

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Peter VIDIC

**PROTEOMSKA ANALIZA ERITROMICINSKE
REZISTENCE PRI BAKTERIJI *Saccharopolyspora
erythraea***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Peter VIDIC

**PROTEOMSKA ANALIZA ERITROMICINSKE REZISTENCE PRI
BAKTERIJI *Saccharopolyspora erythraea***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

**PROTEOMIC ANALYSIS OF ERYTHROMYCIN RESISTANCE IN
BACTERIA *Saccharopolyspora erythraea***

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Biotechnology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti v sodelovanju s podjetjem Acies Bio d.o.o.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Polono Jamnik, za somentorja prof. dr. Hrvoja Petkovića in za recenzenta prof. ddr. Borisa Turka.

Mentorica: prof. dr. Polona Jamnik

Somentor: prof. dr. Hrvoje Petković

Recenzent: prof. ddr. Boris Turk

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

Član: prof. ddr. Boris TURK
Inštitut Jožef Stefan, Odsek za biokemijo, molekularno in strukturno biokemijo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Peter Vidic

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 602.3:579.87:615.332:577.112(043)=163.6
- KG aktinomicete/*Saccharopolyspora erythraea*/sekundarni metaboliti/makrolidni antibiotiki/eritromycin/rezistence/proteomika/glutamin sintetaza
- AV VIDIC, Peter, dipl. bioteh. (UN)
- SA JAMNIK, Polona (mentorica)/PETKOVIĆ, Hrvoje (somentor)/TURK, Boris (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
- LI 2015
- IN PROTEOMSKA ANALIZA ERITROMICINSKE REZISTENCE PRI BAKTERIJI *Saccharopolyspora erythraea*
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija)
- OP XII, 53 str., 16 pregl., 15 sl., 1 pril., 46 vir.
- IJ sl
- JL sl/en
- AI Makrolidni antibiotik eritromycin proizvaja bakterija *Saccharopolyspora erythraea*. Industrijski sevi bakterije *S. erythraea* proizvajajo visoke koncentracije eritromicina, produksijski sev pa odpornost na eritromycin vzdržuje z metilacijo ribosoma in tako preprečei vezavo eritromicina na njegovo tarčno mesto, vendar pri visoki koncentraciji vseeno pride do delne inhibicije rasti. V želji, da identificiramo potencialne druge mehanizme rezistence produkcijskega seva, smo z uporabo proteomskeih orodij preučili odziv kulture bakterije *S. erythraea* na povečane koncentracije eritromicina. Kulturo *S. erythraea* smo izpostavili dodanemu eritromycinu v koncentracijah 1 in 2 g/L. Vzorčili smo eno in dve uri po dodatku eritromicina. Za vsak vzorec smo izdelali proteinski profil z 2-D elektroforezo. Proteinske profile smo analizirali z računalniškim programom 2-D Dymension. Primerjali smo proteinske profile tretiranih vzorcev za vsak čas vzorčenja s proteinskim profilom kulture *S. erythraea* v katero nismo dodali eritromicina. S tem pristopom smo uspeli določiti en diferencialno izražen protein, ki je na gelu obstajal v dveh elektroforetskih lisah. Protein je bil prisoten na mestih lis 1 in 2 že pri kontroli, nato pa se je z zvišanjem koncentracije eritromicina njegova raven v lisi 2 začela, glede na kontrolo, zniževati. Pri lisi 1 nismo opazili signifikantnih sprememb v ravni glede na povečevanje koncentracije eritromicina. Rezultati identifikacije z masno spektrometrijo so pokazali, da se v obeh lisah nahaja protein glutamin sintetaza. Iz različnih podatkovnih baz smo nato pridobili informacije o lastnostih in funkciji identificiranega proteina in na podlagi tega skušali pojasniti njegovo vlogo v bakterijskem stresnem odgovoru na eritromicin.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 602.3:579.87:615.332:577.112(043)=163.6
CX actinomycetes/*Saccharopolyspora erythraea*/secondary metabolites/macrolide antibiotics/erythromycin/resistance/proteomics/glutamine synthetase
AU VIDIC, Peter
AA JAMNIK, Polona (supervisor)/PETKOVIĆ, Hrvoje (co-advisor)/TURK, Boris (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2015
TY PROTEOMIC ANALYSIS OF ERYTHROMYCIN RESISTANCE IN BACTERIA *Saccharopolyspora erythraea*
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Biotechnology)
NO XII, 53 p., 16 tab., 15 fig., 1 ann., 46 ref.
LA sl
AI sl/en
AB Macrolide antibiotic erythromycin is produced by *Saccharopolyspora erythraea*. During industrial production of erythromycin, a high yield of erythromycin is neutralized by protection of ribosome by methylation, thus preventing binding of erythromycin and allowing growth of the culture. However, at high erythromycin concentrations, growth inhibition is still observed. We applied proteomics approach to examine the response of the culture of *S. erythraea* on exogenously added erythromycin. The culture of *S. erythraea* was exposed to exogenously added erythromycin in concentrations of 1 and 2 g/l. The culture was sampled one and two hours after the addition of erythromycin. We have evaluated a protein profile of *S. erythraea* culture by applying the 2-D electrophoresis. Protein profiles were analysed by the 2-D Dymension proteomics software. The protein profiles of the cultures of *S. erythraea* exposed to erythromycin and unexposed control were compared using this approach. We identified two interesting spots, which appeared in all cultures, but showed significant difference. The target protein was already present at positions of the spots 1 and 2 in control sample, and later on, by increasing the concentration of erythromycin, the level in the spot 2 started decreasing, comparing to the control sample. We have not noticed significant changes in the level of protein related to spot 1, depending on the concentration of erythromycin. The results of identification by mass spectrometry demonstrated that both spots contain protein glutamine synthetase. By applying bioinformatic approach and searching different databases, we attempted to corroborate our findings in the light of the stress response causing to the producing strain in response of high concentration of exogenously added antibiotic. Using different databases, we obtained information on the properties and function of the identified protein and on that basis tried to explain its role in bacterial stress response to erythromycin.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI NALOGE	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 AKTINOMICETE	3
2.1.1 Morfologija in življenjski cikel aktinomicet.....	3
2.1.2 Taksonomska opredelitev rodu <i>Saccharopolyspora</i>	4
2.1.3 <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	4
2.1.3.1 Genom bakterije <i>S. erythraea</i>	5
2.2 MAKROLIDNI ANTIBIOTIK ERITROMICIN	6
2.2.1 Poliketidi.....	6
2.2.2 Biosinteza eritromicina	7
2.3 ODPORNOST NA ANTIBIOTIKE	9
2.3.1 Mehanizmi odpornosti na antibiotike.....	9
2.3.2 Odpornost na eritromicin	10
2.3.3 Odpornost bakterije <i>S. erythraea</i> na antibiotike.....	11
2.4 PROTEOMIKA	12
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 DELOVNI POSTOPKI	15
3.2 MATERIALI	16
3.2.1 Eritromicin	16
3.2.2 Mikroorganizem	16

3.2.3 Gojiča	16
3.2.4 Raztopine in reagenti	17
3.2.4.1 Vzorčenje kultur bakterije <i>S. erythraea</i>	17
3.2.4.2 Izolacija celokupnih proteinov iz kultur bakterije <i>S. erythraea</i>	17
3.2.4.3 Merjenje koncentracije proteinov	17
3.2.4.4 Čiščenje proteinov	18
3.2.4.5 2-D elektroforeza (I. dimenzija)	18
3.2.4.6 2-D elektroforeza (II. dimenzija).....	18
3.2.4.7 Barvanje gelov za detekcijo proteinskih lis	20
3.2.5 Aparature in naprave.....	21
3.3 METODE	23
3.3.1 Kultivacija celic bakterije <i>Saccharopolyspora erythraea</i> v prisotnosti visoke koncentracije eritromicina.....	23
3.3.2 Vzorčenje in priprava vzorcev za proteomsko analizo	23
3.3.3 Ekstrakcija celokupnih proteinov kulture <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	23
3.3.4 Merjenje koncentracije proteinov v ekstraktih vzorcev	24
3.3.5 Čiščenje proteinskih ekstraktov	24
3.3.6 Dvo-dimenzionalna gelska elektroforeza (2-DE)	26
3.3.6.1 I. dimenzija	26
3.3.6.2 II. dimenzija.....	27
3.3.7 Barvanje gelov	29
3.3.8 Slikanje gelov	30
3.3.9 Analiza slik gelov	30
3.3.10 Izrez proteinskih lis	31
3.3.11 Identifikacija	31
3.3.12 Podatkovne baze	31
4 REZULTATI.....	32
4.1 PRIMERJAVA PROTEINSKIH PROFILOV CELIC BAKTERIJE <i>S. erythraea</i> BREZ IN PO 1-URNI IZPOSTAVITVI ERITROMICINU	32
4.2 IDENTIFIKACIJA PROTEINOV	36
4.3 BIOINFORMACIJSKA OBDELAVA PODATKOV	38
4.3.1 Glutamin sintetaza.....	38

4.3.1.1 Osnovni podatki o identificiranem proteinu	38
4.3.1.2 Funkcija proteina	38
4.3.1.3 Regulacija delovanja.....	39
4.3.1.4 Razporeditev genov operona	40
4.3.1.5 Interakcije encima glutamin sintetaza	42
5 RAZPRAVA.....	43
6 SKLEPI	48
7 POVZETEK.....	49
8 VIRI	50
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Življenjski cikel aktinomicet (Angert, 2005: 222)	4
Slika 2: Strukturna formula molekule eritromicina A (Nett in sod. 2009: 10).....	6
Slika 3: Shematski prikaz biosinteze eritromicina (Minas, 2005: 72).....	8
Slika 4: Prikaz poteka osnovne proteomske analize (Pacheco in sod., 2012: 190).....	12
Slika 5: Shematski prikaz poteka dela.....	15
Slika 6: Primer obdelave elektroforetske lise (obkrožena z rdečo barvo) s programom 2-D Dymension.....	31
Slika 7: Proteinski profil celičnega ekstrakta bakterije <i>Saccharopolyspora erythraea</i> (A – kontrola)	33
Slika 8: Proteinski profil celičnega ekstrakta bakterije <i>Saccharopolyspora erythraea</i> po enournem tretiranju z eritromicinom (B – koncentracija eritromicina v brozgi: 1g/L).....	34
Slika 9: Proteinski profil celičnega ekstrakta bakterije <i>Saccharopolyspora erythraea</i> po enournem tretiranju z eritromicinom (C – koncentracija eritromicina v brozgi: 2g/L).....	35
Slika 10: Podrobnejši prikaz lokacije identificiranih lis (izrez slik 7, 8, 9)	35
Slika 11: Tro-dimenzionalni prikaz proteina glutamin sintetaza (prikaz z vrha - levo; prikaz od strani - desno; puščica prikazuje eno od aktivnih mest) (Goodsell, 2002).....	38
Slika 12: Pregled dela metabolnih poti in povezave encima glutamin sintetaza (rumen okvir) v metabolizmu (Peano in sod. 2012:16)	39
Slika 13: Shematični prikaz regulacije encima glutamin sintetaza (Itzen in sod., 2011: 223).	40
Slika 14: Prikaz lokacije gena (SACE_1623) za glutamin sintetazo (NCBI, 2013)	40
Slika 15: Shematski prikaz interakcij z glutamin sintetazo	42

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Lastnosti genoma bakterije <i>S. erythraea</i> (Oliynyk in sod. 2007).....	5
Preglednica 2: Sestava ABVM1 vegetativnega gojišča	16
Preglednica 3: Sestava ABPM8 produkcijskega gojišča.....	16
Preglednica 4: Sestava pufra za izolacijo celokupnih proteinov	17
Preglednica 5: Sestava rehidracijskega pufra (RP).....	18
Preglednica 6: Sestava ločilnega gela z debelino 1 mm in 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida	19
Preglednica 7: Sestava osnovnega pufra za uravnoteženje IPG trakov	19
Preglednica 8: Sestava agarozne raztopine.....	20
Preglednica 9: Sestava 1x SDS elektroforeznega pufra	20
Preglednica 10: Sestava fiksacijske raztopine	20
Preglednica 11: Sestava raztopine za razbarvanje	20
Preglednica 12: Protokol barvanja gelov z barvilm SYPRO Ruby	29
Preglednica 13: Rezultati analize proteinskih profilov s programom 2-D Dymension.....	36
Preglednica 14: Rezultati identifikacije 2-D lise št. 1	36
Preglednica 15: Rezultati identifikacije 2-D lise št. 2	37
Preglednica 16: Seznam proteinov pridobljenih iz orodnja STRING	42

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov (metoda po Bradfordu)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2-DE-	dvo-dimenzionalna gelska elektroforeza
ABPM8-	produkcijsko gojišče
ABVM1-	vegetativno gojišče
ACP-	acil nosilni protein
ADP-	adenozin difosfat (<i>angl. adenosine diphosphate</i>)
AMP-	adenozin monofosfat (<i>angl. adenosine monophosphate</i>)
APS-	amonijev persulfat (<i>angl. ammonium persulphate</i>)
AT-	acil transferazna domena
ATP -	adenozin trifosfat (<i>angl. adenosine triphosphate</i>)
BFM-	bromofenol modro barvilo (<i>angl. bromophenol blue</i>)
bp-	bazni par
CHAPS-	3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonat
DEBS-	6-deoksieritromicin-D sintaza
DH-	dehidrogenazna domena
DIGE-	2-D diferencialna gelska elektroforeza
DTT-	ditiotreitol (<i>angl. dithiothreitol</i>)
ER-	enoil reduktazna domena
ery-	gen za eritromicin
ESI-TOF-	elektrosprej – analizator na čas preleta ionov
HPLC-	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>angl. High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICAT-	<i>angl. isotope-coded affinity tags</i>
IEF-	izoelektrično fokusiranje
IPG-	imobiliziran pH gradient (<i>angl. Immobilized pH gradient</i>)
iTRAQ-	<i>angl. isobaric tag for relative and absolute quantitation</i>
JAA-	jod acetamid
KR-	ketoreduktazna domena
KS-	ketosintazna domena
MALDI-TOF-	ionizacija v nosilcu z lasersko desorpcijo – analizator na čas preleta ionov
MS-	masna spektrometrija (<i>angl. Mass Spectrometry</i>)
MW-	molekulska masa (<i>angl. molecular weight</i>)
PAGE-	poliakrilamidna gelska elektroforeza (<i>angl. polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
pI-	izoelektrična točka
PK-	poliketid
PKS-	poliketid sintaza
PMV-	parcialni micelijski volumen
RP-	rehidracijski pufer
SDS-	natrijev dodecilsulfat (<i>angl. sodium dodecylsulphate</i>)
SDS-PAGE-	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata
SILAC-	<i>angl. stable isotope labelling by amino acids in cell culture</i>

TE-	tioesterazna domena
TEMED-	N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin
UMP-	uracil monofosfat
UTP-	uracil trifosfat

1 UVOD

Saccharopolyspora erythraea, včasih poznana tudi kot *Streptomyces erythraeus*, je grampozitivna bakterija, ki jo uvrščamo med aktinomicete. *S. erythraea* se uporablja v industrijski proizvodnji makrolidnega antibiotika eritromicina, katerega derivati igrajo ključno vlogo v medicini (Oliynyk in sod., 2007).

Z namenom poglobljenega razumevanja bakterijske odpornosti na antibiotik pri visokih koncentracijah, ki se pojavijo predvsem v industrijskih procesih, se lahko poslužimo proteomskeih orodij. V večini bakterij, ki so bile izpostavljene antibiotiku, odziv vključuje spremembe v regulaciji energijskega metabolizma in metabolizma dušika, vpliv je razviden tudi v sintezi proteinov in nukleotidov, inducirajo se stresni proteini (Lima in sod., 2013). Genom bakterije *S. erythraea* nam razkrije množico zapisov za encime, ki naj bi sodelovali pri rezistenci bakterije na najpogosteje skupine antibiotikov. Gre za zapis za 17 β-laktamaz in dve makrolidni esterazi. Ena izmed esteraz leži znotraj genske gruče, ki nosi zapis za biosintezo eritromicina, druga makrolidna esteraza pa je po sekvenci zelo podobna esterazam iz bakterij odpornih na eritromicin (Oliynyk in sod., 2007).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Dobra fiziološka učinkovitost industrijskih mikrobov je ključna za uspešnost bioprocесов. Strategije metabolnega inženiringa, ki se osredotočajo predvsem na spremembe v metabolizmu, ne dajejo vedno ustreznih rezultatov oziroma fenotipov zaradi ozke usmerjenosti na metabolne zmoglјivosti organizma, medtem pa pogosto zanemarjajo mikrobne fiziološke odzive na stres iz okolja. Nedavni razvoj v tehnologijah »-omik« je z analizami dogodkov v celici v industrijskem okolju doprinesel k izboljšanju strategij metabolnega inženiringa iz lokalnih metabolnih poti na globalne metabolne mreže. Napredek v metabolnem inženiringu, v kombinaciji z rezultati analiz z različnimi »-omskimi« pristopi, je ogromno prispeval k izboljšanju celičnih metabolnih aktivnosti za dosego bolj učinkovite biotehnološke proizvodnje ciljnih produktov. Metabolno orientirani inženirski pristopi pogosto povzročijo tudi celični stres, ki nastane zaradi akumulacije toksičnih intermediatov ali končnih produktov, kar se odraži v znižani celični kondiciji. Prav tako nastane problem tudi pri eno- ali več-genski modifikaciji tarčne metabolne poti, kar se pogosto odraža v spremembi znotrajceličnega okolja (npr. notranje redoks stanje celice), kar vodi v *in situ* spremembe encimskih aktivnosti in iz tega v nepričakovani in neželeni fenotip. Rešitev teh problemov zahteva celovito razumevanje kompleksnih metabolnih in regulatornih mrež mikrobov (Zhang in sod., 2009).

Metabolna aktivnost mikroorganizmov se odraža v njihovih fizioloških odzivih na habitat ali specifično okolje. Fiziološko delovanje mikroorganizma, ki določa uporabnost industrijskega seva, je odvisno od sprememb in vključevanja znotrajceličnih komponent in

je pod vplivom zunajceličnega okolja oziroma pogojev bioprosesa. V primerjavi z njihovo metabolno zmogljivostjo, na industrijsko zmogljivost vplivajo tudi ostale fiziološke lastnosti (večinoma kondicija in robustnost), kar je za uspešen razvoj industrijsko pomembnega seva potrebno upoštevati. Da lahko uspešno ustvarimo novo ali izboljšamo staro funkcijo mikroorganizma je zelo pomembno razumevanje kako celice zaznajo in se posledično prilagodijo spremembam v okolju, ter seveda kaj vpliva na te spremembe (Zhang in sod., 2009).

Glede na to, da *S. erythraea* proizvaja eritromicin v visokih koncentracijah, lahko sklepamo, da ima industrijski sev tudi učinkovite mehanizme rezistence na ta antibiotik. Z identifikacijo proteinov, ki so vključeni v odziv in omogočajo povečano rezistenco, bi lahko nato z manipulacijo teh proteinov potencialno še dodatno povečali odpornost in posledično lahko izboljšali produkcijo eritromicina v bakteriji *S. erythraea*.

1.2 CILJI NALOGE

- preučiti odziv bakterije *S. erythraea* na povečane koncentracije eritromicina s proteomskimi orodji
- pridobiti informacije o proteinih, ki so potencialno ključni v rezistenci bakterije na eritromicin

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Hipoteza 1: Pričakujemo, da bodo proteini, ki so ključni v rezistenci bakterije *Saccharopolyspora erythraea* na eritromicin, pokazali povečano sintezo in/ali spremenili lokacijo na gelu kot posledico post-translacijske modifikacije.

