

**UNIVERZITET U BEOGRADU,
BIOLOŠKI FAKULTET**

BRANKO JOVČIĆ

**KLONIRANJE I MOLEKULARNA ANALIZA
SULFATAZNIH OPERONA SOJA
Pseudomonas sp. ATCC19151**



DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 2009.

20397

4/35935247

UNIVERZITET U BEOGRADU,
BIOLOŠKI FAKULTET

BRANKO JOVČIĆ

KLONIRANJE I MOLEKULARNA ANALIZA
SULFATAZNIH OPERONA SOJA
Pseudomonas sp. ATCC19151

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 2009.

MENTORI:

dr Milan Kojić, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko
inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Đorđe Fira, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Milan Kojić, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko
inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Đorđe Fira, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Nataša Golić, viši naučni saradnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko
inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu genetiku indistrijskih mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo pod rukovodstvom dr Milana Kojića. Ovom prilikom želim da se zahvalim:

dr Milanu Kojiću koji me je uveo u svet nauke na bezgraničnom strpljenju, znanju i eksperimentalnim iskustvima koje mi je preneo, vremenu koje smo proveli diskutujući o rezultatima i budućim planovima, ali i velikoj slobodi u toku izrade ovog rada i nesebičnoj podršci kako u radu tako i u svakodnevnom laboratorijskom životu;

dr Đorđu Firi na pomoći tokom razrešavanja svih biohemijskih zagonetki koje su iskrsele tokom izrade ove teze, na sugestijama u tumačenju dobijenih rezultata kao i na kritičkoj oceni ove teze;

dr Nataši Golić na korisnim sugestijama tokom izrade i pisanja ove teze, kao i na kritičkoj oceni teze;

Prof. dr Ljubiši Topisiroviću na ukazanom poverenju i razumevanju koje je iskazao od samog početka mog rada u laboratoriji;

dr Vittorio Venturi na obezbeđivanju soja koji je analiziran u ovom radu, kao i na podršci na koju sam mogao da računam u svakom trenutku izrade teze;

Jeleni i Jelki, šta god da kažem nešto ću propustiti, za inspiraciju, kovanje planova, iskrenost, smeh, prijateljstvo, što ste bile tu i da proslavimo uspeh i da me istrpate kad sam se suočavao sa neuspesima... Jeleni i na znanjima koja sam usvojio zahvaljujući njenim širokim interesovanjima, teorijama i nadasve originalnim idejama.

Maji, Kaći i Mici za sve teške dane koji bi postajali mnogo lepši, lakši i prijatniji zahvaljujući razgovorima, razumevanju i nesebičnoj pomoći.

Ttk Ivki i ttk Nati koje su od samog početka bile tu da mi pomognu i učine da zahvaljujući podršci i savetima dodjem do cilja... Amareli na smehu i šalama koje su mi ulepšavale dane.

Posebno želim da se zahvalim mojoj porodici za podršku, razumevanje i ljubav koji su bili neophodni da se ovaj rad dovede do kraja.

APSTRAKT

Soj *Pseudomonas* sp. ATCC19151 poseduje sposobnost biodegradacije anjonskih surfaktanata i rasta na koncentracijama SDS-a do 4 % (v/v). Biodegradacija SDS-a od strane ovog soja je najintenzivnija tokom logaritamske faze rasta. Ukoliko se biodegradacija odigrava pri temperaturi od 30°C celokupan SDS prisutan u medijumu se degraduje za 48 sati, dok se pri temperaturi od 18°C tokom 48 h degraduje 80 % SDS-a. Soj ATCC19151 raste u prisustvu komercijalnog deterdženta "Fairy" (15 % (v/v)) kao jedinog izvora ugljenika, pri čemu tokom 24 sata degraduje 35 % od ukupnih anjonskih surfaktanata prisutnih u "Fairy"-u. Eksperimentom insercije mutageneze *sdsA* gena i komplementacije rezultujućeg mutanta dokazano je da *sdsA* gen kodira funkcionalnu alkil sulfatazu SdsA koja je odgovorna za degradaciju SDS-a. Analizom aktivnosti promotora *sdsA* gena (P_{sdsA}) i promotora divergentno orijentisanog *sdsB* gena (P_{sdsB}) u ATCC19151 divljem soju, mutantu za *sdsB* i mutantu za *sdsA* gen pokazano je da je SdsB pozitivni regulator ekspresije *sdsB* i *sdsA* gena. Aktivnost promotora P_{sdsA} i P_{sdsB} nije zavisila od faze rasta. Indukcija SDS-om dovodi do aktivacije P_{sdsA} i P_{sdsB} ukazujući na inducibilnu transkripciju *sdsA* i *sdsB* gena. Vezivanjem SdsB proteina za intergenski region *sdsA* i *sdsB* gena *in vitro* pokazano je da SdsB vrši direktnu regulaciju transkripcije *sdsA* i *sdsB* gena. S obzirom da soj ATCC19151 raste u sterilisanoj prelivnoj vodi septičke jame i tokom sedam dana degraduje 85 % prisutnih anjonskih surfaktanata to ga čini potencijalnim kandidatom za bioremedijaciju.

Iz soja ATCC19151 kloniran je i sekvenciran operon koji sačinjavaju geni koji kodiraju holin sulfatazu (*betC*), supstrat vezujući protein ABC transportera (*betD*), sulfatni transporter (*betE*) i divergentno orijentisan potencijalni transkripcioni regulator (*betR*). Kompjuterskom analizom pokazano je da BetC protein pripada superfamiliji alkPPc i da sadrži CXPXR sekvencu na osnovu koje se svrstava u sulfataze grupe I cisteinskog tipa locirane predominantno u citoplazmi. Takođe, kompjuterskom analizom je pokazano i da BetR protein pripada LysR familiji transkripcionih regulatora, BetD pripada PBPb superfamiliji proteina periplazme, a BetE protein pripada superfamiliji Xan_ur permeaza i sadrži STAS domen za vezivanje i hidrolizu ATP-a. Insercionom mutagenezom *betC* gena i komplementacijom rezultujućeg mutanta dokazano je da *betC* kodira funkcionalnu BetC holin sulfatazu. Analizom aktivnosti promotora *betC* (P_{betC}) i *betR* gena (P_{betR}) pokazano je da su *betC* i *betR* geni inducibilni, da im je aktivator holin sulfat i da nisu pod kataboličkom represijom. Takođe, na osnovu aktivnosti P_{betC} i P_{betR} u mutantu za *betR* gen možemo da tvrdimo da BetR u prisustvu holin sulfata pozitivno reguliše ekspresiju *betC* i *betR* gena, dok u neinducibilnim uslovima vrši slabu negativnu autoregulaciju. S obzirom da transkripcija *betC* i *betR* gena nije indukovana prisustvom visokih koncentracija NaCl, oni najverovatnije ne učestvuju u odbrani ćelije od osmotskog stresa.

Ključne reči: *Pseudomonas*, biodegradacija, alkil sulfataza, holin sulfataza, transkripciona regulacija ekspresije

ABSTRACT

Strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151 is natural isolate from sewage capable to degrade anionic surfactants, thus growing on SDS at concentrations up to 4 %. SDS biodegradation is the most intensive during the logarithmic phase of growth of ATCC19151, and at 30°C strain degrades all SDS present in the media within 48 hours, also at the 18°C degrades up to 80 % of SDS for the same time. ATCC19151 grows in the presence of 15 % (v/v) "Fairy", commercial detergent, as the sole carbon source and degrades 35 % of anionic surfactants present in "Fairy". It was shown that *sdsA* gene encodes functional alkil sulfatase SdsA which hydrolyse the SDS, by insertional mutagenesis of *sdsA* gene and subsequent complementation for the alkil sulfatase function. Analysis of the *sdsA* (P_{sdsA}) and divergent *sdsB* (P_{sdsB}) gene promoters activity, measured in the ATCC19151 WT, *sdsA* mutant and *sdsB* mutant revealed SdsB as positive regulator of *sdsA* and *sdsB* transcription. Activity of the P_{sdsA} and P_{sdsB} was not depending from the growth phase, thus was the same during growth of ATCC19151. P_{sdsA} and P_{sdsB} activities rise in the presence of the SDS, indicating inducibility of *sdsA* and *sdsB* transcription. Interaction of recombinant SdsB protein with intergenic region of *sdsA* and *sdsB* genes, indicated that SdsB directly regulates transcription of *sdsA* and *sdsB* genes. Since strain ATCC19151 grown in sterile septic tank drain successfully degraded 85 % of present anionic surfactants during 7 days it makes ATCC19151 as good candidate for bioremediation of sewage waters.

Genes encoding potential choline sulfatase (*betC*), substrat binding ABC transporter protein (*betD*), sulfate transporter (*betE*) and divergent potential transcriptional regulator (*betR*) were cloned and sequenced from strain ATCC19151. *In silico* analysis revealed BetC protein belongs to alkPPc superfamily and shares CXPXR sequence with the cistein sulfatases belonging to group I of sulfatases, predominantly located in the citoplasm. Also, by using *in silico* approach it was found that BetR is belonging to LysR family of transcriptional regulators, BetD to PBPb superfamily of periplasmic and membrane associated proteins and BetE contains STAS domain for binding and hydrolysis of the ATP. It was shown, by using insertional mutagenesis and complementation for the function, that *betC* gene encodes functional choline sulfatase which hydrolyse choline sulphate enabling its utilization. Promoter activity analysis of the *betC* (P_{betC}) and *betR* (P_{betR}) promoters revealed that are inducible (inducer is choline sulfate) and aren't catabolically repressed. Also, based on P_{betC} and P_{betR} activities measured in ATCC19151 *betR* mutant it is possible to assume that BetR activates *betC* and *betR* transcription in the presence of choline sulphate, whilst in absence of choline sulfate mildly repres its own transcription. BetR regulates *betC* and *betR* transcription directly, since it binds to *betC* – *betR* intergenic region *in vitro*, with higher affinity in the presence of choline sulfate as cofactor. Transcription of *betC* and *betR* was not induced in the presence of high concentration of NaCl, indicating that they are not involved in stress response.

Key words: *Pseudomonas*, biodegradation, alkil sulfatase, choline sulfatase, transcriptional regulation of gene expression

SADRŽAJ

1. UVOD.....	5
1.1. Rod <i>Pseudomonas</i>	5
1.1.1. Soj <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151	7
1.2. Mikrobiološka biodegradacija.....	8
1.2.1. Surfaktanti	9
1.2.2. Mikrobiološka biodegradacija anjonskih surfaktanata	12
1.3. Sulfataze.....	14
1.3.1. Alkil sulfataze	17
1.3.2. Alkil sulfataze grupe III sulfataza	18
1.3.3. Holin sulfataze i njihova uloga u zaštiti od osmotskog stresa	20
1.4. LysR transkripcioni regulatori.....	22
1.5. Bakterijski transporteri sulfatnih estara	24
2. CILJ RADA.....	27
3. MATERIJAL I METODE	28
3.1. Bakterijski sojevi	28
3.2. Korišćeni i konstruisani plazmidi	29
3.3. Medijumi za rast bakterija	30
3.4. Testiranje rasta soja <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151	31
3.5. Testovi biodegradacije	31
3.5.1. Određivanje koncentracije anjonskih surfaktanata	33
3.6. Određivanje osetljivosti na antibiotike soja <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151	33
3.7. Hemijska sinteza holin sulfata.....	34
3.8. Metode za izolaciju DNK.....	35
3.8.1. Izolacija hromozomalne DNK iz <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151	35
3.8.2. Mini-metoda za izolaciju plazmidne DNK iz <i>E. coli</i>	35
3.8.3. Metode izolacije velike količine plazmidne DNK iz <i>E. coli</i>	36

3.8.4. Metoda izolacije plazmidne DNK iz <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151	36
3.8.5. Elucija DNK fragmenata	37
3.9. Enzimske reakcije sa DNK.....	37
3.9.1. Sečenje restrikcionim enzimima	37
3.9.2. Defosforilacija 5' slobodnih krajeva DNK fragmenata	38
3.9.3. Ligacija DNK fragmenata	38
3.9.4. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom ("Polymerase Chain Reaction")	38
3.10. DNK-DNK hibridizacija.....	40
3.10.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane.....	40
3.10.2. Obeležavanje DNK probe dioksigeninom.....	41
3.10.3. Neradioaktivna DNK-DNK hibridizacija	42
3.11. Konstrukcija kozmidne biblioteke soja <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151	43
3.12. Transformacija <i>E. coli</i>	43
3.12.1. Priprema <i>E. coli</i> kompetentnih ćelija	43
3.12.2. Transformacija kompetentnih <i>E. coli</i> ćelija temperaturnim šokom ("Heat shock")	44
3.13. Konjugacija	44
3.14. Transformacija <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151.....	45
3.14.1. Priprema <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151 kompetentnih ćelija	45
3.14.2. Elektrotransformacija kompetentnih <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151 ćelija	45
3.15. Elektroforeza DNK.....	46
3.15.1. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu	46
3.15.2. Vertikalna elektroforeza DNK na poliakrilamidnim gelovima	46
3.16. Izolacija i kvantifikacija His ₆ - obeleženih proteina iz <i>E. coli</i>	47
3.16.1. Nativna izolacija His ₆ -SdsB i His ₆ -BetR proteina iz <i>E. coli</i>	47
3.16.2. Određivanje koncentracije proteina.....	48
3.16.3. SDS – poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE).....	48
3.17. Interakcija DNK i proteina	49
3.17.1. Metoda usporene elektroforetske pokretljivosti ("Gel shift")	49

3.17.2. Pripremanje i obeležavanje probe sa CTP-11-biotin obeleženim nukleotidom.....	49
3.17.3. Vezivanje proteina za DNK i određivanje smanjene elektroforetske pokretljivosti kompleksa protein-DNK.....	50
3.17.4. Detekcija DNK fragmenata obeleženih CTP-11-biotinom.....	51
3.18. β - galaktozidazni esej.....	51
3.19. Sekvenciranje dvolančane DNK	52
3.20. Kompjuterska analiza	52
4. REZULTATI.....	53
4.1. Funkcionalna analiza <i>sdsA</i> i <i>sdsB</i> gena soja <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151....	53
4.1.1. Osetljivost na antibiotike soja <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151.....	53
4.1.2. Rast soja <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151 u prisustvu SDS-a kao jedinog izvora ugljenika	54
4.1.3. Dinamika biodegradacije SDS-a tokom rasta soja <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151	56
4.1.4. Rast soja <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151 i dinamika biodegradacije ukupnih anjonskih surfaktanata u komercijalnom deterdžentu "Fairy"	58
4.1.5. Mutageneza <i>sdsA</i> i <i>sdsB</i> gena.....	60
4.1.6. Analiza aktivnosti promotora <i>sdsA</i> i <i>sdsB</i> gena.....	62
4.1.7. Inducibilnost aktivnosti promotora <i>sdsA</i> i <i>sdsB</i> gena	64
4.1.8. Ekspresija SdsB proteina	66
4.1.9. Interakcija promotorskog regiona divergentnih <i>sdsA</i> i <i>sdsB</i> gena sa SdsB regulatorom.....	67
4.1.10. Rast soja <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151 i dinamika biodegradacije ukupnih anjonskih surfaktanata u prelivnoj vodi septičke jame.....	69
4.2. Kloniranje i molekularna analiza gena holin sulfataznog operona soja <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151 i određivanje njihove uloge u osmoprotekciji	72
4.2.1. Konstrukcija kozmidne biblioteke gena soja <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151	72
4.2.2. Kloniranje i sekvenciranje holin sulfataznog operona.....	73
4.2.3. Kompjuterska analiza sekvenci <i>betC</i> gena i BetC proteina.....	77

4.2.4. Kompjuterska analiza sekvenci <i>betR</i> gena i BetR proteina	80
4.2.5. Kompjuterska analiza sekvenci <i>betD</i> gena i BetD proteina	82
4.2.6. Kompjuterska analiza sekvenci <i>betE</i> gena i BetE proteina	85
4.2.7. Mutageneza <i>betC</i> i <i>betR</i> gena.....	88
4.2.8. Analiza aktivnosti promotora <i>betC</i> i <i>betR</i> gena	90
4.2.9. Ekspresija BetR proteina	93
4.2.10. Interakcija intergenskog regiona divergentnih <i>betC</i> i <i>betR</i> gena sa BetR regulatorom	94
4.2.11. Analiza aktivnosti promotora <i>betC</i> i <i>betR</i> gena u osmotskom stresu	96
5. DISKUSIJA.....	98
5.1. Funkcija <i>sdsA</i> i <i>sdsB</i> gena soja <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151 u biodegradaciji anjonskih surfaktanata.....	98
5.2. Holin sulfatazni operon soja <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151 i njegova uloga u osmoprotekciji.....	103
6. ZAKLJUČCI.....	107
7. LITERATURA	110
PRILOG I.....	116
PRILOG II.....	119
PRILOG III.....	123
PRILOG IV	127
PRILOG V	130
PRILOG VI	133

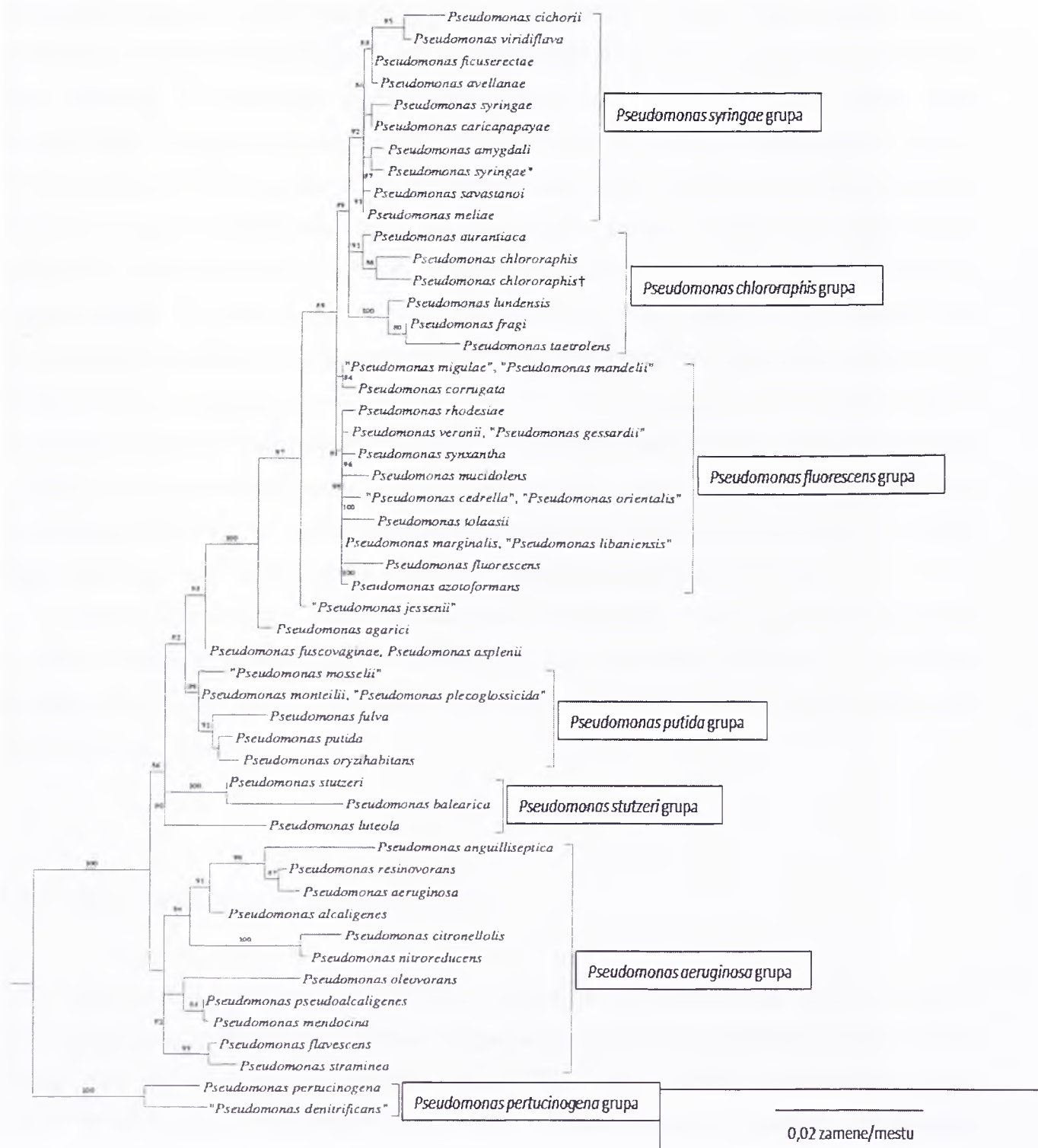
1. UVOD

1.1. Rod *Pseudomonas*

Poimanje biološkog identiteta roda *Pseudomonas* je znatno izmenjeno poslednjih godina u skladu sa izmenama u klasifikaciji baziranoj na fenotipskim karakteristikama (Holt et al., 1986) i novom klasifikacijom baziranoj na genotipskim (filogenetskim) osobinama (Holt et al., 2001). Ove promene dovele su do izdvajanja određenog broja vrsta bakterija iz roda *Pseudomonas* i formiranja novih rodova *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Zooglea*, *Comamonas*, *Acidovorax*, kao i do ubrajanja vrsta nekadašnjih rodova *Chryseomonas* i *Flavimonas* u rod *Pseudomonas* (Slika 1.).

Predstavnici roda *Pseudomonas* su Gram-negativne, štapićaste bakterije (0,5-0,8 μm x 1-3 μm), striktni su aerobi (samo neki predstavnici poseduju sposobnost anaerobnog disanja denitrifikacijom i degradacijom arginina do ornitina), kreću se pomoću polarne flagele (neki predstavnici imaju i bočne flagele), poseduju oksidativni hemoorganotrofni metabolizam, katalaza su pozitivni, uglavnom oksidaza pozitivni, proizvođači su difuzabilnih i/ili nerastvornih pigmenata.

Kloniranje i molekularna analiza sulfataznih operona soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151



Slika 1. Filogenetsko stablo vrsta roda *Pseudomonas* izvedeno na osnovu 16S rDNK sekvenci. Slika je preuzeta iz "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"

Poznato je da pseudomonade poseduju sposobnost razgradnje alifatičnih i aromatičnih ugljovodonika, masnih kiselina, insekticida i drugih zagađivača životne sredine, ali ne i teflona, stiropora i organskih jedinjenja sa jednim ugljenikovim atomom (npr. metanol, formaldehid). Zahvaljujući pomenutim osobinama neke vrste roda *Pseudomonas* koriste se u biokontroli i bioremedijaciji. Za vrste *P. fluorescens* CHA0 i *P. fluorescens* Pf-5 pokazano je da pospešuju rast biljaka indirektno tako što aktiviraju sistemski odgovor u biljkama (koji im kasnije pomaže da se odbrane od patogena) i/ili kompetiraju sa patogenima (pri čemu su u prednosti zbog prisustva siderofora) (Haas i Defago, 2005). *P. chlororaphis* proizvodi fenazine koji imaju antifungalno dejstvo, dok *P. aurantiaca* proizvodi di-2,4-diacetilfluoroglucilmetan koji ima antibiotsko dejstvo na Gram-pozitivne bakterije (Esipov et al., 1975). U bioremedijaciji se koriste vrste *P. alcaligenes* (degraduje policiklične aromatične ugljovodonike), *P. mendocina* (degraduje toluen), *P. pseudoalcaligenes* (koristi cijanid kao izvor azota), *P. resinovorans* (degraduje karbazol), *P. veronii* (degraduje aromatična organska jedinjenja), *P. putida* (degraduje organske rastvarače) i *P. stutzeri* (degraduje ugljenik tetrahlorid).

Upravo zahvaljujući ovako raznovrsnom katabolizmu i mehanizmima odgovora na stres, rasprostranjenje pseudomonada je široko (izuzevši termofilna i acidofilna staništa) tako da se nalaze u zemljištu, vodi, biljnim i životinjskim tkivima, dok neke od njih kolonizuju i čoveka.

1.1.1. Soj *Pseudomonas* sp. ATCC19151

Soj *Pseudomonas* sp. ATCC19151 izolovan je iz kanalizacione otpadne vode u SAD i pokazano je da ima sposobnost degradacije i korišćenja natrijum dodecil sulfata (SDS) kao jedinog izvora ugljenika (Hsu, 1963; Hsu, 1965). Determinacija soja ATCC19151 bazirana na analizi 16S rDNK i klasičnim mikrobiološkim tehnikama ukazala je na pripadnost soja *P. aeruginosa* grupi, ali nije bila dovoljna za precizno određivanje vrste kojoj soj pripada (Jovčić et al., 2009). Pokazano je da soj ATCC19151 poseduje gene koji kodiraju potencijalnu alkil sulfatazu (*sdsA* gen) i potencijalni LysR



transkripcioni regulator (*sdsB* gen) alkil sulfataze (Davison et al., 1992). Gen *sdsA* pokazuje najvišu homologiju sa genom nepoznate funkcije vrste *Mycobacterium tuberculosis* dok *sdsB* gen pokazuje visok stepen homologije sa velikim brojem LysR transkripcionih regulatora (Davison et al., 1992).

1.2. Mikrobiološka biodegradacija

Termin biodegradacija označava proces hemijske razgradnje materije enzimima koje produkuje živi svet iz okruženja i često se koristi u oblastima ekologije, menadžmenta otpadom i bioremedijacije. Mikrobiološka biodegradacija kao pojam podrazumeva biodegradaciju koju vrše mikroorganizmi, najčešće bakterije, zahvaljujući izuzetnoj raznovrsnosti mikrobiološkog ksenobiotičkog metabolizma da degraduje, transformiše ili akumulira širok opseg zagađivača. Interes za mikrobiološku biodegradaciju zagađivača raste poslednjih godina u skladu sa porastom napora čovečanstva da iznađe obnovljive načine za čišćenje zagađenih područja (Diaz, 2008). Tretman otpada mikroorganizmima je relativno jednostavniji, jeftiniji i sigurniji po okruženje u poređenju sa fizičko – hemijskim procesima prečišćavanja.

Uklanjanje otpada i materija koje ugrožavaju životnu sredinu je neophodno u cilju promovisanja održivog razvoja društva sa posledično malim uticajem na okruženje, te se u skladu sa tim sve više ulaže u razvoj bioloških procesa za uklanjanje zagađivača. Nove metodologije sekvenciranja, genomike, proteomike i bioinformatike značajno ubrzavaju sticanje neophodnih znanja. U oblasti mikrobiologije, sekvenciranja genoma su otvorila novu eru obezbeđujući *in silico* pogled na metaboličke i regulatorne mreže, kao i uvid u evoluciju puteva degradacije i strategija molekularne adaptacije na promenljive uslove okruženja. Funkcionalna genomika i metagenomski pristupi povećavaju naše razumevanje značaja različitih puteva i regulatornih mreža protoka ugljenika poreklom od specifičnih zagađivača u određenim staništima i zasigurno ubrzavaju razvoj tehnologija bioremedijacije. Među bakterijskim vrstama koje figuriraju kao kandidati za bioremedijaciju u cilju uklanjanja zagađivača posebno se izdvajaju one

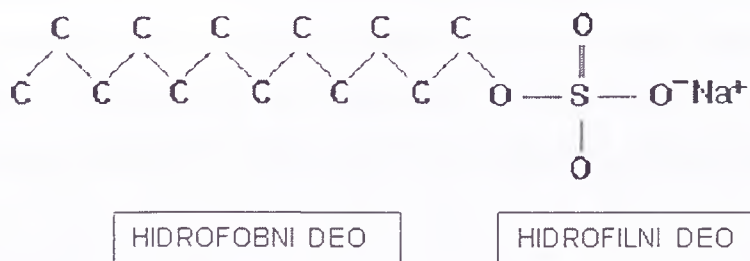
vrste koje pripadaju rodu *Pseudomonas* kako zbog svojstva da degraduju veliki broj jedinjenja koja se koriste u industriji, tako i zbog izuzetne prilagodljivosti na uslove spoljašnje sredine (Uvod, 1.1.).

U eri naglog industrijskog razvoja i povećanja zagađenosti, kao i porasta ljudske populacije na planeti raste potreba za očuvanjem resursa pitke vode. Fabrike, ali i domaćinstva ispuštaju značajnu količinu zagađivača u svojim otpadnim vodama koje zatim dospevaju u podzemne vodotokove i zagađuju izvorišta pitke vode. U cilju prečišćavanja otpadnih voda pre ispuštanja u prirodu podignuta su mnoga postrojenja koja se suočavaju sa problemom pojave pene koja se javlja usled prisustva jedinjenja koja se nazivaju surfaktanti, a koja onemogućava tretman otpadne vode. Stoga je uspešno uklanjanje surfaktanata iz voda trenutno jedan od glavnih ciljeva u oblasti mikrobiološke biodegradacije.

1.2.1. Surfaktanti

Surfaktanti su hemijski agensi koji smanjuju površinski napon tečnosti i povećavaju rastvorljivost u vodi. Upravo ove karakteristike obezbedile su im široku primenu u proizvodnji deterdženata i sredstava lične higijene.

Molekuli surfaktanata sadrže hidrofilni i hidrofobni deo, te se zbog svoje dvojne prirode često označavaju kao amfifilni (West i Harwell, 1992). Hidrofobni deo molekula je uglavnom ugljovodonični lanac, koji se često naziva repom molekula. Hidrofilni deo, ili glavu molekula, obično čine anjoni ili katjoni (Slika 2.).

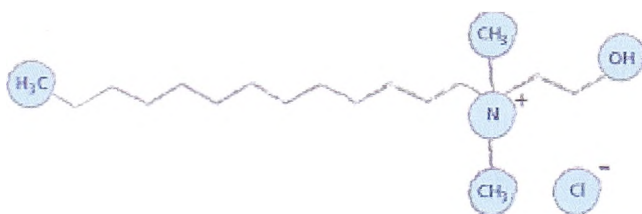


Slika 2. Šematski prikaz molekula surfaktanta. Prikazan je molekul natrijum dodecil sulfata (SDS).

Na osnovu svoje hidrofilne grupe surfaktanti se klasifikuju u četiri grupe: anjonski, katjonski, nejonski i amfoterni (cviterjonski) surfaktanti.

Anjonski surfaktanti čine grupu surfaktanata kod kojih je hidrofilna glava molekula negativno naelektrisana u vodi. Ovo je najčešće korišćena grupa surfaktanata kako u industrijskim tako i u formulacijama deterdženata koji se koriste u domaćinstvima. Nedostatak im je što u tvrdoj vodi interaguju sa katjonima magnezijuma i kalcijuma što dovodi do inaktivacije molekula. Najzastupljeniji u okviru ove grupe su alkil sulfati, sulfonati, karboksilati i fosfati. Tipičan predstavnik ove grupe surfaktanata je SDS (Slika 2.).

Katjonski surfaktanti su oni surfaktanti kod kojih je hidrofilna glava molekula pozitivno naelektrisana u vodi. Zbog svoje toksičnosti sve češće se izbacuju iz deterdžentskih formulacija, ali i dalje su u upotrebi u omekšivačima, deterdžentima za veš i dezinfekcionim sredstvima. Upotreba katjonskih surfaktanata naročito je raširena u takozvanim zemljama trećeg sveta zbog niskih troškova proizvodnje i visoke efikasnosti u odmašćivanju. Predstavnici ove grupe surfaktanata su poliamini i njihove soli i kvaternerne amonijum soli (Slika 3.).



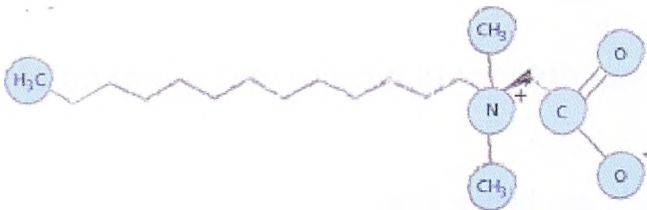
Slika 3. Šematski prikaz molekula katjonskog surfaktanta. Prikazan je molekul monoalkil kvaternerne soli.

Nejonski surfaktanti čine grupu surfaktanata čija hidrofilna glava molekula ne jonizuje u vodi. Usled svoje neosetljivosti na prisustvo katjona magnezijuma i kalcijuma u vodi, a samim tim i visokoj efikasnosti u tvrdim vodama, veoma su česti u deterdžentima, gde se najčešće koriste u kombinaciji sa anjonskim surfaktantima. U grupu nejonskih surfaktanata se ubrajaju alkohol etoksilati, alkil fenol etoksilati i alkanolamidi (Slika 4.).



Slika 4. Šematski prikaz molekula nejonskog surfaktanta.

Amfoterni/cviterjonski surfaktanti su oni čija hidrofilna glava molekula može biti pozitivno ili negativno naelektrisana, ili nenaelektrisana u vodi, a sve u zavisnosti od kiselosti vode. Veoma su blagi te su stoga česti u sredstvima za ličnu higijenu. Kompatibilni su sa ostalim grupama surfaktanata i aktivni u prisustvu visokih koncentracija elektrolita i kiselina. Najpoznatiji predstavnik ove grupe je alkil betain (Slika 5.).



Slika 5. Šematski prikaz molekula amfoternog/cviterjonskog surfaktanta. Prikazan je molekul alkil betaina.

U pogledu svoje toksičnosti po živi svet posebno se izdvajaju katjonski surfaktanti. Poslednjih godina, nova saznanja ukazuju na to da određeni katjonski surfaktanti i njihovi produkti degradacije mogu da imitiraju biološku aktivnost ženskog polnog hormona estrogena, koji se kada je prisutan u visokim dozama povezuje sa pojavom kancera i drugim ozbiljnim zdravstvenim stanjima. Takođe, pokazano je da svi surfaktanti imaju negativan uticaj na živi svet vodenih ekosistema (Ankley i Burkhard, 1992).

U cilju prevazilaženja toksičnog efekta surfaktanata danas su sve češće u upotrebi biosurfaktanti, odnosno surfaktanti poreklom iz mikroorganizama. Neke od prednosti biosurfaktanata u odnosu na hemijski sintetisane surfaktante su:

- visoka biodegradabilnost
- biostimulacija i niska toksičnost



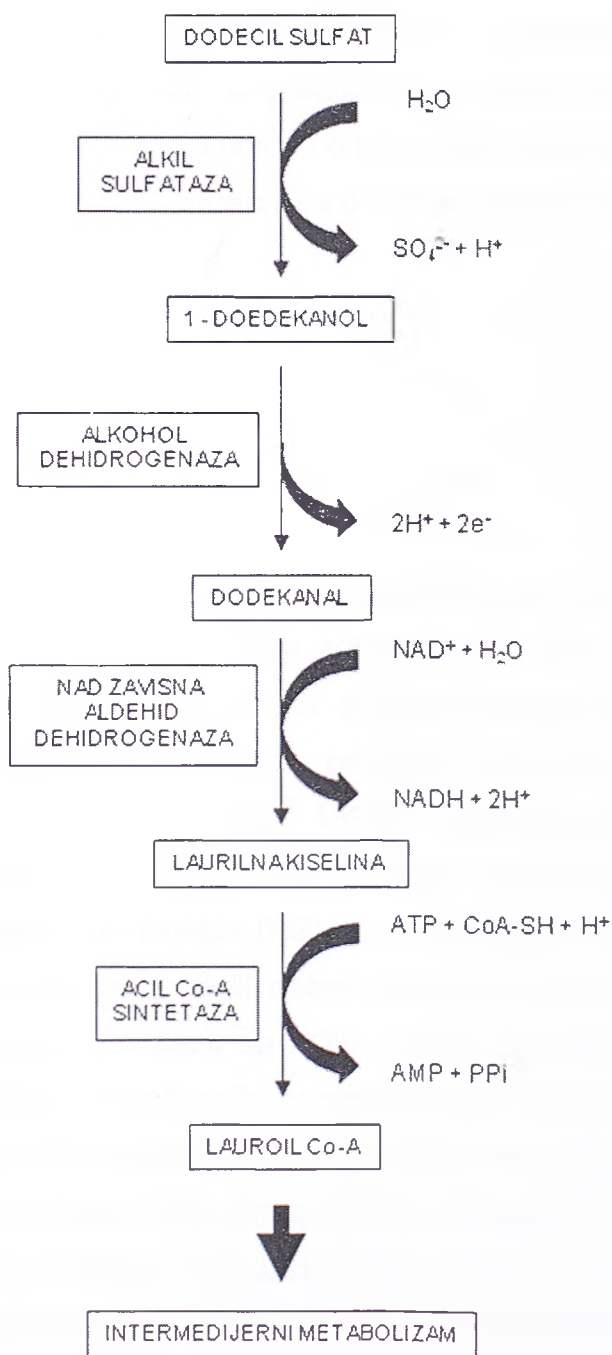
- biokompatibilnost i razgradljivost u digestivnom traktu (što omogućava široku upotrebu u kozmetologiji, farmaciji i prehrambenim proizvodima)
- niski troškovi proizvodnje (izvor ugljenika za mikroorganizme koji ih proizvode mogu biti ugljovodonici, šećeri ili lipidi pa čak i industrijski otpad ili sporedni proizvodi industrijskih procesa)
- nizak rizik uvođenja u prirodno okruženje
- specifičnost (zahvaljujući posedovanju specifičnih funkcionalnih grupa)
- efikasnost pri visokim temperaturama, pH i salinitetu (Kosaric, 2001).

Većina biosurfaktanata su po svojoj hemijskoj prirodi lipidni kompleksi velikih molekularnih masa, koji se obično proizvode u aerobnim uslovima.

1.2.2. Mikrobiološka biodegradacija anjonskih surfaktanata

Anjonski surfaktanti, a posebno alkil sulfati, se zbog svojih amfifiličnih svojstava nalaze u okviru gotovo svakog komercijalnog deterdženta, bilo da se koriste u industriji ili u domaćinstvima. Istraživanja biodegradabilnosti alkil sulfatnih surfaktanata u vodenim ekosistemima usmerena su uglavnom na linearne primarne alkil sulfate - LPAS (SDS), što je kao rezultat omogućilo detaljnu karakterizaciju metaboličkih puteva i enzima uključenih u te procese kod bakterija (Slika 6.). Biodegradacija LPAS u *Pseudomonas* sp. C₁₂B započinje dejstvom dveju alkil sulfataza, P1 i P2 koje se razlikuju po tome što P1 seče O – S, dok P2 seče C – O vezu LPAS, što rezultuje oslobađanjem primarnih alkohola iz LPAS, koji zatim podležu oksidaciji posredovanom alkohol dehidrogenazom, kao kod *P. oleovorans* (Davison et al., 1992; van Beilen et al., 1992) (Slika 6.). Rezultujući aldehid se dejstvom NAD zavisne aldehid dehidrogenaze prevodi u odgovarajuću karboksilnu kiselinu, koja se u prisustvu acil Co - A sintetaze prevodi u masnu kiselinu i podleže β oksidaciji masnih kiselina. Metabolički putevi biodegradacije granatih anjonskih surfaktanata još uvek su uveliko nepoznanica. Analizirana je samo degradacija granatog dodecilbenzen sulfonata (BCDS) u soju *P. aeruginosa* (Campos – Garcia et al., 1999). Rezultati su pokazali da u ovom slučaju

degradacija započinje desulfonizacijom katalizovanom BCDS monooksigenazom što rezultuje dobijanjem granatog dodecilfenola.



Slika 6. Šematski prikaz metaboličkog puta degradacije dodecil sulfata kod *P. oleovorans*.

Dalji tok degradacije nije u potpunosti razjašnjen, ali smatra se da se krajnji produkt 4 – hidroksibenzoat uključuje u metabolički put vanilina, čiji je krajnji rezultat "punjenje" intermedijernog metabolizma.

Granati alkil sulfati su teško razgradljivi i predstavljaju veliki problem u prečišćavanju voda. Bakterije lako degraduju samo granate alkil sulfate sa manjim brojem metil grupa duž hidrofobnog lanca i one sa grananjem na drugom C – atomu, a efikasnost degradacije može se uporediti sa onom za LPAS (Shi et al., 2000; Battersby et al., 2000).

1.3. Sulfataze

Sulfataze su hidrolitički enzimi koji kao supstrate prepoznaju veliki broj jedinjenja, što je bio osnov za formiranje 17 klasa sulfataza (EC 3.1.6.1. do EC 3.1.6.18) po klasifikaciji "IUBMB" ("International Union of Biochemistry and Molecular Biology"). Uprkos izraženoj heterogenosti supstrata, primarne i tercijarne strukture sulfataza su visoko konzervisane (Lukatela et al., 1998). Najprepoznatljivije obeležje većine sulfataza je to što podležu jedinstvenoj ko – ili post – translacionoj modifikaciji pri kojoj se formira C α – formilglicinski ostatak (FGly) u njihovom aktivnom mestu. FGly nastaje konverzijom serina (kod prokariota) ili cisteina (kod prokariota i eukariota) na osnovu čega razlikujemo dva tipa sulfataza sa FGly u aktivnom mestu: serinske i cisteinske sulfataze. Ova jedinstvena modifikacija posredovana je bilo formil – glicin generišućim enzimom (FGE) bilo AtsB proteinom (Cosma et al., 2003; Szameit et al., 1999). AtsB protein posreduje u formiranju FGly kod serinskih sulfataza, dok FGE protein generiše FGly kod cisteinskih sulfataza (izuzetak je cisteinska arilsulfataza *Clostridium perfringens* kod koje u formiranju FGly posreduje homolog AtsB proteina u anaerobnim uslovima) (Berteau et al., 2006). Pokazano je da su serinske sulfataze prokariota lokalizovane u periplazmi, dok su cisteinske sulfataze citoplazmatični proteini.

