

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Domen POGOREVC

ZUNAJCELI NE PROTEINAZE BAKTERIJE
Streptomyces rimosus

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Domen POGOREVC

ZUNAJCELI NE PROTEINAZE BAKTERIJE *Streptomyces rimosus*

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

EXTRACELULAR PROTEINASES OF BACTERIUM *Streptomyces rimosus*

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Biotechnology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani in v podjetju Acies Bio d.o.o.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Hrvoja Petkovića, za somentorico prof. dr. Polono Jamnik in za recenzentko prof. dr. Natašo Poklar Ulrih

Mentor: prof. dr. Hrvoje Petkovi

Somentorica: prof. dr. Polona Jamnik

Recenzentka: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Hrvoje PETKOVI
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Nataša POKLAR ULRIH
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani/podpisana se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal/oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Domen Pogorevc

KLJU NA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 604.4:577.152.34:579.873.7(043)=163.6
- KG *Streptomyces rimosus*/sekundarni metaboliti/proteinaze/aktivnost
proteinaz/proteomika/cimografija/SDS PAGE/elektroforeza/masna
spektrometrija/inhibitorji
- AV POGOREVC, Domen, dipl. bioteh. (UN)
- SA PETKOVI , Hrvoje (mentor)/ JAMNIK, Polona (somentorica)/ POKLAR ULRIH,
Nataša (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
- LI 2014
- IN ZUNAJCELI NE PROTEINAZE BAKTERIJE *Streptomyces rimosus*
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija)
- OP X, 41 str., 21 pregl., 17 sl., 28 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Z uporabo proteomskih orodij v kombinaciji s cimografijo smo po lo evanju z SDS PAGE elektroforezo identificirali proteinaze bakterije *Streptomyces rimosus*. Suspenzijo spor *S. rimosus* smo inokulirali v vegetativno GOTC gojiš e, da smo pridobili primeren inokulum. Ta inokulum smo uporabili za inokulacijo produkcijskega GOTC gojiš a, namenjenega za indukcijo biosinteze proteinaz, kjer smo bakterijo gojili še sedem dni. Vzor iti smo za eli etrti dan kultivacije v produkcijskem gojiš u. Po vzor enju smo brozgo dvakrat centrifugirali, ist supernatant pa prenesli v nove mikrocentrifugirke. Izmerili smo celotno koncentracijo proteinov in proteinaz v supernatantu, sledila pa je izvedba SDS PAGE elektroforeze in kazeinske cimografije. Oba gela smo primerjali in iz SDS PAGE gela izrezali elektroforetske rte, ki so na cimogramu kazale proteoliti no aktivnost. Izrezane vzorce smo poslali na analizo z masno spektrometrijo. Rezultati SDS PAGE in cimografije so pokazali, da sta poleg ostalih proteinov v supernatantu brozge bakterije *S. rimosus* prisotni vsaj še dve proteinazi, ki sta aktivni pri 37 °C ter pH 7,5 in razgrajujeta kazein. Najve jo inhibicijo aktivnosti smo zaznali ob uporabi inhibitorja PMSF, kar nakazuje na prisotnost serinskih proteinaz. Rezultati masne spektrometrije so potrdili, da je vsaj ena izmed zaznanih proteinaz serinskega tipa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Du2
- DC UDC 604.4:577.152.34:579.873.7(043)=163.6
- CX *Streptomyces rimosus*/secondary metabolites/proteinases/proteinase activity/proteomics/zymography/SDS PAGE/electrophoresis/mass spectrometry/inhibitors
- AU POGOREVC, Domen
- AA PETKOVI , Hrvoje (supervisor)/ JAMNIK, Polona (co-supervisor)/ POKLAR ULRIH, Nataša (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
- PY 2014
- TI EXTRACELULAR PROTEINASES OF BACTERIUM *Streptomyces rimosus*
- DT M.Sc. Thesis (Master Study Programmes - Field: Biotechnology)
- NO X, 41 p., 21 tab., 17 fig., 28 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB We used proteomics approach in combination with zymography after SDS PAGE electrophoresis to identify proteases produced by bacterium *Streptomyces rimosus*. Spore suspension of *S. rimosus* was inoculated in seed medium GOTC to ensure sufficient quality of seed. Seed culture was used to inoculate GOTC production medium, designed for induction of proteinase biosynthesis, and further cultured for another seven days. We started sampling after four days of cultivation in production medium. After sampling, fermentation broth was centrifuged twice and clean supernatant was transferred into new microcentrifuge tubes. Total content of proteins and proteases in supernatant was measured, followed by SDS PAGE electrophoresis and casein zymography. Comparative analysis of total protein content by SDS PAGE and zymogram was carried out and target protein bands with proteolytic activity were excised from the gel. The samples were analysed using mass spectrometry. By applying SDS PAGE and zymography we identified numerous extracellular proteins in supernatant of *S. rimosus* culture. At least two of those proteins identified by SDS PAGE are proteases active at 37 °C, pH 7,5 and capable of breaking down casein. The highest inhibition of activity was detected using PMSF inhibitor, which indicates presence of serine proteases. Mass spectrometry results confirmed that at least one of detected proteases is a serine type protease.

KAZALO VSEBINE

KLJU NA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOL	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 PROTEINAZE.....	2
2.1.1 Serinske proteinaze	2
2.1.2 Cisteinske proteinaze	2
2.1.3 Aspartatne proteinaze.....	3
2.1.4 Metalo proteinaze	3
2.2 INHIBITORJI PROTEINAZ.....	3
2.3 BAKTERIJA <i>Streptomyces rimosus</i>	4
2.3.1 Taksonomija	4
2.3.2 Morfologija	4
2.4 DOLO ANJE AKTIVNOSTI PROTEINAZ	5
2.4.1 Spektrofotometri no dolo anje aktivnosti proteinaz.....	5
2.4.2 Cimografija	6
2.4.2.1 Proteinski substrati	7
2.4.2.2 Sinteti ni substrati	7
2.5 IDENTIFIKACIJA PROTEINAZ	7
2.5.1 Masna spektrometrija.....	7
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 MATERIALI	11
3.1.1 Mikroorganizem	11
3.1.2 Gojiš a, raztopine in komercialni kompleti.....	11
3.1.2.1 Gojiš a.....	11

3.1.2.2 Raztopine	12
3.1.3 Laboratorijske aparature in kemikalije.....	14
3.1.3.1 Laboratorijske aparature	14
3.1.3.2 Kemikalije	15
3.2 METODE.....	16
3.2.1 Shema poteka dela.....	16
3.2.2 Priprava inokuluma	17
3.2.3 Kultivacija bakterije <i>Streptomyces rimosus</i>	17
3.2.4 Vzorene in priprava vzorcev za analizo	17
3.2.5 Določanje koncentracije proteinov v vzorcih	17
3.2.6 SDS PAGE	18
3.2.6.1 Priprava ločevalnega in zbiralnega gela	18
3.2.6.2 Priprava vzorcev za nanos na gel (brez kazeina).....	18
3.2.6.3 Potek elektroforeze	19
3.2.6.4 Spiranje in barvanje gela brez dodanega kazeina po elektroforezi	19
3.2.7 Cimografija	19
3.2.7.1 Priprava ločevalnega in zbiralnega gela	19
3.2.7.2 Priprava vzorcev za nanos na gel (z dodanim kazeinom)	19
3.2.7.3 Potek elektroforeze	19
3.2.7.4 Spiranje, inkubacija in barvanje gela z dodanim kazeinom po elektroforezi	20
3.2.8 Ugotavljanje vrste proteinaz z uporabo različnih inhibitorjev.....	20
3.2.9 Rezanje vzorcev iz gelov	20
3.2.10 Identifikacija proteinov	20
4 REZULTATI.....	21
4.1 MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V SUPERNATANTU BROZGE Z BRADFORDOVO METODO	21
4.2 DETEKCIJA IN AKTIVNOST PROTEINAZ NA GELIH	22
4.2.1 Kazeinska cimografija	22
4.2.2 SDS PAGE	23
4.2.3 Poravnava obeh gelov pred rezanjem elektroforetskih prstov iz gela	23
4.3 Določanje tipa proteinaz z uporabo različnih inhibitorjev	24
4.3.1 EDTA.....	24

4.3.2 PMSF	24
4.3.3 Komerzialna mešanica inhibitorjev proteinaz	25
4.4 IDENTIFIKACIJA PROTEINAZ Z MASNO SPEKTROMETRIJO	26
4.4.1 Rezultati identifikacije proteinov z masno spektrometrijo	27
5 RAZPRAVA	32
5.1 LO EVANJE IN DETEKCIJA PROTEINAZ	32
5.2 OCENJEVANJE AKTIVNOSTI IN DOLO ANJE VRSTE PROTEINAZ Z UPORABO RAZLI NIH INHIBITORJEV	33
5.3 IDENTIFIKACIJA Z MASNO SPEKTROMETRIJO	34
6 SKLEPI	37
7 POVZETEK	38
8 VIRI	39
ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 1: Življenjski cikel streptomicit (Angert, 2005).	5
Slika 2: Enostavna shema masnega spektrometra (Dass, 2007).....	9
Slika 3: Shematski prikaz MALDI – TOF analizatorja (Dass, 2007).	9
Slika 4: Shematski prikaz MALDI ionizacije (Dass, 2007).	10
Slika 5: Shematski prikaz poteka dela	16
Slika 6: Določanje aktivnosti proteinaz na gelu z dodanim kazeinom. Nanešeni so vzorci v 4 ponovitvah po 7 dneh kultivacije bakterije <i>Streptomyces rimosus</i>	22
Slika 7: SDS-PAGE analiza zunajceli nih proteinov bakterije <i>Streptomyces rimosus</i>	23
Slika 8: SDS PAGE analiza (levo) in cimografija (desno) zunajceli nih proteinov bakterije <i>Streptomyces rimosus</i>	23
Slika 9: Aktivnost proteinaz (A: v prisotnosti v 10 mM EDTA, B: brez dodatka 10 mM EDTA)	24
Slika 10: Aktivnost proteinaz (A: v prisotnosti 2,5 mM PMSF, B: brez dodatka 2,5 mM PMSF).....	24
Slika 11: Aktivnost proteinaz (A: v prisotnosti 5 mM PMSF, B: brez dodatka 5 mM PMSF).....	25
Slika 12: Aktivnost proteinaz (A: v prisotnosti komercialne mešanice inhibitorjev proteinaz, B: brez dodatka inhibitorjev)	25
Slika 13: Določitev elektroforetskih prstov na SDS PAGE gelu za identifikacijo proteinov z masno spektrometrijo, modro obkrožene prste: protein 1, rdeče obkrožene prste: protein 2. 26	
Slika 14: Označene ohranjene domene pri identificiranem proteinu 1 (hypothetical protein) (NCBI, 2014).	29
Slika 15: Označene ohranjene domene pri identificiranem proteinu 2, zadetek 1 (putative calcium-binding protein) (NCBI, 2014).	29
Slika 16: Označene ohranjene domene pri identificiranem proteinu 2, zadetek 2 (peptidase M4 thermolysin) (NCBI, 2014).	30
Slika 17: Označene pomembne aminokisliline v aktivnem mestu, mestu za vezavo cinka ter mestu za vezavo kalcija pri identificiranem proteinu 2, zadetek 2 (peptidase M4 thermolysin) (NCBI, 2014).....	31

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: GOTC vegetativno gojiš e (VG) (Blaži in sod., 2014)	11
Preglednica 2: GOTC produktivno gojiš e (PG) (Blaži in sod., 2014)	11
Preglednica 3: 5x red en Bradfordov reagent	12
Preglednica 4: Zbiralni gel	12
Preglednica 5: Lo evalni gel brez dodanega kazeina	12
Preglednica 6: Lo evalni gel z dodanim kazeinom	12
Preglednica 7: 1x SDS elektroforezni pufer	13
Preglednica 8: 6x nanašalni pufer	13
Preglednica 9: Fiksacijska raztopina	13
Preglednica 10: Raztopina za razbarvanje	13
Preglednica 11: 0,25 % raztopina Triton X-100	13
Preglednica 12: 100 mM Tris HCl	13
Preglednica 13: 10 mM EDTA	13
Preglednica 14: 2,5 mM PMSF	14
Preglednica 15: 5 mM PMSF	14
Preglednica 16: Raztopina komercialne mešanice inhibitorjev proteinaz	14
Preglednica 17: Seznam laboratorijskih aparatov	14
Preglednica 18: Seznam kemikalij	15
Preglednica 19: Izmerjene absorbance in izračunane koncentracije proteinov v posameznih vzorcih	21
Preglednica 20: Rezultati identifikacije proteina 1 z masno spektrometrijo	27
Preglednica 21: Rezultati identifikacije proteina 2 z masno spektrometrijo	28

OKRAJŠAVE IN SIMBOL

AK - aminokislina

ANS - 8-anilinonaftalen-sulfonska kislina

APS - amonijev persulfat

DTT - ditiotreitrol

EDTA - etilendiamintetraocetna kislina

ESI - *ang. electrospray ionization*

Et/Br - etidijev bromid

GRAS - *ang. Generally Recognized as Safe*

MALDI - *ang. matrix-assisted laser desorption/ionization*

OTC - oksitetraciklin (*ang. Oxytetracycline*)

PAGE - poliakrilamidna gelska elektroforeza (*angl. polyacrylamide gel electrophoresis*)

pI - izoelektri na to ka

PMSF - fenilmetansulfonil fluorid

SDS - natrijev dodecil sulfat (*ang. Sodium dodecyl sulfate*)

TEMED - tetrametil etilen diamid

TOF - *ang. time of flight*

1 UVOD

Streptomyces rimosus je ena izmed najboljše preu enih industrijsko uporabljanih streptomycet. Komercialno se že ve kot 50 let najve uporablja za produkcijo antibiotika oksitetraciklina, že nekaj asa pa je znano, da je *S. rimosus* tudi producent drugih biološko aktivnih sekundarnih metabolitov (Petkovi in sod., 2006), ki se ne uporabljajo v medicini. *S. rimosus* je gostiteljski organizem, ki ga je relativno enostavno gensko manipulirati in ima GRAS status (*ang. Generally Regarded As Safe*), zaradi esar je primeren kot gostiteljski sev za heterologno izražanje različnih metabolitov in heterolognih proteinov (Magdevska, 2011).

1.1 NAMEN DELA

Problem pri produkciji proteinskih produktov z bakterijo *Streptomyces rimosus*, ki isto asno proizvaja tudi zunajceli ne proteinaze, je v tem, da proteinaze lahko razgrajujejo naš ciljni produkt. Prav zaradi tega želimo identificirati in opredeliti lastnosti proteinaz, ki jih *Streptomyces rimosus* proizvaja in so hkrati tudi najbolj aktivne. Predvidevamo, da bodo to serinske proteinaze, ki jih bomo lo ili na gelski elektroforezi. Sledila bo identifikacija s testom aktivnosti, masno spektrometrijo in dolo itev identificiranih proteinov, ki kažejo proteoliti no aktivnost z bioinformacijskimi orodji. Na ta na in želimo kon no dolo iti gene, ki kodirajo proteinaze z najve jo aktivnostjo in jih *Streptomyces rimosus* proizvaja v pogojih, ki so najbolj primerni za biosintezo ciljnih proteinov. Dolo itev aminokislinskih sekvenc teh proteinaz bi omogo ila nadaljnje identifikacije DNA sekvenc ciljnih genov na osnovi nukleotidnega zaporedja celotnega genoma *S. rimosus*, ki te proteinaze kodirajo, ter njihovo inaktivacijo. Na ta na in bi lahko konstruirali bolj primeren produkcijski sev *Streptomyces rimosus*, ki ne bi proizvajal serinskih proteinaz in bi bil lahko zaradi tega bolj optimalen produkcijski organizem za produkcijo heterolognih proteinskih produktov.

