UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Miha ČRNIGOJ

MEHANIZMI STABILIZACIJE MOLEKULE DNA HIPERTERMOFILNE ARHEJE Aeropyrum pernix in vivo TER in vitro

Doktorska disertacija

STABILISATION MECHANISMS OF DNA MOLECULE FROM HYPERTHERMOPHILIC ARCHAEA Aeropyrum pernix in vivo AND in vitro

Dissertation Thesis

Ljubljana, 2008

Doktorsko delo je zaključek podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti. Delo je bilo opravljeno na Katedri za kemijo Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Del raziskav je potekal tudi na Katedri za biokemijo in Katedri za genetiko Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani; na odseku Biokemija, molekularna in strukturna biologija B1, Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani ter v laboratorijih Department of Food, Agricultural and Biological Engeneering na Ohio State University, Ohio, ZDA.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa senata Univerze z dne 29. 9. 2008 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehnoloških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja biotehnologije. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Natašo Poklar Ulrih.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Peter Raspor Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Član:	prof. dr. Roman Jerala Kemijski inštitut
Član:	prof. dr. Nataša Poklar Ulrih Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Miha Črnigoj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

- DK UDK 577.1/.3:579.25:582.233(043)=163.6
- KG Archaea/arheje/*Aeropyrum pernix*/hipertermofili/stabilizacija DNA/proteini Alba/ histoni/fluorescenčna barvila/UV-spektroskopija/fluorescenčna spektroskopija/CDspektroskopija/diferenčna dinamična kalorimetrija/
- AV ČRNIGOJ, Miha, univ. dipl. mikrobiol.
- SA POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biotehnologije
- LI 2008
- IN MEHANIZMI STABILIZACIJE MOLEKULE DNA HIPERTERMOFILNE ARHEJE *Aeropyrum pernix in vivo* TER in vitro
- TD Doktorska disertacija s področja biotehnologije
- OP XIV, 112 str., 14 pregl., 60 sl., 103 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Hipertermofilne arheje so prilagojene na preživetje v okoljih z zelo visokimi temperaturami. Ostri pogoji silijo organizme v prilagajanje svojih makromolekul na visoke temperature. V genomu arheje Aeropyrum pernix sta poznani dve zaporedji, ki nosita zapis za potencialna analoga evkariontskih histonov v arhejah (APE1823 in APE1832.1). Ta dva peptida smo izrazili v različnih sistemih za izražanje genov in ju okarakterizirali. Preučevali smo tudi medsebojno delovanje peptidov ter različnih molekul DNA pri različnih temperaturah. Raziskali smo vpliv koncentracije NaCl, govejih histonov ter proteinov Alba na termično stabilizacijo različnih molekul DNA. Karakterizacijo smo izvedli z UV-, fluorescenčno- in CDelektroforeznega zamika, spektroskopijo, metodo površinsko plazmonsko resonanco ter diferenčno dinamično kalorimetrijo. Proteini Alba termično stabilizirajo molekule DNA, vendar v manjši meri kot goveji histoni. Večja termična stabilnost DNA pri arheji A. pernix je najverjetneje dosežena s kombinacijo stabilizacije s proteini Alba ter ioni v citoplazmi. Vzajemen vpliv različnih fluorescenčnih barvil na molekule DNA ter na celice arheje A. pernix smo preučevali s kombinacijo kalorimetričnih, spektrofotometričnih ter mikroskopskih tehnik. Fluorescenčna barvila Hoechst 33258, DAPI in akridin oranž so DNA termično stabilizirala medtem ko je barvilo DiBAC4(3) DNA rahlo destabiliziralo. Lokalizacija fluorescenčnih barvil v celicah ter test živosti v celicah A. pernix smo preučevali z diferenčno dinamično kalorimetrijo in fluorescenčno mikroskopijo. Poleg komercialnega kompleta BacLightTM smo žive in mrtve celice arheje A. pernix najbolje ločili z barvanjem s kombinacijo barvil akridin oranž in $DiBAC_4(3)$.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dd

- DC UDC 577.1/.3:579.25:582.233(043)=163.6
- CX Archaea/*Aeropyrum pernix/*hyperthermophiles/DNA stabilisation/Alba proteins/ histones/fluorescent dyes/UV-spectroscopy/fluorescent spectroscopy/CDspectroscopy/differential scanning calorimetry/
- AU ČRNIGOJ, Miha
- AA POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor)
- pp SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences
- PY 2008
- TI STABILISATION MECHANISMS OF DNA MOLECULE FROM HYPERTHERMOPHILIC ARCHAEA Aeropyrum pernix in vivo AND in vitro
- DT Doctoral Dissertation
- NO XIV, 112 p., 14 tab., 60 fig., 103 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Hyperthermophilic Archaea are adapted to survive in environments with extremely high temperatures. These harsh conditions forced the organisms to evolve adaptations of macromolecules against high temperatures. Two sequences for potential histone counterpart peptides were found in Aeropyrum pernix genome (APE1823 and APE1832.1). These two peptides were expressed in different heterologous expression systems and characterised in its interactions with DNA molecules at different temperatures. We have studied dependance of thermal stability of different DNA molecules regarding to different concentrations of NaCl, bovine histones and Alba proteines. Characterization was made with UV-, fluorescent- and CD-spectroscopy, gel shift assay, surface plasmon resonance and differential scanning calorimetry. Alba proteins thermally stabilize DNA molecules, however in lesser part than bovine histones. Higher thermal stability of DNA in A. pernix cells is most likely accomplished with combination of stabilization with Alba proteins and ions present in the cell cytoplasm. Interactions of different fluorescent dyes with DNA molecules and whole A. pernix cells were investigated by the combination of calorimetric, spectrophotometric and microscopic techniques. Fluorescent dyes Hoechst 33258, DAPI and acridine orange have thermally stabilized DNA while DiBAC₄(3) slightly destabilized DNA. The localization of the dyes in the cells and viability assay was revealed by differential scanning calorimetry and fluorescence microscopy. Besides using comercally available kit BacLightTM, live and dead cells were best distinguished with combination of fluorescent dyes acridine orange and $DiBAC_4(3)$.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija	III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo slik	IX
	Kazalo preglednic	XII
	Kratice in okrajšave	XIII
1	UVOD	1
1.1	NAMEN DELA	2
1.2	DELOVNI HIPOTEZI	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	ARHEJE	3
2.2	Aeropyrum pernix K1	3
2.3	DNA-VEZAVNI PROTEINI	5
2.3.1	Histoni	6
2.3.2	Proteini Alba	8
2.3.2.1	Proteini Alba v arheji Aeropyrum pernix	11
2.4	FLUORESCENČNA BARVILA IN HIPERTERMOFILNE ARHEJE	13
3	MATERIALI in METODE	15
3.1	MATERIALI	15
3.1.1	Kemikalije	15
3.1.2	Raztopine	16
3.1.2.1	Raztopine za agarozno elektroforezo	16
3.1.2.2	Raztopine za elektroforezo NaDS-PAGE	17
3.1.2.3	Raztopine za nativno elektroforezo PAGE	17
3.1.2.4	Raztopine za izolacijo rekombinantnih proteinov	17
3.1.2.5	Raztopina za CD-spektroskopijo	18
3.1.2.6	Raztopina za SPR	18
3.1.2.7	Raztopina za DSC	18
3.1.2.8	Raztopina za mikroskopiranje	18
3.1.2.9	Raztopina za določanje prostih skupin –SH	18
3.1.3	Gojišča	19
3.1.4	Encimi	19
3.1.5	Uporabljeni kompleti	20
3.1.6	Polnilci kromatografskih kolon in	
	pripravljene kromatografske kolone	20
3.1.7	Laboratorijska oprema	20

str.