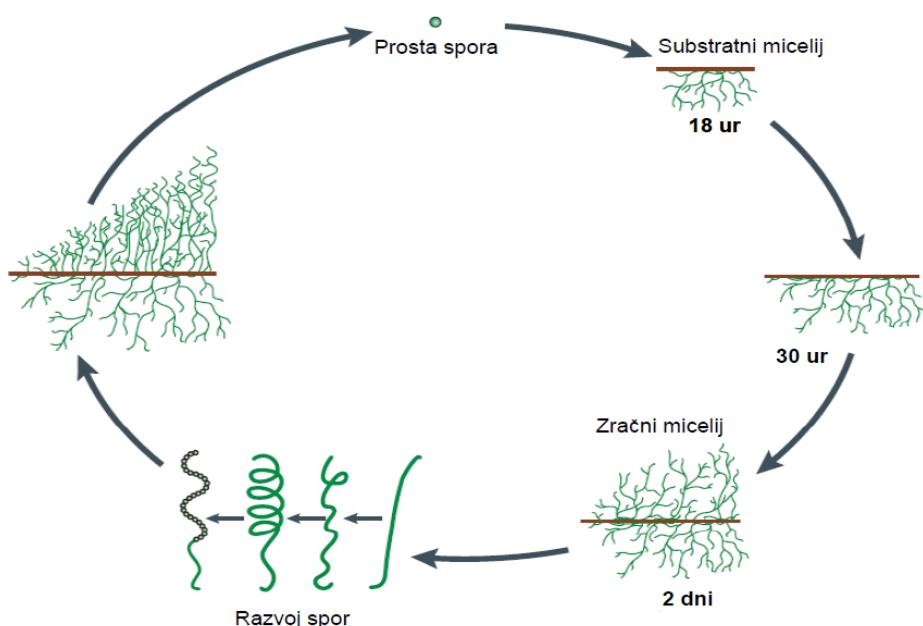
2 PREGLED OBJAV

2.1 AKTINOMICETE

Aktinomicete in zlasti bakterije rodu *Streptomyces*, so bogat vir biološko aktivnih sekundarnih metabolitov. Do sedaj je bilo iz aktinomicet izoliranih preko 9000 različnih biološko aktivnih molekul, kar predstavlja dve tretjini znanih biološko aktivnih učinkovin iz narave, ki jih proizvajajo mikroorganizmi in 60 % vseh sekundarnih metabolitov z biološko funkcijo, ki ni antibiotična. V obeh primerih skoraj 80 % vseh metabolitov proizvedejo bakterije rodu *Streptomyces* (Minas, 2005). Aktinomicete so velika skupina filogenetsko povezanih, nitastih aerobnih, gram-pozitivnih bakterij, ki povečini živijo v tleh in sodelujejo pri razgradnji organskih snovi (Zhi in sod., 2009).

2.1.1 Morfologija in življenjski cikel aktinomicet

Ena izmed glavnih morfoloških značilnosti aktinomicet je rast v obliki razvejane mreže 0,5-1,0 μm širokih filamentov, ki tvorijo micelij, le da je ta manjših dimenzijs kot micelij, ki ga tvorijo glice (Zhi in sod., 2009). Življenjski cikel aktinomicet je sestavljen iz izmenjujočih se faz rasti s tvorbo substratnega in zračnega micelija ter nastanka spor. Vegetativna rast se prične s procesom germinacije, kjer se iz posamezne spore razvijejo nove substratne hife in tvorijo substratni micelij. Tako je vegetativna faza sestavljena iz kompleksne, gosto tkane matrike, kar se odraža v kompaktnem, zvitem miceliju in kasnejši koloniji. S pomočjo te strukture celice črpajo potrebna hrana iz okolja. Ko v okolju začne primanjkovati hrani, se začnejo razvijati zračne hife in tvori se zračni micelij. S staranjem kolonij nastopi diferenciacija zračnih hif (segregacija protoplazme, tvorba prečne stene in delitev celic). Ta pojav se imenuje sporulacija in končni produkt so enojedne spore, ki služijo za razmnoževanje. Spore aktinomicet se precej razlikujejo od endospor rodov bakterij *Bacillus* in *Clostridium*. Ob ugodnih življenjskih pogojih se iz posamezne spore prične nov cikel (Angert, 2005; Madigan in sod., 2012).



Slika 1: Življenjski cikel aktinomicet (Angert, 2005: 222)

2.1.2 Taksonomska opredelitev rodu *Saccharopolyspora*

domena: BACTERIA
deblo: Firmicutes
razred: Actinobacteria
podrazred: Actinobacteridae
red: Actinomycetales
podred: Pseudonocardineae
družina: Pseudonocardiaceae
rod: *Saccharopolyspora*
(Stackelbrandt in Schuman, 2006)

2.1.3 *Saccharopolyspora erythraea*

Saccharopolyspora erythraea je pomembna filamentozna aktinomiceta, ki tvori dolge multicelularne hife s premerom 0,4-0,8 µm. Optimalni rastni pogoji za bakterijo *S. erythraea* so pri temperaturah 28-38 °C in pH vrednostih med 6 in 8 (Yavari in Rafieenia, 2011). Bakterija *S. erythraea* se uporablja v industrijskih bioprocесih za proizvodnjo eritromicina, ki je medicinsko eden najpomembnejših poliketidnih antibiotikov. Za zdravljenje respiratornih infekcij, ki jih povzročajo Gram-pozitivne patogene bakterije, pa so pomembni tudi polsintezi derivati eritromicina, kot sta klaritromicin in azitromicin. *S. erythraea* ni pomembna samo v industriji, uporablja se jo tudi kot modelni aktinomicetni sistem za študije biosinteze sekundarnih metabolitov poliketidnega izvora, predvsem za študije makrolidnih antibiotikov, ki jih sintetizira poliketidna sintaza modularnega tipa I (Kirm in sod., 2013).

Verige spor, ki jih tvori bakterija *S. erythraea*, so v obliki nepopolnih spiral. Površina spor je bodičasta. Glede na gojišče se spreminja tudi barva substratnega micelija; od bledo oranžno rumene do rdeče rjave, pojavijo se tudi od bledo roza do sivorjave barve hif. Opazi se tudi bel zračni micelij, ne proizvaja pa melaninskih pigmentov. Bakterija hidrolizira ali razgradjuje adenin, kazein, eskulin, želatino, hipoksantin, škrob, tirozin, ureo, in ksantin. Je tudi nitrat reducirajoča, encima fosfataze pa ne proizvaja. Rast bakterije se pojavi še pri 5 % koncentraciji NaCl. Asimilira lahko acetat, citrat, laktat, malat, propionat, piruvat in sukcinat. Kisline bakterija *S. erythraea* proizvaja iz adonitola, arabinoze, celobioze, dekstrina, ertrola, fruktoze, galaktoze, glukoze, glicerola, inozitola, maltoze, manitola, melecitoze, melibioze, rafinoze, ramnoze, salicina, sukroze in ksiloze. Vsebnost gvanina in citozina v molekuli DNA je 71,1 % (Labeda, 1987).

2.1.3.1 Genom bakterije *S. erythraea*

Oliynyk in sod. (2007) so leta 2007 predstavili končne rezultate sekvenciranja genoma bakterije *S. erythraea*, kar predstavlja velik preboj v poznavanju biologije te bakterije. Sekvenciran genom te zemeljske bakterije je sestavljen iz 8.212.805 baznih parov (bp). Glede na napovedi naj bi genom nosil zapis za 7.264 genov. Genom je krožne topologije tako, kot pri patogenih aktinomicetah *Mycobacterium tuberculosis* in *Corynebacterium diphtheriae* in ni linearen, kot kromosom modelnega organizma *Streptomyces coelicolor* A3. Genom bakterije *S. erythraea* vsebuje vsaj 25 genskih gruč za proizvodnjo znanih ali predvidevanih sekundarnih metabolitov, vsaj 72 genov za odpornost na spekter najbolj razširjenih skupin antibiotikov in več setov podvojenih genov za podporo saprofitskemu življenskemu slogu (Oliynyk in sod., 2007).

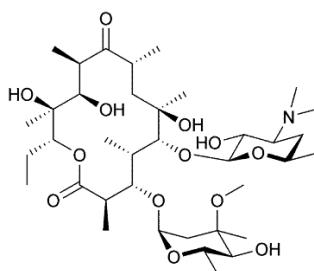
Preglednica 1: Lastnosti genoma bakterije *S. erythraea* (Oliynyk in sod., 2007)

Komponenta genoma	Lastnost
Topologija	Krožna
Dolžina	8.212.805 bp
Vsebnost G+C	71,1 %
Gostota kodiranja	84,9 %
Kodirajoče sekvence	7.264
rRNA	16 genov v štirih setih
tRNA	50
protein kodirajoče sekvence (CDS)	7.198
ohranjene z določeno funkcijo	4.777 (66,4 %)
ohranjene z neznano funkcijo	829 (11,5 %)
neohranjene	1.592 (22,1 %)
Povprečna dolžina CDS	967,9 bp

2.2 MAKROLIDNI ANTIBIOTIK ERITROMICIN

Poliketid eritromicin je makrolidni antibiotik s širokim spektrom delovanja. Eritromicin in njegove polsinteze derive (klaritromicin, azitromicin, itd.) najpogosteje uporabljam pri zdravljenju infekcij zgornjih dihalnih poti (Miyatake in sod., 1991).

Molekula eritromicina (molekulska formula $C_{37}H_{67}O_{13}$) je sestavljena iz 14-členskega makrolidnega obroča, na katerega sta pripeta dva deoksisladkorja, D-desozamin in L-kladinoza (Slika 2). D-desozamin je vezan na peti ogljikov atom, L-kladinoza pa na tretji ogljikov atom laktolskega obroča (Wiley in sod., 1957).



Slika 2: Strukturna formula molekule eritromicina A (Nett in sod., 2009: 10)

2.2.1 Poliketidi

Poliketidi spadajo med sekundarne metabolite in tvorijo ogromno skupino strukturno in kemijsko različnih molekul, ki kažejo različne biološke aktivnosti. Mednje spadajo učinkovine s protitumorskimi (mitramicin, daunorubicin, dokosrubicin), antibakterijskimi (eritromicin in njegovi derivati, tetraciklini), protiparazitskimi (avermektini) ali imunosupresivnimi (rapamicin) lastnostmi. Večino znanih poliketidov proizvedejo aktinomicete (Minas, 2005).

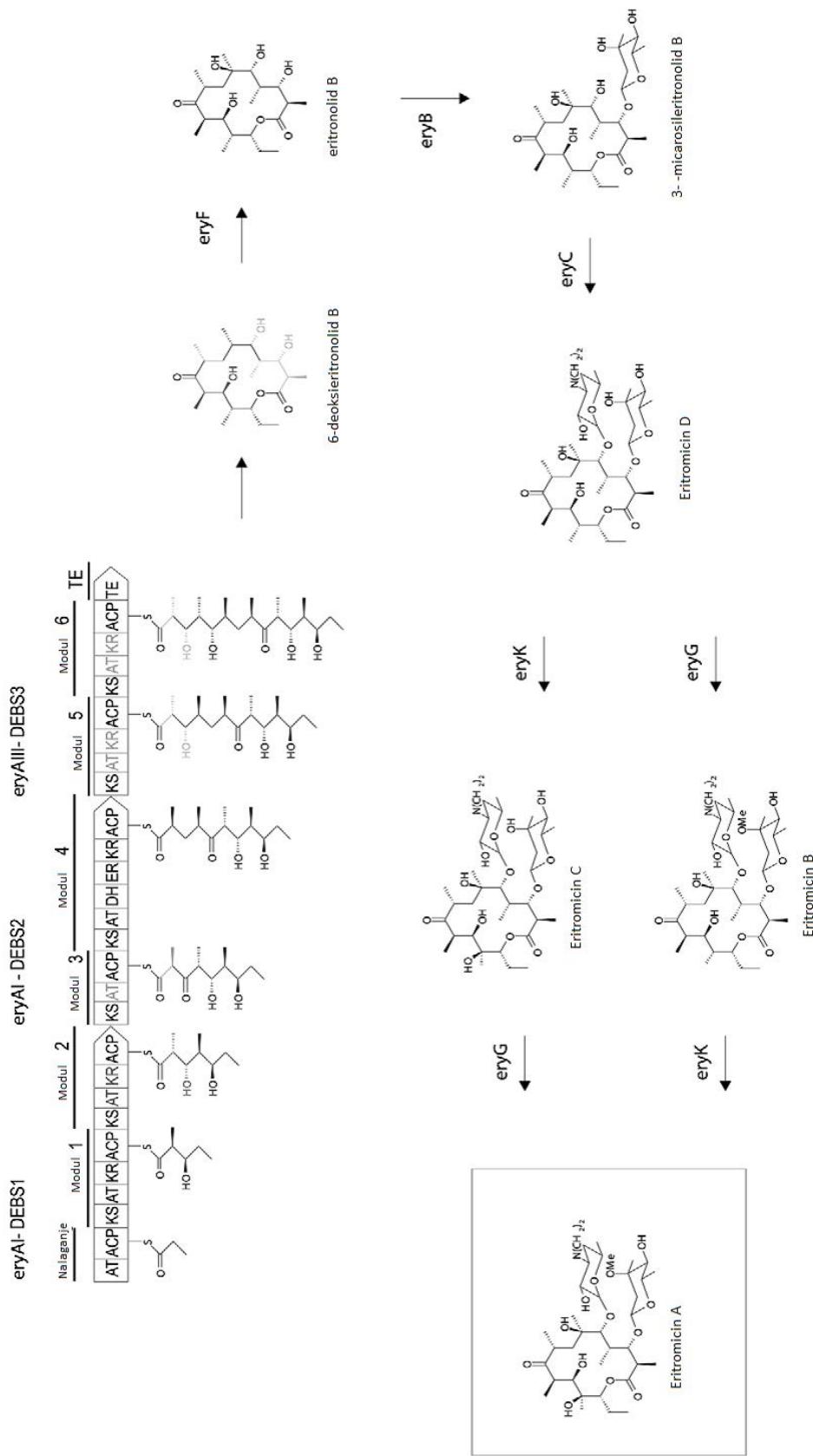
Biosinteza poliketidov se začne s kondenzacijo preprostih tioestrov karboksilnih kislin v poliketidno verigo, ki jo katalizirajo multidomenski kompleksi poliketid-sintaze (PKS). PKS katalizirajo dekarboksilacijsko kondenzacijo s koencimom A (CoA) aktiviranih tioestrov preprostih organskih kislin, kot so malonil-CoA, metilmalonil-CoA in etilmalonil-CoA. Mehanizem biosinteze je podoben biosintezi maščobnih kislin, strukturna kompleksnost poliketidov pa je večja zaradi uporabe različnih gradbenih enot, različnih stopenj redukcije po vsakem koraku kondenzacije, ciklizacije verig do t.i. aglikonov in kiralnih centrov (Kuhstoss in sod., 1996; Tang in McDaniel; 2001). Strukturna raznolikost poliketidov izhaja iz variabilnosti samega genskega zapisa za PKS, od katerega je odvisna dolžina osnovnega ogrodja poliketidne verige, in od poznih stopenj biosinteze, ki sledijo po zaključku sinteze poliketidne verige. Te specifične modifikacije (post-PKS) vključujejo reakcije ketoredukcije, aromatizacije, hidroksilacije, metilacije, dimerizacije, glikozilacije in so v večini bistvene za biološko aktivnost poliketidnih spojin (Minas, 2005).

Poznamo 2 tipa poliketidnih biosinteznih sistemov. Tip I modularne PKS so dolgi multifunkcionalni modularni proteini, ki nosijo določene encimske aktivnosti za vsak korak v biosintezi. Med aktinomicetami, lahko encime tipa I ponazorimo s PKS za biosintezo eritromicina pri bakteriji *S. erythraea*, medtem ko je tip II PKS odgovoren za sintezo različnih aromatskih poliketidov kot je aktinorhodin. Strukturna raznolikost poliketidov, se odraža tudi v pestrosti njihovih proizvajalcev. Splošno je sprejeto, da se neravnovesje v primarnem metabolizmu odraža v indukciji stresnega odgovora v obliki sinteze sekundarnih metabolitov (Minas, 2005).

2.2.2 Biosinteza eritromicina

Sev bakterije *S. erythraea* NRRL 2338 proizvede okoli 0,25-1,0 g/L eritromicina odvisno od bioprocесnih pogojev. Na ta sev lahko gledamo kot na izvorni sev večine trenutnih industrijskih sevov. Bioprocесni donosi so se od odkritja do danes povečali za več kot 10-krat na okoli 10-13 g/L eritromicina v brozgi (Minas, 2005). Genska gruča, ki zapisuje ery gene za biosintezo eritromicina je velika približno 60 kb. Med bioprocесom nastaja mešanica različnih molekul eritromicina (A, B, C, D), od katerih je eritromicin A edina željena oblika eritromicina. Ostale oblike predstavljajo delno hidroksilirane ali metilirane intermediate. Dober produkcijski sev proizvaja večinoma eritromicina A, vsaj 8-10 g/L, oziroma v mešanici se nahaja več kot 90 % eritromicina A (Minas, 2005).

Biosinteza eritromicina je prikazana na sliki 3, katalizira pa jo poliketidna sintaza tipa 1 (PKS). Več domenske proteine DEBS (1-3) kodirajo trije geni *eryAI-III*. Prvi protein, DEBS1, je sestavljen iz nalagalnega modula z acetil transferazno (AT) in acil nosilni protein (ACP) domenama, kateremu sledi modul 1 s ketosintazo (KS), AT, ketoreduktazo (KR) in ACP domenami, nadalje sledi modul 2 z KS, AT, KR in ACP domenami. Drugi protein, DEBS2, je zgrajen iz dveh modulov s KS, AT, ACP domenami in KS, AT, dehidrogenazno (DH), enoilreductazno (ER), KR, ACP domenami. Tretji protein, DEBS3, je prav tako sestavljen iz dveh modulov in tioesterazne (TE) domene za sprostitev poliketida iz modula. Nastajajoča veriga je prikazana na sliki 3 pod proteinskimi domenami (Minas, 2005). Po zaključku podaljševanja se eritromicinska poliketidna veriga ciklizira v makrolaktonski obroč 6-deoksieritronolid B (6-dEB), ki je še brez protimikrobne aktivnosti. V t.i. post-PKS oziroma poznih stopnjah biosinteze nato potečejo modifikacije osnovnega makrolaktonskega obroča 6-dEB, ob čemer molekula pridobi biološko aktivnost. Geni, ki so vključeni v hidroksilacijo, glikozilacijo in metilacijo so na sliki 3 poimenovani: *eryF* (6-deoksieritromolid B hidroksilaza), *eryB* (lokus za sintezo L-mikaroze in transferaza), *eryC* (lokus za D-desosamine sintazo in transferazo), *eryK* (eritromicin DIB hidroksilaza) *eryG* (*o*-metil transferaza) (Cummings in sod., 2014; Minas, 2005).



Slika 3: Shematski prikaz biosinteze eritromicina (Minas, 2005: 72)

2.3 ODPORNOST NA ANTIBIOTIKE

Antibiotiki so sekundarni metaboliti, ki pogojno niso ključni za rast in razmnoževanje organizmov, ki antibiotike proizvajajo. Večina antibiotikov, ki so v medicinski uporabi, nastajajo v sekundarnem metabolizmu aktinomicet. Odpornost na antibiotike je pridobljena lastnost mikroorganizmov, s katero se ubranijo učinka protimikrobnih sredstev, za katere so običajno dovetzni (Cundliffe in Demain, 2010; Madigan in sod., 2012).