Namen magistrske naloge je bila tudi optimizacija metodologije za delno pre iš evanje (koncentriranje) zunajceli nih proteinaz s poudarkom na serinskih proteinazah, razvoj metodologije za detekcijo zunajceli nih proteinaz z gelsko elektroforezo ter dolo itev in identifikacija najbolj zastopanih proteinaz (vrsta, število) in pridobitev informacij o njihovi sekvenci.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pri akujemo, da bomo na osnovi obstoje e literature in analize genoma *S. rimosus* lahko identificirali različne proteinaze iz gojiš a bakterije *S. rimosus*, med katerimi bodo verjetno najbolj zastopane serinske proteinaze.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROTEINAZE

Proteinaze so encimi specifični za proteine, peptidaze pa so specifične za peptide. Proteinaze in peptidaze predstavljajo eno največjih funkcionalnih skupin encimov, ki zajema več kot 560 znanih predstavnikov. S hidrolizo ene izmed najbolj pomembnih kemijskih vezi prisotnih v biomolekulah, to je peptidne vezi, igrajo pomembno vlogo v vseh organizmih iz filogenetskega drevesa, od virusov, bakterij, protozoj, metazoj, gliv ter na koncu rastlin in živali (Supuran in sod., 2002). Sodelujejo v mnogih fizioloških funkcijah, od splošne razgradnje proteinov, pa do bolj specifičnih in reguliranih procesov, kot so; koagulacija krvi, aktivacija hormonov in transport sekretornih proteinov ez membrane. Proteinaze razdelimo v štiri skupine: serinske, cisteinske, aspartatne in metalo proteinaze. Znotrajceli ne bakterijske proteinaze so visoko specifične in sodelujejo v mnogih bioloških procesih, kot so; odstranjevanje signalnih peptidov z novo sintetiziranih proteinov, aktivacija in inaktivacija prekurzorjev, inaktivacija regulatornih proteinov in razgradnja nenormalnih, tujih proteinov. Širok spekter bakterij pa izloča proteinaze tudi v zunajceli ni medij. Nekatere izmed teh proteinaz so toksini ali virulentni faktorji (Wandersman, 1989).

2.1.1 Serinske proteinaze

Skoraj ena tretjina vseh znanih proteinaz spada med serinske proteinaze. Obstaja okrog 40 družin serinskih proteinaz. Ime izhaja iz nukleofilnega serinskega ostanka v aktivnem mestu. Encimi iz teh družin so zelo pomembni za homeostazo in vitalne funkcije večinoma živih organizmov (Supuran in sod., 2002). Štiri najbolj zastopane serinske proteinaze so Kimotripsin, Subtilizin, Karboksipeptidaza Y in Clp proteinaza (Hendstrom, 2002). Bakterije proizvajajo vse glavne poznane tipe serinskih proteinaz. En tak tip serinskih proteinaz so tripsinu podobne proteinaze, ki so široko zastopane pri bakterijah iz rodu *Streptomyces*. Te proteinaze igrajo pomembno vlogo pri tvorbi zrna nega micelija (Supuran in sod., 2002).

2.1.2 Cisteinske proteinaze

Cisteinske proteinaze so proteini z molekularno maso približno 21 - 30 kDa. Največjo hidrolitično aktivnost kažejo pri pH 4 - 6,5. Ker tiolna skupina hitro oksidira, je za normalno delovanje encima v okolju potrebna redukcijska komponenta. Glutation je reductant, ki služi kot aktivacijsko sredstvo v celicah, za *in vitro* eksperimente pa je potrebno dodati merkaptoetanol ali ditiotritol (DTT). Poznanih je 21 družin cisteinskih proteinaz, ki so prisotne v skoraj vseh živih organizmih, skoraj polovica pa jih je bila odkrita v virusih. Mnoge od teh encimov najdemo v bakterijah, glivah, protozojah in

rastlinah. Cisteinske proteinaze sodelujejo v mnogih biokemijskih procesih, ki se odvijajo v živih organizmih. Njihova glavna fiziološka vloga je metabolna razgradnja peptidov in proteinov. Aktivnost cisteinskih proteinaz je regulirana s pravilnim prepisovanjem genov in stopnjo sinteze ter razgradnje proteinaz kot tudi njihovih specifičnih inhibitorjev (Grzonka in sod., 2001).

2.1.3 Aspartatne proteinaze

Aspartatne proteinaze so široko razširjena skupina proteolitičnih encimov, ki jih lahko najdemo v virusih, bakterijah, kvasovkah, rastlinah, glivah in živalih. Delimo jih v dve družini, na primer; A1 - pepsinu podobne aspartatne proteinaze ali A2 - retrovirusne aspartatne proteinaze. Splošne lastnosti pepsinu podobnih encimov so; aktivnost pri nizkem pH in občutljivost na inhibicijo s pepstatinom A. Zgrajeni so iz enojne polipeptidne verige z molekularno maso med 32 in 38 kDa, njihovo tro-dimenzionalno strukturo pa sestavljata dva zelo podobna režnja. Aktivno mesto se nahaja v reži med obema režnjema in vsebuje dva aspartatna ostanka; Asp32 in Asp215. Aspartatne proteinaze so cimo geni, sposobni samo-aktivacije v kislih pogojih, s cepitvijo pro-sekvence (Kadek in sod., 2013).

2.1.4 Metalne proteinaze

Metalne proteinaze so hidrolaze, pri katerih je nukleofilni napad na peptidno vez reguliran s strani vodne molekule, ki jo usmerja dvovalenten kovinski ion. Katalitični kovinski ion regulirajo aminokislinski ostanki, prisotni na aktivnem mestu. Metalne proteinaze delimo v dve glavni skupini glede na število kovinskih ionov potrebnih za katalizo. Pri večini metalnih proteinaz je potreben le en kovinski ion, v nekaterih družinah pa sta potrebna dva kovinska iona, ki delujeta kot katalitični. Metalne proteinaze so široko zastopane v vseh vrstah bakterij. Pogosto so kritični viruleni faktorji, ki igrajo pomembno vlogo v patogenezi in sodelujejo pri infekcijah (Supuran in sod., 2002).

2.2 INHIBITORJI PROTEINAZ

Inhibitorje proteinaz delimo v dve skupini. Poznamo nizkomolekularne inhibitorje, specifične za aktivno mesto in naravne inhibitorje, izolirane iz rastlin, živali in mikroorganizmov. Inhibitorje proteinaz lahko razdelimo v podskupine tudi glede na vrsto proteinaze, ki jo inhibirajo. Ločimo inhibitorje serinskih proteinaz, cisteinskih proteinaz, aspartatnih proteinaz ter inhibitorje metalnih proteinaz (Štaudohar Kozjan, 2003). Ugotovljeno je bilo, da proteinske inhibitorje proteolitičnih encimov proizvajajo razne živali, rastline in mikroorganizmi. Večina odkritih zunajceličnih inhibičnih proteinov je bila izoliranih iz vrste *Streptomyces* in označeni kot pripadniki družine *Streptomyces* subtilizinskih inhibitorjev na podlagi podobne strukture in inhibičnih sposobnosti (Taguchi in sod., 1995).

2.3 BAKTERIJA *Streptomyces rimosus*

2.3.1 Taksonomija

Streptomicete so grampozitivne aerobne bakterije iz reda aktinomicet, ki spada v razred aktinobakterij (Anderson in Wellington, 2001).

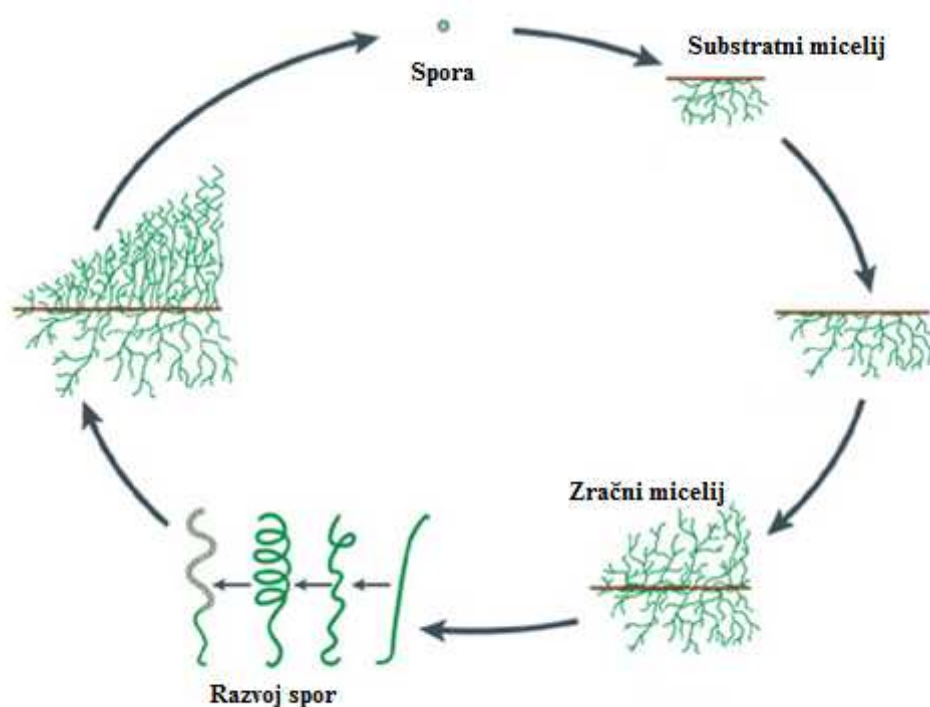
Taksonomska opredelitev streptomicet (UniProt, 2014):

domena: BACTERIA
 deblo: Actinobacteria
 razred: Actinobacteria
 podrazred: Actinobacteridae
 red: Actinomycetales
 podred: Streptomycineae
 družina: Streptomycetaceae
 rod: *Streptomyces*
 vrsta: *Streptomyces rimosus*

2.3.2 Morfologija

Streptomicete so morfološko podobne nitastim glivam, saj rastejo v obliki micelija. Od ostalih aktinomicet se lo ijo predvsem po specifi ni zgradbi celi ne stene. Imajo celi no steno tipa I, za katero je zna ilno, da vsebuje LL-diaminopimeli no kislino in glicin. Hife, ki jih tvorijo streptomicete imajo premer 0,5 - 1 μm in so v vegetativni fazi pogosto brez pre nih sten. Zna ilna je razvejana rast, ker povzro i nastanek tesno prepletenega matriksa hif med vegetativno fazo. Staranje kolonij privede do nastanka zra nega micelija, iz katerega s pomo jo tvorbe pre nih sten, nastanejo verige spor (Anderson in Wellington, 2001).

Streptomicete so industrijsko pomembne, ker proizvajajo številne antibiotike, zunajceli ne encime, kot so proteinaze in ostale sekundarne metabolite s komercialno vrednostjo (Lopes in sod., 1999). Kot za veliko ostalih vrst streptomicet je tudi za *Streptomyces rimosus* zna ilno, da proizvaja zunajceli ne proteoliti ne encime. Ta lastnost je izražena tudi v sevih *S. rimosus*, ki se uporabljajo za industrijsko proizvodnjo antibiotika oksitetraciklina, saj so proteoliti ne encime zaznali tudi v kulturah gojenih pri pogojih za produkcijo antibiotikov (Pokorny in sod., 1979)



Slika 1: Življenjski cikel streptomycet (Angert, 2005).

2.4 DOLO ANJE AKTIVNOSTI PROTEINAZ

2.4.1 Spektrofotometri no dolo anje aktivnosti proteinaz

Zaznavanje proteinazne aktivnosti je pomembno v številnih aplikacijah, kot so; merjenje aktivnosti proteinaz v celi nih in tkivnih ekstraktih, merjenje aktivnosti med iš enjem encima in študije inhibicije proteinaz. Za testiranje proteinazne aktivnosti pogosto potrebujemo proteine, kot so hemoglobin, ali pa kazein, kolagen in želatina z vezanim fluorescentnim barvilom. Te metode vklju ujejo postopke precipitacije, kjer je nerazgrajen substrat netopen (na primer fribrin) ali pa ga oborimo s trikloroocetno kislino. Slabost vseh teh metod je potreba po vzor enju v dolo enih asovnih intervalih, natan na kontrola volumna vzorcev in kvantitativno lo evanje ozna enih peptidov od nehidroliziranih proteinov (Jones in sod., 1997). Dodatna slabost teh metod so dragi substrati, katerih težava je tudi neenakomerna velikost delcev ter neenakomerna razporeditev barvila, zaradi esar je težko dose i homogene pogoje (Wolf in Wirth, 1996).

Obstajajo tudi tehnike za merjenje encimske aktivnosti v realnem asu. Pri teh metodah se uporablja 8-anilinaftalen-sulfonska kislina (ANS) (*ang. 8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid*), ki v vodnem okolju le rahlo flouescira, ob vezavi na hidrofobne proteine pa se njena flouescenca pove a. Ko proteinaze razgradijo proteine, se zmanjša število veznih mest za ANS, kar povzori i padec flouescence, ki jo zaznamo spektrofotometri no. Slabosti te

metode so, da je težko meriti majhen padec fluorescence v primerjavi z močnim ozadjem. Prav tako pa nekateri encimi ne delujejo na mestu kjer je ANS vezana na protein (Jones in sod., 1997).

Moderne metode uporabljajo kazein, kot substrat za merjenje aktivnosti proteinaz in Folinov reagent kot detekcijsko sredstvo oziroma barvilo za zaznavanje stopnje aktivnosti. Ko proteinaza razgradi kazein, se sprost tirozin. Folinov reagent reagira s tirozinom in nastane modro obarvan kromofor, katerega absorbanco izmerimo s spektrofotometrom. Več kazeina kot proteinaze razgradijo, več tirozina se sprost, kar pomeni močnejše modro obarvanje. Absorbanca, ki jo izmerimo, je premo sorazmerna aktivnosti proteinaz (Cupp-Enyard, 2008).

2.4.2 Cimografija

Cimografija je zelo dobra metoda za detekcijo in določanje aktivnosti širokega spektra mikrobnih, živalskih in rastlinskih encimov med njimi tudi številnih nukleaz in proteinaz. Sestavljena je iz dveh korakov. Prvi korak je ločevanje proteinov z elektroforezo, temu pa sledi detekcija encimske aktivnosti (Kaberdin in McDowall, 2003). Uporaba gelske elektroforeze za merjenje proteinazne aktivnosti ima mnogo dobrih lastnosti. Omogoča specifično detekcijo aktivnih proteinaz v kompleksnih ekstraktih brez predhodnih postopkov. Iščena, hitro oceno molekulske mase proteinaz in njihovih inhibitorjev, analizo raznih funkcionalnih karakteristik preučevanih proteinaz in preučevanje interakcij proteinaza - inhibitor (Michaud, 1998). Med elektroforetskimi metodami je cimografija ena izmed najboljših za določanje encimske aktivnosti. Temelji na SDS (*ang. Sodium dodecyl sulfate*) elektroforezi v nereducirajočih pogojih, pri kateri je primeren substrat kopolimeriziran z akrilamidom. Po elektroforezi je SDS odstranjen s spiranjem gela v raztopini Triton X-100, kar omogoča encimu, da ponovno pridobi svojo aktivnost (Resa in sod., 1994).