3.2 METODE 22 3.2.1 Elektroforeza 22 3.2.1.1 Agarozna elektroforeza 22 3.2.1.2 Elektroforeza NaDS 22 3.2.1.3 Nativna elektroforeza 23 3.2.2 Gojenje hipertermofilne arheje Aeropyrum pernix 23 3.2.2.1 Gojenje arheje Aeropyrum pernix v tekočem gojišću 23 3.2.2.1 Gojenje arheje Aeropyrum pernix 23 3.2.2.1 Izolacija genomske DNA arheje Aeropyrum pernix 23 3.2.3.1 Natmoževanje in izolacija plazmidov 24 3.2.3.1 Natmoževanje plazmidov 24 3.2.3.2 Kloniranje 24 3.2.3.3 GST-označeni produkti 25 3.2.3.4 His-Tag-označeni produkti 25 3.2.3.5 Kontrola kloniranih konstruktov 27 3.2.3.4 Izolacija n čiščenje proteinov Alba 28 3.2.3.4 Izolacija v.N-NTA 28 3.2.3.7 Zamrzovanje, visoka temperatura 29 3.2.4 Spektroskopija UV-Vis 29 3.2.4.1 Karakterizcija proteinov Alba ter 21 termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl 29 3.2.4.5 Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba	3.1.8	Bakterijski sevi	21
3.2.1Elektroforeza223.2.1.1Agarozna elektroforeza223.2.1.2Elektroforeza NaDS223.2.1.3Nativna elektroforeza233.2.4Gojenje hipertermofilne arheje Aeropyrum pernix23in izolacija genomske DNA233.2.2Izolacija genomske DNA233.2.3Priprava in izolacija rekombinantnih proteinov Alba243.2.3.1Namnoževanje in izolacija plazmidov243.2.3.2Kloniranje243.2.3.1Namnoževanje plazmidov243.2.3.2Verižna reakcija s polimerazo (PCR)243.2.3.2.3GST-označeni produkti253.2.3.4His-Tag-označeni produkti253.2.3.5Kontrola kloniranih konstruktov273.2.3.6Giščenje proteinov Alba283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCI293.2.4.3Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.5Fluorescenčen spektroskopija313.2.5.1Spremljanje fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence roteinov Alba323.2.5.5Sledenje termičnih barvil333.2.5.6Interakcija Zenic vericovin verzava fluorescenčnimi barvili <td< td=""><td>3.2</td><td>METODE</td><td>22</td></td<>	3.2	METODE	22
3.2.1.1Agarozna elektroforeza223.2.1.2Elektroforeza NaDS223.2.1.3Nativna elektroforeza233.2.2Gojenje hipertermofilne arheje Aeropyrum pernix23in izolacija genomske DNA233.2.2Izolacija genomske DNA arheje Aeropyrum pernix233.2.3Priprava in izolacija rekombinantnih proteinov Alba243.2.3Priprava in izolacija plazmidov243.2.3.1Namnoževanje in izolacija plazmidov243.2.3.2Kloniranje243.2.3.2Verižna reakcija s polimerazo (PCR)243.2.3.2.3GST-označeni produkti253.2.3.4His-Tag-označeni produkti253.2.3.5Kontrola kloniranih konstruktov273.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.3Določanje vsebnosti proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.3Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.5.4Fluorescenčan spektroskopija313.2.5.5Sledenje thorescence proteinov Alba323.2.5.6Interakcija zipoli proteinov z metodo po Bradfordu313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix v p	3.2.1	Elektroforeza	22
3.2.1.2 Elektroforeza NaDS 22 3.2.1.3 Nativna elektroforeza 23 3.2.2 Gojenje hipertermofilne arheje Aeropyrum pernix 23 in izolacija genomske DNA 23 3.2.2.1 Gojenje in pertermofilne arheje Aeropyrum pernix 23 3.2.2.1 Gojenje arheje Aeropyrum pernix v tekočem gojišču 23 3.2.2 Izolacija genomske DNA arheje Aeropyrum pernix 23 3.2.3 Priprava in izolacija rekombinantnih proteinov Alba 24 3.2.3.1 Namnoževanje in izolacija plazmidov 24 3.2.3.2 Kloniranje 24 3.2.3.2.1 Namnoževanje plazmidov 24 3.2.3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) 24 3.2.3.2.3 GST-označeni produkti 25 3.2.3.4 His-Tag-označeni produkti 25 3.2.3.5 Kontrola kloniranih konstruktov 27 3.2.3.4 Izolacija in čiščenje proteinov Alba 28 3.2.3.5 Čiščenje s FPLC 28 3.2.3.6 Ultrafiltracija 28 3.2.4.1 Karakterizacija proteinov Alba ter 29 1.2.4.2 <td>3.2.1.1</td> <td>Agarozna elektroforeza</td> <td>22</td>	3.2.1.1	Agarozna elektroforeza	22
3.2.1.3 Nativna elektroforeza 23 3.2.2 Gojenje hipertermofilne arheje Aeropyrum pernix 23 3.2.2.1 Gojenje arheje Aeropyrum pernix v tekočem gojišču 23 3.2.2.1 Izolacija genomske DNA arheje Aeropyrum pernix 23 3.2.2.2 Izolacija genomske DNA arheje Aeropyrum pernix 23 3.2.3 Priprava in izolacija rekombinantnih proteinov Alba 24 3.2.3.1 Namnoževanje ni izolacija plazmidov 24 3.2.3.2 Kloniranje 24 3.2.3.2.1 Namnoževanje plazmidov 24 3.2.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) 24 3.2.3.2.3 GST-označeni produkti 25 3.2.3.4 His-Tag-označeni produkti 25 3.2.3.5 Kontrola kloniranih konstruktov 27 3.2.3.6 Ultrafiltracija 28 3.2.3.7 Zamrzovanje, visoka temperatura 29 3.2.4 Izolacija visoka temperatura 29 3.2.4 Spektroskopija UV-Vis 29 3.2.4.1 Karakterizacija proteinov Alba ter 21 termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl 29	3.2.1.2	Elektroforeza NaDS	22
3.2.2Gojenje hipertermofilne arheje Aeropyrum pernix in izolacija genomske DNA233.2.2.1Gojenje arheje Aeropyrum pernix v tekočem gojišču233.2.2.1Izolacija genomske DNA arheje Aeropyrum pernix233.2.2Izolacija genomske DNA arheje Aeropyrum pernix233.2.3Priprava in izolacija rekombinantnih proteinov Alba243.2.3.1Namnoževanje in izolacija plazmidov243.2.3.2Kloniranje243.2.3.2Kloniranje243.2.3.2Verižan crakcija s polimerazo (PCR)243.2.3.2.3GST-označeni produkti253.2.3.2.4His-Tag-označeni produkti253.2.3.3Izolacija in čiščenje proteinov Alba283.2.3.4Izolacija z Ni-NTA283.2.3.5Čiščenje s FPLC283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.5Fluorescenča spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescence s fluorescenčnimi barvili333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil v celih celicah arheje Aeropyrum pernix333.2.5.6<	3.2.1.3	Nativna elektroforeza	23
in izolacija genomske DNA23 $3.2.2.1$ Gojenje arheje Aeropyrum pernix v tekočem gojišču23 $3.2.2.2$ Izolacija genomske DNA arheje Aeropyrum pernix23 $3.2.3$ Priprava in izolacija rekombinantnih proteinov Alba24 $3.2.3$ Priprava in izolacija rekombinantnih proteinov Alba24 $3.2.3$ Namnoževanje in izolacija plazmidov24 $3.2.3.2$ Kloniranje24 $3.2.3.2$ Kloniranje24 $3.2.3.2$ Verižna reakcija s polimerazo (PCR)24 $3.2.3.2$ GST-označeni produkti25 $3.2.3.3$ GST-označeni produkti25 $3.2.3.4$ His-Tag-označeni produkti25 $3.2.3.5$ Kontrola kloniranih konstruktov27 $3.2.3.4$ Izolacija in čiščenje proteinov Alba28 $3.2.3.5$ Čiščenje s FPLC28 $3.2.3.6$ Ultrafiltracija28 $3.2.4$ Spektroskopija UV-Vis29 $3.2.4$ Spektroskopija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl29 $3.2.4.3$ Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu31 $3.2.5.1$ Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba32 $3.2.5.2$ Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili32 $3.2.5.4$ Titracija celic arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescence s fluorescenčnimi barvili33 $3.2.5.5$ Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnimi barvili33 $3.2.5.6$ Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum perni	3.2.2	Gojenje hipertermofilne arheje <i>Aeropyrum pernix</i>	
3.2.2.1Gojenje arheje Aeropyrum pernix v tekočem gojišču233.2.2Izolacija genomske DNA arheje Aeropyrum pernix233.2.3Priprava in izolacija rekombinantnih proteinov Alba243.2.3.1Namnoževanje in izolacija plazmidov243.2.3.2Kloniranje243.2.3.2Kloniranje243.2.3.2Verižna reakcija s polimerazo (PCR)243.2.3.2.3GST-označeni produkti253.2.3.2.4His-Tag-označeni produkti253.2.3.2.5Kontrola kloniranih konstruktov273.2.3.3Izolacija in čiščenje proteinov Alba283.2.3.4Izolacija z Ni-NTA283.2.3.5Čiščenje s FPLC283.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.5Fluorescenčan spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescence s fluorescenčnimi barvili333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvili333.2.5.6CD-spektroskopija34		in izolacija genomske DNA	23
3.2.2.2Izolacija genomske DNA arheje Aeropyrum pernix233.2.3Priprava in izolacija rekombinantnih proteinov Alba243.2.3.1Namnoževanje in izolacija plazmidov243.2.3.2Kloniranje243.2.3.2.1Namnoževanje plazmidov243.2.3.2.2Verižna reakcija s polimerazo (PCR)243.2.3.2.3GST-označeni produkti253.2.3.2.4His-Tag-označeni produkti253.2.3.2.5Kontrola kloniranih konstruktov273.2.3.1Izolacija in čiščenje proteinov Alba283.2.3.4Izolacija z Ni-NTA283.2.3.5Čiščenje s FPLC283.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescence s fluorescenčnimi barvili333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnimi barvili333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.6CD-spektroskopija34	3.2.2.1	Gojenje arheje <i>Aeropyrum pernix</i> v tekočem gojišču	23
3.2.3Priprava in izolacija rekombinantnih proteinov Alba243.2.3.1Namnoževanje in izolacija plazmidov243.2.3.2Kloniranje243.2.3.2.1Namnoževanje plazmidov243.2.3.2.2Verižna reakcija s polimerazo (PCR)243.2.3.2.3GST-označeni produkti253.2.3.2.4His-Tag-označeni produkti253.2.3.2.5Kontrola kloniranih konstruktov273.2.3.3Izolacija in čiščenje proteinov Alba283.2.3.4Izolacija z Ni-NTA283.2.3.5Čiščenje s FPLC283.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.5.5Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescence s fluorescenčnimi barvili333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnimi barvili333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.6.6CD-spektroskopija34	3.2.2.2	Izolacija genomske DNA arheje Aeropyrum pernix	23
3.2.3.1Namnoževanje in izolacija plazmidov243.2.3.2Kloniranje243.2.3.2.1Namnoževanje plazmidov243.2.3.2.2Verižna reakcija s polimerazo (PCR)243.2.3.2.3GST-označeni produkti253.2.3.2.4His-Tag-označeni produkti253.2.3.2.5Kontrola kloniranih konstruktov273.2.3.3Izolacija in čiščenje proteinov Alba283.2.3.4Izolacija z Ni-NTA283.2.3.5Čiščenje s FPLC283.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.5.5Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvili333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.6CD-spektroskopija34	3.2.3	Priprava in izolacija rekombinantnih proteinov Alba	24
3.2.3.2Kloniranje243.2.3.2.1Namnoževanje plazmidov243.2.3.2.2Verižna reakcija s polimerazo (PCR)243.2.3.2.3GST-označeni produkti253.2.3.2.4His-Tag-označeni produkti253.2.3.2.5Kontrola kloniranih konstruktov273.2.3.3Izolacija in čiščenje proteinov Alba283.2.3.4Izolacija z Ni-NTA283.2.3.5Čiščenje s FPLC283.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.5.1Spremljanje fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnimi barvili333.2.5.6Interakcija živih in mtrvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.6CD-spektroskopija34	3.2.3.1	Namnoževanje in izolacija plazmidov	24
3.2.3.2.1Namnoževanje plazmidov243.2.3.2.2Verižna reakcija s polimerazo (PCR)243.2.3.2.3GST-označeni produkti253.2.3.2.4His-Tag-označeni produkti253.2.3.2.5Kontrola kloniranih konstruktov273.2.3.3Izolacija in čiščenje proteinov Alba283.2.3.4Izolacija z Ni-NTA283.2.3.5Čiščenje s FPLC283.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.3Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.5Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.6Fluorescenča spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix v crisotnosti fluorescenčni harvil333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil v celih celicah arheje Aeropyrum pernix333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.6CD-spektroskopija34	3.2.3.2	Kloniranje	24
3.2.3.2.2Verižna reakcija s polimerazo (PCR)243.2.3.2.3GST-označeni produkti253.2.3.2.4His-Tag-označeni produkti253.2.3.2.5Kontrola kloniranih konstruktov273.2.3.3Izolacija in čiščenje proteinov Alba283.2.3.4Izolacija z Ni-NTA283.2.3.5Čiščenje s FPLC283.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.3Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.3Določanje koncentracije proteinov Alba323.2.4.4Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.1Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil v celih celicah arheje Aeropyrum pernix333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.6CD-spektroskopija34	3.2.3.2.1	Namnoževanje plazmidov	24
3.2.3.2.3GST-označeni produkti253.2.3.2.4His-Tag-označeni produkti253.2.3.2.5Kontrola kloniranih konstruktov273.2.3.3Izolacija in čiščenje proteinov Alba283.2.3.4Izolacija z Ni-NTA283.2.3.5Čiščenje s FPLC283.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.3Določanje vsebnosti prostih skupin –SH v raztopini proteina313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnih barvil333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnimi barvili333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.6CD-spektroskopija34	3.2.3.2.2	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	24
3.2.3.2.4His-Tag-označeni produkti253.2.3.2.5Kontrola kloniranih konstruktov273.2.3.3Izolacija in čiščenje proteinov Alba283.2.3.4Izolacija z Ni-NTA283.2.3.5Čiščenje s FPLC283.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.3Določanje vsebnosti prostih skupin –SH v raztopini proteina313.2.5.Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili333.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnih barvil333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil v celih celicah arheje Aeropyrum pernix333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.6CD-spektroskopija34	3.2.3.2.3	GST-označeni produkti	25
3.2.3.2.5Kontrola kloniranih konstruktov273.2.3.3Izolacija in čiščenje proteinov Alba283.2.3.4Izolacija z Ni-NTA283.2.3.5Čiščenje s FPLC283.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.3Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.5Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnimi barvili333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.6CD-spektroskopija34	3.2.3.2.4	His-Tag-označeni produkti	25
3.2.3.3Izolacija in čiščenje proteinov Alba283.2.3.4Izolacija z Ni-NTA283.2.3.5Čiščenje s FPLC283.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.3Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.5.4Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.2Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix v celih celicah arheje Aeropyrum pernix333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.6CD-spektroskopija34	3.2.3.2.5	Kontrola kloniranih konstruktov	27
3.2.3.4Izolacija z Ni-NTA283.2.3.5Čiščenje s FPLC283.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4Spektroskopija DV-Vis293.2.4Določanje proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.5Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnimi barvili333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.6CD-spektroskopija34	3.2.3.3	Izolacija in čiščenje proteinov Alba	28
3.2.3.5Čiščenje s FPLC283.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.3Določanje vsebnosti prostih skupin –SH v raztopini proteina313.2.5Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.6CD-spektroskopija34	3.2.3.4	Izolacija z Ni-NTA	28
3.2.3.6Ultrafiltracija283.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura29 3.2.4Spektroskopija UV-Vis 293.2.4Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.3Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.5Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.6CD-spektroskopija34	3.2.3.5	Čiščenje s FPLC	28
3.2.3.7Zamrzovanje, visoka temperatura293.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.3Določanje vsebnosti prostih skupin –SH v raztopini proteina313.2.5Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.6CD-spektroskopija34	3.2.3.6	Ultrafiltracija	28
3.2.4Spektroskopija UV-Vis293.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.3Določanje vsebnosti prostih skupin –SH v raztopini proteina313.2.5Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.6CD-spektroskopija34	3.2.3.7	Zamrzovanje, visoka temperatura	29
3.2.4.1Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.3Določanje vsebnosti prostih skupin –SH v raztopini proteina313.2.5Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnih barvili333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.6CD-spektroskopija34	3.2.4	Spektroskopija UV-Vis	29
termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl293.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.3Določanje vsebnosti prostih skupin –SH v raztopini proteina313.2.5Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.6CD-spektroskopija34	3.2.4.1	Karakterizacija proteinov Alba ter	
3.2.4.2Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu313.2.4.3Določanje vsebnosti prostih skupin –SH v raztopini proteina31 3.2.5Fluorescenčna spektroskopija 313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.6CD-spektroskopija34		termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl	29
3.2.4.3Določanje vsebnosti prostih skupin –SH v raztopini proteina31 3.2.5 Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.6CD-spektroskopija34	3.2.4.2	Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu	31
3.2.5 Fluorescenčna spektroskopija313.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.6CD-spektroskopija34	3.2.4.3	Določanje vsebnosti prostih skupin –SH v raztopini proteina	31
3.2.5.1Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba323.2.5.2Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili323.2.5.3Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil333.2.5.4Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.5Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil333.2.5.6Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili333.2.5.6CD-spektroskopija34	3.2.5	Fluorescenčna spektroskopija	31
 3.2.5.2 Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili 3.2.5.3 Taljenje DNA arheje <i>Aeropyrum pernix</i> v prisotnosti fluorescenčnih barvil 3.2.5.4 Titracija celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i> s fluorescenčnimi barvili 3.2.5.5 Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil v celih celicah arheje <i>Aeropyrum pernix</i> 3.2.5.6 Interakcija živih in mrtvih celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i> s fluorescenčnimi barvili 33 3.2.6 CD-spektroskopija 	3.2.5.1	Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba	32
 3.2.5.3 Taljenje DNA arheje <i>Aeropyrum pernix</i> v prisotnosti fluorescenčnih barvil 3.2.5.4 Titracija celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i> s fluorescenčnimi barvili 3.2.5.5 Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil v celih celicah arheje <i>Aeropyrum pernix</i> 3.2.5.6 Interakcija živih in mrtvih celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i> s fluorescenčnimi barvili 33 3.2.6 CD-spektroskopija 	3.2.5.2	Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili	32
 v prisotnosti fluorescenčnih barvil 33 3.2.5.4 Titracija celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i> s fluorescenčnimi barvili 33 3.2.5.5 Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil v celih celicah arheje <i>Aeropyrum pernix</i> 33 3.2.5.6 Interakcija živih in mrtvih celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i> s fluorescenčnimi barvili 33 3.2.6 CD-spektroskopija 	3.2.5.3	Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix	
 3.2.5.4 Titracija celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i> s fluorescenčnimi barvili 3.2.5.5 Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil v celih celicah arheje <i>Aeropyrum pernix</i> 3.2.5.6 Interakcija živih in mrtvih celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i> s fluorescenčnimi barvili 3.2.6 CD-spektroskopija 		v prisotnosti fluorescenčnih barvil	33
 3.2.5.5 Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil v celih celicah arheje <i>Aeropyrum pernix</i> 3.2.5.6 Interakcija živih in mrtvih celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i> s fluorescenčnimi barvili 3.2.6 CD-spektroskopija 34 	3.2.5.4	Titracija celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i> s fluorescenčnimi barvili	33
 v celih celicah arheje <i>Aeropyrum pernix</i> 33 3.2.5.6 Interakcija živih in mrtvih celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i> s fluorescenčnimi barvili 33 3.2.6 CD-spektroskopija 34 	3.2.5.5	Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil	
 3.2.5.6 Interakcija živih in mrtvih celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i> s fluorescenčnimi barvili 3.2.6 CD-spektroskopija 34 		v celih celicah arheje Aeropyrum pernix	33
s fluorescenčnimi barvili 33 3.2.6 CD-spektroskopija 34	3.2.5.6	Interakcija živih in mrtvih celic arheje <i>Aeropvrum pernix</i>	
3.2.6 CD-spektroskopija 34		s fluorescenčnimi barvili	33
	3.2.6	CD-spektroskopija	34