Povezava med produkcijo antibiotika in odpornostjo nanj, ima pomembno evolucijsko dimenzijo. Pri mutiranih sevih v farmacevtski industriji opažamo pojav, ko zaradi izgube odpornosti ob enem tudi pade raven proizvodnje antibiotika. Eden izmed možnih razlogov, da lahko organizem zviša raven proizvodnje antibiotika, se lahko nahaja tudi v okrepljeni odpornosti na antibiotik. V vsakem poskusu se je pokazalo, da se je selekcija v smeri povečane rezistence izrazila tudi v višjih donosih antibiotika. Verjetnost za nastanek tega pojava se večinoma nanaša na gensko organizacijo. Geni, ki nosijo zapis za biosintezo antibiotikov, so ponavadi organizirani v gručah, ki obenem vsebujejo tudi zapis za odpornost na antibiotike. Med temi se nahajajo tudi transkripcijski aktivatorji, ki regulirajo izražanje biosinteze genov, kot tudi genov za odpornost na antibiotike (Cundliffe in Demain, 2010).

2.3.1 Mehанизmi odpornosti na antibiotike

Odpornost patogenih mikroorganizmov na vse glavne skupine antibiotikov se je pojavila sočasno z njihovo široko uporabo v medicini in živinoreji, pri čemer tudi makrolidni antibiotiki niso izjema. Molekularni mehanizi s katerimi bakterije postanejo odporne na antibiotike lahko opredelimo v tri skupine. Prvi način je modifikacija molekule antibiotika in njegova inaktivacija, drugi način je spremeba tarče antibiotika in pri tretjem načinu celice vzdržujejo odpornost s črpanjem antibiotika iz celice z uporabo transmembranskih črpalk (Vester in Douthwaite, 2001).

Benveniste in Davies (1973) sta pokazala, da aktinomicete vsebujejo ogromno encimov za modifikacijo molekul antibiotika, ki so zelo podobni encimom za modifikacijo antibiotikov v patogenih bakterijah. Encimi, ki inaktivirajo aminoglikozidne antibiotike, kamor spada streptomycin, modificirajo molekule antibiotika z dodajanjem fosfatne, acetatne ali adenilatne skupine. Druga možnost je, da organizem tarčo na katero se antibiotik veže, spremeni in s tem prepreči vezavo antibiotika. Ta sistem zaščite uporablja tudi aktinomiceta *S. erythraea*, ki proizvaja eritromicin, na enak način pa se proti eritromicinu borijo tudi patogene bakterije, ki so nanj odporne. Tretji način odpornosti na antibiotike lahko prikažemo na primeru streptomicet, ki proizvajajo tetracikline in pri patogenih bakterijah, ki so odporne na tetracikline. Ti mikroorganizmi vzdržujejo odpornost na tetracikline s pomočjo transmembranskih proteinov (protonskih črpalk), ki črpajo antibiotik iz celic. Patogene bakterije s pomočjo črpalk vzdržujejo raven tetraciklinov v citoplazmi pod mejo

toksičnosti tako, da antibiotik, takoj ko vstopi v celico ponovno izčrpajo iz celice. Pri streptomicetah, ki tetracikline proizvajajo pa črpalke delujejo endogeno in ves proizveden antibiotik črpajo iz micelija v gojišče (Hopwood, 2007).

2.3.2 Odpornost na eritromicin

Tarčno mesto makrolidov je velika (50S) podenota bakterijskega ribosoma. Eritromicin deluje v zgodnejših fazah sinteze proteinov na ribosomih, kjer najverjetneje povzroči prezgodnjo sprostitev kompleksa peptidil-tRNA iz ribosoma in tako blokira rast nastajajoče proteinske verige. Protimikrobnno delovanje eritromicina je še povečano z inhibicijo sestavljanja novih velikih podenot ribosomov, kar vodi v postopno zmanjševanje količine ribosomov v celici (Vester in Douthwaite, 2001). Večina bakterij, pri katerih so zabeležili odpornost na eritromicin, vrši posttranskripcijsko modifikacijo 23S rRNA molekule z adenin specifično N-metiltransferazo (metilazo) določeno z razredom genov, ki jih s skupnim imenom poznamo pod kratico *erm* (eritromicin ribosom metilacija). V preteklih desetletjih od odkritja prvih *erm* genov so do sedaj odkrili že preko 30 različic *erm* gena iz različnih virov (Weisblum, 1995).

MLS fenotip imenujemo fenotip bakterij, ki so odporne na makrolide (eritromicin), linkomicin in spojine sorodne streptograminu B. Fenotip so najprej opazili pri Gram-pozitivnih kliničnih izolatih, vendar je razširjen tudi med anktinomicetami, vključno (vendar ne nujno) s producenti makrolidov. Produkti gena *ermC* (stafilocoki) in produkti gena *ermE* (*S. erythraea*) na poziciji 2058 znotraj 23S rRNA molekule ustvarijo en ostanek N^6 , N^6 -dimetiladenina, medtem ko produkti ostalih *erm* genov to mesto monometilirajo. V skladu s tem poznamo torej dva različna MLS fenotipa. Mehanizem MLS tipa I (N^6 -monometilacija mesta A-2058) zagotavlja visoko stopnjo odpornosti na linkomicin in mnogo nižjo stopnjo zaščite proti makrolidom in streptograminu B, medtem pa mehanizem tipa II (N^6 , N^6 -dimetilacija mesta A-2058) ustvarja visok nivo odpornosti na vse MLS antibiotike. Mnogi, vendar ne vsi makrolidni producenti gostijo vsaj eno izmed različic gena *erm*, kljub stohiometričnosti metilacije (in zaradi tega točnega fenotipa) ni mogoče napovedati iz *in silico* primerjave sekvenc in je točen fenotip potrebno določiti direktno. V posameznih anktinomicetah lahko pogosto najdemo več genov *erm* tipa (Cundliffe in Demain, 2010).

Makrolidni antibiotiki se pripnejo na tarčo v utesnjeni prostor znotraj tunela, ki prečka veliko podenoto ribosoma in skozi katero mora potovati novonastajajoči peptid. Molekula antibiotika se nalega na tla predora s C-5 substituentom sladkorja v smeri proti vhodu oziroma mestu nastanka peptidne vezi. Ta del predora je skoraj v celoti prekrit s 23S rRNA s katero interaktirajo predvsem prek svojih saharidnih ostankov (Cundliffe in Demain, 2010).

2.3.3 Odpornost bakterije *S. erythraea* na antibiotike

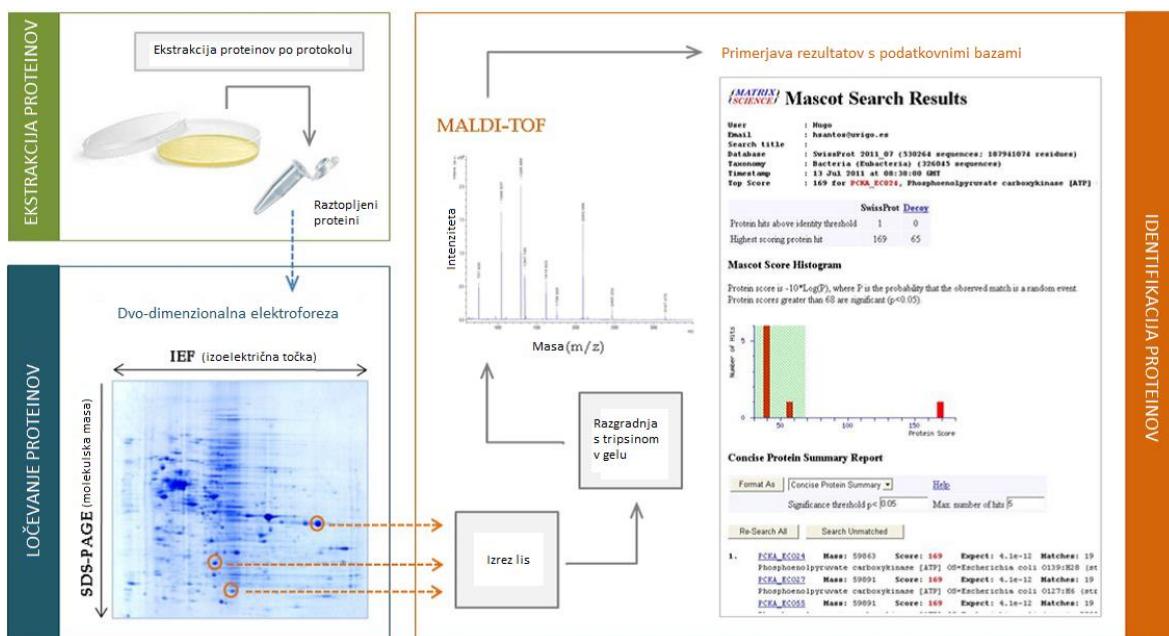
Genom bakterije *S. erythraea* nam pomaga razložiti njeno rezistenco na širok spekter antibiotikov, saj nosi zapis za številne encime, ki inaktivirajo antibiotike skupnih razredov. Na genomu se nahaja zapis za 17 β -laktamaznih genov in za dve makrolid esterazi. Genski zapis za eno izmed teh esteraz (SACE_0712) se nahaja znotraj genske gruče za biosintezo eritromicina in je inaktivirana z vstavljanjem transpozona. Gen, ki nosi zapis za drugo esterazo (SACE_1765) pa se zelo dobro poravna z geni za eritromicinske esteraze iz drugih bakterij, ki so odporne na eritromicin. Lahko da ima tudi doslej spregledano vlogo pri regulaciji biosinteze eritromicina. Bakterija *S. erythraea* vsebuje tudi genski zapis oziroma genske homologe genom za izlivne črpalke za kloramfenikol, daunorubicin, linkomicin, kamfor, fosmidicin, biciklomicin, tetraciklin, vankomicin in sorodne glikopeptidne antibiotike, genom pa vsebuje tudi zapis za streptomycin fosfotransferazo, spektinomicin fosfotransferazo, aminglikozid N-3 –acetiltransferazo, aminonukleozid fosfotransferazo in dve domnevni makrolidni glikoziltransferazi. Pojavilo se je tudi vsaj 21 CDS, ki kodirajo dioksigenaze sorodne bleomicinrezistenčnemu proteinu, za dodatek k že znanemu *ermE* rRNA metiltransferznemu genu (SACE_0733), pa je prisotnih še 11 rRNA metiltransferaz (Oliynyk in sod., 2007).

2.4 PROTEOMIKA

Proteomika je uporabna v vseh raziskavah proteinov. K proteomskim raziskavam se lahko pristopi na več načinov, vendar osnovni princip sestoji iz treh korakov (Slika 4):

- I. ekstrakcija proteinov,
- II. ločevanje proteinov,
- III. identifikacija.

Večina pristopov zahteva uporabo masne spektrometrije (MS) in uporabo podatkovnih baz za identifikacijo, vendar se razlikujejo glede na različne postopke ločevanja in izolacije proteinov. Postopki ekstrakcije proteinov se razlikujejo predvsem v viru proteinov za raziskavo. Za razbitje celic oziroma tkiv se uporablja različne postopke, kot so večkratno zamrzovanje in odtaljevanje, ultrazvok, homogenizacija z visokim tlakom, filtracija ali permeabilizacija membran z uporabo organskih topil. Uporabljeni metodi je odvisna predvsem od vrste celic (Pacheco in sod., 2012).



Slika 4: Prikaz poteka osnovne proteomske analize (Pacheco in sod., 2012: 190)

Eden izmed najpomembnejših načinov ločevanja proteinov je ločevanje z elektroforezo, kamor spada tudi dvo-dimenzionalna gelska elektroforeza (2-DE) in kapilarna elektroforeza. Najpogosteje uporabljeni metodi za ločevanje proteinov v proteomskih analizah je 2-DE. Protein se najprej ločijo glede na izoelektrično točko (pI) v prvi dimenziji, v drugi dimenziji pa se proteini ločijo še glede na molekulsko maso (MW). Gele nato barvamo, da vizualiziramo proteine, ki so se ločili. V ta namen se uporablja različna barvila, največkrat se uporablja Coomasie Blue, srebro ali fluorescentna barvila (Sypro Ruby). Coomassie Blue je barvilo enostavno za uporabo, cenovno ugodno, vendar relativno slabo občutljivo, le 36-45 ng proteina na liso v gelu, v primerjavi s srebrom ali fluorescentimi barvili, edina večja prednost tega barvila je kompatibilnost z MS. Barvanje s srebrom je draga, časovno potratno,

vendar ima visoko občutljivost, saj lahko z njim zaznamo 0,5-1,2 ng proteina na liso na gel. 2-D diferencialna gelska elektroforeza (DIGE) je modifikacija 2-DE, s katero se izognemo razlikam, ki po navadi nastanejo, ko vzorce ločimo na različnih gelih, pa čeprav pod enakimi pogoji. Princip metode je, da vzorce pred ločevanjem označimo z različnimi fluorescentnimi barvili, nato pa vse skupaj ločimo na istem 2-DE gelu. Po barvanju in analizi proteinskih profilov izrežemo proteinske lise, proteine v izrezanih lisah tripsiniziramo (tripsinizacija v gelu), nato pa identificiramo z MS, podatke te analize pa primerjamo s podatkovnimi bazami in uporabo bioinformacijskih orodij, da dobimo pravo identiteto proteina v lisi. Ena izmed glavnih prednosti 2-DE je možnost lokalizacije posttranslacijsko modificiranih proteinov, ker se pojavljajo v skupkih lis, ki jih lahko posledično identificiramo z MS analizo. Prav tako pa lahko posttranslacijske modifikacije (glikozilacija in fosforilacija) zaznavamo tudi z barvanjem gelov s specifičnimi fluorescentnimi barvili (Pacheco in sod., 2012).

Včasih je bila ena večjih težav 2-DE nezmožnost zaznave membranskih proteinov in slaba ponovljivost, vendar je z razvojem boljših reagentov, tehnik in programske opreme za poravnavo gelov postala relativno poceni in dostopna tehnologija. Čeprav je ta metoda še vedno omejena z občutljivostjo, je najbolj uporabljana metoda za ločevanje proteinov. Za ločevanje proteinov in proteomske analize se uporablja tudi tekočinske kromatografije, kamor spadajo različni postopki ločevanja, kot so gelska filtracija, afinitetna kromatografija, ionsko izmenjevalna kromatografija, kromatografija z reverzno fazo in tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) (Pacheco in sod., 2012).

Z identifikacijo proteinov lahko uporabimo ne spektrometrične metode (Edmanova razgradnja, določanje aminokislinskega zaporedja iz sekvence DNA), v današnjih časih pa se večinoma poslužujemo identifikacije proteinov z uporabo MS. Najlažji in najhitrejši način identifikacije proteinov je peptidno mapiranje. Pri tej metodi protein v izrezanem gelu razrežemo z uporabo proteolitičnih encimov, večinoma tripsin, sledi razgradnja gela in priprava peptidov na analizo z MS. Najpogosteje se uporablja MALDI-TOF (ionizacija v nosilcu z lasersko desorpcijo – analizator na čas preleta ionov) instrumente, ker so lažji za upravljanje kot elektrosprej sistemi (ESI-TOF). Masni spekter izmerjenih peptidov se nato z uporabo različnih podatkovnih baz in bioinformacijskih orodij primerja s teoretičnim peptidnim spektrom. Čeprav ta postopek za proteinsko identifikacijo deluje zelo dobro, je postopek lahko vseeno ogrožen zaradi več razlogov. Prejšnjega postopka ne moremo uporabiti kadar potrebujemo nedvoumno proteinsko identifikacijo ali natančno zaporedje aminokislin. V tem primeru uporabimo napravo imenovano tandemna MS (MS/MS) (Pacheco in sod., 2012).

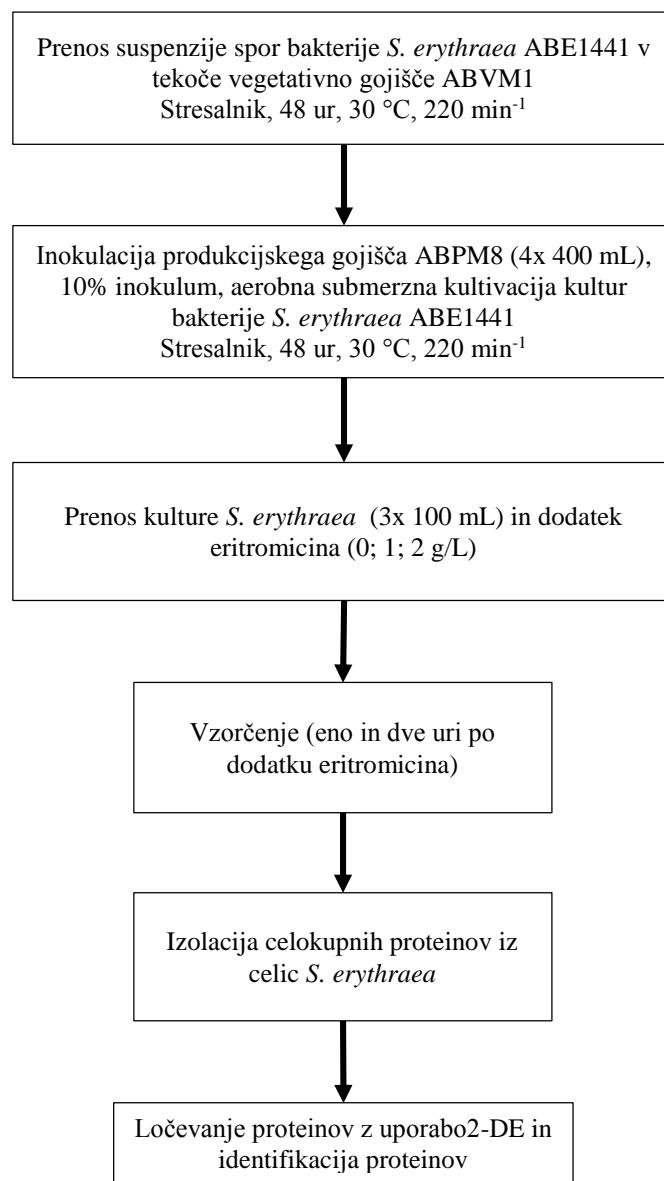
Z evolucijo tehnologij, ki temeljijo na MS se širi naše razumevanje kompleksnosti in dinamičnosti proteoma. Ob enem pa ugotavljamo, da nobena proteomska strategija ne more odgovoriti na vsa biološka vprašanja. Kvantifikacija proteinov z MS se lahko izvede s tremi različnimi metodami: »isotope-coded affinity tags« (ICAT), »isobaric tag for relative and

absolute quantitation« (iTRAQ) ali »stable isotope labelling by amino acids in cell culture« (SILAC) (Pacheco in sod., 2012).

