevanje mehanizma biološkog fitnesa i preživljavanja laktokoka u ekstremnim i promenljivim uslovima, može doprineti unapređenju primene *L. lactis* kao starter kulture u prehrambenoj industriji.

Postoje pretpostavke da rezistencija na antibiotike i druge supstrate može biti povezana sa fitnesom kod bakterija. Rezistencija na antibiotike nastala kao posledica mutacija najčešće dovodi do redukcije biološkog fitnesa, jer antibiotici deluju na osnovne bakterijske funkcije poput transkripcije RNK, sinteze proteina i sinteze ćelijskog zida (Marcusson et al., 2009).

Dok brojne studije ističu uticaj mutacijom izazvane rezistencije na bakterijski fitnes, novija istraživanja preusmerena su ka inducibilnim MDR efluks proteinima. Efluks supstrata je široko raspostranjen MDR mehanizam kod bakterija. Pokazano je da MDR efluksne pumpe, nezavisno od efluksa širokog spektra toksičnih agenasa, mogu biti povoljne za ćeliju u pogledu bakterijskog fitnesa (Pérez et al., 2012, Wood and Cluzel, 2012). Pored toga, neke MDR efluksne pumpe doprinose kolonizaciji različitih

organizama i opstanku u takvoj sredini (Pérez et al., 2012). Na primer, najviši nivo rezistencije posredovan CmbT proteinom uočen je kod holata, jedne od najčešće prisutnih slobodnih žučnih kiselina u humanom intestinalnom traktu, koja snažno inhibira rast crevnih bakterija (Binder et al., 1975; Filipic et al., 2013a).

Ispitivanje uticaja povećane ekspresije CmbT proteina na fitness *L. lactis*, pokazalo je da CmbT ne dovodi do smanjenja fitnesa, čak ni u uslovima rasta u minimalnom CDM medijumu. Naprotiv, blago povećan nivo rasta *L. lactis* NZ9000 koji pojačano eksprimira *cmbT* u bogatom (1,13 puta) i hemijski definisanom medijumu koji sadrži 0,1 x metionin ili 10 x metionin i 10 x cistein (1,04 puta) može biti posledica efluksne aktivnosti CmbT proteina i izbacivanja toksičnih agenasa iz ćelije.

Može se zaključiti da povećana efluksna aktivnost posredovana CmbT transporterom dovodi do poboljšanja fitnesa *L. lactis* eliminacijom toksičnih jedinjenja i specifičnim promenama u bakterijskoj fiziologiji.

### 5.5. Efluks etidijum bromida i Hoechst 33342 posredovan CmbT proteinom

Primenom različitih kompjuterskih programa u kojima je analizirana nukleotidna i aminokiselinska sekvenca CmbT proteina, pokazano je da *cmbT* gen kodira efluksni protein koji funkcioniše po principu antiport mehanizma. Da bi se eksperimentalno potvrdila efluksna aktivnost CmbT proteina, urađeni su transportni eseji u prisustvu EtBr i Hoechst 33342 koji nakon interakcije sa DNK fluoresciraju. Dodavanje EtBr u ćelije *L. lactis* NZ9000/pCT50 dovelo je do pojave fluorescencije čiji je intenzitet bio dva puta manji u poređenju sa kontrolnim *L. lactis* NZ9000 sojem, dok dodatak Hoechst 33342 dovodi do približno trostrukog smanjenja intenziteta fluorescence kod *L. lactis* NZ9000/pCT50 u poređenju sa kontrolnim sojem. Može se tumačiti da je dobijeni rezultat posledica smanjenja nivoa EtBr i Hoechst 33342 u ćeliji, tj. da dolazi do pojačanog izbacivanja EtBr i Hoechst 33342 iz ćelije posredstvom pojačano ekspimiranog CmbT proteina, čime je potvrđena efluks aktivnost CmbT transportera.

Pored toga, dodatak ATPaznog inhibitora orto-vanadata nije imao uticaja na izbacivanje EtBr iz ćelije, na osnovu čega se može zaključiti da za aktivnost CmbT transportera nije potrebna energija dobijena hidrolizom ATP-a. Nasuprot tome, ranije

okarakterisan laktokokalni MDR protein LmrA, bio je inhibiran orto-vanadatom, na osnovu čega je svrstan u primarne, ABC transportere (Bolhuis et al., 1994).

Sa druge strane, dodatak jonofora valinomicina (koji remeti gradijent koncentracije protona,  $\Delta\text{pH}$ ) i nigericina (koji deluje na membranski potencijal,  $\Delta\psi$ ), inhibira efluks Hoechst 33342 iz ćelije, na osnovu čega se može zaključiti da CmbT transporter pripada grupi protonskih pumpi (engl. Proton Motive Force - PMF) kao i ranije okarakterisan sekundarni transporter LmrP kod *L. lactis* (Putman et al., 1999).

### 5.6. Uloga CmbT proteina u metabolizmu sumpora

Bakterije mlečne kiseline (BMK) su Gram-pozitivne bakterije koje imaju veliku primenu u prehrambenoj industriji, jer doprinose boljem ukusu i konzistenciji finalnog proizvoda. Aminokiseline, posebno aromatične, sa razgranatim bočnim lancem i sumporom u svom sastavu, imaju ulogu prekursora u sintezi aromatičnih jedinjenja. Enzimski i/ili hemijski konverzija aminokiselina smatra se esencijalnom za nastanak specifičnih aromatičnih jedinjenja poput estara, tiola, aldehida ili ketona. Enzim cistation  $\beta$ -liaza (CBL) ima sposobnost razgradnje aminokiselina sa sumporom. CBL je enzim zavisian od piridoksal-fosfata (PLP) i njegova fiziološka uloga je kataliza preposlednjeg koraka u biosintezi metonina kod mikroorganizama i biljaka, npr.  $\alpha,\beta$ -eliminaciona reakcija kojom se cistein prevodi u homocistein, piruvat i amonijak. Potom, dolazi do metilacije homocisteina u metionin. Pored toga, može dovesti do razgradnje drugih aminokiselina sa sumporom posredstvom  $\alpha,\gamma$ -eliminacione reakcije, koja u slučaju metionina dovodi do nastanka metanetiola. Metanetiol je prekursor jedinjenja važnog za ukus sireva, poput dimetil disulfida (DMDS) i dimetil trisulfida (DMTS). Ovi enzimi takođe mogu prevesti metionin u isparljiva jedinjenja.

Sa druge strane, konverzija metionina pomoću CBL dovodi do oslobađanja drugih isparljivih sumpornih jedinjenja značajnih za formiranje ukusa u sirevima, poput vodonik sulfida ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Do nedavno je  $\text{H}_2\text{S}$  bio poznat samo kao toksični gas, a danas se povezuje sa brojnim pozitivnim funkcijama kod sisara poput vazorelaksacije, kardioprotektivnog efekta i antiinflamatornog efekta u gastrointestinalnom traktu.

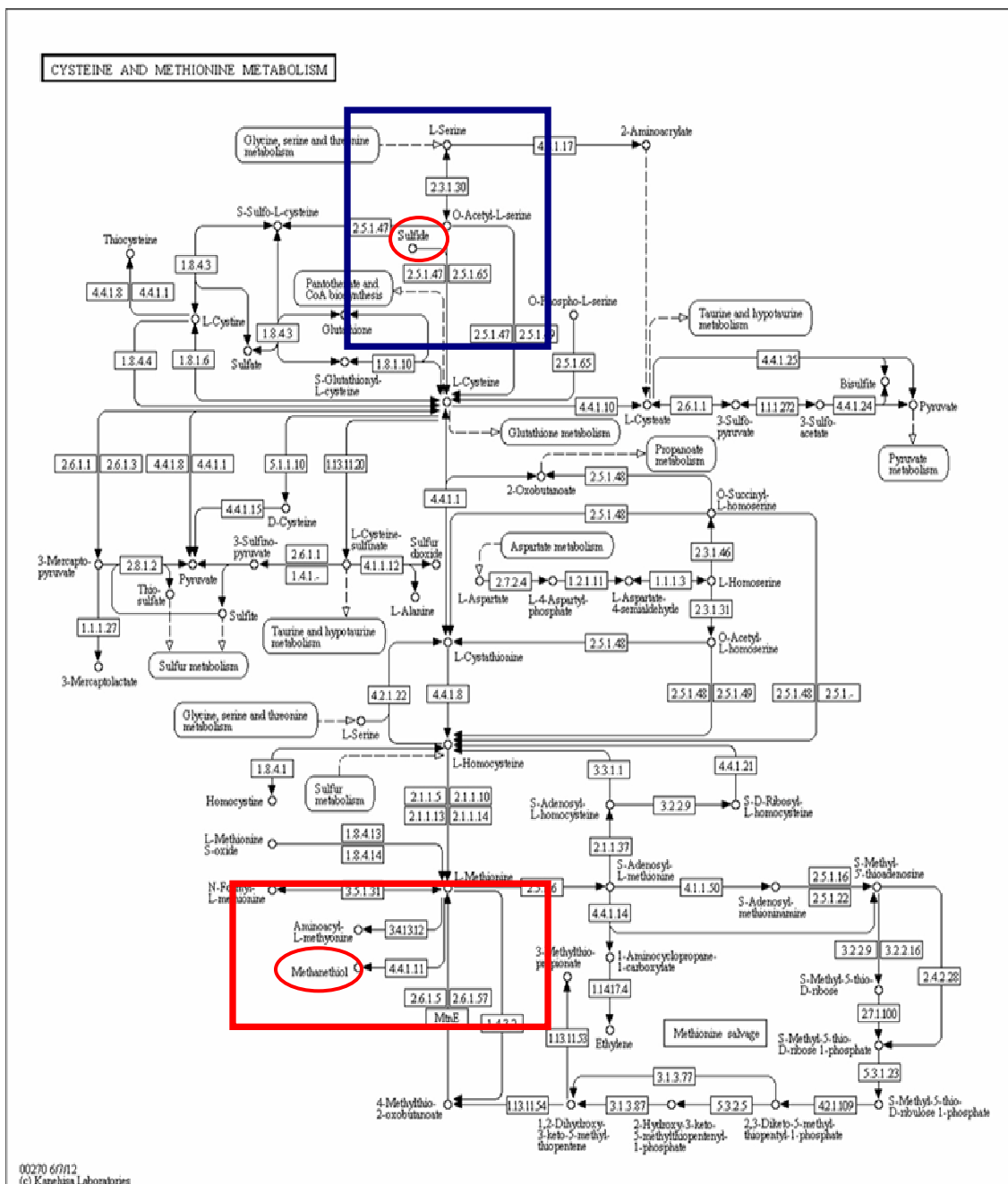
Ranije studije u kojima je izučavan metabolizam sumpora kod laktokoka, ukazale su na postojanje veze između *cmbT* gena i regulacije *metCcysK* operona koji