3.2.7	Površinska plazmonska resonanca (SPR)	35
3.2.8	Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)	36
3.2.9	DIC in fluorescenčna mikroskopija	37
4	REZULTATI	39
4.1	STABILIZACIJA DNA Z NaCl	39
4.2	TERMIČNA STABILIZACIJA DNA S HISTONI	40
4.2.1	pH-titracija govejih histonov (H-7755)	40
4.2.2	Termična stabilizacija DNA s histoni	41
4.3	TERMIČNA STABILIZACIJA DNA S PROTEINI ALBA	44
4.3.1	Izolacija in čiščenje proteinov Alba	44
4.3.1.1	Kloniranje ter ekspresija proteinov Alba	44
4.3.1.2	Izolacija in čiščenje rekombinantnih proteinov Alba	45
4.3.1.2.1	Izolacija proteina Alba1	45
4.3.1.2.2	Izolacija proteina Alba2	46
4.3.2	pH-stabilnost proteinov Alba	47
4.3.3	Nativna elektroforeza PAGE proteinov Alba	48
4.3.4	Vsebnost prostih skupin –SH v proteinih Alba	49
4.3.5	Vezava proteinov Alba na DNA	50
4.3.6	Vpliv temperature na proteina Alba1 in Alba2	52
4.3.7	UV-talilne krivulje DNA v prisotnosti proteinov Alba	53
4.3.8	Metoda elektroforeznega zamika s proteini Alba	62
4.3.9	Vpliv temperature in vezave DNA na proteine Alba	63
4.3.10	Površinska plazmonska resonanca (SPR)	70
4.4	VPLIV FLUORESCENČNIH BARVIL NA CELICE ARHEJE	
	Aeropyrum pernix TER MOLEKULE DNA	74
4.4.1	Termična denaturacija molekul DNA	
	v prisotnosti fluorescenčnih barvil	74
4.4.2	Titracija celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i> s fluorescenčnimi barvili	75
4.4.3	Sprememba fluorescence barvil s celicami	
	ob spreminjanju temperature	76
4.4.4	Razlike v vezavi fluorescenčnih barvil glede na viabilnost celic	
	arheje <i>Aeropyrum pernix</i>	78
4.4.5	DSC termogrami celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i>	
	s fluorescenčnimi barvili	79
4.4.6	Fluorescenčna mikroskopija celic arheje <i>Aeropyrum pernix</i>	
	s fluorescenčnimi barvili	85
5	RAZPRAVA in SKLEPI	92
5.1	RAZPRAVA	92
5.1.1	Termična stabilizacija molekule DNA	92

5.1.2	Izolacija in karakterizacija proteinov Alba	94
5.1.3	Vezava proteinov Alba na DNA	95
5.1.4	Karakterizacija vpliva fluorescenčnih barvil na	
	celice arheje <i>Aeropyrum pernix</i> ter na molekule DNA	98
5.1.5	Fluorescenčna mikroskopija celic arheje A <i>eropyrum pernix</i>	
	s fluorescenčnimi barvili	99
5.2	SKLEPI	100
6	POVZETEK (SUMMARY)	101
6.1	POVZETEK	101
6.2	SUMMARY	102
7	VIRI	103
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

		str.
Slika 1	Aeropyrum pernix mikrograf (presevna elektronska mikroskopija)	4
Slika 2	Filogenetska porazdelitev DNA-vezavnih proteinov v domeni arhej	6
Slika 3	Filogenetska porazdelitev histonov v domeni arhej	7
Slika 4	Arhejski histon (dimer) z ovito dsDNA tvori obliko podkve	8
Slika 5	Filogenetska porazdelitev proteinov Alba v domeni arhej	9
Slika 6	Elektronski mikrograf proteina Alba izoliranega iz	
	hipertermofila Sulfolobus solfataricus	10
Slika 7	Shematska predstavitev sekundarne strukture proteinov Alba1 in Alba2,	
	izoliranih iz arheje Aeropyrum pernix	12
Slika 8	Strukturne formule fluorescenčnih barvil	14
Slika 9	Hodogram poteka poskusov	15
Slika 10	Shematski prikaz plazmida pQE-30 UA	26
Slika 11	Shematski prikaz plazmida pETDuet-1	27
Slika 12	Grafično določanje temperature taljenja (T _m) na UV-termogramu	29
Slika 13	Določanje temperature taljenja (T _m) na UV-termogramu s prvim odvodom	30
Slika 14	Površinska plazmonska resonanca (SPR)	35
Slika 15	Termična stabilnost (T _m) različnih molekul DNA v 5 mM kakodilatnem	
	pufru pri pH 7,0 v odvisnosti od naraščajoče koncentracije NaCl	40
Slika 16	pH-titracija vodne raztopine govejega histona	41
Slika 17	UV-talilne krivulje genomske DNA izolirane iz	
	govejega priželjca pri različnih molskih razmerjih histon : DNAbp	42
Slika 18	UV-talilne krivulje poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA	
	pri različnih molskih razmerjih histon : DNAbp	43
Slika 19	UV-talilne krivulje poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA	
	pri različnih molskih razmerjih histon : DNAbp	44
Slika 20	Sestavljena slika gelov NaDS PAGE (20 %)	
	prikazuje stopnje čistosti proteina Alba1 med procesom izolacije	45
Slika 21	Sestavljena slika gelov NaDS PAGE (20 %)	
	prikazuje stopnje čistosti med procesom izolacije proteina Alba2,	
	izraženega v sistemu pQE-30 UA/Escherichia coli M15	46
Slika 22	Sestavljena slika gelov NaDS PAGE (20 %)	
	prikazuje stopnje čistosti med procesom izolacije proteina Alba2,	
	izraženega v sistemu pETDuet-1/Escherichia coli BL21	47
Slika 23	Sprememba fluorescenčne intenzitete proteinov Alba1 in Alba2	
	pri 310 nm v 50 mM NaH ₂ PO ₄ v odvisnosti od spremembe pH	48
Slika 24	Nativna elektroforeza PAGE z 20-odstotnim homogenim gelom	
	sistema Phast	49