Kljub razlikam v proteomskih analizah, prav pri vseh analizah nastajajo ogromne količine podatkov. Za pridobivanje, analizo in shranjevanje teh podatkov so ključni bioinformacijski pristopi. Za analizo slik 2-DE gelov je na voljo nekaj računalniških programov, ki omogočajo primerjavo različnih gelov. 2-DE geli niso nikoli popolnoma identični zaradi različnih faktorjev, ki vplivajo na ločevanje proteinov (pripravljalne metode, barvanje, različna mobilnost v gelu zaradi regij in variabilnosti v elektroforeznih pogojih) tudi pri študijah istega vzorca. Začetna točka vsake poglobljene analize in statistične študije so metode za avtomatsko ujemanje gelov (detekcija lis, zvijanje gelov in avto-ujemanje). S pomočjo MS, integrirani sistemi omogočajo proteinsko identifikacijo, ki temelji na primerjavi peptidnih fingerprintov s proteinimi v podatkovnih bazah (Pacheco in sod., 2012). Bioinformatika ni v pomoč samo pri interpretaciji rezultatov, ampak je lahko tudi gonilo razvoja in smeri novi raziskav na področju proteomike, predvsem z vidika dostopnosti rezultatov v podatkovnih bazah, ki so dostopne raziskovalcem po vsem svetu.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 DELOVNI POSTOPKI



Slika 5: Shematski prikaz poteka dela

3.2 MATERIALI

3.2.1 Eritromicin

Za tretiranje celic bakterije *S. erythraea* smo uporabili eritromicin (Merck) v prahu.

3.2.2 Mikroorganizem

Uporabili smo visoko produkcijski sev bakterije *Saccharopolyspora erythraea* ABE1441 (Acies Bio d.o.o., Ljubljana).

3.2.3 Gojišča

- ABVM1 vegetativno gojišče

Preglednica 2: Sestava ABVM1 vegetativnega gojišča

Sestavina	Koncentracija
Koruzna namakalna vodica (CSL) (Roquette)	30,0 g/L
Saharoza (Sigma-Aldrich)	30,0 g/L
Amonijev sulfat (Sigma-Aldrich)	4,0 g/L
Kalcijev karbonat (Solvay)	6,0 g/L
dH ₂ O do končnega volumna	

V 20 % končnega volumna dH₂O smo zmešali 30 g koruzne namakalne vodice in segrevali do vrenja. V ohlajeno raztopino smo dodali preostanek destilirane vode in še 30 g saharoze, 4 g (NH₄)₂SO₄, 6 g CaCO₃, pH smo z NaOH ali HCl uravnali na 5,5. Sterilizirali smo 40 min pri T= 121 °C; p= 1,1bar (industrijsko gojišče v uporabi, Acies Bio).

- ABPM8 produkcijsko gojišče

Preglednica 3: Sestava ABPM8 produkcijskega gojišča

Sestavina	Koncentracija
Sojina moka (Soja protein)	36 g/L
Koruzni škrob (Helios)	36 g/L
Amonijev sulfat (Sigma-Aldrich)	2,4 g/L
Kalcijev karbonat (Solvay)	7,2 g/L
Sojino olje (Gea)	5 g/L
Glukoza (Roquette)	30 g/L
n-propanol (Sigma-Aldrich)	1,2 mL/L
dH ₂ O do končnega volumna	

V 80 % končnega volumna destilirane vode smo zmešali 36 g sojine moke, 36 g koruznega škroba, 2,4 g (NH₄)₂SO₄ in uravnali pH na 6,3. Po korekciji pH-ja smo dodali še 7,2 g CaCO₃

zmešanega v 20 % končnega volumna destilirane vode, končni pH je bil 6,8. Na koncu smo dodali še 5 g sojinega olja. Po avtoklaviranju (40 min pri T= 121 °C; p= 1,1bar) smo tekom procesa dodali še 30 g/L glukoze in 1,2 mL/L n-propanola (industrijsko gojišče v uporabi, Acies Bio).

3.2.4 Raztopine in reagenti

3.2.4.1 Vzorčenje kultur bakterije *S. erythraea*

- TRIS pufer (50 mM), pH= 7,2

Zatehtamo ustrezno količino TRIS-baze (Sigma), dodamo 90 % končnega volumna ddH₂O, s koncentrirano HCl uravnamo pH na 7,2 in dopolnimo z ddH₂O do končnega volumna.

3.2.4.2 Izolacija celokupnih proteinov iz kultur bakterije *S. erythraea*

- Pufer za izolacijo celokupnih proteinov

Preglednica 4: Sestava pufra za izolacijo celokupnih proteinov

Sestavina	Končna koncentracija
Urea (Sigma)	7 M
Tiourea (Sigma)	2 M
CHAPS (GE Healthcare)	4 % (w/v)
Tris-baza (Sigma)	40 mM
DTT (Sigma)	65 mM
Koktejl proteaznih inhibitorjev (Roche)	2 tabletki
ddH ₂ O do 10 mL	

Zamešali smo vse sestavine, razen DTT. Pufer smo alikvotirali po 2 mL in shranili na -20 °C. Potrebno količino pufra smo pred uporabo odtajali na sobni temperaturi. V novo mikrocentrifugirko smo odtehtali 0,02 g ditiotreitol (DTT) in dodali 2 mL ekstrakcijskega pufra.

3.2.4.3 Merjenje koncentracije proteinov

- Bradfordov reagent (Bio-Rad)

Za uporabo smo Bradfordov reagent 5x redčili z ddH₂O.

- Goveji serumski albumin (BSA) (Sigma).

3.2.4.4 Čiščenje proteinov

- Komplet za čiščenje proteinov »2-D Clean-Up Kit« (GE Healthcare)

3.2.4.5 2-D elektroforeza (I. dimenzija)

- Rehidracijski pufer (RP)

Preglednica 5: Sestava rehidracijskega pufra (RP)

Sestavina	Končna koncentracija
Urea (Sigma-Aldrich)	7 M
Tiourea (Sigma-Aldrich)	2 M
CHAPS (GE Healthcare)	2 % (w/v)
IPG pufer (GE Healthcare)	2 % (w/v)
BFM (Sigma)	0,002 % (1 kristalček)
ddH ₂ O do 25 mL	

RP smo alikvotirali po 2 mL in shranili pri -20 °C. Pred uporabo smo alikvot RP odtajali na sobni temperaturi in prenesli v novo mikrocentrifugirko, v katero smo zatehtali 0,006 g DTT (Sigma), tako da je bila končna koncentracija DTT v RP 18 mM.

- Mineralno olje (Sigma)
- Trakovi z dehidriranim gelom in immobiliziranim pH gradientom 4-7 (IPG trakovi) za ločevanje proteinov glede na pI (GE Healthcare)

3.2.4.6 2-D elektroforeza (II. dimenzija)

- Raztopine za pripravo ločilnega gela

1,5 M raztopina Tris-HCl, pH= 8,8

Tris-baza (Sigma) 36,3 g
dodamo 150 mL ddH₂O
uravnamo pH na 8,8 s koncentrirano HCl
dodamo ddH₂O do 200 mL

10 % (w/v) raztopina SDS

SDS (Sigma) 10,0 g
dodamo ddH₂O do 1000 mL

10 % (w/v) raztopina APS

APS (Sigma) 0,1 g

dodamo ddH₂O do 1mL

- Ločilni gel

Preglednica 6: Sestava ločilnega gela z debelino 1 mm in 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida

Sestavina	Končna koncentracija	Količina za 2 gela	Količina za 4 gele
Akrilamid 30 % (w/v)/Bisakrilamid 0,8 % (w/v) (Sigma)	12 % (w/v)/0,3 % (w/v)	15,7 mL	31,4 mL
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH = 8,8	0,6 M	9,8 mL	19,6 mL
10 % (w/v) raztopina SDS	4 % (w/v)	0,4 mL	0,8 mL
10 % (w/v) raztopina APS*	2 % (w/v)	195 µL	390 µL
TEMED* (Sigma)		13 µL	26 µL
ddH ₂ O		13 mL	26 mL

*Raztopino APS in TEMED smo dodali po tem, ko smo ostale komponente zmešali in razplinili v ultrazvočni kopeli (10 min).

- Osnovni pufer za uravnoveženje IPG trakov

Preglednica 7: Sestava osnovnega pufra za uravnoveženje IPG trakov

Sestavina	Končna koncentracija
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH = 8,8	75 mM
Urea (Sigma-Aldrich)	6 M
Glicerol (Sigma-Aldrich)	30 % (w/v)
SDS (Sigma-Aldrich)	2 % (w/v)
BFM (Sigma-Aldrich)	0,002 % (w/v) (1 kristalček)
ddH ₂ O do 100 mL	

Osnovni pufer za uravnoveženje smo alikvotirali po 40 mL in shranili na -20 °C. Pred uporabo smo ga odtajali na sobni temperaturi.

Pufer za uravnoveženje IPG trakov I smo pripravili tako, da smo zatehtali 0,2 g DTT v kiveto, dodali 20 mL osnovnega pufra za uravnoveženje. Ko se je DTT raztopil smo razdelili v dve epruveti po 10 mL.

Pufer za uravnoveženje IPG trakov II smo pripravili po enakem postopku kot pufer za uravnoveženje I, le da smo namesto DTT zatehtali 0,96 g JAA.

- Agarozna raztopina

Preglednica 8: Sestava agarozne raztopine

Sestavina	Končna koncentracija
Agaroza (Sigma-Aldrich)	0,5 % (w/v)
1x SDS elektroforezni pufer do 100 mL	
BFM* (1 kristalček)	

Bromfenol modro (BFM) smo dodali k raztopini, ki smo jo predhodno segreli v mikrovalovni pečici, da se je agarosa lažje raztopila. Raztopino smo nato razdelili v alikvote v kivete in hranili do 1 mesec na sobni temperaturi.

- 1x SDS elektroforezni pufer za 2-D elektroforezo

Preglednica 9: Sestava 1x SDS elektroforeznega pufra

Sestavina	Končna koncentracija
Tris-baza (Sigma-Aldrich)	25 mM
Glicin (Merck)	192 mM
SDS (Sigma-Aldrich)	0,1 % (w/v)
ddH ₂ O do 1 L	

3.2.4.7 Barvanje gelov za detekcijo proteinskih lis

- Fiksacijska raztopina

Preglednica 10: Sestava fiksacijske raztopine

Sestavina	Končna koncentracija
100 % metanol (Merck)	50 % (v/v)
100 % ocetna kislina (Merck)	7 % (v/v)
ddH ₂ O do 1 L	

- Barvilo SYPRO Ruby (Invitrogen)
- Raztopina za razbarvanje gelov

Preglednica 11: Sestava raztopine za razbarvanje

Sestavina	Končna koncentracija
100 % metanol (Merck)	10 % (v/v)
100 % ocetna kislina (Merck)	7 % (v/v)
ddH ₂ O do 1 L	

3.2.5 Aparature in naprave

Pri delu smo poleg standardne laboratorijske opreme uporabljali tudi naslednje aparature in naprave:

Priprava gojišč, raztopin in reagentov

- pH-meter (Mettler Toledo)
- parni sterilizator – avtoklav (Sutjeska)
- magnetno mešalo MM-540 (Tehnica)
- tehnica Exellence (Sartorius)
- tehnica PS 1200/C/2 (Radwag)
- tehnica PLJ 2100-2M (Kern)
- tehnica ALT-220-4NM (Kern)

Kultivacija in inkubacija kultur bakterij *S. erythraea*

- brezprašna komora MC 12-2 (PIO)
- mikroskop (ZEISS)
- stresalnik Multitron (Infors HT)

Vzorčenje kultur bakterije *S. erythraea*

- centrifuga ROTINA 420 R hlajena (Hettich)

Izolacija celokupnih proteinov proteinov

- ultrazvočna naprava za razbijanje celic (sonifikator) LABSONIC M (Sartorius)
- centrifuga ROTINA 420 R hlajena (Hettich)

Merjenje koncentracije proteinov

- čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)
- prozorne 96-mestne mikrotitrskie plošče (Nunc)

Čiščenje proteinov

- vrtinčnik TTS2 (Ika)
- centrifuga s hlajenjem (Sigma)

I. dimenzija 2-D elektroforeze

- vrtinčnik TTS2 (Ika)
- centrifuga miniSpin (Eppendorf)
- podstavek z režami za rehidracijo trakov (GE Healthcare)
- elektroforetska enota Multiphor II (GE Healthcare)
- steklen podstavek z elektrodnimi priključki (GE Healthcare)
- plastična plošča z vdolbinami (GE Healthcare)
- elektrodni trakovi (GE Healthcare)
- termostatski cirkulator (GE Healthcare)
- električni usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)

II. dimenzija 2-D elektroforeze

- steklene plošče
- distančniki (1mm)
- nosilci z vijaki
- podstavek-nosilec za kalupe
- pritrtilci kalupov
- ultrazvočna kopel Sonis (Pio)
- mikrovalovna pečica (Sanyo)
- SDS-PAGE posoda (zgornja in spodnja) (GE Healthcare)
- električni usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)

Barvanje gelov

- stresalna plošča (Biometra)
- plastične posode (banjice) 19,5 x 20,8 cm (Rotho)

Zajem in analiza slik gelov

- sistem za dokumentacijo gelov CAM-GX-CHEMI HR (Syngene)
- program za zajem slik GeneSnap (Syngene)
- program za analizo slik gelov 2-D Dymension (Syngene)

Hladilniki in zamrzovalniki za sharanjevanje raztopin, reagentov in vzorcev

- zamrzovalnik (-20 °C) (LTH)
- hladilnik (4 °C) (LTH)
- zamrzovalnik Ultra Freeze (-80 °C) (Heto)

3.3 METODE

3.3.1 Kultivacija celic bakterije *Saccharopolyspora erythraea* v prisotnosti visoke koncentracije eritromicina

Za pripravo inokuluma smo uporabili tekoče vegetativno gojišče ABVM1 (Preglednica 2), za nadaljnjo kultivacijo smo uporabili tekoče produkcijsko gojišče ABPM8 (Preglednica 3).

Inokulum za produkcijsko gojišče smo pripravili tako, da smo v dve 500-mL erlenmajer steklenici s 100 mL gojišča prenesli 700 μ L suspenzije spor visoko produkcijskega seva bakterije *S. erythraea* ABE1441. Kultivacija je potekala 48 ur na stresalniku pri 30 °C in številu obratov 220 min⁻¹. Po 48 urah smo preverili procesne parametre (pH, PMV) in preverili mikroskopsko sliko brozge. Glede na to da so bili parametri ustrezni in nobena izmed kultur ni bila okužena, smo združili inokulum iz obeh erlenmajer steklenic in inokulirali 4x 400 mL gojišča ABPM8 v 2-L erlenmajer steklenicah (10 % inokulum). Kultivacija je potekala nadalje še 48 ur na stresalniku pri 30 °C in številu obratov 220 min⁻¹. Po 48 urah smo vsako izmed erlenmajer steklenic vzorčili, da smo preverili procesne parametre (pH, PMV) in preverili mikroskopsko sliko brozge. Nato smo iz vsake 2-L erlenmajer steklenice razdelili brozgo (po 100 mL) v 3 sterilne 500-mL erlenmajer steklenice. Prva erlenmajer steklenica vsake ponovitve je služila kot kontrola, v ostali dve (vsake ponovitve) pa smo dodali eritromicin v prahu, da smo dosegli koncentracijo 1 in 2 g/L eritromicina v brozgi. Sledila je kultivacija na stresalniku pri 30 °C in številu obratov 220 min⁻¹.

3.3.2 Vzorčenje in priprava vzorcev za proteomsko analizo

Vzorčili smo v ustreznih časovnih intervalih (1 in 2 uri po dodatku eritromicina v gojišče). Vzorčili smo 3x po 2 mL vzorca iz vsake 500-mL erlenmajer steklenice.

Vzorce smo najprej centrifugirali v hlajeni centrifugi ($T= 4$ °C) 1 min pri 3500 g. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant. Nato je sledilo 3-kratno spiranje s 50 mM Tris pufrom (pH= 7,2). Spiranje je potekalo tako, da smo najprej peletu dodali 2 mL pufra, resuspendirali pelet na vrtinčniku in nato ponovno centrifugirali pri 3500 g v hlajeni centrifugi ($T= 4$ °C). Vzorci so bili ves vmesni čas hlajeni na ledu. V zadnjem koraku smo odstranili supernatant in pelet zmrznili v tekočem dušiku. Tako pripravljene vzorce smo nato shranili na -80 °C.

3.3.3 Ekstrakcija celokupnih proteinov kulture *Saccharopolyspora erythraea*

Vzorce, shranjene na -80 °C, smo odtajali na ledu, jim dodali 400 μ L pufra za izolacijo celokupnih proteinov (Preglednica 4). Nato smo z uporabo ultrazvočne naprave

(sonifikatorja) celice izpostavili ultrazvoku za 4×15 s z vmesnimi 30 s premori. Vzorci so bili ves čas na ledu. Nato smo tako obdelane vzorce centrifugirali 20 min pri 4°C in 20000 g. Supernatant smo prenesli v sveže mikrocentrifugirke in shranili na -80°C .

3.3.4 Merjenje koncentracije proteinov v ekstraktih vzorcev

Koncentracijo proteinov v ekstraktih vzorcev smo določili z metodo Bradford (Bradford, 1976) glede na umeritveno krivuljo (Priloga A).

Za določanje koncentracije proteinov v ekstraktih vzorcev smo v jamice prozorne mikrotitrskie ploščice odpipetirali 4 μL predhodno ustrezeno redčenega ekstrakta in dodali 196 μL 5x redčenega Bradfordovega reagenta. Kot slepi vzorec smo namesto vzorca v jamico mikrotitrskie plošče dodali ekstrakcijski pufer. Nato smo premešali in čez 5 min pomerili absorbanci pri valovni dolžini 595 nm, na čitalcu mikrotitrskih plošč Safire 2. Vrednostim absorbanc vzorcev ekstraktov smo odsteli vrednost absorbance slepega vzorca in izračunali koncentracijo proteinov z enačbo umeritvene krivulje. Ekstrakte vzorcev smo redčili tolikokrat, da so bile vrednosti absorbanc vzorcev v linearinem območju umeritvene krivulje.

3.3.5 Čiščenje proteinskih ekstraktov

Za čiščenje proteinskih ekstraktov smo uporabili komplet »2-D Clean-Up Kit«. Osnovni princip delovanja tega kompleta je, da z obarjanjem proteinov odstranimo moteče snovi, kot so detergenti, lipidi, fenoli in nukleinske kisline (Stasyk in sod., 2001).

Kompletu so bila priložena navodila proizvajalca, po katerih smo izvedli čiščenje proteinov.

- I. Ustrezen volumen ekstrakta smo odpipetirali v 2-mL mikrocentrifugirko, tako da je vsebnost proteinov v mikrocentrifugirki znašala 150 μg in z ddH₂O dopolnili do 200 μL .
- II. Nato smo dodali 3-kraten volumen precipitanta (glede na volumen vzorca), premešali na vrtinčniku in inkubirali 15 min na ledu.
- III. Potem smo dodali 3-kratni volumen ko-precipitanta (glede na volumen vzorca) mešanici vzorca in precipitanta in kratko premešali na vrtinčniku.
- IV. Nato smo centrifugirali 5 min pri 12000 g v hljeni ($T= 4^{\circ}\text{C}$) centrifugi. Supernatant smo po centrifugiranju s previdnim pipetiranjem odstranili, saj se sediment ni smel resuspendirati.

- V. Ko smo odstranili supernatant, smo dodali 80 µL ko-precipitanta (takšen volumen, da je prekril sediment) in inkubirali na ledu 5 minut.
- VI. Centrifugirali smo 5 min pri 12000 g v hlajeni (T= 4 °C) centrifugi in po centrifugiranju s previdnim pipetiranjem odstranili supernatant.
- VII. Dodali smo 50 µL ddH₂O (takšen volumen, da se prekrije sediment), nato smo vzorce mešali na vrtinčniku, da se je sediment resuspendiral (v primeru da se pelet ni resuspendiral, se je potem v naslednjem koraku zagotovo).
- VIII. Nato smo dodali 1 mL pufra za izpiranje (pufer moramo vsaj eno uro prej ohladiti na T= -20 °C) in 5 µL aditiva, sledilo pa je mešanje na vrtinčniku toliko čaša da se je sediment resuspendiral (sediment se ne raztopi).
- IX. Po resuspendiranju peleta smo vzorce inkubirali pri T= -20 °C (30 min) in mešali 20-30 sekund na vrtinčniku na vsakih 10 min inkubacije.
- X. Po zadnjem delu inkubacije smo vzorce centrifugirali pri 12000 g, 5 min, v hlajeni centrifugi (T= 4 °C).
- XI. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant s previdnim pipetiranjem, v mikro-centrifugirki pa je ostal viden bel sediment, ki smo ga nato sušili na zraku največ 5 min.