Prva stvar o kateri moramo razmisliti, ko načrtujemo cimografsko detekcijo katerekoli proteinaze, je izbira primernega substrata. Gelske teste za določanje aktivnosti encimov lahko glede na uporabljeno vrsto substrata razdelimo v dve skupini. Substrati so lahko naravni ali sintetični, katerega uporabimo pa je odvisno od količine informacij, ki so nam na voljo o preučevanem vzorcu in od stopnje specifičnosti potrebne za analizo encima. V primeru, da imamo proteinaze izolirane iz slabo karakteriziranih ekstraktov, so bolj primerni "naravni" proteinski substrati, saj imajo proteini po navadi več veznih mest, zaradi katerih jih lahko večje število raznovrstnih encimov prepozna kot substrat. V primeru, ko pa testiramo aktivnost dobro karakteriziranih proteinaz ali pa je poudarek na detekciji eksotične proteinaze, so bolj primerna izbira sintetični substrati, ki omogočajo specifično detekcijo pri natančno definiranih pogojih (Michaud, 1998).

2.4.2.1 Proteinski substrati

Proteinski substrati, ki se uporabljajo za detekcijo proteinaz s cimo grafijo, so navadno poceni in komercialno dostopni proteini. Najve krat je v uporabi želatina, kazein, goveji serumski albumin ali hemoglobin. V ve ini primerov proteinaze najprej lo imo na gelu in jih nato pustimo, da hidrolizirajo substrat *in situ* (v primeru, da je substrat dodan v gel) ali pa hidrolizirajo substrat v novem matriksu (v primeru, da je substrat dodan v indikatorski gel ali pa fiksiran na nitrocelulozno membrano, na katero nato prenesemo proteinaze iz lo evalnega gela). eprav proteini, kot sta želatina in kazein, niso naravni substrati za ve ino proteinaz, so se izkazali za uporabne pri elektroforetski karakterizaciji proteinaz v velikem številu bioloških vzorcev. Prav tako postajajo vedno bolj uporabni pri preu evanju interakcij proteinaza - inhibitor, saj predstavljajo enostavna in ob utljiva sredstva detekcije in vizualizacije aktivnosti ciljanih proteinaz po njihovi inhibiciji s specifi nimi inhibitorji (Michaud, 1998).

2.4.2.2 Sinteti ni substrati

Za razliko od ve ine proteinskih substratov so sinteti ni substrati uporabni pri identifikaciji specifi nih proteinaz in dolo anju njihovih funkcionalnih lastnosti. Sinteti ni substrati so najve krat sintetizirani s spajanjem specifi nih substituentov in $-NH_2$ ali $-COOH$ skupine aminokislin. Sekvenca aminokislina in razporeditev substituentov po navadi dolo a specifi nost substrata, medtem ko izvor enega od substituentov da substratu kromogene ali fluorogene lastnosti, kar je uporabno pri naknadnem dolo anju hidroliti ne aktivnosti. Glede na pozicijo substituenta delimo sinteti ne substrate v dve skupini: substrate za endo proteinaze in substrate za esko proteinaze. Veliko razli nih sinteti nih substratov se je izkazalo za uporabne pri preu evanju proteinaz po lo evanju na gelski elektroforezi. Nekateri substrati so relativno nespecifi ni in omogo ajo bolj grobo identifikacijo proteinaz, medtem ko drugi omogo ajo specifi no identifikacijo proteinaz ali družin proteinaz in so uporabni pri dolo anju aktivnosti specifi ne proteinaze v mešanih ekstraktih. Ker je raznolikost proteoliti nih encimov v živih organizmih velika in ker je število nedolo enih proteinaz še tako veliko, je potrebno specifi nost substrata potrditi za vsak biološki sistem posebej. Tako zagotovimo, da vsa encimska aktivnost izhaja le iz preu evanega encima (Michaud, 1998).

2.5 IDENTIFIKACIJA PROTEINAZ

2.5.1 Masna spektrometrija

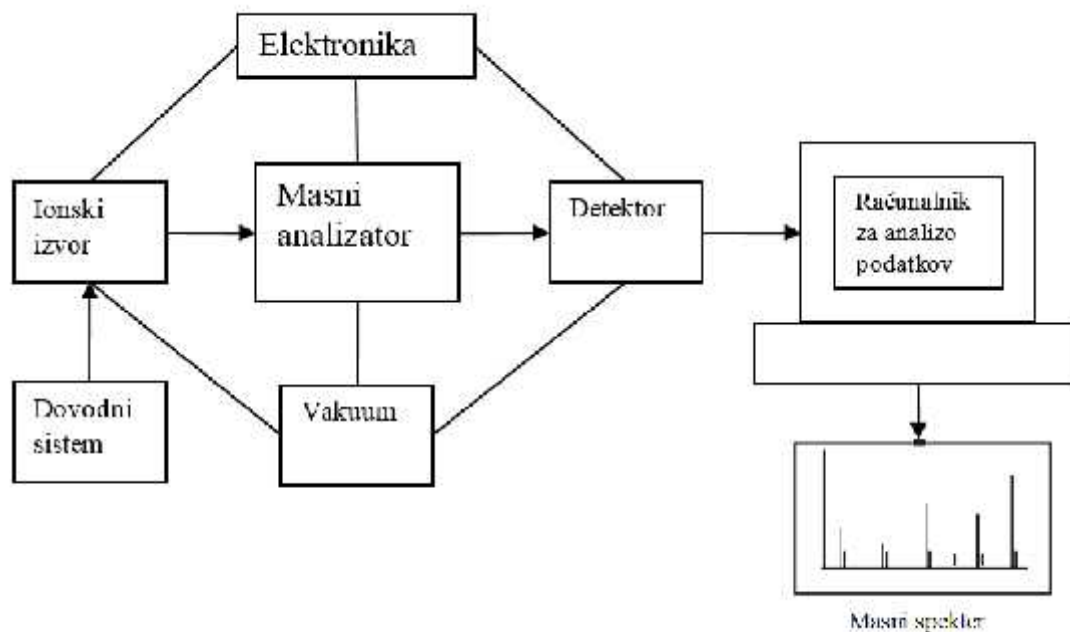
Masna spektrometrija je analitska tehnika, ki omogo a merjenje molekulskih mas posameznih spojin in atomov s pretvarjanjem le teh v nabite ione. Pogosto lahko z masno

spektrometrijo sklepamo tudi o strukturi molekule. Je ena izmed najbolj vsestranskih analitskih metod, ki so trenutno na voljo v kemiji in biokemiji (Dass, 2007).

Analiza z masno spektrometrijo je sestavljena iz treh osnovnih korakov (Dass, 2007):

1. Prvi korak je ionizacija, ki pretvori molekule ali atome analita v plinasto fazo. Za izvedbo tega koraka je potrebno odvzeti ali dodati elektron ali proton. Odve na energija, ki se sprosti med ionizacijo lahko razbije molekulo v fragmente, ki jih je možno analizirati.
2. Naslednji korak je lo evanje in masna analiza ionov molekule ter njihovih nabitih fragmentov na podlagi razmerja med maso in nabojem.
3. Na koncu tok ionov, lo enih glede na maso, še izmerimo, oja amo in prikažemo v obliki masnega spektra.

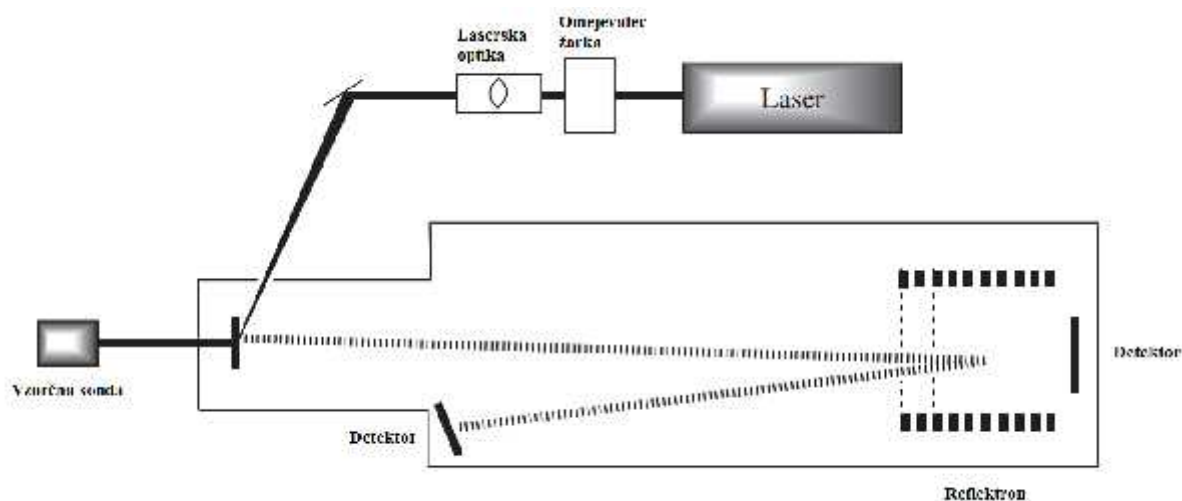
Osnovne enote masnega spektrometra so: dovodni sistem, ionski izvor, masni analizator, detektor, ra unalnik za analizo podatkov sistem za vakuum in elektronika. Dovodni sistem prenese vzorec v ionski izvor, ionski izvor pa nato pretvori nevtralne molekule vzorca v ione v plinastem stanju. Masni analizator s pomo jo magnetnega ali elektri nega polja nadzoruje in kontrolira tok ionov ter jih tako lo i in na podlagi odklona v elektri nem polju dolo i njihovo maso. Detektor izmeri in oja a tok ionov. Ra unalnik za analizo podatkov procesira, shranjuje in prikazuje podatke. Sistem za vakuum ohranja nizek tlak v masnem spektrometru, elektronika pa kontrolira in omogo a delovanje ostalih enot (Dass, 2007).



Slika 2: Enostavna shema masnega spektrometra (Dass, 2007)

Poznamo več različnih tipov ionizacije, med najbolj pogostimi sta MALDI (*ang. Matrix Assisted Laser Desorption ionization*) in ESI (*ang. Electrospray ionization*).

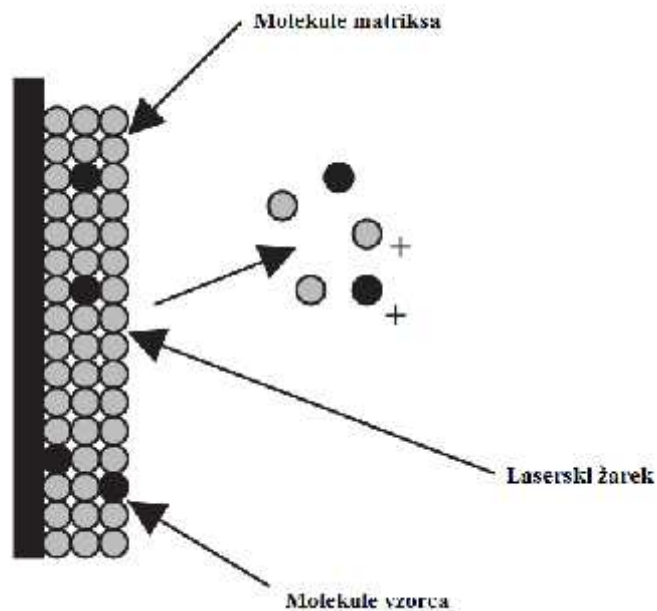
V našem primeru je bil za analizo vzorcev uporabljen MALDI – TOF analizator, pri čemer beseda MALDI izhaja iz tipa ionizacije, TOF (*ang. time of flight*) pa izhaja iz tipa masnega analizatorja oziroma iz principa delovanja tega.



Slika 3: Shematski prikaz MALDI – TOF analizatorja (Dass, 2007).

Pri MALDI ionizaciji gre za mešanje vzorca z velikim masnim prebitkom matriksa in nanašanje mešanice na posebno ploščo. Ko topilo izpari, v kratkih intervalih obsevamo kristale matriksa in vzorca z močnim laserskim žarkom, kar povzroči ionizacijo matriksa in vzorca v plinasto fazo (slika 4). MALDI se največkrat uporablja v kombinaciji s TOF

masnim analizatorjem. Glavni razlog za to je njegov velik masni razpon in pa sposobnost, da analizira celoten spekter enega intervala obsevanja z laserjem (Dass, 2007).



Slika 4: Shematski prikaz MALDI ionizacije (Dass, 2007).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Mikroorganizem

Streptomyces rimosus M4018 z OTC^R (Rhodes in sod., 1981).

3.1.2 Gojiš a, raztopine in komercialni kompleti

3.1.2.1 Gojiš a

Preglednica 1: GOTC vegetativno gojiš e (VG) (Blaži in sod., 2014)

Setavina	Koli ina
Kazein tripton	1,5 g
Glukoza	1 g
Kalcijev karbonat	0,1 g
Kvasni ekstrakt	0,5g
Destilirana voda	do 100 mL

GOTC vegetativno gojiš e smo pripravili tako, da smo v ašo zatehtali vse potrebne sestavine in nato dopolnili z destilirano vodo do kon nega volumna (100 mL). Gojiš e smo razdelili po 5 mL v 50-mL kivete, ki smo jih zamašili s penastimi zamaški in nato sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C, 25 minut. Po sterilizaciji smo po akali, da se je gojiš e ohladilo in ga shranili v hladilnik (4 °C).

Preglednica 2: GOTC produktivno gojiš e (PG) (Blaži in sod., 2014)

Sestavina	Koli ina
MOPS	1,75 g
Sojina moka	10,5 g
Amonijev sulfat	1,5 g
Magnezijev klorid	0,5 g
Natrijev klorid	0,375 g
Kalcijev karbonat	1,825 g
Koruzni škrob	7 g
1 % raztopina cinkovega sulfata	2,5 mL
1 % raztopina manganovega sulfata	0,937 mL
Destilirana voda	do 250 mL

-pH 6,25

GOTC produktivno gojiš e smo pripravili tako, da smo v ašo zatehtali vse potrebne sestavine in nato dopolnili z destilirano vodo do kon nega volumna (250 mL). Gojiš e smo nato segrevali do 80 °C in mešali. Ko so se sestavine raztopile (ne raztopijo se popolnoma), smo gojiš e ohladili in umerili pH na 6,25 z 10 % NaOH ali HCl. Gojiš e

smo po tem razdelili po 50 mL v 250-mL erlenmajerice. V vsako erlenmajerico smo dodali še 1 mL sojinega olja. Erlenmajerice smo zamašili s penastimi zamaški in jih sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C, 25 minut. Po sterilizaciji smo po akali, da se je gojiš e ohladilo in ga shranili v hladilnik (4 °C).