Mikroorganizmi sintetišu čitav spektar sulfataza različitih supstratnih specifičnosti u cilju iskorištavanja sulfatnih estara kao izvora ugljenika i/ili sumpora (Kahnert i

Kertesz, 2000) (Slika 7.). Do sada su opisane najmanje tri grupe sulfataza na osnovu mehanizma delovanja: sulfataze koje sadrže FGly u svom aktivnom mestu i među njima su najbrojnije i prve opisane arilsulfataze (posebno arilsulfataze eukariota), Fe(II) α -ketoglutarat zavisna superfamilija dioksigenaza i sulfataze homologe SdsA sulfatazi soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 (Hagelueken et al., 2006). Arilsulfataze su najbolje okarakterisane (čine grupu I) i uglavnom su zastupljene kod eukariota. Karakteriše ih aktivno mesto koje sadrži serin ili cistein (C/S)XPXR) koji se posttranslacionim modifikacijama prevode u formilglicin koji posreduje u sečenju CO-S veze sulfatnih estara pri čemu se dobijaju neorganski sulfat i odgovarajući alkohol (Kertesz, 2000). Fe(II) α -ketoglutarat zavisna superfamilija dioksigenaza obuhvata grupu enzima koji čine grupu II sulfataza. Ovi enzimi oksidativno seku sulfatne estre pri čemu se dobijaju neorganski sulfat i odgovarajući aldehid, ali zahtevaju prisustvo α -ketoglutarata kao kosupstrata (Muller et al., 2004). Dokazi za postojanje treće grupe su godinama akumulirani, međutim činjenica da mnoge vrste, među njima i *P. aeruginosa*, eksprimiraju čak po šest alkil i aril sulfataza (Lillis et al., 1983), zajedno sa nepostojanjem podataka o sekvencama zimografski identifikovanih enzima sprečili su njihovo izdvajanje u odvojenu grupu.

Prva potencijalna sulfataza (funkcija do danas nije potvrđena) grupe III je sulfataza SdsA soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151. N – terminalni domen SdsA enzima i njegovih homologa nosi motiv vezivanja jona Zn^{+} (THxHxDHxGG-102-E-18-AE-44-H) što ih uvrštava u grupu metalo- β -laktamaza srodnih enzima.

europaea; Nm, *Neisseria meningitidis*; No, *Nostoc* sp.; Oi, *Oceanobacillus iheyensis*; Oy, *Onion yellows phytoplasma*; Pf, *Pseudomonas fluorescens*; Pg, *Porphyromonas gingivalis*; Pl, *Photobacterium luminescens*; Pm (Proteobacteria), *Pasteurella multocida*; Pm (Cyanobacteria), *Prochlorococcus marinus*; Rc, *Rickettsia conorii*; Rb, *Rhodopirellula baltica*; Rp, *Rhodopseudomonas palustris*; Rs, *Ralstonia solanacearum*; Sa, *Staphylococcus aureus*; Sc, *Streptomyces coelicolor*; Se, *Salmonella enterica*; Sf, *Shigella flexneri*; Sh, *Shewanella* sp.; Sm, *Sinorhizobium meliloti*; Su, *Solibacter usitatus*; Sp (Firmicutes), *Streptococcus pneumoniae*; Sp (Proteobacteria), *Silicibacter pomeroyi*; Ss, *Silicibacter* sp.; Sy, *Synechococcus* sp.; Te, *Thermosynechococcus elongates*; Tf, *Thermobifida fusca*; Tm, *Thermotoga maritima*; Tp, *Treponema pallidum*; Tt, *Thermoanaerobacter tengcongensis*; Tw, *Tropheryma whippelii*; Up, *Ureaplasma parvum*; Vf, *Vibrio fischeri*; Vp, *V. parahemolyticus*; Vv, *Vibrio vulnificus*; Ws, *Wolinella succinogenes*; Xa, *Xanthomonas axonopodis*; Xf, *Xylella fastidiosa*; Yp, *Yersinia pestis*.

1.3.1. Alkil sulfataze

Alkil sulfataze se razlikuju od aril sulfataza ne samo po supstratima koje hidrolizuju već i po mehanizmu kojim to čine jer uglavnom ne formiraju kovalentni enzim – supstrat intermedijer (Dodgson et al., 1982). Ove sulfataze uglavnom seku C – OS vezu, međutim postoje alkil sulfataze koje seku CO – S vezu (SdsA1 sulfataza *P. aeruginosa* i P1 sulfataza *Pseudomonas* sp. C₁₂B) što je u prošlosti definisano kao ekskluzivno obeležje aril sulfataza. U zavisnosti od mehanizma hidrolize supstrata, mogu biti Fe(II) α -ketoglutarat zavisne (AtsK alkil sulfataza) (Kahnert i Kertesz, 2000) ili pak pripadati III grupi sulfataza (metalo- β -laktamaza srodnih enzima) (Hagelueken et al., 2006).

Alkil sulfataze opisane do danas potiču isključivo iz Gram – negativnih bakterija, iako je pokazano da i neke Gram – pozitivne bakterije mogu da rastu na SDS-u (Singh et al., 1998). Kao primer alkil sulfataza najčešće se navodi pet sulfataza soja *Pseudomonas* sp. C₁₂B. Dve od pet specifično hidrolizuju primarne sulfate, ali se međusobno razlikuju po tome što je jedna od njih konstitutivno eksprimirana dok je druga inducibilna. Ostale tri alkil sulfataze specifično hidrolizuju sekundarne sulfatne estre, dve su konstitutivne i degraduju specifično D – i L – izomere, dok je treća

inducibilna. Ekspresija inducibilnih alkil sulfataza soja *Pseudomonas* sp. C₁₂B je suprimirana u prisustvu alkohola koji nastaju kao produkti sulfatazne reakcije i intermedijera Krebsovog ciklusa (Kertesz, 2000). Ovakva regulatorna šema ukazuje na to da navedene alkil sulfataze nisu deo ciklusa sumpora, već da im je uloga u obezbeđivanju ugljenika i energije neophodne za bakterijski rast. Takođe, opisane su i inducibilne alkil sulfataze čija je ekspresija suprimirana neorganskim sulfatom (litoholat sulfataza vrste *P. aeruginosa* i holin sulfataza soja *Pseudomonas* sp. V – A) te su verovatno deo ciklusa sumpora (Imperato et al., 1977; Fitzgerald i Scott, 1974).

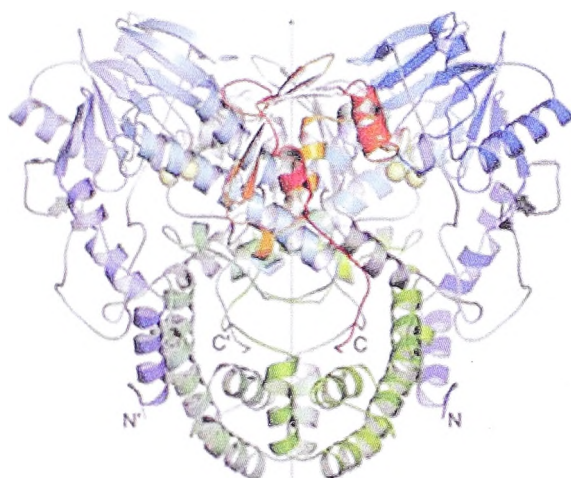
Specifičnost alkil sulfataza prema supstratima različite dužine ugljovodoničnog lanca varira, ali najveći broj do sada opisanih ne hidrolizuje one sa pet ugljenikovih atoma ili manje.

1.3.2. Alkil sulfataze grupe III sulfataza

Prvi opisani predstavnik grupe III sulfataza (podela sulfataza na osnovu mehanizma delovanja) je SdsA, potencijalna alkil sulfataza soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 (Davison et al., 1992). Smatra se da su kod ovog soja u korišćenju alkil sulfata kao izvora ugljenika uključeni proteinski produkti *sdsA* i *sdsB* gena. Potencijalni SdsB protein pripada familiji LysR transkripcionih regulatora i homolog je regulatornom proteinu vrste *P. putida* uključenom u degradaciju aril sulfonata. Pretpostavlja se da je SdsB protein neophodan za ekspresiju *sdsA* gena. Pokazano je da je SdsA protein lociran u periplazmi, ali pošto se u njegovoj aminokiselinskoj sekvenci ne nalazi klasičan signal peptid za eksport u periplazmu pretpostavlja se da ovaj protein poseduje atipičan signal za lociranje u periplazmi (Kertesz, 2000).

Homolog SdsA sulfataze, SdsA1 alkil sulfataza iz *P. aeruginosa* je najbolje okarakterisan predstavnik grupe III sulfataza. Kristalna struktura SdsA1 proteina

otkrila je mnoge specifičnosti sulfataza ove grupe (Hagelueken et al., 2006) (Slika 8.).



Slika 8. Struktura SdsA1 enzima. Na slici je predstavljen dimer. Plavo – N terminalni domen, zeleno – dimerizacioni domen, crveno – C terminalni domen. Joni cinka su predstavljeni žutim sferama.

N – terminalni katalitički $\alpha\beta\alpha$ - "sendvič" domen poseduje motiv za vezivanje jona Zn^{+} (THxHxDHxGG-102-E-18-AE-44-H) karakterističan za grupu enzima srodnih metalo- β -laktamazama. Dva jona cinka u aktivnom mestu su međusobno povezana molekulom vode ili pak dele zajednički hidroksilni jon. Upravo molekul vode ili hidroksilni jon vrše nukleofilni napad na atom sumpora što rezultuje sečenjem CO – S veze. Metalo- β -laktamazni domen je kroz evoluciju korišćen u katalizi širokog spektra hemijskih reakcija. Strukturno, diverzitet enzima koji sadrže metalo- β -laktamazni domen je postignut variranjem sekvence i konformacijom regiona oko aktivnog mesta, što je omogućilo prepoznavanje raznorodnih supstrata. Centralni domen, domen za dimerizaciju obezbeđuje rezistenciju na visoke koncentracije SDS – a, i čine ga isključivo α - heliksi. U okviru dimera monomeri su tako postavljeni da bi trebalo potpuno narušiti strukturu proteina ili izvršiti isecanje jednog od polipeptida da bi došlo do razdvajanja što može da objasni otpornost ovog enzima na prisustvo SDS – a

(Hagelueken et al., 2006). C – terminalni domen ima izraženu hidrofobnost i najverovatnije ima ulogu u vezivanju alifatičnih supstrata.

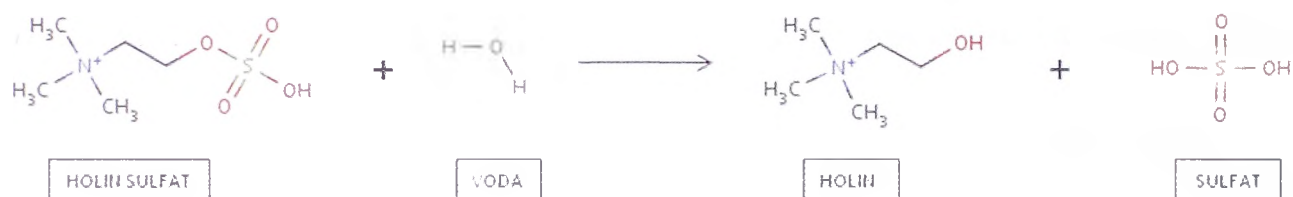
Homolozi SdsA i SdsA1 enzima nalaze su u mnogim eubakterijama, dok su eukariotski homolozi, BdsI protein vrste *Saccharomyces cerevisiae* (Hall et al., 2005) i EAL47917 protein patogena *Entamoeba histolytica* (Loftus et al., 2005), najverovatnije poreklom od α – proteobakterija.

Usled porasta broja sekvenciranih bakterijskih genoma, a nakon određivanja strukture SdsA1 i definisanja njegove enzimske specifičnosti, očekuje se identifikacija novih alkil sulfataza koje će na osnovu homologije sa SdsA1 biti ubrojane u grupu III sulfataza.

1.3.3. Holin sulfataze i njihova uloga u zaštiti od osmotskog stresa

Kada se bakterije nađu u uslovima osmotskog stresa najčešći odgovor podrazumeva akumulaciju osmolita u cilju održavanja turgora ćelije koji je neophodan za metaboličke funkcije i strukturni integritet. Akumulacija osmolita u visokim koncentracijama ne narušava metaboličke funkcije ćelija. Osmoliti mogu biti sintetisani *de novo* ili akumulirani iz spoljašnje sredine sa ili bez prethodne modifikacije (Miller i Wood, 1996). Najčešći među osmolitima je glicin betain, cviterjonski kvaternerni amonijum molekul, koji se akumulira sintezom ili transportom iz spoljašnje sredine. Proteini uključeni u transport glicin betaina pripadaju ABC ("ATP – binding cassette"), BCCT ("Betaine – carnitine – choline transporter") i MFS ("Major facilitator superfamily") porodicama transportera. *De novo* sinteza glicin betaina je retka i zabeležena je samo kod malog broja bakterijskih vrsta. Najčešći prekursor glicin betaina je holin, i do danas je otkriveno nekoliko enzimskih sistema koji katalizuju tu konverziju. Proteinski produkti *betBA* gena (betain aldehid dehidrogenaza i holin dehidrogenaza) katalizuju dvostepenu transformaciju holina u betain kod *E. coli* (Lamark et al., 1991) i *Sinorhizobium meliloti* (Poccard et al., 1997). Primer alternativnih puteva sinteze glicin betaina iz holina podrazumevaju dejstvo bifunkcionalne holin oksidaze (*Arthrobacter globiformis*) ili

kombinacije betain aldehyd dehidrogenaze i solubilne alkohol dehidrogenaze tip III (*B. subtilis*). Holin kod nekih bakterija i gljiva poreklom od holin sulfata dobija se hidrolizom koju vrši holin sulfataza (Osteras et al., 1998) (Slika 7.). Prednost korišćenja holin sulfata kao prekursora osmoprotektanata za bakterije rizosfere leži u tome što ga biljke u osmotskom stresu akumuliraju u velikim količinama u korenskom sistemu te je lako dostupan.



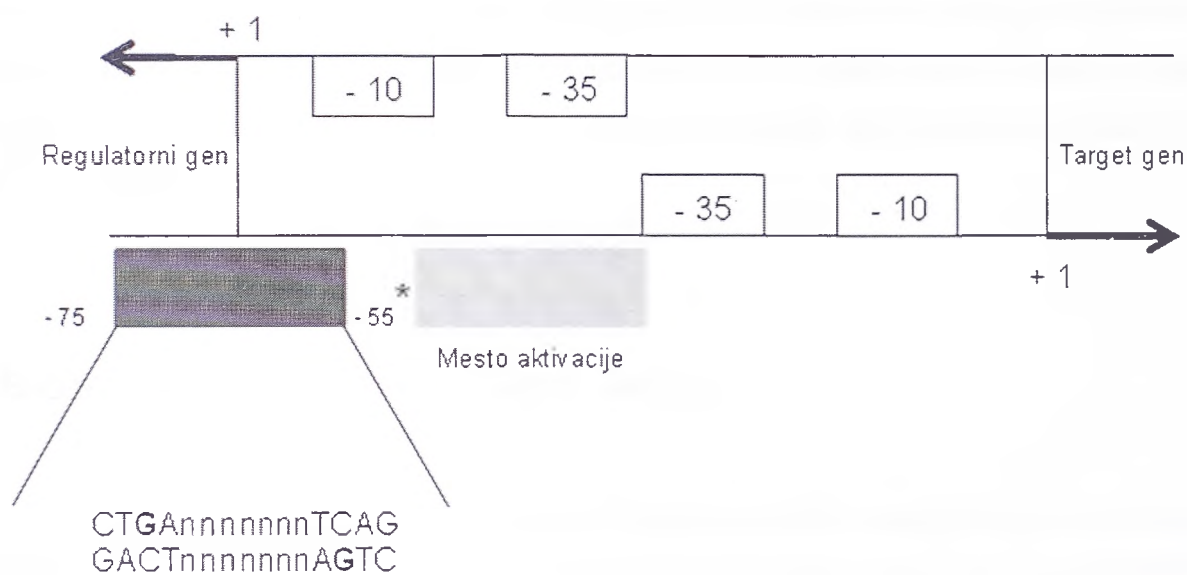
Slika 7. Šematski prikaz hidrolize holin sulfata.

Do danas su detaljno opisane samo dve holin sulfataze bakterija, i to iz *S. meliloti* (Osteras et al., 1998) i *P. putida* (Galvao et al., 2006). Za holin sulfatazu *S. meliloti* je pokazano da čini deo operona uključenog u sintezu glicin betaina, te da shodno tome ima ulogu u osmoprotekciji. Takođe, utvrđeno je da osim što prevodi holin sulfat u holin, konvertuje i fosforilholin u holin. Holin sulfataza iz *P. putida* se u genomu nalazi u drugačijem kontekstu u odnosu na prethodno navedenu, u okviru operona koji pored nje čine divergentni gen za LysR transkripcioni regulator i konvergentni geni za periplazmatski supstrat vezujući domen ABC transportera (*betD*) i sulfatni transporter sa ATP vezujućim domenom (*betE*), dok se geni uključeni u konverziju holina u glicin betain nalaze u udaljenom delu genoma. Pokazano je da holin sulfataza iz *P. putida* nema ulogu u osmoprotekciji, već da holin sulfat služi kao izvor ugljenika, azota i sumpora, dok holin predstavlja kako izvor ugljenika i azota, tako i prekursor glicin betaina, u zavisnosti od fizioloških parametara ćelije i uslova u spoljašnjoj sredini.

Po svojoj domenskoj organizaciji i mehanizmu hidrolize, holin sulfataze su cisteinske sulfataze i najbližnje su arilsulfatazama grupe I sulfataza, s obzirom da u aktivnom mestu poseduju sekvencu koju prepoznaju formilglicin - generišući enzimi (CXPXR).

takođe imaju ulogu u prepoznavanju koinducera ili u konformacionim promenama do kojih dolazi nakon vezivanja koinducera za regulator.

DNK sekvenca koju prepoznaju i za koju se vezuju LysR transkripcioni regulatori u okviru promotora ciljnih gena najčešće je pozicionirana u regionu – 65 i sastoji se od konzervisanog motiva sa dijadnom simetrijom CTGA – N₇ – TCAG (Slika 10.).



DNK sekvenca koju prepoznaju LysR regulatori

Slika 10. Šematski prikaz strukture tipičnog divergentnog promotora regulisanog LysR transkripcionim regulatorima. + 1 – start transkripcije, - 35 i - 10 konzensus sekvence prokariotskih promotora su uokvirene, * - lokacija potencijalnog mesta savijanja DNK usled vezivanja regulatora. U okviru dijadne sekvence koju prepoznaju LysR regulatori podebljani su guanini za koje se pretpostavlja da su direktno uključeni u vezivanje.

U vezivanju LysR regulatora za DNK aktivnu ulogu imaju dva simetrična guanina iz dijade, što je i uobičajeno za DNK vezujuće proteine koji nose "helix – turn – helix" motiv (Jordon i Pabo, 1988). Dijadni motiv stoga verovatno predstavlja sidro ili svojevrsan putokaz za vezivanje LysR regulatora, dok specifičnost u prepoznavanju obezbeđuju manje konzervisani okolni nukleotidi. Dijada se u okviru divergentnih promotora najčešće preklapa sa promotorom LysR regulatora i vezivanje za njihove sekvence verovatno obezbeđuje autoregulaciju. Osim sa regionom – 65 LysR regulatori

interaguju i sa nizvodni regionom koji se nalazi uz – 35, pri čemu je za ovu interakciju neophodno prisustvo koinducera, a posledica je aktivacija transkripcije target gena. Neki LysR regulatori vezuju se samo za dijadnu sekvencu na – 65, ali u prisustvu koinducera dolazi do kooperativnog vezivanja proteina i do interakcije sa mestom aktivacije. Kod nekih, međutim, dolazi do vezivanja kako za – 65 tako i za mesto aktivacije i bez prisustva koinducera. Uopšteno govoreći, kod većine promotora koinducer menja strukturu LysR – DNK kompleksa i/ili mobilnost samog kompleksa. Ovakve promene verovatno dovode do savijanja DNK ili pojave novih LysR – DNK interakcija koje povećavaju afinitet vezivanja RNK polimeraze, što posledično dovodi do inicijacije transkripcije (Schell, 1993).

1.5. Bakterijski transporteri sulfatnih estara

Transportni proteini su od suštinskog značaja za žive organizme i upravo je selektivna permeabilnost za nutrijente i metabolite verovatno bila jedna od primarnih karakteristika prvobitnih ćelija. Uopšteno govoreći, transportni proteini mogu biti kanali, primarni transporteri ili sekundarni transporteri (Saier, 2000). Kanali omogućavaju difuziju niz gradijent koncentracije, što je proces koji ne zahteva utrošak energije. Kanali spoljašnje membrane Gram – negativnih bakterija katalizuju transport iz spoljašnje sredine u periplazmatski prostor. Sulfatni estri koriste OmpF ili OmpC porinske kanale pri procesu difuzije u periplazmatski prostor (Nikaido, 2003). Primarni aktivni transporteri (među njima i ABC transporteri) vrše transport nasuprot gradijentu koncentracije uz utrošak ATP – a. Sekundarni aktivni transporteri (uniporter, antiporter i simporter) tokom transporta koriste energiju jonskih gradijenata.

Sulfatni estri su jonizovani na fiziološkom pH jer se ponašaju kao kiseline, te shodno tome ne mogu biti preuzeti pasivno već zahtevaju aktivan transport kroz unutrašnju membranu ćelije. Transporteri sulfatnih estara bakterija uglavnom pripadaju superfamiliji ABC transportera. Osim ABC transportera sulfatne estre iz periplazmatskog prostora u citoplazmu transportuju i bakterijski transporteri koji

pripadaju grupi MFS transportera. Količine sulfatnih estara ovako transportovanih u ćelije su male s obzirom da je bakterijama dovoljna relativno mala koncentracija sumpora za normalan rast (sumpor čini 1 % suve mase bakterijske ćelije). Neki sulfatni estri se pak hidrolizuju u samoj periplazmi, najčešće od strane alkil sulfataza (Dodgson et al., 1982) i serinskih arilsulfataza, te kod bakterija koje eksprimiraju ove enzime za korišćenje sulfatnih estara kao izvora ugljenika i sumpora nisu neophodni transporteri sulfatnih estara. Bakterije koje ne poseduju periplazmatske sulfataze svoje sulfatne transportere koeksprimiraju sa sulfataznim genima, što omogućava brz odgovor ćelije na promene u fiziološkom statusu i/ili spoljašnjoj sredini (Kahnert i Kertesz, 2000). Bakterijski sulfatni transporteri ABC tipa često postoje u više kopija u genomu i uobičajeno je delimično ili čak potpuno preklapanje funkcije što je verovatno posledica veoma složenog metabolizma sumpora. Kao primer, ABC transporter holin sulfata vrste *P. putida* eksprimira se kao deo istog operona sa holin sulfatazom, međutim, nasuprot očekivanjima mutageneza ovog transportera ne zaustavlja transport holin sulfata u ćeliju, što ukazuje na to da u genomu postoje drugi ABC transporteri koji mogu da preuzmu funkciju mutiranog u cilju preživljavanja ćelije (Galvao et al., 2006).

Na osnovu funkcije koju obavljaju razlikujemo tri tipa ABC transportera:

- importeri
- eksportereri
- proteini ABC superfamilije koji ne učestvuju u transportu već imaju ulogu u regulaciji elongacije translacije i procesima popravke oštećenja DNK molekula (Davidson et al, 2008).

ABC transporteri koji vrše transport sulfatnih estara iz periplazme u citoplazmu pripadaju grupi importera. Većina ABC importera oslanja se na prisustvo visoko – specifičnih supstrat vezujućih proteina. Supstrat vezujući proteini Gram – negativnih bakterija nalaze se u periplazmi, dok su kod Gram – pozitivnih bakterija često u formi lipoproteina vezanih za membranu ili su pak fuzionisani sa transmembranskim transportnim proteinom (van der Heide i Poolman, 2002). Supstrat vezujući proteini obezbeđuju specifičnost transportera i zahvaljujući svojoj funkciji komponenta su ABC transportera koja ima najveću raznovrsnost. Često prepoznaju više različitih molekula kao supstrate i mogu da interaguju sa više transmembranskih komponenti što dodatno

doprinosi raznolikosti u transportu koja kao posledicu obezbeđuje brži odgovor ćelije na promene fiziološkog statusa i promene u spoljašnjoj sredini (Davidson et al., 2008). Osim supstrat vezujućih proteina, po definiciji, ABC importere čine još i permeaza vezana za unutrašnju membranu ćelije (transmembranska komponenta), prisutna obično u formi dimera, i ATP vezujuća komponenta koja se nalazi na citoplazmatskoj strani membrane, takođe u formi dimera (Kertesz, 2000). ATP vezujuća komponenta često je fuzionisana sa permeazom i nalazi se na C – terminusu permeaza (Galvao et al, 2006; Davidson et al., 2008).

2. CILJ RADA

Ciljevi ovog rada bili su:

1. Funkcionalna analiza *sdsA* i *sdsB* gena soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151
2. Određivanje sposobnosti soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 da degraduje anjonske surfaktante
3. Kloniranje i molekularna analiza gena holin sulfataznog operona soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 i određivanje njihove uloge u osmoprotekciji

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Bakterijski sojevi

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

Tabela 1. Spisak korišćenih sojeva

Soj	Relevantne karakteristike	Referenca
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , Δ lac, U169(Φ 80 lacZ Δ M15), supE44, hsdR17, recA1, gyrA96, endA1, thi-1, relA1	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> 2013	Km ^r	Figurski i Helinski, 1979
<i>E. coli</i> CC118	F ⁻ , Δ (ara-leu)7697 araD139 Δ (lac)X74 phoA Δ 20 galE galK thi rpsE rpoB argE(Am) recA1	Manoil i Beckwith, 1985
<i>E. coli</i> M15	Nosi pREP4 plazmid, Km ^r	Qiagen, Nemačka
<i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151	Amp ^r	Hsu, 1963; Hsu, 1965

3.2. Korišćeni i konstruisani plazmidi

Plazmidi korišćeni u ovom radu predstavljani su u Tabeli 2.

Tabela 2. Plazmidi korišćeni u ovom radu

Plazmid	Relevantne karakteristike ^a	Referenca
pBluescript SK	Amp ^r , ColE1 replikon	Stratagene
pBluescript KS	Amp ^r , ColE1 replikon	Stratagene
pMP220	Vektor za kloniranje promotora, IncP1, Tc ^r	Spaink et al., 1987
pMP77	Vektor za kloniranje promotora, IncQ, Cm ^r	Spaink et al., 1987
pKNOCK	Vektor za mutagenezu, Km ^r	Alexeyev, 1999
pQE32	Komercijalni vector, Amp ^r	Qiagen, Nemačka
pGEM-T Easy	Komercijalni vektor za kloniranje PCR produkata, Amp ^r	Promega, SAD
pLAFR	Komercijalni vector, Tc ^r	Stratagene
pBSSKsdsB	PCR produkt <i>sdsB</i> gena kloniran u pBluescript SK (<i>EcoRV</i>)	Ovaj rad
pBSSKMdsdsB	286 bp <i>TaqI</i> fragment <i>sdsB</i> gena kloniran u pBluescript SK (<i>Clal</i>)	Ovaj rad
pKNMdsdsB	<i>BamHI-KpnI</i> fragment iz pBSSKMdsdsB kloniran u pKNOCK (<i>BamHI-KpnI</i>)	Ovaj rad
pQE32sdsB	<i>BamHI-HindIII</i> fragment iz pBSSKsdsB kloniran u pQE32 (<i>BamHI-HindIII</i>)	Ovaj rad
pBSSKMdsdsA	1017 bp <i>SalI</i> fragment <i>sdsA</i> gena kloniran u pBluescript SK (<i>SalI</i>)	Ovaj rad
pKNMdsdsA	<i>BamHI-KpnI</i> fragment iz pBSSKMdsdsA kloniran u pKNOCK (<i>BamHI-KpnI</i>)	Ovaj rad
pBSSKsdsI	intergenski region <i>sdsA</i> i <i>sdsB</i> gena kloniran u pBluescript SK (<i>SmaI</i>)	Ovaj rad
pMP220KXsdsI	<i>KpnI-XbaI</i> fragment pBSSKsdsI kloniran u pMP220 (<i>KpnI-XbaI</i>)	Ovaj rad
pMP220BKsdsI	<i>BamHI-KpnI</i> fragment pBSSKsdsI kloniran u pMP220 (<i>BglII-KpnI</i>)	Ovaj rad
pGEMsdsA	PCR product <i>sdsA</i> gena kloniran u pGEM-T Easy	Ovaj rad
pBSKSEIsdsA	<i>EcoRI</i> fragment pGEMsdsA kloniran u pBluescript KS	Ovaj rad
pGEMsdsBStu	PCR fragment koji nosi <i>sdsB</i> gen, intergenski region i deo <i>sdsA</i> gena od starta transkripcije do <i>StuI</i> restrikcionog mesta kloniran u pGEM-T	Ovaj rad

pBSKSsdsO	Easy <i>HindIII-StuI</i> fragment pGEMsdsBStu kloniran u pBSKSEIsdsA (<i>HindIII-StuI</i>)	Ovaj rad
pMP77sdsO	<i>BamHI-XbaI</i> fragment pBSKSsdsO kloniran u pMP77 (<i>BglII-XbaI</i>)	Ovaj rad
pLAFRCS	Kozmid koji nosi holin sulfatazni operon	Ovaj rad
pBSSK3.5Kpn	<i>KpnI</i> fragment 3,5 kb iz pLAFRCS kloniran u pBluescript SK	Ovaj rad
pBSSKE47III	3,5 kb <i>Eco47III</i> fragment iz pLAFRCS kloniran u pBluescript SK	Ovaj rad
pBSSKNotI5	<i>NotI</i> fragment 5 kbp iz pLAFRCS kloniran u pBluescript SK	Ovaj rad
pBSSKPstI300	<i>PstI</i> fragment 300 bp iz pBSSKNotI5 kloniran u pBluescript SK	Ovaj rad
pBSSKPstI1420	<i>PstI</i> fragment 1420 bp iz pBSSKNotI5 kloniran u pBluescript SK	Ovaj rad
pBSSKPstI1268	<i>PstI</i> fragment 1268 bp iz pBSSKNotI5 kloniran u pBluescript SK	Ovaj rad
pBSSKbetR	PCR produkt <i>betR</i> gena kloniran u pBluescript SK	Ovaj rad
pBSSKMbetR	<i>SacII-SalI</i> fragment <i>betR</i> gena kloniran u pBluescript SK	Ovaj rad
pKNMbetR	<i>SacII-SalI</i> fragment pBSSKMbetR kloniran u pKNOCK (<i>SacII-SalI</i>)	Ovaj rad
pQEbetR	<i>BamHI-HindIII</i> fragment iz pBSSKbetR kloniran u pQE32 (<i>BamHI-HindIII</i>)	Ovaj rad
pGEMMbetC	834 bp PCR fragment za mutagenezu <i>betC</i> gena kloniran u pGEM-T Easy	Ovaj rad
pBSSKMbetC	<i>EcoRI</i> fragment iz pGEMMbetC kloniran u pBluescript SK	Ovaj rad
pKNMbetC	<i>EcoRI</i> fragment iz pBSSKMbetC kloniran u pKNOCK	Ovaj rad
pGEMbetI	PCR produkt intergenskog regiona <i>betR</i> i <i>betC</i> gena kloniran u pGEM-T Easy	Ovaj rad
pBSSKbetI	<i>EcoRI</i> fragment iz pGEMbetI kloniran u pBluescript SK	Ovaj rad
pMP220KXbetI	<i>KpnI-XbaI</i> fragment pBSSKbetI kloniran u pMP220 (<i>KpnI-XbaI</i>)	Ovaj rad
pMP220BKbetI	<i>BamHI-KpnI</i> fragment pBSSKbetI kloniran u pMP220 (<i>BglII-KpnI</i>)	Ovaj rad

3.3. Medijumi za rast bakterija

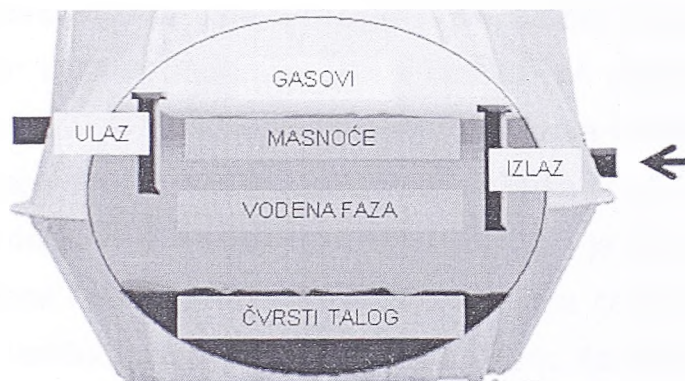
Bakterije korišćene u ovom radu gajene su u LB medijumu (1 % tripton, 0,5 % NaCl, 0,5 % ekstrakt kvasca) na 37°C za *E. coli* sojeve, odnosno na 30°C za *Pseudomonas* sp. ATCC19151. Za rast soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 korišćen je i M9 minimalni medijum sa glukozom (finalno 0,2 %), SDS-om (0,5 % do 4 %), citratom (0,2 %), holin sulfatom (0,2 %), betainom (0,2 %) ili holinom (0,2 %), ponaosob, kao jedinim izvorom ugljenika. Čvrste podloge za rast bakterija dobijene su dodavanjem 1,5 % agara u tečni LB medijum ili M9 minimalni medijum. Antibiotici su po potrebi dodavani u medijum u sledećim koncentracijama: ampicilin 100 µg/ml (*E. coli*); tetraciklin 20 µg/ml (*E. coli*, *Pseudomonas* sp. ATCC19151); kanamicin 100 µg/ml (*E. coli*, *Pseudomonas* sp. ATCC19151); hloramfenikol 35 µg/ml (*E. coli*, *Pseudomonas* sp. ATCC19151).

3.4. Testiranje rasta soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151

Rast soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 testiran je u LB medijumu; zatim M9 minimalnom medijumu sa dodatkom glukoze (0,2 % finalno) ili SDS-a (0,5 %, 0,75 %, 1 %) kao i u prelivnoj vodi septičke jame domaćinstva iz Beograda u okviru eksperimenata karakterizacije alkil sulfataznog operona. Rast soja testiran je i u M9 minimalnom medijumu sa dodatkom holin sulfata (0,2 % finalno) ili citrata (finalno 0,2 %) kao jedinih izvora ugljenika, ponaosob u okviru eksperimenata karakterizacije holin sulfataznog operona. U staklenom sudu (500 ml) 100 ml odgovarajućeg medijuma je inokulisano sa 1 ml (1% v/v inokulum) prekonocne kulture. Rast bakterijske kulture praćen je testom mikrodilucije, pri čemu su odgovarajuća razblaženja na svaka dva sata utrljavana na čvrstu LB podlogu koja je zatim inkubirana preko noći na 30°C. Broj bakterija u kulturi određivan je brojanjem kolonija (CFU, "Colony Forming Units") i izražavan kao CFU/ml. Eksperimenti su rađeni u triplikatu.

3.5. Testovi biodegradacije

U cilju ispitivanja sposobnosti biodegradacije anjonskih surfaktanata soj *Pseudomonas* sp. ATCC19151 gajen je u M9 minimalnom medijumu sa dodatkom 0,5 % SDS-a pri temperaturi od 18°C i 30°C ili rastućih koncentracija (0,5 %, 0,75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 % i 30 %) komercijalnog deterdženta "Fairy" (Procter & Gamble-Rakona, Republika Češka) kao jedinog izvora ugljenika pri temperaturi od 30°C, kao i u sterilisanoj prelivnoj vodi septičke jame domaćinstva iz okoline Beograda pri temperaturi od 30°C (Slika 11).



Slika 11. Šematski prikaz septičke jame iz koje je uzeta prelivna voda za testove biodegradacije. Mesto odakle je prelivna voda uzorkovana naznačeno je strelicom.

Hemijski sastav prelivne vode septičke jame određen je uslužno u Laboratoriji za ispitivanje hemijske ispravnosti vode Gradskog zavoda za javno zdravlje u Beogradu. Hemijski sastav je određivan pre inokulacije kulturom *Pseudomonas* sp. ATCC19151 i sedam dana nakon inokulacije. Degradacija alkil sulfata ili ukupnih anjonskih surfaktanata praćena je MBAS ("Methylene Blue Active Substance Assay") metodom (Hayashi, 1975).

3.5.1. Određivanje koncentracije anjonskih surfaktanata

Koncentracija anjonskih surfaktanata određivana je MBAS metodom (Hayashi, 1975). Metod se zasniva na formiranju kompleksa između anjonskih surfaktanata i katjonske boje metilen plavo koja se dodaje u višku. Tako formirani kompleksi se zatim ekstrahuju hloroformom iz vodene faze i određuje se apsorpcija plave hloroformske faze. U radni rastvor metilen plavog (0,5 % u destilovanoj vodi) je dodavan hloroform (1/20 v/v) u cilju uklanjanja nečistoća rastvorljivih u hloroformu i tako dobijena smeša je čuvana na sobnoj temperaturi u tamnoj boci da bi se sprečila fotodegradacija.

Radni rastvor metilen plavog je 100 x razblaživan dodavanjem 0,7 mM Na - fosfatnog pufera pH 7,2. Alikvoti ovako dobijenog rastvora metilen plavog (500 µl) su mešani sa odgovarajućom zapreminom ispitivanog uzorka (1 µl) i intenzivno mešani 10 s. Nakon mešanja dodavano je 3 ml hloroforma, a zatim je rezultujuća smeša iznova mešana 10 s. Vodena i hloroformska faza su razdvajane centrifugiranjem u centrifugi 5804 (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) 3 min, 2000 rpm. Apsorpcija hloroformske faze određivana je na 655 nm koristeći aparat UltraSpec 3300 pro (Amersham Biosciences, Biochrom Ltd., Cambridge, Engleska). Svi eksperimenti su rađeni u triplicatu.

3.6. Određivanje osetljivosti na antibiotike soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151

Za određivanje MIK-a (minimalne inhibitorne koncentracije) antibiotika za soj *Pseudomonas* sp. ATCC19151 korišćen je test mikrodilucije u mikrotitar ploči sa 96 bunarčića (Jovčić et al., 2009). Mikrotitar ploča sadržala je serije razblaženja (po 100 µl, pri čemu je svako razblaženje 2 x veće od prethodnog) sledećih antibiotika: ampicilin (500-4000 µg/ml), gentamicin (2-16 µg/ml), hloramfenikol (8-32 µg/ml), vankomicin (4-32 µg/ml), tobramicin (2-16 µg/ml), amikacin (8-64 µg/ml), kanamicin (12.5-100 µg/µl), tetraciklin (1-16 µg/ml) i nalidiksična kiselina (25-200 µg/ml). 20 ml LB je inokulisano sa 100 µl prekonocne kulture *Pseudomonas* sp. ATCC19151 i inkubirano na 30°C 5 h uz

konstantno mešanje od 180 rpm. Nakon što je kultura dostigla $OD_{600nm} = 0,132$ (0,5 McFarland jedinica) po 100 μ l kulture je dodato u svaki bunarčić koji je sadržao antibiotik. Finalno je u svakom bunarčiću broj ćelija bio 5×10^5 CFU/ml. Bunarčić u kom nije bilo antibiotika predstavljao je pozitivnu kontrolu, dok je bunarčić koji je imao neinkulisani LB bio negativna kontrola za rast. Mikrotitar ploče su zatim inkubirane na 30°C 24 h nakon čega je na čitaču (Labsystems Multiscan RC, MTX Labsystems, Inc., Vienna, Vayoming, SAD) očitavana optička gustina u bunarčićima. Kao MIK je definisana najniža koncentracija antibiotika koja nakon 24 h u potpunosti inhibira rast soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151.

3.7. Hemijska sinteza holin sulfata

Holin sulfat sintetisan je reakcijom supstitucije iz holin hlorida (Sigma, Nemačka) u prisustvu sumporne kiseline (Poch, Republika Češka) na povišenoj temperaturi. 0,5 mola holin hlorida (69,815 g) zagrevano je na 95°C u vodenom kupatilu u prisustvu 1,3 mola (127,504 g, s obzirom na to da je specifična gustina H_2SO_4 1,84 g/cm³ u 69,29 ml sumporne kiseline) 12 h. Nakon kuvanja u smešu je dodato 80 ml 80 % etanola pri čemu je odmah uočeno formiranje kristala holin sulfata. Ovako dobijena suspenzija čuvana je na 6°C tokom noći. Sutradan je odlivena tečnost iz suspenzije i kristali su pomešani sa 80 ml 80 % etanola i iznova ostavljeni 16 h na 6°C. Nakon tretmana suspenzija je profiltrirana kroz 3 MM Wathman papir, kristali su osušeni na vazduhu i izmeren je prinos od 8 g holin sulfata.