Po tem protokolu smo očistili proteine, po čiščenju pa smo sediment raztopili v raztopini za rehidracijo trakov.

3.3.6 Dvo-dimenzionalna gelska elektroforeza (2-DE)

S to metodo proteine v I. dimenziji ločujemo glede na njihovo izoelektrično točko (izoelektrično fokusiranje) in nato še glede na molekulsko maso v II. dimenziji (SDS-PAGE). Ta metoda nam tako omogoča ločevanje proteinov z identičnimi molekulskimi masami in različnimi izoelektričnimi točkami ali obratno (Nelson in Cox, 2004).

3.3.6.1 I. dimenzija

Izoelektrično fokusiranje je elektroforetska metoda, ki se uporablja za analizo amfoternih snovi. Za te snovi je značilno, da migrirajo pod vplivom električne napetosti vzdolž pH gradiента, kar je tudi osnova te metode. V našem primeru pozitivno nabiti proteini potujejo proti negativno nabiti elektrodi (katodi), negativno nabiti proteini pa proti pozitivno nabiti elektrodi (anodi). Protein ne potuje več, ko je njegova izoelektrična točka enaka pH vrednosti okolja, torej, ko postane elektronevtralen. Po končani elektroforezi so amfoterne molekule ločene vzdolž pH gradienta glede na svojo izoelektrično točko. Izoelektrično fokusiranje poteka pri visoki napetosti, zaradi česar se ustvarja toplota, in zato moramo nosilec obvezno hladiti (Sepčić in sod., 1997).

- Priprava vzorca za nanos na IPG trakove

Sediment, ki je ostal po čiščenju proteinov smo raztopili v raztopini za rehidracijo trakov (rehidracijski pufer) (Preglednica 5). Sedimentu smo dodali tolikšno količino rehidracijskega pufra, da smo dosegli končno koncentracijo proteinov $0,6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Vsebnost proteinov v $250 \mu\text{L}$ rehidracijskega pufra (kolikor je potrebno nanesti na IPG trak) je bila tako $150 \mu\text{g}$. Vzorce smo nato premešali na vrtinčniku in inkubirali 15 min na sobni temperaturi. V zadnjem koraku smo vzorce centrifugirali 5 min pri 13400 min^{-1} .

- Rehidracija trakov in nanos vzorca na IPG trakove

Uporabili smo trakove z imobiliziranim pH gradientom 4-7 dolžine 13 cm, ki smo jih do uporabe hranili na $T = -20^\circ\text{C}$. Za rehidracijo smo uporabili podstavek z režami in pokrovom. Podstavek, smo najprej uravnali v ravnotežno lego, nato pa na sredino reže odpipetirali $250 \mu\text{L}$ rehidracijskega pufra z raztopljenimi proteini.

Zamrznjenemu IPG traku smo z anodnega konca (+) odstranili plastično folijo, ki je prekrivala dehidriran gel z imobiliziranim pH gradientom, in trak previdno, brez tvorbe mehurčkov, položili z gelom navzdol v režo na vzorec. Trak smo nato prekrili s 3 mL mineralnega olja, podstavek z režami pa s pokrovom in pustili, da so se geli čez noč rehidrirali, ob tem pa so proteini vstopili v gel.

Mineralno olje preprečuje kristalizacijo uree in evaporacijo vode iz rehidracijskega pufra.

- Izoelektrično fokusiranje (IEF)

Na ploščo, ki zagotavlja konstantno temperaturo 20 °C med potekom IEF, smo v vertikalnih črtah nanesli 5x po 1 mL mineralnega olja. Na to ploščo smo položili steklen podstavek z elektrodnimi priključki, vanj vlili 10 mL mineralnega olja in v podstavek na olje previdno brez mehurčkov položili plastično ploščo z vdolbinami. IPG trak smo po rehidraciji sprali z ddH₂O. S tem smo s trakov sprali kristalčke uree in proteine, ki niso vstopili v gel. Trak smo popivnali na brisači in ga z gelom navzgor položili v dolbino na plošči, tako, da je bil plus konec traku, kjer je pH najnižji, na anodni strani.

Odrezali smo 2 elektrodna trakova, ju omočili z ddH₂O in ju popivnali na papirnatih brisačih. En elektrodnih trakov smo položili na anodni (+) konec IPG traku, drug trak pa na katodni (-) konec IPG traku. Na sredino elektrodnih trakov smo vpeli elektrodi. Trakove smo prelili s 150 mL mineralnega olja, pri čemer olje služi kot prevodnik topote, da lahko s hlajenjem na 20 °C vzdržujemo pH gradient.

IEF ploščo smo povezali z usmernikom, na katerem smo nastavili 4 faze:

1. faza: 0 – 300V; 1 min
2. faza: 300V; 1 ura
3. faza: 300 – 3500V; 1 h 30 min
4. faza: 3500V; 5 ur

Tok teče od katode (-) proti anodi (+). Prvi dve fazi sta namenjeni temu, da iz gela izstopijo ioni. Po IEF smo IPG trakove shranili na -80 °C do nadaljnje analize.

3.3.6.2 II. dimenzija

Ločevanje proteinov v II. dimenziji poteka glede na njihovo molekulsko maso (MW). V ta namen se uporablja poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom (SDS). Pri tej metodi se uporablja anionski detergent SDS, ki denaturira proteinske molekule, jih razvije in obda s svojimi molekulami. Molekule SDS imajo negativen naboj, zato tudi vsi proteini dobijo negativen naboj, velikost naboja pa je odvisna od velikosti proteina. V električnem polju bodo zato vsi proteini potovali proti anodi, hitrost potovanja pa bo obratnosorazmerna z njihovo velikostjo. Večje molekule potujejo počasneje zaradi večjega upora nosilca (zamreženost gela). Tako manjše molekule prepotujejo večjo razdaljo od katode do anode kot večje (Sepčič in sod., 1997).

- Vlivanje gelov za II. dimenzijo (SDS-PAGE)

Poliakrilamidni geli nastanejo s polimerizacijo monomera akrilamida v prisotnosti manjših količin bisakrilamida. Bisakrilamid sta pravzaprav dve molekuli akrilamida povezani z metilensko skupino, ki deluje kot povezovalni agens. Akrilamidni monomer polimerizira v dolge verige, v katere je občasno vgrajen bisakrilamid, ki predstavlja mesto za podaljševanje verige v novo smer. Na ta način nastane matrica precej dobro definirane strukture. Polimerizacija akrilamida je primer reakcije z radikalom. Začne se z dodatkom amonijevega persulfata (APS) in tetrametil etilen diamida (TEMED), saj TEMED katalizira razpad persulfatnega iona v radikal. Kisik zajem radikale, zato raztopino pred dodatkom APS in TEMED razplinimo (Wilson in Walker, 2000).

Sestavne dele kalupa smo najprej očistili s 96 % etanolom in brezprašnimi robčki, še posebno smo bili pozorni pri čiščenju steklenih plošč kalupa. Med stekleni plošči smo ob krajši stranici na levo in desno stran dali distančnika in vse skupaj vpeli v nosilca z vijaki. Nato smo kalup s posebnimi držali vpeli v nosilec. Med stekleni plošči smo s stekleno pipeto vlili 19 mL ločilnega gela (Preglednica 6). Na gel smo z drugo pipeto nanesli plast ddH₂O. Ta preprečuje stik s kisikom, kar omogoča enakomerno polimerizacijo in raven zgornji rob ločilnega gela. Gel pustimo čez noč da polimerizira. Ko je gel popolnoma polimeriziral, smo odlili vodo, in površino gela osušili s sušilnikom.

- Uravnoteženje IPG trakov

IPG trakove, ki smo jih po IEF shranili, smo vzeli iz zamrzovalnika in jih 4x sprali z 1x SDS elektroforeznim pufrom (Preglednica 7), s čemer smo s trakov odstranili mineralno olje. Trakove smo nato prenesli v epruvete z 10 mL pufra za uravnoteženje I in jih dali na stresalnik za 15 min. Iz pufra za uravnoteženje I smo prenesli trakove v epruvete s pufrom za uravnoteženje II in jih ponovno stresali na stresalniku 15 min. Trakove smo po uravnoteženju prenesli na filter papir.

- Prenos IPG traku na ločilni gel

Najprej smo na površino ločilnega gela nalili agarozno raztopino (Preglednica 8), ki smo jo pred uporabo segreli ($T=100\text{ }^{\circ}\text{C}$) in takoj čez spustili IPG trak, da se je usedel na površino ločilnega gela.

- SDS-PAGE

Ko se je agarozna raztopina strdila, smo na kalup z vrha pripeli zgornjo posodo za SDS-PAGE, in odpeli spodnji nosilec. Kalupa speta z zgornjo posodo smo postavili v spodnjo

posodo za SDS-PAGE. Obe posodi smo do oznak napolnili z 1x SDS elektroforeznim pufrom (Preglednica 10).

SDS-PAGE posodo smo pokrili s pokrovom in kable povezali z usmernikom, na katerem smo nastavili 2 fazi:

1. faza: 20 mA/gel; 15 min
2. faza: 40 mA/gel; dokler bromfenol modro ne doseže spodnjega roba gela (\sim 1 ura 35 min)

SDS-PAGE je potekala pri temperaturi 15 °C.

Po končani elektroforezi smo kalup z zgornjo posodo odstranili iz spodnje posode, razdrli kalup in gel vzeli iz stekel, odstranili IPG trak in agarozni gel, ter primerno označili ločilni gel (smiselno smo odrezali vogale).

3.3.7 Barvanje gelov

Gele smo barvali z barvilo SYPRO Ruby po postopku opisanem v preglednici 13. Barvilo SYPRO Ruby je sestavljeni iz rutenija kot del organskega kompleksa. S tem barvilo je omogočeno fluorescentno zaznavanje proteinov v poliakrilamidnih gelih. Barvilo zazna širok spekter proteinov, glikoproteine, proteine, ki se vežejo na Ca^{2+} ione, lipoproteine, fibrilarne proteine in ostale proteine, ki jih je z drugimi barvili težje obarvati, zelo pomembno pa je tudi to, da ne obarva nukleinskih kislin (Berggren in sod., 2000). Barvilo se ne veže kovalentno na proteine, ampak se v kislem pH veže na aminokisline v proteinih. Najmočnejše interakcije tvori z Lys, Arg in His ostanki, najšibkejše s Tyr in Trp (Steinberg in sod., 2000). Meja detekcije barvila je 1-2 ng proteina na 2-D elektroforezno liso, intenziteta fluorescence pa je linearno odvisna od količine proteina, kar nam omogoča približno kvantitativno ovrednotenje količine proteina v lisi (Görg in sod., 2000).

Preglednica 12: Protokol barvanja gelov z barvilo SYPRO Ruby

Zap. št.	Korak	Raztopina	Čas
1.	fiksacija	fiksacijska raztopina	2x 30 min
2.	barvanje	barvilo SYPRO Ruby	preko noči
3.	razbarvanje	raztopina za razbarvanje	2x 30 min
4.	izpiranje	ddH ₂ O	3x 5 min

Za barvanje enega gela smo uporabili 150 mL posamezne raztopine, za barvanje dveh gelov v isti posodi pa 250 mL. Gele smo barvali v plastičnih posodah na stresalni plošči. Fiksacija proteinov je namenjena preprečitvi difuzije proteinov iz gela, spiranju odvečnih ionov in SDS-a. Vse postopke barvanja razen fiksacije smo zaradi občutljivosti barvila na svetlobo izvajali v temi, posode z geli pa preventivno zaščitili z aluminijasto folijo. Pri koraku razbarvanje smo gele prenesli v novo posodo, da zmanjšamo obarvanost ozadja ter nespecifične signale.

3.3.8 Slikanje gelov

Slikanje gelov po izpiranju smo izvedli s sistemom za dokumentacijo gelov CAM-GX-CHEMI HR – kamera in pripadajočim računalniškim programom Syngene GENE SNAP.

Barvilo SYPRO Ruby ima eksitacijski maksimum pri valovnih dolžinah ~280 nm in ~450 nm, emisijsko valovno dolžino pri 610 nm. Uporabili smo eksitacijsko osvetlitev Transilluminator in emisijski filter FiltUV. Stalni parametri, ki smo jih izbrali za slikanje so bili zaslonka 1,2; povečava 12,5; fokus 114 in čas izpostavitev 100 ms.

3.3.9 Analiza slik gelov

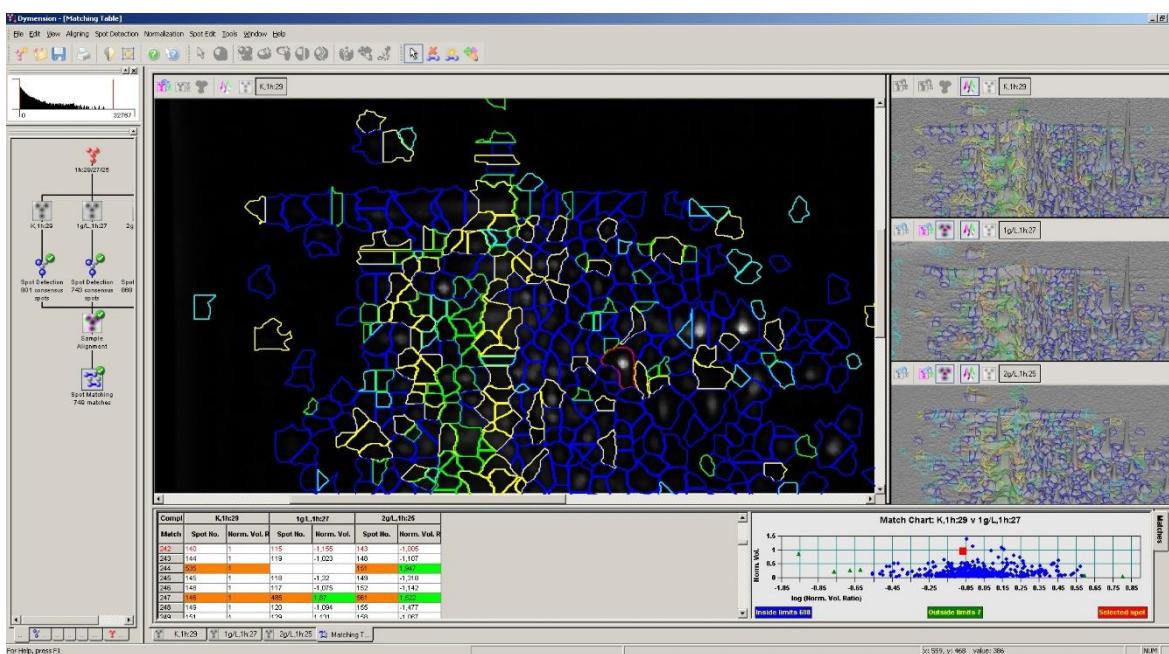
Analizo slik gelov smo izvedli v računalniškem programu 2-D Dymension (Syngene). Program omogoča medsebojno primerjavo več gelov, pri čemer en gel postavimo kot referenčni gel (v našem poskusu smo za referenčni gel uporabili gel kontrolnega vzorca brez dodanega eritromicina), s katerim nato program primerja gele tretiranih vzorcev.

Ko smo v program naložili gele, smo najprej določili območje detekcije elektroforetskih lis, to pomeni, da smo iz območja detekcije izvzeli robove gelov, ter s programom samodejno določili položaj posameznih 2-D lis. Program nato primerja 2-D lise posameznih gelov in samodejno poveže ujemajoče 2-D lise. V programu smo nastavili tudi parametre za diferencialno izražene proteine, ki jih nato program posebej označi. Nato smo ročno pregledali in preverili ujemanje posameznih 2-D lis, ki jih je program samodejno zaznal, na kontrolnem in ostalih gelih.

Podrobneje smo se lotili pregledovanja diferencialno izraženih proteinov, ki jih je glede na parametre označil program, rezultate pa nam poda v preglednici v R vrednostih, pri čemer R pomeni razmerje med normaliziranim volumnom (V_N) posamezne 2-D lise tretiranega vzorca in V_N ujemajoče 2-D lise kontrolnega vzorca. Pri pregledovanju in odločjanju o ustreznosti rezultatov programa smo si pomagali tudi s funkcijo tridimenzionalnega pogleda, ki jo omogoča program. V naši raziskavi smo določili, da je diferencialno izražanje značilno če je razmerje (R) med normaliziranim volumnom (V_N) posamezne 2-D lise tretiranega vzorca in V_N ujemajoče 2-D lise kontrolnega vzorca manjše od -1,5 ali večje od 1,5. Normaliziran volumen predstavlja razmerje med volumnom ene lise proti celokupnemu volumnu vseh lis na gelu (Enačba 1).

$$V_N [\%] = \frac{V}{\sum_{i=0}^n V_i}$$

... (1)



Slika 6: Primer obdelave elektroforetske lise (obkrožena z rdečo barvo) s programom 2-D Dymension.

Modro označene 2-D lise so tiste lise, ki glede na kontrolni vzorec niso diferencialno izražene. Program z rumeno barvo označi 2-D lise, ki imajo R manjši kot -1,5 in z zeleno tiste, ki imajo R večji kot 1,5. Z rdečo barvo pa program označi 2-D liso, ki jo trenutno pregledujemo. Program ima tudi možnost, da naložimo več različnih slik tako kontrolnih

3.3.10 Izrez proteinskih lis

Za izrez diferencialno izraženih 2-D lis smo najprej gel položili na ploščo z UV lučjo, nato pa s pipeto s primerno odrezanim nastavkom izrezali ustrezno liso. Za to delo je nujno potrebno zaščiti predvsem oči kot tudi čim več kože zaradi sevanja UV svetlobe.

3.3.11 Identifikacija

Identifikacija proteinov je bila opravljena z MS na University of York, York, Velika Britanija.