kodira cistation  $\beta,\gamma$ -liazu (CBL) i cistein sintazu (CysK) (Fernández et al., 2002; Golic et al., 2005). Fiziološka uloga CBL je da katalizuje preposlednji korak u biosintezi metionina. Iako CBL, pored katalize preposlednjeg koraka u biosintezi metionina, poseduje i dodatnu aktivnost da sekundarnom reakcijom konvertuje metionin u metanetiol, sekundarna reakcija je 100 puta manje efikasna od primarne reakcije prevođenja cistationa u homocistein (Alting et al., 1995). CysK cistein sintaza katalizuje nastanak cisteina iz *O*-acetil-L-serina i sulfida, u poslednjem koraku biosinteze cisteina.

U cilju razjašnjavanja moguće uloge CmbT proteina u metabolizmu sumpora kod laktokoka, merena je produkcija tiola i  $H_2S$  kod CT50<sup>1</sup> i kontrolnog NZ9000 soja, kao rezultat aktivnosti CBL i CysK. Dobijeni rezultati pokazali su da nije bilo značajne razlike u produkciji  $H_2S$  između CT50<sup>1</sup> i kontrolnog NZ9000 soja. Interesantno je da je nivo tiolnih grupa u supernatantu CT50<sup>1</sup> gajenog u CDM medijumu sa ograničenim izvorom metionina bio značajno viši (3,78 puta,  $p < 0,05$ ) nego kod kontrolnog soja, dovodeći do zaključka da CmbT može imati značajnu ulogu u metabolizmu sumpora delujući na produkciju isparljivih jedinjenja u pravcu degradacije metionina. Uzimajući u obzir, da povećana sinteza CmbT proteina dovodi do rezistencije na neke antibiotike koji poseduju sumpor u svojoj strukturi, moguće objašnjenje može biti da je prirodni supstrat CmbT proteina neko jedinjenje uključeno u metabolizam sumpora, koje dovodi do povećanja koncentracije tiola u supernatantu. Međutim, u prisustvu viših koncentracija metionina (CDM sa 10 x metionin/cistein) produkcija tiola je značajno umanjena (4,3 puta u poređenju sa istim sojem gajenim u 0,1 x metioninu,  $p < 0,05$ ) što je u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Dias i Weimer (1998).

Nasuprot tome, produkcija tiola kod CT50<sup>1</sup> gajenog u CDM medijumu sa 10 x metioninom/cisteinom je bila niža nego kod kontrolnog NZ9000 soja gajenog u istom medijumu, iako razlika nije bila statistički značajna (1,6 puta,  $p > 0,05$ ), slično razlikama u produkciji tiola kod NZ9000 soja gajenog u CDM sa visokim i niskim sadržajem metionina i cisteina. Razlike u produkciji tiola u dva analizirana soja, gajena u prisustvu visokih i niskih koncentracija metionina i cisteina, može biti objašnjena činjenicom da i drugi enzimi, pored CBL, poput cistation  $\gamma$ -liaze koja učestvuje u procesu konverzije cistationa u cistein (Bruinenberg et al., 1997), ili aminotransferaze, igraju značajnu ulogu u konverziji metionina u isparljiva jedinjenja koja doprinose boljem ukusu proizvoda.

Analizom metabolizma cisteina i metionina kod *L. lactis* (Slika 29), može se zaključiti da CmbT protein nema uticaja na reakcije u kojima nastaje sulfid, dok najverovatnije učestvuje u reakcijama u kojima nastaje metantioi.



Slika 29. Metabolizam cisteina i metionina kod *L. lactis*, preuzeto: <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00270.png>.

### 5.7. Modeliranje, optimizacija i molekulska dinamička studija CmbT proteina QSAR analizom

Za razliku od LmrA, LmrP i LmrCD proteina gde je za karakterizaciju supstrata korišćen eksperimentalni pristup, u slučaju P-glikoproteina specifičnost supstrata određena je primenom kompjuterskih metoda. Za ispitivanje specifičnosti supstrata u slučaju CmbT proteina korišćen je indirektan pristup, koji se zasniva na strukturnim karakteristikama samih supstrata i obuhvata 3D-QSAR studije.

Kako je određivanje specifičnosti supstrata CmbT proteina od velikog značaja, formiran je homologni model CmbT proteina, optimizovan i ispitan molekulska dinamičkim studijama.

Relativne rezistencije 21 testiranog jedinjenja korišćene su za formiranje 3D-QSAR modela i selekciju molekulskih determinanti koje CmbT prepoznaje.

Sposobnost formiranog 3D-modela da predvidi aktivnost, ispitana je metodom ukrštene validacije za trening set ( $Q^2$ : 0,69,  $R^2_{\text{Observed vs. Predicted}}$ : 0,918 i RMSEE: 0,193) i eksternom validacijom za verifikacioni set ( $R^2_{\text{Observed vs. Predicted}}$ : 0,704 i RMSEP: 0,289). Dobijeni statistički parametri ukazuju da se predloženi 3D-QSAR model može koristiti kao pouzdan model u predviđanju RR aktivnosti.

Pozitivna korelacija između lipofilnosti ( $\log D_{\text{pH } 5,0}$ ) i RR vrednosti ukazuje da se ispitivani CmbT supstrati umeću u lipidni dvosloj. Pored toga, dobijeni rezultati pokazuju da se CmbT aminokiselinski ostaci Leu331, Val357 i Leu360 koji učestvuju u vezivanju liganda takođe nalaze u membrani, što sve zajedno dovodi do hipoteze da CmbT najverovatnije prepoznaje supstrate u membrani, a ne u citoplazmi. Ova hipoteza je u skladu sa rezultatima dobijenim u studijama za LmrP i LmrA, dobro okarakterisanih MDR transportera u *L. lactis* (Bolhuis et al., 1996; Mazurkiewicz et al., 2005).

Prisustvo veoma specifičnih nefavorizovanih v144: O-O interakcija između tercijernog i kvaternernog N atoma u bacitracinu, apramicinu, novobiocinu, vankomicinu, kanamicinu, gentamicinu i tobramicinu, prepoznato je kao glavni razlog smanjene RR vrednosti. Nasuprot tome, odsustvo nekoliko značajnih nefavorizovanih interakcija (v144: O-O, v225: N1-N1, v341: TIP-TIP, i v723: O-N1) kod EtBr, sulbaktama i sulfatiazola je odgovorno za povećane RR vrednosti.

Konačno, rezultati ove studije, određivanjem CmbT vezujućeg mesta (Leu331, Val357 i Leu360) unutar membranskog dela CmbT proteina, zajedno sa pozitivnom korelacijom između lipofilnosti ( $\log D_{pH5,0}$ ) i RR vrednosti, ukazuju da CmbT prepoznaje supstrate unutar lipidnog dvosloja.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata izloženih u ovom radu, mogu se doneti sledeći zaključci:

1. *cmbT* gen uspešno je kloniran u plazmid pNZ8113, nizvodno od fino regulisanog inducibilnog  $P_{nisA}$  promotora.
2. Povećana ekspresija CmbT proteina postignuta je pomoću NICE sistema. Rezultati dobijeni RT-PCR i Western blot analizama pokazali su da su najviša ekspresija *cmbT* gena i najveća količina CmbT proteina dobijene nakon indukcije nizinom u koncentraciji 1 ng/ml.
3. Dodatak nizina u medijum u koncentraciji 1 ng/ml nema uticaja na rast soja *L. lactis* NZ9000.
4. Ispitivanjem rasta u prisustvu različitih antibiotika i toksičnih supstrata pokazano je da CmbT protein pripada MDR transporterima.
5. CmbT obezbeđuje rezistenciju *L. lactis* na linkozamidni antibiotik linkomicin, sulfonamidne antibiotike sulbaktam, sulfametoksazol i sulfadiazin, aminoglikozidni antibiotik streptomycin, aminonukleozidni antibiotik puromicin i semisintetski antibiotik rifampicin.
6. Pored rezistencije na strukturno različite antibiotike, CmbT doprinosi povećanoj otpornosti *L. lactis* i na različite toksične agense, poput holata, EtBr i Hoechst 33342.
7. Povećana ekspresija CmbT proteina dovodi do povećanog fitnesa *L. lactis* najverovatnije usled eliminacije toksičnih jedinjenja.
8. Transportni eseji u prisustvu EtBr i Hoechst 33342 i smanjenje fluorescence indukovanog (*L. lactis* NZ9000/pCT50) soja u poređenju sa kontrolnim (*L. lactis* NZ9000) sojem ukazuju da je CmbT efluks protein.
9. CmbT ne pripada grupi primarnih, ABC transportera, jer dodatak ATPaznog inhibitora orto-vanadata nije imao uticaja na izbacivanje etidijum bromida iz ćelije.
10. Dodatkom jonofora valinomicina i nigericina inhibiran je efluks Hoechst 33342 iz ćelije, na osnovu čega se može zaključiti da CmbT transporter pripada grupi protonskih pumpi (engl. Proton Motive Force - PMF).
11. Dobijeni rezultati ukazuju da je CmbT protein uključen u metabolizam sumpora u soju *L. lactis* u toku rasta u medijumu sa ograničenim izvorom metionina i cisteina.