3.8. Metode za izolaciju DNK

3.8.1. Izolacija hromozomalne DNK iz *Pseudomonas* sp. ATCC19151

Hromozomalna DNK izolovana je tako što je talog prekonoćne kulture (10 ml) resuspendovan u 2 ml pufera za suspenziju ćelija (50 mM Tris pH 8,0, 20 mM EDTA), a zatim je suspenziju dodato 2,5 ml 2 % sarkozila i 0,5 ml pronaze E (5 mg/ml). Smeša je inkubirana na 37°C 10 min, a zatim intenzivno mešana 2 min. Nakon ekstrakcije fenolom, smeša je tretirana hloroformom. Precipitacija DNK iz smeše vršena je dodavanjem 0,7 volumena izopropanola i 0,1 volumena 3M Na-acetata i inkubacijom na -20°C 20 min. DNK je taložena centrifugiranjem na 13000 rpm 30 min (centrifuga 5804, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Pranje DNK vršeno je 75 % etanolom. Nakon sušenja u vakuum uparivaču, DNK je resuspendovana u bidestilovanoj vodi. Ovako dobijena DNK obično je 50 - 100 x diluirana da bi mogla da se koristi kao matrica u PCR ili u analizi restrikcionim endonukleazama.

3.8.2. Mini-metoda za izolaciju plazmidne DNK iz *E. coli*

Izolacija malih količina plazmidne DNK iz *E. coli* rađena je po modifikovanoj metodi "JETSTAR Plasmid Kit- MINI" (Genomed, GmbH, Austrija). Ćelije *E. coli* iz prekonoćne kulture (3 ml) su taložene centrifugiranjem (1 min, 13000 rpm, centrifuga 5804, Eppendorf, Hamburg, Nemačka), a zatim resuspendovane u 200 µl rastvora za resuspendovanje ćelija (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, finalno pH 8,0) koji sadrži RNazu. Dobijena suspenzija je homogenizovana intenzivnim mešanjem, a zatim je dodato 200 µl rastvora za lizu ćelija (200 mM NaOH i 1 % SDS). Neutralizacija liziranih ćelija je vršena dodavanjem 200 µl rastvora za neutralizaciju (3,1 M kalijum acetat, sirćetna kiselina, finalno pH 5,5), smeša je intenzivno mešana i centrifugirana 10 min na 13000 rpm u centrifugi 5804 (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Supernatant je prenošen

u novu mikrotubu u koju je dodato 50 µl neutralnog fenola, smeša je intenzivno promešana, a zatim centrifugirana 1 min na 13000 rpm u centrifugi 5804 (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) nakon čega je supernatant prebačen u novu mikrotubu i pomešan sa 0,7 volumena izopropanola. Plazmidna DNK je taložena centrifugiranjem na 13000 rpm 30 min (centrifuga 5804, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Pranje DNK vršeno je 75 % etanolom. Nakon sušenja u vakuum uparivaču, plazmidna DNK je resuspendovana u bidestilovanoj vodi.

3.8.3. Metode izolacije velike količine plazmidne DNK iz *E. coli*

Velika količina plazmidne DNK iz *E. coli* izolovana je po proceduri proizvođača za "QIAGEN Plasmid Mini-Prep Kit " (Qiagen, Nemačka).

3.8.4. Metoda izolacije plazmidne DNK iz *Pseudomonas* sp. ATCC19151

Plazmidna DNK iz *Pseudomonas* sp. ATCC19151 izolovana je po modifikovanoj proceduri za "JETSTAR Plasmid Kit" (Genomed, GmbH). Čelije *Pseudomonas* sp. ATCC19151 iz prekončne kulture (3 ml) su taložene centrifugiranjem (1 min, 13000 rpm, centrifuga 5804, Eppendorf, Hamburg, Nemačka), a zatim resuspendovane u 200 µl rastvora za resuspendovanje ćelija (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, finalno pH 8,0) koji sadrži RNazu. Dobijena suspenzija je homogenizovana intenzivnim mešanjem, a zatim je dodato 200 µl rastvora za lizu ćelija (200 mM NaOH i 1 % SDS). Neutralizacija rastvora je izvršena dodavanjem 200 µl rastvora za neutralizaciju (3,1 M kalijum acetat, sirćetna kiselina, finalno pH 5,5), rastvor je intenzivno promešan i centrifugiran 10 min na 13000 rpm u centrifugi 5804 (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Supernatant je odlivan u nove tube i dodavano je 100 µl PCI smeše (fenol, hloroform, izoamil alkohol u zapreminskom odnosu 10 : 9 : 1). Smeša je intenzivno mešana i centrifugirana 7 min na

13000 rpm u centrifugi 5804 (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Vodena faza je prebacivana u čiste mikrotube i u nju su dodavani finalno 0,3 M Na-acetat i 2,5 zapremine hladnog etanola (96 %, -20°C). Posle inkubacije na -20°C (20 minuta) i centrifugiranja (20 minuta na 13000 rpm na 4°C u centrifugi 5804, Eppendorf, Hamburg, Nemačka), dobijeni talog je ispiran hladnim etanolom (75 %, -20°C), centrifugiran (5 minuta na 13000 rpm na 4°C u centrifugi 5804, Eppendorf, Hamburg, Nemačka), sušen i resuspendovan u bidestilovanoj vodi.

3.8.5. Elucija DNK fragmenata

Elucija DNK fragmenata dobijenih PCR metodom ili digestijom DNK restrikcionim enzimima iz agaroznog gela vršena je pomoću "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

3.9. Enzimske reakcije sa DNK

3.9.1. Sečenje restrikcionim enzimima

Sečenje restrikcionim endonukleazama (Sambrook et al., 1989) je rađeno u komercijalnim puferima u zavisnosti od korišćenih enzima. Uslovi za sečenje DNK restrikcionim enzimima kao što su količina enzima, pufer i temperatura inkubacije, određivani su prema savetu proizvođača.

3.9.2. Defosforilacija 5' slobodnih krajeva DNK fragmenata

Defosforilacija 5' slobodnih krajeva DNK fragmenata vršena je CIP ("calf intestinal phosphatase") fosfatazom (New England Biolabs, Ipswich, SAD) po uputstvu proizvođača: preparati DNK (1-20 ng) rastvoreni u 1 x NEB3 puferu inkubirani su sa 0,1 U enzima, 30 min na 37°C. Enzim je na kraju reakcije termički inaktiviran 15 min na 75°C.

3.9.3. Ligacija DNK fragmenata

Ligacija fragmenata DNK (Maniatis et al., 1982) je rađena tako što su DNK fragmenti sa komplementarnim lepljivim krajevima, u finalnoj količini od 200 ng, inkubirani 16 h na 16°C sa 1 U T4 DNK ligaze (MBI Fermentas, Litvanija) u ligacionom puferu (10 mM MgCl₂, 10 mM ditiotritol, 1 mM spermidin, 1 mM ATP, 100 µg/ml BSA, 50 mM Tris-HCl, finalno pH 7,4).

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

Umnožavanje *sdsA* i *sdsB* gena, intergenskog regiona kao i fragmenta *sdsBStul* PCR metodom je vršeno tako što je totalna DNK soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 (0,1 - 1 µg) pomešana sa 2,5 µl 10 x reakcionog pufera (0,5 M KCl, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,8, na 25°C, 0,8 % Nonidet P40), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 1,5 µl DMSO, smešom dNTP (svaki dNTP po 200 µM), prajmerima (svaki po 2,5 µM), 0,25 µl *Taq* polimeraze (MBI Fermentas, Litvanija, 5 U/µl) i bidestilovanom vodom do finalne zapremine od 25 µl. PCR je rađen po šemi prikazanoj u Tabeli 3.

Tabela 3. Šema reakcije PCR-a za fragmente alkil-sulfataznog operona

	Temperatura	Vreme	Faza reakcije
	95°C	5 min	Denaturacija dvolančane DNK
33 ciklusa PCR-a	95°C	1 min	Denaturacija
	53°C	0,5 min	Hibridizacija ("annealing")
	72°C	1,5 min	Elongacija
	72°C	10 min	Finalna elongacija

Umnožavanje PCR fragmenata holin-sulfataznog operona vršeno je tako što je totalna DNK soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 ili kozmidna DNK kozmida CS (0,1 - 1 µg) pomešana sa 2,5 µl 10 x reakcionog pufera (0,5 M KCl, 0,1M Tris-HCl, pH 8,8, na 25°C, 0.8 % Nonidet P40), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), smešom dNTP (svaki dNTP po 200 µM), prajmerima (svaki po 2,5 µM), 0.25 µl *Taq* polimeraze (MBI Fermentas, Litvanija, 5 U/µl) i bidestilovanom vodom do finalne zapremine od 25 µl. PCR je rađen po šemi prikazanoj u Tabeli 4.

Tabela 4. Šema reakcije PCR-a za fragmente holin-sulfataznog operona

	Temperatura	Vreme	Faza reakcije
	95°C	5 min	Denaturacija dvolančane DNK
30 ciklusa PCR-a	95°C	1 min	Denaturacija
	58°C	0,5 min	Hibridizacija ("annealing")
	72°C	1 min	Elongacija
	72°C	10 min	Finalna elongacija

Sekvence korišćenih prajmera date su u Tabeli 5. Pri svakom postavljanju PCR reakcije kao negativna kontrola korišćena je reakciona smeša koja je imala sve prethodno navedene sastojke osim DNK matrice.

Tabela 5. Sekvence prajmera za PCR korišćenih u ovom radu

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera
sdsA1	5'-GTGATGATCGAGGCGCCC-3'
sdsA2	5'-TTGGCAGGCGCCCTGCCC-3'
sdsB1	5'-CGCATGAAGGATCCTACGCCAGCTCCG-3'
sdsB2	5'-GCAGCGTGAAGCTTGCTCAGCGGG-3'
sdsBStul	5'-TTCATGTCGCGCTTGTCC-3'
sdsIF	5'-TCACGCTGTTGGCGAGG-3'
sdsIR	5'-GCCTGCATTGAAAGCTGG-3'
MbetCF	5'-CAAGATGCACTTCTGCGGC-3'
MbetCR	5'-ATGTATTCGCCCAGCACC-3'
betIF	5'-GTGCGCTTATCCATACCG-3'
betIR	5'-GGGAAATCTGCCATAAGAATC-3'
betRF	5'-CGGATCCCAGATTTCCCTGAC-3'
betRR	5'-CGTTTAAGCTTAGATCGCGAT-3'
Not5-1	5'-GTAGTCGATGAAATTGACG-3'
Not5-2	5'-CAGAGCTTCGCCTTCACC-3'

3.10. DNK-DNK hibridizacija

3.10.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane

U cilju potvrđivanja uspešne mutageneze gena u soju *Pseudomonas* sp. ATCC19151 korišćena je DNK-DNK hibridizacija. Totalna DNK, izolovana iz *Pseudomonas* sp. ATCC19151 i ispitivanih mutanata (*Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ sdsA, *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ sdsB, *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ betR, *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ betC), sećena je restrikcionim enzimima i razdvajana na 1 % agaroznom gelu. DNK je prenošena sa gela na najlonske membrane po metodi Southern-a (1975). Po završetku elektroforeze, agarozni gel je tretiran sa 0,25 M HCl tokom 15 min, da bi se ostvarilo delimično prekidanje molekula DNK uzrokovano depurinacijom. Gel je zatim ispiran u destilovanoj vodi, a denaturacija

DNK je vršena potapanjem gela 2 puta po 15 min u rastvor koji sadrži 0,5 M NaOH i 1,5 M NaCl (denaturacioni rastvor). Pre transfera gel je neutralisan u neutralizacionom puferu (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, finalno pH 7,5) inkubacijom 2 puta po 20 min. Za sledeću fazu eksperimenta pripremani su listovi Whatman 3 MM filter papira odgovarajućih dimenzija. Najlonska membrana (SensiBlotPlus Nylon Membrane, MBI Fermentas, Litvanija), na koju će DNK biti prenet, je potapana na kratko u 20 x SSC puferu (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-citrat, finalno pH 7,0). Dva lista 3 MM papira, veći od gela, su potapana u 20 x SSC pufer i slagana jedan na drugi. Na njih je stavljan tretiran gel, tako da je strana sa DNK bila okrenuta na gore, a oko gela su stavljeni graničnici. Preko gela je stavljena najlonska membrana dimenzija kao i sam gel i preko nje još dva 3 MM papira navlažena u 20 x SSC puferu. Pri stavljanju papira vođeno je računa da mehurići vazduha ne ostanu zarobljeni između papira. Na kraju je preko svega stavljen 10 cm debeo sloj upijajućeg papira i sve je ravnomerno opterećeno tegom od 1 kg. Transfer je vršen preko noći u 20 x SSC puferu.

Posle završenog transfera najlonska membrana je skinuta i dva puta potopljena u 5 x SSC pufer u trajanju od 5 min. Fiksiranje DNK za membranu je rađeno tako što je prosušena membrana stavljena između dva 3 MM papira i ostavljena 2 sata na temperaturi od 80°C u pećnici.

3.10.2. Obeležavanje DNK probe dioksigeninom

Specifične probe koje su korišćene u eksperimentima DNK-DNK hibridizacije obeležavane su „DIG DNA Labeling and Detection Kit” (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Nemačka). Ovaj protokol se bazira na hibridizaciji „random” oligonukleotida za denaturisanu DNK probu („random primed labeling”). Komplementarni lanac DNK sintetiše se pomoću Klenow-og enzima koji koristi 3'(OH) kraj „random” oligonukleotida kao prajmer i mešavine dezoksioligonukleotida sa dioksigeninom (DIG-11-dUTP) za produžavanje lanca DNK. DIG-11-dUTP se ugrađuje u novosintetisanu DNK na svakih 20-25 nukleotida. U 1 µg probe (PCR proizvod) je dodavana smeša koja se sastoji od: 2

μ l dNTP smeše za obeležavanje (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP i 0,65 mM dTTP i 0,35 mM DIG-11-dUTP pH 7,5), 2 μ l mešavine heksanukleotida (10 x koncentrisan) i Klenow enzim za obeležavanje (2 U/ μ l), a finalna zapremina do 15 μ l podešena je destilovanom vodom. Dobijena smeša je promešana, kratko centrifugirana i inkubirana preko noći na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 2 μ l 0,2 M EDTA (pH 8) i dobijena smeša je prečišćena od neinkorporisanih nukleotida precipitacijom 100 % etanolom. Pre hibridizacije proba je denaturisana kuvanjem 5 min na temperaturi od 100°C, a zatim prebačena na led do sledećeg koraka hibridizacije. Ovako je dobijena neradioaktivno obeležena proba.

3.10.3. Neradioaktivna DNK-DNK hibridizacija

Procedura za hibridizaciju DNK sa neradioaktivno obeleženom probom je bila sledeća: membrana je pakovana u najlonsku kesicu i inkubirana 1 sat na temperaturi od 62°C sa 10 ml hibridizacionog pufera (5 x SSC, 0,1% N-lauril sarkozil, 0,02 % SDS, 1 % kazein). Nakon toga, u kesicu je sipan 1 ml svežeg hibridizacionog pufera po cm² membrane u koji je prethodno dodata neradioaktivno obeležena i denaturisana proba. Hibridizacija je vršena preko noći (16 sati) na 62°C. Membrana je nakon hibridizacije oprana dva puta u rastvoru I (2 x SSC, 0,1 % SDS) na sobnoj temperaturi, a zatim dva puta oprana u rastvoru II (0.5 x SSC, 0,1 % SDS) na temperaturi od 65°C. Za detekciju DNK-DNK hibrida korišćen je „DIG DNA Labeling and Detection Kit” (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Nemačka). Proces detekcije uključio je:

- 1) vezivanje hibridizovane probe sa anti-dioksigenin-AP i Fab fragmentima konjugovanim sa alkalnom fosfatazom;
- 2) vizualizaciju sa kolorimetrijskim supstratima NBT/BCIP koji reaguju sa alkalnom fosfatazom.

Pranje membrane i detekcija hibrida su vršeni po uputstvu proizvođača (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Nemačka).

3.11. Konstrukcija kozmidne biblioteke soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151

Totalna DNK soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 tretirana je *Hind*III restrikcionim enzimom u različitim dužinama trajanja i nakon što su odabrani uzorci odgovarajućeg stepena digestije (20. i 30. minut) isti su ligirani sa pLAFR3 kozmidom prethodno sečenim *Hind*III restrikcionim enzimom i defosforilisanim. Nakon što je ligaciona smeša proverena na 1 % agaroznom gelu, urađene su reakcije pakovanja rekombinantnog lambda faga korišćenjem komercijalnog kita "Gigapack III Gold Packaging Extract" (Stratagene, Holandija). Tako dobijeni fazi su uvođeni u *E. coli* ćelije koje su zatim selektovane na tetraciklin (20 µg/ml). Broj dobijenih tetraciklin rezistentnih *E. coli* kolonija, koje nose pLAFR3 vektor sa *Hind*III fragmentima genoma *Pseudomonas* sp. ATCC19151 iznosio je 5×10^3 .

3.12. Transformacija *E. coli*

3.12.1. Priprema *E. coli* kompetentnih ćelija

Kompetentne *E. coli* ćelije su pripremane po modifikovanoj proceduri sa rubidijum hloridom (Hanahan, 1985). 100 ml LB medijuma inokulisano je jednom kolonijom na 10 ml medijuma i ćelije su gajene na 37°C, uz snažnu aeraciju na 180 rpm, do optičke gustine kulture od 0,4 na 600 nm. Rast bakterijske kulture zaustavljan je hlađenjem iste 15 min na ledu. Nakon inicijalnog hlađenja bakterije su obarane (25 ml kulture po tubi) iz medijuma 10 min na 5000 rpm, 4°C u centrifugi 5804R (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Supernatant je odlivan, a talog resuspendovan, laganim mešanjem, u 25 ml prethodno ohlađenog 0,1 M CaCl₂ i ostavljen na ledu 15 min. Ćelije su zatim ponovo obarane 10 min na 5000 rpm, 4°C u centrifugi 5804R (Eppendorf,

Hamburg, Nemačka), a talog je resuspendovan u 2 ml RF2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂·2H₂O, 15 % glicerol, finalno pH 6,8). Suspenzija ćelija deljena je u alikvote od po 200 µl, koji su naglo zamrznuti u tečnom azotu, a zatim čuvani na -80°C.

3.12.2. Transformacija kompetentnih *E. coli* ćelija temperaturnim šokom ("Heat shock")

Transformacija kompetentnih *E. coli* vršena je izlaganjem istih termičkom stresu u prisustvu DNK. Prilikom korišćenja, zamrznute ćelije su otapane na ledu. Suspenziji otopljenih ćelija dodavana je DNK (u zapremini do 20 µl, ukupne količine DNK ne više od 200 ng), a zatim je inkubirana 60 min na ledu. Nakon inkubacije ćelije su izlagane temperaturnom stresu u trajanju od 90 sekundi na 42°C, a zatim su odlagane 5 min na led. Ćelije su posttransformaciono oživljavane dodavanjem 300 µl neselektivnog LB medijuma i inkubiranjem uz intenzivnu aeraciju od 30 do 60 min na 37°C. Ćelije su zatim razmazivane na selektivne podloge i inkubirane na 37°C do pojave transformanata. Efikasnost transformacije bila je oko 10⁷ transformanata po µg DNK.

3.13. Konjugacija

Konjugacioni eksperimenti rađeni su na neselektivnim LA petri šoljama. Konjugacione smeše pravljene su mešanjem donora (*E. coli* DH5α), "helper"-a (*E. coli* 2013) i recipijenta (*Pseudomonas* sp. ATCC19151) i inkubirane preko noći na 30°C. Nakon inkubacije konjugaciona smeša striklovana je na selektivne LA petri šolje, sa odgovarajućim antibioticima, radi selekcije konjuganata.

3.14. Transformacija *Pseudomonas* sp. ATCC19151

3.14.1. Priprema *Pseudomonas* sp. ATCC19151 kompetentnih ćelija

Kompetentne *Pseudomonas* sp. ATCC19151 ćelije su pripremane na sledeći način. 10 ml LB medijuma inokulisano je sa 0,1 ml prekonoćne kulture i ćelije su gajene na 30°C, uz snažnu aeraciju na 180 rpm, do optičke gustine kulture od 0,4 na 600 nm. Rast bakterijske kulture zaustavljan je hlađenjem iste 15 min na ledu. Nakon inicijalnog hlađenja bakterije su obarane (10 ml kulture po tubi) iz medijuma 10 min na 5000 rpm, 4°C u centrifugi 5804R (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Supernatant je odlivan, a talog resuspendovan, laganim mešanjem, u 10 ml sterilnog, prethodno ohlađenog, 0,3 M rastvora saharoze i ostavljen na ledu 15 min. Prethodno navedeni postupak je ponovljen 2 x. Suspenzija ćelija u 0,3 M rastvora saharoze deljena je u alikvote od po 200 µl (ukupno 3) su korišćeni u transformaciji.

3.14.2. Elektrotransformacija kompetentnih *Pseudomonas* sp. ATCC19151 ćelija

Transformacija kompetentnih *Pseudomonas* sp. ATCC19151 ćelija vršena je tretiranjem istih sa strujnim impulsom napona 2,5 kV u kivetama 2 mm (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) u prisustvu DNK. Korišćene su samo sveže pripremljene kompetentne ćelije. Suspenziji ćelija dodavana je DNK (u zapremini do 20 µl, ukupne količine DNK ne više od 200 ng), a zatim je inkubirana 30 min na ledu. Nakon inkubacije ćelije su tretirane u elektroporator aparatu 2510 (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) strujnim impulsom napona 2,5 kV, a zatim su odlagane 5 min na led. Ćelije su posttransformaciono oživljavane dodavanjem 800 µl neselektivnog LB medijuma i inkubiranjem uz intenzivnu aeraciju od 30 do 60 min na 30°C. Ćelije su zatim

razmazivane na selektivne podloge i inkubirane na 30°C do pojave transformanata. Efikasnost transformacije bila je oko 10^3 transformanata po μg DNK.

3.15. Elektroforeza DNK

3.15.1. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Elektroforeza DNK rađena je na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani rastvaranjem agaroze u 1 x TAE puferu (40 mM Tris-acetat, 2 mM EDTA, finalno pH 8,0) i dodavanjem etidijum bromida (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Kao pufer za elektroforezu korišćen je 1 x TAE. Agarozni gelovi različitog procenta su korišćeni u zavisnosti od veličine fragmenata koje je trebalo razdvojiti. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela.

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

- "Gene-Ruler 100 bp DNA ladder" (MBI Fermentas, Litvanija): 10000 bp, 8000 bp, 6000 bp, 5000 bp, 4000 bp, 3500 bp, 3000 bp, 2500 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1200 bp, 1031 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp.

3.15.2. Vertikalna elektroforeza DNK na poliakrilamidnim gelovima

Razdvajanje fragmenata DNK obeleženih biotinom, kao i kompleksa DNK i proteina, vršeno je na nenedenaturišućim poliakrilamidnim gelovima (akrilamid :

poliakrilamid 19 : 1), koncentracije 4,5 %, u 0.5 x TBE puferu (100 mM Tris-boratni pufer pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0), pri konstantnoj struji 15 mA i voltaži od 110 V. Dimenzije gelova bile su 120 x 100 x 1,5 mm (Maniatis et al., 1982).

3.16. Izolacija i kvantifikacija His₆- obeleženih proteina iz *E. coli*

3.16.1. Nativna izolacija His₆-SdsB i His₆-BetR proteina iz *E. coli*

Izolacija SdsB i BetR proteina sa 6 x His vršena je iz 200 ml bakterijske kulture u logaritamskoj fazi rasta (po protokolu QIAGEN). U kulturu je, 2 h pre obaranja ćelija, dodavano 100 µl 1 M IPTG rastvora radi indukcije sinteze SdsB i BetR proteina. Ćelije su obarane 10 min na 5000 rpm, 4°C u centrifugi (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Talog je resuspendovan u 2 ml pufera za ćelijsku lizu (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, finalno pH 8,0) u koji je dodato 500 µl lizozima (1 mg/ml) i suspenzija je ostavljena 30 min na ledu. Nakon inkubacije na ledu suspenzija je sonifikovana 5 x 10 sekundi, a zatim propuššana kroz usku iglu radi oslobađanja preostale visokomolarne DNK i prenošena u čiste tube (svi koraci su rađeni na ledu). Nakon centrifugiranja 20 min na 13000 rpm na 4°C u centrifugi 5804 (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) supernatant je prenošen u nove tube, 20 µl je odvojeno za proveru na SDS-PAGE, dok je u ostatak dodato 1 ml NTA agaroze i smeša je inkubirana 1 h uz konstantno mešanje na 4°C. Smeša je nakon inkubacije nanošena na kolonu koja je zatim 3 x prana sa po 2 ml pufera za pranje (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, finalno pH 8,0). Uzorak je sa kolone eluiran u tri etape sa po 500 µl pufera za eluciju (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, finalno pH 8,0). Tako dobijeni eluat je korišćen u daljem radu.

3.16.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivana je Bradfordovim esejom (Bradford, 1976). Kao standard za pravljenje standardne krive korišćen je BSA protein poznatih koncentracija. Pripremano je nekoliko razblaženja proteinskog standarda u opsegu od 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 Coomassie brilliant blue G 250 rastvarano je u 50 ml 95 % etanola, tome je dodavano 100 ml 85 % H₃PO₄ i 50 ml ddH₂O, sve je filtrirano kroz filter papir i čuvano na 4°C.

3.16.3. SDS – poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Pri elektroforezi u prisustvu SDS-a proteini vezuju za sebe molekule deterdženta, postaju negativno naelektrisani i putuju ka anodi. Pređeni put kroz gel je funkcija njihovih molekulskih masa. SDS-PAGE je rađen prema metodi Laemmli-ja opisanoj 1970. Sam sistem čine dva gela različite koncentracije i različitog pH pufera: gel za razdvajanje (10-15 % akrilamid, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,001 % TEMED i 0,1 % amonijumpersulfat) i gel za koncentrisanje proteina (4 % akrilamid, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,001 % TEMED i 0,1 % amonijumpersulfat). Prvo se naliva gel za razdvajanje koji se ostavi da polimeriše između staklenih ploča, a zatim se nanosi i gel za koncentrovanje. Pufer za uzorak je sadržavao 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glicerol i 10 % β-merkaptioetanol. Uzorak je mešan sa puferom za uzorak u odnosu 1:1, denaturisan 10 min kuvanjem, a potom mu je dodavana indikatorska boja (0,05 % bromfenol plavo). Elektroforeza je rađena u puferu 0,025 M Tris pH 8,8, 0,192 M glicin, 0,1 % SDS, pri standardnim uslovima 10 mA, 90 V). Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini u gelovima su fiksirani i bojani rastvorom 0,025 % boje Coomassie

brilliant blue R-250 u 45 % metanolu i 10 % sirćetnoj kiselini 1-2 h uz lagano mućkanje. Odbojavanje je vršeno difuzijom u 15 % metanolu i 10 % sirćetnoj kiselini nekoliko sati ili do pojave vidljivih proteinskih traka. Potpuno obezbojavanje pozadine postizano je ispiranjem gela u destilovanoj vodi preko noći.

3.17. Interakcija DNK i proteina

3.17.1. Metoda usporene elektroforetske pokretljivosti ("Gel shift")

Metoda usporene elektroforetske pokretljivosti je jednostavna i osetljiva metoda za određivanje interakcija između proteina i DNK. Metoda je zasnovana na razdvajanju kompleksa protein-DNK i slobodne DNK u nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu. Kompleksi proteina i DNK se detektuju u vidu traka čija je elektroforetska pokretljivost manja u odnosu na slobodnu DNK. Metoda usporene elektroforetske pokretljivosti može se podeliti na dva dela:

- pripremanje i obeležavanje probe
- vezivanje proteina za DNK i određivanje smanjene elektroforetske pokretljivosti kompleksa protein-DNK.

3.17.2. Pripremanje i obeležavanje probe sa CTP-11-biotin obeleženim nukleotidom

Fragmenti intergenskog regiona gena *sdsA* i *sdsB*, kao i intergenskog regiona *betC* i *betR* gena su *Bam*HI-*Kpn*I restrikcionim enzimima isecani iz plazmida pBSSKsdsI i pBSSKbetI, ponaosob. Ovako dobijeni fragmenti, veličine 300 bp (pBSSKsdsI) i 100 bp (pBSSKbetI) su eluirani sa agaroznih gelova i obeležavani

ugradnjom CTP-11-biotina (biotin- ϵ -aminokaproil-[5-(3-aminoalil)-citidin-5'-trifosfat], Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Nemačka).

Obeležavanje je rađeno na *Bam*HI kraju fragmenata pomoću Klenow fragmenta DNK polimeraze I i CTP-11-biotina. U reakcije obeležavanja (finalno 20 μ l) dodavano je 1-2 pmol DNK fragmenta, 2 μ l 10 x Klenow pufera, ekvimolarna smeša dATP-a, dGTP-a, dTTP-a i CTP-11-biotin i 5 U Klenow fragmenta. Reakcija obeležavanja se odvijala 1 h na 37°C. Nakon inkubacije obeležene probe su propuštane kroz G50 kolone kako bi se oslobodile od neugrađenih CTP-11-biotin nukleotida.

3.17.3. Vezivanje proteina za DNK i određivanje smanjene elektroforetske pokretljivosti kompleksa protein-DNK

Vezivanje SdsB i BetR proteina za obeležene DNK fragmente se odvijalo u 10 μ l reakcione smeše koja je sadržavala 0-200 ng SdsB, odnosno 0-150 ng BetR, 2 ng obeleženog fragmenta, 0,4 μ g nespecifičnog kompetitora ("salmon sperm DNK"), 10 μ g BSA, 1 mM DTT, 1,5 mM MgCl₂ i 1 x pufer za vezivanje (20 mM HEPES-KOH, 20 % v/v glicerol, 0,2 mM EDTA, 0,1 M KCl, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT). U kompetitivnim esejima, neobeležene probe (intergenski region *sdsA* i *sdsB* gena, odnosno intergenski region *betC* i *betR* geni ponaosob) dodavane su u velikom molarnom višku (50 - 100 x) u odnosu na obeleženu probu. Reakciona smeša je zatim inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi pre nanošenja na gel. Formirani kompleksi proteina i DNK su razdvajani metodom zaostajanja na gelu, pri čemu su korišćeni 4 % nedenaturišući poliakrilamidni gelovi. Elektroforeza se odvijala na temperaturi od 4 - 8°C u 0.5 x TBE puferu pri jačini struje od 15 mA i voltaži od 110 V. Po završenoj elektroforezi detekcija je vršena "Biotin Luminescent Detection Kit"-om (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Nemačka).

3.17.4. Detekcija DNK fragmenata obeleženih CTP-11-biotinom

Transfer DNK fragmenata obeleženih biotinom i DNK-protein kompleksa na najlonsku membranu (SensiBlotPlus Nylon Membrane, MBI Fermentas, Litvanija) vršen je u "Semi-dry" aparatu (Fastblot B43, Biometra, Goettingen, Nemačka) na 300 mA 30 min u 1 x TBE puferu (100 mM Tris-boratni pufer pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0). Nakon transfera membrana je osušena, i ostavljena 2 h na 80°C u pećnici. U cilju izbegavanja nespecifičnih signala membrana je tokom noći potopljena u PBS puferu (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄, pH 7,4 na 1 l vode) sa 5 % mlekom u prahu. DNK fragmenti obeleženi CTP-11-biotinom detektovani su "Biotin Luminescent Detection Kit"-om (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

3.18. β - galaktozidazni esej

Enzim β – galaktozidaza je korišćena kao reporter molekul za merenje aktivnosti transkripcionih fuzija korišćenih u ovom radu. Esej je rađen tako što je 100 μ l preonoćne kulture *Pseudomonas* sp. ATCC19151 (gajene u LB medijumu ili M9 minimalnom medijumu sa dodatkom citrata, holin sulfata, betaina ili holina pojedinačno ili u kombinaciji, kao jedinih izvora ugljenika) diluirano u 500 μ l Z-pufera (60 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 40 mM NaH₂PO₄·H₂O, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄·7H₂O, 50 mM β -merkaptotanol), a zatim je dodato 20 μ l 0.05 % SDS-a i 20 μ l hloroforma. Smeša je intenzivno mešana 30 sekundi, a zatim inkubirana 10 min na 30°C. Po isteku inkubacije reakcija je otpočinjana dodavanjem 100 μ l ONPG (4 mg/ml), a zatim nakon 5 min (kada je aktivnost merena u LB medijumu), odnosno 45 min (kada je aktivnost merena u M9 minimalnom medijumu) prekidana dodavanjem 250 μ l 1M Na₂CO₃. U cilju određivanja inducibilnosti divergentnog promotora *sdsA* i *sdsB* gena u LB medijum kulture u logaritamskoj fazi rasta (OD_{600nm} = 1) dodavan je SDS (finalno 0,5 %). Aktivnost

promotora je zatim praćena u kratkim vremenskim intervalima (2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min i 60 min).

U cilju određivanja inducibilnosti divergentnog promotora *betC* i *betR* gena osmotskim stresom, kulture su gajene u M9 minimalnom medijumu sa citratom (0,2 %) uz dodatak 0,4 M, 0,5 M ili 0,6 M NaCl. Aktivnost promotora je zatim praćena nakon 24 h i poređena sa aktivnošću u citratu.

Optiãka gustina uzoraka β – galaktozidaznog eseja merena je na 420 nm, a aktivnost β – galaktozidaze izražavana je u Miller jedinicama (Miller, 1972). Konaãne tabelarne vrednosti dobijene su kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta.

3.19. Sekvenciranje dvolanãane DNK

DNK fragmenti korišćeni u ovom radu su sekvencirani uslužno u centru za sekvenciranje Macrogen, Seoul, Južna Koreja.

3.20. Kompjuterska analiza

Poređenja nukleotidnih i aminokiselinskih sekvenci gena i proteina analiziranih u ovom radu, rađena su korišćenjem baze podataka "National Health Institute NCBI" pomoću BLAST programa (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) i korišćenjem "ClustalW2" softvera (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Određivanja otvorenih okvira čitanja vršena su pomoću "DNA Strider" programa. Potencijalni transmembranski domeni proteina određivani su pomoću "DAS - Transmembrane Prediction" servera (Aravind i Koonin, 2000).

4. REZULTATI

4.1. Funkcionalna analiza *sdsA* i *sdsB* gena soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151

4.1.1. Osetljivost na antibiotike soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151

Minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika (MIK) za soj *Pseudomonas* sp. ATCC19151 su određivane metodom mikrodilucije u LB medijumu (Materijal i metode, poglavlje 3.6.). Kao MIK je definisana najniža koncentracija antibiotika koja nakon 24 h u potpunosti inhibira rast soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151. Dobijeni rezultati predstavljeni su u Tabeli 5.

Tabela 5. Osetljivost na antibiotike soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151

Antibiotik	MIK (mg/L)	MIK za <i>Pseudomonas</i> sp. (mg/L) ^a
Ampicilin	>4000	≥16
Tetraciklin	4	≥2
Kanamicin	≤4	≥8
Hloramfenikol	≥32	≥16
Vankomicin	≥32	ND
Tobramicin	8	≥4
Nalidiksična kiselina	200	≥32
Amikacin	≤4	≥8
Gentamicin	8	≥4

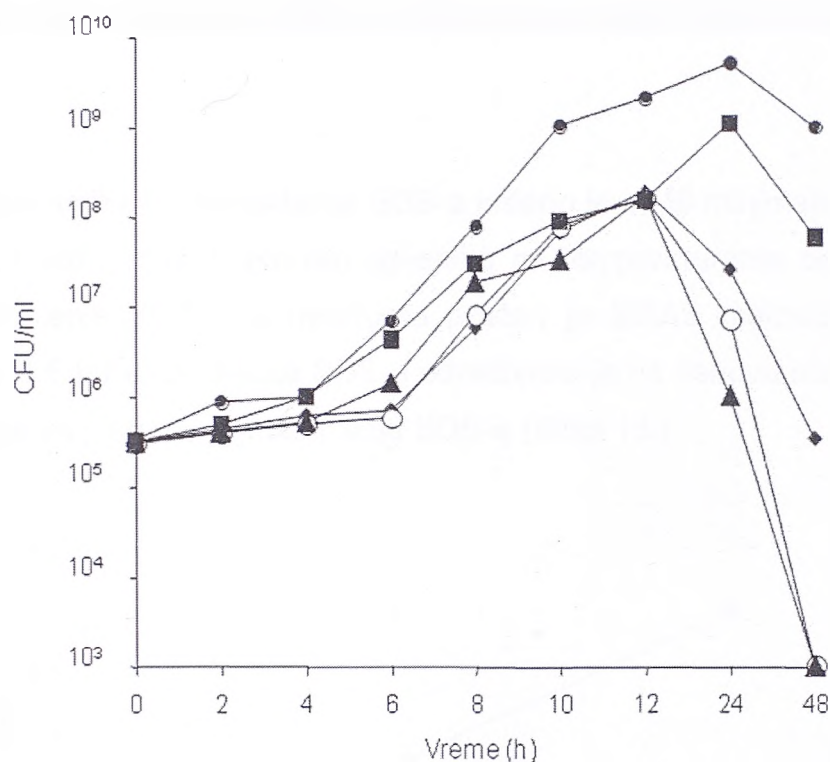
^a- definisano od strane "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)"; ND – nije definisano

MIK vrednosti za ampicilin, tetraciklin, hloramfenikol, tobramicin, nalidiksičnu kiselinu i gentamicin nalaze se u okviru vredosti definisanih od strane "EUCAST" ("European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing"), dok su vrednosti za kanamicin i amikacin niže od onih koje su definisane kao prosečne za većinu pseudomonada. Uopšteno govoreći soj *Pseudomonas* sp. ATCC19151 ne pokazuje visok stepen rezistencije na antibiotike, ukoliko se njegovi MIK rezultati uporede sa ostalim predstavnicima roda *Pseudomonas*.

Određivanje MIK vrednosti za navedene antibiotike omogućile su odabir vektora, na osnovu rezistencija koje nose, koji su korišćeni u daljim genetičkim manipulacijama ovim sojem.

4.1.2. Rast soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u prisustvu SDS-a kao jedinog izvora ugljenika

U cilju određivanja krive rasta soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u prisustvu alkil sulfata kao jedinog izvora ugljenika korišćen je M9 minimalni medijum sa različitim koncentracijama SDS-a (0,5 %, 0,75 %, 1 %) i rast je praćen tokom 48 h. Takođe, određivana je i kriva rasta soja u LB medijumu kao i M9 minimalnom medijumu sa dodatkom glukoze (0,2 % finalno) (Materijal i metode, poglavlje 3.4.). Dobljeni rezultati izraženi su kao CFU/ml (Slika 12.)

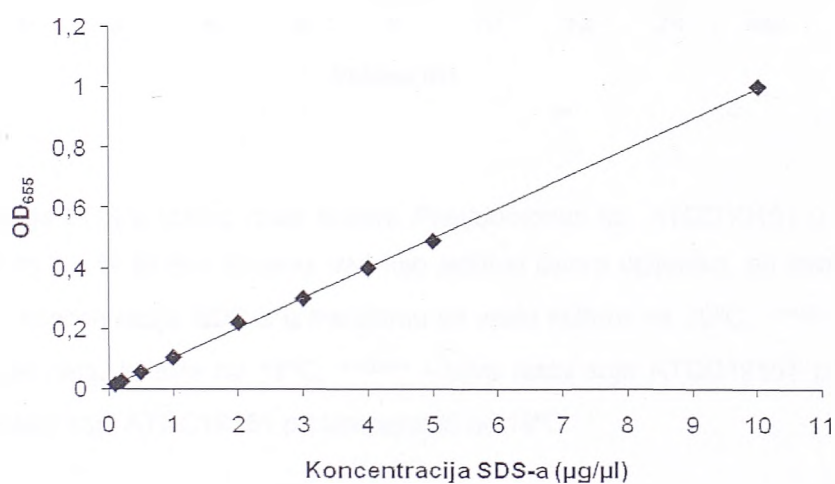


Slika 12. Krive rasta soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u bogatom LB medijumu i M9 minimalnom medijumu sa glukozom ili tri različite koncentracije SDS-a, pojedinačno, kao jedinih izvora ugljenika. ● - LB medijum, ■ - M9 + 0,2 % glukoza, ◆ - M9 + 0,5 % SDS, ○ - M9 + 0,75 % SDS, ▲ - M9 + 1 % SDS.

Nakon određivanja broja ćelija uočljivo je da je rast sporiji u minimalnom medijumu sa SDS-om nego u istom medijumu sa glukozom, i da kultura gajena u prisustvu SDS-a ranije ulazi u stacionarnu fazu (12-ti sat u odnosu na 24-ti sat u prisustvu glukoze). Takođe, uočeno je formiranje ćelijskih agregata i povećanje viskoznosti medijuma sa bakterijskom kulturom u toku svih faza rasta u prisustvu SDS-a. Ponovljenim inokulacijama u M9 minimalni medijum sa rastućim koncentracijama SDS-a dobijen je rast soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u prisustvu čak 4 % SDS-a (rezultati nisu prikazani).