3.3.12 Podatkovne baze

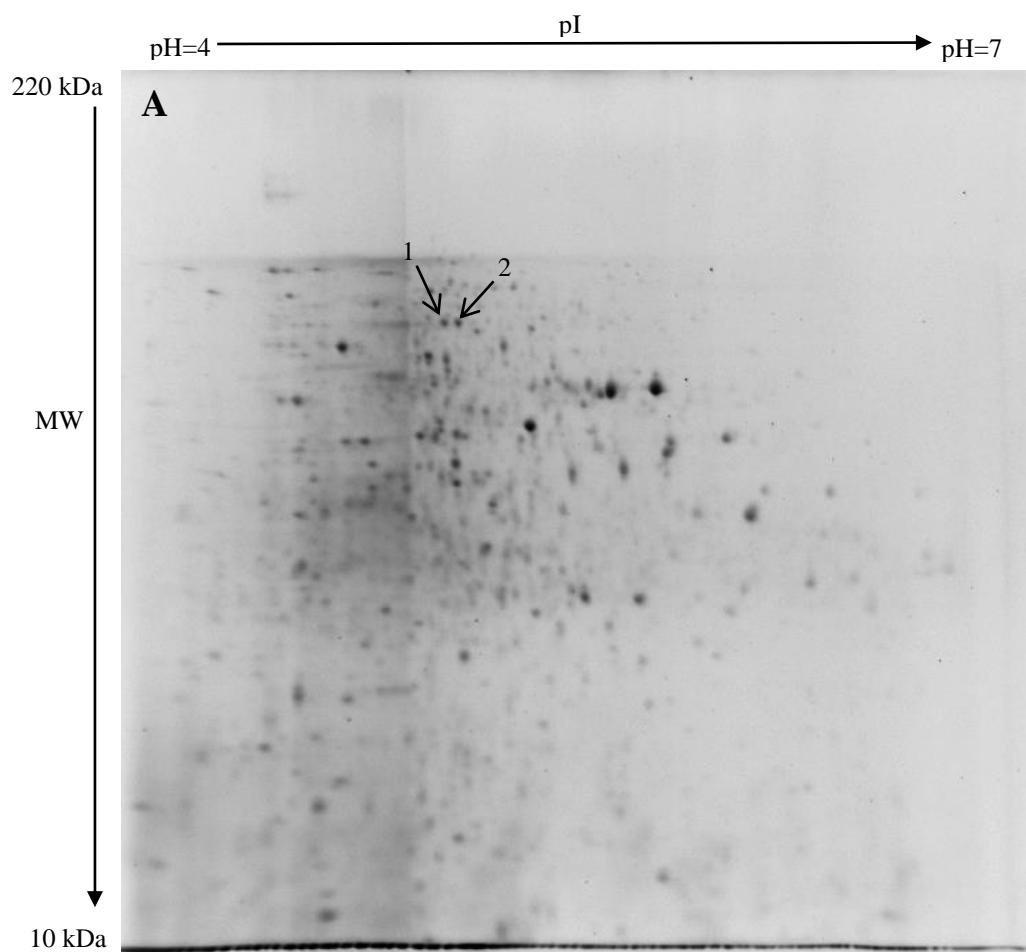
Podatke o identificiranem proteinu smo iskali po podatkovnih bazah NCBI, KEGG, UniProt, RCSB PDB, String.

4 REZULTATI

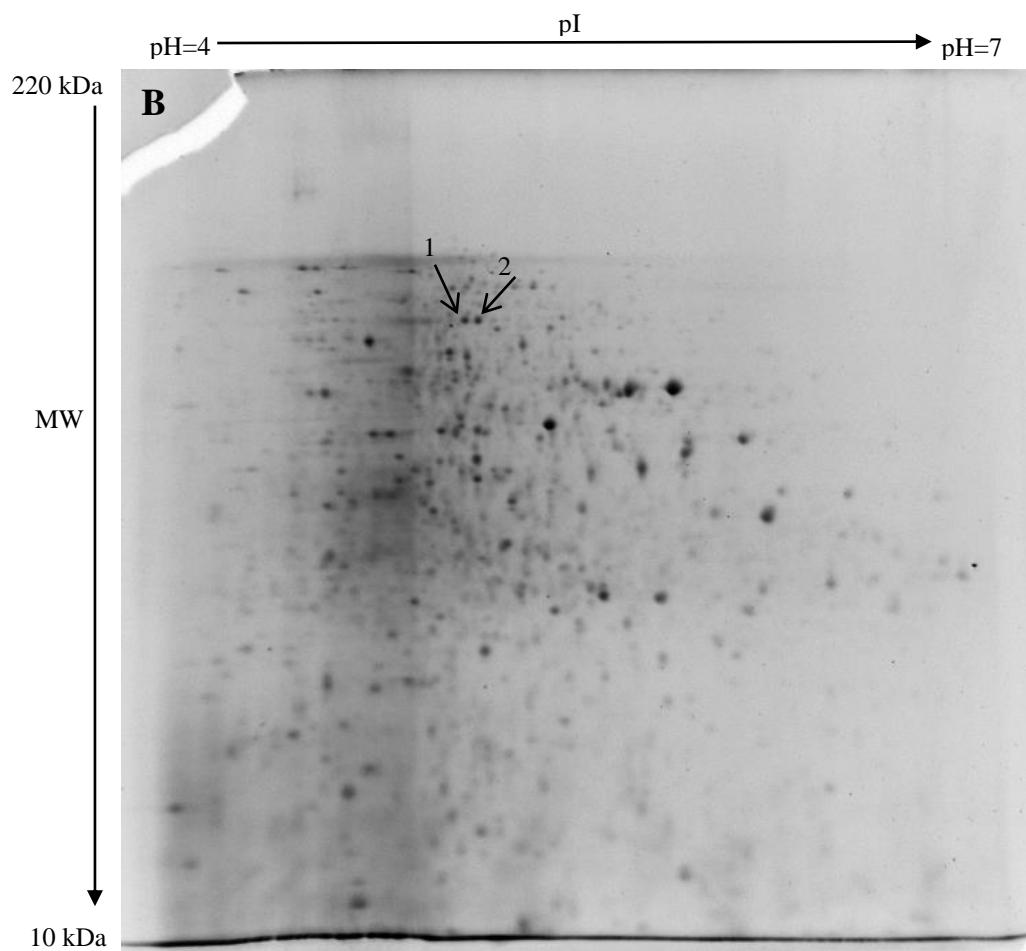
Celice bakterije *S. erythraea* smo izpostavili različnim koncentracijam eritromicina (1 in 2 g/L) v dveh bioloških ponovitvah in za vsako biološko ponovitev smo imeli še kontrolo, pri kateri v gojišče nismo dodali eritromicina. Vzorčili smo eno in dve uri po dodatku eritromicina. Za vsak vzorec smo izdelali proteinski profil z 2-DE. Proteinske profile smo analizirali z računalniškim programom 2-D Dymension. Za vsak čas vzorčenja smo primerjali proteinske profile tretiranih vzorcev (1 in 2 g/L) (Slika 8, 9) s proteinskim profilom kontrole (Slika 7). Primerjava proteinskih profilov s programom 2-D Dymension pri dvourni izpostavitvi ni bila možna zaradi težav pri ponovljivosti rezultatov.

4.1 PRIMERJAVA PROTEINSKIH PROFILOV CELIC BAKTERIJE *S. erythraea* BREZ IN PO 1-URNI IZPOSTAVITVI ERITROMICINU

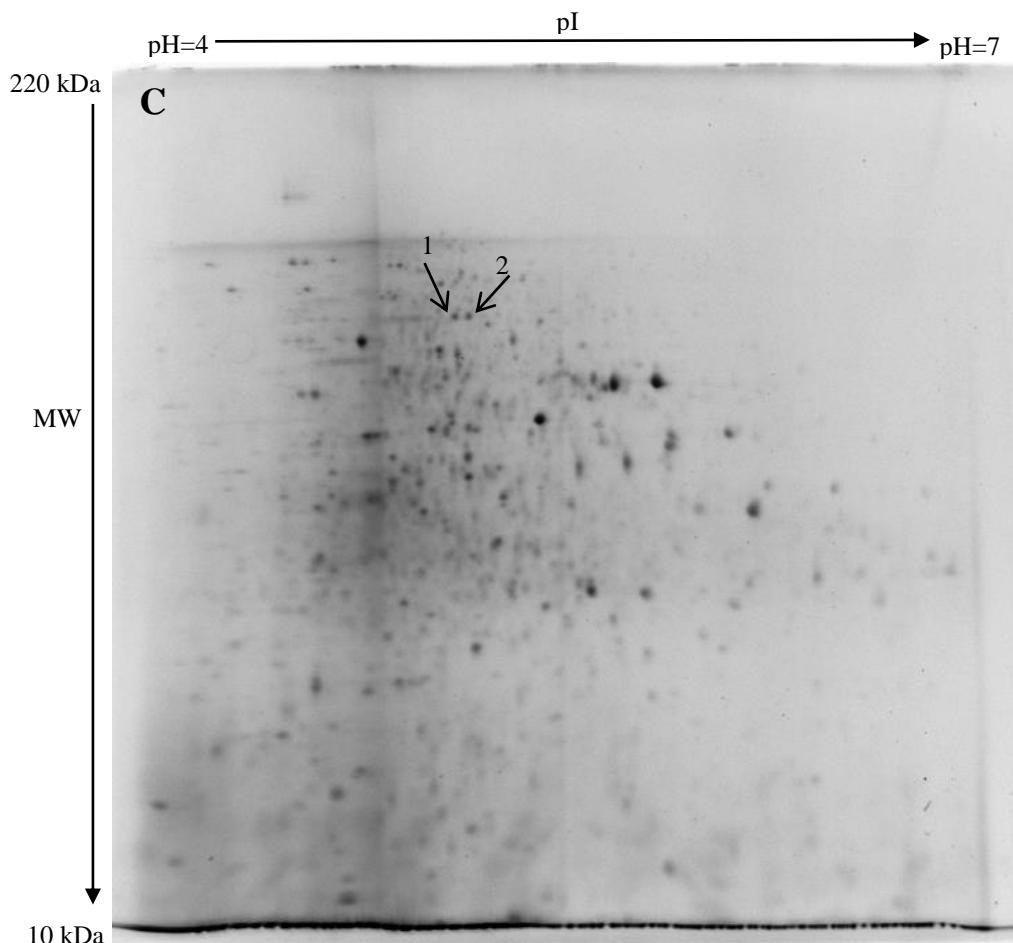
Po enourni izpostavitvi kulture bakterije *S. erythraea* različnim koncentracijam eritromicina (1 in 2 g/L), smo iz celic ekstrahirali skupne proteine. Po ekstrakciji smo proteine očistili z uporabo kompleta (»2-D Clean up kit«), nato pa smo jih ločili z 2-D elektroforezo v območju pI 4-7 in MW 10-220 kDa. Za pH gradient 4-7, v katerem smo ločevali proteine glede na pI, smo se odločili na podlagi že opravljenih proteomskeih analiz dotičnega organizma v Laboratoriju za proteomiko na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani.



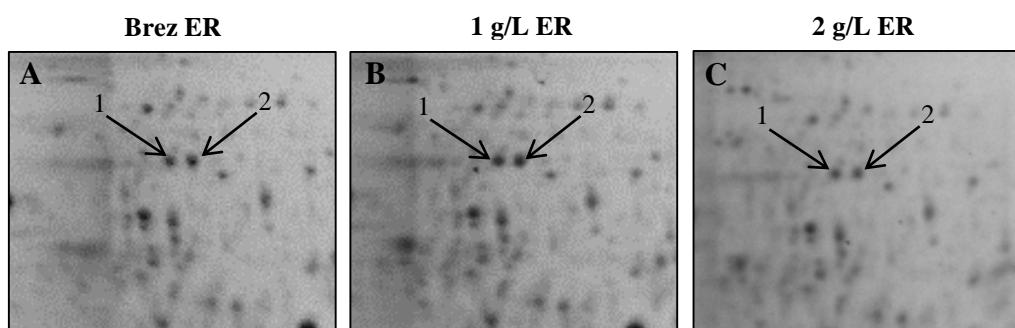
Slika 7: Proteinski profil celičnega ekstrakta bakterije *Saccharopolyspora erythraea* (A – kontrola).



Slika 8: Proteinski profil celičnega ekstrakta bakterije *Saccharopolyspora erythraea* po enournem tretiranju z eritromicinom (B – koncentracija eritromicina v brozgi: 1g/L).



Slika 9: Proteinski profil celičnega ekstrakta bakterije *Saccharopolyspora erythraea* po enournem tretiranju z eritromicinom (C – koncentracija eritromicina v brozgi: 2g/L).



Slika 10: Podrobnejši prikaz lokacije identificiranih lis (izrez slik 7, 8, 9)

Primerjava proteinskih profilov je pokazala eno diferencialno izraženo proteinsko liso (proteinska lisa št. 2), vendar smo se glede na 3-D sliko primerjave proteinskih profilov, ki je nakazovala povezavo med obema lisama, odločili tudi za identifikacijo proteinske lise št. 1.

Preglednica 13: Rezultati analize proteinskih profilov s programom 2-D Dymension.

št. 2-D lise	zvišanje (+)/znižanje (-) ravni proteina in R				identifikacija	
	Ponovitev 1		Ponovitev 2			
	1g/L ERY	2g/L ERY	1g/L ERY	2g/L ERY		
1	-1,388	1,046	-1,17	-1,373	glutamin sintetaza	
2	-1,403	-1,608	-1,111	-1,524	glutamin sintetaza	

Pri lisi 1 nismo opazili signifikantnih sprememb v ravni proteina, pri lisi 2 pa raven proteina pada z naraščajočo koncentracijo eritromicina.

4.2 IDENTIFIKACIJA PROTEINOV

Identifikacija proteinov je bila opravljena z MS na University of York, York, Velika Britanija. Preglednici 14 in 15 prikazujeta rezultate identifikacije proteinskih lis.

Preglednica 14: Rezultati identifikacije 2-D lise št. 1

2-D lisa 1	
Proteinski zadetek	gi 134098206 glutamine synthetase [<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338]
MASCOT »score« za najvišji, najbolj značilen zadetek	259
Število ujemajočih peptidov najvišjega zadetka	3
Masa (Mr)	53649 Da
pI (preračunana)	5,03
Sekvenca	<p>1 MFKNPDEVLR FISEEDVKFV DVRFCDLPGV MQHFTVPAAS FDQDAFTEGL 51 AFDGSSVRGF QSIHESDMILL LPDPYTARID PFRAEKTTLIL NFFVHDPTL 101 EPYSRDPRTNI ARKAEQYLAE SGIAADTAFFG AEAIFYIFDS VRFGEAANKS 151 FAEVDSIEGW WNTGRDEEGG NRGYKTRMKG GYFPVSPYDH FADLRDQMVO 201 QLIASGFTVE RAHHEVGTGG QAEINYKFNT MLHAADDLQL FKYIINKNTAW 251 QNGKTATFMP KPLLGDNGSG MHAHQSLWQD GNPLFHDESG YAGLSDTARY 301 YIGGILHHAP SLLAFTNPTV NSYHRLVPGF EAPVNLVYSQ RNRSACMRIP 351 ITGSNPKAKR VEFRCPDPSG NPYLAFAAAML MAGLDGIKNK MEPAEPIDKD 401 LYELPPEEAK NVPQVPDSL A KVIDRLETDH DYLLEGGVFT EDLIETWINL 451 KRENEIDPIR LRPHPHEFAL YFDV</p>

Preglednica 15: Rezultati identifikacije 2-D lise št. 2

2-D lisa 2	
Proteinski zadelek	gi 134098206 glutamine synthetase [<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338]
MASCOT »score« za najvišji, najbolj značilen zadelek	256
Število ujemajočih peptidov najvišjega zadetka	3
Masa (Mr)	53649 Da
pI (preračunana)	5,03
Sekvenca	<p>1 MFKNPDEVLR FISEEDVKFV DVFCDLPGV MQHFTVPAAS FDQDAFTEGL 51 AFDGSSVRGF QSIHESDMLL LPDPYTARID PFRRAEKTLL NFFVHDPTL 101 EPYSRDPRNI ARKAEQYLAE SGIAADTAFFG AEEAFYIFDS VRFGEAANKS 151 FAEVDSIEGW WNTGRDEEGG NRGYKTRMKG GYFPVSPYDH FADLRDQMV</p> <p>201 QLIASGFTVE RAHHEVGTGG QAEINYKFNT MLHAADDLQL FYKIIKNTAW 251 QNGKTATFMP KPLLGDNGSG MHAHQSLWQD GNPLFHDESG YAGLSDTARY 301 YIGGILHHAP SLLAFTNPTV NSYHRLPGF EAPVNLVYSQ RNRSACMRIP 351 ITGSNPKAKR VEFRCPDPSG NPYLAFAAAML MAGLDGIKNK MEPAEPIDKD 401 LYELPPEEAK NVQVPDSL A KVIDRLETDH DYLLEGGVFT EDLIETWINL 451 KRENEIDPIR LRPHPHEFAL YFDV</p>

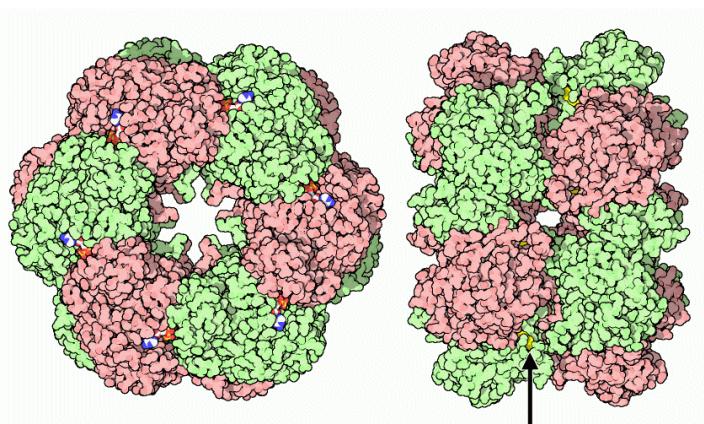
4.3 BIOINFORMACIJSKA OBDELAVA PODATKOV

Glede na rezultate identifikacije proteinov iz izrezanih proteinskih lis, smo podrobno analizirali identificiran protein, ki se nahaja na mestih 1 in 2 na gelu (Slika 10). Z iskanjem podatkov po podatkovnih bazah (NCBI, KEGG, UniProt, RCSB PDB, String) smo prišli do sledečih informacij o identificiranem proteinu.

4.3.1 Glutamin sintetaza

4.3.1.1 Osnovni podatki o identificiranem proteinu

Glutamin sintetaza je encim, sestavljen iz 474 aminokislin, in se nahaja v citoplazmi. Je oligomer, zgrajen iz 12 podenot, ki so postavljene skupaj v obliki dveh heksagonov. Osnovna molekularna funkcija encima je ligaza, ki katalizira reakcijo $\text{ATP} + \text{L-glutamat} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{ADP} + \text{fosfat} + \text{L-glutamin}$ (Eisenberg in sod., 2000).



Slika 11: Tro-dimenzionalni prikaz proteina glutamin sintetaza (prikaz z vrha - levo; prikaz od strani - desno; puščica prikazuje eno od aktivnih mest) (Goodsell, 2002)

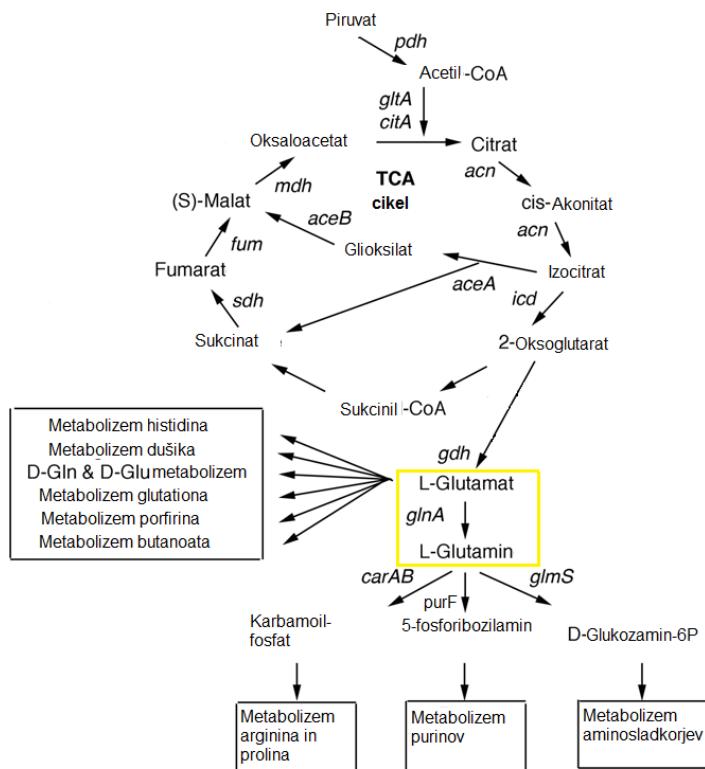
4.3.1.2 Funkcija proteina

Funkcija proteina glutamin sintetaza je asimilacija dušika. Tako rekoč v vseh celicah sta glutamat in glutamin glavna donorja dušika za biosintezne reakcije. Obstajata dve glavni biosintezi poti, ki omogočata vključevanje dušika v glutamat in glutamin. Glavna biosinteza pot je pot glutamin sintetaza/glutamat sintetaza, ki je splošno razširjena pri bakterijah. Glutamin sintetaza spremeni glutamat in amonij v glutamin, glutamat sintetaza pa prenese amidno skupino glutamina do 2-ketoglutarata, pri čemer nastaneta dve molekuli glutamata (Merrick in Edwards, 1995).