Slika 25	Elektroforeza NaDS PAGE prikazuje tvorjenje	
	disulfidnih mostičkov pri proteinih Alba	49
Slika 26	Titracija proteina Alba1 z DNA, izolirano iz govejega priželjca,	
	poli(dA-dT) · poli(dA-dT) in poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA	50
Slika 27	Titracija proteina Alba2 z DNA, izolirano iz govejega priželjca,	
	poli(dA-dT) · poli(dA-dT) in poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA	51
Slika 28	Vpliv temperature na denaturacijo proteinov Alba1 in Alba2	52
Slika 29	UV-talilne krivulje genomske DNA, izolirane iz govejega priželjca,	
	in proteina Alba1 pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp	53
Slika 30	UV-talilne krivulje poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA	
	in proteina Alba1 pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp	54
Slika 31	UV-talilne krivulje poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA	
	in proteina Alba1 pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp	55
Slika 32	UV-talilne krivulje genomske DNA, izolirane iz govejega priželjca,	
	in proteina Alba2 pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp	56
Slika 33	UV-talilne krivulje poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA	
	in proteina Alba2 pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp	57
Slika 34	UV-talilne krivulje poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA	
	in proteina Alba2 pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp	58
Slika 35	UV-talilne krivulje kompleksa proteinov Alba1/Alba2	
	in genomske DNA, izolirane iz govejega priželjca,	
	pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp	59
Slika 36	UV-talilne krivulje kompleksa proteinov Alba1/Alba2	
	in poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA	
	pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp	60
Slika 37	UV-talilne krivulje kompleksa proteinov Alba1/Alba2	
	in poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA	
	pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp	61
Slika 38	Metoda elektroforeznega zamika linearne molekule DNA (pUC19/EcoRI)	
	s proteini Alba	63
Slika 39	Spektri (cirkularni dikroizem) proteina Alba1 pri različnih temperaturah	
	v daljnjem UV-območju (200-250 nm)	64
Slika 40	Spektri (cirkularni dikroizem) proteina Alba2 pri različnih temperaturah	
	v daljnjem UV-območju (200-250 nm)	66
Slika 41	Spektri (cirkularni dikroizem) kompleksa proteinov Alba1/Alba2	
	pri različnih temperaturah v daljnjem UV-območju (200-250 nm)	68
Slika 42	Senzorgram vezave proteina Alba1 na oligonukleotid SPRspecAP z SPR	70
Slika 43	Senzorgram vezave proteina Alba2 na oligonukleotid SPRspecAP z SPR	71

Slika 44	Senzorgram vezave kompleksa proteinov Alba1/Alba2	
	na oligonukleotid SPRspecAP z SPR	72
Slika 45	Senzorgram vezave govejih histonov	
	na oligonukleotid SPRspecAP z SPR	73
Slika 46	Termična denaturacija izolirane genomske DNA	
	arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti različnih fluorescenčnih barvil	75
Slika 47	Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili	76
Slika 48	Relativna intenziteta fluorescence (FI/FI ₀) barvila Hoechst 33258	
	v prisotnosti celic arheje Aeropyrum pernix v odvisnosti od temperature	77
Slika 49	Relativna intenziteta fluorescence (FI/FI ₀) barvila DAPI	
	v prisotnosti celic arheje Aeropyrum pernix v odvisnosti od temperature	78
Slika 50	Odvisnost intenzitete fluorescence od deleža živih celic	
	arheje Aeropyrum pernix, inkubiranih s fluorescenčnimi barvili	79
Slika 51	Termogrami (diferenčna dinamična kalorimetrija) celic arheje	
	Aeropyrum pernix po inkubiranju z barvilom Hoechst 33258	80
Slika 52	Termogrami (diferenčna dinamična kalorimetrija) celic arheje	
	<i>Aeropyrum pernix</i> po inkubiranju z barvilom DAPI	81
Slika 53	Termogrami (diferenčna dinamična kalorimetrija) celic arheje	
	Aeropyrum pernix po inkubiranju z barvilom akridin oranž	82
Slika 54	Termogrami (diferenčna dinamična kalorimetrija) celic arheje	
	<i>Aeropyrum pernix</i> po inkubiranju z barvilom DiBAC ₄ (3)	83
Slika 55	DIC/fluorescenčni mikrograf celic arheje Aeropyrum pernix	
	z barvilom Hoechst 33258	85
Slika 56	DIC/fluorescenčni mikrograf celic arheje Aeropyrum pernix	
	z barvilom DAPI	86
Slika 57	DIC/fluorescenčni mikrograf celic arheje Aeropyrum pernix	
	z barvilom akridin oranž	87
Slika 58	DIC/fluorescenčni mikrograf celic arheje Aeropyrum pernix	
	z barvilom $DiBAC_4(3)$	88
Slika 59	Fluorescenčni mikrograf celic bakterije Escherichia coli	
	in arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti barvil SYTO9	
	in propidijevega jodida (komplet BacLight TM)	89
Slika 60	DIC/fluorescenčni mikrografi celic arheje Aeropyrum pernix,	
	obarvanih s fluorescenčnim barvilom DiBAC ₄ (3),	
	v kombinaciji z ostalimi fluorescenčnimi barvili	90

KAZALO PREGLEDNIC

		str.
Preglednica 1	Sestava akrilamidnih gelov NaDS različnih zamreženosti	23
Preglednica 2	Uporabljeni oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje genov	
	proteinov Alba1 in Alba2 v ekspresijskem vektorju pGEX	25
Preglednica 3	Uporabljeni oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje genov	
	proteinov Alba1 in Alba2 v ekspresijskem vektorju pQE-30 UA	26
Preglednica 4	Uporabljeni oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje genov	
	proteinov Alba1 in Alba2 v ekspresijskem vektorju pETDuet	27
Preglednica 5	Uporabljeni biotinilirani oligonukleotidni začetniki	
	za vezavo na čip SPR SA	36
Preglednica 6	Primerjava T _m različnih molekul DNA	
	v prisotnosti 0 in 250 mM NaCl pri pH 7,0	40
Preglednica 7	Molski delež prostih skupin –SH na mol proteinov Alba	50
Preglednica 8	Konstanta vezave ($K_{\rm bin}$) ob vezavi proteinov Alba	
	na različne molekule DNA	
	in število nukleotidov, ki sodelujejo pri vezavi proteina in DNA	52
Preglednica 9	Navidezne konstante asociacije (K^{T_m}) za molska razmeria	
-0	(1 - 1)	62
D 1 1 . 10	proteinov Alba in CI-DNA, AI-DNA in GC-DNA	02
Preglednica 10	Ocena deležev posameznih elementov sekundarne strukture	
	proteina Albal na podlagi spektrov cirkularnega dikroizma	
	v daljnjem UV-obmocju v odvisnosti od temperature in	65
D 1 1 . 11	prisotnosti različnih molekul DNA	65
Preglednica II	Ocena delezev posameznih elementov sekundarne strukture	
	proteina Alba2 na podlagi spektrov cirkularnega dikroizma	
	v daljnjem UV-območju v odvisnosti od temperature in	
D 1 1 . 10	prisotnosti razlicnih molekul DNA	6/
Preglednica 12	Ocena deležev posameznih elementov sekundarne strukture	
	kompleksa proteinov Albal/Alba2 na podlagi spektrov	
	cırkularnega dıkroızma v daljnjem UV-območju	(0)
D 1 1 · 10	v odvisnosti od temperature in prisotnosti različnih molekul DNA	69
Preglednica 13	Vrednosti (v RU-relativne enote) vezanih proteinov na	
	oligonukleotid SPRspecAP, 790 sekund po nanosu raztopine proteina	
D 1 1 · · · ·	na streptavidinski čip	74
Preglednica 14	Vpliv fluorescenčnih barvil na DSC-prehode	
	pri arheji Aeropyrum pernix	84

KRATICE in OKRAJŠAVE

A ₂₆₀ / A ₂₈₀	absorbanca (negativni logaritem prepustnosti) pri	
	valovni dolžini 260 / 280 nm	
AGI	C _{25,25} -arhetidil(glukozil)inozitol	
AI	C _{25,25} -arhetidilinozitol	
AK	aminokislina	
Alba	protein "Acetylation lowers binding affinity"	
APS	amonijev persulfat	
Arg	aminokislina arginin	
Asp	asparaginska kislina	
AT-DNA	poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA	
bp	bazni par	
CD-spektroskopija	cirkularni dikroizem	
CT-DNA	genomska DNA, izolirana iz govejega priželjca	
Cys	aminokislina cistein	
Da	Dalton	
DIC	differential interference contrast (mikroskopija)	
DNA	deoksiribonukleinska kislina	
dsDNA	dvojno vijačna DNA	
ssDNA	enojno vijačna DNA	
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija	
DTT	ditiotreitol	
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina	
EMSA	electrophoretic mobility shift assay (metoda elektroforeznega zamika)	
FPLC	fast protein liquid chromatography (hitra tekočinska kromatografija za proteine)	
FS	filter set	
GC-DNA	poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA	
gDNA	genomska DNA	
Glu	glutaminska kislina	
His-tag	histidinski rep	
HSCO	heteronuclear single quantum correlation spectroscopy	
HTa	protein kromatina skupine <i>Themroplasmata</i>	
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid	
ITC	izotitracijska kalorimetrija	
LB	gojišče LB	

LBAp	gojišče LB z dodanim ampicilinom	
LBApKn	gojišče LB z dodaniim ampicilinom in kanamicinom	
LC/MS-MS	tekočinska kromatografija/masna spektroskmasna spektroskopija	
Lys	aminokislina lizin	
MC1	protein kromatina skupin Methanomicrobia in Halobacteria	
MCS	multy cloning site	
MWCO	molecular weight cut-off (izključitvena molekulska masa)	
NaDS-PAGE	elektroforeza na poliakrilamidnem gelu z Na-dodecil sulfatom	
	(ang. "Na-dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresys")	
Ni-NTA	nikelj-nitrilotriocetna kislina	
NMR	jedrska magnetna resonanca	
OD	optična gostota	
Pat	acetilaza protienov Alba	
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. "polymerase chain reaction")	
Phe	aminokislina fenilalanin	
pI	izoelektrična točka	
RNA	ribonukleinska kislina	
Sir2	deacetilaza proteinov Alba	
SPR	površinska plazmonska resonanca	
Sul7	protein kromatina skupine Sulfolobus	
TCA	triklorocetna kislina	
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin	
T _m	temperatura taljenja	
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propanol	
Trp	aminokislina triptofan	
Tyr	aminokislina tirozin	
λ	valovna dolžina	

1 UVOD

Vse zdaj poznane organizme razvrščamo v tri domene, ena od teh domen so tudi arheje (Woese in sod., 1990). Arheje poznamo predvsem kot mikroorganizme, ki zasedajo ekološke niše v ekstremnih habitatih. Mikroorganizme, ki najbolje rastejo pri temperaturah, višjih od 80 °C in pod 60 °C niso sposobni rasti, imenujemo hipertermofile (Stetter, 1996).