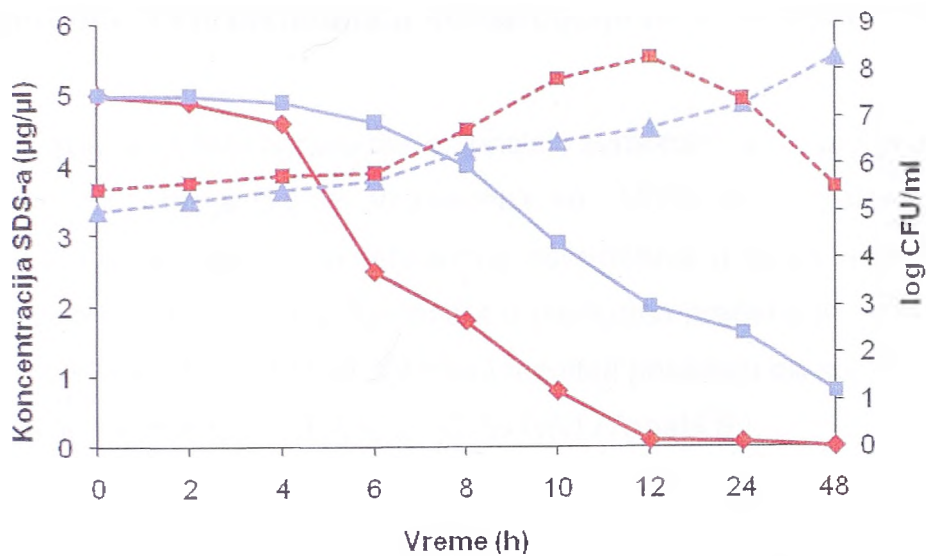
4.1.3. Dinamika biodegradacije SDS-a tokom rasta soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151

Testiranje dinamike biodegradacije SDS-a vršeno je u M9 minimalnom medijumu sa 0,5 % SDS-om kao jedinim izvorom ugljenika pri temperaturama od 18°C i 30°C tokom 48 h. Smanjenje SDS-a iz medijuma praćen je MBAS metodom (Materijal i metode, poglavlje 3.5.). Koncentracija SDS-a određivana je na osnovu standardne krive prethodno dobijene za poznate koncentracije SDS-a (Slika 13.).



Slika 13. Standardna kriva za određivanje koncentracije SDS-a.

Dobijeni rezultati ukazuju da je smanjenje koncentracije SDS-a u medijumu u korelaciji sa rastom bakterijske kulture (Slika 14.).



Slika 14. Biodegradacija SDS-a tokom rasta kulture *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u M9 minimalnom medijumu sa dodatkom 0,5 % SDS-a (finalno, v/v) kao jedinog izvora ugljenika, pri temperaturi rasta od 30°C i 18°C. —◆— - koncentracija SDS-a u medijumu pri rastu kulture na 30°C, —■— - koncentracija SDS-a u medijumu pri rastu kulture na 18°C, - -■- - kriva rasta soja ATCC19151 pri temperaturi od 30°C, - -▲- - kriva rasta soja ATCC19151 pri temperaturi od 18°C.

Biodegradacija SDS-a je intenzivnija prilikom rasta kulture *Pseudomonas* sp. ATCC19151 na 30°C u poređenju sa onom prilikom rasta na 18°C, što je odraz bržeg rasta kulture u povoljnijim uslovima (temperatura od 30°C). Zajedničko za biodegradaciju na obe analizirane temperature je to što se značajniji pad koncentracije SDS-a beleži tokom logaritamske faze rasta u toku koje dolazi do degradacije oko 80 % SDS-a prisutnog u medijumu. Osim toga sposobnost biodegradacije SDS-a na 18°C ukazuje na moguću primenu ovog soja u bioremedijaciji staništa zagađenih anjonskim surfaktantima.

4.1.4. Rast soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 i dinamika biodegradacije ukupnih anjonskih surfaktanata u komercijalnom deterdžentu "Fairy"

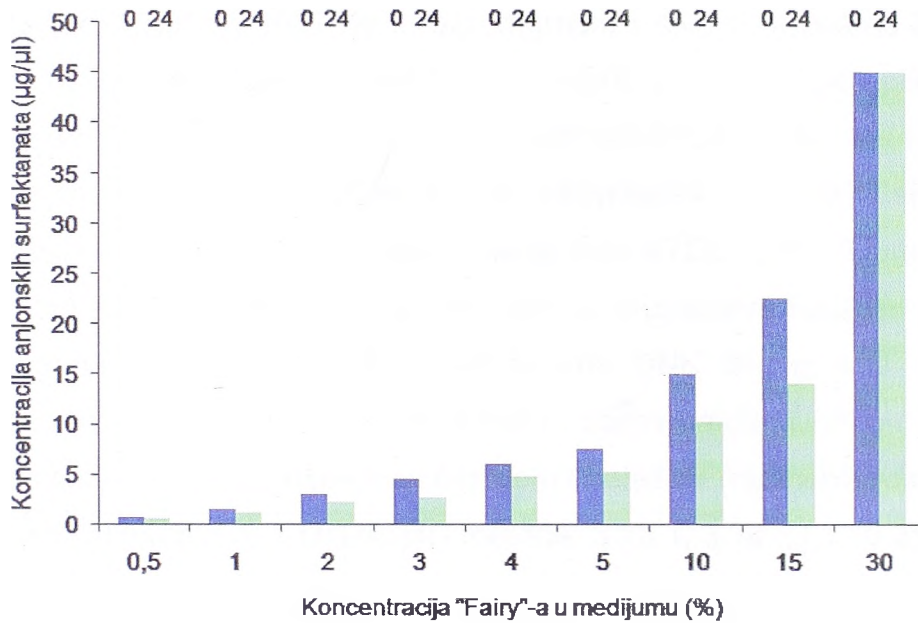
U cilju praćenja biodegradacije anjonskih surfaktanata u sastavu komercijalnih deterdžentskih formulacija soj *Pseudomonas* sp. ATCC19151 gajen je u prisustvu "Fairy"-a, najčešće korišćenog komercijalnog deterdženta u domaćinstvima na teritoriji Srbije. Koncentracija anjonskih surfaktanata u medijumu praćena je MBAS metodom, a broj ćelija određivan je kao CFU/ml. Dobijeni rezultati pokazuju da soj ATCC19151 raste na koncentracijama "Fairy"-a od 0,5 % - 15 % (v/v) (Tabela 6.).

Tabela 6. Broj ćelija *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u medijumu sa različitim koncentracijama "Fairy"-a

% "Fairy"-a u medijumu	0 h (CFU/ml)	24 h (CFU/ml)
0,5 %	10^5	13×10^8
1 %	10^5	27×10^8
2 %	10^5	36×10^8
3 %	10^5	40×10^8
4 %	10^5	40×10^8
5 %	10^5	15×10^8
10 %	10^5	9×10^6
15 %	10^5	3×10^6
30 %	10^5	0

Takođe, pokazano je da je tokom 24 h rasta degradovano u proseku oko 35 % ukupnih anjonskih surfaktanata (Slika 15.) iz medijuma. Dobijeni rezultat verovatno znači da u okviru anjonskih surfaktanata "Fairy"-a, alkil sulfati (kao što je SDS) koji su supstrat SdsA alkil sulfataze, čine oko trećinu prisutnih, dok ostale dve trećine verovatno čine anjonski surfaktanti koji nisu supstrat za SdsA protein ili su nerazgradivi (granati anjonski surfaktanti). Navedenim eksperimentom pokazana je sposobnost rasta

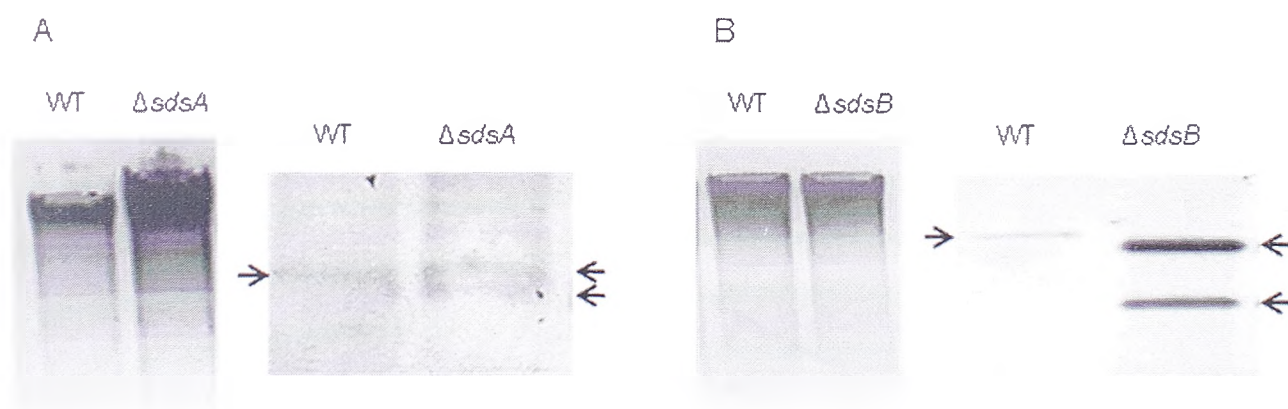
soja ATCC19151 na visokim koncentracijama deterdženata, višim od onih koje su prisutne u otpadnim vodama ili zagađenim ekosistemima vodotokova ili zemljišta.



Slika 15. Biodegradacija anjonskih surfaktanata tokom rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u M9 minimalnom medijumu sa dodatkom različitih koncentracija komercijalnog deterdženta "Fairy" kao jedinog izvora ugljenika. 0 – početna koncentracija ukupnih anjonskih surfaktanata, 24 – koncentracija anjonskih surfaktanata nakon 24 h rasta kulture *Pseudomonas* sp. ATCC19151.

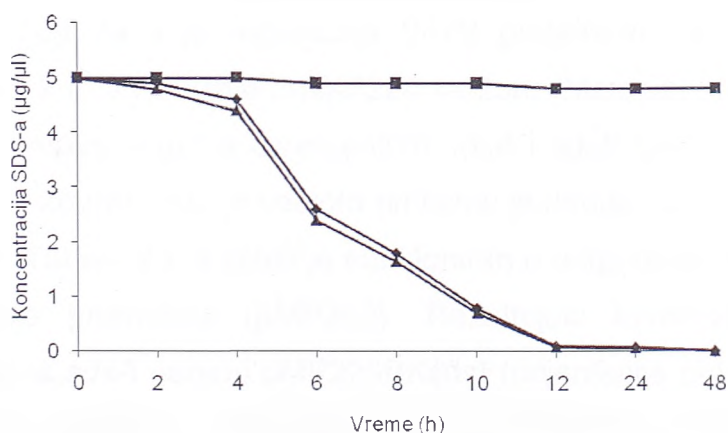
4.1.5. Mutageneza *sdsA* i *sdsB* gena

U cilju određivanja funkcije *sdsA* i *sdsB* gena, odnosno njihove uloge u biodegradaciji alkil sulfata urađena je njihova mutageneza. Fragmenti (*Sall* DNK fragment *sdsA* gena dužine 1017 bp i *TaqI* fragment *sdsB* gena dužine 286 bp, Prilog 1.) klonirani su u pBluescriptSK vektor i dobijeni su rezultujući pBSSKM*sdsA* i pBSSKM*sdsB* konstrukti. Subkloniranjem u "suicid" pKNOCK vektor koji se ne replikuje u pseudomonadama dobijeni su konstrukti pKNM*sdsA* i pKNM*sdsB* kojima su, ponaosob, elektroporacijom transformisane ćelije soja ATCC19151 (Materijal i metode, 3.14.2). Dobijeni elektrotransformanti selektovani su u prisustvu kanamicina, a zatim je narušavanje gena provereno hibridizacijom totalne DNK divljeg soja ATCC19151 i mutanata tretirane *HindIII* restrikcionim enzimom i odgovarajuće DNK probe (Slika 16.). Kao probe u hibridizacijama korišćeni su biotinom obeleženi fragmenti *sdsA* i *sdsB* gena koji su korišćeni i u mutagenezi (Materijal i metode, 3.10.1, 3.10.2 i 3.10.3).



Slika 16. A - Neradioaktivna DNK-DNK hibridizacija totalne DNK *Pseudomonas* sp. ATCC19151 i *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta sdsA$ sečenih sa *HindIII*, kao proba korišćen je *Sall* fragment *sdsA* gena. B – Neradioaktivna DNK-DNK hibridizacija totalne DNK *Pseudomonas* sp. ATCC19151 i *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta sdsB$ sečenih sa *HindIII*, kao proba korišćen je *TaqI* fragment *sdsB* gena. WT – totalna DNK *Pseudomonas* sp. ATCC19151, $\Delta sdsA$ - totalna DNK *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta sdsA$, $\Delta sdsB$ - totalna DNK *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta sdsB$.

Radi potvrđivanja funkcije *sdsA* gena u soju *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *sdsA* urađen je eksperiment komplementacije za alkil sulfataznu aktivnost uvođenjem konstrukta pMP77*sdsO* koji nosi *sdsA* i *sdsB* gen (Materijal i metode, Tabela 2.). pMP77*sdsO* dobijen je ligacijom *Bam*HI-*Xba*I fragmenta pBSKS*sdsO* konstrukta i pMP77 vektora prethodno sečenog *Bgl*II i *Xba*I enzimima. pBSKS*sdsO* konstrukt prethodno je dobijen ligacijom pBSKSEI*sdsA* vektora tretiranog *Hind*III i *Stu*I restrikcionim endonukleazama sa *Hind*III-*Stu*I fragmentom pGEM*sdsBStu* konstrukta (Materijal i metode, Tabela 2.). pMP77*sdsO* je elektroporacijom uveden u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *sdsA* nakon čega su transformanti selektovani u prisustvu kanamicina i hloramfenikola. Tako dobijeni *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *sdsA* komplementiran za alkil sulfataznu aktivnost uvođenjem pMP77*sdsO*, testiran je zajedno sa divljim sojem i nekomplementiranim *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *sdsA* na sposobnost rasta na SDS-u kao jedinom izvoru ugljenika u M9 minimalnom medijumu. Rezultati MBAS metode kojom je praćen utrošak SDS-a iz medijuma prikazani su na slici 17.



Slika 17. Biodegradacija SDS-a tokom rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151, *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *sdsA* i *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *sdsA* komplementiranog sa pMP77*sdsO* u M9 minimalnom medijumu sa dodatkom 0,5 % SDS-a (finalno, v/v) kao jedinog izvora ugljenika. —◆— - koncentracija SDS-a tokom rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151, —■— - koncentracija SDS-a tokom rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *sdsA*, —▲— - koncentracija SDS-a tokom rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *sdsA* komplementiranog sa pMP77*sdsO*.

Pseudomonas sp. ATCC19151 Δ *sdsA* nije rastao u M9 minimalnom medijumu u prisustvu 0,5 % SDS-a, što je i očekivano s obzirom na nepostojanje aktivne alkil sulfataze, te u skladu s tim nije došlo do značajnije promene koncentracije SDS-a tokom 48 h nakon inokulacije. *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *sdsA* koji je nosio pMP77*sdsO* konstrukt, ispoljio je alkil sulfataznu aktivnost koja je bila približna vrednosti dobijenoj za divlji soj (Slika 17.). *Pseudomonas* sp. ATCC19151 koji je nosio mutirani *sdsB* gen pokazivao je slab rast na SDS-u kao izvoru ugljenika, ali uvođenje konstrukta pMP77*sdsO* nije rezultiralo komplementacijom alkil sulfatazne aktivnosti do nivoa izmerenog u divljem soju, kao što je bio slučaj sa *sdsA* mutantom.

Prethodnim eksperimentom je nedvosmisleno potvrđena uloga *sdsA* gena u biodegradaciji alkil sulfata.

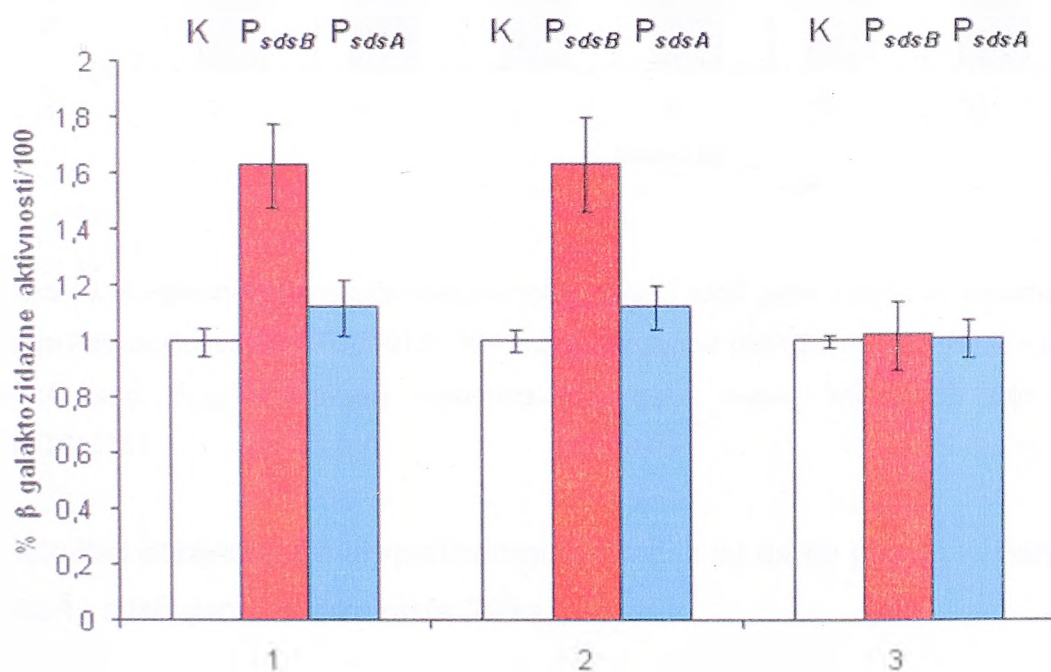
4.1.6. Analiza aktivnosti promotora *sdsA* i *sdsB* gena

Da bi se utvrdilo da li je genska ekspresija sa promotora *sdsA* i *sdsB* gena regulisana, i ako jeste da li je regulisana SdsB proteinom na nivou transkripcije, konstruisane su transkripcione fuzije u pMP220 vektoru (Materijal i metode, Tabela 2.). PCR produkt intergenskog regiona divergentnih *sdsA* i *sdsB* gena kloniran je najpre u *Sma*I restrikciono mesto pBluescript vektora pri čemu je dobijen konstrukt pBSSK*sdsI* (Materijal i metode, Tabela 2.), a zatim je subkloniran u odgovarajućim orijentacijama u vektor za kloniranje promotora (pMP220). Rezultujući konstrukti pMP220KX*sdsI* (orijentacija promotora *sdsA* gena) i pMP220BK*sdsI* (orijentacija promotora *sdsB* gena) elektroporacijom su uvedeni u *Pseudomonas* sp. ATCC19151, *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *sdsA* i *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *sdsB*.

β - galaktozidazna aktivnost transkripcionih fuzija koje nose promotorske regione P_{sdsA} (pMP220KX*sdsI*) i P_{sdsB} (pMP220BK*sdsI*) i pMP220 vektora koji je korišćen kao kontrolni merena je u *Pseudomonas* sp. ATCC19151, *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *sdsA* i *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *sdsB* nakon 18 h od inokulacije.

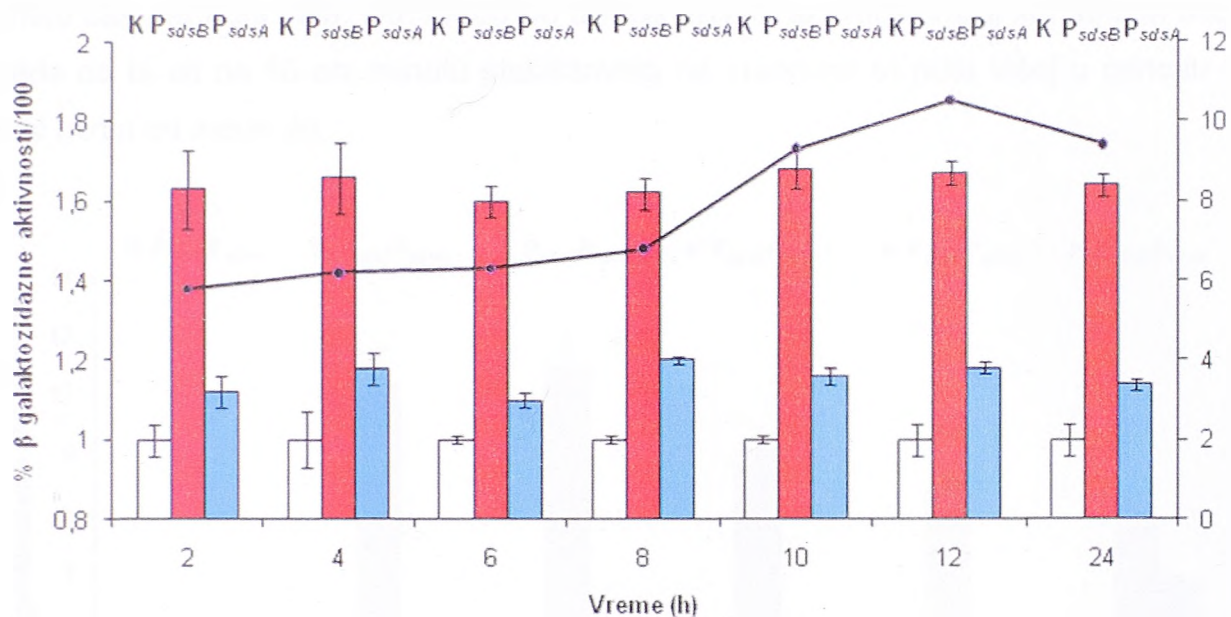
Dobijeni rezultati za transkripcione fuzije izraženi su u odnosu na aktivnost pMP220 vektora koja je uzeta kao 100 % (Slika 18.).

Smanjenje β - galaktozidazne aktivnosti P_{sdsA} i P_{sdsB} u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta sdsB$ ukazuje na postojanje pozitivne regulacije ekspresije *sdsA* i *sdsB* gena SdsB transkripcionim regulatorom, ali na osnovu dobijenih rezultata baziranih samo na aktivnostima promotora merenih preko β -galaktozidaznih aktivnosti, ne može da se tvrdi da li je regulacija direktna ili indirektna.



Slika 18. β - galaktozidazna aktivnost promotora *sdsA* i *sdsB* gena u pMP220 vektoru, analizirana u: 1. *Pseudomonas* sp. ATCC19151, 2. *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta sdsA$ i 3. *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta sdsB$. K – bazična aktivnost pMP220 vektora, P_{sdsA} – aktivnost promotora *sdsA* gena, P_{sdsB} – aktivnost promotora *sdsB* gena.

U cilju utvrđivanja zavisnosti aktivnosti promotora *sdsA* i *sdsB* gena od faze rasta bakterijske kulture, praćena je β - galaktozidazna aktivnosti P_{sdsA} i P_{sdsB} konstrukata u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 tokom 24 h na svaka 2 h.



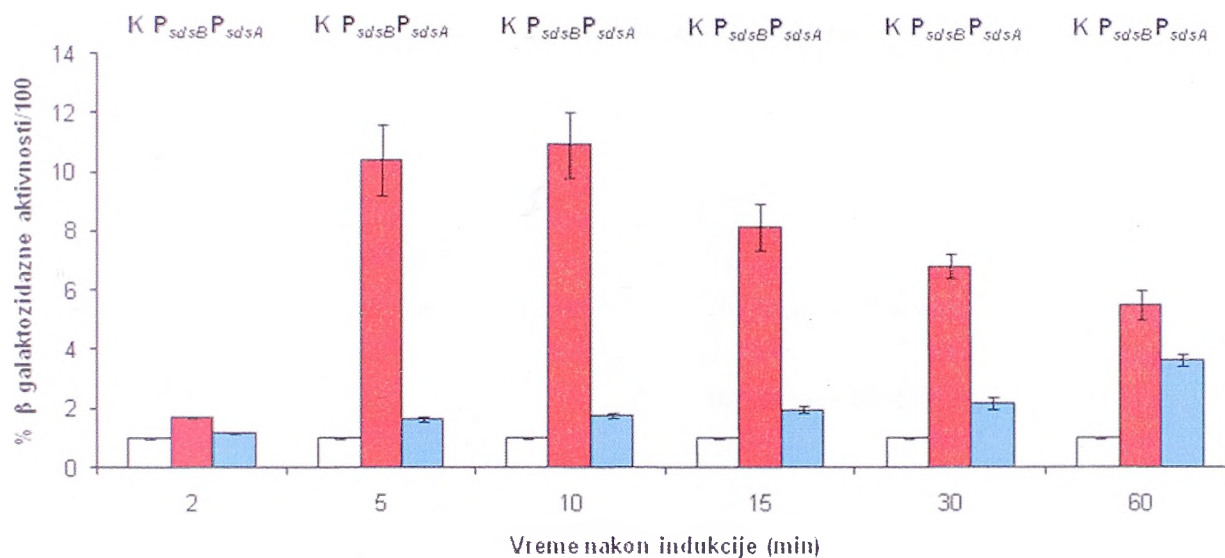
Slika 19. β - galaktozidazna aktivnost promotora *sdsA* i *sdsB* gena u pMP220 vektoru, analizirana tokom rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151. K – bazična aktivnost pMP220 vektora, P_{sdsA} – aktivnost promotora *sdsA* gena, P_{sdsB} – aktivnost promotora *sdsB* gena; —●— kriva rasta soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151.

Rezultati dobijeni ovim eksperimentom pokazali su da ne postoji zavisnost transkripcije *sdsA* i *sdsB* gena od faze rasta (Slika 19.).

4.1.7. Inducibilnost aktivnosti promotora *sdsA* i *sdsB* gena

S obzirom da je prethodno utvrđeno da ekspresija *sdsA* i *sdsB* gena u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 ne zavisi od faze rasta (Rezultati, 4.4.) ispitivana je β - galaktozidazna aktivnosti P_{sdsA} i P_{sdsB} konstrukata u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 nakon dodavanja SDS-a (0,5 % finalno, v/v) u LB medijum u kojem je vršena kultivacija. Aktivnost je praćena 2, 5, 10, 15, 30 i 60 min nakon indukcije. 2 min od indukcije nije primećena razlika u aktivnosti u odnosu na aktivnost izmerenu u LB medijumu bez dodatka SDS-a (Slika 19. i Slika 20.). U petom minutu nakon indukcije β -galaktozidazna

aktivnosti P_{sdsB} konstrukta raste 4,5 puta u odnosu na drugi minut, dok je u desetom minutu čak pet puta viša. Od 15-tog do 60-tog minuta aktivnost P_{sdsB} konstrukta blago opada da bi se na 60-om minutu stabilizovala na vrednosti tri puta višoj u odnosu na drugi minut od indukcije.



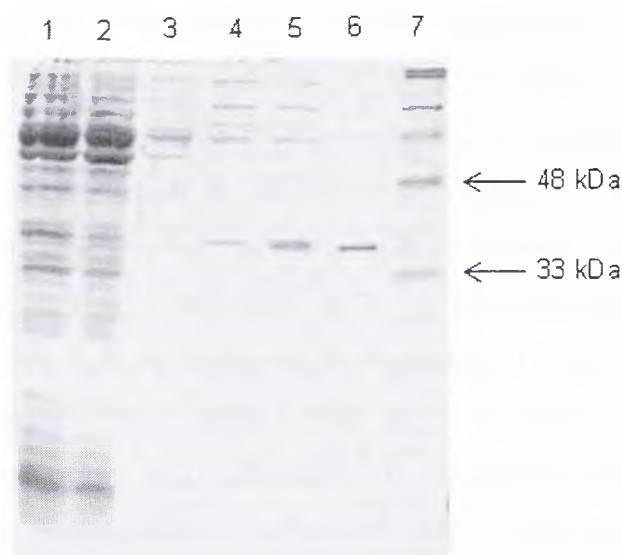
Slika 20. β - galaktozidazna aktivnost promotora *sdsA* i *sdsB* gena u pMP220 vektoru, analizirana u LB medijumu nakon indukcije sa 0,5 % SDS-om (finalno, v/v). K – bazična aktivnost pMP220 vektora, P_{sdsA} – aktivnost promotora *sdsA* gena, P_{sdsB} – aktivnost promotora *sdsB* gena.

Aktivnost P_{sdsA} blago raste do 10. minuta od indukcije, da bi počevši od 15. minuta brže rasla, te dostigla skoro četiri puta višu vrednost aktivnosti u 60-om minutu u odnosu na drugi minut (Slika 20.).

Dobijeni rezultati ukazuju na to da nakon indukcije prvo dolazi do značajne aktivacije *sdsB* gena (regulatora), usled prisustva inducera, čiji proteinski produkt zatim aktivira transkripciju *sdsA* gena (efektora).

4.1.8. Ekspresija SdsB proteina

PCR fragment koji sadrži *sdsB* gen korišćen je za ekspresiju SdsB proteina subkloniran je iz pBSSK*sdsB* konstrukta (*Bam*HI-*Hind*III) u pQE32 komercijalni vektor za ekspresiju proteina. Dobijenim plazmidom su transformisane *E. coli* M15 ćelije.

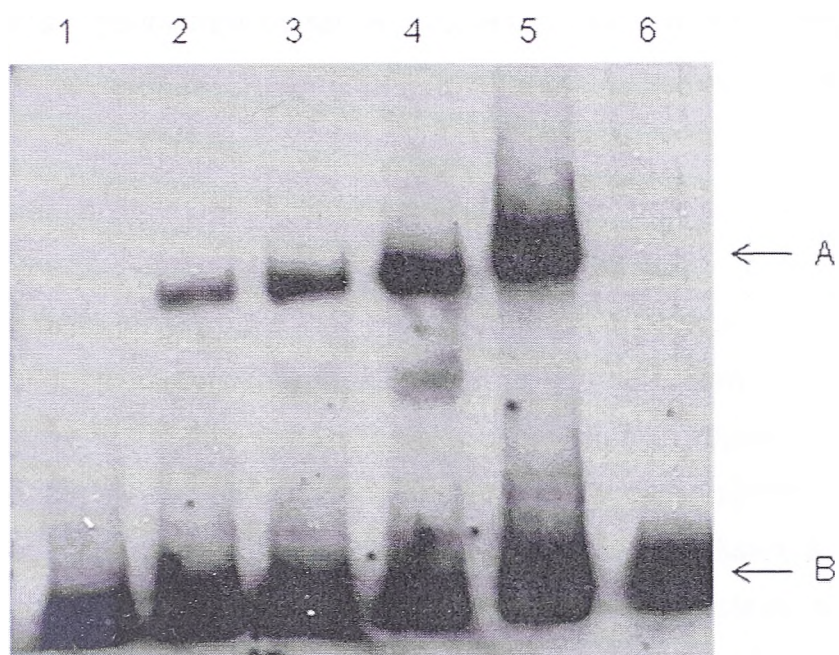


Slika 21. Ekspresija rekombinantnog His₆-obebeženog SdsB proteina. 1. proteini koji se nisu vezali za NTA agarozu, 2. proteini dobijeni prvim pranjem kolone, 3. proteini dobijeni drugim pranjem kolone, 4. proteini dobijeni nakon prve elucije, 5. proteini dobijeni nakon druge elucije, 6. proteini dobijeni nakon treće elucije, 7. "Prestained protein marker broad range" Biolabs.

Rekombinantni His₆-SdsB protein nakon indukcije IPTG-em prečišćen je iz *E. coli* M15 (Materijal i metode, 3.16.1) i proteinski eluat dobijen nakon treće elucije proteina sa NTA agaroze (Slika 21.) korišćen je u reakcijama interakcije sa biotinom obebeženim promotorskim regionom *sdsA* i *sdsB* gena. Koncentracija proteina u eluatu određivana je Bradfordovim esejom (Materijal i metode, 3.16.2.).

4.1.9. Interakcija promotorskog regiona divergentnih *sdsA* i *sdsB* gena sa SdsB regulatorom

Intergenski region divergentnih *sdsA* i *sdsB* gena, umnožen je PCR-om i kloniran u pBluescript pri čemu je dobijen konstrukt pBSSKsdsl (Materijal i metode, Tabela 2.), a zatim je tretmanom *Bam*HI i *Hind*III enzimima dobijen fragment koji je dalje u reakciji sa Klenow fragmentom DNK polimeraze obeležen biotinom. Obeležavanje biotinom zasnivalo se na uvođenju jednog obeleženog CTP-11-biotin molekula po fragmentu intergenskog regiona (CTP je uvođen pri popunjavanju 5' produženog kraja koje nastaje *Bam*HI digestijom, Materijal i metode, 3.17.2) Ovako dobijeni obeleženi DNK fragment korišćen je u reakcijama vezivanja (vidi Materijal i metode) sa rekombinantnim SdsB proteinom (koncentracije 0, 50, 100, 150 i 200 ng). Koncentracija SdsB proteina od 50 ng bila je dovoljna da se formira jasno vidljiv kompleks DNK - protein, dok je sa višim koncentracijama proteina (100, 150 i 200 ng) dobijeno pojačavanje intenziteta kompleksa u poliakrilamidnom gelu (Slika 22.). U reakcijama kompeticije sa fragmentom DNK koji je sadržao neobeleženi intergenski region (isti fragment korišćen je za obeležavanje) dodatog u 100 x molarnom višku, sa obeleženom probom došlo je do gubljenja kompleksa obeležene DNK - SdsB. Na osnovu dobijenih rezultata može se tvrditi da se SdsB transkripcioni regulator specifično vezuje za intergenski region *sdsA* i *sdsB* gena.



Slika 22. Specifično vezivanje SdsB proteina za promotor divergentnih *sdsA* i *sdsB* gena. 1. Proba - CTP-11-biotin obeležen promotor *sdsA* i *sdsB* gena; 2. Vezivanje obeležene probe sa 50 ng SdsB proteina; 3. Vezivanje sa 100 ng SdsB proteina; 4. Vezivanje sa 150 ng SdsB proteina; 5. Vezivanje sa 200 ng SdsB proteina 6. Hlađenje neobeleženom DNK (promotorom *sdsA* i *sdsB* gena u 100 x molarnom višku); A – kompleks CTP-11-biotin DNK –SdsB; B – slobodna biotinom obeležena proba.

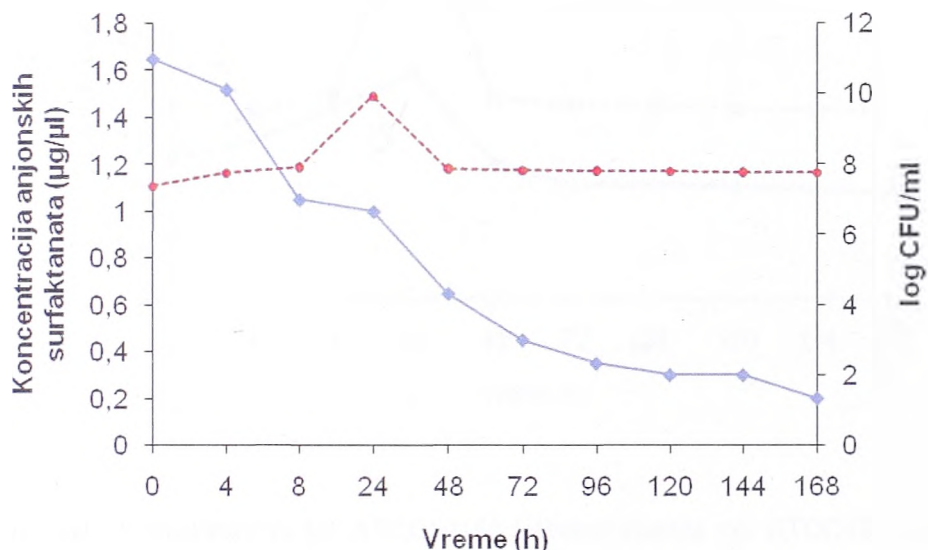
4.1.10. Rast soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 i dinamika biodegradacije ukupnih anjonskih surfaktanata u prelivnoj vodi septičke jame

Radi određivanja mogućnosti potencijalne primene soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u prečišćavanju otpadnih voda, soj ATCC19151 je gajen u sterilisanoj prelivnoj vodi septičke jame domaćinstva iz Beograda i praćen je rast divljeg soja kao i biodegradacija ukupnih anjonskih surfaktanata u toku rasta. Hemijska analiza prelivne vode septičke jame vršena je sedam dana od inokulacije sojem *Pseudomonas* sp. ATCC19151, a dobijeni rezultati poređeni su sa vrednostima dobijenim za neinokulisano prelivnu vodu septičke jame (u pitanju je isti uzorak, 1 l je sterilisan, a zatim je 500 ml inokulisano) (Tabela 7.). Najveća promena u hemijskom sastavu ogledavala se u povećanju koncentracije solubilnog fosfora od skoro dva puta u inokulisanoj otpadnoj vodi, što ukazuje na moguću sposobnost soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 da razlaže slabo solubilne mineralne fosfate i oslobađa fosfor u solubilnoj formi.

Tabela 7. Rezultati hemijske analize prelivne vode septičke jame sedam dana od inokulacije sa *Pseudomonas* sp. ATCC19151. Kao kontrola analiziran je hemijski sastav neinokulisane prelivne vode septičke jame. Kontrolni uzorak je tretiran istovetno kao i inokulisani uzorak tokom sedam dana (30°C, 180 rpm). ND – nije definisano za pijaću vodu.

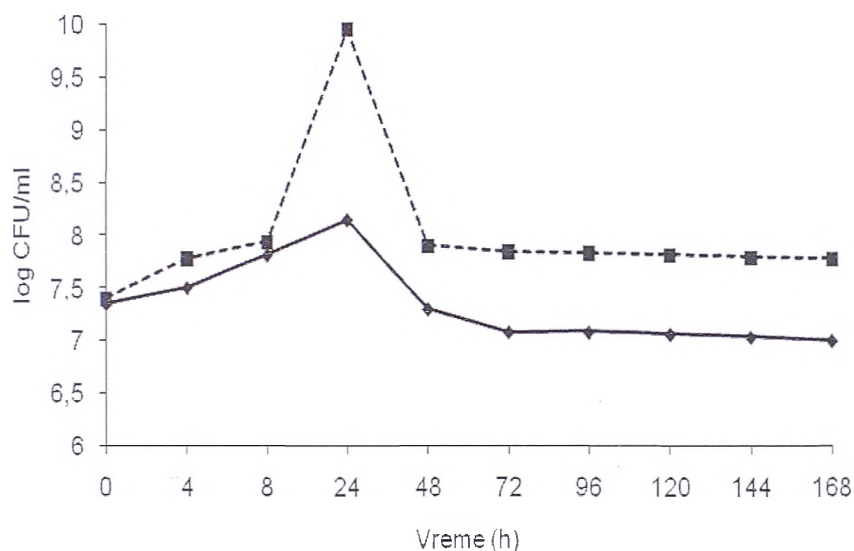
Parametar	Analizirana prelivna voda septičke jame - neinokulisana	Analizirana prelivna voda septičke jame – inokulisana sa <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC19151	Vrednost vode za piće
pH vrednost	9,2	9,1	6,8 - 8,5
Elektroprovodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$) na 20°C	1150	1180	1000
p-alkalitet (mg/l CaCO_3)	118	116	ND
m-alkalitet (mg/l CaCO_3)	437,5	431,5	ND
Nitriti (mg/l NO_2^-)	0,018	0,013	0,03
Nitrati (mg/l NO_3^-)	0,417	0,023	50
Fosfati (mg/l)	1,9	3,1	0,15
TOC ukupni organski ugljenik mg/l	186	60,64	ND

Praćenjem koncentracije ukupnih anjonskih surfaktanata u inokulisanoj otpadnoj vodi pokazano je da tokom 7 dana gajenja dolazi do degradacije čak 85 % istih (Slika 23.). S obzirom da se po definiciji uspešnom biodegradacijom smatra ona gde se tokom 28 dana degraduje 60 % zagađivača, ovi rezultati kvalifikuju *Pseudomonas* sp. ATCC19151 kao potencijalno primenljiv soj u prečišćavanju otpadnih voda.



Slika 23. Biodegradacija ukupnih anjonskih surfaktanata prelivne vode septičke jame tokom rasta kulture *Pseudomonas* sp. ATCC19151 na temperaturi od 30°C. —◆— koncentracija anjonskih surfaktanata, - - -◆- - - kriva rasta soja ATCC19151

U cilju određivanja uloge proteinskog produkta *sdsA* gena u preživljavanju soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u otpadnim vodama poređen je rast divljeg soja i *Pseudomonas* sp. ATCC19151Δ*sdsA* u prelivnoj vodi septičke jame tokom sedam dana na 30°C.