Glutamin sintetaza sodeluje v več metabolnih poteh (KEGG, 2013):

- Metabolizem alanina, aspartata in glutamata
- Metabolizem arginina in prolina

- Glioksilatni in dikarboksilatni metabolizem
- Metabolizem dušika
- Mikrobeni metabolizem v različnih okoljih
- Biosinteza aminokislin

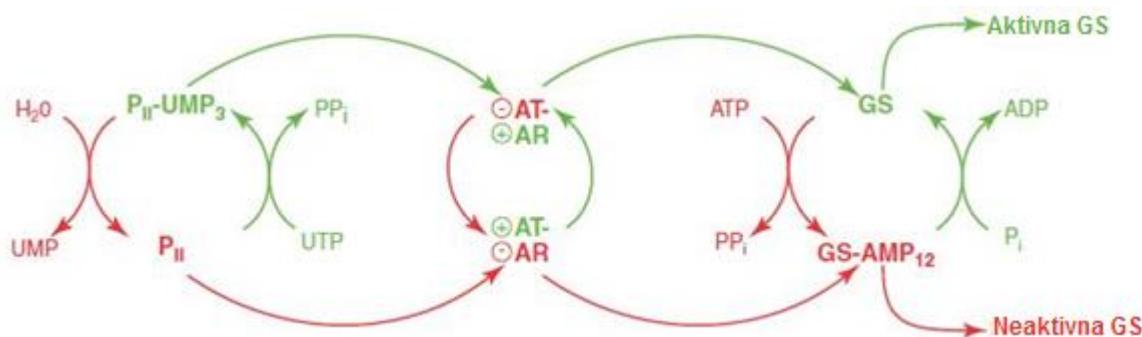


Slika 12: Pregled dela metabolnih poti in povezave encima glutamin sintetaza (rumen okvir) v metabolizmu
 (Peano in sod., 2012:16)

4.3.1.3 Regulacija delovanja

Aktivnost glutamin sintetaze je uravnavana preko številnih inhibitorjev in aktivatorjev. Eden najpomembnejših načinov v tem kompleksnem mehanizmu regulacije vključuje kovalentno vezavo AMP, ki jo adenilil transferaza prenese na tirozinski ostanek. Glutamin sintetaza je v adenililirani obliki manj aktivna kot v neadelilirani. Stopnja inhibicije je odvisna od števila adenililiranih podenot oligomera (dodekamer). Aktivnost adenilil transferaze je sama po sebi aktivirana z glutaminom, kar vodi do inhibicije glutamin sintetaze. Adenilil transferaza pa je inhibirana z α -ketoglutaratom, ki je prekursor glutamata. Adenilil transferaza ima tudi deadenilacijsko aktivnost ki pa se nahaja na drugi domeni kot adenililacijska aktivnost. Deadenilacijska aktivnost poteka preko fosfopiroilize, to je cepitve vezi med AMP in tirozinom z napadi anorganskega fosfata na AMP fosfat, in nastajanje ADP (Itzen in sod., 2011).

Zanimiva je še ena stopnja regulacije, ki je zagotovljena z dodatnim modulatorjem aktivnosti glutamin sintetaze, proteinom imenovanim P_{II} . Ta obstaja v dveh oblikah. Ena oblika aktivira adenilil transferazno aktivnost, druga pa aktivira deadenililazno aktivnost. Razlika med tem dvema oblikama P_{II} je v prisotnosti ali odsotnosti kovalentno vezanega UMP. UMP oblika P_{II} aktivira deadenillilacijo, oblika P_{II} brez UMP pa aktivira adenillilacijo glutamin sintetaze preko interakcije z adenilil transferazo. Pretvorba med obema oblikama je katalizirana z uridilil transferazo, ki je analog adenilil transferaze, ki ima tudi deuridililazno aktivnost. V tem primeru je denukleotidilazna reakcija fosfodiesterazna aktivnost in ne fosforolitična kot pri adenilil transferazi. Glutamin stimulira deuridililazno aktivnost pri uridilil transferazi, za razliko od stimulacije adenililazne aktivnosti pri adenilil transferazi, α -ketoglutarat pa stimulira uridililacijo. Logika dvojnega mehanizma uravnavanja aktivnosti glutamin sintetaze se nahaja v tem, da se lahko encim odzove in prilagodi glede na relativne koncentracije glutamina, α -ketoglutarata, ATP, UTP in anorganskega fosfata (Itzen in sod., 2011).



Slika 13: Shematični prikaz regulacije encima glutamin sintetaza (Itzen in sod., 2011: 223).

Legenda:

AT – adenilil transferaza
 AR – adenilil removase
 GS – glutamin sintetaza

4.3.1.4 Razporeditev genov operona

Genski zapis za encim glutamin sintetazo pri bakteriji *Saccharopolyspora erythraea* je dolg 1425 bp (NCBI, 2013).



Slika 14: Prikaz lokacije gena (SACE_1623) za glutamin sintetazo (NCBI, 2013)

Legenda:

SACE_1623 – glutamin sintetaza [*Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338]
 SACE_1620 – aciltransferaza
 SACE_1622 – družina IclR transkripcijskih regulatorjev
 SACE_1624 – hipotetični protein

SACE_1625 – hipotetični protein

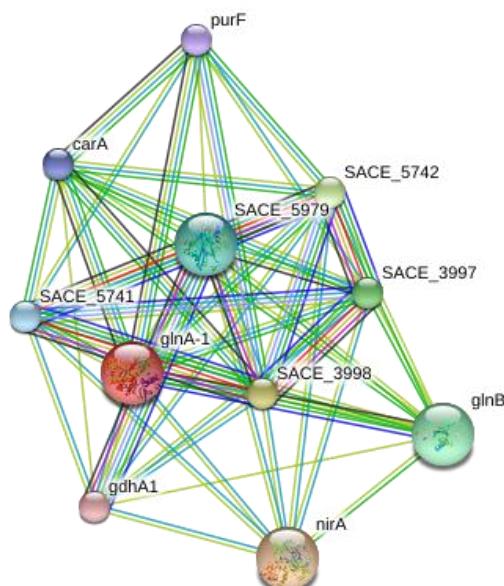
4.3.1.5 Interakcije encima glutamin sintetaza

Za določanje funkcije proteina in njegovo vlogo v celici veliko vlogo igrajo tudi interakcije proteina z ostalimi proteini in ali nukleinskimi kislinami. Za prikaz interakcij glutamin sintetaze (GlnA-1) smo uporabili spletno orodje STRING, spletno podatkovno bazo znanih in predvidenih proteinskih interakcij.

Spletno orodje STRING je za naš protein izpisalo in izrisalo (Slika 15) interakcije s proteini, navedenimi v Preglednici 16.

Preglednica 16: Seznam proteinov pridobljenih iz orodja STRING

Oznaka na sliki x	Oznaka proteina	Celotno ime proteina (velikost proteina)
■	GlnA-1	glutamin sintetaza (474 aa) (<i>Saccharopolyspora erythraea</i>) (naš vnos)
■	NirA	ferredoksin-nitrit reduktaza (570 aa)
■	SACE_3998	domnevna glutamat sintaza (NADPH) velika podenota (1517 aa)
■	SACE_5742	domnevna glutamat sintaza (NADPH) velika podenota (1516 aa)
■	SACE_3997	glutamat sintaza, NADH/NADPH, mala podenota 1 (483 aa)
■	GlnB	dušik regulirajoči protein PII (112 aa)
■	SACE_5979	glutamat dehidrogenaza (446 aa)
■	SACE_5741	glutamat sintaza, NADH/NADPH, mala podenota 1 (500 aa)
■	CarA	karbamoil-fosfat sintaza, mala podenota (373 aa)
■	PurF	amidoftosforiboziltransferaza (538 aa)
■	GdhA1	glutamat dehidrogenaza (NAD(P)+) (387 aa)



Slika 15: Shematski prikaz interakcij proteinov z glutamin sintetazo

5 RAZPRAVA

V nalogi smo s proteomskim pristopom želeli preučiti in določiti proteine, ki sodelujejo pri rezistenci bakterije *Saccharopolyspora erythraea* na eritromicin. S proteomsko analizo lahko vidimo, kateri proteini so v nekem trenutku v celici prisotni. Prav zaradi tega smo se odločili za proteomsko analizo. Komel in sod. (2008) so mnenja, da so proteini »resnični igralci« življenja, saj ti izgrajujejo celične in izvencelične strukture in so nosilci celičnih funkcij. Zato tudi menijo, da je ravno proteom pravi izraz fiziologije celice v njenih fizioloških oziroma patofizioloških razmerah, saj pomeni trenutno (v trenutnih razmerah) celokupno vsebnost vseh vrst proteinov v celici. Proteomika pa je veda, ki se ukvarja z obsežnimi raziskavami zgradbe in funkcije posameznih proteinov proteoma ter njihove medsebojne (strukturne in funkcijalne) povezanosti. Genomika preučuje celoten genom in vključuje določanje njegovega nukleotidnega zaporedja in vseh razlik (polimorfizmov, mutacij) ter njihovih interakcij (med lokusi oziroma aleli), ki vplivajo na izražanje posameznih genov (Komel in sod., 2008). Transkriptomika se posveča raziskavam sistemskega, globalnega izražanja genov. Celični transkriptom je količinska navzočnost vseh vrst izrazov genov (vseh vrst RNA, predvsem mRNA) v danih celičnih fizioloških razmerah. Kaže nam, kateri geni in s kakšno močjo se v teh razmerah izražajo. Na ravni transkriptoma je že mogoče sklepati o odzivanju sistema na zunanje in notranje spremembe. Glavni pomislek proti vsesplošni uporabi transkriptomike zaenkrat leži v prepričanju, da različno izražanje genov ne prinaša nujno tudi razlik v zastopanosti (vseh) celičnih proteinov (Komel in sod., 2008). Nivo izražanja mRNA pogosto ne ustreza dejanski količini proteina v celici. Razlike nastanejo zaradi regulacije na nivoju translacije in zaradi proteolitske razgradnje proteina. Poleg tega na končno funkcionalnost proteina vplivajo tudi post-translacijske modifikacije, kot so glikozilacija, fosforilacija, proteolitsko procesiranje in številne druge. Post-translacijskih procesov na nivoju mRNA ni mogoče zaznati. Proteomika pa nam omogoča spremeljanje sprememb v celici na ravni proteinov, kar nam poda dosti bolj natančno informacijo o fiziološkem stanju v celici (Fonovič, 2008).

Naš eksperimentalni pristop, ki se nanaša na študij odpornosti bakterije *Saccharopolyspora erythraea* na eritromicin, smo zasnovali tako, da smo po 48 urah kultivacije visoko donosnega industrijskega seva ABE 1441 v produkcijskem gojišču ABPM8 dodali relativno visoko koncentracijo eritromicina, da je bila koncentracija v brozgi 1 g/L oziroma 2 g/L, nato pa vzorčili eno in dve uri po dodatku eritromicina, za tem pa izvedli analizo proteoma z 2-D elektroforezo. Potrebno je poudariti, da smo eritromicin dodali v obliki prahu in ne v obliki raztopine, saj je eritromicin v vodi zelo slabo topen. Maksimalna topnost eritromicina v vodi je 2 g/L, tako da, če bi eritromicin dodali v obliki raztopine, bi preveč razredčili gojišče in s tem spremenili pogoje kultivacije. Za najbolj optimalen poskus bi bilo najboljše, da bi v gojišče dodali eritromicin v obliki raztopine, tako pa se je prah moral najprej raztopiti, kar seveda ni optimalno.

Analizo z 2-D elektroforezo pridobljenih proteinskih profilov smo izvedli v programu 2-D Dymension. Med sabo smo primerjali proteinske profile vzorca brez dodatka eritromicina (kontrola), vzorca z dodanim 1 g/L eritromicina in vzorca z 2 g/L eritromicina. Najprej smo med sabo primerjali povprečne proteinske profile bioloških ponovitev kontrole in tretiranih vzorcev. Med biološkima ponovitvama znotraj posameznega vzorca so bile opazne velike razlike v proteinskih profilih, tako da je program imel težave pri prekrivanju bioloških ponovitev. Težavo glede ponovljivosti smo imeli najverjetneje zaradi dodatka eritromicina v obliki prahu in ne v obliki raztopine, ki se je tako neenakomerno raztopil v gojišču. Tretiranje je bilo izvedeno v eksponentni fazi rasti, za to fazo pa je značilno, da se fiziološko stanje celic hitro spreminja. Zato smo izvedli analizo za vsako posamezno biološko ponovitev kontrolnega in tretiranih kultur, označili diferencialno izražene proteine in jih primerjali z označenimi proteinimi druge biološke ponovitve. S to analizo smo določili dve 2-D lisi, ki smo ju izrezali iz gela in identificirali.

Rezultati identifikacije so pri obeh proteinskih lisah pokazali, da gre za isti protein – glutamin sintetazo. Protein je prisoten na mestih lis 1 in 2 že pri kontroli, nato pa se z zvišanjem koncentracije eritromicina na 1 in 2 g/L njegova raven v lisi 2 začne, glede na kontrolo, zniževati. Pri lisi 1 nismo opazili signifikantnih sprememb v ravni v odvisnosti od koncentracije eritromicina (Preglednica 13).

Glede na rezultate primerjave tretiranih vzorcev s kontrolo lahko sklepamo, da koncentracija eritromicina v brozgi 1 g/L še ne sproži stresnega odgovora, pri koncentraciji 2g/L pa se že pojavijo značilne razlike glede na kontrolo. Na tem mestu se lahko postavi tudi vprašanje, ali je tudi koncentracija 2 g/L sploh dovolj visoka, da bi lahko pri bakteriji sprožila odziv, ki ga je mogoče pričakovati pri realnih koncentracijah, ki jih sev proizvaja. Višje koncentracije v brozgi pa ni bilo mogoče doseči zaradi omejene topnosti čistega eritromicina v obliki prahu. Možnosti zaradi katerih je prišlo do tega rezultata je več. Predvsem je tu zanimivo vprašanje, zakaj se ta protein nahaja na dveh mestih na gelu, tako blizu skupaj.

Bender in Streicher (1979) sta z uporabo poliakrilamidne gelske elektroforeze določevala regulacijo in stopnjo adenililacije glutamin sintetaze. Pri tem sta ugotovila, da ima adenililirana oblika glutamin sintetaze manjšo mobilnost na gelu kot neadenililirana oblika (velikost adenililiranega encima je za 350 Da večja od deadenililiranega). Kar pomeni, da bi se na proteinskem profilu lahko nahajala še kakšna lisa z glutamin sintetazo, ki pa je nismo detektirali v okviru diferencialno izraženih proteinov.

Proces prenosa AMP lahko pravilno opišemo z besedo adenililacija (ali bolj z bolj splošno besedo nukleotidililacija), kar pomeni prenos adenililne ali nukleotidililne skupine. Ko je govora o prehodni adenililaciji, pojavi pogosto imenujejo adenilacija, vendar to poimenovanje ni točno. Tako poimenovanje bi se nanašalo na prenos radikalna adenila, ki ga dobimo iz adenina. Skupina, ki se prenaša pri adenililaciji prihaja iz AMP in jo imenujemo

adenilil skupina. Izraz AMPilacija je bil uporabljen v nekaterih publikacijah, ki opisujejo reakcije adenililacije, ki vodijo do stabilne modifikacije. Vendar pa mehanično ni nobene podlage za odmik od originalnega poimenovanja v naštetih primerih (Itzen in sod., 2011).

Vloga adenililacije še ni popolnoma razumljena in postavlja mnogo vprašanj o naravi in raznolikosti te post-translacijske modifikacije. Prva in najpomembnejša vloga adenililacije je endogena evkariotska signalizacija. Glavna domenska organizacija nekaterih evkariotskih Fic proteinov nakazuje na lokalizacijo v membrani in vlogo v metabolizmu ali stresnem odzivu. Kot drugo pa so z bioinformacijskimi študijami dokazali obstoj Fic domen v bakterijah v obliki gospodinjskih (ang. housekeeping) genov. Ime domene Fic izhaja iz genetskega opazovanja (filamentacija inducirana s cAMP), pri čemer se je morfologija celic, ki ji manjka Fic protein, spremnila v prisotnosti cAMP. Razumevanje vloge Fic domen v bakterijskih gostiteljih bo zagotovilo dragocen vpogled v proteine, ki vsebujejo Fic domeno. Nedvomno pa bo za razumevanje regulatornega cikla te posttranslacijske modifikacije pomembno razumeti tudi vlogo deadenililaz. To nedvomno velja za adenilil transferaze, pri katerih ima N-terminalna domena adenilil transferaze deadenilacijsko funkcijo in je tesno vključena v regulacijo metabolnega sistema (Woolery in sod., 2010).

Večina celičnih procesov za svoje delovanje potrebuje energijo, ki nastaja (direktno ali indirektno) s hidrolizo ATP do ADP in fosfata (ali redkeje do AMP in pirofosfata). Heterotrofni organizmi pridobijo energijo s katabolizmom oziroma oksidacijo reduciranih ogljikovih spojin organskega izvora (glukoza) (Hardie, 2011). Adenililacijski sistem (Slika 12) s kovalentno vezavo AMP na vsako izmed podenot glutamin sintetaze reverzibilno inaktivira aktivnost tega encima (Bender in Streicher, 1979). Za adenililacijo in ustavitev delovanja glutamin sintetaze organizem porabi več energije (od ATP se odcepi pirofosfat PP_i), pri deadenililaciji pa se AMP odcepi od encima in poveže s fosfatom (P_i), da nastane ADP, ki je energetsko šibkejši od ATP (Stadtman, 2001). Iz tega lahko sklepamo, da se ustvari deficit energije, ki ga v primeru stresa celica ne more pravočasno nadomestiti. Predvidevamo, da se količina tega proteina v celici verjetno znižuje ravno zaradi tega, da celica prepreči omenjen deficit energije.

Glede na to, da sta obe lisi proteina glutamin sintetaza na gelu v enaki višini (proteinski lisi sta se ločili kot proteina z enako molekulsko maso), sklepamo, da ima del molekul proteina spremenjeno izoelektrično točko. Razlog za to je lahko post-translacijska modifikacija proteina, ki ne vpliva na molekulsko maso. V signalne poti celic od membrane proti jedru je vključenih veliko število proteinskih modifikacij kot odgovor na različne dražljaje iz okolice. Organizacija in reorganizacija različnih kombinacij modularnih domen v različnih signalnih proteinih omogoča ustvarjanje kompleksnih signalnih mrež in poti. Poleg opravljanja katalitične funkcije, signalni proteini spremenjeni s fosforilacijo, miristoilacijo, farnezilacijo, oksidacijo cisteinov, ubikvitinilacijo, acetilacijo, metilacijo ali nitrozilacijo ali ostalimi post-translacijskimi modifikacijami, služijo kot ogrodje za sestavljanje

večproteinskih signalnih kompleksov kot adapterji, transkripcijski faktorji in regulatorji signalnih poti. Kakorkoli, veliko proteinskih modifikacij v različnih signalnih poteh uravnavajo različne biološke odzive s spremenjanjem proteinske aktivnosti, lokalizacije in vezavnih partnerjev (Seo in Lee, 2004). Na podlagi pridobljenih rezultatov smo našo hipotezo 1 lahko deloma potrdili.