Aeropyrum pernix je striktno aeroben hipertermofil z optimumom rasti pri 92 °C, prištevamo ga v kraljestvo Crenarchaeota. Rod *Aeropyrum* je v kraljestvu Crenarchaeota neke vrste posebnež, saj so v tem kraljestvu razen tega rodu za zdaj poznani samo striktni anaerobi. Za predstavnike Crenarchaeota je večinoma značilna odsotnost arhejskih histonov, ki skrbijo za stabilizacijo kromatina v celici. DNA, izolirana iz arheje *A. pernix*, se denaturira pri temperaturi, ki je nižja od temperature rasti mikroorganizma, po čemer gre sklepati, da mora imeti organizem druge dodatne mehanizme, ki mu omogočajo temperaturno stabilizacijo DNA. Vlogo stabilizacije DNA imajo pri nekaterih hipertermofilnih arhejah histoni oz. analogi evkariontskih histonov. Zaradi odsotnosti histonov v rodu *Aeropyrum* ima ta rod najverjetneje druge DNA-vezavne proteine, ki omogočajo termično stabilnost DNA pri višjih temperaturah, pri temperaturah rasti. V rodu *Aeropyrum* in nekaterih drugih hipertermofilnih arhejah tako srečamo specifične družine majhnih, bazičnih proteinov, ki nastopajo v velikem številu ter se vežejo na DNA brez posebnih specifičnih prepoznavanj zaporedij. Proteini Alba so drugi najbolj razširjeni proteini kromatina pri arhejah. (Sandman in Reeve, 2005)

Za razliko od kultivacijskih tehnik, ki so časovno potratne, lahko kot alternativo za ločevanje med živimi in mrtvimi celicami uporabljamo kombinacije različnih fluorescenčnih barvil. Populacije celic tako največkrat ločujemo s fluorescenčno mikroskopijo ali pretočno citometrijo. Za ta namen se navadno uporabljajo fluorescenčna barvila, ki specifično obarvajo ene in druge celice (Huber in sod., 1985; Haidinger in sod., 2003). Zaradi neprepustnosti membran arhej ponavadi fluorescenčna barvila slabše razlikujejo med živimi in mrtvimi celicami. Testiranje delovanja različnih barvil s hipertermofilnimi arhejami je pokazalo, da je za razlikovanje med mrtvimi in živimi celicami arhej barvilo DiBAC₄(3) najustreznejše (Beck in Huber, 1997; de Poorter in Keltjens, 2001; Alakomi in sod., 2005). Barvila vplivajo na temperaturno stabilnost posameznih komponent celic. Zaradi vezave barvil na posamezne komponente celic navadno opazimo tudi spremembo v temperaturi pri kateri pride do denaturacije komponent (Črnigoj in sod., 2008).

1.1 NAMEN DELA

Namen doktorskega dela je bil z uporabo različnih tehnik izolirati in okarakterizirati DNAvezavne proteine hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix*. Dodatno smo raziskali vpliv in uporabnost različnih fluorescenčnih barvil na celice *A. pernix*.

V ta namen smo dva DNA-vezavna proteina hoteli izraziti v različnih sistemih za izražanje genov in ju okarakterizirati. Okarakterizirati smo nameravali medsebojno delovanje proteinov ter različnih molekul DNA pri različnih temperaturah. Raziskave so vključevale vpliv koncentracije NaCl, govejih histonov ter proteinov Alba na termično stabilizacijo različnih molekul DNA. Študij interakcij je potekal z UV-, fluorescenčno in CD-spektroskopijo, metodo elektroforeznega zamika, površinsko plazmonsko resonanco ter diferenčno dinamično kalorimetrijo. Preučevali smo tudi vzajemni vpliv različnih fluorescenčnih barvil na molekule DNA ter na celice arheje *A. pernix* s kombinacijo kalorimetričnih, spektrofotometričnih ter mikroskopskih tehnik.

1.2 DELOVNI HIPOTEZI

Hipoteza 1:

Predvidevamo, da fluorescenčna barvila (Hoechst 33258, DAPI, akridin oranž in DiBAC₄(3)) pri višjih temperaturah hitreje prehajajo v celice arheje *Aeropyrum pernix*, se vežejo na molekulo DNA ali RNA in jo z vezavo stabilizirajo. Pričakujemo, da bomo s fluorescenčnimi označevalniki molekulo DNA *in vivo* (v celici arheje *A. pernix*) opazovali z metodo DSC in fluorescenčno mikroskopijo.

Hipoteza 2:

V evkariontskih celicah je DNA v kompleksu s histoni, medtem ko *Aeropyrum pernix* vsebuje proteine Alba s katerimi je molekula DNA stabilizirana *in vivo*. S pripravo rekombinantnih proteinov Alba bomo preučevali njihovo vlogo in vlogo histonov pri stabilnosti molekule DNA. Pričakujemo, da bodo proteini Alba termično bolj stabilizirali DNA kot histoni.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ARHEJE

Po letu 1990 delimo žive organizme na tri glavne domene: Archaea, Eukarya in Bacteria (Woese in sod., 1990). Pred to delitvijo je veljala delitev na prokarionte in evkarionte, ki je bazirala na odsotnosti oz. prisotnosti jedrne membrane in ostalih organelov v celici. Arheje se taksonomsko razlikujejo od evkariontov, prav tako tudi od bakterij, saj so po nekaterih lastnostih bolj podobne enim, po drugih pa drugim, veliko lastnosti je specifičnih le za skupino arhej. Tako imajo arheje lipide z etrsko vezjo (bakterije in evkarionti imajo estrsko vez), imajo edinstveno sestavo celične stene, brez mureina, ki ga navadno najdemo v bakterijski steni, nekateri rodovi arhej so sposobni produkcije metana. Arhejski replikacijski, transkripcijski in translacijski aparat je bolj soroden evkariontskemu (encimi, DNA vsebuje introne), medtem ko so metabolične značilnosti ter celična organizacija bolj podobne bakterijskim (Bernander, 1998). Zanimivo je tudi, da lahko podenote arhejskih in evkariontskih ribosomov tvorijo aktivne hibridne ribosome (Altamura in sod., 1986). Za bakterije je značilno, da nimajo histonov, ki so prisotni pri evkariontih ter nekaterih arhejah. Bakterije za uravnavo pakiranja DNA uporabljajo druge proteine (HU, H-NS, IHF, Fis) (Kumarevel in sod., 2007).

Arhejam navadno pripisujemo ekstremofilnost zaradi njihove razširjenosti v ekoloških nišah, v katerih veljajo ekstremne razmere (visoka slanost, temperatura, tlak, ekstremne pH-vrednosti). Čeprav so arheje najverjetneje splošno prisotne v okolju, med njimi za zdaj še ni znanih patogenov (Barns in sod., 1996; DeLong, 1998; Cavicchioli in sod., 2003; Eckburg in sod., 2003). Med arhejami najdemo poleg hipertermofilov in halofilov tudi psihrofile (ne rastejo pri temperaturi nad 20 °C), piezofile (optimalno rastejo pri višjih tlakih), alkalofile (rastejo pri vrednosti pH nad 9, ne rastejo pa pri nevtralnih vrednostih pH) in acidofile, ki optimalno rastejo pod vrednostjo pH 3. Pogosto se zgodi, da organizem poseduje lastnosti dveh ali več ekstremnih fenotipov (Preston in sod., 1996; Johnson, 1998; Horikoshi, 1999; Abe in Horikoshi, 2001). Na podlagi fenotipov, ki so najbolj razširjeni, temelji osnovna delitev arhej na ekstremne termofile, ekstremne halofile in metanogene (Cowan, 1992).

Domeno arhej delimo na štiri kraljestva: Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota in Nanoarchaeota. Kraljestvo Euryarchaeota obsega predstavnike vseh treh glavnih fenotipov, medtem ko so v kraljestvu Crenarchaeota v glavnem hipertermofilne arheje. Kraljestvi Korarchaeota in Nanoarchaeota za zdaj obsegata zelo malo predstavnikov, večina predstavnikov teh dveh kraljestev temelji na zaporedjih DNA, pridobljenih iz okoljskih vzorcev.

2.2 Aeropyrum pernix K1

Arheja *Aeropyrum pernix* spada v kraljestvo Crenarchaeota ter red Desulfurococcales in jo glede na fenotipske lastnosti prištevamo med hipertermofile. Beseda hipertermofil označuje organizem (do zdaj so to mikroorganizmi), ki ima optimalno temperaturo rasti višjo od 80 °C in pod 60 °C ni sposoben rasti (Stetter, 1996). Velika večina zdaj poznanih hipertermofilov je arhej, saj sta le dva bakterijska redova sposobna rasti pri tako visokih temperaturah (Huber in Stetter, 2001).

Družino Desulfurococcaceae sestavlja osem rodov: *Desulfurococcus, Aeropyrum, Ignicoccus, Stetteria, Sulfophobococcus, Thermosphaera* in *Thermodiscus*. Pripadniki te družine optimalno rastejo pri temperaturah med 85 °C in 95 °C. Znani mikroorganizmi iz te družine so bili izolirani iz morskih in zemeljskih hidrotermalnih sistemov, vsi (z izjemo rodu *Aeropyrum*) so striktni anaerobi s fermentativnim ali anaerobno respiratornim metabolizmom in uporabljajo žveplo ali tiosulfat kot sprejemnik elektronov (Huber in Stetter, 2001).

Ime *Aeropyrum* je sestavljanka dveh grških besed: aer (gr. zrak) in pyr (gr. ogenj), tako nam že samo ime da slutiti osnovni značilnosti te arheje, torej potrebo po zraku in rast pri visokih temperaturah. *A. pernix* je striktno aerobna, heterotrofna in hipertermofilna arheja. Tipski sev vrste je sev K1, ki je bil izoliran iz obalnih sulfatarnih vrelcev na otoku Kodakara-Jima na severozahodu Japonske. Vrsta je s svojo striktno potrebo po kisiku, po svoji nevtrofilni rasti ter s svojo neodvisnostjo od žvepla v kraljestvu Crenarchaeota edinstvena. Z določitvijo zaporedja DNA genoma arheje *A. pernix* je ta arheja tudi prvi predstavnik kraljestva z znanim zaporedjem genoma (Sako in sod., 1996; Kawarabayasi in sod., 1999).



Slika 1: Aeropyrum pernix mikrograf (presevna elektronska mikroskopija). Črtica predstavlja dolžino 2 μm. (Sako in sod., 1996)

Figure 1: Micrograph of *Aeropyrum pernix* (transmission electron microscopy). Bar represents the scale for 2 µm. (Sako in sod., 1996)

Celice arheje *A. pernix* (Slika 1) so nepravilnih, navadno posamičnih kokoidnih oblik z ostrimi robovi, velike so od 0,8 μ m do 1 μ m, vsebnost GC baznih parov v njihovem genomu je 67 %. Rod zavzema poleg arheje *A. pernix* še vrsto *Aeropyrum camini*. Za predstavnike tega rodu je značilna rast med 70 °C in 100 °C (optimum med 90 °C in 95 °C), med pH 5 in 9 (optimum pri pH 7) in pri slanosti 1,8 – 7,0 % (optimum pri 3,5 % slanosti). V idealnih pogojih za rast imajo celice čas podvojevanja okoli 200 minut. Celice so večinoma obdane s strukturami, podobnimi pilijem, flagel nimajo. Celice obdaja 25 nm debela ovojnica, t.i. S-sloj. Celice rastejo na proteinskih substratih, kot so kvasni ekstrakt,

triptikazni pepton in tripton (celice na kazaminokislinah ne rastejo). Dodatek tiosulfata v gojišča spodbuja njihovo rast. Antibiotiki (ampicilin, vankomicin, cikloserin), ki delujejo na sintezo peptidoglikanov, na to vrsto ne učinkujejo. Vrsta je občutljiva na kloramfenikol, ki vpliva na proteinsko sintezo. V membranah organizmov tega reda ne najdemo maščobnih kislin, temveč lipide di-O-sesterterpanil (C25, C25) glicerol eter. Predstavnika omenjenih lipidov sta AI (C_{25,25}-arhetidilinozitol) in AGI (C_{25,25}arhetidil(glukozil)inozitol). Celice so živahno gibljive tako pri sobni temperaturi kakor tudi pri 90 °C (Sako in sod., 1996; Morii in sod., 1999).

2.3 DNA-VEZAVNI PROTEINI

Z naraščajočim številom znanih zaporedij genomov bakterijskih in arhejskih organizmov je postalo znano, da so arhejski genomi v mnogo karakteristikah podobni bakterijskim. Tako so arhejski genomi krožni in obsegajo tudi zunajkromosomske elemente, kot so plazmidi, velikosti genomov segajo od 0,49 Mbp do 5,75 Mbp. Genom arhej po svoji dolžini krepko presega velikost arhejski celic, zato je DNA povezana v proteinske komplekse, poznane pod besedo kromatin (Sandman in Reeve, 2005).