3.1.2.2 Raztopine

Preglednica 3: 5x red en Bradfordov reagent

Sestavina	Koli ina
Bradfordov reagent	1 mL
Destilirana voda	do 5 mL

Preglednica 4: Zbiralni gel

Sestavina	Koli ina
raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %)	0,652 mL
0,75 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,65 mL
10 % SDS	50 µL
10 % APS	15 µL
TEMED	7,5 µL
dH ₂ O	2,675 mL

Preglednica 5: Lo evalni gel brez dodanega kazeina

Sestavina	Koli ina
raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %)	2 mL
1 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,875 mL
10 % SDS	75 µL
10 % APS	22,5 µL
TEMED	11,25 µL
dH ₂ O	3,55 mL

Preglednica 6: Lo evalni gel z dodanim kazeinom

Sestavina	Koli ina
raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %)	2 mL
1 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,875 mL
10 % SDS	75 µL
10 % APS	22,5 µL
TEMED	11,25 µL
dH ₂ O	3,55 µL
kazein	0,014 g

Preglednica 7: 1x SDS elektroforezni pufer

Sestavina	Koli ina
Tris-baza	3 g
Glicin	14,4 g
SDS	1 g
ddH ₂ O	do 1000 mL

Preglednica 8: 6x nanašalni pufer

Sestavina	Kon na koncentracija
Tris-HCl (pH 6)	375 mM
SDS	9 %
bromfenol modro	0,06 %
DTT	0,6 M
ddH ₂ O do kon nega volumna	

Preglednica 9: Fiksacijska raztopina

Sestavina	Koli ina
100 % metanol	500 mL
100 % očetna kislina	70 mL
ddH ₂ O	do 1000 mL

Preglednica 10: Raztopina za razbarvanje

Sestavina	Koli ina
100 % metanol	100 mL
100 % očetna kislina	70 mL
ddH ₂ O	do 1000 mL

Preglednica 11: 0,25 % raztopina Triton X-100

Sestavina	Koli ina
Triton X-100	75 µL
ddH ₂ O	30 mL

Preglednica 12: 100 mM Tris HCl

Sestavina	Koli ina
Tris-baza	6,057 g
ddH ₂ O	do 500 mL

-pH 7,5; uravnamo z 1 M HCl

Preglednica 13: 10 mM EDTA

Sestavina	Koli ina
EDTA	0,1861 g
100 mM Tris-HCl (pH 7,5)	do 50 mL

Preglednica 14: 2,5 mM PMSF

Sestavina	Koli ina
100 mM PMSF (v 70 % etanolu)	0,5 mL
100 mM Tris-HCl (pH 7,5)	do 20 mL

Preglednica 15: 5 mM PMSF

Sestavina	Koli ina
200 mM PMSF (v 70 % etanolu)	0,5 mL
100 mM Tris-HCl (pH 7,5)	do 20 mL

Preglednica 16: Raztopina komercialne mešanice inhibitorjev proteinaz

Sestavina	Koli ina
Komercialna mešanica inhibitorjev proteinaz	1 tabletko
100 mM Tris-HCl (pH 7,5)	20 L

3.1.3 Laboratorijske aparature in kemikalije

3.1.3.1 Laboratorijske aparature

Preglednica 17: Seznam laboratorijskih aparatov

Aparatura	Proizvajalec
italec mikrotiterskih ploš Safire 2	Tecan
centrifuga za mikrocentrifugirke Centric 200	Tehtnica
hlajena centrifuga Sigma 3K30	Sigma
vrtnik Yellow line TTS2	IKA
pipete Corning Lambda	Corning
inkubator Kambi I-115	Kambi
stresalnik za erlenmajerice in kivete Multitron	Infors HT
CAM-GX-CHEMI HR-Gbox	Syngene
laminar SMBC 122VA	Iskra Pio d.o.o.
stresalna ploš a	Miometra
avtoklav	Sutjeska
pH meter SevenEasy	Mettler Toledo
tehtnica	Lotri d.o.o.

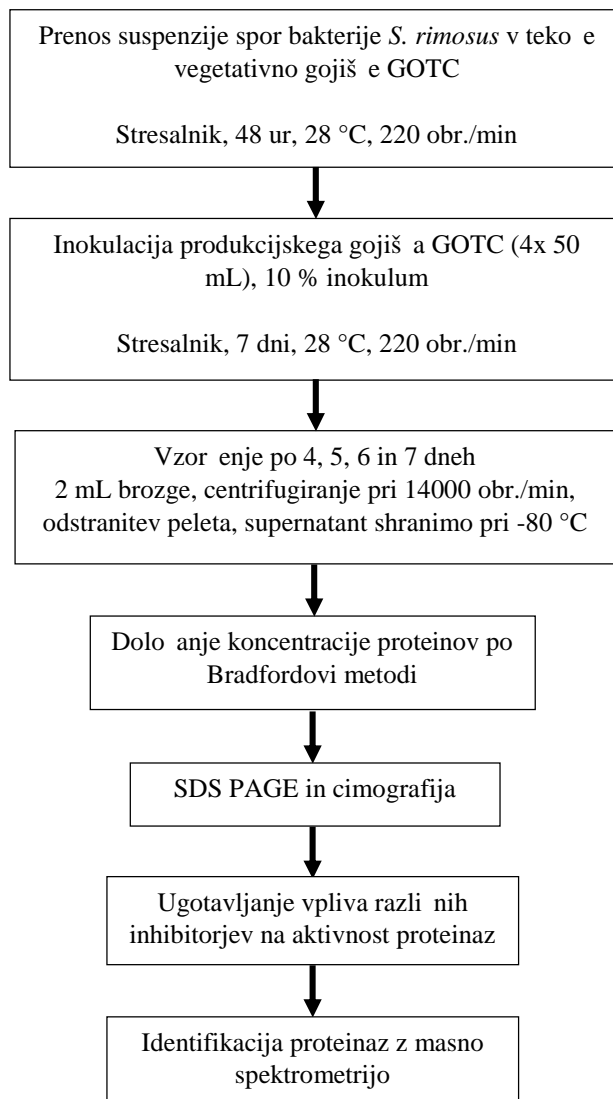
3.1.3.2 Kemikalije

Preglednica 18: Seznam kemikalij

Kemikalija	Proizvajalec
raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %)	Sigma - Aldrich
Tris-baza	Merck Millipore
tetrametil etilen diamid (TEMED)	Sigma - Aldrich
ocetna kislina	Merck Millipore
metanol	Merck Millipore
SimplyBlue	Life technologies
kazein iz govejega mleka	Sigma - Aldrich
Triton X-100	Acros organics
etilendiamintetraocetna kislina (EDTA)	Kemika
fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF)	Sigma - Aldrich
pepton iz kazeina	Merck Millipore
kalcijev karbonat	Merck Millipore
kvasni ekstrakt	BioLife
MOPS	Sigma - Aldrich
sojina moka	Soja protein
amonijev sulfat	Merck Millipore
magnezijev klorid	Sigma - Aldrich
natrijev klorid	Sigma - Aldrich
bakteriološki agar	BioLife
komercialna mešanica inhibitorjev	Roche
amonijev persulfat (APS)	Sigma - Aldrich
natrijev dodecil sulfat (SDS)	Sigma - Aldrich
Bradfordov reagent	Biorad
Sypro Ruby	Invitrogen
koruzni škrob	Helios
glukoza	Merck
ditiotreitol (DTT)	Sigma - Aldrich
bromfenol modro	Sigma - Aldrich

3.2 METODE

3.2.1 Shema poteka dela



Slika 5: Shematski prikaz poteka dela

3.2.2 Priprava inokuluma

Uporabili smo pet kivet s prostornino 50 mL. V vsako izmed njih smo dali 5 mL vegetativnega gojiš a in jih nato inokulirali s 50 μ L suspenzije spor *S. rimosus*. Kivete smo dali na stresalnik in stresali pri pogojih 220 obr./min, 28 °C, 48 ur.

3.2.3 Kultivacija bakterije *Streptomyces rimosus*

Po 48 urah stresanja pri 220 obr./min in 28 °C je sledila inokulacija štirih 250 mL erlenmajeric, v katerih je bilo 50 mL produkcijskega gojiš a. Erlenmajerice smo predhodno vzeli iz hladilnika, da se je gojiš e segrelo na sobno temperaturo, nato pa smo v laminarju s pipeto v vsako erlenmajerico prenesli 5 mL kulture v vegetativnem gojiš u iz posamezne kivete. Erlenmajerice smo dali na stresalnik in stresali pri pogojih 220 obr./min, 28 °C, 7 dni.

3.2.4 Vzor enje in priprava vzorcev za analizo

Po štirih dneh stresanja, smo za eli z vzor enjem. Vzor ili smo iz dveh erlenmajeric, v katerih je kultura najbolj rasla. Odlo ili smo se glede na barvo in izbrali tisti dve, v katerih je bila kultura najbolj temne barve. Iz vsake erlenmajerice smo odpipetirali po 2 mL brozge v dve mikrocentrifugirki s prostornino 2 mL. Erlenmajerice smo dali nazaj na stresalnik, mikrocentrifugirke pa centrifugirali 10 min pri 14000 obr./min. Supernatant smo prenesli v nove mikrocentrifugirke in ponovili centrifugiranje pri enakih pogojih, nato pa supernatant ponovno prenesli v nove mikrocentrifugirke, ki smo jih shranili pri -80 °C. Vzor enje smo ponavljali do sedmega dne kultivacije, tako da smo na koncu dobili vzorce za etrti, peti, šesti in sedmi dan kultivacije.

3.2.5 Dolo anje koncentracije proteinov v vzorcih

V laboratorijski praksi in v procesih iš enja proteinov so za kvantifikacijo proteinov zaželene metode, ki so hitre, ob utljive in ponovljive. Ve ina metod, ki so obstajale pred uveljavitvijo Bradfordove metode, le delno izpolnjuje te pogoje, zato se za spektrofotometri no dolo anje koncentracije proteinov v vzorcih dandanes najpogosteje uporablja Bradfordova metoda. Bradfordova metoda temelji na vezavi barvila Coomassie Brilliant blue na protein. To barvilo obstaja v dveh barvah, in sicer v rde i ter modri. Barvilo ob vezavi na proteine spremeni barvo iz rde e v modro, kar povzro i premik absorpcijskega maksimuma barvila iz 365 na 595 nm. Prav pove anje absorbcije pri 595 nm pa je sprememba, ki jo merimo in s pomo jo katere dolo imo koncentracijo proteinov. Metoda je hitra in ponovljiva, saj se barvilo na protein veže v slabih 2 minutah, obarvanje pa ostane stabilno še približno 1 uro (Bradford, 1975).

Vzorci smo najprej odtalili, nato pa na mikrotitrsko ploščo nanесли po 4 μL vsakega vzorca v svojo luknjico. Pred nanosom na mikrotitrsko ploščo smo vsak vzorec premešali na vrtiniku. K vzorcem smo dodali še 196 μL pet-krat rednega Bradfordovega reagenta, tako da je bil končni volumen v vsaki luknjici 200 μL . Po 5 minutah smo čakali, da je potekla reakcija, nato pa smo izmerili absorbanco pri 595 nm.

Od izmerjenih absorbanco smo nato odšteli vrednost slepega vzorca (destilirana voda). Dobljene vrednosti smo vstavili v umeritveno krivuljo in izračunali koncentracijo proteinov v supernatantu (Preglednica 19).

3.2.6 SDS PAGE

3.2.6.1 Priprava ločevalnega in zbiralnega gela

V falkon kivetu smo dodali raztopino akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %), 1 M Tris-HCl s pH 8,8, 10 % SDS, dH₂O in isto na koncu še TEMED ter APS (Preglednica 5), da je gel za el polimerizirati. Zmes smo rahlo premešali s plastično pipeto ter jo nato s pomočjo iste pipete nalili med stekelci za pripravo gela, ki smo jih predhodno sestavili. Na vrh gela smo nalili destilirano vodo do roba stekelca in pustili približno 30 minut, da se je gel strdil. Ko se je gel strdil, smo vodo odlili ter prostor med stekelci na vrhu osušili s papirnato brisačo. Nato smo pripravili mešanico za zbiralni gel, ki smo ga nalili nad ločevalni gel. Za zbiralni gel smo v kivetu zmešali raztopino akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %), 0,75 M Tris-HCl s pH 6,8, 10 % SDS, dH₂O in isto na koncu dodali še TEMED ter APS za polimerizacijo (Preglednica 4). Ponovno smo vse premešali s plastično pipeto ter nalili na vrh ločevalnega gela. Ko smo zbiralni gel nalili, smo vanj takoj vstavili še glavni ek, da so nastali žepki za nanašanje vzorcev. Gel smo pustili približno 30 minut, da se je strdil.

3.2.6.2 Priprava vzorcev za nanos na gel (brez kazeina)

Na gel brez kazeina smo nanašali 9 μL supernatanta vzorca (masa proteinov = 7 μg), pripravljenega kot je opisano v točki 3.2.4, zmešanega z 9 μL 2x nanašalnega pufra. Mešanico smo segrevali 10 minut na 95 °C in nato nanašali po 18 μL v žepke gela.

3.2.6.3 Potek elektroforeze

V posodo za izvedbo elektroforeze smo namestili dva gela in posodo napolnili z 1x SDS elektroforeznim pufrom. Na gel smo nanegli vzorce. Posodo smo pokrili s pokrovom in priklopili na vir električnega toka. Za dva gela smo tok na začetku nastavili na 50 mA (25 mA na gel). Ko je začela napetost naraščati, smo tok postopoma zmanjševali, da je bila bolj lepša, ter da temperatura ni preveč naraščala. Mejna napetost, pri kateri smo začeli zmanjševati tok, je bila okrog 120 V.

3.2.6.4 Spiranje in barvanje gela brez dodanega kazeina po elektroforezi

Po končani elektroforezi smo gel dvakrat zaporedoma po 30 minut spirali s 30 mL fiksacijske raztopine (Preglednica 9). Po drugem spiranju smo odlili fiksacijsko raztopino in gel v temi prelili s 30 mL barvila Sypro Ruby. Od tu naprej smo nadaljevali v temi, saj je barvilo občutljivo na svetlobo. Gel smo pustili ležeti na streljniku v Sypro Ruby, da se je dobro obarval. Naslednji dan smo gel dvakrat zaporedoma po 30 minut spirali z raztopino za razbarvanje (Preglednica 10). Po tem pa smo gel še trikrat zaporedoma po 5 minut spirali z bidestilirano vodo. Sledilo je slikanje gela s kamero CAM-GX-CHEMI HR-Gbox (UV transiluminator - vzbujanje in Et/Br filter - emisija).

3.2.7 Cimografija

3.2.7.1 Priprava ločevalnega in zbiralnega gela

Postopek priprave gelov je bil enak kot v točki 3.2.6.1, le da je ločevalni gel vseboval še 0,1 % kazein.

3.2.7.2 Priprava vzorcev za nanos na gel (z dodanim kazeinom)

Na gele s kazeinom smo dodajali manjše volumne vzorcev, saj so proteinaze precej aktivne in bi pri prevelikih koncentracijah dobili nejasne elektroforetske pike na gelu. V žepke gela smo nanašali 2 μ L vzorca (masa proteinov = 1,6 μ g), pripravljenega kot je opisano v točki 3.2.4, in 2 μ L 2x nanašalnega pufra. Vzorcev pred nanosom na gel nismo segrevali, da so proteinaze ohranile svojo aktivnost.

3.2.7.3 Potek elektroforeze

Postopek je enak kot v točki 3.2.6.3.

3.2.7.4 Spiranje, inkubacija in barvanje gela z dodanim kazeinom po elektroforezi

Po konani elektroforezi smo gel 45 minut spirali v 30 mL 0,25 % raztopine tritona. Nato smo gel 60 minut spirali v 30 mL 100 mM Tris-HCl s pH 7,5, odlili pufer in dodali novega ter gel ne inkubirali pri temperaturi 37 °C. Naslednji dan smo odlili Tris-HCl in gel prelili s 30 mL barvila Simply Blue, v katerem smo ga barvali 1 uro. Sledilo je 1-h spiranje z bidestilirano vodo in slikanje s kamero CAM-GX-CHEMI HR-Gbox (bela svetloba, brez filtra).

3.2.8 Ugotavljanje vrste proteinaz z uporabo različnih inhibitorjev

Vrsto proteinaz v vzorcih smo testirali z uporabo naslednjih inhibitorjev; EDTA (etilendiamintetraocetna kislina), ki je inhibitor metalo proteinaz, PMSF (fenilmetansulfonil fluorid), ki je inhibitor serinskih proteinaz, in komercialno mešanico inhibitorjev. Gel z dodanim kazeinom smo naredili po postopku, opisanem v točki 3.2.7.1, nanj v dveh ponovitvah nanесли dva vzorca, ki smo jih pripravili, kot je opisano v točki 3.2.7.2 in izvedli elektroforezo, kot je opisano v točki 3.2.7.3. Gel smo nato 45 minut spirali v 30 mL 0,25 % raztopine Tritona in nato še 60 minut v 30 mL 100 mM Tris-HCl s pH 7,5. Gel smo potem razrezali na polovico in eno polovico ne inkubirali v 30 mL 100 mM Tris-HCl s pH 7,5 pri temperaturi 37 °C, drugo polovico pa smo ne inkubirali v raztopinah različnih inhibitorjev (10 mM EDTA, 2,5 mM PMSF, 5 mM PMSF in raztopina komercialne mešanice inhibitorjev) pri temperaturi 37 °C. Naslednji dan smo obe polovici barvali s Simply Blue, kot je opisano v točki 3.2.6.4, naredili primerjavo in ocenili vpliv inhibitorjev na aktivnost proteinaz.