12. Za određivanje specifičnosti supstrata za CmbT protein formiran je pouzdan 3D-QSAR model.

13. 3D-QSAR analizom pokazano je da CmbT protein prepoznaje supstrate unutar lipidnog dvosloja, a ne u citoplazmi, posredstvom aminokiselinskih ostataka Leu331, Val357 i Leu360 koji se nalaze u membrani.

14. 3D-QSAR analizom pokazano je da je odsustvo nekoliko značajnih nefavorizovanih interakcija (v144: O-O, v225: N1-N1, v341: TIP-TIP, i v723: O-N1) kod EtBr, sulbaktama i sulfatiazola odgovorno za povećane RR vrednosti.

## 7. LITERATURA

1. Ahmed, M., Lyass, L., Markham, P. N., Taylor, S. S., Vasquez-Laslop, N. and Neyfakh, A. A., 1995. Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J. Bacteriol.* 177, 3904–3910.
2. Ainsa, J. A., Blokpoel, M. C. J., Otal, I., Young, D. B., De Smet, K. A. L. and Martin, C., 1998. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 180, 5836–5843.
3. Akerberg, C., Hofvendahl, K., Zacchi, G. and Hahn-Hagerdal, B., 1998. Modeling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentration on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 49, 682-690.
4. Allen, D. M., 1974. The relationship between variable selection and data augmentation and a method for prediction. *Technometrics* 16, 125-127.
5. Altenberg, G. A., Vanoye, C. G., Horton, J. K. and Reuss, L., 1994. Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug-resistant cells: evidence against direct drug extrusion from the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4654–4657.
6. Alting, A. C., Engels, W. J. M., van Schalkwijk, S. and Exterkate, F. A., 1995. Purification and characterization of cystathionine  $\beta$ -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 and its possible role in flavor development in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4037–4042.
7. Aumercier, M., Bouhallab, S., Capmau, M. L. and Le Goffic, F., 1992. RP59500: a proposed mechanism for its bactericidal activity. *J. Antimicrob. Chemother.* 30, 9-14.
8. Ballow, C. H. and Amsden, G. W., 1992. Azithromycin: the first azalide antibiotic. *Ann. Pharmacother.* 26, 1253-1261.
9. Barone, V., Biczysko, M., Bloino, J. and Puzzarini, C., 2013. Characterization of the elusive conformers of glycine from state-of-the-art structural,

- thermodynamic, and spectroscopic computations: Theory complements experiment. *J. Chem. Theory Comput.* 9(3), 1533-1547.
10. Bennett-Lovsey, R. M., Herbert, A. D., Sternberg, M. J. E., Kelley, L. A., 2008. Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins* 70, 611–625.
  11. Bentley, J., Hyatt, L. S., Ainley, K., Parish, J. H., Herbert, R. B. and White, G. R., 1993. Cloning and sequence analysis of an *Escherichia coli* gene conferring bicyclomycin resistance. *Gene* 127, 117–120.
  12. Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N. et al., 2000. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242.
  13. Bermudez-Humaran, L. G. and Langella, P., 2010. Perspectives for the development of human papillomavirus vaccines and immunotherapy. *Expert Rev. Vaccines* 9(1), 35-44.
  14. Bernaudat, F., Frelet-Barrand, A., Pochon, N., Dementin, S., Hivin, P., et al. 2011: Heterologous Expression of Membrane Proteins: Choosing the Appropriate Host. *PLoS ONE* 6(12): e29191. doi:10.1371/journal.pone.0029191.
  15. Binder, H. J., Filburn, B. and Floch, M., 1975. Bile acid inhibition of intestinal anaerobic organisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 28, 119–125.
  16. Bohn, C. and Bouloc, P., 1998. The *Escherichia coli* *cmlA* gene encodes the multidrug efflux pump Cmr/MdfA and is responsible for isopropyl-b-Dthiogalactopyranoside exclusion and spectinomycin sensitivity. *J. Bacteriol.* 190, 6072–6075.
  17. Bolhuis, H., Molenaar, D., Poelarends, G., van Veen, H.W., Poolman, B., Driessen, A.J.M. and Konings, W.N. 1994. Proton motive force-driven and ATPdependent drug extrusion systems in multidrug-resistant *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 176, 6957– 6964.
  18. Bolhuis, H., Poelarends, G., van Veen, H. W., Poolman, B., Driessen, A. J. M. and Konings, W. N., 1995. The lactococcal *lmrP* gene encodes a proton motive force-dependent drug transporter, *J. Biol. Chem.* 270, 26092–26098.

19. Bolhuis, H., van Veen, H.W., Poolman, B., Driessen, A. J. M. and Konings, W. N., 1997. Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 55-84.
20. Bolhuis, H., vanVeen, H.W., Molenaar, D., Poolman, B., Driessen, A. J. M. and Konings, W.N., 1996. Multidrug resistance in *Lactococcus lactis*: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane, *EMBO J.* 15, 4239– 4245.
21. Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. and Sorokin, A., 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11, 731–753.
22. Bradford, M. M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
23. Bradley, G., Juranka, P. F. and Ling, V., 1988. Mechanism of multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 948, 87–128.
24. Brown, M. H., Paulsen, I. T. and Skurray, R. A., 1999. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol. Microbiol.* 31, 394–395.
25. Bruinenberg, P. G., de Roo, G. and Limsowtin, G. K. Y., 1997. Purification and characterization of cystathionine g-lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11: possible role in flavor compound formation during cheese maturation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 561–566.
26. Budin-Verneuil, A., Maguin, E., Auffray, Y., Ehrlich, S. D. and Pichereau, V., 2004. An essential role for arginine catabolism in the acid tolerance of *Lactococcus lactis* MG1363. *Lait* 84, 61–68.
27. Cabrera, M. A., Gonzalez, I., Fernandez, C., Navarro, C. and Bermejo, M., 2006. A topological substructural approach for the prediction of P-glycoprotein substrates. *J. Pharm. Sci.* 95(3), 589-606.
28. Calamia, J. and Manoil, C., 1990. *lac* permease of *Escherichia coli*: topology and sequence elements promoting membrane insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4937–4941.

29. Clancy, J., Petitpas, J., Dib-Hajj, F., Yuan, W., Cronan, M., Kamath, A. V., Bergeron, J. and Retsema, J. A., 1996. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* 22, 867-879.
30. Claverys, J. P., 2001. A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res. Microbiol.* 152, 231–243.
31. Colmer, J. A., Fralick, J. A. and Hamood, A. N., 1998. Isolation and characterization of a putative multidrug resistance pump from *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 27, 63–72.
32. Contreras, A. and Vasquez, D., 1977. Cooperative and antagonistic interactions of peptidyl-tRNA and antibiotics with bacterial ribosomes. *Eur. J. Biochem.* 74, 539-547.
33. Corroler, D., Desmasures, N. and Gueguen, M., 1999. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 51, 91–99.
34. Danø, K., 1973. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Biophys. Acta* 323, 466–483.
35. Dawson, R. J. and Locher, K. P., 2006. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 443, 180–185.
36. de Cerqueira Lima, P., Golbraikh, A., Oloff, S., Xiao, Y. and Tropsha, A., 2006. Combinatorial QSAR Modeling of P-Glycoprotein Substrates. *J. Chem. Inf. Model.* 46(3), 1245-1254.
37. De Rossi, E., Branzoni, M., Cantoni, R., Milano, A., Riccardi, G. and Ciferri, O., 1998. *mmr*, a *Mycobacterium tuberculosis* gene conferring resistance to small cationic dyes and inhibitors. *J. Bacteriol.* 180, 6068–6071.
38. de Ruyter, P. G., Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., van Alen-Boerrigter, I. And Vos, W. M., 1996a. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 178(12), 3434-3439.