Beseda kromatin je pogosto definirana kot kompleks kondenzirane DNA in proteinov v jedru med mitozo. Omenjena definicija, ki je definirana iz evkariontskega stališča, se v zadnjem času uporablja tudi v povezavi z bakterijsko in arhejsko DNA, ki je kondenzirana v komplekse zaradi vezave različnih proteinov. Če lahko pri evkariontski uravnavi kromatina najdemo skupni model, tega za arhejske proteine ne moremo trditi, saj se mehanizmi med seboj razlikujejo (Sandman in Reeve, 2005).

Koncentracija genomske DNA v celici presega koncentracije 80 mg/mL (Bohrmann in sod., 1993). Pri tako visokih koncentracijah se molekula DNA brez DNA-vezavnih proteinov kondenzira ter tvori agregate. Že zavoljo samega izražanja genov, ki je za funkcioniranje celice nujno, DNA ne sme biti kondenzirana v neurejene agregate, ampak mora biti urejena v natančno uravnano, dinamično tridimenzionalno strukturo. Tako struktura kot tudi dinamičnost kompleksa je uravnana preko treh faktorjev: vezave proteinov, superzvitja DNA ter t.i. gnečo makromolekul (zelo visoke koncentracije makromolekul na omejenem prostoru).

Tako v vseh treh domenah srečamo specifične družine majhnih, bazičnih proteinov, ki nastopajo v velikem številu ter se vežejo na DNA brez posebnih specifičnih prepoznavanj zaporedij (Lurz in sod., 1986; Xue in sod., 2000; Mallick in sod., 2002; Jelinska in sod., 2005). Te proteine (Slika 2), ki skrbijo tudi za strukturo kromatina, najdemo v vseh znanih arhejskih genomih. Pri arhejah so poznani tudi drugi proteini kromatina, ki pa so omejeni le na določene filogenetske skupine. Takšne proteine najdemo npr. v skupini *Thermoplasmata* (HTa), *Sulfolobus* (Sul7), *Methanomicrobia* in *Halobacteria* (MC1) (Slika 2). HTa proteini, ki sodijo v skupino bakterijskih proteinov HU, so najverjetneje posledica lateralnega genskega prenosa med arhejami in bakterijami (Sandman in Reeve, 2005).



Slika 2: Filogenetska porazdelitev DNA-vezavnih proteinov v domeni arhej (Sandman in Reeve, 2005). Figure 2: Filogenetic tree of DNA-binding proteins in archaea domaine (Sandman and Reeve, 2005).

2.3.1 Histoni

Histoni se vežejo na DNA in jo pakirajo v skoraj vseh evkariontskih organizmih (Sullivan in sod., 2002). Predvidoma so imeli sedanjo funkcijo že v prvotnih evkariontskih jedrih. Histonov pri bakterijah ne najdemo, so pa prisotni tudi v skupini arhej (Woese in sod., 1990; Matte-Tailliez in sod., 2002).

Nukleosomi so univerzalna enota pakiranja DNA pri evkariontih. Prokariontska organizacija kromatina je bolj različna, mehanizmi pakiranja DNA pa so manj poznani. Prokarionti morajo svojo DNA pakirati tako, da se poraba prostora zmanjša za več kot 1000-krat (Wu, 2004).

V domeni arhej najdemo histone predvsem v kraljestvu Euryarchaeota (Slika 3). Prav tako jih najdemo v nekaterih rodovih domene Crenarchaeota (Slika 3). Odkritje histonov v tej domeni kaže na to, da so se histoni verjetno pojavili pred filogenetsko ločitvijo evkariontov in arhej (Cubonova in sod., 2005). Arhejski genomi nosijo zapis za do šest histonov, ki imajo t.i. minimalno strukturo histonov (ang. "histone fold", HF). Minimalna struktura HF ima sekundarno strukturo, ki obsega tri α -vijačnice (kratek, dolg, kratek), ločene z dvema kratkima β -zavojema. Ker so monomeri arhejskih histonov nestabilni, ti večkrat tvorijo homodimere ali heterodimere oz. tetramere. Sinteza dveh različnih arhejskih histonov je dokazano uravnavana glede na rastno fazo, v kateri organizem je, s čimer organizem uravnava prvo raven organizacije kromatina. Evkariontski histoni imajo za razliko od arhejskih, ki vsebujejo samo strukturo HF, še karboksi in amino repe na eni oz. drugi strani aminokislinskega zaporedja proteina. Na histonskih repih poteka večina postranslacijskih

modifikacij histonov (ubikvitinacija, fosforilacija, metilacija in acetilacija), ki vplivajo na aktivnost evkariontskih histonov ter s tem tudi na organizacijo kromatina. Pri evkariontih hiperacetilacija navadno sproži aktivacijo nekega gena, torej na evkariontske histone obratno vpliva kot na proteine Alba (Sandman in sod., 1994; Dinger in sod., 2000; Sandman in sod., 2001; Zhao in sod., 2003; Heinicke in sod., 2004; Kumarevel in sod., 2007; Luo in sod., 2007).



Slika 3: Filogenetska porazdelitev histonov v domeni arhej (Sandman in Reeve, 2005). Figure 3: Filogenetic tree of histones in archaea domaine (Sandman in Reeve, 2005).

Evkarionti imajo, za razliko od arhej, strukturno visoko ohranjene histone. Histoni evkariontov H2A, H2B, H3 in H4 imajo natančno določen model sestavljanja v oktamere, saj se vedno sestavijo po modelu centralnega (H3-H4)₂ tetramera, ki ga obdajata dva H2A-H2B dimera. Razlika v organizaciji proteinov kromatina pri evkariontih in prokariontih najverjetneje izhaja iz dejstva, da morajo biti geni v arhejskem kromatinu vedno dostopni encimom metabolizma celice, medtem ko je večji del DNA v evkariontskem genomu večino časa v encimom metabolizma manj dostopni obliki; le–ta se spremeni le ob sodelovanju dodatnih proteinov ter modifikacij histonov, ki strukturo kromatina sprostijo. Za arhejski nukleosom je posledično značilna povišana fleksibilnost, kar omogoča v nukleosomu arhej več različnih konformacij DNA. Okoli evkariontskega histonskega oktamera je tako navitih približno 145 bp negativno superzvite DNA, medtem ko arhejski histonski kompleksi ovijejo le približno 90 bp DNA, zaradi česar tvorijo z ovito DNA obliko konjske podkve (Slika 4). Omenjene lastnosti arhejskih histonov v celici verjetno preprečujejo pretirano polimeriziranje histonskih dimerov ter omogočajo prehod RNA-polimeraze. (Xie in Reeve, 2004; Sandman in Reeve, 2005)



Slika 4: Arhejski histon (dimer) z ovito dsDNA tvori obliko podkve (α : α -vijačnice, L: β -zanke) (Reeve in sod., 2004).

Figure 4: Archaean histone (in dimmer) wraped in dsDNA forms a structure in a shape of horseshoe (α : α -helix, L: β -loop) (Reeve in sod., 2004).

2.3.2 Proteini Alba

Superdružina proteinov Alba obsega 2 evkariontski ter eno arhejsko skupino (Slika 5). Proteini verjetno izvirajo iz RNA-vezavnih proteinov, ki tvorijo različne ribonukleinske komplekse, sorodni so RNazi P (Aravind in sod., 2003).

Proteini Alba so drugi najbolj razširjeni proteini kromatina pri arhejah. Ime Alba izhaja iz besed Acetylation Lowers Binding Affinity. Regulacija z acetilacijo (Pat/Sir pot) poteka najverjetneje na dveh koncih molekule, na N-koncu proteinske verige ter na Lys¹⁶. Ob acetilaciji proteina Alba z acetilazo Pat se disociacijska konstanta proteina zniža do 30-krat. Proteine Alba deacetilira Sir2, od NAD-odvisna deacetilaza, ki jo najdemo v vseh treh domenah, le–ta tvori s proteinom Alba stabilen kompleks (Frye, 1999; Bell in sod., 2002; Marsh in sod., 2005). Acetilacijo vrši acetiltransferaza Pat, ki je zanimivo ohranjena tako pri arhejah kakor tudi pri bakterijah, kjer uravnava metabolizem (Marsh in sod., 2005).

Proteine Alba najdemo tako v evkariontih kot v arhejah (z izjemo *Halobacteria* in *Methanomicrobia*) (Slika 5). V različnih arhejah nastopajo proteini Alba pod drugačnimi imeni, tako imajo npr. v rodu *Sulfolobus* imena DNBP-B, Sac10b, Sso10b in SSh10b (Reddy in Suryanarayana, 1988). Vse termofilne in hipertermofilne arheje vsebujejo vsaj eno kopijo proteina Alba. Proteini Alba nastopajo v celici v velikem številu in v dimerih, so bazični proteini, ki se na DNA vežejo kooperativno in v velikih količinah. *Pyrobaculum aerophylum* in *Aeropyrum pernix* sta edini poznani vrsti arhej, ki v genomu nimata zapisa za druge DNA-vezavne proteine, ampak le za en protein oz. dva proteina Alba (Fitz-Gibbon in sod., 2002; Luo in sod., 2007). Do zdaj je v arhejah poznanih 37 proteinov Alba. Visoka ohranjenost zaporedij AK proteinov Alba kaže na to, da imajo proteini skupne strukturne lastnosti ter v organizmu igrajo pomembno vlogo (Kumarevel in sod., 2007).



Slika 5: Filogenetska porazdelitev proteinov Alba v domeni arhej (Sandman in Reeve, 2005). Figure 5: Filogenetic tree of Alba proteins in archaea domaine (Sandman in Reeve, 2005).

Proteini Alba v raztopini nastopajo v obliki dimerov, povezujejo jih hidrofobne vezi. Iz globularne strukture dimera štrlita dve nasprotno orientirani β-lasnici, s katerima se protein veže v mali žleb DNA. Predvidevajo, da so Alba tako DNA- kot tudi RNA-vezavni proteini. V prid hipoteze, ki predvideva tudi vezavo na RNA, govori dejstvo, da so ob imunskem označevanju proteina Alba v celici ugotovili največjo koncentracijo proteina v citoplazmi in ne v nukleoidu, po čemer lahko sklepamo, da je protein Alba vezan večinoma na molekule RNA (Bohrmann in sod., 1994). Dodatno so ugotovili, da je afiniteta proteina Alba za RNA podobna afiniteti za ssDNA in dsDNA. Kompleksi DNA ali RNA in Alba ob tretiranju z DNazo ali RNazo razpadejo. Predvidevajo, da Alba nastopajo tudi v vlogi šaperonov RNA (Guo in sod., 2003; Marsh in sod., 2005).



Slika 6: Elektronski mikrograf proteina Alba, izoliranega iz hipertermofila *Sulfolobus solfataricus*. Protein Alba je na linearno Φ X174 plazmidno dsDNA vezan v obliki homo- in heterodimerov (Jelinska in sod., 2005).

Figure 6: Electromicrograph of Alba protein, isolated from hypertermophylic archaea *Sulfolobus* solfactaricus. Alba proteins form homo- and heterodimmers when bound to linear Φ X174 plazmid dsDNA (Jelinska in sod., 2005).