3.2.9 Rezanje vzorcev iz gelov

Določene elektroforetske pte smo izrezali iz gelov in jih poslali na identifikacijo z masno spektrometrijo.

3.2.10 Identifikacija proteinov

Identifikacija proteinov je bila opravljena z masno spektrometrijo na Univerzi v Yorku (University of York, York, Velika Britanija).

4 REZULTATI

Po etrtem, petem, šestem in sedmem dnevu kultivacije bakterije *S. rimosus* smo vzor ili brozgo, jo centrifugirali, supernatant pa prenesli v nove mikrocentrifugirke, ter jih shranili na - 80 °C za nadaljnje delo. V tem supernatantu smo dolo ili koncentracijo proteinov z Bradfordovo metodo, sledila je detekcija in dolo anje aktivnosti proteinaz na gelih, preverjanje vrste proteinaz z uporabo specifi nih inhibitorjev ter identifikacija proteinaz z masno spektrometrijo.

4.1 MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V SUPERNATANTU BROZGE Z BRADFORDOVO METODO

Za merjenje koncentracije proteinov v supernatantu brozge smo uporabili Bradfordovo metodo, ki je pogosto uporabljana metoda za merjenje celokupne koncentracije proteinov v vzorcih, saj je hitra in enostavna (Bradford, 1975).

Umeritvena krivulja:

$$Y=0,49689 x + 0,01152 \quad \dots(1)$$

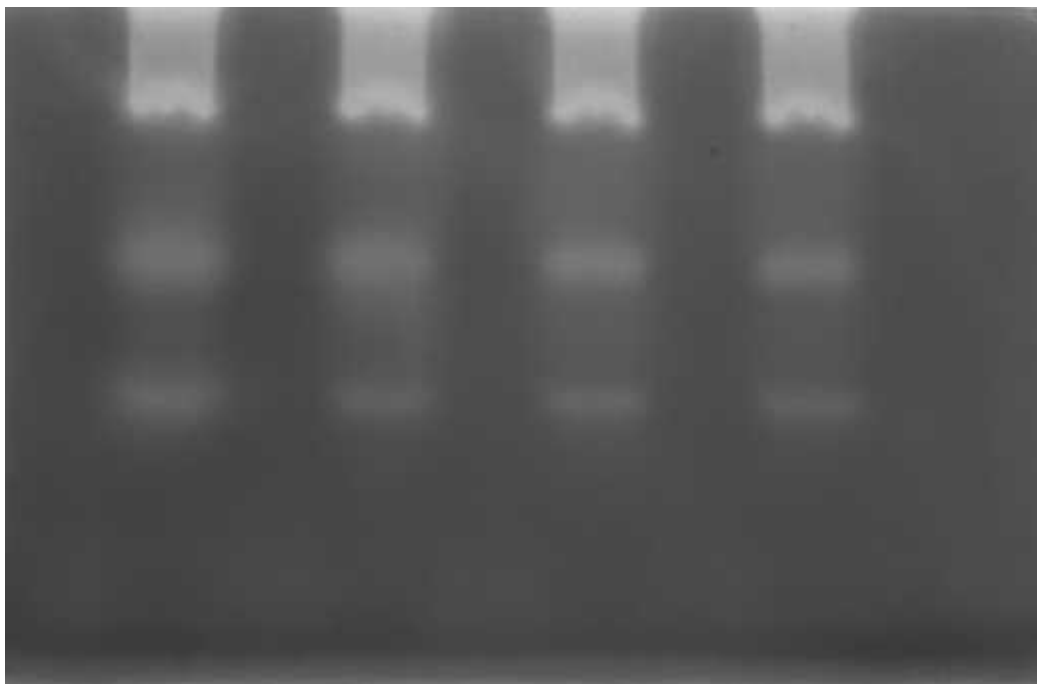
Preglednica 19: Izmerjene absorbance in izra unane koncentracije proteinov v posameznih vzorcih

Oznaka vzorca	Absorbanca (=595 nm)	Povpre je obeh meritev	Odšteta vrednost slepega vzorca	Izra un koncentracije (µg/µL)
1A4	0,8104	0,8106 ± 0,0003	0,3861	0,7538
	0,8108			
1B4	0,8426	0,8292 ± 0,0190	0,4047	0,7913
	0,8158			
1A5	0,8779	0,8673 ± 0,0151	0,4428	0,8679
	0,8566			
1B5	0,8261	0,8388 ± 0,0180	0,4143	0,8106
	0,8515			
1A6	0,8536	0,8530 ± 0,0009	0,4285	0,8391
	0,8523			
1B6	0,8900	0,8762 ± 0,0195	0,4517	0,8859
	0,8624			
1A7	0,8798	0,8812 ± 0,0019	0,4567	0,8958
	0,8825			
1B7	0,8756	0,8682 ± 0,0105	0,4437	0,8697
	0,8607			
1C7	0,8740	0,8763 ± 0,0032	0,4518	0,8860
	0,8785			
1D7	0,8883	0,8715 ± 0,0238	0,4470	0,8763
	0,8546			
ISTO GOJIŠ E	0,9758	0,9597 ± 0,0228	0,5352	1,0539
	0,9436			
SLEPI VZOREC	0,4250	0,4245 ± 0,0007		
	0,4240			

4.2 DETEKCIJA IN AKTIVNOST PROTEINAZ NA GELIH

Za detekcijo proteinaz smo uporabili SDS PAGE elektroforezo (to ka 3.2.6), aktivnost proteinaz pa smo zaznavali s kazeinsko cimografijo, kot je opisano v to ki 3.2.7. Obe metodi temeljita na lo evanju proteinov na gelu in sta pogosto uporabljani metodi v tovrstnih eksperimentih.

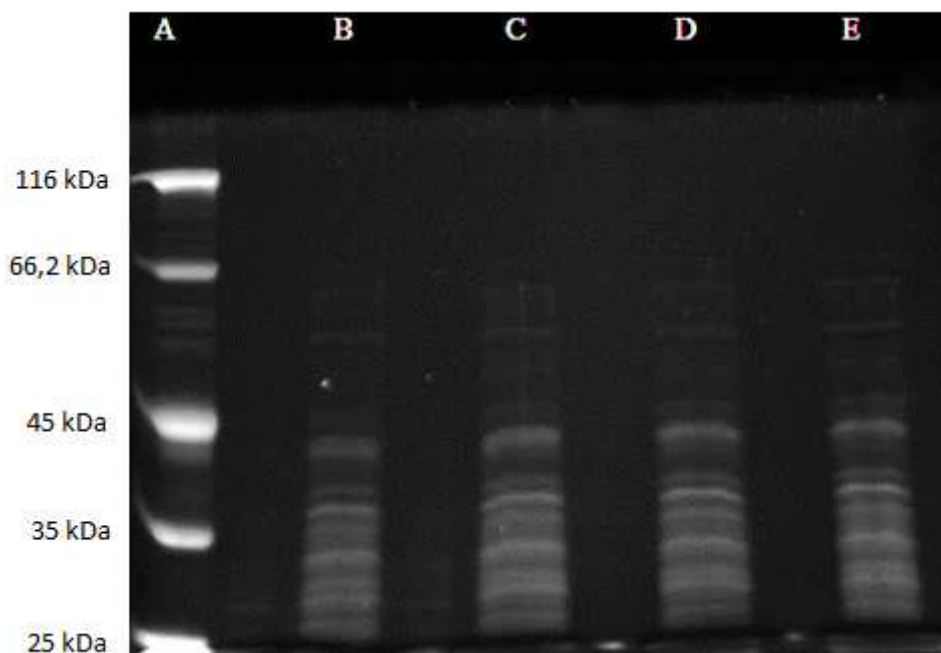
4.2.1 Kazeinska cimografija



Slika 6: Dolo anje aktivnosti proteinaz na gelu z dodanim kazeinom. Nanešeni so vzorci v 4 ponovitvah po 7 dneh kultivacije bakterije *Streptomyces rimosus*.

Lo evalni gel: 8 % akrilamid, zbiralni gel: 4 % akrilamid. Proteini so bili detektirani z barvilom Simply Blue. Masa proteinov v žepkih je bila 1,6 µg.

4.2.2 SDS PAGE



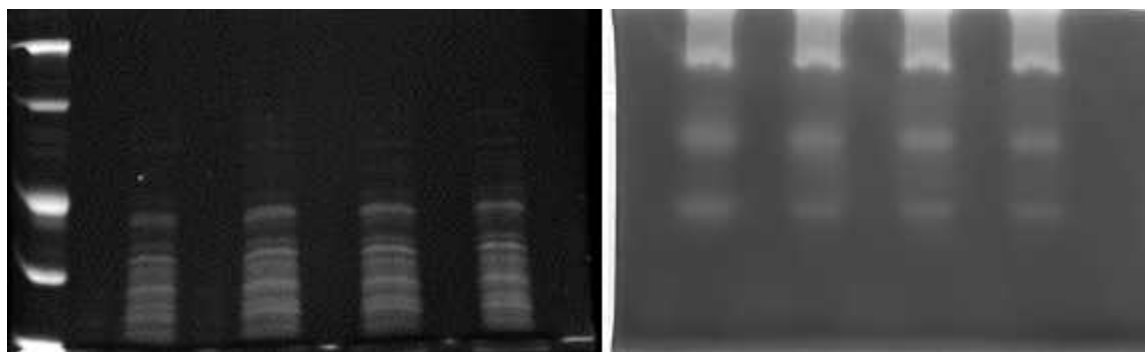
Slika 7: SDS-PAGE analiza zunajceli nih proteinov bakterije *Streptomyces rimosus*.

A: raztopina proteinov znanih molekulskih mas v kDa

B-E: Vzorci po 7 dneh kultivacije.

Lo evalni gel: 8 % akrilamid, zbiralni gel: 4 % akrilamid. Proteini so bili detektirani z barvilom Sypro Ruby. Masa proteinov v žepkih B-E je 7 μ g.

4.2.3 Poravnava obeh gelov pred rezanjem elektroforetskih rt iz gela

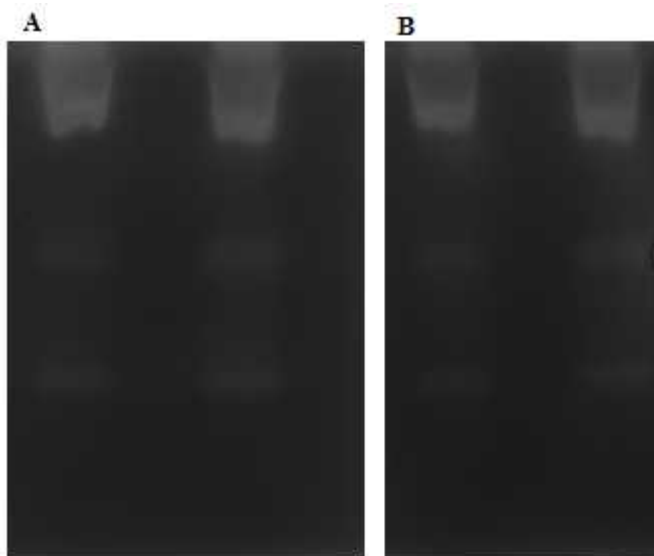


Slika 8: SDS PAGE analiza (levo) in cimografija (desno) zunajceli nih proteinov bakterije *Streptomyces rimosus*.

4.3 DOLO ANJE TIPA PROTEINAZ Z UPORABO RAZLI NIH INHIBITORJEV

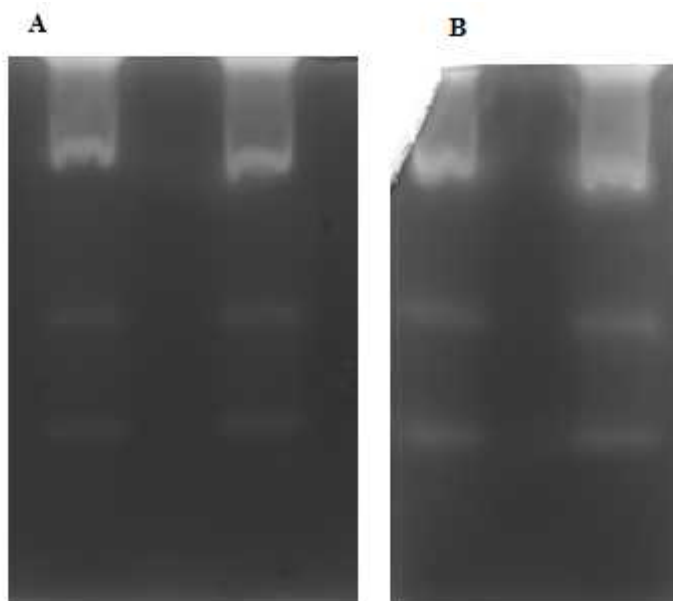
Za dolo anje tipa proteinaz smo uporabili specifi ne inhibitorje, ki inhibirajo le aktivnost proteinaz tistega tipa, za katere so specifi ni.