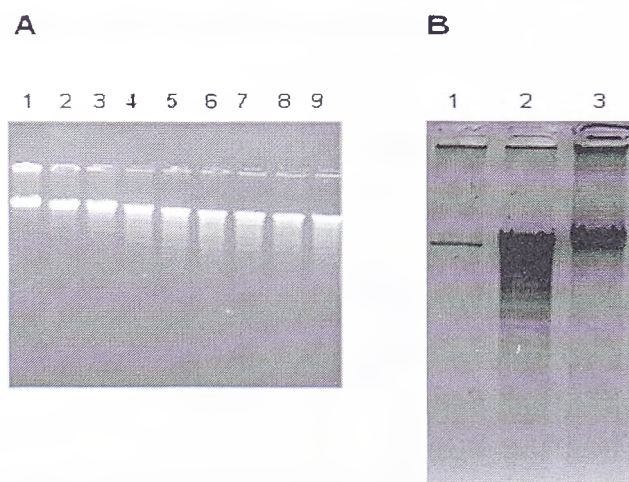
Slika 24. Krive rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151 i *Pseudomonas* sp. ATCC19151ΔsdsA u prelivnoj vodi septičke jame. —◆— - kriva rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151ΔsdsA, - -■- - kriva rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151.

Mutant za *sdsA* gen ispoljio je slabiju sposobnost rasta u otpadnoj vodi u poređenju sa divljim sojem, što je verovatno u korelaciji sa nemogućnošću korišćenja anjonskih surfaktanata kao izvora ugljenika. Čak i slab rast *sdsA* mutanta je neočekivan, ali se verovatno može objasniti s jedne strane niskom koncentracijom prisutnih anjonskih surfaktanata, a s druge strane postojanjem alternativnih izvora ugljenika prisutnih u otpadnoj vodi (Slika 24.).

4.2. Kloniranje i molekularna analiza gena holin sulfataznog operona soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 i određivanje njihove uloge u osmoprotekciji

4.2.1. Konstrukcija kozmidne biblioteke gena soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151

Kozmidna biblioteka gena dobijena je kloniranjem totalne DNK izolovane iz soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u pLAFR3 vektor (Materijal i metode, 3.11.) (Slika 25.). Efikasnost je iznosila 5×10^3 , što znači da bi, po predviđanjima na osnovu veličina poznatih genoma pseudomonada, svaki gen soja ATCC19151 trebalo da bude zastupljen sa najmanje 10 kopija u kozmidnoj biblioteci .



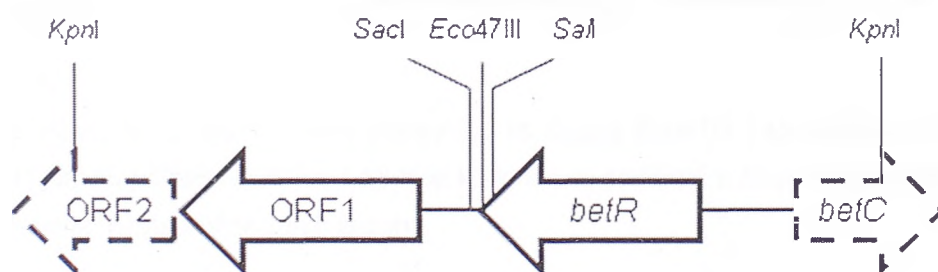
Slika 25. A – Gel elektroforeza parcijalne *Hind*III digestije totalne DNK izolovane iz *Pseudomonas* sp. ATCC19151. 1. nulti minut, 2. peti minut, 3. deseti minut, 4. dvadeseti minut, 5. trideseti minut, 6. prvi sat, 7. drugi sat, 8. treći sat, 9. šesnaesti sat.

B – Gel elektroforeza DNK fragmenata korišćenih u konstrukciji kozmidne biblioteke. 1. *Hind*III digestija pLAFR3 vektora koji je korišćen u ligaciji sa totalnom DNK izolovanom iz *Pseudomonas* sp. ATCC19151, 2. parcijalna *Hind*III digestija totalne DNK izolovane iz *Pseudomonas* sp. ATCC19151 (dvadeseti i trideseti minut) koja je korišćena u ligaciji sa pLAFR3 vektorom, 3. ligaciona smeša pLAFR3 *Hind*III i totalne DNK *Hind*III.

4.2.2. Kloniranje i sekvenciranje holin sulfataznog operona

Analizom kozmidne biblioteke soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 izdvojen je kozmid pLAFRCS koji je nosio holin sulfatazni operon. Nukleotidna sekvenca holin sulfataznog operona dobijena je sukcesivnim sečenjem pLAFRCS kozmida odabranim restrikcionskim endonukleazama, subkloniranjem tako dobijenih fragmenata u pBluescript i sekvenciranjem fragmenata iz rezultujućih konstrukata. Za svaku sekvencu sekvenciranje je ponovljeno tri puta radi izbegavanja grešaka koje se javljaju tokom sekvenciranja.

pLAFRCS je prvo tretiran *KpnI* restrikcionskim enzimom nakon čega je eluiran fragment veličine 3,5 kb i kloniran u pBluescript pri čemu je dobijen konstrukt pBSSK3.5Kpn (Materijal i metode, 3.2.). Sekvenciranjem *KpnI* fragmenta iz pBSSK3.5Kpn dobijena je nukleotidna sekvenca za koju je analizom ORF-ova ("Open reading frame", otvoreni okviri čitanja) u "DNA Strider" programu pokazano da sadrži dva okvira čitanja i 5' krajeve još dva ORF-a (Slika 26.).

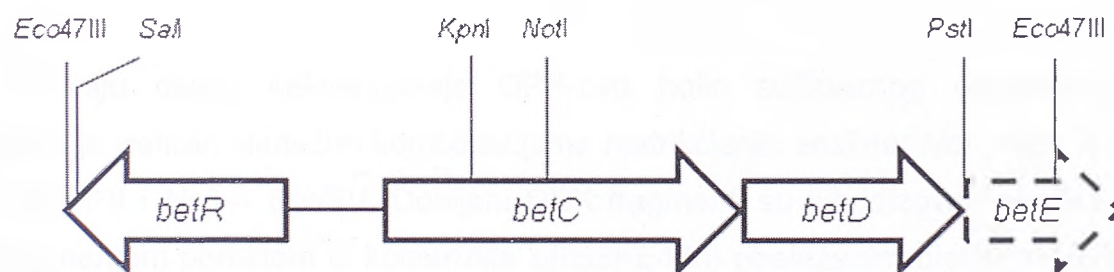


Slika 26. Šematski prikaz otvorenih okvira čitanja 3,5 kb dugog *KpnI* fragmenta pLAFRCS kozmida. Isprekidanom linijom su prikazani ORF-ovi čiji stop nukleotidi nisu sadržani u *KpnI* fragmentu. Vertikalnim linijama su označena mesta restrikcionskih enzima.

Poređenjem nukleotidnih sekvenci ORF-ova *KpnI* fragmenta sa NCBI bazom podataka BLAST programom (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pokazano je da oni kodiraju potencijalni LysR transkripcioni regulator ekspresije holin sulfataze (*betR*) i potencijalnu fosfolipazu C (ORF 1). Takođe, pokazano je i da dva ORF-a čiji se

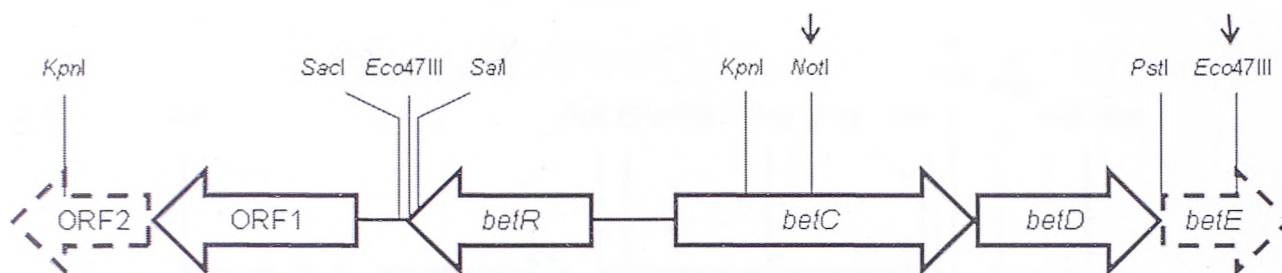
proksimalni delovi nalaze u okviru *KpnI* fragmenta kodiraju holin sulfatazu divergentno orijentisanu u odnosu na *betR* (*betC*) i protein nepoznate funkcije (ORF 2), ponaosob.

U cilju daljeg sekvenciranja holin sulfataznog operona pLAFRCS, a na osnovu restrikcione mape poznatog *KpnI* fragmenta, tretiran je *Eco47III* enzimom i tako dobijeni fragmenti (1,6 kb, 2,7 kb, 2,9 kb, 3,5 kb i više fragmenata veličine od 4 kb do 7 kb) su hibridizovani sa biotinom obeleženim *Sall* – *KpnI* fragmentom pBSSK3.5Kpn konstrukta (Slika 26.). Samo je *Eco47III* fragment veličine 3,5 kb hibridizovao sa probom, te je eluiran i kloniran u pBluescript i tako je dobijen konstrukt pBSSKE47III. Sekvenciranjem *Eco47III* fragmenta iz pBSSKE47III dobijena je nukleotidna sekvenca za koju je analizom ORF-ova u "DNA Strider" programu pokazano da sadrži tri okvira čitanja i 5' kraj još jednog ORF-a (Slika 27.).



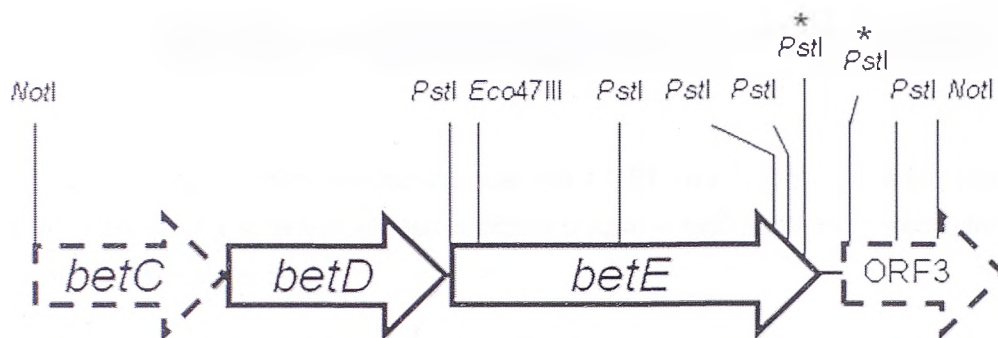
Slika 27. Šematski prikaz otvorenih okvira čitanja 3,5 kb dugog *Eco47III* fragmenta pLAFRCS kozmida. Isprekidanom linijom su prikazani ORF-ovi čiji stop kodoni nisu sadržani u *Eco47III* fragmentu. Vertikalnim linijama su označena mesta restrikcionih enzima.

Poređenjem nukleotidnih sekvenci ORF-ova *Eco47III* fragmenta sa NCBI bazom podataka korišćenjem BLAST programa pokazano je da oni kodiraju potencijalni LysR transkripcioni regulator ekspresije holin sulfataze (*betR*), potencijalnu holin sulfatazu (*betC*) i potencijalni periplazmatski supstrat vezujući protein ABC transportera (*betD*). ORF čiji se proksimalni deo nalazi u okviru *Eco47III* fragmenta kodira potencijalni sulfatni transporter (*betE*). Dodatna provera nukleotidnih sekvenci 3,5 kb *KpnI* i 3,5 kb *Eco47III* fragmenata pLAFRCS kozmida urađena je njihovim preklapanjam u "DNA Strider" programu (Slika 28.).



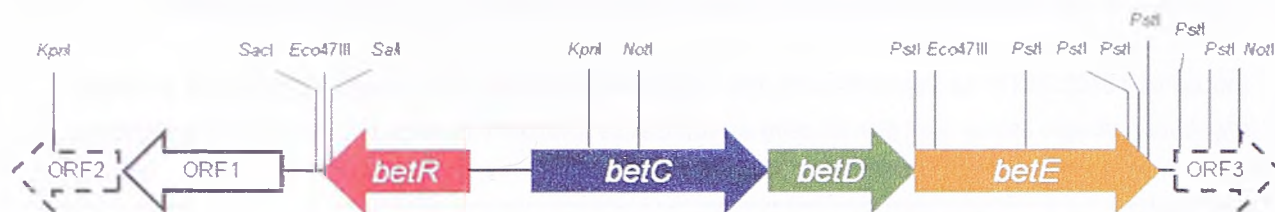
Slika 28. Šematski prikaz otvorenih okvira čitanja holin sulfataznog operona dobijenih sekvenciranjem 3,5 kb dugog *KpnI* i 3,5 kb dugog *Eco47III* fragmenta pLAFRCS kozmida. Isprekidanom linijom su prikazani ORF-ovi čiji stop kodoni nisu sadržani u ova dva fragmenta. Vertikalnim linijama su označena mesta restrikcionih enzima, strelicama su označena restrikciona mesta koja ovičavaju *Eco47III* – *NotI* fragment koji je korišćen kao proba u kloniranju *NotI* 5 kb fragmenta.

U cilju daljeg sekvenciranja ORF-ova holin sulfataznog operona kozmid pLAFRCS je tretiran sledećim kombinacijama restrikcionih enzima: *NotI*, *NotI* – *EcoRI*, *NotI* – *BamHI* i *NotI* – *EcoRV*. Dobijeni DNK fragmenti su hibridizovani sa *Eco47III* – *NotI* fragmentom poreklom iz konstrukta pBSSKE47III obeleženim biotinom (Slika 27). U svim digestijama pozitivan signal dao je zajednički fragment veličine 5 kb (na osnovu čega je zaključeno da je u pitanju *NotI* fragment) koji je eluiran i kloniran u pBluescript pri čemu je dobijen konstrukt pBSSKNotI5. U cilju sekvenciranja 5 kb *NotI* fragmenta pBSSKNotI5 je tretiran *PstI* enzimom i tako dobijeni fragmenti su eluirani i klonirani u pBluescript i dobijeni su konstrukti pBSSKPstI300, pBSSKPstI1420, pBSSKPstI1268. Deo *NotI* fragmenta, dužine 1,3 kb, je nakon tretmana *PstI* enzimom nije isečen iz pBluescript-a, te je sekvenciran direktno iz konstrukta pBSSKNotI5. Redosled *PstI* fragmenata u okviru *NotI* fragmenta je određena sekvenciranjem okoline *PstI* restrikcionih mesta u pBSSKNotI korišćenjem internih prajmera. Sekvenciranjem i analizom dobijenih nukleotidnih sekvenci u "DNA Strider" programu pokazano je da 5 kb *NotI* fragment pLAFRCS nosi dva kompletna ORF-a i još dva sa nekompletnim sekvencama (Slika 29.).



Slika 29. Šematski prikaz otvorenih okvira čitanja holin sulfataznog operona dobijenih sekvenciranjem 5 kb dugog *NotI* fragmenta pLAFRC5 kozmida. Isprekidanom linijom su prikazani ORF-ovi čiji stop nukleotidi nisu sadržani u ovom fragmentu. Vertikalnim linijama su označena mesta restrikcionih enzima. Zvezdicama su označena restrikciona mesta fragmenta čija sekvenca je dobijena naknadnim sekvenciranjem pBSSKNotI5.

Poređenjem nukleotidnih sekvenci ORF-ova 5 kb *NotI* fragmenta sa NCBI bazom podataka korišćenjem BLAST programa pokazano je da oni kodiraju potencijalni periplazmatski supstrat vezujući protein ABC transportera (*betD*) i potencijalni sulfatni transporter (*betE*). ORF čiji se proksimalni deo nalazi u okviru *NotI* fragmenta kodira potencijalnu šikimat dehidrogenazu (ORF 3), dok ORF čiji se distalni deo nalazi u okviru *NotI* fragmenta kodira potencijalnu holin sulfatazu. Takođe, preklapanjem ovako dobijenih nukleotidnih sekvenci 5 kb *NotI* fragmenta pokazano je da deo sekvence nedostaje (Slika 29., region između restrikcionih mesta obeleženih zvezdicom), te su u svrhu sekvenciranja tog dela dizajnirani Not5-1 i Not5-2 prajmeri na osnovu sekvence koja ovičava region čija je sekvenca ostala nepoznata (Materijal i metode, 3.9.4.). Sekvenciranjem pomoću Not5-1 i Not5-2 prajmera je kompletirana sekvenca holin sulfataznog operona (Prilog II).



Slika 30. Šematski prikaz gena holin sulfataznog operona i ORF-ova koji ga okružuju. Isprekidanom linijom su prikazani ORF-ovi čiji stop kodoni nisu sadržani u *KpnI* – *NotI* fragmentu. Vertikalnim linijama su označena mesta restrikcionih enzima.

Holin sulfatazni operon soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 čine četiri gena koji kodiraju potencijalni LysR transkripcioni regulator (*betR* gen), potencijalnu holin sulfatazu (*betC* gen), potencijalni periplazmatski supstrat vezujući protein ABC transportera (*betD* gen) i potencijalni sulfatni transporter (*betE* gen) (Slika 30.). Operon je oivičen genima koji kodiraju potencijalnu fosfolipazu C (ORF 1) i potencijalnu šikimat dehidrogenazu (ORF 3).

4.2.3. Kompjuterska analiza sekvenci *betC* gena i BetC proteina

Nukleotidna sekvenca *betC* gena (Prilog II, 1524 bp) analizirana je BLAST programom dostupnim na internetu (NCBI), a poređenje sa potencijalnim holin sulfataznim genima dobijenim BLAST pretragom rađeno je korišćenjem ClustalW2 programa. Pretraživanjem sekvenci BLAST programom pokazano je da najvišu homologiju *betC* gen soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 deli sa potencijalnim holin sulfataznim genima sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (Tabela 8.).

Kloniranje i molekularna analiza sulfataznih operona soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151

Tabela 8. Rezultati poređenja *betC* nukleotidne sekvence soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 sa bazom podataka NCBI, BLAST programom. Prikazani su rezultati za gene tri soja koja su dali najvišu homologiju sa *betC*.

Soj	Naziv gena	Identični nukleotidi	Nepoklapanja sekvenci
<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp	Potencijalna holin sulfataza	85 %	3 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	Potencijalna holin sulfataza	84 %	4 %
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	Potencijalna holin sulfataza	77 %	6 %

Poređenjem sve četiri sekvence u ClustalW2 programu dobijeno je da *betC* gen i potencijalni holin sulfatazni geni sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a dele čak 510 identičnih nukleotida (Prilog III - A) što iznosi oko trećine od ukupnog broja nukleotida analiziranih gena.

Prevođenjem nukleotidne sekvence *betC* gena u aminokiselinsku sekvencu i unošenjem tako dobijene sekvence BetC proteina (503 AK) u BLAST program analizirana je njegova domenska organizacija i stepen homologije sa drugim holin sulfatazama.



Slika 31. Šematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence BetC proteina BLAST programom.

Rezultati analize BLAST programom pokazuju najveću sličnost BetC proteina sa proteinima koji pripadaju superfamiliji alkPPc koja obuhvata homologe alkalne fosfataze, alkalne fosfataze i nespecifične fosfataze. Domenska organizacija u okviru prvih 450 AK pokazuje visoku homologiju sa arilsulfatazom A iz *P. aeruginosa* i srodnim enzimima koji su uključeni u transport neorganskih jona i njihov balans (slika 31.).

Pretraživanjem baze podataka aminokiselinskih sekvenci proteina BLAST programom pokazano je da najvišu homologiju BetC protein soja *Pseudomonas* sp.

ATCC19151 deli sa potencijalnim holin sulfatazama sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (Tabela 9.)

Tabela 9. Rezultati poređenja aminokiselinske sekvence BetC proteina soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 sa bazom podataka NCBI, BLAST programom. Prikazani su rezultati za proteine tri soja koja su dali najvišu homologiju sa BetC.

Soj	Naziv proteina	Identične aminokiseline	Aminokiseline koje pripadaju istoj grupi
<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp	Potencijalna holin sulfataza	81 %	88 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	Potencijalna holin sulfataza	80 %	87 %
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	Potencijalna holin sulfataza	76 %	86 %

Poređenjem sve četiri analizirane aminokiselinske sekvence u ClustalW2 programu dobijeno je da BetC protein i potencijalne holin sulfataze sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a dele čak 337 identičnih aminokiselina (Prilog III – B), odnosno oko dve trećine od ukupnog broja aminokiselina.

Pretragom aminokiselinske sekvence za (C/S)XPXR sekvencom koju prepoznaju enzimi koji prevode serin ili cistein unutar aktivnog mesta enzima u formilglicin, a koja je karakteristična za sulfataze grupe I kojima je BetC homolog, na poziciji 55 – 58 nađena je sekvenca CAPSR koja odgovara traženoj (Prilog IV). Sekvenca koju prepoznaju formilglicin generišući enzimi, a koja sadrži cistein ukazuje na to da je BetC protein sulfataza cisteinskog tipa i da je verovatno locirana u citoplazmi.

4.2.4. Kompjuterska analiza sekvenci *betR* gena i BetR proteina

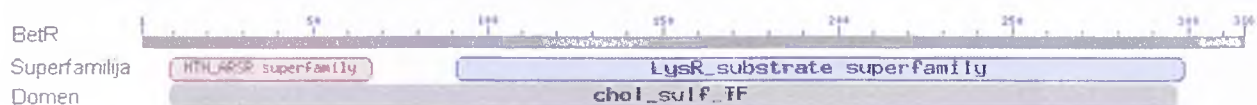
Poređenjem 951 bp duge nukleotidne sekvence *betR* gena (Prilog II) sa bazom podataka NCBI pomoću BLAST programa pokazano je da ovaj gen najvišu homologiju deli sa potencijalnim LysR transkripcionim regulatorima iz sojeva *Pseudomonas mendocina ymp*, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (Tabela 10.).

Tabela 10. Rezultati poređenja *betR* nukleotidne sekvence soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 sa bazom podataka NCBI, BLAST programom. Prikazani su rezultati za gene tri soja koja su dali najvišu homologiju sa *betR*.

Soj	Naziv gena	Identični nukleotidi	Nepoklapanja sekvenci
<i>Pseudomonas mendocina ymp</i>	Potencijalni LysR transkripcioni regulator	77 %	7 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	Potencijalni LysR transkripcioni regulator	78 %	6 %
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	Potencijalni LysR transkripcioni regulator	76 %	6 %

Poređenjem sve četiri sekvence u ClustalW2 programu dobijeno je da *betR* gen i geni koji kodiraju potencijalne LysR regulatore sojeva *Pseudomonas mendocina ymp*, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a dele čak 478 identičnih nukleotida (Prilog IV – A) što iznosi oko polovine od ukupnog broja nukleotida analiziranih gena.

Prevođenjem nukleotidne sekvence *betR* gena u aminokiselinsku sekvencu i unošenjem tako dobijene sekvence BetR proteina (317 AK) u BLAST program analizirana je njegova domenska organizacija i stepen homologije sa drugim transkripcionim regulatorima koji pripadaju LysR familiji.



Slika 32. Šematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence BetR proteina BLAST programom.

Rezultati analize BLAST programom pokazuju najveću sličnost BetR proteina sa proteinima koji pripadaju superfamiliji LysR regulatora (region od 100. do 300. AK koji predstavlja supstrat vezujući domen karakterističan za LysR regulatore) kao i onima koji pripadaju HTH_ARSR superfamiliji (prvih 60 AK BetR proteina) (Slika 32.). HTH_ARSR superfamilija obuhvata proteine koji sadrže "helix – turn – helix" domen koji ima ulogu u interakciji proteina sa DNK. Domenska organizacija u okviru prvih 300 AK takođe pokazuje visoku homologiju sa potencijalnim transkripcionim regulatorima ekspresije holin sulfataznih gena. Pretraživanjem baze podataka aminokiselinskih sekvenci proteina BLAST programom pokazano je da najvišu homologiju BetR protein soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 deli sa potencijalnim LysR transkripcionim regulatorima sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (Tabela 11.)

Tabela 11. Rezultati poređenja aminokiselinske sekvence BetR proteina soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 sa bazom podataka NCBI, BLAST programom. Prikazani su rezultati za proteine tri soja koja su dali najvišu homologiju sa BetR.

Soj	Naziv proteina	Identične aminokiseline	Aminokiseline koje pripadaju istoj grupi
<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp	Potencijalni LysR transkripcioni regulator	67 %	77 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	Potencijalni LysR transkripcioni regulator	67 %	77 %
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	Potencijalni LysR transkripcioni regulator	68 %	81 %

Poređenjem sve četiri aminokiselinske sekvence u ClustalW2 programu dobijeno je da BetR protein i potencijalni LysR transkripcioni regulatori sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a dele čak 151 identičnu aminokiselinu (Prilog IV – B), odnosno oko polovine od ukupnog broja aminokiselina. Homologija među poređenim proteinima je naročito visoka u delovima proteina koji formiraju "helix – turn – helix" domen i domen za koji se vezuje supstrat.

4.2.5. Kompjuterska analiza sekvenci *betD* gena i BetD proteina

Poređenjem 927 bp duge nukleotidne sekvence *betD* gena (Prilog 3) sa bazom podataka NCBI pomoću BLAST programa pokazano je da ovaj gen najvišu homologiju deli sa potencijalnim *betD* genima iz sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (Tabela 12.).

Tabela 12. Rezultati poređenja *betD* nukleotidne sekvence soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 sa bazom podataka NCBI, BLAST programom. Prikazani su rezultati za gene tri soja koja su dali najvišu homologiju sa *betD*.

Soj	Naziv gena	Identični nukleotidi	Nepoklapanja sekvenci
<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp	Potencijalni <i>betD</i> gen	83 %	4 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	Potencijalni <i>betD</i> gen	76 %	8 %
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	Potencijalni <i>betD</i> gen	73 %	6 %

Poređenjem sve četiri sekvence u ClustalW2 programu dobijeno je da *betD* gen i geni koji kodiraju potencijalne periplazmatske supstrat vezujuće proteine ABC transportera sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a dele 256 identičnih nukleotida

(Prilog V – A) što iznosi približno četvrtinu od ukupnog broja nukleotida analiziranih gena.

Prevođenjem nukleotidne sekvence *betD* gena u aminokiselinsku sekvencu i unošenjem tako dobijene sekvence BetD proteina (309 AK) u BLAST program analizirana je njegova domenska organizacija i stepen homologije sa drugim genima koji kodiraju potencijalne BetD proteine.



Slika 33. Šematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence BetD proteina BLAST programom.

Rezultati domenske analize BLAST programom pokazuju najveću sličnost BetD proteina sa proteinima koji pripadaju PBPb superfamiliji proteina (region od 25. do 285. AK) (Slika 33). PBPb superfamilija obuhvata periplazmatične proteine koji vezuju supstrate i interaguju sa membranski vezanim kompleksima, najčešće permeazama. Domenska organizacija proteina pokazuje visoku homologiju sa ABC transporterima holina. Pretraživanjem baze podataka aminokiselinskih sekvenci proteina BLAST programom pokazano je da najvišu homologiju BetD protein soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 deli sa potencijalnim BetD proteinima sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 i *Pseudomonas syringae* pv. syringae B728a (Tabela 13.).

Kloniranje i molekularna analiza sulfataznih operona soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151

Tabela 13. Rezultati poređenja aminokiselinske sekvence BetD proteina soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 sa bazom podataka NCBI, BLAST programom. Prikazani su rezultati za proteine tri soja koja su dali najvišu homologiju sa BetD.

Soj	Naziv proteina	Identične aminokiseline	Aminokiseline koje pripadaju istoj grupi
<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp	Potencijalni BetD protein	77 %	91 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	Potencijalni BetD protein	63 %	77 %
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	Potencijalni BetD protein	63 %	77 %

Poređenjem sve četiri sekvence u ClustalW2 programu dobijeno je da BetD protein i potencijalni BetD proteini sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a dele 139 identičnih aminokiselina (Prilog V – B), odnosno nešto više od trećine od ukupnog broja aminokiselina.

4.2.6. Kompjuterska analiza sekvenci *betE* gena i *BetE* proteina

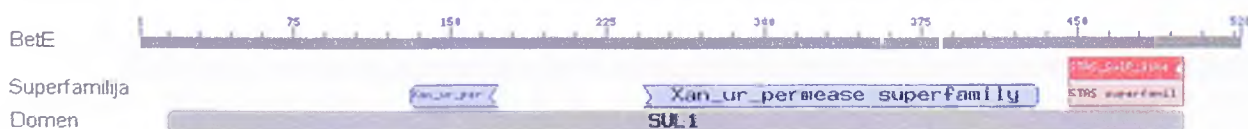
Poređenje 1587 bp duge nukleotidne sekvence *betE* gena (Prilog II) sa bazom podataka NCBI pomoću BLAST programa pokazano je da ovaj gen najvišu homologiju deli sa potencijalnim *betE* genima iz sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 i *Pseudomonas putida* GB-1 (Tabela 14.).

Tabela 14. Rezultati poređenja *betE* nukleotidne sekvence soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 sa bazom podataka NCBI, BLAST programom. Prikazani su rezultati za gene tri soja koja su dali najvišu homologiju sa *betE*.

Soj	Naziv gena	Identični nukleotidi	Nepoklapanja sekvenci
<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp	Potencijalni <i>betE</i> gen	77 %	7 %
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	Potencijalni <i>betE</i> gen	76 %	8 %
<i>Pseudomonas putida</i> GB-1	Potencijalni <i>betE</i> gen	74 %	9 %

Poređenjem sve četiri sekvence u ClustalW2 programu dobijeno je da *betE* gen i geni koji kodiraju potencijalne sulfatne transportere sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 i *Pseudomonas putida* GB-1 dele 501 identičan nukleotid (Prilog VI – A) što čini trećinu od ukupnog broja nukleotida analiziranih gena.

Prevođenjem nukleotidne sekvence *betE* gena u aminokiselinsku sekvencu i unošenjem tako dobijene sekvence *BetE* proteina (529 AK) u BLAST program analizirana je njegova domenska organizacija i stepen homologije sa drugim genima koji kodiraju potencijalne *BetE* proteine.



Slika 34. Šematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence *BetE* proteina BLAST programom.

Rezultati domenske analize BLAST programom pokazuju najveću sličnost BetE proteina sa proteinima koji pripadaju Xan_ur superfamiliji permeaza (region od 100. do 450. AK) (Slika 34.). Xan_ur superfamilija permeaza obuhvata proteine koji čine komplekse u ćelijskoj membrani i interaguju sa periplazmatskim proteinima koji vezuju supstrate. Domenska organizacija proteina pokazuje visoku homologiju i sa sulfatnim permeazama i njima srodnim transporterima (SUL1). Takođe, pokazano je da C – terminalni region BetE proteina pokazuje visoku homologiju sa STAS domenom koji ima ulogu u vezivanju i hidrolizi ATP – a. Pretraživanjem baze podataka aminokiselinskih sekvenci proteina BLAST programom pokazano je da najvišu homologiju BetE protein soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 deli sa potencijalnim BetE proteinima sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (Tabela 15.)

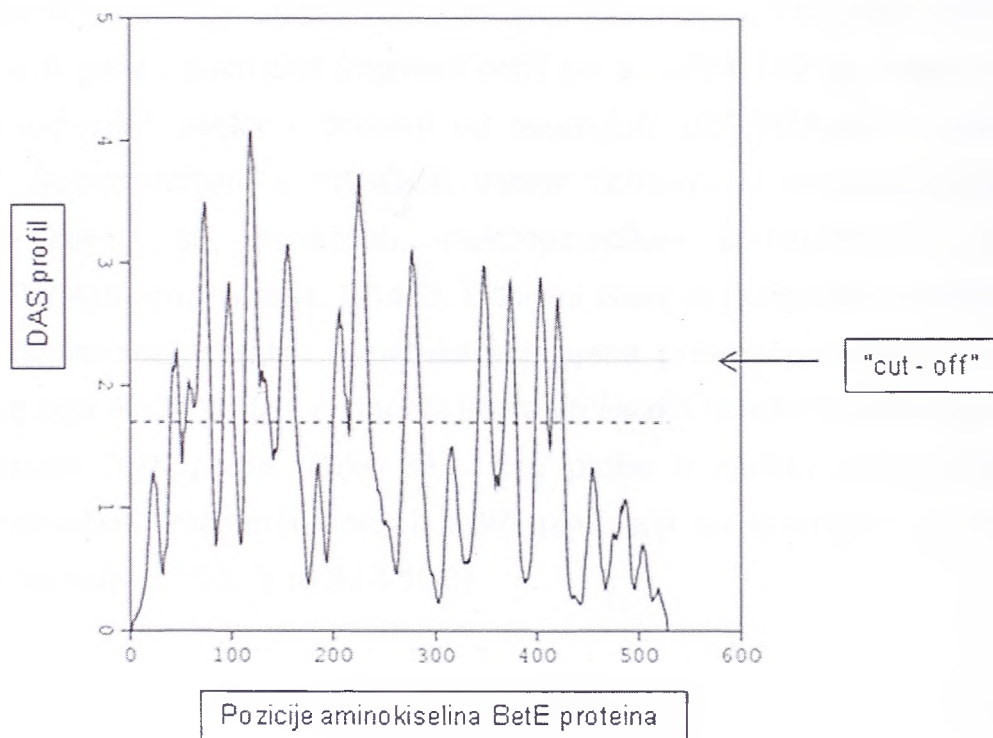
Tabela 15. Rezultati poređenja aminokiselinske sekvence BetE proteina soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 sa bazom podataka NCBI, BLAST programom. Prikazani su rezultati za proteine tri soja koja su dali najvišu homologiju sa BetE.

Soj	Naziv proteina	Identične aminokiseline	Aminokiseline koje pripadaju istoj grupi
<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp	Potencijalni BetE protein	70 %	80 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	Potencijalni BetE protein	65 %	75 %
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	Potencijalni BetE protein	67 %	79 %

Poređenjem sve četiri sekvence u ClustalW2 programu dobijeno je da BetE protein i potencijalni BetE proteini sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a dele 274 identične aminokiseline (Prilog VI – B), odnosno nešto više od polovine od ukupnog broja aminokiselina poređenih proteina.

Pošto BetE protein pokazuje visoku homologiju sa sulfatnim transporterima koji su locirani u unutrašnjoj membrani ćelije Gram – negativnih bakterija, vršena je pretraga potencijalnih transmembranskih domena "DAS - Transmembrane Prediction"

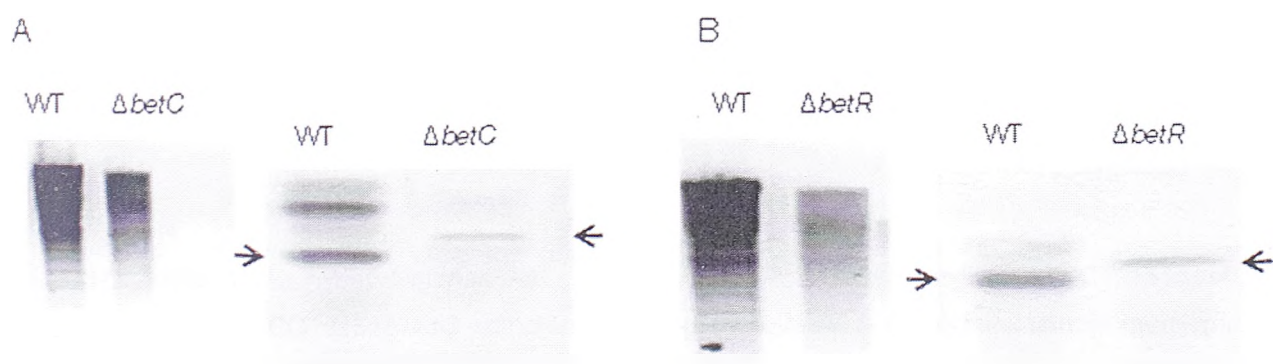
programom. Rezultati izvršene pretrage pokazuju da BetE protein poseduje 12 potencijalnih transmembranskih segmenata (Slika 35.).



Slika 35. Grafički prikaz rezultata DAS analize transmembranskih segmenata BetE proteina "DAS - Transmembrane Prediction" programom. Pozicije aminokiselina koje formiraju potencijalne transmembranske segmente: 45 – 46, 68 – 78, 94 – 101, 115 – 127, 149 – 161, 203 – 210, 220 – 234, 273 – 284, 344 – 353, 371 – 377, 401 – 409, 419 – 424. "cut - off" granična vrednost kojom se definišu transmembranski segmenti proteina.

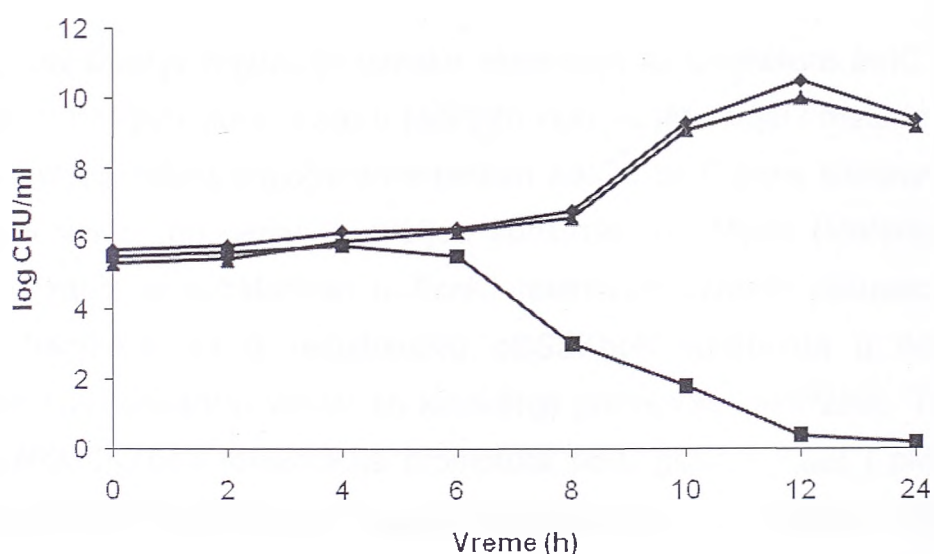
4.2.7. Mutageneza *betC* i *betR* gena

U cilju određivanja funkcije *betC* i *betR* gena, odnosno njihove uloge u katabolizmu holin sulfata urađena je njihova mutageneza. Fragmenti (834 bp dug fragment *betC* gena i *SacII-SalI* fragment *betR* gena dužine 702 bp, Prilog II) klonirani su u pBluescriptSK vektor i dobijeni su rezultujući pBSSKMbetC i pBSSKMbetR konstrukti. Subkloniranjem u pKNOCK vektor dobijeni su konstrukti pKNMbetC i pKNMbetR kojima su, ponaosob, elektroporacijom transformisane ćelije soja ATCC19151 (Materijal i metode, 3.14.2). Dobijeni elektrotransformanti selektovani su u prisustvu kanamicina, a zatim je narušavanje gena provereno hibridizacijom totalne DNK divljeg soja ATCC19151 i mutanata tretiranih *HindIII* restrikcijom endonukleazom i odgovarajuće DNK probe (Slika 36.). Kao probe u hibridizacijama korišćeni su biotinom obeleženi fragmenti *betC* i *betR* gena koji su korišćeni i u mutagenezi (Materijal i metode, 3.10.1, 3.10.2 i 3.10.3).



Slika 36. A - Neradioaktivna DNK-DNK hibridizacija totalne DNK *Pseudomonas* sp. ATCC19151 i *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *betC* sečenih *HindIII* enzimom. Kao proba korišćen je fragment *betC* gena dužine 834 bp. B – Neradioaktivna DNK-DNK hibridizacija totalne DNK *Pseudomonas* sp. ATCC19151 i *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *betR* sečenih *HindIII* enzimom. Kao proba korišćen je *SacII-SalI* fragment *betR* gena dužine 702 bp. WT – totalna DNK *Pseudomonas* sp. ATCC19151, Δ *betC* - totalna DNK *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *betC*, Δ *betR* - totalna DNK *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *betR*.

U cilju potvrđivanja funkcije *betC* gena u korišćenju holin sulfata, urađen je eksperiment komplementacije *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *betC* uvođenjem kozmida pLAFRCS koji nosi ceo holin sulfatazni operon (Materijal i metode, Tabela 2.). Rezultujući *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *betC* i *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *betC* komplementiran sa pLAFRCS su testirani na sposobnost rasta na holin sulfatu kao jedinom izvoru ugljenika u M9 minimalnom medijumu. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 37.



Slika 37. Krive rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151, *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *betC* i *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *betC* komplementiranog sa pLAFRCS u M9 minimalnom medijumu sa dodatkom holin sulfata kao jedinog izvora ugljenika. \blacklozen - kriva rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151, \blacksquare - kriva rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *betC*, \blacktriangle - kriva rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *betC* komplementiranog sa pLAFRCS.