39. de Ruyter, P. G., Kuipers, O. P., de Vos, W. M., 1996b. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* using the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3662–3667.
40. de Vos, W. M., Kuipers, O. P., van der Meer, J. R. and Siezen, R. J., 1995. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: posttranslationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 17, 427–437.
41. Delahay, R. M., Robertson, B. D., Balthazar, J. T., Shafer, W. M. and Ison, C. A., 1997. Involvement of the gonococcal MtrE protein in the resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to toxic hydrophobic agents. *Microbiology* 143, 2127–2133.
42. Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. and Hugenholtz, J., 1996. Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69, 193–202.
43. Detmers, F. J. M., Lanfermeijer, F. C. and Poolman, B., 2001. Peptides and ATP binding cassette peptide transporters. *Res. Microbiol.* 152, 245–258.
44. Dias, B. and Weimer, B., 1998. Conversion of methionine to thiols by lactococci, lactobacilli and brevibacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3320–3326.
45. Dodd, H. M. and Gasson, M. J., 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. In: Gasson MJ, de Vos WM (eds) *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. Blackie, London.
46. Doige, C. A., Yu, X. and Sharom, F. J., 1993. The effect of lipids and detergents on ATPase-active P-glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1146, 65–72.
47. Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S. D. and Renault, P., 1999. Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4881–4886.
48. Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S., Lee, M. C., Xiong, G., Zhang, W., Yang, R., Cieplak, P., Luo, R., Lee, T., Caldwell, J., Wang, J. and Kollman, P., 2003. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.* 24, 1999–2012.
49. Dushi, R., Gutmann, D. A., Khoo, Y. S., Fagg, L. A. and van Veen, H. W., 2011. The choreography of multidrug export. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 807–811.

50. Edgar, R. and Bibi, E., 1997. MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *J. Bacteriol.* 179, 2274–2280.
51. Eichenbaum, Z., Federle, M. J., Marra, D., de Vos, W. M., Kuipers, O. P., Kleerebezem, M., et al. 1998. Use of the lactococcal nisA promoter to regulate gene expression in Gram-positive bacteria: comparison of induction level and promoter strength. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2763–2769.
52. Elliott, J. A., Collins, M. D., Pigott N. E. and Facklam, R. R., 1991. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. *J. Clin. Microbiol.* 29(12), 2731–2734.
53. Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelman, M. and Entian, K. D., 1994. Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 814–825.
54. Enouf, V., Langella, P., Commissaire, J., Cohen, J. and Corthier, G., 2001. Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1423–1428.
55. Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Trygg, J., Wikstrom, C. and Wold, S. (Eds.) 2001. Multi- and Megavariate Data Analysis. Basic Principles and Applications I, 2nd ed, Umetrics Academy, Umeå.
56. Fernández, M., Kleerebezem, M., Kuipers, O. P., Siezen, R. J. and van Kranenburg, R., 2002. Regulation of the *metC-cysK* operon, involved in sulphur metabolism in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 184, 82–90.
57. Fernández, M., van Doesburg, W., Rutten, G. A. M., Marugg, J. D., Alting A. C., van Kranenburg, R. and Kuipers, O. P., 2000. Molecular and functional analyses of the *metC* gene of *Lactococcus lactis*, encoding cystathionine  $\beta$ -lyase. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 42–48.
58. Fihman, V., Raskine, L., Barrou, Z., Kiffe, C., Riahi, J., Berçot, B. and Sanson-LePors, M. J., 2006. *Lactococcus garvieae* endocarditis: identification by 16 S rRNA and *sodA* sequence analysis. *J. Infect.* 52, e3–e6.
59. Filipic, B., Golic, N., Jovicic, B., Tolinacki, M., Bay, D. C., Turner, R. J., Antic-Stankovic, J., Kojic, M. and Topisirovic, L., 2013a. The *cmbT* gene encodes a

- novel major facilitator multidrug resistance transporter in *Lactococcus lactis*. Res. Microbiol. 164, 46-54.
60. Filipic, B., Jovicic, B., Uzelac, G., Miljkovic, M., Antic-Stankovic, J., Topisirovic, L. and Golic, N., 2013b. Over-expressed CmbT multidrug resistance transporter improves the fitness of *Lactococcus lactis*. Genetika, 45(1), 197-206.
61. Fischer, C. F. F., 1977. The Hartree-Fock Method for Atoms: A Numerical Approach. John Wiley and Sons, New York. ISBN 047125990X.
62. Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Field, C., Gocayne, J. D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelly, J. M., Weidman, J. F., Phillips, C. A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M. D., Utterback, T. R., Hanna, M. C., Nguyen, D. T., Saudek, D. M., Brandon, R. C., Fine, L. D., Fritchman, J. L., Fuhrman, J. L., Geohagen, N. S. M., Gnehm, C. L., McDonald, L. A., Small, K. V., Fraser, C. M., Smith, H. O. and Venter, J. C., 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science 269, 496–512.
63. Florez, A. B., Ammor, M. S. and Mayo, B., 2008. Identification of tet(M) in two *Lactococcus lactis* strains isolated from a Spanish traditional starter-free cheese made of raw milk and conjugative transfer of tetracycline resistance to lactococci and enterococci. Int. J. Food Microbiol. 121, 189–194.
64. Fluman, N. and Bibi, E., 2009. Bacterial multidrug transport through the lens of the major facilitator superfamily. Biochim. et Biophys. Acta 1794, 738–747.
65. Furukawa, H., Tsay, J. T., Jackowski, S., Takamura, Y. and Rock, C. O., 1993. Thiolactomycin resistance in *Escherichia coli* is associated with the multidrug resistance efflux pump encoded by *emrAB*. J. Bacteriol. 175, 3723–3729.
66. Garmory, H. S. and Titball, R. W., 2004. ATP-Binding Cassette Transporters Are Targets for the Development of Antibacterial Vaccines and Therapies Infect. Immun. 72, 6757–6763.
67. Geoffroy, M. C., Guyard, C., Quatannens, B., Pavan, S., Lange, M. and Mercenier, A., 2000. Use of green fluorescent protein to tag lactic acid



- bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 383-391.
68. Gill, M. J., Brenwald, N. P. and Wise, R., 1999. Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 187–189.
69. Golic, N., Schliekelmann, M., Fernandez, M., Kleerebezem, M. and van Kranenburg, R., 2005. Molecular characterization of the CmbR activator binding site in the *metC–cysK* promoter region in *Lactococcus lactis*. *Microbiol-SGM* 151, 439-446.
70. Gotoh, N., Tsujimoto, H., Poole, K., Yamagishi, J.-I. and Nishino, T., 1995. The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA–mexB–oprK* multidrug resistance operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2567–2569.
71. Gottesman, M. M. and Ambudkar, S. V., 2001. Overview: ABC transporters and human disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33, 453–458.
72. Gottesman, M.M. and Pastan I., 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 385-427.
73. Grinius, L., Dreguniene, G., Goldberg, E. B., Liao, C.-H. and Projan, S. J., 1992. A staphylococcal multidrug resistance gene product is a member of a new protein family. *Gene* 27, 119–129.
74. Guan, L., Ehrmann, M., Yoneyama, H. and Nakae. T., 1999. Membranetopology of the xenobiotic-exporting subunit, MexB, of the MexA,B-OprM Extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 274, 10517–10522.
75. Hagman, K. E., Pan, W., Spratt, B. G., Balthazar, J. T., Judd, R. C. and Shafer, W. M., 1995. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. *Microbiology* 141, 611–622.
76. Hanahan, D., 1985. DNA Cloning (Glover, D.M., ed) IRL Press, Oxford, 1: 109.
77. Heap, H. A. and Lawrence, R. C., 1984. The development of a defined starter system for casein manufacture. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 19, 119–123.
78. Heap, H. A., 1998. Optimising starter culture performance in NZ cheese plants. *Aust. J. Dairy Tech.* 53, 74–78.

79. Heir, E., Sundheim, G. and Holck, A. L., 1998. The *Staphylococcus aureus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. FEMS Microbiol. Lett. 163, 49–56.
80. Heir, E., Sundheim, G. and Holck, A. L., 1999. The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quarternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. J. Appl. Microbiol. 86, 378–388.
81. Hickey, R. M., Ross, R. P. and Hill, C., 2004. Controlled autolysis and enzyme release in a recombinant lactococcal strain expressing the metalloendopeptidase enterolysin A. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1744–1748.
82. Higgins, C. F. and Gottesman, M. M., 1992. Is the multidrug transporter a flippase. Trends Biochem. Sci. 17, 18-21.
83. Higgins, C. F., 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. Res. Microbiol. 152, 205–210.
84. Holland, I. B., Cole, S. P. C., Kuchler, K. and Higgins, C. F., 2003. ABC Proteins: From Bacteria to Man (Academic, London).
85. Holmgren, J. and Czerkinsky, C., 2005. Mucosal immunity and vaccines. Nat. Med. 11(4 Suppl), S45-53.
86. Holo, H. and Nes, I.F., 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. Appl. Environ. Microbiol. 55, 3119-3123.
87. Höltje, J. V., 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 181–203.
88. Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M. and Schrempf, H., 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces* - a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich.
89. Horn, N., Fernandez, A., Dodd, H. M., Gasson, M. J. and Rodriguez, J. M., 2004. Nisincontrolled production of pediocin PA-1 and colicin V in nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5030– 5032.
90. Horn, N., Martínez, M. I., Martínez, J. M., Hernández, P. E., Gasson, M. J., Rodríguez, J. M. and Dodd, H. M., 1998. Production of pediocin PA-1 by