4.3.1 EDTA

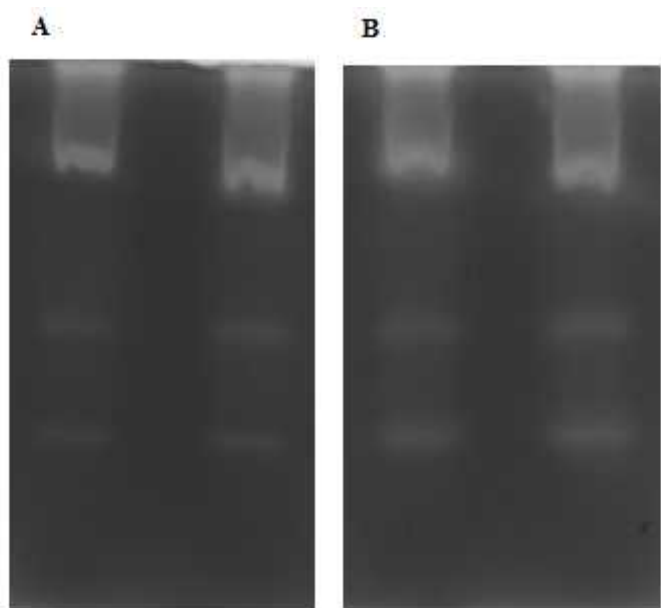


Slika 9: Aktivnost proteinaz (A: v prisotnosti v 10 mM EDTA, B: brez dodatka 10 mM EDTA)

4.3.2 PMSF

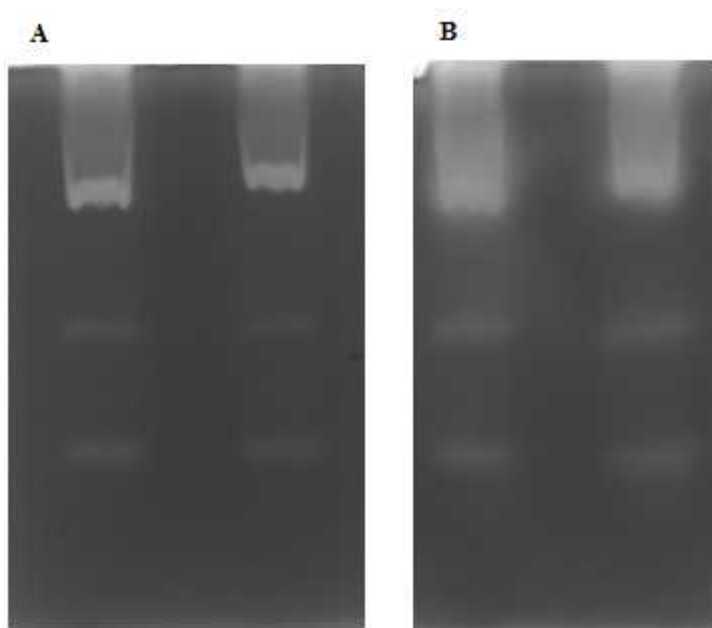


Slika 10: Aktivnost proteinaz (A: v prisotnosti 2,5 mM PMSF, B: brez dodatka 2,5 mM PMSF)



Slika 11: Aktivnost proteinaz (A: v prisotnosti 5 mM PMSF, B: brez dodatka 5 mM PMSF)

4.3.3 Komercialna mešanica inhibitorjev proteinaz

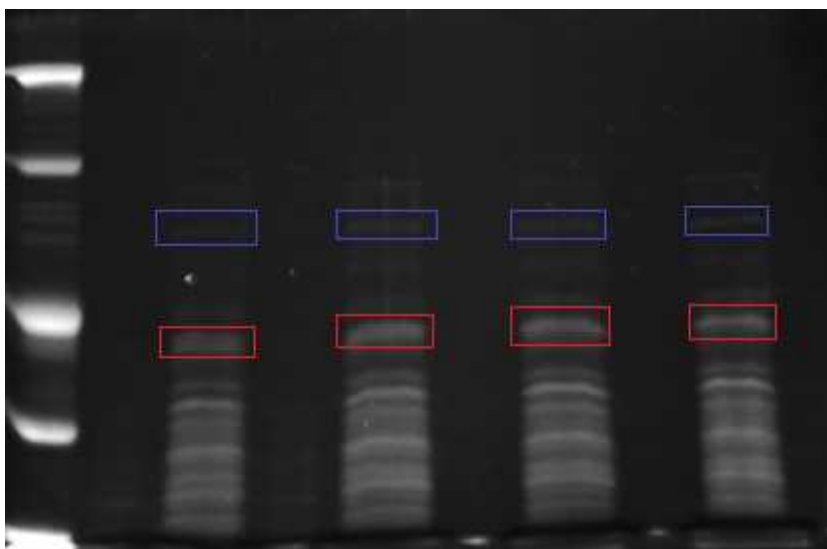


Slika 12: Aktivnost proteinaz (A: v prisotnosti komercialne mešanice inhibitorjev proteinaz, B: brez dodatka inhibitorjev)

4.4 IDENTIFIKACIJA PROTEINAZ Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Sliki gela po SDS PAGE analizi in cimografiji smo med seboj primerjali (Slika 9) in nato iz gela brez dodanega kazeina (SDS PAGE analiza, Slika 7) izrezali trakce, ki naj bi vsebovali protein s proteinazno aktivnostjo, saj so na gelu s kazeinom pokazali proteoliti no aktivnost (cimografija, Slika 6). Izvedba tega je bila precej zahtevna, saj je bilo na gelu brez kazeina prisotnih precej ve proteinov in je bilo težko dolo iti, katera elektroforetska rta se ujema s to no tisto rto, ki na gelu s kazeinom kaže proteoliti no aktivnost. Tako smo izrezali dva proteina, vsakega v štirih ponovitvah (Slika 13). Identifikacija proteinov (proteinaz) z masno spektrometrijo je bila izvedena na Univerzi v Yorku.

Prve elektroforetske rte (ozna ene modro) se zaradi nizke koncentracije pri vseh vzorcih precej slabše vidijo od drugih rt (ozna ene rde e), vendar pa so se na gelu videle precej bolje kot na sliki.



Slika 13: Dolo itev elektroforetskih rt na SDS PAGE gelu za identifikacijo proteinov z masno spektrometrijo, modro obkrožene rte: protein 1, rde e obkrožene rte: protein 2.

4.4.1 Rezultati identifikacije proteinov z masno spektrometrijo

Preglednica 20: Rezultati identifikacije proteina 1 z masno spektrometrijo

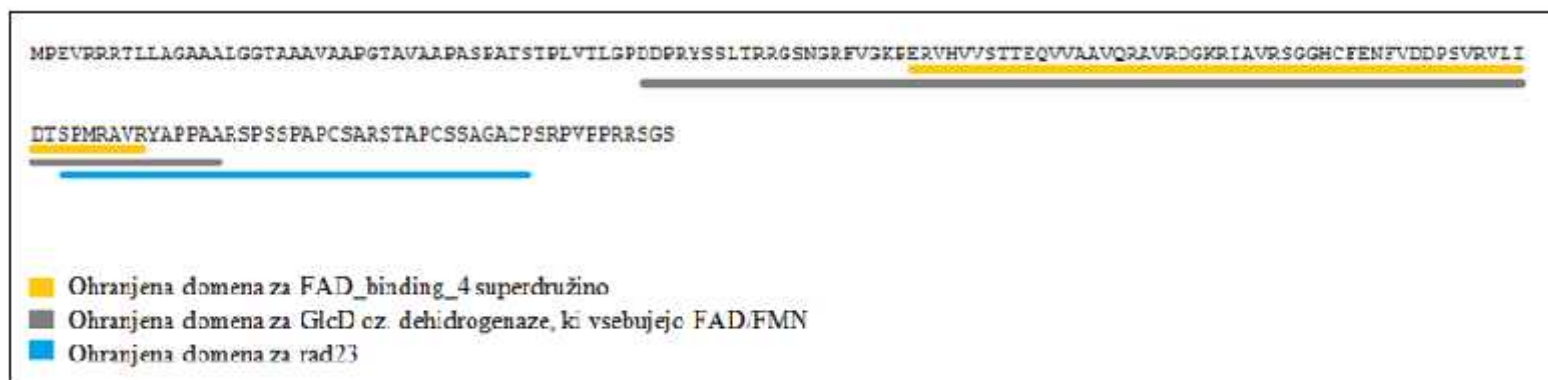
zadetek 1	
Pristopna številka v bazi NCBI/ime proteina	gi 490082952/hypothetical protein, partial [Streptomyces rimosus ATCC 10970]
MASCOT "score" za najvišji, najboljši in zadetek	67
Število ujemanih peptidov najvišjega zadetka	1
Masa (Mr)	17197 Da
pI (prera unana)	11,28
AK sekvenca	<p>1 MPEVRRRTLL AGAAALGGTA AAVAAPGTAV AAPASPATST PLVTLGPDDP</p> <p>51 RYSSLTRRGS NGRFVGKPER VHVSTTEQV VAAVQRAVRD GKRIAVRSGG</p> <p>101 HCFENFVDDP SVRVLIDTSP MRAVRYAPPA ARSPSSPAPC SARSTAPCSS</p> <p>151 AGACPSRPVP PRRSGS</p>

Preglednica 21: Rezultati identifikacije proteina 2 z masno spektrometrijo

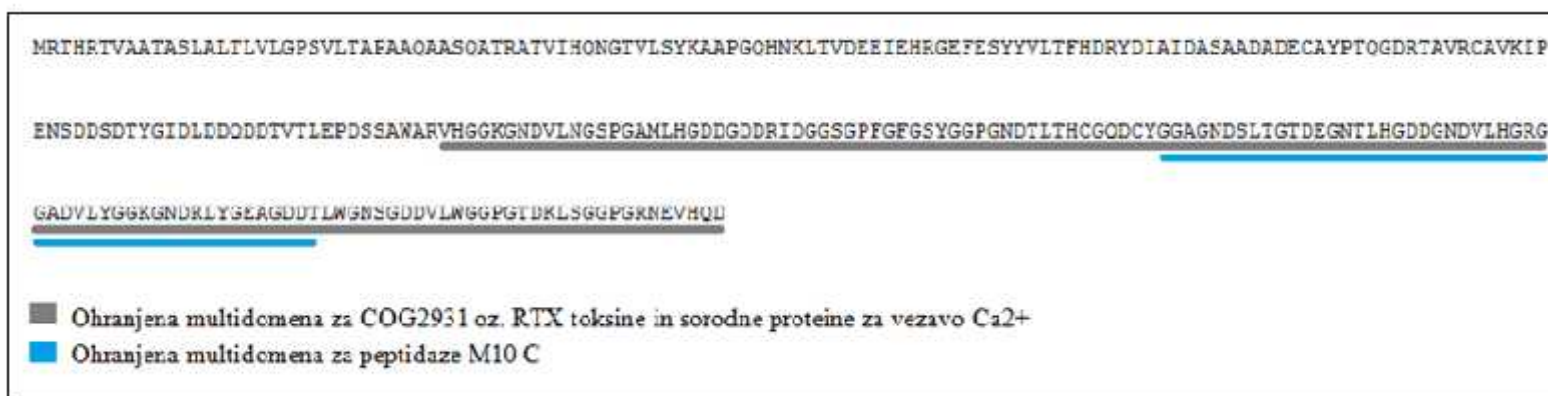
zadetek 1	
Pristopna številka v bazi NCBI/ime proteina	gi 490077019/putative calcium-binding protein [Streptomyces rimosus ATCC 10970]
MASCOT "score" za najvišji, najbolj zna ilen zadetek	227
Število ujemanih peptidov najvišjega zadetka	2
Masa (Mr)	29834 Da
pI (prera unana)	4,34
Funkcije proteina	vezava kalcijevih ionov
AK sekvenca	<p>1 MRTHRTVAAT ASLALTLVLG PSVLTAPAAQ AASQATRATV IHQNGTVLSY</p> <p>51 KAAPGQHNLK TVDEEIEHRG EFESYYVLT HDRYDIAIDA SAADADECAY</p> <p>101 PTQGDRTAVR CAVKIPENSD DSDTYGIDL DQDDTVTLEP DSSAWARVHG</p> <p>151 GKGNDVNLGS PGAMLHGDDG DDRIDGSGP FGFSGYGGPG NDTLTHCGQD</p> <p>201 CYGGAGNSL TGTDEGNTLH GDDGNDVLHG RGGADVLYGG KGNDRLYGEA</p> <p>251 GDDTLWGNNG DDVLWGGPGT DKLSGGPGRN EVHQD</p>
zadetek 2	
Pristopna številka v bazi NCBI/ime proteina	gi 490080128/peptidase M4 thermolysin [Streptomyces rimosus ATCC 10970]
MASCOT "score" za najvišji, najbolj zna ilen zadetek	204
Število ujemanih peptidov najvišjega zadetka	2
Masa (Mr)	79037 Da
pI (prera unana)	6,61
Funkcije proteina	vezava kalcijevih ionov, metaloendopeptidazna aktivnost, endopeptidazna aktivnost serinskega tipa, proteoliza
AK sekvenca	<p>1 MRRTPHRRAV ATGAVVAMAA MLTVSVQAGA GTAATPRPGQ VHAQDPDGPAL</p> <p>51 PAKLTPAQRA ELLRAARAGA AETARQLKLG PKEKLVVRDV VKDVSGSLHT</p> <p>101 RYERTYAGLP VLGGLLVVHK ADGKVRGVTG AVRSQLDVPT TTAKVKPATA</p> <p>151 EQKALKASQA QGAKKSDAQE PRKVVWVADG KPLLAYETVV GGVQEDGTP</p> <p>201 NELHVVTDAT TGEKLAEWQG VHEGTGNSMY SGQVTLGTAP SYTLTDTRG</p> <p>251 NHKTYNLNRG TSGTGLFTD PDDVWGDGTP QNAQTAGVDA HYGAALTWDY</p> <p>301 YKNVHGRSGI RGDGVGAYSR VHYGNNYVNA FWQDSCFCMT YGDGSGNVKP</p> <p>351 LTSIDVAAHE MTHGVTSATA NLTYSGEPGG LNEGTSDIFA TAVEFNANNP</p> <p>401 KDVG DYLIGE AIDINGNGTP LRYMDKPSK GRSKDYWYSG IGGVDVHYSS</p> <p>451 GVANHHFFYLL AEGSGPKDIN GVHYDSPTYD NLPVPGIGRS NAEKIWFSA</p> <p>501 TKYMNANTNY AAARTATLSA AAELFGQGS A TYNTVANTWA AVNVGQRPD</p> <p>551 SGVSVTNPGN QTSTVGQPAS LQIKATSSNA GALKYAATGL PAGLSINQDS</p> <p>601 GLISGTPPTA GTGNVTVTVT DSANKTGTT S FTWTVNPAGG GDVFENTDDV</p> <p>651 PIPDAGAAVN SPIKVTRAGN APSALKVDVD IVHTYRGDLV IDLVAPDGTA</p> <p>701 YRLKNSNAAD SAENVKATYT VNASAQKAEG TWNLRVRDVY QQDSGYINSW</p> <p>751 KLTF</p>

Pogorevc D. Zunajceli ne proteinaze bakterije *Streptomyces rimosus*.

Mag. delo (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2014



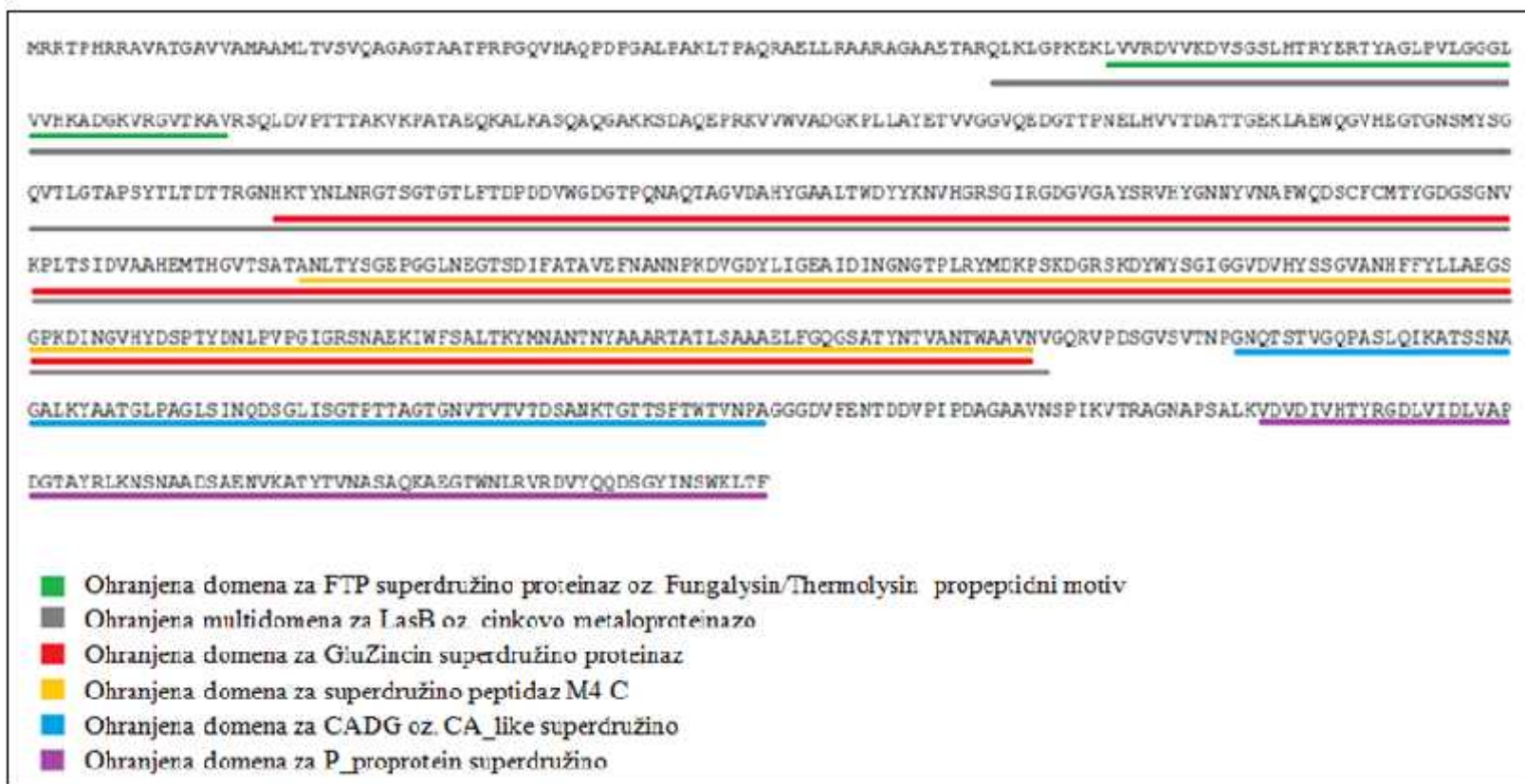
Slika 14: Označene ohranjene domene pri identificiranem proteinu 1 (hypothetical protein) (NCBI, 2014).