Sinteza proteinov Alba zavzema velik del proteinske sinteze v celici, saj predstavljajo 5 % celotnih proteinov. Alba2 zavzema približno 5 % sinteze oz. količine proteina Alba1. Predvidevajo, da so koncentracije Alba1 in vivo približno 500 µM, koncentracije Alba2 pa 25 µM. S tehnikama jedrske magnetne resonance (ang. "nuclear magnetic resonance", NMR) in izotitracijske kalorimetrije (ang. "isotitration calorimetry", ITC) je bilo pokazano, da Alba2 vedno nastopa kot heterodimer z Alba1 (Jelinska in sod., 2005). Alba1 homodimer se v primerjavi z Alba2 veže na DNA z 10- do 20-krat večjo afiniteto, kar kaže, da ima Alba2 monomer manjšo afiniteto za DNA kot monomer Alba1. Fiziološko pomemben heterodimer Alba1-Alba2 veže DNA s podobno afiniteto kot acetilirani homodimer Alba1, kar kaže na to, da vloga Alba2 verjetno ni neposredno povezana s spremembami v K_D za DNA. Alba2 ima najverjetneje vlogo pri uravnavi tvorbe kompleksov Alba-DNA preko vezave v heterodimer. Sprememba v afiniteti Alba1 za DNA v acetilirani in neacetilirani obliki je približno 4-kratna, torej manjša, kot so predvidevali v starejši literaturi, npr. Guo in sod. (2003). Razlika acetiliranega ter neacetiliranega heterodimera Alba1 in Alba2 v afiniteti za 16 bp ter 39 bp dolg odsek dsDNA je enaka, iz česar se da sklepati, da acetilacija proteina Alba ne vpliva neposredno na afiniteto proteina za DNA, marveč služi kot molekularni signal za druge proteine. Z elektronsko mikroskopijo (ang. "electron microscopy", EM) so ugotovili, da ob nižjih koncentracijah Alba lahko povezuje dve molekuli DNA, ob višjih razmerjih DNA in proteina pa se začne

tvoriti visoko razvejena kondenzirana struktura (Lurz in sod., 1986; Jelinska in sod., 2005) (Slika 6).

Kot nakazuje že samo ime, je aktivnost proteinov Alba uravnavana z reverzibilno acetilacijo, ki poteka na aminokislinskem ostanku lizin na mestu 16 (Lys¹⁶), acetilacija za nekajkrat zniža afiniteto proteina za DNA. Acetilacijo omogočajo homologi proteinov Pat, deacetilacijo pa histonske deacetilaze Sir2. Lahko bi rekli, da je ta lastnost proteinov Alba skupna točka s histoni, saj so tudi ti uravnavani preko acetilacije repnih delov molekule, acetilacija histonov je namreč bistvena za rahljanje oz. razpad kromatina pri evkariontih (Bell in sod., 2002; Marsh in sod., 2005). Acetilaciji proteinov Alba pripisujejo dve vlogi: regulacijo vezave na DNA ter uravnavo vezi med enotami filamentov dimerov Alba (Lurz in sod., 1986; Jelinska in sod., 2005). Mogoča vloga acetilacije pred ostalima dvema je tudi signalizacijska kaskada za ostale proteine, ki uravnavajo polimerizacijo proteinov Alba na DNA. Prav tako v prid tej teoriji govori dejstvo, da so Lys¹⁶ v dimerih Alba znotraj tetramera tesno skupaj, kar posledično vpliva na stabilizacijo di- oz tetramera ter na afiniteto vezave na DNA. Če je Lys¹⁶ zamenjan z drugo aminokislino, do dimerizacije ne pride (Zhao in sod., 2003). Lys¹⁶ leži tudi na mestu, kjer se protein veže na molekulo DNA (Kumarevel in sod., 2007).

V prisotnosti dsDNA se proteini vežejo kooperativno brez očitne specifičnosti za zaporedje. Ob nižjih koncentracijah se 1 molekula Alba veže na 12 bp dsDNA, ob nadaljevanju vezave pa pride 1 molekula proteina na 6 bp DNA. Predvidevajo, da je preko vezave proteinov Alba1 in Alba2 v heterodimer omogočena organizacija kromatina na višji ravni (Lurz in sod., 1986; Xue in sod., 2000; Kumarevel in sod., 2007).

2.3.2.1 Proteini Alba v arheji Aeropyrum pernix

V arheji *A. pernix* najdemo dve zaporedji za proteine Alba, APE 1832.1 (Alba1) in APE 1823 (Alba2). Zaporedji sta verjetno nastali s podvojitvijo gena (Aravind in sod., 2003). Alba1 je velik 94 aminokislinskih ostankov (AK) oz. 10336 Da in ima teoretično izoelektrično točko (pI) 9,5. Drugi protein, ki uravnava strukturo kromatina – Alba2, je velik 102 AK oz. 11380 Da z pI 9,1. Strukturno sta proteina podobna (kakor tudi večina proteinov Alba) C-terminalni domeni bakterijskih iniciacijskih faktorjev transkripcije (IF3) (Biou in sod., 1995; Wardleworth in sod., 2002; Kumarevel in sod., 2007; ExPASy, 2008).

Sekundarna struktura proteinov Alba v arheji *A. pernix* je iz dveh α -vijačnic in treh β -trakov, ki si sledijo v zaporedju α 1- β 1- α 2- β 2- β 3 (Slika 7). AK, ki so v α 2, β 2 in β 3 so odgovorne za dimerizacijo proteina preko H-vezi ter hidrofobnih interakcij. Z ¹H-¹⁵N HSCQ NMR je bilo pokazano, da je pri stehiometriji 1 : 1 Alba1 : Alba2 v raztopini 99 % proteinov v obliki heterodimera. Poravnave zaporedij so razkrile, da pri proteinu Alba2 igra vlogo Lys¹⁶ mesta za acetilacijo verjetno AK ostanek arginin na mestu 13 (Arg¹³) (Jelinska in sod., 2005; Kumarevel in sod., 2007).



Slika 7: Shematska predstavitev sekundarne strukture proteinov Alba1 (levo) in Alba2 (desno), izoliranih iz arheje *Aeropyrum pernix* (ExPASy, 2008).

Figure 7: Secondary structure of Alba1 (left) and Alba2 (right) proteins isolated from *Aeropyrum pernix* (ExPASy, 2008).

Zanke (β -zavoji) L1, L3 in L5 so verjetno pomembne pri vezavi proteina na DNA. V zanki L1 proteina Alba2 sta locirana Arg¹³ in Lys¹⁴ (verjetno ekvivalenta Lys¹⁶ oz. Lys¹⁷ v drugih proteinih Alba). Ta dva ostanka sta pomembna tako za acetilacijo kot tudi za vezavo na DNA. L1 verjetno z dupleksom DNA interagira ob straneh (Kumarevel in sod., 2007). V zanki L3 najdemo dve ohranjeni, pozitivno nabiti AK (Arg⁴⁰ in Arg⁴²), ki posredujeta pri vezavi proteina z verjetno velikim žlebom DNA. Zanka L5 v Alba2 je malce daljša kot pri ostalih proteinih Alba (6 AK), zato zavzame drugačno konformacijo. Zaradi vsebnosti pozitivno nabitih AK v zanki L5 je ta tudi verjetno vpletena v vezavo proteina v mali žleb molekule DNA. Za razliko od ostalih proteinov Alba so pri strukturi arheje *A. pernix* Alba2 ugotovili, da vsebuje potencialni cisteinski mostiček med Cys³ (v zanki L1) in Cys⁹⁴ (v β 3). Cisteinski mostiček verjetno stabilizira N-terminalni del ter prispeva k večji skupni termostabilnosti molekule. Čeprav je zaporedje AK Alba zelo ohranjeno, pa se zanke v strukturi od proteina do proteina razlikujejo. (Mallick in sod., 2002; Wardleworth in sod., 2002; Kumarevel in sod., 2007)

V literaturi zasledimo, da se proteini Alba nespecifično vežejo na različna zaporedja DNA. Čeprav strukturno ni znano, kako poteka vezava proteinov na DNA, se predvideva, da se proteini vežejo na dvojne vijačnice B-DNA (Lurz in sod., 1986; Xue in sod., 2000; Mallick in sod., 2002; Wardleworth in sod., 2002; Wang in sod., 2003; Jelinska in sod., 2005). Kumarevel in sod. (2007) ter Walderworth in sod. (2002) poročajo o afiniteti Alba2 za dsDNA, ki je v območju nanomolarnih do mikromolarnih konstant disociacij. S poskusi so ugotovili, da je afiniteta za 16 bp in 39 bp dolgo dsDNA približno enaka (K_d za 16 bp je 1 μ M, za 39 bp pa 0,74 μ M), pridobljene afinitete so primerljive z afinitetami drugih proteinov Alba za DNA. Za vezavo dimera proteina Alba pa je potrebno vsaj 21 baznih parov (Kumarevel in sod., 2007). Proteini Alba pri visokih temperaturah (\geq 45 °C) lahko v molekuli DNA vzdržujejo negativno supernavitje molekule, kar tudi igra vlogo pri pakiranju DNA. Do vnašanja supernavojev v molekulo DNA pri višjih temperaturah prihaja, ko koncentracija proteina Alba preseže kritično vrednost (Xue in sod., 2000; Jelinska in sod., 2005).

2.4 FLUORESCENČNA BARVILA IN HIPERTERMOFILNE ARHEJE

Rigidnost membrane hipertermofilnih arhej izhaja iz sestave lipidov v membranah. Ti vsebujejo etrsko vezane fitanilne verige namesto estrsko vezanih maščobnih kislin, ki jih najdemo v membranah bakterij in evkariontov. Membrane hipertermofilov so posledično, še posebej pri sobnih temperaturah, manj prepustne.

Za razliko od kultivacijskih tehnik, ki so časovno potratne, lahko kot alternativo za ločevanje med živimi in mrtvimi celicami uporabljamo kombinacije različnih fluorescenčnih barvil (ang. multicolor staining approach). Populacije celic tako navadno ločujemo s fluorescenčno mikroskopijo ali pretočno citometrijo. Za ta namen se navadno uporabljajo fluorescenčna barvila, ki specifično obarvajo ene in druge celice (Huber in sod., 1985; Haidinger in sod., 2003). Teoretično lahko s takim načinom barvanja celic ločimo 4 populacije: reproduktivno viabilne, metabolično aktivne, intaktne ter premeabilizirane (Nebe-von Caron in sod., 1998; Hewitt in Nebe-Von-Caron, 2001; Alakomi in sod., 2005).

Zaradi neprepustnosti membran arhej fluorescenčna barvila navadno slabše razlikujejo med živimi in mrtvimi celicami. Testiranje delovanja različnih barvil s hipertermofili je pokazalo, da je barvilo DiBAC₄(3) najustreznejše. Barvilo, ki selektivno obarva samo depolarizirane celice, predstavlja univerzalno učinkovito barvilo za razločanje živih celic od mrtvih (Beck in Huber, 1997; de Poorter in Keltjens, 2001; Alakomi in sod., 2005). Za halofilne arheje so v ta namen uporabljali tudi komercialni komplet Live/Dead BacLightTM (Berney in sod., 2007). Komplet vsebuje dve barvili, Syto9 ter propidijev jodid (Leuko in sod., 2004).

Preučevali smo 4 fluorescenčna barvila: Hoechst 33258, DAPI, akridin oranž ter DiBAC₄(3) (Slika 8). Barvili Hoechst 33258 in DAPI se povežeta z DNA preko malega žleba vijačnice DNA, imata visoko specifičnost vezanja na dele DNA z visoko vsebnostjo adenina in timina (Breusegem in sod., 2002; Kiser in sod., 2005). Akridin oranž se veže z DNA in RNA preko elektrostatskih interakcij (Kapucinski in Darzynkiewicz, 1990). DiBAC₄(3) je anionsko barvilo, ki je občutljivo na membranski potencial in sledi Nernstovemu ravnotežju (Bräuner in Huber, 1984).