- Lactococcus lactis* using the lactococcin A secretory apparatus. Appl. Environ. Microbiol. 64, 818–823.
91. Hosie, A. H. F. and Poole, P. S., 2001. Bacterial ABC transporters of amino acids. Res. Microbiol. 152, 259–270.
92. Hresko, R. C., Kruse, M., Strube, M. and Mueckler, M., 1994. Topology of the Glut 1 glucose transporter deduced from glycosylation scanning mutagenesis. J. Biol. Chem. 269, 20482–20488.
93. Huang, J., Ma, G., Muhammad, I. and Cheng, Y., 2007. Identifying P-Glycoprotein Substrates Using a Support Vector Machine Optimized by a Particle Swarm. J. Chem. Inf. Model 47, 1638-1647.
94. Hutkins, R. W. and Nannen, N. L., 1993. pH homeostasis in lactic acidbacteria. J. Dairy Sci. 76, 2354–2365.
95. Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileady, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E. and Higgins, C. F., 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. Nature 346, 362–365.
96. Igarashi, K., Ito, K. and Kashiwagi, K., 2001. Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. Res. Microbiol. 152, 271–278.
97. Jack, D. L., Storms, M. L., Tchieu, J. H., Paulsen, I. T. and Saier, M. H. Jr., 2000. A broad-specificity multidrug efflux pump requiring a pair of homologousSMR-type proteins. J. Bacteriol. 182, 2311–2313.
98. Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 59, 171–200.
99. Jager, W., Kalinowski, J. and Puhler, A., 1997. A *Corynebacterium glutamicum* gene conferring multidrug resistance in the heterologous host *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 179, 2449–2451.
100. James, P. R., Hardman, S. M. and Patterson, D. L., 2000. Osteomyelitis and possible endocarditis secondary to *Lactococcus garvieae*: a first case report. Postgrad. Med. J. 76, 301–303.
101. Jensen, P. R. and Hammer, K., 1998. The sequence of spacer between the consensus sequences modulates the strength of procaryotic promoters. Appl. Environ. Microbiol. 64, 82-87.

102. Kang, L. and Rybak, M. J., 1995. Pharmacodynamics of RP59500 alone and in combination with vancomycin against *Staphylococcus aureus* in an in vitro-infected fibrin clot model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1505-1511.
103. Karplus, K., Katzman, S., Shackleford, G., Koeva, M., Draper, J., Barnes, B., Soriano, M. and Hughey, R., 2005. SAM-T04: what's new in protein-structure prediction for CASP6. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 61(S7), 135-142.
104. Kashket, E. R., 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 233–244.
105. Katzman, S., Barrett, C., Thiltgen, G., Karchin, R. and Karplus, K., 2008. Predict-2nd: a tool for generalized protein local structure prediction. *Bioinformatics* 24, 2453-2459.
106. Kazama, H., Hamashima, H., Sasatsu, M. and Arai, T., 1998a. Distribution of the antiseptic-resistance genes *qacE* and *qacEDI* in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 159, 173–178.
107. Kazama, H., Hamashima, H., Sasatsu, M. and Arai, T., 1998b. Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacEDI* in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 165, 295–299.
108. Kelley, L. A. and Sternberg, M. J., 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* 4, 363-71.
109. Kelly, W. J., Ward, L. J. and Leahy, S. C., 2010. Chromosomal diversity in *Lactococcus lactis* and the origin of dairy starter cultures. *Genome Biol. Evol.* 2, 729-44.
110. Kertesz, M. A., 2001. Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds. *Res. Microbiol.* 152, 279–290.
111. Kleerebezem, M., Beerthuyzen, M. M., Vaughan, E. E., de Vos, W. M. and Kuipers, O. P., 1997a. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4581–4584.
112. Kleerebezem, M., de Vos, W. M. and Kuipers, O. P., 1999. The lantibiotics nisin and subtilin act as extracellular regulators of their own biosynthesis. In: Dunny

- GM, Winams SC (eds) Cell-cell signalling in bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
113. Kleerebezem, M., Quadri, L. E., Kuipers, O. P. and de Vos, W. M., 1997b. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24, 895–904.
114. Klein, J. R., Henrich, B. and Plapp, R., 1991. Molecular analysis and nucleotide sequence of the *envCD* operon of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 230, 230–240.
115. Klijn, N., Weerkamp, A. H. and De Vos, W. E., 1995. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 788–792.
116. Knol, J., Veenhoff, L., Liang, W. J., Henderson, P. J. F., Leblanc, G. and Poolman, B., 1996. Unidirectional reconstitution into detergent destabilized liposomes of the purified lactose transport systems of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 271, 15358–15366.
117. Kobayashi, H., 1985. A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 260, 72–76.
118. Kohler, T., Epp, S. F., Kocjancic Curty, L. and Peche`re, J.-C., 1999. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181, 6300–6305.
119. Konings, W. N., 2002. The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 3–27.
120. Koster, W., 2001. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res. Microbiol.* 152, 291–301.
121. Kronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. and Hughes, C., 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914–919.
122. Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., de Ruyter, P. G. G. A., Luesink, E. J. and de Vos, W. M., 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.* 270, 27299–27304.
123. Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J. and de Vos, W. M., 1993. Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*:

- requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. Eur. J. Biochem. 216, 281–91.
124. Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G. G. A., Kleerebezem, M. and de Vos, W. M., 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. J. Biotechnol. 64, 15–21.
125. Kunji, E. R., Slotboom, D. J. and Poolman, B., 2003. *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. Biochim. Biophys. Acta 1610, 97–108.
126. Lancefield, R. C., 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J. Exp. Med. 57, 571–595.
127. Langella, P. and Le Loir, Y., 1999. Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. Braz. J. Med. Biol. Res. 32, 191–198.
128. Le Bourgeois, P., Lautier, M., Mata, M. and Ritzenthaler, P., 1992. Physical and genetic map of the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. J. Bacteriol. 174, 6752–6762.
129. Le Loir, Y., Nouaille, S., Commissaire, J., Bretigny, L., Gruss, A. and Langella, P. 2001. Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4119–4127.
130. Leclercq, R. and Courvalin, P., 1991. Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 1273–1276.
131. Leelaporn, A., Paulsen, I. T., Tennent, J. M., Littlejohn, T. G. and Skurray, R. A., 1994. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. J. Med. Microbiol. 40, 214–220.
132. Levy, S., 1992. Active efflux mechanisms for antibiotic resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 36, 695–703.
133. Lewinson, O., Adler, J., Poelarends, G. J., Mazurkiewicz, P., Driessen, A. J. and Bibi, E., 2003. The *Escherichia coli* multidrug transporter MdfA catalyzes both electrogenic and electroneutral transport reactions, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 1667–1672.

134. Lewis, K., 1994. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends Biochem. Sci.* 19, 119–123.
135. Lewis, K., Hooper, D. C. and Ouellette, M., 1997. Multidrug resistance pumps provide broad defense. *ASM News* 63, 605–610.
136. Lister, J., 1873. A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. *Quarterly Microbiological Sciences*, 13, 380–408.
137. Littlejohn, T. G., DiBerardino, D., Messerotti, L. J., Spiers, S. J. and Skurray, R. A., 1991. Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene* 101, 59–66.
138. Liu, J., Takiff, H. E. and Nikaido, H., 1996. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* 178, 3791–3795.
139. Locher, K. P., Lee, A. T. and Rees, D. C., 2002. The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296, 1091–1098.
140. Lomovskaya, O. and Lewis, K., 1992. *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8938–8942.
141. Lopez-Diaz, T. M., Alonso, C., Roman, C., Garcia-Lopez, M. L. and Moreno, B., 2002. Lactic acid bacteria isolated from a hand made blue cheese. *Food Microbiology* 17, 23–32.
142. Lubelski, J., de Jong, A., van Merkerk, R., Agustiandari, H., Kuipers, O. P., Kok, J. and Driessen, A. J. M., 2006a. LmrCD is a major multidrug resistance transporter in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 61, 771–781.
143. Lubelski, J., Konings, W. N. and Driessen, A. J. M., 2007. Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 463–476.
144. Lubelski, J., Mazurkiewicz, P., van Merkerk, R., Konings, W. N. and Driessen, A. J. M., 2004. *ydaG* and *ydbA* of *Lactococcus lactis* encode a heterodimeric ATP-binding cassette-type multidrug transporter. *J. Biol. Chem.* 279, 34449–34455.

145. Lubelski, J., van Merkerk, R., Konings, W. N. and Driessen, A.J.M., 2006b. Nucleotide-Binding Sites of the Heterodimeric LmrCD ABC-Multidrug Transporter of *Lactococcus lactis* Are Asymmetric. *Biochemistry* 45, 648-656.
146. Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H. and Hearst, J. E., 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 16, 45-55.
147. Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H. and Hearst, J. E., 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175, 6299-6313.
148. Madera, M., Vogel, C., Kummerfeld, S. K., Chothia, C. and Gough, J., 2004. The SUPERFAMILY database in 2004: additions and improvements. *Nucl. Acids. Res.* 32, 235-239.
149. Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., et al. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 15611-15616.
150. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
151. Mannion, P. T. and Rothburn, M. M., 1990. Diagnosis of bacterial endocarditis by *Streptococcus lactis* and assisted by immunoblotting of serum antibodies. *J. Infect.* 21, 317-326.
152. Marcusson L. L., Fridodt-Møller, N. and Hughes, D., 2009: Interplay in the Selection of Fluoroquinolone Resistance and Bacterial Fitness. *PLoS Pathog.* 5(8): e1000541. doi:10.1371/journal.ppat.1000541
153. Marger, M. D. and Saier Jr, M. H., 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* 18, 13-20.
154. Margolles, A., Putman, M., van Veen, H. W. and Konings, W. N., 1999. The purified and functionally reconstituted multidrug transporter LmrA of *Lactococcus lactis* mediates the transbilayer movement of specific fluorescent phospholipids. *Biochemistry* 38, 16298-16306.