Slika 15: Označene ohranjene domene pri identificiranem proteinu 2, zadetek 1 (putative calcium-binding protein) (NCBI, 2014).

Pogorevc D. Zunajceli ne proteinaze bakterije *Streptomyces rimosus*.

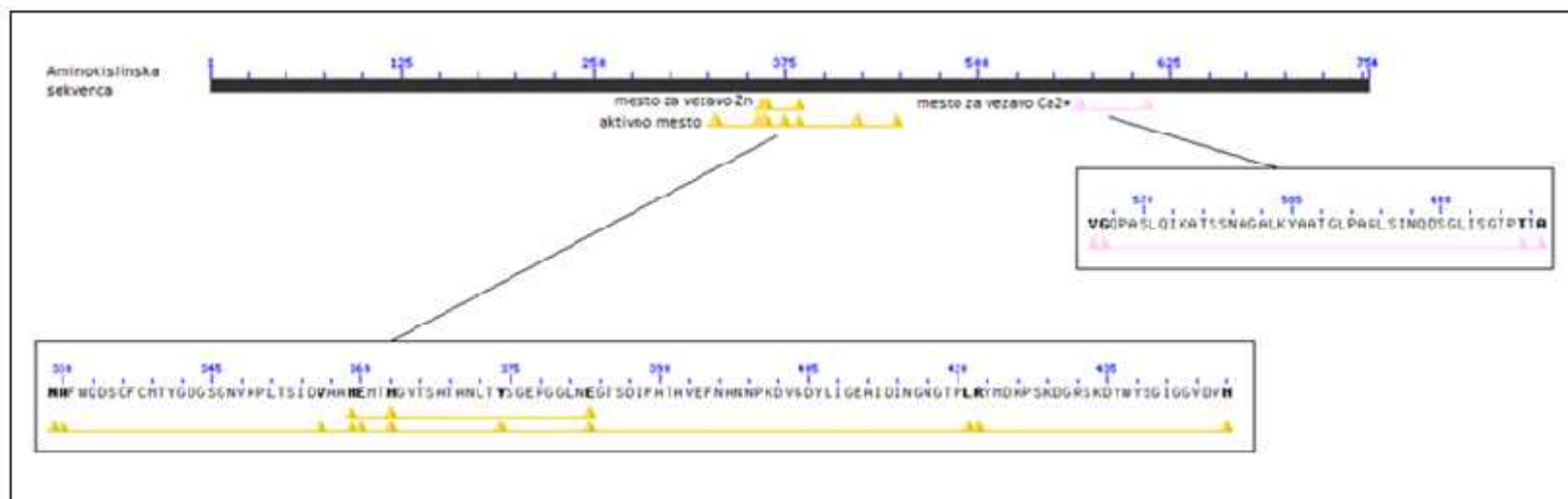
Mag. delo (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2014



Slika 16: Označene ohranjene domene pri identificiranem proteinu 2, zadetek 2 (peptidase M4 thermolysin) (NCBI, 2014).

Pogorevc D. Zunajceli ne proteinaze bakterije *Streptomyces rimosus*.

Mag. delo (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2014



Slika 17: Ozna ene pomembne aminokisliline v aktivnem mestu, mestu za vezavo cinka ter mestu za vezavo kalcija pri identificiranem proteinu 2, zadetek 2 (peptidase M4 thermolysin) (NCBI, 2014).

5 RAZPRAVA

Z analizo zunajceli nih proteinov bakterije *Streptomyces rimosus* smo želeli detektirati proteinaze in ugotoviti, katere izmed njih imajo največjo proteolitično aktivnost, ter jih identificirati.

5.1 LO EVANJE IN DETEKCIJA PROTEINAZ

Za detekcijo zunajceli nih proteinaz bakterije *Streptomyces rimosus* smo izbrali cimografijo. Cimografija je ena izmed najboljših biokemijskih metod za določanje encimske aktivnosti. Temelji na SDS elektroforezi v nereducirajočih pogojih, pri čemer je primeren substrat kopolimeriziran z akrilamidom. Po elektroforezi je SDS odstranjen s spiranjem gela v raztopini Tritona X-100, kar omogoča encimu, da ponovno pridobi svojo aktivnost (Resa in sod., 1994). Ena glavnih prednosti cimografije v primerjavi s spektrofotometričnimi metodami je določanje njihove proteolitične aktivnosti ter ob enem tudi njihovo ločevanje na gelu glede na velikost. V našem primeru je to zelo pomembno, saj imamo kompleksen vzorec, v katerem je veliko različnih proteinov in tudi proteinaz. Če želimo ugotoviti, katere izmed teh proteinaz imajo proteolitično aktivnost ter določiti kolikšen delež celokupne proteolitične aktivnosti lahko pripišemo kateri proteinazi, moramo proteinaze najprej ločiti.

Prav zaradi tega je cimografija za nas idealna metoda, saj proteinaze z elektroforezo najprej ločimo na gelu s kopolimeriziranim substratom, ki je v našem primeru kazein, temu pa sledi detekcija proteolitične aktivnosti proteinaz (Kaberdin in McDowall, 2003).

Za uspešno detekcijo proteinaz s cimografijo je pomembna tudi izbira primernega substrata. V primeru, da preužemo proteinaze iz slabo karakteriziranih ekstraktov, so bolj primerni "naravni" proteinski substrati, saj imajo proteini po navadi več veznih mest, zaradi katerih jih lahko večje število raznovrstnih encimov prepozna kot substrat (Michaud, 1998). Ker smo predpostavili, da analiziramo kompleksno mešanico večjega števila neznanih proteinaz, smo se odločili za naravni, proteinski substrat – kazein. Kazein je idealen substrat za naš primer, saj je komercialno dostopen, poceni in se pogosto uporablja za tovrstne detekcije proteolitične aktivnosti (Michaud, 1998).

Ločevanje zunajceli nih proteinov smo izvedli na 8 % zamreženem poliakrilamidnem gelu. Vzporedno pa smo te iste vzorce ločili še na 8 % poliakrilamidnem gelu z dodanim kazeinom. Ko smo pobarvali in slikali gel brez dodanega kazeina, smo opazili veliko število elektroforetskih paskov, kar potrjuje, da je supernatant gojišča bakterije *Streptomyces rimosus* kompleksna mešanica velikega števila različnih proteinov (Slika 7). Naš cilj je bil ugotoviti, kateri izmed teh proteinov so proteinaze z najvišjo proteolitično aktivnostjo. Zato smo ta gel primerjali z gelom, v katerega smo dodali kazein. Na kazein se je med

barvanjem gela vezalo barvilo, zato je bil gel modro obarvan. Na mestih, kjer smo nanegli vzorce, pa smo opazili bele lise, kar nakazuje, da so na teh mestih prisotne proteinaze s proteoliti no aktivnostjo, ki so razgradile kazein in se zato barvilo tam ni vezalo. Dve proteinazi sta imeli molekulsko maso približno 55 kDa in 45 kDa, tretja pa okrog 100 kDa (Slika 8) in se je nahajala v širokem pasu v bližini žepka, kamor smo na gel nanegli naš vzorec. Obstaja možnost, da je ta širok pas v bližini žepka kamor smo nanegli vzorec, posledica aktivnosti proteinaz že med samim lo evanjem na gelu. To domnevo bi lahko potrdili tako, da bi gel pobarvali takoj po lo evanju proteinov z elektroforezo, še pred inkubacijo v pufru pri 37 °C. Na ta na in bi lahko z zagotovostjo potrdili ali je kakšnakoli aktivnost proteinaz prisotna že med samim lo evanjem proteinov z elektroforezo.

5.2 OCENJEVANJE AKTIVNOSTI IN DOLO ANJE VRSTE PROTEINAZ Z UPORABO RAZLI NIH INHIBITORJEV

Proteinaze lahko razdelimo v štiri glavne skupine; serinske, cisteinske, aspartatne in metalo proteinaze (Wandersman, 1989, to ka 2.1). Vsaka izmed teh štirih skupin proteinaz ima druga ne lastnosti in jih lahko inhibiramo z uporabo razli nih inhibitorjev proteinaz. Pri našem delu smo izkoristili sposobnost posameznih inhibitorjev, da inhibirajo specifi no vrsto proteinaz. Poskus smo zasnovali tako, da smo gel z dodanim kazeinom po elektroforezi ez no inkubirali v pufru z dodanim inhibitorjem za dolo en tip proteinaz. Za kontrolo pa smo uporabili enak gel, ki smo ga inkubirali v pufru brez dodanega inhibitorja. Naslednji dan smo oba gela pobarvali, jih primerjali ter na podlagi primerjave dolo ili, ali je inhibitor vplival na zmanjšanje aktivnosti proteinaz v gelu ali ne. Vpliv inhibitorja na aktivnost proteinaz smo dolo ili vizualno. Glede na študijo iz leta 1979, ki so jo izvedli Pokorny in sodelavci, kjer so z uporabo razli nih inhibitorjev potrdili, da je v gojiš u bakterije *Streptomyces rimosus* pristonih najve serinskih ter metalo proteinaz, smo pri akovali, da bo tudi v našem primeru prisotnih najve proteinaz tega tipa. Uporabili smo 3 razli ne inhibitorje; EDTA, ki inhibira aktivnost metalo proteinaz, PMSF, ki inhibira aktivnost serinskih proteinaz ter komercialno mešanico inhibitorjev, ki bi naj inhibirala aktivnost vseh vrst proteinaz. Pri uporabi inhibitorja EDTA (Slika 9) nismo opazili ve jih razlik v primerjavi s kontrolnim gelom, iz esar lahko sklepamo, da proteinaze, ki smo jih zaznali, ne spadajo v skupino metalo proteinaz. Pri inkubaciji gela v 2,5 mM PMSF (Slika 10) pa smo zaznali rahlo zmanjšanje intenzitete lis glede na kontrolo brez inhibitorja. Poskusili smo še z inkubacijo v 5 mM PMSF (Slika 11), da bi ugotovili, e ve ja koncentracija inhibitorja bolj inhibira aktivnost proteinaz v gelu. Rezultat je bil zelo podoben kot pri uporabi 2,5 mM PMSF. Zaznali smo le rahlo zmanjšanje intenzitete lis. Morda je v gelu prisotna še kakšna druga vrsta proteinaz, ki jih PMSF ne inhibira, zato smo uporabili še v komercialno mešanico inhibitorjev (Slika 12), ki naj bi inhibirala ve ino znanih proteinaz. Z uporabo komercialne mešanice inhibitorjev smo prišli do podobnih rezultatov kot z uporabo inhibitorja PMSF. Majhna sprememba v intenziteti lise v prisotnosti inhibitorja nakazuje, da je aktivnost proteinaz še vedno prisotna. Možno je, da

so proteinaze aktivne že med samim lo evanjem z elektroforezo in dolo en delež kazeina razgradijo že tam. V tem primeru z inkubacijo gela v raztopini inhibitorja inhibiramo aktivnost proteinaz šele po tem, ko je dolo en delež kazeina že razgrajen. To pojasni rahlo razliko intenzitete lis v primerjavi s kontrolnim gelom, saj proteinaz v kontrolnem gelu ne inhibiramo in te med inkubacijo v pufru razgradijo še dodaten delež kazeina, kar kasneje opazimo v rahli razliki intenzitete rt na obeh gelih. Da bi zagotovo lahko potrdili to domnevo, bi morali inhibitor dodati v vzorec že pred nanosom na gel. Tako bi inhibirali proteoliti no aktivnost že pred lo evanjem na gelu z inhibiranimi vzorci ne bi smeli ve opaziti belih lis. Druga možna razlaga je ta, da sam gel prepre uje inhibitorju popolno vezavo na proteinaze in jih zaradi tega ne inhibira popolnoma. Tudi ta problem bi lahko rešili tako, da bi inhibitor dodali v vzorec že pred nanosom na gel. Tako gel ne bi oviral dostopa inhibitorja do proteinaz in v primeru, da gre za "kompatibilno" proteinazo ter inhibitor, bi prišlo do popolne inhibicije.

Kot že omenjeno, so Pokorny in sodelavci leta 1979 izvedli podobno študijo, kjer so preu evali kompleksno mešanico zunajceli nih proteinaz bakterije *Streptomyces rimosus*. Med drugim so testirali tudi vpliv inhibitorjev na aktivnost proteinaz. Uporabljali so spektrofotometri no metodo za dolo anje aktivnost proteinaz. Temeljila je na inhibiciji proteinaz z dodatkom inhibitorjev (tudi PMSF in EDTA), po inhibiciji pa so dodali substrat hemoglobin ter po 10 min inkubacije izmerili absorbanco pri 280 nm. Rezultati so pokazali mo no inhibicijo proteinaz z uporabo inhibitorjev PMSF in EDTA, kar nakazuje prisotnost serinskih ter metalo proteinaz.

To dodatno nakazuje na prejšnje domneve, da so proteinaze aktivne že med samim lo evanjem z elektroforezo, ali pa da gel prepre uje inhibitorjem popolno inhibicijo proteinaz. Za potrditev teh domnev bi bilo najbolje izvesti še spektrofotometri no metodo za dolo anje aktivnosti proteinaz ter ugotavljanje vpliva inhibitorjev na le te.

5.3 IDENTIFIKACIJA Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Že ve kot 100 let ima masna spektrometrija pomembno vlogo v številnih znanstvenih disciplinah. Trenutno se najve uporablja pri identifikaciji majhnih molekul in pa tudi proteinov v bioloških vzorcih z namenom ugotavljanja njihove funkcije. Zaradi svoje vsestranskosti, natan nosti in visoke ob utljivosti je postala nepogrešljiva metoda v proteomiki (Dass, 2007).