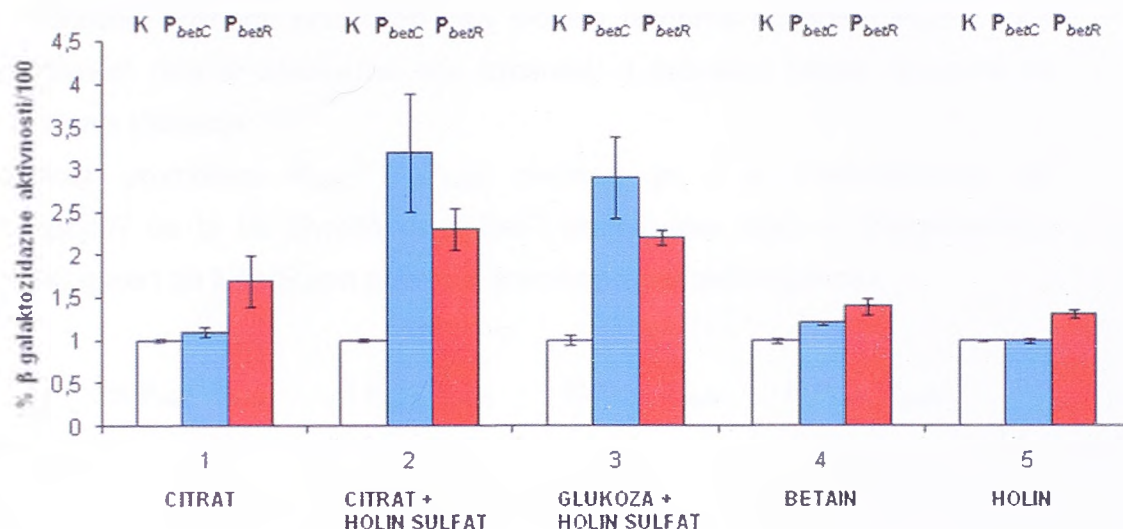
Pseudomonas sp. ATCC19151 Δ *betC* ispoljio je određeni stepen rasta u M9 minimalnom medijumu u prisustvu holin sulfata zaključno sa četvrtim satom merenja što je verovatno posledica prisustva primesa holin hlorida u holin sulfatu. Od šestog sata pa sve do 24 h nakon inokulacije dolazi do značajnog pada broja ćelija *Pseudomonas* sp. ATCC19151 Δ *betC* što ukazuje na nemogućnost korišćenja holin sulfata kao jedinog

izvora ugljenika. *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta betC$ koji je nosio pLAFRCS kozmid ispoljio je stepen rasta koji je bio identičan vrednosti dobijenoj za divlji soj (Slika 37.). Ovim eksperimentom je nedvosmisleno pokazana uloga holin sulfataznog gena *betC* soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151u korišćenju holin sulfata.

4.2.8. Analiza aktivnosti promotora *betC* i *betR* gena

U cilju utvrđivanja regulacije genske ekspresije sa promotora *betC* i *betR* gena konstruisane su transkripcione fuzije u pMP220 vektoru (Materijal i metode, Tabela 2.). PCR produkt intergenskog regiona divergentnih *betC* i *betR* gena kloniran je najpre u pGEM-T Easy vektor pri čemu je dobijen konstrukt pGEMbetl (Materijal i metode, Tabela 2.), a zatim je subkloniran u *EcoRI* restrikciono mesto pBluescript vektora. Promotorski fragmenti su iz rezultujućeg pBSSKbetl konstrukta u odgovarajućim orijentacijama subklonirani u vektor za kloniranje promotora (pMP220). Tako dobijeni konstrukti pMP220KXbetl (orijentacija promotora *betC* gena - P_{betC}) i pMP220BKbetl (orijentacija promotora *betR* gena - P_{betR}) elektroporacijom su uvedeni u *Pseudomonas* sp. ATCC19151. Aktivnost transkripcionih fuzija praćena je u M9 minimalnom medijumu sa dodatkom 0,2 % citrata, 0,2 % holin sulfata, smeše 0,2 % holin sulfata i 0,2 % glukoze, 0,2 % betaina ili 0,2 % holina ponaosob, kao jedinih izvora ugljenika.

β - galaktozidazna aktivnost transkripcionih fuzija P_{betC} , P_{betR} i pMP220 vektora koji je korišćen kao kontrola merena je u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 24 h nakon inokulacije. Dobijeni rezultati za transkripcione fuzije izraženi su u odnosu na aktivnost pMP220 vektora koja je uzeta kao 100 % (Slika 38.).

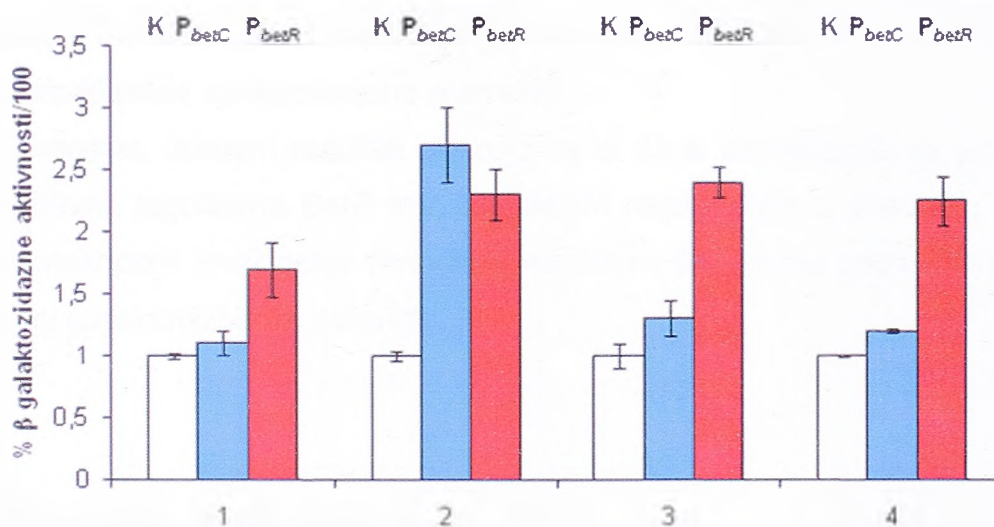


Slika 38. β - galaktozidazna aktivnost promotora *betC* i *betR* gena u pMP220 vektoru u *Pseudomonas* sp. ATCC19151, analizirana u M9 minimalnom medijumu sa različitim izvorima ugljenika. 1. aktivnost promotora u M9 minimalnom medijumu sa 0,2 % citratom kao jedinim izvorom ugljenika, 2. aktivnost promotora u M9 minimalnom medijumu sa 0,2 % holin sulfatom kao jedinim izvorom ugljenika, 3. aktivnost promotora u M9 minimalnom medijumu sa 0,2 % holin sulfatom i 0,2 % glukozom kao izvorima ugljenika, 4. aktivnost promotora u M9 minimalnom medijumu sa 0,2 % betainom kao jedinim izvorom ugljenika, 5. aktivnost promotora u M9 minimalnom medijumu sa 0,2 % holinom kao jedinim izvorom ugljenika, K – aktivnost pMP220 vektora, P_{betC} – aktivnost promotora *betC* gena, P_{betR} – aktivnost promotora *betR* gena.

Aktivnost transkripcionih fuzija u prisustvu citrata, odnosno u neinducibilnim uslovima pokazuje da je P_{betC} neaktivan (Slika 38.). Tokom rasta kulture u prisustvu holin sulfata dolazi do aktivacije promotora *betC* gena tako da je nivo njegove aktivnosti čak 3 x viši od nivoa izmerenog u medijumu sa citratom. Promotor *betR* gena pokazuje iznenađujuće visoku aktivnost u prisustvu citrata, u odnosu na aktivnost u prisustvu betaina ili holina. Aktivnost P_{betR} tokom rasta u prisustvu holin sulfata međutim raste iznad vrednosti izmerene u prisustvu citrata i to za 1,5 put, dok je razlika još očiglednija u poređenju sa aktivnošću izmerenom u prisustvu betaina ili holina. P_{betC} i P_{betR} pokazuju skoro identičnu aktivnost u medijumu sa holin sulfatom kao i u medijumu u kojem pored holin sulfata kao izvor ugljenika je prisutna i glukoza, što ukazuje na to da nisu pod kataboličkom represijom. Tokom rasta u M9 minimalnom medijumu sa

betainom, odnosno holinom, ponaosob kao jedinim izvorima ugljenika P_{betC} i P_{betR} pokazuju aktivnost nižu u odnosu na onu izmerenu u prisustvu citrata, odnosno ne pokazuju znakove indukcije.

Aktivnost promotora P_{betC} i P_{betR} praćena je i u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta betR$ da bi se utvrdilo da li BetR protein ima ulogu u transkripcionoj regulaciji *betC* gena i da li *betR* gen pokazuje transkripcionu autoregulaciju.



Slika 39. β - galaktozidazna aktivnost promotora *betC* i *betR* gena u pMP220 vektoru u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 i *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta betR$, analizirana u M9 minimalnom medijumu sa citratom i smešom citrata i holin sulfata kao izvorima ugljenika. 1. aktivnost promotora u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 gajenom u prisustvu citrata, 2. aktivnost promotora u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 gajenom u prisustvu citrata i holin sulfata, 3. aktivnost promotora u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta betR$ gajenom u prisustvu citrata, 4. aktivnost promotora u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta betR$ gajenom u prisustvu citrata i holin sulfata, K – aktivnost pMP220 vektora, P_{betC} – aktivnost promotora *betC* gena, P_{betR} – aktivnost promotora *betR* gena.

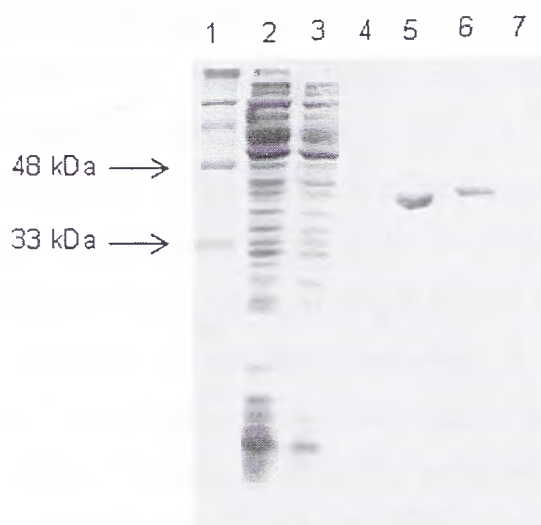
Aktivnost transkripcione fuzije *betC* gena u *betR* mutantu u prisustvu citrata je skoro identična onoj izmerenoj u divljem soju, dok je aktivnost *betR* promotora 1,5 x viša u mutantu nego u divljem soju i bliska je vrednostima dobijenim u inducibilnim uslovima (Slika 39.) Povećanje aktivnosti *betR* promotora u neinducibilnim uslovima u *betR* mutantu u odnosu na divlji soj može da znači da je ovaj promotor negativno

autoregulisan kada nema holin sulfata. U prisustvu holin sulfata vrednost aktivnosti *betR* promotora u *betR* mutantu ostaje nepromenjena ukoliko se uporedi sa aktivnošću u neinducibilnim uslovima, a 1,5 x viša u odnosu na divlji soj u neinducibilnim uslovima. Aktivnost *betC* promotora merena u *betR* mutantu gajenom u prisustvu citrata i holin sulfata je 2,7 x niža u odnosu na onu izmerenu u divljem soju u istom medijumu. Ovakva aktivnost transkripcionih fuzija ukazuje na to da se najverovatnije po vezivanju holin sulfata kao koinducera BetR aktivira transkripciju sa *betC* promotora istovremeno oslobađajući transkripciju sa sopstvenog promotora (holin sulfat dovodi do derepresije), najverovatnije usled konformacione promene.

Sumirano, dobijeni rezultati ukazuju na to da je transkripcija sa promotora *betC* gena pozitivno regulisana BetR transkripcionim regulatorom u prisustvu holin sulfata, dok je transkripcija *betR* gena verovatno negativno regulisana sopstvenim proteinskim produktom u neinducibilnim uslovima.

4.2.9. Ekspresija BetR proteina

PCR fragment *betR* gena koji je korišćen za ekspresiju BetR proteina subkloniran (*Bam*HI-*Hind*III) je iz pBSSK*betR* konstrukta u pQE32 komercijalni vektor za ekspresiju proteina kojim su transformisane *E. coli* M15 ćelije. Rekombinantni His₆-BetR protein nakon indukcije IPTG-jem prečišćen je iz *E. coli* M15 (Materijal i metode, 3.16.1) i proteinski eluat dobijen nakon druge elucije proteina sa NTA agaroze (Slika 40.) korišćen je u reakcijama interakcije sa biotinom obeleženim promotorskim regionom *betC* i *betR* gena. Koncentracija proteina određivana je Bradfordovim esejom (Materijal i metode, 3.16.2.)

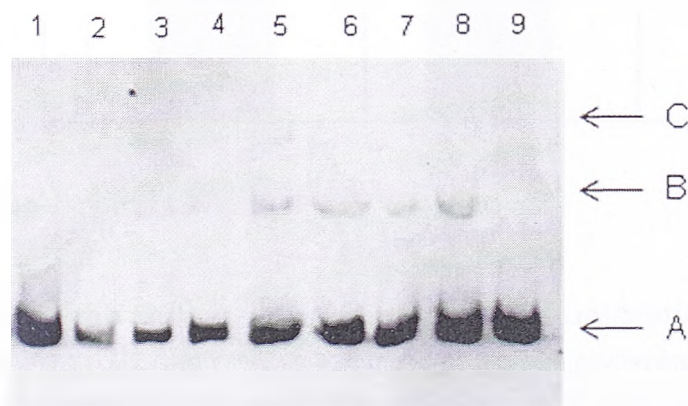


Slika 40. Ekspresija rekombinantnog His₆-obebeženog BetR proteina. 1. "Prestained protein marker broad range" Biolabs, 2. proteini koji se nisu vezali za NTA agarozu, 3. proteini dobijeni prvim pranjem kolone, 4. proteini dobijeni drugim pranjem kolone, 5. proteini dobijeni nakon prve elucije, 6. proteini dobijeni nakon druge elucije, 7. proteini dobijeni nakon treće elucije,

4.2.10. Interakcija intergenskog regiona divergentnih *betC* i *betR* gena sa BetR regulatorom

Intergenski region divergentnih *betC* i *betR* gena, umnožen je PCR-om i kloniran u pGEM-T Easy vektor. Subkloniranjem iz rezultujućeg pGEMbetI konstrukt intergenski region je prebačen u pBluescript pri čemu je dobijen konstrukt pBSSKbetI (Materijal i metode, Tabela 2.), a zatim je tretmanom *Bam*HI i *Hind*III enzimima dobijen fragment koji je dalje u reakciji sa Klenow fragmentom DNA polimeraze obeležen biotinom. Obeležavanje biotinom zasnivalo se na uvođenju jednog obeleženog CTP-11-biotin molekula po fragmentu intergenskog regiona (CTP je uvođen pri popunjavanju 5' produženog kraja koje nastaje *Bam*HI digestijom, Materijal i metode, 3.17.2). Dobijeni obeleženi DNK fragment korišćen je u reakcijama vezivanja (vidi Materijal i metode) sa rekombinantnim SdsB proteinom (koncentracije 0, 50, 100, 150 ng). Takođe, u reakcije vezivanja dodavan je i holin sulfat (koncentracije 1, 10, 50 i 100 mM) kao koinducer.

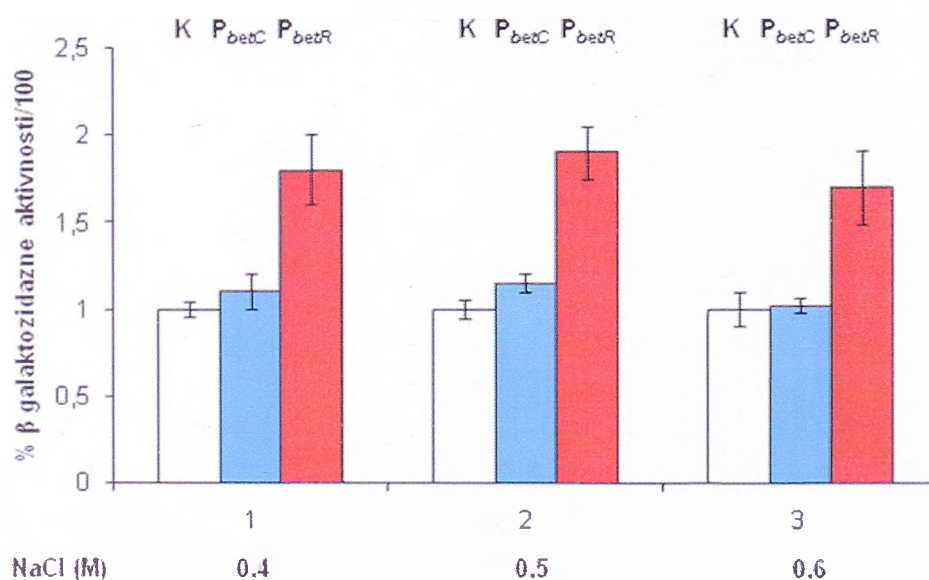
Koncentracija BetR proteina od 100 ng bila je dovoljna da dođe do pojave jasno vidljivih DNK-protein kompleksa (Slika 41.). Holin sulfat je dodavan u reakcije vezivanja u prisustvu 100 ng rekombinantnog BetR proteina. Prisustvo 1 mM holin sulfata bilo je dovoljno da značajno povisi afinitet vezivanja BetR proteina za intergenski region *betC* i *betR* gena, što se ogleda u jasnijem signalu DNK – protein kompleksa. Pri višim koncentracijama holin sulfata ne dolazi do značajnijeg povećanja afiniteta, ali dolazi do gubljenja gornjeg DNK – protein kompleksa (kompleks II, Slika 41.). U reakcijama kompeticije neobebeženog intergenskog regiona (isti fragment korišćen je za obeležavanje) dodatog u 100 x molarnom višku, sa obeleženom probom došlo je do gubljenja kompleksa DNK – BetR. Na osnovu dobijenih rezultata može se tvrditi da se BetR transkripcioni regulator specifično vezuje za intergenski region *betC* i *betR* gena i da mu je afinitet vezivanja viši u prisustvu holin sulfata kao kofaktora.



Slika 41. Specifično vezivanje BetR proteina za promotor divergentnih *betC* i *betR* gena. 1. Proba - CTP-11-biotin obeležen promotorski region *betC* i *betR* gena; 2. Vezivanje obeležene probe sa 50 ng BetR proteina; 3. Vezivanje sa 100 ng BetR proteina; 4. Vezivanje sa 150 ng BetR proteina; 5. Vezivanje sa 100 ng BetR proteina u prisustvu 1 mM holin sulfata, 6. Vezivanje sa 100 ng BetR proteina u prisustvu 10 mM holin sulfata, 7. Vezivanje sa 100 ng BetR proteina u prisustvu 50 mM holin sulfata, 8. Vezivanje sa 100 ng BetR proteina u prisustvu 100 mM holin sulfata, 9. Hlađenje neobebeženom DNK (promotorskim regionom *betC* i *betR* gena u 100 x molarnom višku); A – slobodna biotinom obeležena proba, B – kompleks I CTP-11-biotin DNK – BetR; C – kompleks II CTP-11-biotin DNK – BetR.

4.2.11. Analiza aktivnosti promotora *betC* i *betR* gena u osmotskom stresu

Radi utvrđivanja uloge *betC* gena u odbrani od osmotskog stresa, a samim tim indirektno i povezanost funkcije holin sulfataze sa sintezom osmoprotektanta glicin betaina, analizirana je β – galaktozidazna aktivnost promotora *betC* i *betR* gena u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u M9 minimalnom medijumu sa 0,2 % (v/v) citratom kao jedinim izvorom ugljenika u prisustvu povišenih koncentracija NaCl (0,4 M, 0,5 M, 0,6 M).



Slika 42. β - galaktozidazna aktivnost promotora *betC* i *betR* gena u pMP220 vektoru u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 analizirana u M9 minimalnom medijumu sa citratom pri povišenim koncentracijama NaCl (0,4 M, 0,5 M ili 0,6 M) 1. aktivnost promotora u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 gajenom u prisustvu 0,4 M NaCl, 2. aktivnost promotora u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 gajenom u prisustvu 0,5 M NaCl, 3. aktivnost promotora u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 gajenom u prisustvu 0,6 M NaCl, K – aktivnost pMP220 vektora, *P_{betC}* – aktivnost promotora *betC* gena, *P_{betR}* – aktivnost promotora *betR* gena.

Rezultujuće β – galaktozidazne aktivnosti promotora pokazale su da pri povišenoj koncentraciji NaCl u medijumu (osmotski stres) ne dolazi do aktivacije transkripcije sa

betR i *betC* promotora, odnosno da holin sulfataza i njen regulator nisu uključeni u odbranu od osmotskog stresa u soju *Pseudomonas* sp. ATCC19151.

5. DISKUSIJA

5.1. Funkcija *sdsA* i *sdsB* gena soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u biodegradaciji anjonskih surfaktanata

Pseudomonas sp. ATCC19151 okarakterisan je još 1963. (Hsu), a 1992. Davison i saradnici klonirali su i sekvencirali gene za koje se pretpostavlja da imaju ulogu u degradaciji anjonskog surfaktanta, linearnog primarnog alkil sulfata SDS-a (*sdsA* i *sdsB* gen). Na osnovu aminokiselinske sekvence potencijalne alkil sulfataze ovog soja formirana je grupa III sulfataza (Hagelueken et al., 2006). Upravo zbog značaja ove sulfataze u sistematizaciji sulfataza, ali i moguće primene soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u bioremedijaciji u cilju uklanjanja anjonskih surfaktanata iz zagađenih voda i zemljišta u ovom radu je analizirana sposobnost ovog soja da vrši biodegradaciju i funkcionalna analiza gena uključenih u biodegradaciju.

Mnoge vrste roda *Pseudomonas* su fakultativni patogeni čoveka i životinja, te su stoga često izloženi antibioticima kojima se tretiraju oboleli koje kolonizuju ove bakterije (Pitt et al., 2003). Izloženost antibioticima vremenom dovodi u prednost sojeve koji nose gene za rezistenciju i pojačava efekat horizontalnog transfera gena za rezistenciju koji se često nalaze na plazmidima. Rezultati testa mikrodilucije za soj *Pseudomonas* sp. ATCC19151 pokazali su da je ovaj soj osetljiv na aminoglikozide kanamicin i amikacin (Rezultati, 4.1.). Takođe, poređenjem MIK vrednosti za ATCC19151 sa MIK vrednostima za rod *Pseudomonas* definisanim od strane "EUCAST" ("European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing"), pokazano je da je soj otporan na visoke koncentracije ampicilina što ukazuje na to da ovaj soj verovatno poseduje gen koji kodira β – laktamazu, protein čija je funkcija inaktivacija ampicilina sečenjem laktamskog prstena. Rezistencija koju ATCC19151 poseduje na tetraciklin, hloramfenikol, tobramicin, nalidiksičnu kiselinu i gentamicin (Rezultati, 4.1.)

karakteristične su za pseudomonade i široko su rasprostranjene među sojevima ovog roda. Rezultati analize osetljivosti soja ATCC19151 na antibiotike omogućili su odabir plazmida koji su korišćeni tokom ovog rada.

S obzirom da je jedan od ciljeva ovog rada bio određivanje sposobnosti soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 da degraduje anjonski surfaktant SDS, analiziran je rast soja u prisustvu različitih koncentracija SDS-a u cilju određivanja koncentracije koja će se koristiti u testovima biodegradacije. Kao rezultat odabrana je koncentracija SDS-a od 5 µg/µl (0,5 %) u minimalnom medijumu, pri kojoj je ATCC19151 najbolje rastao tokom 48 h (u poređenju sa 0,75 % i 1 % SDS) (Rezultati, 4.2.). *Pseudomonas* sp. ATCC19151 nije rastao u prisustvu 4 % SDS-a, ali su sukcesivnim presejavanjem u medijume sa rastućim koncentracijama SDS-a preselektovane ćelije koje rastu na 4 % SDS-a u minimalnom medijumu. Preselektovane ćelije su verovatno usled selektivnog pritiska najverovatnije pretrpele promene u ekspresiji alkil sulfataze i/ili neke druge promene koje su im omogućile da rastu u prisustvu visokih koncentracija SDS-a. U toku rasta u prisustvu SDS-a ćelije soja ATCC19151 rastu pojedinačno, ali i formiraju ćelijske agregate. Prethodno je pokazano da subpopulacije *P. aeruginosa* takođe formiraju agregate, koje sačinjavaju ćelije, polisaharidi i DNK, u prisustvu SDS-a (Klebensberger et al., 2006). Smatra se da je formiranje agregata indukovano prisustvom SDS-a, ali da nije od suštinskog značaja za preživljavanje u njegovom prisustvu, već da predstavlja strategiju održavanja kulture u slučaju da je u sredini u kojoj se nalaze prisutna još neka toksična supstanca osim SDS-a što je najčešće i slučaju u otpadnim vodama (Klebensberger et al., 2007).

Biodegradacija SDS-a je osim na 30°C praćena i na 18°C da bi se utvrdilo da li soj ATCC19151 vrši degradaciju pri nižim temperaturama radi simuliranja uslova iz prirodnog okruženja ovog soja (Rezultati, 4.3.). Pokazano je da ATCC19151 sporije degraduje SDS na 18°C nego na 30°C, ali ukoliko se biodegradacija izrazi u odnosu na broj ćelija u kulturi, ili u odnosu na fazu rasta, onda je stepen biodegradacije isti i na 30°C i na 18°C. S obzirom da je biodegradacija SDS-a praćena u minimalnom medijumu, nametnulo se pitanje da li ATCC19151 može da degraduje anjonske surfaktante u prisustvu drugih toksičnih materija koje se u prirodi često nalaze sa SDS-om, jer vode zajedničko poreklo iz deterdženata. U tu svrhu praćena je sposobnost

rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u medijumu u koji je kao jedini izvor ugljenika dodat komercijalni deterdžent za pranje sudova "Fairy", jedan od najčešće upotrebljavanih deterdženata za kućnu upotrebu u Srbiji. U sastavu "Fairy"-a anjonski surfaktanti čine 10 – 15 % od ukupne zapremine. Pošto je ATCC19151 rastao na koncentracijama "Fairy"-a od 0,5 % - 15 % (v/v) (Rezultati, 4.4.) i degradovao trećinu prisutnih ukupnih anjonskih surfaktanata za 24 h, to ga čini dobrim kandidatom za prečišćavanje otpadnih voda poreklom iz domaćinstava. Većina domaćinstava u Srbiji danas svoje otpadne vode kolektuje u septičkim jamama, koje se nažalost ispuštaju u okruženje (Materijal i metode, Slika 11.). Upravo je prelivna voda septičke jame domaćinstva iz Beograda iskorištena da bi se uvidelo kako ATCC19151 raste u otpadnim vodama, koje su dobri kandidati za njegovu bioremedijaciju, a gde pored deterdženata figurišu i druge toksične supstance. Hemijska analiza neinokulisane prelivne vode septičke jame i inokulisane sa ATCC19151 pokazala je da tokom rasta ATCC19151 dolazi do značajnog povećanja koncentracije solubilnih fosfata i do blagog pada vrednosti p – i m – alkaliteta i nitrita, dok koncentracija nitrata opada dvadeset puta (Rezultati, 4.10.). Povećanje koncentracije solubilnih fosfata ukazuje na to da ATCC19151 ima sposobnost solubilizacije fosfora. Navedena karakteristika je od posebnog značaja s obzirom da se fosfor u prirodi nalazi uglavom u obliku nesolubilnih fosfata. Uzimajući u obzir da je biljkama za normalan rast neophodan fosfor, a procesi proizvodnje veštačkih đubriva koji sadrže solubilni fosfor su štetni po okruženje, poslednjih decenija se sve više istražuju mikroorganizmi koji mogu solubilizacijom da obogate zemljište fosforom (Moghimi i Tate, 1978, Illmer i Schinner, 1992). Stoga bi se bioremedijacijom korišćenjem soja ATCC19151 osim prečišćavanja voda i zemljišta od anjonskih surfaktanata ujedno postiglo i obogaćivanje sredine solubilnim fosforom neophodnim za rast biljaka. Nitrati, čija koncentracija značajno opada u prisustvu ATCC19151, su pak štetni po zdravlje ukoliko se nalaze u pijaćoj vodi u povećanoj koncentraciji (SAD 10 mg/l, Srbija 50 mg/l) jer su povezani sa ozbiljnim akutnim stanjima, posebno kod dece (<http://www.co.dare.nc.us/Water/tstexpl.htm>). Koncentracija anjonskih surfaktanata prelivne vode septičke jame tokom sedam dana rasta soja ATCC19151 opada za 85 % u odnosu na početnu. Dobijeni rezultat je od izuzetnog

značaja s obzirom da se pod uspešnom biodegradacijom smatra degradacija preko 60 % zagađivača tokom 28 dana.

U cilju utvđivanja uloge *sdsA* (kodira potencijalnu alkil sulfatazu) i *sdsB* (kodira potencijalni regulator ekspresije alkil sulfataze) gena soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u biodegradaciji SDS-a, a uzimajući u obzir rad Davison-a i autora (1992) urađena je analiza njihove funkcije. Mutant *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta sdsA$ nije rastao na SDS-u što nedvosmisleno pokazuje da *sdsA* gen kodira funkcionalnu alkil sulfatazu SdsA koja hidrolizuje SDS (Rezultati, 4.11.). Potvrda funkcionalnosti SdsA sulfataze je od izuzetne važnosti s obzirom da je reč o prvom opisanom predstavniku grupe III sulfataza, odnosno sulfataza koje pripadaju superfamiliji metalo – β – laktamaza, a do sada nije bilo poznato da li je uopšte aktivna i odgovorna za sposobnost degradacije SDS-a (Hagelueken et al., 2006). Regulacija ekspresije sulfataza koje pripadaju grupi III do sada nije analizirana, te su stoga konstruisane transkripcione fuzije koje su nosile promotore *sdsA* i *sdsB* gena, čija je aktivnost testirana u divljem soju, mutantu za *sdsB* gen i mutantu za *sdsA* gen. Aktivnost promotora *sdsA* gena (P_{sdsA}) u divljem soju, mutantu za *sdsA* gen i mutantu za *sdsB* gen je veoma niska i na nivou nešto većem od aktivnosti pMP220 vektora (Rezultati, 4.6.). Dobijena aktivnost P_{sdsA} upućuje na to da je aktivnost *sdsA* gena inducibilna, te da u nedostatku inducera (SDS) ne dolazi do ekspresije *sdsA* gena. Aktivnost promotora *sdsB* gena (P_{sdsB}) je identična u *sdsA* mutantu i divljem soju, dok je u *sdsB* mutantu 1,7 puta niža i jednaka onoj koju ima pMP220 vektor (Rezultati 4.6.). Obrazac ekspresije *sdsB* gena ukazuje da SdsB protein pozitivno reguliše svoju ekspresiju i kada inducer nije prisutan. Moguće objašnjenje bilo bi da je neophodan brz odgovor ćelije na prisustvo surfaktanata da bi se ćelija izborila sa navedenim stresnim uslovima. Prisustvo SdsB proteina u neinducibilnim uslovima verovatno obezbeđuje brz odgovor ćelije. SdsB tada ne aktivira ekspresiju sa promotora *sdsA* gena jer mu je za to verovatno neophodno prisustvo koinducera. Faza rasta soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 ne utiče na ekspresiju *sdsA* i *sdsB* gena, te ne predstavlja faktor indukcije, kao što je i očekivano. Do aktivacije ekspresije alkil sulfataze dolazi tek u prisustvu SDS-a u medijumu. U prvih deset minuta od trenutka dodavanja SDS-a u medijum dolazi do porasta aktivnosti *sdsB* promotora (5 x), najverovatnije posredovano SdsB

proteinom. Poznato je da transkripcioni regulatori LysR familije mogu da se vežu za ciljne promotore i bez prisustva koinducera, samo sa slabijim afinitetom (Schell, 1993). Vezivanje sa slabim afinitetom za promotore dovodi do takozvanog "curenja" sa promotora, dok se u prisustvu koinducera menja konformacija regulatora, dolazi do savijanja DNK i pune aktivacije transkripcije, što je verovatno slučaj i kod *sdsB* gena. Aktivnost *sdsA* promotora raste značajnije od petnaestog minuta od indukcije, tako da nakon 60 min dostiže četiri puta višu vrednost nego pre indukcije. Za aktivaciju ekspresije *sdsA* gena stoga je verovatno neophodno prisustvo inducera za promenu konformacije SdsB proteina koja bi potom omogućila pravilno pozicioniranje istog na promotoru (Rezultati, 4.7.). Specifično vezivanje SdsB proteina za intergenski region *sdsA* i *sdsB* gena, a samim tim i direktna regulacija ekspresije *sdsA* i *sdsB* gena, dokazana je "gel - shift" eksperimentom (Rezultati, 4.9.). Dodatni eksperimenti kojima bi se analizirao afinitet vezivanja SdsB regulatora za promotorske regione *sdsA* i *sdsB* gena, pojedinačno, sa i bez koinducera dodatno bi potvrdili pretpostavku o mehanizmu regulacije ekspresije *sdsA* i *sdsB* gena.

Sumirano, u ovom radu je pokazano da *sdsA* gen kodira funkcionalnu alkil sulfatazu, SdsA. Genska ekspresija *sdsA* gena regulisana je pozitivno SdsB proteinom koji se direktno vezuje za intergenski region divergentnih *sdsA* i *sdsB* gena, a takođe vrši i autoregulaciju. Prisustvo *sdsA* i *sdsB* gena u soju *Pseudomonas* sp. ATCC19151 omogućuje mu rast u prisustvu visokih koncentracija SDS-a (do 4 %). Zahvaljujući svojoj sposobnosti da degraduje alkil sulfate, ali i da toleriše prisustvo drugih toksičnih supstanci, što je pokazano eksperimentima rasta u prisustvu komercijalnog deterdženta i otpadne vode, soj *Pseudomonas* sp. ATCC19151 je dobar kandidat za bioremedijaciju u vodama zagađenim deterdžentima. Budući eksperimenti stoga bi trebali da pokažu da li soj *Pseudomonas* sp. ATCC19151 ispoljava toksično dejstvo bilo na biljni, životinjski svet ili čoveka. Takođe, osim ispitivanja bezbednosti upotrebe soja ATCC19151 u bioremedijaciji, precizno određivanje spektra zagađivača koje ATCC19151 degraduje pomoglo bi u pronalaženju staništa u okviru kog bi se bioremedijacija vršila.

5.2. Holin sulfatazni operon soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 i njegova uloga u osmoprotekciji

Holin sulfat koji se nalazi u zemljištu potiče uglavnom iz metabolizma sumpora biljaka i bakterija, ali i iz biljnih i životinjskih tkiva u raspadanju (Ikawa et al., 1972, Fitzgerald i Luschinski, 1977, Hanson et al., 1994). Do danas su opisani transportni sistemi za holin sulfat u mnogim bakterijama, uključujući pseudomonade rizosfere, što ukazuje na njegov značaj u prirodi (Ikawa et al., 1972, Fitzgerald i Luschinski, 1977, Hanson et al., 1994). Katabolizam holin sulfata u bakterijskim ćelijama započinje delovanjem hidrolitičkog enzima holin sulfataze (Galvao et al., 2006). Cilj našeg rada bio je da kloniramo, sekvenciramo i funkcionalno okarakterišemo holin sulfatazu kao i druge gene holin sulfataznog operona. Prethodno je pokazano da organizacija holin sulfataznog operona kod bakterija varira, a sve u zavisnosti od uloge koju holin sulfat, odnosno produkti njegovog katabolizma imaju u datoj vrsti (Osteras et al., 1998, Galvao et al., 2006). Subkloniranjem fragmenata pLAFRC kozmida i njihovim sekvenciranjem pokazano je da soj *Pseudomonas* sp. ATCC19151 poseduje holin sulfatazni operon koji čine konvergentni geni koji kodiraju potencijalnu holin sulfatazu (*betC*), potencijalni supstrat vezujući protein ABC transportera (*betD*), potencijalni sulfatni transporter (*betD*) i divergentni potencijalni LysR regulator (*betR*) (Rezultati, 4.12.). Slična organizacija je otkrivena i kod *P. putida* gde holin sulfatazni operon nema ulogu u osmoprotekciji (Galvao et al., 2006), a razlikuje se od organizacije operona kod *Sinorhizobium melliloti* gde se holin dobijen hidrolizom holin sulfata prevodi u glicin betain (Osteras et al., 1998). Geni holin sulfataznog operona soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 pokazuju najviši stepen identičnosti sa odgovarajućim genima potencijalnih holin sulfataznih operona iz sekvenciranih genoma γ – proteobakterija i β – proteobakterija. S obzirom da je nuklearno – magnetnom rezonancom za *P. putida* dokazano da holin sulfatazni operon nema ulogu u osmoprotekciji (Galvao et al., 2006) postojeća identičnost ukazuje na to da u ovim filumima ne postoji veza između osmoprotekcije i ekspresije holin sulfataznih operona. Pošto se u filumu α – proteobakterija (*Sinorhizobium melliloti*) holin dobijen hidrolizom holin sulfata koristi kao

prekursor osmoprotektanata, a uzimajući u obzir prethodne iznete konstatacije, možemo da pretpostavimo da je do divergencije funkcije holin sulfataznog operona došlo rano tokom evolucije (Galvao et al., 2006).

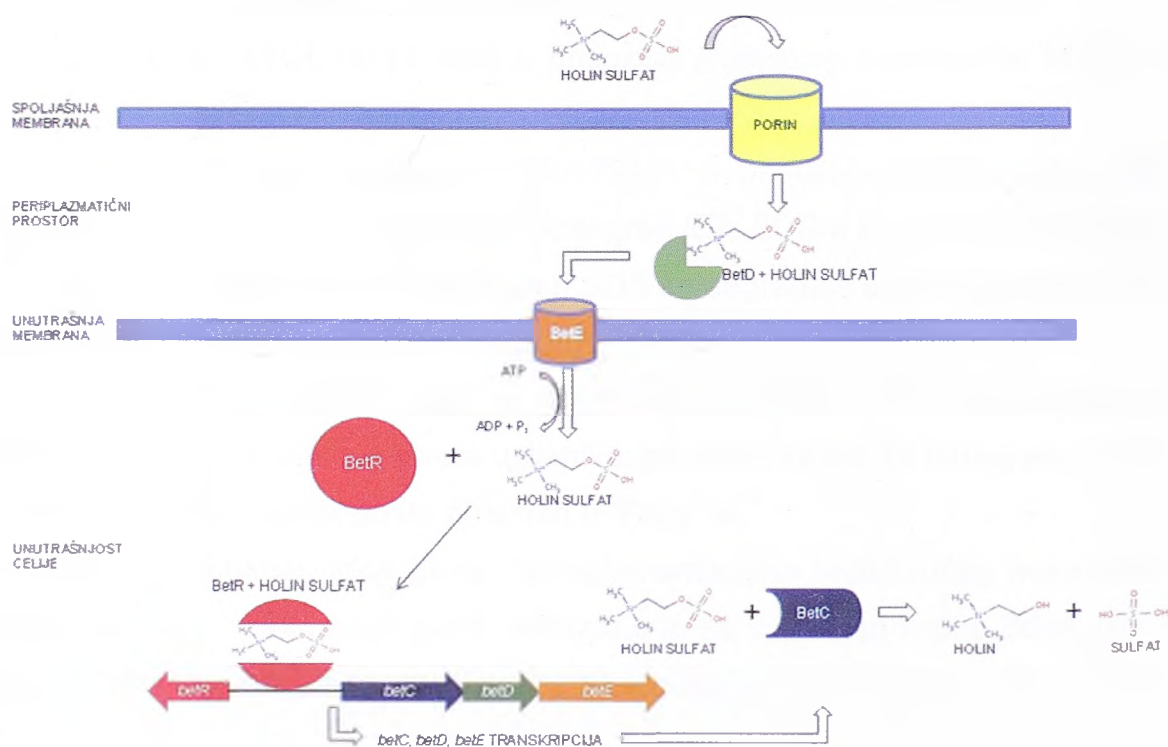
Analiza aminokiselinske sekvence BetC proteina pokazala je da u svom aktivnom mestu sadrži sekvencu CXPXR koju prepoznaju formilglicin generišući enzimi, te stoga pripada klasi cisteinskih sulfataza. Prisustvo sulfatnog transportera u operonu i činjenica da se cisteinske sulfataze uglavnom nalaze u citoplazmi ukazuje i da je BetC protein *Pseudomonas* sp. ATCC19151 najverovatnije lociran u citoplazmi. ATP vezivna komponenta karakteristična za ABC importere fuzionisana je sa BetE sulfatnim transporterom na njegovom C – terminusu i formira STAS domen. Na osnovu celokupne analize domenske organizacije proteina koje kodiraju geni holin sulfataznog operona soja ATCC19151 i rezultata dobijenih korišćenjem transkripcionih fuzija može se pretpostaviti da holin sulfat prolazi difuzijom kroz kanale spoljašnje mebrane u periplazmu gde se vezuje za BetD protein. BetD zatim interaguje sa BetE lociranim u unutrašnjoj membrani koji vrši aktivni transport holin sulfata u citoplazmu. Kada se holin sulfat nađe u citoplazmi vezuje ga BetR protein koji zatim menja konformaciju, što rezultuje derepresijom *betR* gena i aktivacijom *betC* gena.