Domnevamo, da glutamin sintetaza, glede na to, da je eden ključnih encimov vpletен v metabolizmu dušika, lahko posredno sodeluje pri rezistenci bakterije *Saccharopolyspora erythraea* na eritromicin. Vendar se pri tem še vedno lahko vprašamo, ali je pri vsakem proteinu mogoča le osnovna (glavna) funkcija, ali se lahko ta s posttranslacijskimi modifikacijami proteina spremeni in tako dobi vlogo tudi v kakšnem drugem procesu v celici. Cash in sod. (1999) poročajo o primerjalni proteomske analizi med odpornim in neodpornim sevom bakterije *Streptococcus pneumoniae* na eritromicin, kjer so določili tri proteine z enako molekulsko maso, vendar različno izoelektrično točko. Ugotovili so, da gre za protein gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenazo, ki ga v vseh treh oblikah proizvaja samo na eritromicin odporen sev *S. pneumoniae*. Pri sevu, ki je občutljiv na eritromicin se protein pojavi samo na dveh mestih na gelu. Zanimiva je sama zasnova poskusa, ki so jo izvedli Cash in sod. (1999), saj so za razliko od naše raziskave, med sabo primerjali dva različna seva (sev odporen na eritromicin in sev neodporen na eritromicin). Iz tega vidika bi bila zanimiva primerjava seva bakterije *S. erythraea*, ki ne proizvaja eritromicina, oziroma nima genske skupine za eritromicin, in visoko donosnega produkcijskega seva. Predvidevamo, da sev, ki eritromicina ne proizvaja, tudi nima prisotnih proteinov, ki so povezani z odpornostjo na eritromicin, oziroma jih organizem ne sintetizira zaradi energetskega vidika. Oliynyk in sod. (2007) poročajo o genskem zapisu za eritromicinsko esterazo (SACE_0712), ki leži znotraj genskega gnezda za biosintezo eritromicina. To pa pomeni, da s tem, ko bi ustvarili sev brez genske skupine za sintezo eritromicina, odstranili tudi to esterazo (SACE_0712), ki sodeluje pri rezistenci na eritromicin. Tako bi mogoče iz primerjave proteinskih profilov verjetno odkrili več proteinov, ki omogočajo bakteriji *S. erythraea* odpornost na eritromicin. Verjetno bi bil smiseln eksperiment kjer bi izvedli enak poskus, kot smo ga opravili v našem delu, le da bi visoko donosni produkcijski sev zamenjali s sevom, ki eritromicina ne proizvaja (ima odstranjeno gensko gručo za sintezo eritromicina) in mu dodali različne koncentracije eritromicina in preverjali odgovor na proteinski ravni.

Med raziskovanjem in odkrivanjem vseh novih potencialnih možnosti, kako bi lahko delovanje glutamin sintetaze potencialno vplivalo na odpornost na antibiotik pri bakterijah, smo našli publikacijo raziskovalcev Harth in Horwitz (2003), ki sta preizkušala nov pristop v zdravljenju tuberkuloze. Z L-metionin-SR-sulfoksimin (MSO), ki je inhibitor glutamin sintetaze, sta tretirala morske prašičke, okužene z visoko virulentnim sevom bakterije *Mycobacterium tuberculosis* in preverjala odziv živali na tretiranje. Harth in Horwitz sta pokazala, da sta z inhibicijo glutamin sintetaze bakterije *M. tuberculosis* uspela zaščititi živali pred smrtjo, zmanjšala izgubo teže, ki je glavni stranski učinek bolezenskega stanja

tuberkuloze je izguba teže, in onemogočila nadaljnjo razvoj infekcije v pljučih in vranici živali, kar se je odrazilo v zmanjšani patogenosti in preživelosti *M. tuberculosis*. Glutamin sintetaza je zaradi svoje široke vloge v metabolizmu lahko tudi zanimiva tarča za nove pristope v zdravljenju bakterijskih obolenj oziroma razvoja novih antibiotikov.

6 SKLEPI

Na osnovi rezultatov naloge lahko zaključimo, da:

- koncentracija eritromicina v brozgi 1 g/L še ne sproži stresnega odgovora, medtem ko se le-ta inducira pri koncentraciji 2 g/L
- je v stresni odgovor vključen encim glutamin sintetaza, ki smo ga na 2-D gelu identificirali v dveh proteinskih lisah 1 in 2
- raven identificiranega proteina, ki se nahaja v lisi 2, pada z naraščajočo koncentracijo eritromicina

7 POVZETEK

Za temeljitejše razumevanje bakterijske odpornosti na antibiotike so proteomska orodja odličen vir informacij. Odziv bakterij, ki so izpostavljene antibiotiku, se odraži v spremembah energetskega metabolizma in metabolizma dušika, vpliv pa je razviden tudi v sintezi proteinov in nukleotidov. Dobra fiziološka učinkovitost industrijskih mikrobov je ključna za uspešnost bioprocesov. Zato je pomembno razumeti, kako celice zaznajo in se posledično prilagodijo spremembam v okolju, ter seveda kaj vpliva na te spremembe.

V okviru magistrskega dela smo z uporabo proteomskih orodij preučili odziv bakterije *S. erythraea* na povečane koncentracije eritromicina. Glede na to, da bakterija *S. erythraea* proizvaja eritromicin v visokih koncentracijah, lahko sklepamo, da ima tudi močne mehanizme rezistence na ta antibiotik.

Celice bakterije *S. erythraea* smo izpostavili različnim koncentracijam eritromicina (1g/L in 2g/L) v dveh bioloških ponovitvah in za vsako biološko ponovitev smo imeli še kontrolo brez dodatka eritromicina. Vzorčili smo eno in dve uri po dodatku eritromicina. Za vsak vzorec smo izdelali proteinski profil z 2-DE. Proteinske profile smo analizirali z računalniškim programom 2-D Dymension. Za vsak čas vzorčenja smo primerjali proteinske profile tretiranih vzorcev (1 in 2 g/L) s proteinskim profilom kontrole. S to primerjavo smo določili en diferencialno izražen protein, ki je na gelu obstajal v dveh elektroforetskih lisah (1, 2). Protein je bil prisoten na mestih lis 1 in 2 že pri kontroli, nato pa se je z zvišanjem koncentracije eritromicina njegova raven v lisi 2 začela, glede na kontrolo, zniževati. Pri lisi 1 nismo opazili signifikantnih sprememb v ravni v odvisnosti od koncentracije eritromicina. Rezultati identifikacije z masno spektrometrijo so pokazali, da se v obeh lisah nahaja protein glutamin sintetaza. Iz različnih podatkovnih baz smo nato pridobili informacije o lastnostih in funkciji identificiranega proteina in na podlagi tega skušali objasniti njegovo vlogo v bakterijskem stresnem odgovoru na eritromicin.

Glede na rezultate primerjave tretiranih vzorcev s kontrolo lahko sklepamo, da koncentracija eritromicina v brozgi 1 g/L še ne sproži stresnega odgovora, pri koncentraciji 2g/L pa se že pojavijo značilne razlike glede na kontrolo. Na tem mestu se lahko postavi tudi vprašanje, ali je tudi koncentracija 2 g/L sploh dovolj visoka, da bi lahko pri bakteriji sprožila odziv, ki ga je mogoče pričakovati pri realnih koncentracijah, ki jih sev proizvaja. Višje koncentracije v brozgi pa ni bilo mogoče doseči zaradi omejene topnosti čistega eritromicina. Tako smo hipotezo 1 lahko samo deloma potrdili.

8 VIRI

Angert E. R. 2005. Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 3: 214-224

Bender R.A., Streicher S.L. 1979. Glutamine synthetase regulation, adenylylation state, and strain specificity analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 137, 2: 1000-1007

Benveniste R., Davies J. (1973) Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibioticresistant bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70: 2276-2280

Berggren K., Chernokalskaya E., Steinberg T.H., Kemper C., Lopez M.F., Diwu Z., Haugland R.P., Patton W.F. 2000. Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two- dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis*, 21: 2509-2521

Cash P., Argo E., Ford L., Lawrie L., McKenzie H. 1999. A proteomic analysis of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Electrophoresis*, 20: 2259-2268

Cummings M., Breitling R., Takano E. 2014. Steps towards the synthetic biology of polyketide biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 351: 116-125

Cundliffe E., Demain A.L. 2010. Avoidance of suicide in antibiotic-producing microbes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37, 7: 643-672

Eisenberg D., Gill H.S., Pfluegl G.M.U., Rotstein S.H. 2000. Structure – function relationships of glutamine synthetases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477: 122-145

Fonovič M. 2008. Proteomika – veda ali tehnologija. V: Proteomika. Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 31. januar in 1. februar 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-9

Goodsell D. 2002. Molecule of the month: Glutamine synthetase. RCSB Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=30> (10. julij 2013)

Görg A., Obermeier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21: 1037-1053

- Hardie D.G. 2011. AMP-activated protein kinase – an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes and Development*, 25: 1895-1908
- Harth G., Horwitz M.A. 2003. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase as a novel antibiotic strategy against tuberculosis: demonstration of efficacy *in vivo*. *Infection and Immunity*, 71, 1: 456-464
- Hopwood D.A. 2007. How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? *Molecular Microbiology*, 63, 4: 937-940
- Itzen A., Blankenfeldt W., Goody R. S. 2011. Adenylylation: renaissance of a forgotten post-translational modification. *Trends in Biochemical Sciences*, 36, 4: 221-228
- KEGG. 2013. Kegg pathway. Kyoto, Kanehisa Laboratories: baza podatkov <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> (julij 2013)
- Kirm B., Magdevska V., Tome M., Horvat M., Karničar K., Petek M., Vidmar R., Baebler Š., Jamnik P., Fujs Š., Horvat J., Fonovič M., Turk B., Gruden K., Petković H., Kosec G. 2013. SACE_5599, a putative regulatory protein, is involved in morphological differentiation and erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea*. *Microbial Cell Factories*, 12, 126, doi:10.1186/1475-2859-12-126: 15 str.
- Komel R., Kastelic D., Kočevar N., Rajčević U. 2008. Proteomika v medicinskih raziskavah in diagnostiki. V: Proteomika. Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 31. januar in 1. februar 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-44
- Kuhstoss S., Huber M., Turner J.R., Paschal J.W., Rao R.N. 1996. Production of a novel polyketide through the construction of a hybrid polyketide synthase Gene, 183: 231-236
- Labeda D.P. 1987. Transfer of the type strain of *Streptomyces erythraeus* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1948 to the Genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975 as *Saccharopolyspora erythraea* sp. nov., and designation of a neotype strain for *Streptomyces erythraeus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31, 1: 19-22
- Lima B.T., Pinto M.F. S., Ribeiro S.M., Lima L.A., Viana J.C., Gomes J.N., Candido E.S., Diasand S.C., Franco O.L. 2013. Bacterial resistance mechanism: what proteomics can elucidate. *FASEB Journal*, 27, 4: 1291-1303

Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A., Clark D.P. 2012. Brock biology of microorganisms. 13th ed. San Francisco, Pearson Education: 1043 str.

Merrick M.J., Edwards R.A. 1995. Nitrogen control in bacteria. Microbiological Reviews, 59,4: 604-622

Minas W. 2005. Production of erythromycin with *Saccharopolyspora erythraea*. V: Methods in Biotechnology. Vol. 18. Barredo J. L. (ed.). Totowa, Humana Press: 65-89

Miyatake H., Taki F., Taniguchi H., Suzuki R., Takagi K., Satake T. 1991. Erythromycin reduces the severity of bronchial hyperresponsiveness in asthma. Chest Journal, 99: 670-673

NCBI. 2013. Gene. Bethesda, NCBI: National Center for Biotechnology Information: baza podatkov
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (julij 2013)

Nelson D.L., Cox M.M. 2004. Lehninger principles of biochemistry. 4th ed. New York, W. H. Freeman & Co.: 1136 str.

Nett M., Ikeda H., Moore B.S. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. Natural Product Reports, 26, 11: 1362–1384

Oliynyk M., Samborskyy M., Lester J.B., Mironenko T., Scott N., Dickens S., Haydock S.F., Leadlay P.F. 2007. Complete genome sequence of the erythromycinproducing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. Nature Biotechnology, 25: 447-453

Pacheco R., Correia S., Poeta P., Pinto L., Igrejas G. 2012. The role of proteomics in elucidating multiple antibiotic resistance in *Salmonella* and in novel antibacterial discovery. V: *Salmonella* - distribution, adaptation, control measures and molecular technologies. Bassam A.A., Gurtler J.B. (eds.). Rijeka, Intech: 187-220

Peano C., Talà A., Corti G., Pasanisi D., Durante M., Mita3 G., Bicciato S., De Bellis G., Alifano P. 2012. Comparative genomics and transcriptional profiles of *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 and a classically improved erythromycin over-producing strain. Microbial Cell Factories, 11, 32, doi:10.1186/1475-2859-11-32: 25 str.

Seo J., Lee K.-J. 2004. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 37, 1: 35-44

Sepčić K., Anderluh G., Turk T., Maček P. 1997. Biokemijski praktikum. Ljubljana,
Študentska založba: 182 str.

Stackelbrandt E., Schuman P. 2006. Introduction to the taxonomy of actinobacteria.
Prokaryotes, 3: 297-321

Stadtman E.R. 2001. The story of glutamine synthetase regulation. The Journal of Biological
Chemistry, 276, 48: 44357-44364

Stasyk T., Hellman U., Souchelnytskyi S. 2001. Optimizing sample preparation for 2-D
electrophoresis. Life Science News: Amersham Biosciences, 9: 1-4

Steinberg T.H., Chernokalskaya E., Berggren K., Lopez M.F., Diwu Z., Haugland R.P.,
Patton W.F. 2000. Ultrasensitive fluorescence protein detection in isoelectric focusing
gels using a ruthenium metal chelate stain. Electrophoresis, 21: 486-496

Tang L., McDaniel R. 2001. Construction of desosamine containing polyketide libraries
using a glycosyltransferase with broad substrate specificity. Chemistry and Biology, 8, 6:
547-555

Vester B., Douthwaite S. 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S
rRNA. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45: 1-12

Weisblum B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrobial
Agents and Chemotherapy, 39, 3: 577-585

Wiley P. F., Gerzon K., Flynn E.H., Sigal M.V. Jr., Weaver O., Quarck C.U., Chauvette
R.R., Monahan R. 1957. Erythromycin. X. structure of erythromycin. Journal of the
American Chemical Society, 79, 22: 6062–6070

Wilson K., Walker J. 2000. Principles and techniques of practical biochemistry. 5th ed.
Cambridge, University Press: 586-588

Woolery A.R., Luong P., Broberg C.A., Orth K. 2010. AMPylation: something old is new
again. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 1: 1-6

Yavari S., Rafieenia R. 2011. Effect of medium composition fermentation conditions on
erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea*. Clinical Biochemistry, 44,
13: 310-310

Zhang Y., Zhu Y., Zhu Y., Li Y. 2009. The importance of engineering physiological functionality into microbes. Trends in Biotechnology, 27, 12: 664-672

Zhi X.-Y., Li W.-J., Stackebrandt E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59: 589-608

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Poloni Jamnik za pomoč pri načrtovanju in uvajanju v laboratorijsko delo. Hvala tudi za pomoč, popravke in nasvete pri pripravi magistrskega dela in predstavitve. Hvala za ves čas in trud, ki ga je namenila temu in vse strokovne razprave, ki so mi omogočile tudi drugačen pogled na delo.

Zahvaljujem se tudi somentorju prof. dr. Hrvoju Petkoviću za strokoven ter temeljit pregled magistrskega dela.

Zahvala gre tudi Teji Zakrajšek, Katarini Karničar in Vasilki Magdevski za vso strokovno pomoč.

Zahvaljujem se podjetju Acies Bio d.o.o., ki mi je omogočilo delo na tem zanimivem projektu.

Zahvala gre tudi vsem zaposlenim v podjetju Acies Bio d.o.o., za pomoč in nasvete.

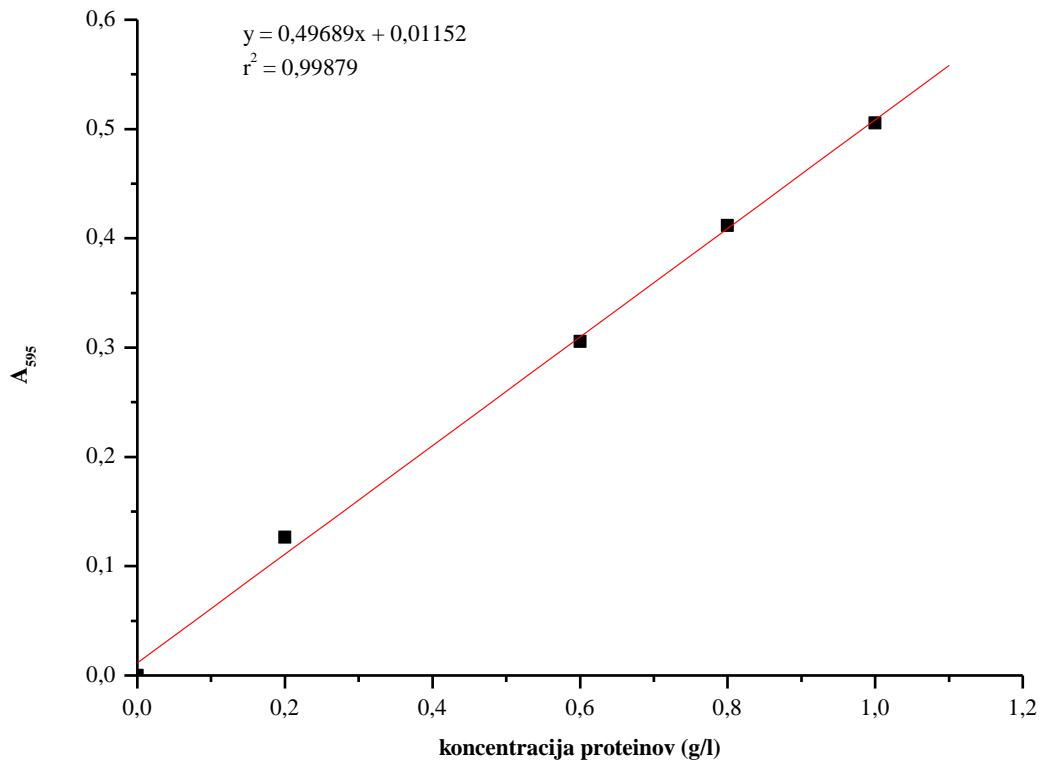
Zahvaljujem se tudi Domnu in Ivi za potrpežljivost, nasvete, kolegialnost in pomoč ves čas študija.

Hvala, Simona, da si mi vedno znova vlivala moči, da si bila potrpežljiva in me podpirala pri študiju.

In hvala družini, da ste me podpirali moralno in finančno in mi stali ob strani cel čas študija.

Hvala vsem!

PRILOGE



Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov (metoda po Bradfordu)