155. Masaoka, Y., Ueno, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T., 2000. A two-component multidrug efflux pump, EbrAB, in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 182, 2307–2310.
156. Mathur, S. and Singh, R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review Int. J. of Food Microbiol. 105, 281–295.
157. Mazurkiewicz, P., Sakamoto, K., Poelarends, G. J. and Konings, W. N., 2005. Multidrug Transporters in Lactic Acid Bacteria. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 5, 173-181.
158. McMurry, L., Petrucci, R. E. and Levy, S. B., 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3974–3977.
159. Medeiros, A. A., O'Brien, T. F., Rosenberg, E. Y. and Nikaido, H., 1987. Loss of OmpC porin in a strain of *Salmonella typhimurium* causes increased resistance to cephalosporins during therapy. J. Infect. Dis. 156, 751–757.
160. Midgley, M., 1986. The phosphonium ion efflux system of *Escherichia coli*: relationship to the ethidium efflux system and energetic studies. J. Gen. Microbiol. 132, 3187–3193.
161. Mierau, I. and Kleerebezem, M., 2005. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68, 705–717.
162. Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. 1999. Expression in *Escherichia coli* of a new efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 415–417.
163. Mitchell, B. A., Paulsen, I. T., Brown, M. H. and Skurray, R. A., 1999. Bioenergetics of the staphylococcal multidrug export protein QacA: identification of distinct binding sites for monovalent and divalent cations. J. Biol. Chem. 274, 3541–3548.
164. Mofredj, A., Baraka, D., Cadranel, J. F., LeMaitre, P., Kloeti, G. and Dumont, J. L., 2000. *Lactococcus garvieae* septicemia with liver abscess in an immunosuppressed patient. Am. J. Med. 109, 513–514.

165. Morimyo, M., Hongo, E., Hama-Inaba, H. and Machida, I., 1992. Cloning and characterization of the *mvrC* gene of *Escherichia coli* K-12 which confers resistance against methyl viologen toxicity. *Nucleic Acids Res.* 20, 3159–3165.
166. Morita, Y., Kodama, K., Shiota, S., Mine, T., Kataoka, A., Mizushima, T. and Tsuchiya, T., 1998. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1778–1782.
167. Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J. and de Vos, W. M., 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.* 201, 581–584.
168. Nakai, K. and Horton, P., 1999. PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* 24, 34–35.
169. Nakamura, H., 1965. Gene-controlled resistance to acriflavine and other basic dyes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 90, 8–14.
170. Nakamura, H., 1968. Genetic determination of resistance to acriflavine, phenethyl alcohol, and sodium dodecyl sulfate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 96, 987–996.
171. Naroditskaya, V., Schlosser, M. J., Fang, N. Y. and Lewis, K., 1993. An *E. coli* gene *emrD* is involved in adaptation to low energy shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 803–809.
172. Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. and Holo, H., 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 113–128.
173. Neyfakh, A. A., 1992. The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus* NorA protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 484–485.
174. Neyfakh, A. A., 1997. Natural functions of bacterial multidrug transporters. *Trends Microbiol.* 8, 309–313.
175. Neyfakh, A. A., Bidnenko, V. E. and Chen, L. B., 1991. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4781–4785.

176. Ng, E. Y. W., Trucksis, M, and Hooper, D. C., 1994. Quinolone resistance mediated by *norA*: physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1345–1355.
177. Nikaido, H., 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 3905-3908.
178. Nikolic, K., Ivković, B., Bešović, Ž., Marković, S. and Agbaba, D., 2009. A validated enantiospecific method for determination and purity assay of clopidogrel. *Chirality* 21(10), 878-885.
179. Nilsen, I. W., Bakke, I., Vader, A., Olsvik, Ø. and El-Gewely, M. R., 1996. Isolation of *cmr*, a novel *Escherichia coli* chloramphenicol resistance gene encoding a putative efflux pump. *J. Bacteriol.* 178, 3188–3193.
180. Ohki, R. and Murata, M., 1997. *bmr3*, a third multidrug transporter gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 179, 1423–1427.
181. Orla-Jensen, S., 1919. The lactic acid bacteria. *Mem. Acad. Roy. Sci. Danemark, Sect. sci.*, 8 ser., 5.
182. Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Grönlund, M., Isolauri, M. and Salminen, S. J., 1999. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *Int. Dairy J.* 9, 623–630.
183. Pastor, M., Cruciani, G., McLay, I., Pickett, S. and Clementi, S., 2000. GRIND-INdependent. Descriptors (GRIND): A novel class of alignment-independent three-dimensional molecular descriptors. *J. Med. Chem.* 43, 3233-3243.
184. Paulsen, I. T. and Skurray, R. A., 1993. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes-an analysis. *Gene* 124, 1–11.
185. Paulsen, I. T., 2003. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 446-451.
186. Paulsen, I. T., Brown, M. H. and Skurray, R. A., 1996a. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60, 575–608.
187. Paulsen, I. T., Brown, M. H. and Skurray, R. A., 1998a. Characterization of the earliest known *Staphylococcus aureus* plasmid encoding a multidrug efflux system. *J. Bacteriol.* 180, 3477–3479.

188. Paulsen, I. T., Brown, M. H., Littlejohn, T. G., Mitchell, B. A. and Skurray, R. A., 1996b. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3630–3635.
189. Paulsen, I. T., Littlejohn, T. G., Rådström, P., Sundström, L., Skold, O., Swedberg, G. and Skurray, R. A., 1993. The 39 conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 761–768.
190. Paulsen, I. T., Skurray, R. A., Tam, R., Saier, M. H. Jr., Turner, R. J., Wiener, J. H., Goldberg, E. B. and Grinius, L. L., 1996c. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol.* 19, 1167–1175.
191. Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K. and Saier, M. H. Jr., 1998b. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J. Mol. Biol.* 277, 573–592.
192. Pavan, S., Hols, P., Delcour, J., Geoffroy, M. C., Grangette, C., Kleerebezem, M., et al 2000. Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study in vivo biological effects. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4427–32.
193. Pérez A., Poza, M., Fernández, A., Del Carmen Fernández, M., Mallo, S., Merino, M., Rumbo-Feal, S., Cabral, M. P. and Bou, G., 2012. Involvement of the AcrAB-TolC Efflux Pump in the Resistance, Fitness, and Virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(4): 2084–2090.
194. Perez Elortondo, F. J., Aldamiz Echobarria, P., Albisu, M. and Barcina, Y., 1999. Indigenous lactic acid bacteria in Idiazabal ewes' milk cheese. *Int. Dairy J.* 8, 725–732.
195. Perreten, V., Schwarz, F. V., Teuber, M., Levy, S.B., 2001. Mdt(A), a new efflux protein conferring multiple antibiotic resistance in *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1109–1114.
196. Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G. and Teuber, M., 1997. Antibiotic resistance spread in food. *Nature* 389, 801-802.

197. Poelarends, G. J., Mazurkiewicz, P. and Konings, W. N., 2002. Multidrug transporters and antibiotic resistance in *Lactococcus lactis* Biochim. et Biophys. Acta 1555, 1 – 7.
198. Poole, K., Heinrichs, D. E. and Neshat, S., 1993a. Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. Mol. Microbiol. 10, 529–544.
199. Poole, K., Krebs, K., McNally, C. and Neshat, S., 1993b. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. J. Bacteriol. 175, 7363–7372.
200. Poolman, B. and Konings, W. N. 1988. Relation of growth of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* to amino acid transport. J. Bacteriol. 170(2), 700–707.
201. Prendergast, F. G., Haugland, R. P. and Callahan, P. J., 1981. 1-[4-(Trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene: Synthesis, fluorescence properties, and use as a fluorescence probe of lipid bilayers. Biochemistry 20, 7333–7338
202. Purewal, A. S., 1991. Nucleotide sequence of the ethidium efflux gene from *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 82, 229–232.
203. Putman, M., van Veen, H. W. and Konings, W. N., 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 672–693.
204. Putman, M., van Veen, H. W., Poolman, B. and Konings, W. N. 1999. Restrictive use of detergents in the functional reconstitution of the secondary multidrug transporter LmrP. Biochemistry 38, 1002–1008.
205. Putman, M., van Veen, H.W., Degener, J.E., and Konings, W.N., 2001. The lactococcal secondary multidrug transporter LmrP confers resistance to lincosamides, macrolides, streptogramins and tetracyclines. Microbiology 147, 2873–2880.
206. Rademaker, J. L., Herbet, H., Starrenburg, M. J., Naser, S. M., Gevers, D., Kelly, W. J., Hugenholtz, J., Swings, J. and van Hylckama Vlieg, J. E., 2007. Diversity analysis of dairy and nondairy *Lactococcus lactis* isolates, using a

- novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG)<sub>5</sub>-PCR fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7128-7137.
207. Rallu, F., Gruss, A. and Maguin, E., 1996. *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 243–251.
208. Rasmussen, B. A. and Bush, K., 1997. Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 223-232.
209. Raviv, Y., Pollard, H. B., Bruggemann, E. P., Pastan, I. and Gottesman, M. M. 1990. Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *J. Biol. Chem.* 265, 3975–3980.
210. Reeve, E. C. and Suttie, D. R., 1968. Chromosomal location of a mutation causing chloramphenicol resistance in *Escherichia coli* K 12. *Genet. Res.* 11, 97–104.
211. Rigoulay, C., Poquet, I., Madsen, S. M. and Gruss, A., 2004. Expression of the *Staphylococcus aureus* surface proteins Htra(1) and Htra(2) in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 237, 279–288.
212. Rodriguez, J. M., Martinez, M. I. and Kok, J., 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42, 91–121.
213. Roissart, H. and Luquet F. M., 1994. Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques. Uriage, Lorica, France, 1, p. 605. ISBN 2 9507477 0 1.
214. Rouch, D. A., Cram, D. S., DiBerardino, D., Littlejohn, T. G. and Skurray, R. A., 1990. Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. *Mol. Microbiol.* 4, 2051–2062.
215. Ryckaert, J. P., Ciccotti, G. and Berendsen, H. J. C., 1977. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* 23, 327-341.
216. Sánchez, L., Pan, W., Viñas, M. and Nikaido, H., 1997. The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* 179, 6855–6857.
217. Saier, M. H. Jr., 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 354-411.

- 218.Sakala, R. M., Hayashidani, H., Kato, Y., Kaneuchi, C. and Ogawa, M., 2002. Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef J. Appl. Microbiol. 92, 173-179.
- 219.Sakamoto, K., Margolles, A., van Veen, H. W. and Konings, W.N., 2001. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA. J. Bacteriol. 183, 5371-5375.
- 220.Salama, M. S., Musafija-Jeknic, T., Sandine, W. E. and Giovannoni, S. J., 1995. An ecological study of lactic acid bacteria: isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. J. Dairy Sci. 78, 1004–1017.
- 221.Salminen, S., vonWright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S. E. and Mattila-Sandholm, T., 1998. Demonstration of safety of probiotics — a review. Int. J. Food Microbiol. 44, 93–106.
- 222.Salyers, A. A., Gupta, A. and Wang, Y., 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotics resistance genes. Trends. Microbiol. 12, 412–416.
- 223.Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 224.Sami, M., Yamahita, H., Hirono, T., Kadokura, H., Kitamoto, K., Yoda, K. and Yamasaki, M., 1997. Hop-resistant *Lactobacillus brevis* contains a novel plasmid harboring a multidrug resistance-like gene. J. Ferment. Bioeng. 84, 1–6.
- 225.Sánchez, L., Pan, W., Vinas, M. and Nikaido, H. 1997. The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. J. Bacteriol. 179, 6855–6857.
- 226.Sanders, J. W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J. R., Venema, G. and Kok, J., 1998. A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. Mol. Microbiol. 27, 299–310.
- 227.Sandine, W. E., Radich, P. C. and Elliker, P. R., 1972. Ecology of the lactic streptococci. A review. J. Milk Food Technol. 35, 176-184.

- 228.Sasatsu, M., Shima, K., Shibata, Y. and Kono, M., 1989. Nucleotide sequence of a gene that encodes resistance to ethidium bromide from a transferable plasmid in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 17, 10103.
- 229.Schleifer, K. H. and Kilpper-Balz, R., 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. And *Enterococcus faecium* comb.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 31-34.
- 230.Schleifer, K. H. and Kilpper-Balz, R., 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.* 10, 1-19.
- 231.Schleifer, K. H. and Ludwig, W., 1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System. Appl. Microbiol.* 18, 461-467.
- 232.Schleifer, K. H., Krdua, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M. D. and Fischer, W., 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 6, 181-195.
- 233.Schneider, E. and Hunke, S., 1998. ATP-binding cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolysing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 1-20.
- 234.Schneider, E., 2001. ABC transporters catalyzing carbohydrate uptake. *Res. Microbiol.* 152, 303–310.
- 235.Scott, K. P., 2002. The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract. *Cell. Mol. Life. Sci.* 59, 2071–2082.
- 236.Self, W. T., Grunden, A. M., Hasona, A. and Shanmugam, K. T., 2001. Molybdate transport. *Res. Microbiol.* 152, 311–321.
- 237.Shackelford, G. and Karplus, K., 2007. Contact Prediction using Mutual Information and Neural Nets. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 69(S8), 159-164.
- 238.Sharom, F. J., DiDiodato, G., Yu, X. and Ashbourne, K. J. D. 1995. Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter with peptides and ionophores. *J. Biol. Chem.* 270, 10334–10341.



239. Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S. and Miller, G. H., 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57, 138–163.
240. Siezen, R. J., Bayjanov, J., Renckens, B., Wels, M., van Hijum, S. A., Molenaar, D. and van Hylckama Vlieg, J. E., 2010. Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, a plant-associated lactic acid bacterium. *J. Bacteriol.* 192, 2649–2650.
241. Siezen, R. J., Starrenburg, M. J. C., Boekhorst, J., Renckens, B., Molenaar, D. and van Hylckama Vlieg, J. E., 2008. Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* isolates from plants identifies mechanisms of adaptation to the plant niche. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 424–436.
242. Silver, R. P., Prior, K., Nsalai, C. and Wright, L. F., 2001. ABC transporters and the export of capsular polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Res. Microbiol.* 152, 357–364.
243. Smit, G., Smit, B. A. and Engels, W. J., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 591-610.
244. Smith, C. A. and Rayment, I., 1996. Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other Plooproteins. *Biophys. J.* 70, 1590-1602.
245. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
246. Sonnhammer, E. L. L., von Heijne, G. and Krogh, A., 1998. A Hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In: *Proc. Sixth Int. Conf. Intelligent Systems for Molecular Biology.*
247. Sperandio, B., Polard, P., Ehrlich, D. S., Renault, P. and Guédon, E., 2005. Sulfur amino acid metabolism and its control in *Lactococcus lactis* IL1403. *J. Bacteriol.* 187, 3762-3778.
248. Spratt, B. G., 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264, 388-393.

249. Starrenburg, M. and Hugenholtz, J., 1991. Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3535–3540.
250. Stewart, J. J. P., 1989a. Optimization of parameters for semiempirical methods I. *Method. J. Comput. Chem.* 10, 209-220.
251. Stewart, J. J. P., 1989b. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. *J. Comput. Chem.* 10, 221-264.
252. Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1-29.
253. Tailliez, P., Tremblay, J., Ehrlich, S. D. and Chopin, A., 1998. Molecular diversity and relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 530–538.
254. Takiff, H. E., Cimino, M., Musso, M. C., Weisbrod, T., Martinez, R., Delgado, M. B., Salazar, L., Bloom, B. R. and Jacobs, W. R. Jr., 1996. Efflux pump of the proton antiporter family confers low level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 362–366.
255. Tal, N. and Schuldiner, S., 2009. A coordinated network of transporters with overlapping specificities provides a robust survival strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 9051–9056.
256. Teixeira, L. M., Merquior, V. L., Vianni, M. C. E., Carvalho, M. G. S., Fracalanza, S. E. L., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J. and Facklam, R. R., 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 664–668.
257. Tennent, J. M., Lyon, B. R., Midgley, M., Jones, G., Purewal, A. S. and Skurray, R. A. 1989. Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 1–10.
258. Teuber, M., Gets, A. and Neve, H., 1991. The genus *Lactococcus*. In: Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. (editors). *The Prokaryotes*, Vol. II. 2nd edition. Springer-Verlag. New York, pp 1482-1501.

259. Tress, M. L., Jones, D. T. and Valenica, A., 2003. Predicting reliable regions in protein alignments from sequence profiles. *J. Mol. Biol.* 330, 705–718.
260. Ubukata, K., Itoh, N. Y. and Konno, M. 1989. Cloning and expression of the *norA* gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1535–1539.
261. Uren, J. R., 1987. Cystathionine  $\beta$ -lyase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 143, 483–486.
262. Vaara, M., 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 56, 395–411.
263. van Kraaij, C., de Vos W. M., Siezen, R. J. and Kuipers, O. P., 1999. Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. *Nat. Prod. Rep.* 16, 575–587.
264. van Veen, H. W., Callaghan, R., Soceneantu, L., Sardini, A., Konings, W. N. and Higgins, C. F., 1998. A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature* 391, 291–295.
265. van Veen, H. W., Putman, M., Margolles, A., Sakamoto, K. and Konings, W. N., 1999. Structure-function analysis of multidrug transporters in *Lactococcus lactis*, *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 201–206.
266. van Veen, H. W., Venema, K., Bolhuis, H., Oussenko, I., Kok, J., Poolman, B., Driessen, A. J. M. and Konings, W. N., 1996. Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human drug transporter MDR1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 10668–10672.
267. van Veen, H. W., Margolles, A., Muller, M., Higgins, C. F. and Konings, W. N., 2000. The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *EMBO J.* 19, 2503–2514.
268. Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O. and Múzquiz, J. L., 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 177–198.

269. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B. (Eds.), 2nd ed, 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer, New York.
270. Wagner, S., Baars, L., Ytterberg, A. J., Klussmeier, A., Wagner, C. S., Nord, O., Nygren, P. A., van Wijk, K. J., de Gier, J. W., 2007. Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1527-1550.
271. Walther, C., Rossano, A., Thomann, A. and Perreten, V., 2008. Antibiotic resistance in *Lactococcus species* from bovine milk: Presence of a mutated multidrug transporter *mdt(A)* gene in susceptible *Lactococcus garvieae* strains. *Vet. Microbiol.* 131, 348–357.
272. Wass, M. N., Kelley, L. A., Sternberg, M. J. E., 2010. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic Acids Research* Vol. 38, Web Server issue W469–W473, doi:10.1093/nar/gkq406
273. Waters, C. M., Hirt, H., McCormick, J. K., Schlievert, P. M., Wells, C. L. and Dunny, G. M., 2004. An amino-terminal domain of *Enterococcus faecalis* aggregation substance is required for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid. *Mol. Microbiol.* 52, 1159–1171.
274. Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., Ventura, M., Goesmann, A., Gasson, M. J., Kuipers, O. P., van Sinderen, D. and Kok, J., 2007. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.* 189, 3256–3270.
275. Weisblum, B., 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 577-585.
276. Wells, J. M. and Mercenier, A., 2008. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6(5), 349-362.
277. Wells, J. M., Robinson, L. M., Chamberlain, L. M., Schofield, M. and Le Page, R. W., 1996. Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. *Antonie Leeuwenhoek.* 70, 317–330.

278. White, D. G., Goldman, J. D., Demple, B. and Levy. S. B., 1997. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 6122–6126.
279. Wiener, E. B., Goldberg, and Grinius, L. L., 1996. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol.* 19, 1167–1175.
280. Williams, A. M., Fryer, J. L. and Collins, M. D., 1990. *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiol. Lett.* 68, 109-114.
281. Witte, W., 1997. Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans. In: Chadwick, D. J., Goode, J. (Eds.), *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread*, Ciba Foundation Symposium 207. Wiley, Chichester, pp. 61–75.
282. Wold, S., Johansson, E. and Cocchi, M., 1993. 3D-QSAR in drug design, theory, methods, and applications. H. Kubinyi Ed., ESCOM Science Publishers: Leiden, pp 523–550.
283. Wood K. B., and Cluzel, P., 2012. Trade-offs between drug toxicity and benefit in the multi-antibiotic resistance system underlie optimal growth of *E. coli*. *BMC Systems Biology* 6, 48.
284. Wood, H. F., Jacobs, K. and McCarty, M., 1955. *Streptococcus lactis* isolated from a patient with subacute bacterial endocarditis. *Am. J. Med.* 18, 345–347.
285. Woodward, R. B., 1957. Struktur und Biogenese der Makrolide: eine neue Klasse von Naturstoffen. *Angew Chem* 69, 50-58.
286. Woolridge, D. P., Vasquez-Laslop, N., Markham, P. N., Chevalier, M. S., Gerner, E. W. and Neyfakh, A. A., 1997. Efflux of the natural polyamine spermidine facilitated by the *Bacillus subtilis* multidrug transporter. *Blt. J. Biol. Chem.* 272, 8864–8866.
287. Xue, Y., Yap, C. W., Sun, L. Z., Cao, Z. W., Wang, J. F. and Chen, Y. Z., 2004. Prediction of P-glycoprotein substrates by a support vector machine approach. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 44(4), 1497-505.
288. Yamada, H., Kurose-Hamada, S., Fukuda, Y., Mitsuyama, J., Takahata, M., Minami, S., Watanabe, Y. and Narita, H., 1997. Quinolone susceptibility of

- norA*-disrupted *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2308–2309.
289. Yerushalmi, H., Lebendiker, M. and Schuldiner, S., 1996. Negative dominance studies demonstrate the oligomeric structure of EmrE, a multidrug antiporter from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 271, 31044–31048.
290. Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, S., Ubukata, K., and Konno, M., 1990. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J. Bacteriol.* 172, 6942–6949.
291. Zaidi, A. H., Bakkes, P. J., Lubelski, J., Agustiandari, H., Kuipers, O. P. and Driessen, A. J. M., 2008. The ABC-Type multidrug resistance transporter LmrCD is responsible for an extrusion-based mechanism of bile acid resistance in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 190, 7357–7366.
292. Zhou, X. X., Li, W. F., Ma G. X., and Pan Y. J., 2006. The nisin-controlled gene expression system: Construction, application and improvements. *Biotechnol. Adv.* 24, 285– 295.

## 8. PRILOG: Spisak publikovanih radova i saopštenja

### Publikovani radovi iz teze:

1. **Brankica Filipic**, Natasa Golic, Branko Jovcic, Maja Tolinacki, Denice C. Bay, Raymond J. Turner, Jelena Antic-Stankovic, Milan Kojic and Ljubisa Topisirovic (2013): The *cmbT* gene encodes a novel major facilitator multidrug resistance transporter in *Lactococcus lactis*. *Research in Microbiology*, Jan; 164(1): 46-54. (M22)

2. **Brankica Filipic**, Branko Jovcic, Gordana Uzelac, Marija Miljkovic, Jelena Antic-Stankovic, Ljubisa Topisirovic and Natasa Golic (2013): Over-expressed CmbT multidrug resistance transporter improves the fitness of *Lactococcus lactis*. *Genetika*, 45(1): 197-206. (M23)

3. **Brankica Filipic**, Katarina Nikolic, Slavica Filipic, Branko Jovcic, Danica Agbaba, Jelena Antic Stankovic, Milan Kojic, Natasa Golic (2013): Identifying the CmbT substrates specificity by using a quantitative structure-activity relationship (QSAR) study. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, doi: 10.1016/j.jtice.2013.09.033. (M21)

### Saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampana u izvodu (M34) iz teze:

1. **B. Filipic**, N. Golic, B. Jovcic, D. C. Bay, R. J. Turner, J. Stankovic, M. Kojic, L. Topisirovic, Characterization of the CmbT potential multidrug resistance protein in *Lactococcus lactis*, 4<sup>th</sup> FEMS Congress of European Microbiologist, Geneva, Switzerland, 2011.

**Publikovani radovi iz naučne oblasti:**

1. Jovanka Lukić, Ivana Strahinić, Branko Jovčić, **Brankica Filipić**, Ljubiša Topisirović, Milan Kojić and Jelena Begović (2012): Different roles of lactococcal aggregation factor and mucin binding protein in adhesion to gastrointestinal mucosa. *Applied and environmental microbiology*, 78(22): 7993-8000.

2. Gorana Veinovic, **Brankica Filipic** and Jelena Stankovic (2013): Isolation, cultivation, and in vitro susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: a review. *Archives of Biological Sciences*, 65(2): 533-547.

**Saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampana u izvodu (M34) iz naučne oblasti:**

1. **B. Filipić**, B. Ivković, I. Ćirković, J. Antić-Stanković, M. Milenković, Ispitivanje antibakterijske aktivnosti novosintetisanih halkona, Mikromed, Beograd, Srbija, 2008.

2. **B. Filipic**, M. Nikolic, M. Tolinacki, K. Veljovic, N. Golic, M. Kojic, Analyses of the genes responsible for the synthesis of capsular polysaccharides in *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, 7th Balkan Congress of Microbiology, Belgrade, Serbia, 2011.

3. M. Nikolic, M. Tolinacki, M. Miljkovic, **B. Filipic**, J. Stankovic, J. Lukic, J. Begovic, A. Terzic-Vidojevic, M. Kojic, N. Golic and L. Topisirovic, Study of the probiotic potential of lactobacilli natural isolates through the analysis of adhesion ability to Caco-2 intestinal epithelial cell line, 6th Central European Congress on Food, Novi Sad, Serbia, 2012.



## **9. BIOGRAFIJA**

Brankica Filipić je rođena 02.11.1982. u Loznici. Diplomirala je 2007. godine na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 9,03. Iste godine je upisala doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu iz oblasti Farmaceutske mikrobiologije. Od februara 2008. godine zaposlena je kao saradnik na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju, a 2009. godine izabrana je u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Mikrobiologija sa imunologijom i imunohemijom.

Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Autor je i koautor 5 objavljenih radova u časopisima međunarodnog značaja, kao i 4 saopštenja sa naučnih skupova. Saradnik je na projektu osnovnih istraživanja koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (broj projekta: 173019). U cilju stručnog usavršavanja boravila je na Katedri za biološke nauke, Univerziteta u Kalgariju, Kalgari, Alberta, Kanada. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Бранкица В. Филипић

број уписа 41/08

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Функционална карактеризација CmbT транспортера одговорног за вишеструке резистенције на структурно различите супstrate у соју *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363“**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 15.10.2013.

Бранкица Филипић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бранкица В. Филипић

Број уписа 41/08

Студијски програм Фармацеутска микробиологија

Наслов рада „**Функционална карактеризација CmbT транспортера одговорног за вишеструке резистенције на структурно различите супstrate у соју *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363**“

Ментори: др Јелена Антић-Станковић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

др Наташа Голић, научни саветник, Универзитет у Београду – Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

Потписани Бранкица В. Филипић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, 15.10.2013.

Бранкица Филипић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„Функционална карактеризација CmbT транспортера одговорног за вишеструке резистенције на структурно различите супstrate у соју *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363“** која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, 15.10.2013.