Funkcija holin sulfataznih operona je dobro opisana, ali ne postoje podaci o regulaciji ekspresije gena koji čine operone, već se samo pretpostavlja da LysR regulatori, divergentno orjentisani u odnosu na holin sulfatazu, vrše regulaciju ekspresije (Galvao et al., 2006). Stoga su u ovom radu konstruisane transkripcione fuzije koje nose intergenski region *betC* i *betR* gena u orijentaciji kako *betC* (P_{betC}) tako i *betR* gena (P_{betR}) i njihova aktivnost je ispitivana u neinducibilnim i inducibilnim uslovima u divljem soju i *betR* mutantu (Rezultati, 4.19.). Aktivnost *betC* promotora merena u prisustvu citrata i holin sulfata (inducibilni uslovi) je tri puta viša u odnosu na onu merenu u prisustvu citrata. Takođe, aktivnost je bila nepromenjena kada je umesto u citratu i holin sulfatu divlji soj koji nosi transkripcionu fuziju gajen u glukozu i holin sulfatu. P_{betC} bio je neaktivan kada je divlji soj gajen u prisustvu holina ili betaina isto kao i u prisustvu citrata (aktivnost P_{betC} u slučaju kada je divlji soj gajen u prisustvu holina ili betaina bila je na nivou one u prisustvu citrata). Dobijeni rezultat ukazuje na to da je ekspresija *betC* gena inducibilna, da je holin sulfat inducer, i da nije pod kataboličkom

represijom pošto je do indukcije holin sulfatom došlo i u prisustvu glukoze. Kada je aktivnost P_{betC} merena u *betR* mutantu u neinducibilnim uslovima bila je ista kao u divljem soju, dok je u inducibilnim uslovima bila tri puta niža nego u divljem soju u prisustvu holin sulfata. Stoga ovaj rezultat potvrđuje pretpostavku da BetR protein aktivira transkripciju sa *betC* promotora u prisustvu koinducera holin sulfata. Potvrda ove hipoteze dobijena je i *in vitro* eksperimentima vezivanja BetR proteina za intergenski region *betC* i *betR* gena. BetR protein je pokazao znatno veći afinitet vezivanja za DNK koja sadrži navedeni intergenski region u prisustvu holin sulfata kao koinducera nego u njegovom odsustvu (Rezultati, 4.21.). Aktivnost *betR* promotora u prisustvu betaina ili holina bila je na nivou aktivnosti pMP220 vektora, dok je u prisustvu citrata (neinducibilni uslovi) bila blago povišena (Rezultati, 4.19.). U prisustvu citrata i holin sulfata (inducibilni uslovi) aktivnost u divljem soju raste 1,5 puta u odnosu na onu izmerenu u prisustvu citrata, dok je u *betR* mutantu nepromenjena u inducibilnim i neinducibilnim uslovima i identična onoj u divljem soju u inducibilnim uslovima. Rezultujuća aktivnost mogla bi da se objasni hipotezom da BetR vrši slabu negativnu autoregulaciju u neinducibilnim uslovima, dok u prisustvu holin sulfata dolazi do konformacione promene koja dovodi do aktivacije *betC* gena i derepresije *betR* gena. U cilju potvrđivanja hipoteze da holin sulfatazni operon nema ulogu u osmoprotekciji analizirana je aktivnost transkripcionih fuzija koje nose promotore *betC* i *betR* gena u divljem soju *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u prisustvu povišenih koncentracija NaCl. Aktivnosti kako P_{betC} tako i P_{betR} ostale su nepromenjene u prisustvu sve tri koncentracije NaCl (0,4 M, 0,5 M, 0,6 M), što je indirektna potvrda pretpostavke da holin dobijen hidrolizom holin sulfata ne služi kao prekursor za sintezu osmoprotektanata kod *Pseudomonas* sp. ATCC19151.

Na osnovu celokupne analize domenske organizacije proteina koje kodiraju geni holin sulfataznog operona soja ATCC19151 i rezultata dobijenih korišćenjem transkripcionih fuzija može se pretpostaviti da holin sulfat prolazi difuzijom kroz porinske kanale spoljašnje mebrane u periplazmu gde se vezuje za BetD protein. BetD – holin sulfat kompleks zatim intereaguje sa BetE sulfatnim transporterom lociranim u unutrašnjoj membrani koji vrši aktivni transport holin sulfata u citosol koristeći energiju u formi ATP-a. Kada se holin sulfat nađe u citoplazmi vezuje ga BetR protein koji zatim

menja svoju konformaciju, što rezultuje derepresijom *betR* gena i aktivacijom *betC* gena. Tako indukovana BetC holin sulfataza zatim hidrolizuje holin sulfat što ćeliji omogućuje da ga iskoristi kao izvor ugljenika, sumpora ili azota (Slika 43).



Slika 43. Šematski prikaz pretpostavljenog modela transporta holin sulfata u ćeliju i mehanizma aktivacije i delovanja holin sulfataze BetC.

Rezultati dobijeni u ovom radu po prvi put potvrđuju ulogu BetR proteina u regulaciji ekspresije gena holin sulfataze kod bakterija. Takođe, pokazano je i da BetR vrši slabu negativnu autoregulaciju u neinducibilnim uslovima. Izmerene nepromenjene aktivnosti P_{betC} i P_{betR} u prisustvu visokih subletalnih koncentracija NaCl, potvrdila su pretpostavku Galvao i saradnika (2006) da holin sulfatazni operon kod pseudomonada, a najverovatnije i kod svih γ – proteobakterija i β – proteobakterija nema ulogu u osmoprotekciji.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata predstavljenih u ovom radu mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Soj *Pseudomonas* sp. ATCC19151 raste u prisustvu anjonskog surfaktanta, SDS-a, kao jedinog izvora ugljenika u koncentracijama do 4 % (v/v).
2. Tokom rasta soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u prisustvu SDS-a, kako pri temperaturi od 30°C tako i 18°C, dolazi do biodegradacije SDS-a koja je najizraženija u logaritamskoj fazi rasta. Na 30°C celokupan SDS se degraduje do 48. sata, dok se na 18°C tokom 48 h degraduje 80 % od ukupnog SDS-a.
3. *Pseudomonas* sp. ATCC19151 raste u prisustvu do 15 % (v/v) komercijalnog deterdženta "Fairy"-a kao jedinog izvora ugljenika, pri čemu tokom 24 h degraduje 35 % od ukupnih anjonskih surfaktanata prisutnih u "Fairy"-u.
4. Insercionom mutagenezom *sdsA* gena i komplementacijom rezultujućeg mutanata konstruktom koji nosi *sdsA* i *sdsB* gene, dokazano je da *sdsA* gen kodira SdsA alkil sulfatazu koja omogućava preživljavanje *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u prisustvu SDS-a.
5. Analizom aktivnosti promotora *sdsA* (P_{sdsA}) i *sdsB* (P_{sdsB}) gena u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 divljem soju, mutantu za *sdsB* gen i mutantu za *sdsA* gen pokazano je da SdsB vrši pozitivnu autoregulaciju i pozitivno reguliše ekspresiju *sdsA* gena.
6. Analizom aktivnosti P_{sdsA} i P_{sdsB} tokom različitih faza rasta *Pseudomonas* sp. ATCC19151 pokazano je da ne postoji zavisnost transkripcije *sdsA* i *sdsB* gena od faze rasta.
7. Analizom aktivnost P_{sdsB} i P_{sdsA} u divljem soju *Pseudomonas* sp. ATCC19151 nakon indukcije SDS-om pokazano je transkripcija *sdsA* i *sdsB* gena inducibilna.
8. Eksperimentom interakcije prečišćenog rekombinantnog SdsB proteina i DNK koja sadrži intergenski region *sdsA* i *sdsB* gena dokazno je da dolazi do specifičnog vezivanja SdsB proteina za intergenski region.

9. *Pseudomonas* sp. ATCC19151 je rastao u sterilisanoj prelivnoj vodi septičke jame iz domaćinstva i tokom sedam dana degradovao 88 % prisutnih anjonskih surfaktanata, što ga čini potencijalni kandidatom za bioremedijaciju.
10. Kloniran je i sekvenciran operon koji sačinjavaju geni koji kodiraju holin sulfatazu (*betC*), supstrat vezujući protein ABC transportera (*betD*), sulfatni transporter (*betE*) i divergentno orjentisan potencijalni transkripcioni regulator (*betR*).
11. Kompjuterska analiza pokazala je da:
- BetC protein pripada superfamiliji alkPPc i da njegova aminokiselinska sekvenca na N – terminalnom delu sadrži CXPXR na osnovu čega možemo da ga svrstamo u sulfataze grupe I cisteinskog tipa locirane predomonantno u citoplazmi.
 - BetR protein pripada superfamiliji LysR transkripcionih regulatora
 - BetD protein pripada PBPb superfamiliji proteina lociranih u periplazmi
 - BetE protein pripada Xan_ur superfamiliji permeaza i da u okviru C – terminalnog regiona sadrži STAS domen koji vezuje i hidrolizuje ATP.
13. Insercionom mutagenезom *betC* gena i komplementacijom rezultujućeg mutanata kozmidom koji nosi celokupan holin sulfatazni operon, dokazano je da *betC* gen kodira BetC holin sulfatazu koja omogućava preživljavanje *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u prisustvu holin sulfata kao jedinog izvora ugljenika.
14. Analizom aktivnosti promotora *betC* gena (P_{betC}) u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 divljem soju pokazano je da je aktivnost P_{betC} indukovana prisustvom holin sulfata i da nije pod kataboličkom represijom. Takođe, pokazano je da se aktivnost P_{betC} ne indukuje u prisustvu betaina ili holina. Aktivnost P_{betC} u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta betR$ gajenom u prisustvu holin sulfata je 2,7 puta niža u odnosu na divlji soj. Navedeni rezultati ukazuju da BetR protein pozitivno reguliše transkripciju *betC* gena u prisustvu holin sulfata.
15. Aktivnost promotora *betR* gena (P_{betR}) je indukovana prisustvom holin sulfata, a u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 $\Delta betR$ u neinducibilnim uslovima aktivnost P_{betR} je 1,5 puta viša u odnosu na onu u divljem soju. Sumirano, aktivnost P_{betR} je negativno autoregulisana u neinducibilnim uslovima, dok u prisustvu holin sulfata dolazi do aktivacije transkripcije.

16. Interakcijom prečišćenog rekombinantnog BetR proteina i intergenskog regiona divergentnih *betC* i *betR* gena pokazano je da dolazi do specifičnog vezivanja BetR regulatora za intergenski region i da afinitet vezivanja raste u prisustvu holin sulfata kao kofaktora.
17. Analizom aktivnosti promotora *betC* (P_{betC}) i *betR* (P_{betR}) gena u *Pseudomonas* sp. ATCC19151 u prisustvu povišenih koncentracija NaCl (osmotski stres) pokazano je da holin sulfataza i njen transkripcioni regulator nisu indukovani osmotskim stresom, te shodno tome može da se pretpostavi da nemaju ulogu u odbrani od osmotskog stresa.

7. LITERATURA

- Alexeyev, M.F. 1999. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of Gram's negative bacteria. *BioTechniques* **26**: 824-828.
- Ankley, G.T., Burkhard, L.P. 1992. Identification of surfactants as toxicants in a primary effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**:1235-1248.
- Aravind, L., Koonin, E.V. 2000. The STAS domain - a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Curr. Biol.* **10**: 53-55.
- Battersby, N.S., Kravetz, I., Salanitro, J.P. 2000. Effect of branching on the biodegradability of alcohol-based surfactants, p. 1397-1407. *In the 5th World surfactant congress*. Federchemica, Milan, Italy.
- Berteau, O., Guillot, A., Benjdia, A., Rabot, S. 2006. A new type of bacterial sulfatase reveals a novel maturation pathway in prokaryotes. *J. Biol. Chem.* **281** (32): 22464-22470.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **12**: 248-254.
- Campos-García, J., Esteve, A., Vázquez-Duhalt, R., Ramos, J.L., Soberón-Chávez, G. 1999. The branched-chain dodecylbenzene sulfonate degradation pathway of *Pseudomonas aeruginosa* W51D involves a novel route for degradation of the surfactant lateral alkyl chain. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (8): 3730-3734.
- Cosma, M.P., Pepe, S., Annunziata, I., Newbold, R.F., Grompe, M., Parenti, G., Ballabio, A. 2003. A major step on the road to understanding a unique posttranslational modification and its role in a genetic disease. *Cell* **113**: 435-444.
- Davison, J., Brunel, F., Phanopoulos, A., Prozzi, D., Terpstra, P. 1992. Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes determining sodium dodecyl sulfate biodegradation. *Gene* **114**: 19-24.

- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J. 2008. Structure, function and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**: 317-364.
- Diaz, E.(editor) 2008. Microbial biodegradation: Genomics and Molecular Biology (1 st ed). Caister Academic Press.
- Dodgson, K.S., White, G.F., Fitzgerald, J.W. 1982. Sulfatases of Microbial Origin. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Esipov S.E., Adanin V.M., Baskunov B.P., Kiprianova E.A., Garagulia A.D. 1975. New antibioticly active fluoroglucide from *Pseudomonas aurantiaca*. *Antibiotiki* **20** (12): 1077-1081.
- Figurski, D.H., Helinski, D.R. 1979. Replication of an origin containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provide in trans. *PNAS USA* **76**: 1648-1652.
- Fitzgerald, J.W., Luschinski, P.C. 1977. Further studies on the formation of choline sulfate by bacteria. *Can. J. Microbiol.* **23**: 483-490.
- Fitzgerald, J.W., Scott, C.L. 1974. Utilization of choline-O-sulphate as a sulphur source for growth by a *Pseudomonas* isolate. *Microbios* **10**: 121-131.
- Galvao, T.C., de Lorenzo, V., Canovas, D. 2006. Uncoupling of choline-O-sulphate utilization from osmoprotection in *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **62** (6): 1643-1654.
- Haas, D, Defago, G. 2005. Biological control of soil born pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3** (4): 307-319.
- Hagelueken, G., Adams, T.M., Wiehlmann, L., Widow, U., Kolmar, H., Tummler, B., Heinz, D.W., Schubert, W.D. 2006. The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. *PNAS* **103** (20): 7631-7636.
- Hall, C., Brachat, S., Dietrich, F.S. 2005. Contribution of horizontal gene transfer to the evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukar. Cell* **4**: 1102-1115.
- Hanahan, D. 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hanahan, D. 1985. DNA Cloning (Glover, D. M., ed.) IRL Press, Oxford, 1, 109.

- Hanson, A.D., Rathinasabapathi, B., Rivoal, J., Burnet, M., Dillon, M.O., Gage, D.A. 1994. Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *PNAS USA* **91**: 306-310.
- Hayashi, K. 1975. A rapid determination of sodium dodecyl sulfate with methylene blue. *Anal. Biochem.* **67**: 503-506.
- Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M., Wallace, J.C. 1988. A large family of bacterial activator proteins. *PNAS* **85**: 6062-6066.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T.B. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T.B. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed.
- Hsu, Y.C. 1963. Detergent (sodium lauryl sulfate) splitting enzyme from bacteria. *Nature* **200**: 1091-1092.
- Hsu, Y.C. 1965. Detergent-splitting enzyme from *Pseudomonas*. *Nature* **207**: 385-388.
- Ikawa, M., Chakravarti, A., Taylor, R.F. 1972. Occurrence of choline in *Lactobacillus plantarum*. *Can. J. Microbiol.* **18**: 1241-1245.
- Illmer P., Schinner F. 1992. Solubilization of inorganic phosphate by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **24**:389-395.
- Imperato, T.J., Wong, C.G., Chen, L.J., Bolt, R.J. 1977. Hydrolysis of lithocholate sulfate by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **130**: 545-547.
- Jordon, S.R., Pabo, C. 1988. Structure of the lambda complex at 2.5 Å resolution: details of repressor - operator interactions. *Science* **242**: 893-899.
- Jovčić, B., Begović, J., Lozo, J., Topisirović, Lj., Kojić, M. 2009. Dynamic of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Arch. Biol. Sci.* **61** (2): 159-165.
- Kahnert, A., Kertesz, M.A. 2000. Characterization of a sulfur-regulated oxygenative alkylsulfatase from *Pseudomonas putida* S-313. *J. Biol. Chem.* **275**: 31661-31667.
- Kertesz, M.A. 2000. Riding the sulfur cycle metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 135-175.

- Klebensberger, J., Rui, O., Fritz, E., Schink, B., Philipp, B. 2006. Cell aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as an energy dependent stress response during growth with sodium dodecyl sulfate. *Arch. Microbiol.* **185**: 417-427.
- Klebensberger, J., Lautenschlager, K., Bressler, D., Wingender, J., Philipp, B. 2007. Detergent induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptive survival strategy. *Environ. Microbiol.* **9** (9): 2247-2259.
- Kosaric, N. 2001. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technol. Biotechnol.* **39** (4): 295-304.
- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M.W., Falkenberg, P., McDougall, J., Storm, A.R. 1991. DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 1049-1064.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-686.
- Lillis, V., Dodgson, K.S., White, G.F., Payne, W.J. 1983. Initiation of activation of a pre-emergent herbicide by a novel alkylsulfatase of *Pseudomonas putida* FLA. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 988-994.
- Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U.C., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R.P., Mann, B.J. et al. 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**: 865-868.
- Lukatela, G., Krauss, N., Theis, K., Selmer, T., Gieselmann, V., von Figura, K., Saenger, W. 1998. Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry* **37**: 3654-3664.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Manoil C., Beckwith, J. 1985. TnphoA: a transposon probe for protein export signals. *PNAS* **82**: 8129-8133.
- Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

- Miller, K.J., Wood, J.M. 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 101-136
- Moghimi, A., Tate, M.E. 1978. Does 2-ketogluconate chelate calcium in the pH range 2.4 to 6.4? *Soil Biol. Biochem.* **10**: 289-293.
- Muller, I., Kahnert, A., Pape, T., Sheldrick, G.M., Meyer-Klaucke, W., Dierks, T., Kertesz, M.A., Uson, I. 2004. Crystal structure of the alkylsulfatase AtsK: Insights into the catalytic mechanism of the Fe(II) alpha -ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily. *Biochemistry* **43**: 3075-3088.
- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 593-656.
- Osteras, M., Boncompagni, E., Vincent, N., Poggi, M.C., Le Rudulier, D. 1998. Presence of gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti bet* operon: choline-O-sulfate is metabolized into betaine. *PNAS* **95**: 11394-11399.
- Pitt, T.L., Sparrow, M., Warner, M., Stefanidou, M. 2003. Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. *Thorax* **58**: 794-796.
- Poccard, J.A., Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L.T., Poggi, M.C., Le Rudulier, D. 1997. Molecular characterization of the *bet* genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. *Microbiol.* **143**: 1369-1379.
- Saier, M.H. 2000. A functional phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 354-411.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schell, M.A. 1993. Molecular biology of the LysR family transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 597-626.
- Shi, J., Kloepper-Sams, P.J., Giolando, T., Federle, T.W., Versteeg, D.J., Belanger, S.E. 2000. Biodegradable high solubility alkyl sulfate surfactants: environmental safety profiles, p. 1525-1531. In the 5th World surfactant congress. Federchemica, Milan, Italy.

- Singh, K.L., Kumar, A., Kumar, A. 1998. *Bacillus cereus* capable of degrading SDS shows growth with a variety of detergents. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 777-779.
- Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503.
- Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Pees, E., Lugtenberg, B.J.J. 1987. Promoter in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. *Plant. Mol. Biol.* **9**: 27-39.
- Szameit, C., Miech, C., Balleininger, M., Schmidt, B., von Figura, K., Dierks, T. 1999. The iron sulfur protein AtsB is required for posttranslational formation of formylglycine in the *Klebsiella* sulfatase. *J. Biol. Chem.* **274**: 15375-15381.
- van Beilen, J.B., Eggnik, G., Enequist, H., Bos, R., Witholt, B. 1992. DNA sequence and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded alkJKL genes from *Pseudomonas oleovorans*. *Mol. Microbiol.* **6** (21): 3121-3136.
- van der Heide, T., Poolman, B. 2002. ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep.* **3**: 938-943.
- West, C.C., Harwell, J.H. 1992. Surfactants and subsurface remediation. *Environ. Sci. Technol.* **26**: 2324-2330.

PRILOG I

tgcttgcggcagcgtgaagctagctcagcgggscgaggccgggtgggggtgcggggcgtcctcgtcag
 gatcagcccgcgcacatcgctcggcagccggtgacaggggtgcgccgggcgaggctgaccaggccgta
 ggccgagcgttgcgacagcaggccggggcgcagctccagcagggccaggcgcccggcctcgatctc
 ttggccaccacgtccagtggcgccatgctcagcacgtcgtttccgccaccagcgccttcagcgc
 catgaagtgtgcattcgatgcccagcggctggccgctttccgccaaactgccccaggggcctgcgc
 cacctcggcggggcacctgggtgccggccagcgggtaggctgccaggctcgcccgccgctcagccggtg
 ccggcgcgggcccagcagcgggtgccccggctcggcagaaaatcaccocgggcccagctgcgcagcgg
 cgtgacctcagctgcgggtcgtcgcgcagttcccgcacatcggccacgaacagctccagggcatac
 gtccagcaggcgtgggtgcaggctgtaccagggtgtcgatggccaattgcaccgcaccccgggggtg
 tgccccggcgaagcgccccagcgcgccggggcaccaggcggggcgcggggtaggggcccggcaccag
 gcgcagttcgcgcgtgccaggttgtccagctgggagaccgcactgcgcagcgcgcggctgcgcgtc
 cagcaggcgcggggcgtgttcagcaccagccggccgtgggcgggtcaggctcacctggcgcggccc
 ccggtccagcaggcggcagcccaggccgttctccagggcctggatgctgcggctcaggggccggctg
 gctgagattcacgcctcggcggcacgggcgaagtggccgtgttcggccaggggcgacgaagtgaag
 gagctggcgtaggtcgttcacatgcgttgcctgcattgaaagctggataagaatgcattggcattatc
 attcggccgctgccagctctgtctgcgctcatccacaacaacaacgagccgacccatgcgactgacta
 cctgcttcagcggcctgctgctggccgcgaccctgcccctggggccgacgcggccctgcccgacga
 aaccctgaaagccagcatcaaccccgaactggccgaaacacaccggcacttcaaccagaaggtcta
 ccagggtggccgacaacgtctggtcggcgggtgggctggaaactcgcacaacagcgtgatgatcgaggc
 gcccgaggggctgatcatcgtcgcacaccggcgagtcgggtggaccagtcgcgcgaaggctcctgcgca
 gttccgcaagatcagcgcacaagcccatcaaggccatcgtctacaccacttccaccggaccacat
 caacggcgtgaaggccttcgtcagcgaagagcaggtgaagagcggcgagggtgcgcacatctacgcca
 ggaaaccctgctggacaacgtcgtcaccacaaggctcgtggtggggccgatcctcaccatgcgctc
 gggctacagcttcggcgttgcgctctccgacgaggacaagcgcgacatgaacgcggccctcgccc


sdsB1 →
 TaqI
 TaqI
 sdsB2 ←
 sdsI1 →
 sdsII ←
 sdsA1 →
 SalI

gctggcccacgagggcgctccaccttcatcgccccaccgacaccttccgcgacagcctcgacac
caccatcgccgggcttaaggtgcagttcctccacgtgcccagcgagggcgccggacgaaatcgtcct
ctacctgcccggacaacgcgctgctcatcagcgccgaggtgacccagggcccgaccctgcccacgt
ccacaccctgcgcgccaccaagttccgcgacccgggtggtgtgggtggcgagcctggacaagctgcg
ggccttccaggccgacgtgatggtgcccgtgcacggccagccgggtgagcgggcccggagaaggtgga
ggaggtgotgcgcatgaccgcgacgccatcgctacatccaacgaccagaccgtgcgctggatgaa
caagggcctgacccccgacgagctggtggagaaggtcaagctgcccaccacacctggccggctaac
gccctacctgcgcgagtactacggcacctggaagcacagcgtgcccagatctaccagggctacct
gggctggttccagggcgacccgggtggacctcgaccccatcccgcggcgagaaggccagggcgct
gatcgccctcatgggcccgtcgcgacaaggtgctgatggcggcccggcgatgcctacctgaagggcga
ctggcaatgggcccgaactgtccggctacgccatccgcgtcgaccacgacgacaaaactcgcccg
cgacatcaaggcccgcagcttccgcccctgggctacgccagcatgaacatcaactggcgcaactg
gtacctgatgagtgccatggagctggaaggcaagctggagggcgacgtggcgtggaatgtcccg
ccgggtgcgcgccgcttctctccccggacatgctgaagaacctgcccgcgcatcttctgca
gaactgggtgacgcgcatcgacccggagaagagcggcgacgtcgaactggcctgggcttgcctt
ccccgacatcgacgaagcctggaccctggaggtgcccgcggcgtggcccagctcaagtccggcat
tgaccccgccgtgcccctgcccctgaccctcgacaagcgctacctggacaccgtcatcagcggcga
gaacagcctgctcaagggagcgtgctgggggacgtgaaggtcgatggcaacctgctggacatcaa
gaccttctcggtgcttcgacttcgaggacgcccccatcgccctcaccgtgctgagccgggca

SalI

gggcgccctgcca

← sdsA2

Prilog I. Nukleotidna sekvenca *sdsB* gena, intergenskog regiona i *sdsA* gena. Osenčeni su regioni *sdsB* (*TaqI* fragment) i *sdsA* (*SalI* fragment) gena korišćeni u mutagenezi istih. Pozicije prajmera korišćenih u radu (Tabela 2., Materijal i metode) označene su strelicama (). Podebljanim slovima su označena potencijalna mesta starta (ATG) i završetka translacije (TGA) *sdsA* i *sdsB* gena koja su definisali Davison i autori (1992).

PRILOG II

ggcggcgcgtacgtcgaattcaacctggtggtcgaccgtggcaccctggtcggcctgcaatccggcgg
ggtaccgaaatccatcctcatgtccctgcccggccacgtgcgctggggctacgactggaagcccagagc
cgggcagcgaagaagcagcctcaccgagtaactcctccaggaccgcgactggctggccaccagccc
tgacgccccgcgcccggccaggcgcgctggcccggaccggcaagcgcacccaccgatgtagactccg
ccgctgatccgggcccgcctgcccggccttccaacgtgacgcccgaagcggactttcgaaccgccc
cggccctgccccaaaggacttcccatggaccgctactgcgctcttcggcaacccccatcggccacagcaag
tcgcccgtcatccatcgctctacgcccagcagaccggccagggtgctgagctacgaagcggctcctcgc
cccgttgaagacttcaccggctgcccggccttcttcggccaccggcctggggcggcaacgtcaccg
tgcccttcaaggagcaggccttcgaactggccgaccagctcagcgcggcggcggcggcggcggcggc
gtgaacacctgaagaagctcgacgacggccgcctgctcggggacaacaccgaaggcggcggcggcggc
ccgagacctcaccgcaacgcgggctgtccctggccggcaagcgcacccctcctgctggggcggcgggag
ggcggcggcgggggtgatcgaaccgctgctggcggaaaagcggcgtccctgggtgatcgccaaccgca
ccgtggaaggccgaagcctcgcccgcctggttcggcgaacctcggcccgggtgtccggcagcggcctc
gactggctggaagaaccggtggacctgatcaaacggcacctccggcagcctggccggcggacctgcc
ccccatcgcccctagcctcatccagccgcccacacggcctgctacgacatgatgatggcaaggaaac
cgaccgccttcaaccgctgggcccggccagccacgggtgccgcggcaccctcgacggcctcggcatgctg
gtggagcaggccggcgaagccttctgctgtggcgtggcgtgctgcccgacagcggcccgggactggc
cgaactgctgcccagctcggcggagggtgagcgaaccccggcctgacgcccgggctacggctcga**tca**
gcaggccgctgcctcgcctccagcttgcgcagctcccgtccacctgcccggggccggcggcggcggc
accaggcagcggccctccccggcaggcggcggcctcgtcgtggagcaggctgacccccgcgtagtcg
atgaaattgacgtgggtgggcatccagcaccaggcggcccggcctggctcttctggatcagccgctgag
gtacgggcaggcaccgaagaagatcgaccctcgatgcccagcaccctcctcatcaccctgtcgggct
gcagcaccggcggctgcgaggtgcgcttgaggtagaagaacagcgcaccagcacccccggcatagatg
gcccgttgcactccagcagcagggtgcggccagggtcagcgcacccaccgcaactccggcccggct
caccgcccacagctggcgcacccccggcggcctccagcaggcccagcagatcatcaggatgccagcgg
ccatcgcccggcagcgggatgtggccgatcaggctccggcggcccctatgccaacagcggcaccacagc
gcccagaaacaccccggccagggggcagcggcggcggcggcctgcagggttgagcccggaccgggtgaagga
gcccggcggcaggttagccggaaaaaccaggcggcggcaccagggtggacagcccctggccacggggttct
ggttcagctccagcaccctgcccggagcggctggccaggggcaccggcggatggacaggctgggtgaccagg
cccagcagcccgcacgccaccggcggcagcagcaggcggcagcagctgtcctcggcatcgaagcgcagcgt
cgccagtgggcggcaggctgccttggaaaggcggcaccggcggcaccggcggcggcggcggcggcggc
ccatcaccagcaggctgcccggcagcaggcccagcagcaggggcggcaggcggcggcggcggcggcggc
gccagaatcgacacggcaggctcacccccggcaccggctcagcgcagggcccgtgtgctcggcccagggtg
ggcggccagtgccagcggcctctgcccaggcggctggcggcggcctcggcggcaccaggccgagcagggt
tgggcaactgcccaggggcagatcaccagcggcggcaccagggtgaaaccgagcaccaccgactgcgag
acgaagtgcggcggggcggcgaagcgcagcagcaccatgaggaactggaaggccccggcagaaaggt
cagcagcagcaccaggccgatgtagctcctggctgccggcaaggccagggggctgacgctggccatca
gcaccaccgagatggcccggctgggcccggcggatcagggtgcggcggcagcggcccacaggcaggcggc
atcaccggcaccacggcggcatacagcccataggccggcggcagcggcggcggcggcggcggcggc
ggactggggcagcggcagcaccgcccggctcagccccaccagggtcaccggcggcagcggcccggggggc
gcaggccgggtagccagtgagggaagggggaagagatgggatggggcggatggcggcggctcgtgtggctc
ggttgcgggaggcggct**cat**tcggaaagggcaacgctgcccggcccggggtggggcggggttcaaccg
tgagagcggccccgggctgtgagagcggctcgggttcagagcttcgcctcaccgcccagcccac
gcccgcctcggcgggtggtcacgcccgttcaaccaggcctccagggtgcccgggttggccttgatccagg
ccttcaccgcccgcctcgttgetggccttgcggctcagcaccctggctccatcagcgtgtttccatccc
tgggtgaaactgcagggttggccagcagcggcccacgcttcgggcaactgctgggctgagccttgcggggc
taggggtgttcagcgtgcccgtctcggccgaagttagcgtcggcacccttcaggtagaccaggctcgtact
gcaggttcatcgggtgcccggctccagccagggaacaccacgaactcgttgcgcttaccgcccggccc
acctgcaccagcatcgctgctcgtggactccaccagcttcagtcggcccaggccgaactcgttcga
ccggatcatctcctggatggaaacgttggcccggcagcccggcggcggatgcccgtacagggtgtgcttga
accgctcggcatggctgtccaggctcggcgaaggctctcacccccggcctcgttagacgtagcggcggcacc
gccagggtgactcgggtgcccgtgagggtctcggccagcggcctccacctcggcggctggcggcggcggc
gtcgtagtgtgctctgctgggcccggcaccagttgcccagggaaggcgtccacctggcctctctgcaacc
cggcgaagatgatcggcaccggccagggtctgggtctcggcggcggtagcccagcccgtccagcagcagg

cgtgccacgccgttgggtcacggcaatgtcgctccagcccgggtcgcccagtttcaaccgtggcgagcg
 ggcgctcctcggcctgcgcccagggccaggggtgggtgctcagcaggccggcgccacggcaggggatca
 gcgtctt**cat**ggggcggtcct**ca**ggggttgggggaagcgcgcgggcgctccaggtcgctccaggtcgat
 gtggttgcgcatgtactgctggctggcgctcgacgaagggctggtgggtcccagctggtcagcgtgcct
 gggccagggcctcggcgacgaagcggcgggcgctggctggcgagggccgcctcggcgatggccgcg
 acgttccagcgcgcccgcctcgtcgaggaaggtcgccagcagcgcctggtggttcggcggagccggc
 caggttctccagctccagcgggtcgttggccaggtcgaaacagcaggcacgggtcctgctccgagtaga
 tgaacttccactgccggcgacggatcatcatcagcgggtggtggtgcttcggccATGTATTGCCC
 AGCACCTCGTCGTGGCCTTCGCGGCCCTCCAGGTGCGGCAGCAGCGAGCGGCCGTCCAGCGGCAGGTT
 CGCCTCCAGGCGGCCGCCGGCCAGTTCACACAGGGTCCAGCAGCGGTCCACGGTGGACACCGAGGCCG
 CCACCCGGCGGGCCGCGAAGCGCGCCGGGGCGTGCACCAGCAGCGGCACCCGGGCGGCCATCTCGAAC
 CAGTGCATCTTGTACCAGAGGCCCGCTCCCCAAGCATGTCGCCGTGGTCCCGGAGAACACCACGAG
 GGTGTCCTCGGCCAGGCCGACTCGGCCAGGGTCTTCAGTAGCGCGCCGACCTGGTCGTCGACGTAGC
 TGCAGGCGCCGAAGTAGGCCCGGCGGGCATCGCGGATCTTCGCCTCCGGCAGCGGCTTGCCCCACAGA
 TCGATGACCTTCAGCAGGCGCTGGCTGTGGGGTCTGCTCGTGGTCCGGCGAAGCGCACCCGTGGCAT
 GGGGATCGCCGCTCGTCGTGGCGGGCCAGTAGTCGGCCGGGATGGTGTAGGGGTCTGGGGGTGGG
 TCATCGACACCGTCAGGCAGAAGGGCTGGTCCGCCCGCTGGCGCACGTGGTTCGTAGAGGTACTGGCGG
 GCCTTGAACACCACCTCCTCGTCGAAATCCAGCTGGTGGTGGTGGCAGCTCGGCCCGGCCTGCAGCAC
 CGAGGACATGTTGTGGTACCAGCTCGGGCGCACATCCGGCGCGTCCCAGTTCACCGCCAGCCGTATT
 CGGCGGGGTAGATGTCGCTGGTTCAGGCGCTCCTCGTAGCCGTGCAACTGGTCCGGGCCGAGAAGTGC
 ATCTTGcccagacagcgcgctgcggtagccgagggcgcgaggtagtggcgtaggtggggatgtcggc
 ggggaactcggcggcggttgcgtagggcgccgatcttcgacggcagctgcccgctcaccaggggtgaagc
 gcgagggggcgcacagcgggtggtgtagtagggcagcagcggcgcgccatctggtc
 gccatgatgaagaggatggtggggcggtt**cat**cgtgcgcttatccataccgatgaattatgcgagag
 tgcgtggcgctgatgattgctcagcccttcgccccggtaaacggcacggggagacatgactcggataa
 gcaaggcttat**tg**gcagatctccctgacatgcacctcgacctgctgogtgtggttcgagggcgcgccc
 ccacctcagcttcaccgcgctgcccgtggagctgggcaccaccagccggcggtgagccagcagatcc
 agcggctggagaagcaactggcgacccggctggttcgaccgcgctc**CCGCGGCATCGAACTCACCGAT**
 GCCGGGCGCGTGTGTTCCCTCCACGTGCAGGAAGGCCTGCAGGCGATCCAGGCCGGCCTGGAGGCCGT
 GGGCGCCCGCAGCCAGCACGAGGTGCTGCAGGTGGCCACGGACTTCGCCTTCGCCGCCTACTGGCTGA
 TGCCGCGCCTGCACCCTTTCATGAAGCCAACCCGGACATCGAGTCAGCCTCGTCACCAGCGACCGCA
 CCATGAACATGCTGCGCTCGGAGGTGGACATCGCCATCGCCTTCGGCGACGGCCGCTTCAAGCACGGC
 GATGCCCTGCTGCTGTTCCGCGAGGAGTCTTCCCATCGCCAGCCCGCGCCTGCTGGCCGGGCGCGC
 CACGCCGCTGCCGGCCGCGCGCTGGCCGAGCTGCCGCTGCTGCACCTGAAGCCGGAGGTGCGCACCC
 GCTGGTTCGACTGGAGCAGCCTGTTCCGCGAGCTGGGCATCAGCCAGAGCCCGCCCTCCGGCGCGCTG
 CGTTTCGACAACCTACACCCTGCTGATCCAGGCCGCCATCGCCGGCCAGGGCGTCCCATCGGCTGGCG
 CTACCTGGTGGACGACCTGCTGGAGCAGGGCCTGCTCGCCCCGCTGCTGGAAGGCCGGGTGTGCTCGG
 ACCTCGGCTACTACCTGGTCCAGCCCGAGCGCAAACGCCGCGCCCGGATGATGAAATGCTTCGTCGAC
 tggctgcaacatgagctggcgatgctgctcgacaggcacatctgatccacaatcagagggcatcgc
 gatc**tg**agctcaaagctctgcagaccgcaaccatcggttggggcgtcgctatcatgtgatgcccgtcac
 ggggtcgccgcccctgagcgtcatgcagaggccacaaccttcgccattactgacacaccaccactcca
 aagagcgtgcccccaatgagaccgacctcccgcctggtcgccagccttgtgctgtgcgccctcgccg
 gccaggcccacgcctggtcgagcccaccacaagaacatcgtcaaggatgccctggcgtacatgaac
 tccgcctacgccaccgaggagatgcccaggcctatgccttctacgtcggcgccgcccggcagcagggc
 caaggccggcgagatcctcggtcaggccgctacgacgtggacgacttccgcgacacgcgcctgggtg
 gctggtgggtcggctacgaatacgccccggtgtggaatgccgcccgaagctggtgaactacacctcc
 tactggcacttctcaacatgggcccagggcgatgccacggcaacctcagggcggctacgacta
 ccgctaccacaaggtggacggcaccatcgccgacgtggactggtacgccaaaggtctacctgtacaacc
 gcgagctgaaacgcgaggacttcgacaccaccgagggccactaccggcgggcagccgggtccaactgg
 caggagcactacggcgacttccagaccgccccttccagcccatcgataacctcgccggtactggtt
 cgaccagttccgcgcccctcgtgcagaccatcggtatgcctgcacgctaccggcgacgtgg
 cccagcctcaccacgtgtggtacacctcgcccaacggccacgtcagctgggaaggctgggtcgatgac
 cactacgccagcgagaaactcaacgaccccaccgctggtggccaacctcatcagccgctacgaccggc

ccgcagcattcgcgagctgctgacccagaccggccaggtgcctacgcccaccccgagccgctctacg
 acaccagctacgccacccggctgcgggctgcccgcgagctgatccccgagtcctatcgccctgaccgctc
 accgtgctgaccaagggcgcacgcagcttcaatgcccgatgaaagcctctgatcgccccctggcgccggc
 gggggccctggcgctgctgctcggcgctggctcggcgggcgcgaggccatgccccagcgccccggac
 ctgcgcatcgacggccagcgctgcccggacgcagcatcgccctgctggaacaggtgctcaccggggc
 aaagtcaaacaccgacccgcgcccagctgcgcccggcctgggtggagaaccacctgctggcgcgggaa
 ctggagccgcagctgaacgagcagaaccgcccgcgacctcgacgccagtgctgagatcgaggccggcaa
 cctgctggagcagtaacttcggccgcccgcgcccaggaagaacctcagcccctacctgcgccagccccggc
 cgctcagcgcgggagcgccctgcgccaggtgctggcccccgcccgcgctgctgggtgggacagcctg
 cagctggacccgacccagacccgcgaagcggcagccaccgagctgatccgctggcagttccccgggta
 aaccgagcagcgccctcgacctgctcgacctctaccagggcgacaacgtccagggccgctgtggagctgc
 agcagggcaacctcggctacctggcgcgccaggtccaggccccggattcagcgggaccgctctctggtad

Prilog II. Nukleotidna sekvenca holin sulfataznog operona i gena koji ga ovičavaju. Osenčena su *NotI* (svetlo sivo) i *KpnI* (tamno sivo) restrikciona mesta. Plava slova – *betE* gen, zelena slova – *betD* gen, crvena slova – *betC*, narandžasta slova – *betR* gen. Potencijalna mesta početka i kraja translacije su podebljana. Regioni *betR* i *betC* gena koji su korišćeni u mutagenezi su prikazani velikim slovima. Podvučeni su nukleotidi koji u *betR* sekvenci čine mesta koja prepoznaju *SaII* i *SacII* enzimi, odnosno koji su u *betC* sekvenci komplementarni prajmerima koji su korišćeni u PCR reakciji za dobijanje fragmenta za mutagenezu (*MbetCF* i *MbetCR*). Intergenski regioni holin sulfataznog operona su prikazani italic slovima.