V našem primeru smo iz gela izrezali dva proteina, za katera smo na podlagi cimografije domnevali, da gre za proteinazi in ju poslali na identifikacijo z masno spektrometrijo. Prvi protein (Slika 13, Preglednica 20) je bil identificiran kot hipoteti ni oziroma neokarakteriziran protein iz bakterije *Streptomyces rimosus* dolžine 166 aminokislin z maso 17197 Da. Možno je, da gre za do sedaj še nepreu en protein, katerega funkcija še ni

bila to no dolo ena ali pa podatek v podatkovni bazi ni posodobljen. Glede na to, da je v cimogramu na mestu, kjer se je ta protein nahajal, prišlo do razgradnje kazeina, lahko sklepamo, da gre za neko vrsto proteinaze. Ne moremo z zagotovostjo trditi to no za katero vrsto proteinaze gre. Kot že omenjeno v to ki 4.4, je bilo na gelu brez dodanega kazeina prisotnih zelo veliko elektroforetskih rt, kar je otežilo izrez to no tiste proteinaze, ki je povzročila razgradnjo kazeina na cimogramu. Obstaja možnost, da smo izrezali napa en protein, ki se je nahajal v neposredni bližini proteinaze, ki smo jo želeli izrezati. V primeru, da sta bila proteina res v neposredni bližini eden poleg drugega, bi v najslabšem primeru izrezali oba, ali pa del vsakega izmed njiju. V tem primeru bi rezultati masne spektrometrije pokazali prisotnost dveh različnih proteinov, kar pa se v našem primeru ni zgodilo. Da bi ugotovili to no funkcijo identificiranega proteina bi bilo potrebno narediti še več dodatnih testov. Najprej bi bilo potrebno izolirati vsaj eno količino tega proteina in ponovno preveriti ali ima proteolitične lastnosti. To bi lahko ponovno naredili s cimografijo ali pa z uporabo spektrofotometričnih metod. V primeru, da bi zaznali proteolitično aktivnost, bi potrdili, da gre za neko vrsto proteinaze, ki bi jo bilo nato potrebno bolj podrobno preučiti. V primeru, da pa proteolitične aktivnosti ne bi zaznali, bi to pomenilo, da ne gre za proteinazo, ter da smo najverjetneje iz gela izrezali napa en protein.

V drugi elektroforetski rti (Slika 13, Preglednica 21) sta bila identificirana dva proteina. Spet je zelo verjeten razlog za to veliko število elektroforetskih rt v gelu, ki se nahajajo v neposredni bližini ena poleg druge in zaradi tega velika verjetnost, da smo pri rezanju iz gela poleg zelene proteinaze izrezali še del nekega drugega proteina, ki se je nahajala v bližini. Mogoče sta bila ta dva proteina na gelu celo tako blizu, da je na gelu to izgledalo kot ena rta in se druga ne sploh ni dala izrezati.

Prvi identificiran protein (Slika 13, Preglednica 21) v drugi rti je bil domnevni protein za vezavo kalcija iz bakterije *Streptomyces rimosus* dolžine 285 aminokislin z molekularno maso 29834 Da. Sode po podatkovni bazi UniProt, je funkcija tega proteina vezava kalcijevih ionov. Glede na to, da ni nobene omembe o proteolitični aktivnosti pa po vsej verjetnosti ne gre za proteinazo. Ker je funkcija proteina vezava kalcijevih ionov, prisotnost katerih je eden izmed faktorjev, ki lahko vplivajo na delovanje in stabilnost metalo proteinaz (Manni in sod., 2008), obstaja možnost, da ima ta protein funkcijo pri uravnavanju delovanja metalo proteinaz, ki pa nam trenutno še ni poznana. Tudi analiza ohranjenih domen v programu BLAST kaže ohranjeno multidomeno za peptidaze M10 C, ki so sorodne sesalskim metalo peptidazam iz matriksa, kot tudi ohranjeno multidomeno COG2931, ki je značilna za proteine, ki vežejo kalcij (Slika 15).

Druga možnost zakaj se je ta protein nahajal na mestu v gelu kjer je bil razgrajen kazein pa je ta, da je bil ta protein tam isto slujajno, kazein pa je razgradil drugi protein, ki je bil poleg tega proteina identificiran v isti lisi na gelu.

Drugi identificiran protein (Slika 13, Preglednica 21) v drugi elektroforetski rti je bil homolog peptidaze M4 termolizin iz bakterije *Streptomyces rimosus* dolžine 754 aminokislin z maso 79037 Da. Sode po podatkih iz podatkovne baze UniProt, so funkcije

tega proteina; vezava kalcijevih ionov, metaloendopeptidazna aktivnost, endopeptidazna aktivnost serinskega tipa ter proteoliza. Kot lahko sklepamo že iz samega imena, gre v tem primeru za proteinazo. Zelo verjetno je, da je izmed obeh proteinov identificiranih v drugi rti, ta proteinaza odgovorna za razgradnjo kazeina v gelu. Sode po podatkih iz podatkovne baze UniProt gre za proteinazo, ki ima lastnosti metalo in serinskih proteinaz. Iz teh podatkov smo sklepali, da se v aktivnem mestu te proteinaze nahaja kataliti na triada histidin - serin - asparaginska kislina, ki je značilna za serinske proteinaze, vendar pa je analiza v programu BLAST pokazala, da temu ni tako. V programu BLAST smo identificirali ohranjene domene (Slika 16) in nato označili še pomembne aminokislino v aktivnem mestu, mestu za vezavo kalcija ter mestu za vezavo cinka (Slika 17). Od vseh treh aminokislin, ki tvorijo katalitično triado, je BLAST v aktivnem mestu proteinaze označil le aminokislino histidin. To bi lahko pomenilo, da ima proteinaza res lastnosti serinskih in metalo proteinaz, kot navaja UniProt in so zaradi tega v aktivnem mestu pomembne druge aminokislino.

Študiji iz leta 1979 (Pokorny in sod., 1979) so sledile še tri podobne študije, ki so jih izvedli Renko in sod. (1981, 1989) ter Vitale in sod. (1986). V vsaki izmed teh treh študij so izolirali še dodatno proteinazo iz gojišča bakterije *Streptomyces rimosus*. Renko in sod. (1981) so izolirali in okarakterizirali serinsko alkalno proteinazo. Vitale in sod. (1989) so izolirali in okarakterizirali levcinsko aminopeptidazo. Renko in sod. (1989) so izolirali tripsinu podobno proteinazo. Težko je zagotovostjo reči, ali se katera od proteinaz iz teh študij ujema s katero od proteinaz, ki smo jih mi identificirali v tem eksperimentu, saj bi za to bilo potrebno izvesti več testov. Le v enem izmed primerov sta tako izoelektrična točka kot tudi molekulska masa proteinov dovolj blizu, da bi lahko sklepali, da gre morda za enak protein. Renko in sod. (1989) so določili molekulsko maso tripsinu podobne proteinaze z uporabo SDS PAGE elektroforeze ter gelske filtracije. Z elektroforezo so določili maso 27000 Da, z gelsko filtracijo pa 29000 Da. Izoelektrična točka je bila določena na 4,5. Obstaja možnost, da gre za enak protein, kot je v našem primeru protein za vezavo kalcija, saj je povprečna masa tripsinu podobne proteinaze (28000 Da) precej blizu mase proteina za vezavo kalcija, ki znaša 29834 Da. Tudi pI tripsinu podobne proteinaze, ki znaša 4,5 je zelo blizu pI proteina za vezavo kalcija iz našega poskusa, ki je 4,34. Trenutno znani podatki nakazujejo, da bi morda lahko šlo za enak protein, vendar pa ne moremo ničesar zagotovo potrditi.

V tej magistrski nalogi smo potrdili prisotnost zunajceličnih proteinaz bakterije *Streptomyces rimosus* in uspeli dokazati, da je vsaj ena izmed identificiranih proteinaz serinskega tipa. S tem smo delno potrdili zastavljene delovne hipoteze.

6 SKLEPI

- Bakterija *Streptomyces rimosus* v gojišču izolirala veliko število proteinov.
- S cimoografijo smo za vsaj dva izmed zaznanih zunajcelinskih proteinov v območju molekularnih mas od 25 do 116 kDa potrdili proteinazno aktivnost.
- Največja inhibicija aktivnosti proteinaz na gelu je bila opažena pri uporabi inhibitorja PMSF.
- Ena izmed zaznanih proteinaz je bila identificirana kot proteinaza serinskega tipa.
- Proteinaze, ki so prisotne v gojišču bakterije *Streptomyces rimosus*, so aktivne pri temperaturi 37 °C in pH 7,5 ter razgrajujejo kazein.

7 POVZETEK

Proteinaze in peptidaze predstavljajo eno največjih funkcionalnih skupin encimov. Pomembne so za vse žive organizme, saj imajo sposobnost hidrolize peptidne vezi. Sodelujejo v mnogih fizioloških funkcijah, od splošne razgradnje proteinov, pa do bolj specifičnih in reguliranih procesov, kot so; koagulacija krvi, aktivacija hormonov in transport sekretornih proteinov čez membrane. Poznamo eksopeptidaze ter endopeptidaze, slednje pa razdelimo še na serinske, cisteinske, aspartatne in metalo proteinaze. Bakterija *Streptomyces rimosus* v svojem gojišču izloča veliko število različnih proteinov, med katerimi so prisotne tudi proteinaze. Ker je ta bakterija dober produkcijski organizem za produkcijo različnih sekundarnih metabolitov, med katerimi so tudi produkti proteinskega izvora, prisotnost proteinaz v mediju negativno vpliva na končni donos proizvodnje. Namen te magistrske naloge je bila identifikacija proteinaz, ki jih bakterija *Streptomyces rimosus* izloča v gojišču, s ciljem, da bi v nadaljnjih študijah inaktivirali gene, ki te proteinaze kodirajo. Na ta način bi pridobili dober produkcijski organizem, za proizvodnjo proteinskih produktov.

Suspencijo spor bakterije *S. rimosus* smo inokulirali v vegetativno GOTC gojišču. Brozgo smo nato prenesli v erlenmajerice z GOTC gojiščem, kjer smo jo gojili še sedem dni. Z vzorcnjem smo za elucirni dan kultivacije. Brozgo, ki smo jo vzorčili, smo dvakrat centrifugirali, iz supernatanta pa nato prenesli v nove mikrocentrifugirke. Po vzorcnju je sledila izvedba SDS PAGE elektroforeze in kazeinske cimoigrafije. Oba gela smo primerjali in iz SDS PAGE gela izrezali elektroforetske trake, ki so na cimoogramu kazale proteolitno aktivnost. Izrezane vzorce smo poslali na analizo z masno spektrometrijo.

Rezultati SDS PAGE in cimoigrafije v tem magistrskem delu nakazujejo, da sta poleg kopice ostalih proteinov v supernatanu brozge bakterije *S. rimosus* prisotni še vsaj dve proteinazi, ki sta aktivni pri 37 °C ter pH 7,5 in razgrajujeta kazein. Največjo inhibicijo aktivnosti smo zaznali ob uporabi inhibitorja PMSF, kar nakazuje na prisotnost serinskih proteinaz. Rezultati masne spektrometrije so potrdili, da je vsaj ena izmed zaznanih proteinaz serinskega tipa.

8 VIRI

- Anderson A. S., Wellington M. H. E. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 797-814
- Angert E. R. 2005. Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 3: 214-224
- Blaži M., adež N., Jamnik P., Paš M., Petkovi H. 2014. Biotehnologija mikroorganizmov : delovno gradivo za vaje. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije: 44 str.
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2752/Biotehnologija_mikroorganizmov.pdf (7. okt. 2014)
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254
- Cupp-Enyard C. 2008. Sigma's non-specific protease activity assay - casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*, 19: e899, doi:10.3791/899: video article
- Dass C. 2007. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.: 585 str.
- Grzonka Z., Jankowska E., Kasprzykowski F., Kasprzykowska R., Ankiewicz L., Wiczek W., Wiczerzak E., Ciarkowski J., Drabik P., Janowski R., Kozak M., Jaskólski M., Grubb A. 2001. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 1: 1-20
- Hedstrom L. 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102: 4501-4523
- Jones J. L., Upson, H. R., Haugland P.R., Panchuk-Voloshina N., Zhou M., Haugland P. R. 1997. Quenched BODIPY dye-labeled casein substrates for the assay of protease activity by direct fluorescence measurement. *Analytical Biochemistry*, 251: 144-152
- Kaberdin R. V., McDowall J. K. 2003. Expanding the use of zymography by the chemical linkage of small, defined substrates to the gel matrix. *Genome Research*, 13: 1961-1965
- Kadek A., Tretyachenko V., Mrazek H., Ivanova L., Halada P., Rey M., Schriemer D. C., Man P. 2013. Expression and characterization of plant aspartic protease nepenthesin-1 from *Nepenthes gracilis*. *Protein Expression and Purification*, 95: 121-128

- Lopes A., Coelho RR R., Meirelles M. N., Branquinha M. H., Vermelho A.B. 1999. Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger*: Partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 6: 763-770
- Magdevska V. 2011. *Streptomyces rimosus* as a potential host for heterologous protein expression. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška Fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti: 150 str.
- Manni L., Jellouli K., Agrebi R., Bayoudh A., Nasri M. 2008. Biochemical and molecular characterization of a novel calcium-dependent metalloprotease from *Bacillus cereus* SV1. *Process Biochemistry*, 43: 522-530
- Michaud D. 1998. Gel electrophoresis of proteolytic enzymes. *Analytica Chimica Acta*, 372: 173-185
- NCBI. 2014. BLAST - basic local alignment search tool. Bethesda MD, National Center for Biotechnology Information: baza podatkov
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (7.okt. 2014)
- Petkovi H., Cullum J., Haranueli D., Hunter S. I., Perić-Concha N., Pigac J., Thamchaipenet A., Vujaklija D., Long F. P. 2006. Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 3: 704-728
- Pokorny M., Vitale L., Turk V., Renko M., Žuvani J. 1979. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 8: 81-90
- Renko M., Pokorny M., Vitale L., Turk V. 1981. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases 2. Isolation and characterization of serine alkaline proteinase. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 11: 166-171
- Renko M., Vitale L., Kokalj M., Pokorny. 1989. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases 4. Trypsin-like proteinase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31: 38-44
- Resa F. P., Mira E., Quesada R. A. 1994. Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. *Analytical Biochemistry*, 224: 434-435
- Supuran C. T., Scozzafava A., Clare B. W. 2002. Bacterial protease inhibitors. *Medical Research Reviews*, 22, 4: 329-372

- Štaudohar Kozjan M. 2003. Utišanje genov za proteaze pri bakteriji *Streptomyces rimosus*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo: 192 str.
- Taguchi S., Odaka A., Watanabe Y., Momose H. 1995. Molecular characterization of a gene encoding extracellular serine protease isolated from a subtilisin inhibitor-deficient mutant of *Streptomyces albogriseolus* S-3253. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1: 180-186
- UniProt. 2014. Taxonomy of *Streptomyces rimosus*. Cambridge, UniProt Consortium, EMBL, SIB, PIR: baza podatkov
<http://www.uniprot.org/taxonomy/1883> (7. okt. 2014)
- Vitale L., Renko M., Lenar i B., Turk V., Pokorny M. 1986. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases 3. Isolation and characterization of leucine aminopeptidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23: 449-455
- Wandersman C. 1989. Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Molecular Microbiology*, 3, 12: 1825-1831
- Wolf A. G., Wirth J. S. 1996. Soluble, dye-labelled substrates for a micro-plate assay of proteinase activity. *Journal of Microbiological Methods*, 25: 337-342

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Hrvoju Petkovi u za strokovno pomo in nasvete ter za pregled magistrskega dela.

Iskreno se zahvaljujem somentorici prof. dr. Poloni Jamnik za odlično usmerjanje, čas in pomo pri praktični izvedbi eksperimentov v okviru magistrskega dela.

Zahvaljujem se recenzentki, prof. dr. Nataši Poklar Ulrih za strokoven pregled magistrskega dela.

Zahvaljujem se Lini Burkan Makivi za pregled moje magistrske naloge.

Hvala tudi vsem sodelavcem na Katedri za mikrobiologijo, biotehnologijo in varnost živil ter sodelavcem iz podjetja Acies bio d.o.o.

Posebna zahvala pa gre mojim staršem in ostali družini za podporo in vzpodbudne besede tekom študija in ob zagovoru.