PRILOG III

A	GTCA TGGGGGTGGCTCATTCGACACCGGTCAAGGCAAGACGGCTGCTCCGGCGT-CAGACGCACCGGGTGTAGAGGTACTGGGGCCCTTGAACACCACTCTCGTGGAAATCCAGCTGCT	1026
B	GTGTCGGGATGGGTCAATCGACACCGGTGAGGCGAAATGGCTGG-CCGGGDTGCTGGCGCAACATGGTGTAGAGTACTGGGGCCCTTGAACACCACTCTCGTGGAAATCCAGCTGCT	1026
C	GTCA TGAAGGTTGACTATTGAAACCGGTCAAGCAAGACGGC-CCATCACCGTCTGGCCACACATGGTGTAGAGTATGCTGGACTTGAACAGCACTTCTCATGCGAAGTCCAGCTGCT	1026
D	GCCGCCCGGGGTG-----CCGCTGTGTGTGCACCGCCCGGGCGCTTCCGGGGCCCGGGGTGGGGCCCTCGGTGTCCACCGTGGACCTG---CTGCCAACCTGGTGGAA--CTGGCGCG	1038
A	TGCTGGCCACGCAGGGGGCCGGCC--TGCAACACCCGAGCATGTTGTGTATCCAGCTGGCCCGC-ACCCTCCGCTTCG--TCCAGTTTCACCCCCAGCCCTAGTC--GGCCGGGTAGAT	1138
B	TGCTGGCCACGCAGGGGGCCGGCC--TGCAAAACCCGAGCATGTTGTGTATCCAGCTGGCCCGC-ACCCTCCGCTTCG--TCCAGTTTCACCCCCAGCCCTAGTC--GGCCGGGTAGAT	1138
C	TGCTGGCCAAATGCACGGCCGGCC--TGCAACACCCGAGCATGTTGTGTATCCAGCTGGCCCGC-ACCCTCCGCTTCG--TCCAGTTTGAACCCAGCCCTAATC--GGCCGGGTAGAT	1138
D	GGCCGGCCGTGAGCGCAACCTGCCGCTGACGGCCGCTCGC-TGCTGCCCCACCTGGAAGGCCCGGGAAGGCCACGACGAGGTGCTGGCGAATPACATGGCCGAAAGCACACCCCGCT	1157
A	GTCCGCTGTTACAGGCGTTCCTCGTACCCCGTGCAGCTGCTGCTCCGGCCAGAAAGTGCATCTTGCCCGACAGCCGGTGGCTAGCCG-AGGGCGGCAGGTAGTGGGCTAGCTGGGCACGT	1257
B	GTCCGCTGTTACAGGCGTTCCTCGTACCCCGTGCAGCTGCTGCTCCGGCCAGAAAGTGCATCTTGCCCGACAGCCGGTGGCTAGCCG-AGGTGGCAGAGTGGGCGTAAAGTGGGGTAT	1257
C	GTAC TGGTACAGGCGTTCCTCGTACCCCGTGCAGCTGCTGCTCCGGCCAGAAATGCATCTTGCCCGACAGAAATGCATCTTGCCCGACAGCCGGTGGCTAGCCG-AGCCAGCAAGTATGGGCATAGCTGGGAATAT	1257
D	GATGATGATTCCTGCGCCGGCAGTGGAAATTCATCTTACCTGGAGGAGCACCCTGCTGCTGTTGACCTGGCCAACGACCCCGCTGGAGACTGGAGAACCTGGCCGGCTCCCGCGAAAC-C	1276
A	CGGGCGGAAAGTCCGGGCGCTTGTGCATAGGCGCCGATTCGACCGCCAGCGCCCGCTGACCAAGGGTGAAGCCGACCGCCCGCACAGCGGGCTGTTGCAAGTGGCCGATGCGAACACCA	1377
B	CGGGCGGAAAGTCCGGGCGCTTGTGCATAGGCGCCGATTCGACCGCCAGCGCCCGCTGACCAAGGGTGAAGCCGACCGCCCGCACAGGGGCTGTTGCAAGTGGCCGATGCGAACACCA	1377
C	CGGGCGGAAAGTCCGGGCGCTTGTGCATAGGCGCCGATTCGACCGCCAGCGCCCGCTGACCAAGGGTGAAGCCGACCGCCCGCACAGGGGCTGTTGCAAGTGGCCGATGCGAACACCA	1377
D	AGGGCCTGCTTGGCCACTTCTCGACGAGGCGCGGGCGGCTGGAACGTTCGGGCCATTCGCCAGGGCCCTTCGCAAGCCGCGC--CCGCTTTCGT--CGCCGAG-----GCC	1387
A	CGGGCCGTTCCGGCCAGTTCATCAGGTTGGGCATTCGACCGCCGAGCGCCGACCGCCGACCGCCCGCTGACCAAGGGTGAAGCCGACCGCCCGCACAGGGGCTGTTGCAAGTGGCCGATGCGAACACCA	1494
B	CGGGCCGTTCCGGCCAGTTCATCAGGTTGGGCATTCGACCGCCGAGCGCCGACCGCCGACCGCCCGCTGACCAAGGGTGAAGCCGACCGCCCGCACAGGGGCTGTTGCAAGTGGCCGATGCGAACACCA	1497
C	CGGGCCGTTCCGGCCAGTTCATCAGGTTGGGCATTCGACCGCCGAGCGCCGACCGCCGACCGCCCGCTGACCAAGGGTGAAGCCGACCGCCCGCACAGGGGCTGTTGCAAGTGGCCGATGCGAACACCA	1491
D	TGGCCCA--GGGCACGCTGACCAAGCTGGGA-----CACACGCCCTTCGTTGACGCGCCACGACGATCATCGCCAACCCAC--ATCGAACCTGGACGACCTGGA-GCGCCGCGCGCGCT	1495
A	TCAT-----	1498
B	TCAT-----	1501
C	TCAT-----	1495
D	TCGCCCAACCTGGA	1509

Prilog III – A. Poređenje nukleotidne sekvence *betC* gena soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 (D) sa sekvencama potencijalnih holin sulfataznih gena iz sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp (A), *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (B) i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (C).

Osnovni nukleotidi su identični u sve četiri sekvence.

Kloniranje i molekularna analiza sulfataznih operona soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151

```

A -----MKR-PNILEFTIWDQMAAPLLEPHDAASPVQWPNLMKLAERAVVFPDPSAYCNSPLCARSREFTLVSGRLPSQIGAYDNAADPEADVPTYAHYLRRLGYRTALSQKMHFCGPDQLHGXE 114
B -----MKTSPNILEFTIWDQMAAPLLEPHDRSVLKRPHLSRLAERAVVFPDPSAYCNSPLCARSREFTLVSGRLPTRTIGAWDNAADFAADPTYAHYLRNLGYRTALSQKMHFCGPDQLHGXE 115
C MDKRTMKR-PNILEFTIWDQMAAPLLEFETPTSSPLKVPHLARLAEFGVFPDPSAYCNSPLCARSREFTLVSGQLPSKIGAYDNAAEFPADIPTYAHYLRRLGYRTALSQKMHFCGPDQLHGXE 119
D -----MKR-KNILEFTIWDQMAAPMLDFPY-ARSPILMPNLSRLAADGVVFPDPSAYCNSPLCARSREFTLVSGQLPSRIGAYDNAADPEADIPTYAHYLRALGYKRTALAGKMHFCGPDQLHGXE 113

A ERLTSDIYPADYGWAVNWDEPDVRAASWYHNWSSVLDQAGPCVRSNQLDFDEEVVFKARQYLVDHVRLTPEQPECLTIVSMTHPHDPEYTI PREYWERVEGVDI PMPRQHI EQAEQDPHSGRLL 234
B ERLTSDIYPADYGWAVNWDEPEVRPSSWYHNWSSVLDQAGPCVRTNQLDFDEEVVFKARQYLVDHVRFQHAGQPFCLTIVSMTHPHDPEYSI PASYWNLYRDEDI PLPRQRFQAEQDPHSGRLL 235
C ERLTSDIYPADYGWAVNWDA PDVREPSWYHNWSSVLDQAGPSVRTNQLDFDEEVVFKARQYLVDHVQRADQPECLTIVSMTHPHDPEYTI PADYWARHDEAAI PMPRVRFADHEQDPHSGRLL 239
D ERLTSDIYPADYGWAVNWDEPDVRSWYHNWSSVLDQAGPCIRTNQLDFDEEVLFKSQQLYLDHVHQDGDARPECLTIVSMTHPHDPEYTI PLDFEWDLYADDEI PMPTPHANQALDPHSGRLL 233

A KVIDLMDKPLPADKIDARRAYFGACSYIDNIGKLIKLTLEECCGLAEDTLIVFSGDGHDMIGERGLWYKMHWFEMAAARVPLLVNHAQRFAAHRVVSQSVSTLDDLPTLVELLAGRVEEGEA 354
B KVIDLMDKPLPEERIKARRAYFGACSYVDDQIGALLATLEECGLADDTIVVFSGDGHDMIGERGLWYKMHWFEMAAARVPLLVNHA PAREFAPRRIGASVSTVDDLPTLVELLAGGQVDPRLP 355
C KVIDLWGRPLPEAKIDARRAYFGACSYVDDQV GALLIKTLAECCGLAEDTLVFSGDGHDMIGERGLWYKMHWFEMAAARVPLLVNHA PAREFARRVAA SVSTVDDLPTLVELLAGRLEANLDP 359
D KYVDLMDKPMPTDKIDARRAYFGACSYIDINVGKIMQTLDEVLAEEDTLIVVFSGDGHDMIGERGLWYKMHWFEMAAARVPLLVVYAPRGQEFKPRGRVSA SVSTADLLPTFVEMAKGRLDAGLP 353

A IEGRSLLAHLTGGEGGHDEVIGEYMAEGTSPMLMTRRGPMWKFVYSQDPLLFLHLQDDPQERENLAGSADHQGVLAEFLEAARAEWDIPAIHAATLASQRRRRLVAEALVSQGLTSMWDHQ 474
B IEGRSLLPHLRDGGSGHDEVIGEYTAEGTISPIMMIRRGDYKFIYSEQDPCLLYDLRNDPQERENLAASPARHGTFEAEFLDEARRRWDIPAITRAVLD SQRRRLVAALDARGRLTSMWDHQ 475
C IDGRSLLPHLEGRGHDEVLGEYMAEGTSPMLMTRRRQWKFVIYSEQDPCLLFDLANDPLELENLAGSAEHQALLATFLDEARARAWNVAA LAEALASQRRRRRVAEALDAQGTLSMWDHQ 479
D MGRSLMPHIKRRKGHDEVFGEYMAEGTSPMLMIRRGAYKFIYSEQDPCLLFDVYKDKPKRQKDLDSQSPHHEKLFNDFLAERAKWDIPAIHQVVLASQRRRRRVAKSLATGKDKSMWDHQ 473

A FWDVDSQQYMRNHIDLDLLERRARYPQV 502
B FVIDASQQYMRNHIDLDLLERRARFPQP 503
C FVVDASQQYMRNHIDLDLLERRARFPQP 507
D PLVDASQQYMRNHIDLDLLERRARFPQP 501

```

Prilog III – B. Poređenje aminokiselinske sekvence BelC proteina soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 (B) sa sekvencama potencijalnih BelC proteina soja *Pseudomonas mendocina* ymp (C), *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (A) i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (D). Osenčene aminokiseline su identične u sve četiri sekvence. Podvučene aminokiseline formiraju tzv. sulfatazni potpis (C/S)XPXR koji predstavlja motiv koji prepoznaju enzimi koji prevode cistein ili serin u formilcistin.

PRILOG IV

Kloniranje i molekularna analiza sulfataznih operona soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151

A	ATGCCAAAGTGTCTGGATGATGATTTTCCCTGGACACGCTGGGGGTGTTCGAATCCGGCCGGCCGGCCCTTGCCTGAGCTTTCACCGGGGGCCAAACGAGGAGCAAGCCAGCCGGCCATCAGC	120
B	ATGGGAGAACCCCTCATGCCCCATCCGCTGACCTGCTCCGGGATATCCGGATCCCGCCGGCCAACTCAGCTCAGCCGGTGGAGAGCTTGGGACCAACCCAGCCCTGGGTACAGC	120
C	ATGGCAGATTTCCCTGAC---ATCCGCCCTGACACTGCTGGGTGTGTTCGAGCCCGCCCGCCCACTCAGCTTACCCGGCCGCTGAGCCAGCCACCCAGCCGGGGGTAGCC	117
D	ATGTTTGAATCTTTGGCGATGTTCACCTGACCTTGGGTTGAGGTCCGGGGCCGCTTACGCAAGCTTTCACCGGGCCAGCCCTCGAACTGGGCACGACAGCCCGCTGTACAGC	120
A	CAGCAGATCAAAACCGCCTGGAACAGCACTGGCGGTACCGCTGTTCGACCCCGGTTCGATCCGGGATTTGGTCTGTAGCGGAAGCGGGGCAACTGTTCGCTTACGTCGAGGAGGGCCCTGCAC	240
B	CAGCAGATCAAAACCGCCTGGAAGAAGGAGCTGGCGACCTCCTGTTCAGCGGTATCCAGAGGATCCAGAGGATCCGACCGCGGCGAGCTCCGCAACCGGAGCCCTGCAG	240
C	CAGCAGATCCAGCGGCTGGAGAACAATGGCCGACCCCGGCTGTTCGACCCGGCTTACCCGGGCAATCGAATCACCAGATGCCGGGGCGGTCTTCCACACGTCGAAAGGCCCTGCAG	237
D	CAGCAGATCAAGCGCCCTCGAAGAGCAACTCCCTTACCCCGTCTGTTCGACCGGATTTAACCGGTTGATTCGAAATTCGACCGCGCGGTAAGTGTGTTCAGCCATGTCAGAGCCCGGGCTGCAA	240
A	AGCCTGGACAGGGCCCTGCAGCGGTGGTCCGCGCGCCAGCAGCATGAGGTGCTGAGGTGGCCACCCGATTTCCGCTTCCGCGCCCTACTGGCTGATCCCGGCTTCGACGCGCTTCCATCAG	360
B	ACGATGATGCCGGGATTCGCCCGGCTGGGGCGCCGCGCCAGCGCCACGAGGTCTCCAGGTGGCCACCGACTACGCTTCCGCGCCCTACTGGCTGATCCCGGCTTCCGCGCTTCCACAG	360
C	GGATCCAGCGCCGCTGGAGGCGCTGGGGCGCCGACGCGCAGCAGAGGTGCTGGGCGGAGCTTCGCTTCCGCTTCCGCGCCCTACTGGCTGATCCCGGCTTCGACCGCTTTCATCAG	357
D	TCGATCGACAGCGGAGTGTAGCCATTCACCGAACACCAACGACGACGAGTAGTCTCAAGTGGCGACCCGACTTCCGCGCGCTTACTGGCTGATCCCGGCTTCGACCGCTTCCACAG	360
A	CTGCACCCGGAGGAGTGGACGTGAGCCCTGGTGAACCAACCGCGACTTTGGCGGCAACTTGGCCGGGGGAGATTCGACGTGGCCATCAGTTTGGCGGAGGTGGCTGCAAGCAGCGCGGAGAGCC	480
B	GCCCATCCCGACCTTGACGTGAGGCTGGTGAACCAAGGAGCGCGGCGGCTGGCCGGC---CAGGGCGGAGATTCGACGCTGGGACTCTGTTCCGCGCCCTACTGGCTGATCCCGGCTTCCACAG	477
C	GCCAAACCGGACATCGAGTCAAGCTGACACCGACCGCAACGAGAACATG---CTGGGCTCGGAGTGGACAATCCGCAATCGCCTTGGCGGAGCGCCGCTTTCAAAGCAGCGCGGATGCC	474
D	GTCAAACCCGGAGCGTGGACGTACGCCCTGGTACCCAGCGGACGCTTACGACAGCATG---TTAGCGCCGATATCGACTTGGCTTGGCTGAGCCGGGCGCTTCAAAACAGGAGGAAAGC	477
A	CTGCTGCTGTTCGGCGAGGAAAGTATCCCGGATGTGCAAGTCCGCAACCCCTGCTGCACGCGCGGCACTGGCCGGAATTTGTTGGCGCGCCCTGCCACTGCTGCTGATCCGCTGGCCCGGAG	600
B	CACCGGCTGTTTCCGGAGGAGGTGTCCCGGCTCTGTAGCCCGCGCGCTGGTTCGAGGGAATTCGAGTTGCGCTGGCCCAAGGCCACCTGGCGGCTCCGAGTGCATGTAAGCCCGGAG	597
C	CTGCTGCTGTTCGGCGAGGAGGTGTCCCGATTCGCCATTCGCGAGCCCGCGGCTGCTGGCGGCGGCAACCGCGCTGGCCGCGCGGCTGGCGGAGCTTGCCTGCTGCATCCCTGAAACCCCGGAG	594
D	CACCTGGCTGTTCAGCGGAGAAAGTCTTCCCGGGTGTGCAACCGCGCACTGCTCCACCGATGCGGCTGGCCACCGATTTCCACTCCCTGCACCCCTGGTGGCGGAA	597
A	GCGCGCCCAACCTGGTTCCTGGATTCGCTATTCGCCGCGCTTGGSCATTCGCCAGCCCTTCTTGGCCCGCCCTTCCGCTTCGACACTACACCTTGGCTGATCCAGGCGGCCCATCCGC	720
B	CAGCACCGCCGCTGGTTCGACTGGCCGATTCGCAAGGCTTGGCCATTCGACAGCCGATTCGACAGCCGATTCGACAGCCCTTGGCTGATCCAGGCGGCCATCCGCT	717
C	GTCGGCACCCGCTGGTTCGACTGGAGAGCCCTGCTTCGCGAGGCTGGCATACGCCAGCCGCTCCGAGGCTGGCATACAGCCCTTCCGCTGATCCAGGCGGCCCATCCGCT	714
D	AGCATCAACACTGGTTCGACTGGGGGTGATTCGCGCGCTGGACATCCCCAGGCCCCCGGTCMACTGGCCCTTCGACAACTACACCCCTGCTGATCCAGGCGGCCCATCCGCT	717
A	GGCCAGGGCGTGGCCATCCGCTGGGCGGCTTACCTGGTGGACGACTGTTGGCCCGCAGGGGCTGCTG-GTTCGCGCATGCTGGACACTCCGCTCCGCTATGGCTATGACGTGGTATGCC	839
B	GGCCAGGGCGTGGCCATCCGCTGGGCGGCACTGGCTGCAGCGGCTTCGACAGAGGGGCTGCTTTCGCGGCAATGGCGAGGCTGCTG-TCCGGATACGGGTACTATGCGGATTTGCC	836
C	GGCCAGGGCGTGGCCATCCGCTGGGCGGCTTACCTGGTGGACGACTGTTGGCCCGCAGGGGCTGCTG-CCCCCGCTGCTGGAAGGCCCGGCTGTGCTCGAACCTCGGCTTACTTGGTCCAGCC	833
D	GGACAAAGGCATCCGCATCCGCTGGGCGGCTGGAGGACTCCTTCGATGTAAGGGCTTCTGTCG-CCGGGCGCGGATTTCCGGTCAAGGGCTATTAAGTGTGCTTGC	836
A	CGAGCGCAAGCGGGCGTGGCGGCTGGTGGTTCGACTGGCTGCAGGACGAGCTGG--CCAGCCTGC--AGCGGCAACCGCCCGCAAGGTGTGGCGGGGTTCCGCGATCTAG	954
B	GGAGCGCAAGCGGGCGTGGCGGCTGGTGGTTCGACTGGCTGCAGGACGAGCTGG--CCAGCCTGC--AGCGGCAACCGCCCGCAAGGTGTGGCGGGGTTCCGCGATCTAG	915
C	CGAGCGCAAAACCGCGCGGCTGGATGAATGCTTCTTCGACTGGCTGCACATGAGCTGGCGGATGCTGCTTCGACAGGACATCTGATCCACAATCAGGAGGCTATCGGATCTGA	951
D	CCATCCGCAAAACCGCGCGGCTGGATGCTTTCAGCGATTCTGGACTGGCGGCAAGCGGACAG--CCTTGAAGCGGGGTTCCGCTGACGGGCGCCATTCGCTTCC-ATTGGCGGTGTA	951

Prilog IV – A. Poređenje nukleotidne sekvence *betR* gena soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 (C) sa sekvencama potencijalnih regulatora holin sulfataznih gena iz sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp (A), *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (B) i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (D). Osenčeni su nukleotidi koji su identični u sve četiri sekvence.

```

A -MADPEDIALDLLRVEFAARRHLSHTAAVLELGTTPAVSQQIQRLLEKQLATRLFDKRVYRGIELTDPAGVLFHVOEGLQAIQAGLEAVGARQHEVLTQVATDFAFAAWYMLPRLHREHE 119
B MFESFGDVSIDLRLRAFEVAARLRSEFPAALALELGTTPAVSQQIKRLLEEQLATRLFDRIYRGIELTDAGEVLFSHVQAGLQSIDSGVIAITENHQHEVLTQVATDFAFAAWYMLPRLHRRFK 120
C MRKVLDEISLDSLRVESAAARLLSFTAANQSSQPAISQQIKRLLEQQLAVRLFDKRVHHRGLVLTAEAGELLRYVQEGILSLDSGLQAVARQOHEVLTQVATDFAFAAWYMLPRLQRFHQ 120
D MGERLMPSPIDLRLRVFESAARQLSFTAAAEELGTTPAVSQQIKRLLEKELATPLFQRVHRGIVLTDAGQLLRHVAAGLETTIDAGIALGARQRHEVLTQVATDYAFAAWYMLPRLPREHQ 120

A ANPDIDVSLVTSQRTWMLR-SEVDIAIAFGDGRREKHGDALELFRREEVFPRIASPRLLAGRATPLPAAALAELEPLLHLKPEVTRTRWFQWSSLERELGISQSPSGALRFQNYTLLIOAAIA 238
B VNPDVAVSLVTSERTSMMLR-ADIDVAVLFGDGRFKQGESEHMLFSEEVFPVCSPLLQAGRQTPLEFDALRDEPLLHLRGEINNMWEDWAGVFRALDIQAPAFQQLREDMNYTLLIOAAIG 239
C LHPVAVSLVTSERTDLGGNLPGEIDVAISFGDGRCKHGESLILFGEVEVFPVCSPHLHGEBPVDSALLARLPLHLRPEARANWFAMDGVFRALGIAEPPSAGALRFQNYTLLIOAAIA 240
D AHPHLVAVSLVTSERGLAGQR-GDIDVAIIFGDGRSKHGEAHRLLFREVEVFPVCSPLVEGLQPLAKAHLARLPMHLKPAQHARWFWDPALELALADRQPIPAVLSEFQNYTLLIOAAIA 239

A GGGVATGWRVYVDDLLEQGLLAPLLRGRVCSDLGYVYLQPERKRRARMMKGFVDWLQHELGDARQAHLLHNHEGIAI 316
B GGGIATGWKHLVDDLLDQGLLCPITIGAASISGGGYVYVLPQKRRRVOIQQFVDWLASDAQLSG-VSLTGRPLPSIAV 316
C GGGVATGWRVYVDELLAQGLLVRMLDTSIRSAVGYVVMPEKRRRARLVRCFVDWLQDELLASLQRPQGG-WAGVAI 317
D GGGVATGWRHLVDDLLEQGLLCPITIGSCLSRXYGYAVLPERKRRQRLVDFVDWLQAEILQ-----AGGA- 304

```

Prilog IV – B. Poređenje aminokiselinske sekvence BetR proteina soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 (A) sa sekvencama potencijalnih BetR proteina sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp (C), *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (D) i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (B). Osenčene aminokiseline su identične u sve četiri sekvence.

PRILOG V

Kloniranje i molekularna analiza sulfataznih operona soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151

A	-----TCAAAAGCGCGCCCTTGAACCGGCGCCAGCCCGCCCGCCGCTGCGGGGTGGTGAACCCCGCTCCAGCCGAGCCGCGTGGAGCCACCTGGCGCTTGCATCCCTTGATGGC	111
B	-----CTACAACTTCGGCCTTCACTGCTTGCACCGCCCGCTTCCCATTCACCGCTTTCACGGCCCTCCAGCCACTTGTCCAGAACCCGTCGCGGGTGGCCCTTGATGCC	111
C	-----CTATGCGTGGCGCGAACCAGCGCCAGCGCCGCGCCGCTGCGGGGTGGTGAACCCCGCTCCAGCCGAGCCCTTGAAGCACCCGCGGGTGGCGCTTGCATCCCTTGATGGC	111
D	ATGAAGACCGCTGATCCCTGGCTGGCGCGCCCGCTTGCATGACCAACCCCTTGGCC--CTGGGGCGGAGAGCCCGGACCGCCCGCTGGCCACCGGTGAACCTGGCCGACCCCGCGCTGGAGCGGA	119
A	CTGGGCGTTGGCCCTGCTGCTGAGCACCCCGATCCATGATGCTTGTCT--CCATCTCCCTGGTGAATTTTGAAGT--TGTCCAGCAACTTTCGCGCATTTGGGCACTGCTGGCCATAGCC	228
B	CTGCGTGTGCTGACCTCTTGTGTGACCAACCTCGGCCATATGCTGTTT--CCATGTCCAGGGTGAAGCTCAGAT--TGTCCAGCAACTTTCGCGCATTTGGGCACTGCTGGCCATAGCC	228
C	CGAGCCCGGAGCCGCTTCCAGCCCTGCTGCATCAGGGGTTCT--CCATGTCCAGGGTGAAGCTCAGAT--TGTCCAGCAACTTTCGCGCATTTGGGCACTGCTGGCCGATAGCC	228
D	CATTGCCGTGACCAACGGCGTGGCAAGCCCTGCTGCTGAGAGGGGCTTACCGCGCCGAGAACCCAGAACCCCTGGCGGGTGGCCGATCTTTCGCGCGGTTGCAGAAAGGCCAGGTGGACCC	239
A	CTTGGCCGCGCA---GGGTGTTGACCTGGCCGCT--GTCCGCCAAATACTTCTCCGCCCGCCCGCCGAGGATTTTCATGTCGTA---TTCACACCTTCATTCGGGTTGGGGTCCAGCCCGAAGACA	341
B	TTTGGCGGTCA---GTGTAAAGACCAGCCCGGT--GTCCGCCAAAGTATTTCTCCGCCCGCCCTTGGAGGATGCGCTTATTCGCACTTCATTCGGGTTGGGGTCCAGCCCGAAGACA	344
C	CTTGGCGGTCA---GGGTATPAGACCTGGCCGCT--GTCCGCCAAAGTATTTCTCCGCCCGCCCTTGGAGGATGCGCTTATTCGCACTTCATTCGGGTTGGGGTCCAGCCCGAAGACA	341
D	CTTCCCTGGCAACTGGATGCCCGCCAGCAGACCACTAGCAGCCGCTTGTCCGCCAGCGGGGAGGAGGAGCGGCTGGCCG---AGAACCCTCA--CGGCCACCGAGTACACCTTGGCGGCTG	354
A	CCACGAACTGCTCCGCTTTGACCCGCGCCGACCTGCAACAGCATGCGCTGCT--CGCTGGACTCCACCAGTGGCCAGTCCGACGTCGTCGCGCGGATCCGCTGCTGCTGCTGATC	460
B	CCACAAAGCCCTTTTTCACGTTGATGATGACCTGCGCAAGCATGCGGTTT--CGCTGGACTCCACCAGTGGCCAGTCCGACGTCGTCGCGCGGATCCGCTGCTGCTGCTGATC	463
C	CCAGCCAGCGCTGCGCTTCTGCGCCCGCCGAGTTCCGGCAGCATGCGCTGCT--CGCTGGACTCCACCAGTGGCCAGTCCGACGTCGTCGCGCGGATCCGCTGCTGCTGCTGATC	460
D	CCGCGCTAACGTCATCGA---GGCCGGGGTGAAGACCTTCCGCCGACCTGACACGCCATGCGGAGGTTCAAGCACACCTTGTACGGGATGGCCCGCGGCTTCCATC	471
A	GATTCGTTGGCCCGCCAGCCGATGCCCTGAGAGCTTTTGGCCGAACTTGTCCCGCGCTTGTGCGAGGTTCCGCGGAAAGTCTTCCACACCCCGGATCCAAAGCATAGTGG--GCACCG	578
B	GACAGGTTGGCCCGCCAGCCGATGCCCTGAGAGCTTTTGGCCGAACTTGTGCGAGGTTGTGCGAGGTTCCGCGGAAAGTCTTCCACACCCCGGATCCAAAGCATAGTGG--GCACCG	581
C	GACTGATTTGGCCCGCCAGCCGATGCCCTGAGAGCTTTTGGCCGAACTTGTGCGAGGTTGTGCGAGGTTCCGCGGAAAGTCTTCCACACCCCGGATCCAAAGCATAGTGG--GCACCG	578
D	CAGGAGATGATCCGGTGCAGAGATTCGGCCGCGGAGGCTGGTGGAGTCCAGGCTGAGTGGGCTGGAGTGGGCTGGAGTGGGCTGGAGTGGGCTGGAGTGGGCTGGAGTGGGCTGGAGTGGG	591
A	CCAGGGTCTACTCCGGTGGCC--CTCCGAGGTTCTGCGCGCAGTTGGTCCACCCTCCCGCCGCGCGGCGAACTTGTGCTGCTGCTGCGCGCGGCAATCC--AGTTGCCAGGAAACAGCTGCA	695
B	CCAGGGTGAATTCGGTGGCC--CTCCGAGGTTTTCGCGCAGTTGGTCCACATCGCCCGGTTGGCCACAGAACTTGTGCTGCTGCTGCGCGCGGCAATCC--AGTTGCCAGGAAACAGCTGCA	698
C	CCAGGGTGAAGTGGTGGCC--ATCCGAGGTTGGGAGGAGCGGCTTCCACCTGGCCGCGGCGGCAAGAACTTGTGCTGCTGCTGCGCGCGGCAATCC--AGTTGCCAGGAAAGGCTGCA	695
D	CTCGGCTGGACCGCCGACCCCGATGAAAGCTGCTGTAACCTGTAAGGGTGGCA--GCCCTACTTTCGCGGAGAGCCGCGCAAGCTTACCCCGCAAGGGCTTACGCCCA	710
A	GCTG-ACCCTTCTGCACCGCCCGGCTAGATGATGATGCGGACCCCGCAGGGTCTGGCTTGGTATGCGGACGCGCCCTTGAAGCAGGAACTGGCGATGCCGTTGGTACCGCGGATGCTGTC	814
B	GCTT-GCCGCTTTTCAAACCGCCTTAGGCGATGCGGACGGCGAGGTATCGACCTTTGGCGCTTGAAGCCAGACCTTTCAGATACCCAGCTTGGTAAATGGCGTTGGTGGCCGCAATGCATC	817
C	CTTG-GGCGTCCGCGAGCCCGCATAGATGATGATGCGGACCGAGGGTATCGTCTTACCTTTCACCTGGTACCGGAGGCTTTCAGAGAAACCGCGGCTGGCTGGTGGTACCGCGATTCGCTC	814
D	GCAGTGCCCGAACGTTGGGCGGCG--TSCCTGGCCA--ACCTGCAAG--TTCAACCCAGSGGATGGAAACAACAGCGGTGATGACCAAGTGTGACCGCGCAAGGCCAGCAACGAGGGCGCGTGA	823
A	CAGCCCCGGATC--GCCCAGCTTGACCGGCGGCGAGCCCGGCTCCT--CGGCCAGACGCTTGGCGGCTGGCG--GACAAGCGCTCCCGCCAGCAACAGC--GCCGTTGATTCGGTTTCAT	921
B	CAGCCGGGATC--GGCCATTTTCACCGGCTCAACTGGCGTCT--CTGCCCTGTGCTGCAAGAGCTGGCCGAGGCTCATGACCCGCGCAACCGGCTGTGGATTAACCTTCTTCAT	927
C	CAGCCTGGATC--GGCCAGCCTGACCGGGCGAGGGGCTT--CGGCGTATAGGAGGCTGGCCGAGGAGGCGGCTGGCGGAGGAGGAGGCTGGAT	924
D	AGGCCCTGGATCAAGGCGCAACCCCGGACCGCCCTTGGTGGTGAACGGCGGTGACCAACCCCGGAGGGCGGCGA--TGGGCTTGGCGCGGCTGAG---GCCAAGCCTCTGA-----	927

Prilog V – A. Poređenje nukleotidne sekvence gena za supstrat vezujući domen ABC transportera soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 (D) sa sekvencama potencijalnih gena za supstrat vezujući domen ABC transportera iz sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp (A), *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (C) i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (B). Osenčeni su nukleotidi koji su identični u sve četiri sekvence.

A	MKTLIPVAAGLLSTTLAALAAQAEADRCATVKLGDPEGWSDIAVTTNGVARLLLDGLCYRAETQTLAVPIITAGLQKQGVDAFLGNMMPAQOOSNYDRFVASGVEERLAENLTGTEYTLAVBR	120
B	MNRINALLLAGALASAN--VAAEDACACATWVKLGDPEGWSDIAVTTNGIASFLLEGIXQTOQOTLAVPIIYAGLQKQQLDVFLLGNMMPAQOOSNYDKFEVASGEVDQAQLDGTETTLAVPT	118
C	MKLLSTAVAVAVMTLGLS-L-AAQAEADASCSTVKMADPEGWSDIAAATNNAITTSVLEGLGTTPKVDTLAVPIAYGGLKDKGLDVFLLGNMMPAQOQGFYDKFVATGDVTDLAKNLEGTETTLAVBD	119
D	MNRLLPTCLLAATLFLGSA-SLYAEDPACARVRLADPEGWSDIAVTTNATVAAFLLESLGYQVKIDTLVSVPIIYGLRDLGQVDAFLGGWMPAHQDYHDKFEVASGQVERLARNLDTGTRFTLAVPR	119
A	YVEAGVKTTFADDLSHAERFKHTLYGTAAGSPANVSIQEMIKNSNEFGLGDWKLVESSSEQAMLVQVGRAVKRNNEFVFLGWTPEHNNVQVD-LVYLKGGERYFGESSGSVNTLARKGYAQQC	239
B	YAFDAGVKTTFADLDKHAADKFGKKLYGTAAGSPANESI KQMTADDEFGLGDWQLVESSEQAMLVQVGRAVKREQFVVELGWTPEHNNVQVD-MKXYLRGGEKYYFGDSGQVNTLARKGYAQQC	237
C	YVWDAGVHDFADLSKPADRFDKKIYGISSGAPANLSIQEIIKKNFEDLGRKWLVESSSETAMLAEVNRNVRKKAFFVFLGWTPEHNNVQIKGMHYLKGGEKYYFGDTGSVFTLTKRGYAAQC	239
D	YVWDAGVHRFEDLAAQGORFMRKLYGIGSSGAPANQSTIQKMTDANQFGLGDWKLVESSSEQAMLAELGRAEKRQRWLVFLGWTPEHNNIRHD-LRYLLEGGEQYFGDRGQVYTLARKGYAAQC	238
A	PNVGRLLANLQFTQGMENSVMDOVLISGKASNEPAVKAWIKANPAALAEAMLNGVTTREGGDGLAAVVKAKL	308
B	PNAGKLLSNLKFQEMENSIMDRVLSKQASNAQAIKDWLQANPQVLDAMLGVTTRDGGDGLAAVVKARL	306
C	PNVCKLLTNLSFTLDMENSIMAEVNVNKKVSNSEAKSWMIKANPTVLDKMLIEGVRTVDGKDGGLAAVVKAKL	308
D	PNPARLLANLRFDDMENRLLMSDALLEGTATPASAATRAWLKANPRVILEAWLQGVTSRDPGGDGLAAVVRGQP	307

Prilog V -- B. Poređenje aminokiselinske sekvence supstrat vezujućeg proteina ABC transportera soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 (A) sa sekvencama potencijalnih supstrat vezujućih proteina ABC transportera sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp (B), *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (D) i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (C). Osnovne aminokiseline su identične u sve četiri sekvence.

PRILOG VI



A	-----MAMPDRQSLPLILSMLEPRQTRASVGRDILVIGSGAITALPOSTAYAYAIAGLPEPEYGLYAATVPVLIAQLMGSSWHILICGPTAAISIVLYASVSPPLAV 97
B	-----MHRILHLLPELSMLPRQSGSLRQDLVIGSGAITALPOSTAYAYAIAGLPAEYGLYAATVPVLVACLMGSSWHILICGPTAAISIVLYASISPLAV 95
C	MRSQATLIGSCDLPESNPTCLPTMPLDILQTLPLFRMLPCTSRKTLGNLDLVTGAVLALPOSTAYAYAIAGLPAEYGLYAATVPVIAACLMGSSWHILICGPTAAISIVLFTSVSPLAK 120
D	-----MTVLPQPSHSDAAMRPSHLPEFLHWLPGLRPRAVGRDALVGLTGAVLALPOSTIGYALLAGLPAAYAAVVPVIVACLMGSSRHILIGPTAAISVYLMASVSPPLAL 107
A	PASEDYITLILLTLLAGVFQWLLGMIRFGALVNFVSHSVVLGFTTGAAVYIALGQLPNLLGLELPLN-QATALNSLSQLIQHLGEVDRPSSLILGLTALGVAFKLLAERMPGHLISVF 216
B	AGSADYITLIVLITLFTLGGIFQILLGLRFGALVNFVSHSVVLGFTTGAALVIALGQLPNLLGMDLPS-QATVALKTWQDLASHAGVDLPSLVLGLATVMIQVAEKLMRERWPELLISML 214
C	AGSEQFLAVLILLTFLAGLFQWLLGLRFGALVNFVSHSVVLGFTTGAALVIALGQLPNLLRVEIVS-QATALASLLQIQHLNDVHWPSLALAAFTLLICLAVRRLWERKAPALILGHVA 239
D	PGSQDYIGLVILLTFLAGAFQFLMGLIRFGALVNFVSHSVVLGFTTGAALVIALGQVFNLLGLVPEPEGRATWQSAHALAAHLGEAHGPSLTVAGVSLGVSILARVLAEKRLPALLIGLLA 227
A	SALVWVLLIPG--VEGHVQVLVSATFVGRLLPEFSPPL-LDDELIRLLPSAVAVAGMGLVTSLSIARSLSARSEQLLDANQEVRAQGISNMVGAFFSGYLSSSGFTTRSGLSYEAGACSEPLAGVF 334
B	VSLILWVLLIPG--YEGHVRVVTATFGQLPPEFSPPLLDVLELMIRLLPEAVAVAGMGLVTSLSIARSLSARSEQLIDDEQEIARAQGISNIAGAFSGYLSAGSFTTRSGLSYERAGARSPMAGVF 333
C	GSALVWVLLPERLVGGIALVSAFEGGSLPEFTPLQ-FDINSLLIQLLPAAVACGMGLVTSLSIARALAVKSHQFLDANQEVRAQGISNMLGPMFAGSLSAGSFTTRBALNLQAGARTPLAGVF 358
D	GSLVWVALLPG--PFGAVARVAARQGSLEPLATLR-FDAEDMIRLLSSAVACGHLGLVTSLSIARALASRSGQVLDVNQETRGQGISNLVGAWFSGYLSAGSFTTRSGLNLQAGAGSPLAGVF 345
A	SALWVALLEFAVAGAGLTAHIPIIPAMAGSILLICWGLVDHRGTRALFRVSRAEFFVMSLTCVATLILLELQFATYAGVLASLFFFYIKRRTSQPRVQSSSEGEDDILRVGGSIFFGASHYLQVRLM 454
B	SALWVALFAVATGAGLTAHLPIIPAMAGSILLICWGLVDHRGTRALFRVSRSEFLVMALTTAATLILELQFATYAGVLASLFFFYIKRRTSRPRVQSSREGDADVLRVGGSLFFGAAHYLQVRL 453
C	SALLVALLEFAALTAHIPLPVMAGLILICWGLVDLAIRALRVRSRAEFAVMILTLLATLILELQFATYAGVLASLFFFYIKRRTSQPRVRLMWDGDDDEVLRIEGSLFFGACHYIQQLL 478
D	SALWVALLEFAWGGADLIGHIPIIPAMAGLIMICWGLLDGRGVRLMVRSRAEFAVMALTTAATLILELQFATYAGVLASLFFFYIKRRTSQPRVLQARQGDDEVLRIEGSLFFGACPYLQRLI 465
A	QRCHAPRLVIDARQINFTDYSQVEMLHQEARRLR-RQERSLILRRARQAVKEELIKLEGPBRCPHIFED 522
B	QRQGGPHVVIDARQVNFIDYSQVDMLHQREARRLR-RLGGSLTLRRARQVVELELOKLEGVALCPIRFEE 521
C	QRSRQRLVIDARHINFTDYGAVEMLHQEARLL-AGQRSVLRLQARPPQVVEILKIEGAERCPVQFED 546
D	QRSQAGRLVLDHNVNFTDYAGVSLIHDEARRLAAGRAAAWCCAGPARRMSSGSCASWRARAAC----- 528

Prilog VI – B. Poređenje aminokiselinske sekvence sulfatnog transportera soja *Pseudomonas* sp. ATCC19151 (D) sa sekvencama potencijalnih sulfatnih transportera sojeva *Pseudomonas mendocina* ymp (C), *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (B) i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (A). Osenčene aminokiseline su identične u sve četiri sekvence.



РД 20397



300157554

СОBISS