Slika 8: Strukturne formule fluorescenčnih barvil (A) Hoechst 33258, (B) DAPI, (C) akridin oranž ter (D) DiBAC₄(3) (Invitrogen, 2008).

Figure 8: Structure of fluorescent dyes (A) Hoechst 33258, (B) DAPI, (C) acridine orange and (D) DiBAC₄(3) (Invitrogen, 2008).

Barvila, ki vstopijo v celico, vplivajo na posamezne komponente celice, kot so ribosomi, DNA, RNA, membrane in proteini. Zaradi vezave barvil na posamezne komponente celic lahko opazujemo tudi spremembe v njihovi termični stabilnosti. S tehniko diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC, and. differential scanning calorimetry) smo opazovali vpliv posameznih barvil na termično stabilnost DNA (Črnigoj in sod., 2008). Vrhovi DNA v termogramu DSC so lahko večkrat prekriti z vrhovi drugih celičnih komponent. Zaradi sposobnosti renaturacije DNA lahko s tehniko predgretja vzorcev celic do določene temperature dosežemo denaturacijo ostalih, za meritev motečih komponent (npr. ribosomov), medtem ko se vrh, ki pripada celični DNA, zaradi renaturacijskih sposobnosti ohrani (Milek in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE



Slika 9: Hodogram poteka poskusov. Figure 9: Experiment flow chart.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

agar agaroza 30-odstotni akrilamid/bis-akrilamid β-alanin amonijev acetat (CH₃COONH₄) amonijev sulfat $((NH_4)_2SO_4)$ amonijev persulfat ((NH₄)₂(SO₄)₂; APS) ampicilin Bactotripton borova kislina bromfenolno modrilo CaCl₂ citronska kislina Comassie briljantno modrilo ditiotreitol (DTT) 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzojska kislina) (DTNB) **EDTA** etanol fenol filtri ($0,2 \mu m$ in $0,45 \mu m$) Fluorescenčna barvila: Hoechst 33258 DAPI akridin oranž

Roth, Nemčija SeaKem, ZDA Sigma, ZDA Sigma, ZDA Kemika, Hrvaška Merck, Nemčija Sigma, ZDA Sigma, ZDA Difco, Francija Šabac, Srbija Merck, Nemčija Merck, Nemčija Merck, Nemčija Bio-Rad, ZDA Sigma, ZDA Sigma, ZDA Kemika, Hrvaška Merck, Nemčija Sigma, ZDA Sartorius, Švedska Invitrogen, ZDA Invitrogen, ZDA

Invitrogen, ZDA

 $DiBAC_4(3)$ Live/Dead BacLight Komplet glicerol glicin glukoza goveji serumski albumin (BSA) gvanidinijev izotiocianat HC1 HEPES histoni H7755 imidazol **IPTG** izopropanol kakodilna kislina/sol kanamicin KH₂PO₄ kloroform kromžveplena kislina kvasni ekstrakt Lambda DNA/PstI Marker Marine Broth 2216 metanol natrijev acetat (CH₃COONa) NaCl NaDS $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ NaOH $Na_2S_2O_3 \times 5H_2O$ ocetna kislina P20 PageRuler Prestained Protein Ladder $poli(dA-dT) \cdot poli(dA-dT)$ $poli(dG-dC) \cdot poli(dG-dC)$ Sensor Chip SA (Series S) SimplyBlue Safe Stain TCA (tri klor ocetna kislina) TEMED Tris-HCl Triton X-114

Invitrogen, ZDA Invitrogen, ZDA Kemika, Hrvaška Merck, Nemčija Kemika, Hrvaška Sigma, ZDA Merck, Nemčija Merck, Nemčija Sigma, ZDA Sigma, ZDA Sigma, ZDA Merck, Nemčija Kemika, Hrvaška Roth, Nemčija Roth, Nemčija Merck, Nemčija Kemika, Hrvaška Kemika, Hrvaška Difco, Francija Fermentas, Kanada Difco, Francija Merck, Nemčija Kemika, Hrvaška Sigma, ZDA Sigma, ZDA Kemika, Hrvaška Merck, Nemčija Merck, Nemčija Merck, Nemčija GE Healthcare, Švedska Fermentas, Kanada Invitrogen/Sigma, ZDA Invitrogen/Sigma, ZDA GE Healthcare, Švedska Invitrogen, ZDA Merck, Nemčija Sigma, ZDA Sigma, ZDA Sigma, ZDA

3.1.2 Raztopine

3.1.2.1 Raztopine za agarozno elektroforezo

Pufer TBE (10x)

900 mM Tris-HCl 0,9 M borova kislina 20 mM EDTA pH 8,0

Nanašalni pufer (6x)	20 % Ficoll 20 mM EDTA 0,15 % (w/v) bromfenolno modrilo 0,15 % (w/v) ksilen cianol	
3.1.2.2 Raztopine za elektroforezo NaDS-F	PAGE	
Pufer za NaDS-PAGE (5x)	0,12 M Tris 1 M glicin 0,1 % (w/v) NaDS	
Nanašalni pufer za NaDS-PAGE (6x)	280 mM Tris-HCl 10 % (w/v) NaDS 30 % (v/v) glicerol 0,0012 % (w/v) bromfenolno modrilo 0,5 M DTT pH 6,8	
Raztopina za barvanje	10 % ocetna kislina (v/v) 40 % metanol (v/v) 0,5 % Comassie briljantno modrilo (w/v)	
Raztopina za razbarvanje	10 % ocetna kislina (v/v) 40 % metanol (v/v)	
3.1.2.3 Raztopine za nativno elektroforezo PAGE		

Kisle agarozne blazinice	2,0 g agaroza
	4,4 g β-alanin
	4,0 mL ocetna kislina
	95 mL mQ voda

3.1.2.4 Raztopine za izolacijo rekombinantnih proteinov

Pufer za lizo (Ni-NTA)

50 mM NaH₂PO₄ 300 mM NaCl 10 mM imidazol <u>pH 8,0</u> 10 μg/ml DNaza 20 μg/ml RNaza 1,0 mg/ml lizocim 0,1 % Triton X-114 (v/v)

Pufer za afinitetno kromatog	grafijo Ni-NTA
spiranje	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl
	20 mM imidazol
	pH 8,0
elucija	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl
	250 mM imidazol
	pH 8,0
Pufer za ionsko izmenjevaln	o kromatografijo (FPLC)
vezavni	$50 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$
(filtrirano, odzračeno)	<u>pH 8,0</u>

(Internatio, ouzraceno)	рп 8,0
elucijski	50 mM NaH ₂ PO ₄
(filtrirano, odzračeno)	1,0 M NaCl
	рН 8,0

3.1.2.5 Raztopina za CD-spektroskopijo

50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)

3.1.2.6 Raztopina za SPR

50 mM NaH₂PO₄ 150 mM NaCl 0,005 % P20 pH 7,0

3.1.2.7 Raztopina za DSC

10 mM HEPES 260 mM NaCl pH 7,0

3.1.2.8 Raztopina za mikroskopiranje

10 mM HEPES 513 mM NaCl pH 7,0

3.1.2.9 Raztopina za določanje prostih skupin -SH

10 mM DTNB (5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzojska kislina))

3.1.3 Gojišča

Medij LB, LBAp, LBApKn	10 g/L Bactotripton
	5 g/L kvasni ekstrakt
	10 g/L NaCl
	100 μg/mL ampicilin (Ap)
	30 µg/mL kanamicin (Kn)
Avtoklavirano. Za pripravo LBAp in	LBApKn dodamo antibiotike tik pred uporabo v
ohlajen medij.	

Trdni mediji: LBAp, LBApKn

Pred avtoklaviranjem dodamo 15 g agarja /1 L medija LB (1,5 % (w/v)). V zmerno ohlajen medij (50 °C) po potrebi dodamo antibiotike in vlijemo v sterilne petrijevke.

Gojišče Marine Broth	37,4 g/L Marine Broth 2216 1,0 g/L Na ₂ S ₂ O ₃ × 5H ₂ O 4,77 g/L HEPES pH 7,0
Minimalno gojišče	0,4 g/L MgSO ₄ × 7H ₂ O 7,88 g/L KH ₂ PO ₄ 9,97 g/L K ₂ HPO ₄ 7 g/L NaNH ₄ HPO ₄ × 4H ₂ O pH 7,0
Gojišče 2YT	16 g/L Bactotripton 10 g/L Kvasni ekstrakt 5 g/L NaCl pH 7,0
3.1.4 Encimi	
BamHI	Fermentas, Kanada
BglII	Fermentas, Kanada
DNaza B	Fermentas, Kanada
DNaza I	Fermentas, Kanada
EcoRI	Fermentas, Kanada
Lizocim	Serva, Nemčija
Ndel	Fermentas, Kanada
PSII DNozo A	Fermentas, Kanada
KINAZA A TA DNA ligozo	Fermentas, Kanada
Taq DNA polimeraza	Fermentas, Kanada

3.1.5 Uporabljeni kompleti

Komplet za določanje koncentracije proteinov po metodi BCA – "BCA Protein Assay Reagent A/B" (Smith in sod., 1985; Sorensen, 1992)	Pierce, ZDA
Komplet za določanje koncentracije proteinov po metodi "Bradford" – "Bio-Rad Protein Assay" (Bradford, 1976)	Bio-Rad, ZDA
Komplet za izolacijo DNA iz agaroznega gela "QiaQuick Gel Extraction Kit" (Vogelstein in Gillespie, 1979)	QiaGen, ZDA
Komplet za izolacijo DNA iz agaroznega gela/produktov PCR "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" (Zimmermann in sod., 1998)	Promega, ZDA
Komplet za čiščenje produktov PCR "QiaQuick PCR Purification Kit" (Hamaguchi in Geiduschek, 1962)	QiaGen, ZDA
Komplet za izolacijo plazmidne DNA "Gene Elute" "GeneJet" (Bimboim in Doly, 1979)	Sigma, ZDA Fermentas, Kanada
Komplet za transformacijo bakterij "TransformAid – Bacterial Transformation Kit"	Fermentas, Kanada
Komplet za določanje živosti celic BacLight [™] , Bacterial Viability Kits (Berney in sod., 2007)	Invitrogen, ZDA

3.1.6 Polnilci kromatografskih kolon in pripravljene kromatografske kolone

Ni-NTA agaroza	QiaGen, ZDA
Superdex 75 HR 10/30	Pharmacia, Švedska
Mono S TM HR 5/5 (FPLC)	Pharmacia, Švedska

3.1.7 Laboratorijska oprema

aparatura za agarozno elektroforezo	Powerpac1000, Bio-Rad, ZDA
aparatura za CD-spektroskopijo	62A DS, Aviv, Lakewood, New Jersey, ZDA
aparatura za SPR	Biacore T100, Švedska
aparatura za DSC	Setaram, Francija in
-	N DSC III, Calorimetry Science Corp., ZDA
aparatura za FPLC	ÄktaFPLC, Pharmacia, Švedska

aparatura za PCR	Gene Amp PCR System 2400,
aparatura za elektroforezo NaDS-PAGE	Mini-PROTEAN II system, Bio-Rad, ZDA
aparatura za nativno elektroforezo	PhastSystem, Pharmacia, Švedska
centrifuge	Eppendorf 5415C, Nemčija
	Rotanta 460R, Hettich, Nemčija
magnetno mesalo	Tehtnica Rotamix S-10, Slovenija
DIC/Fluorescenční mikroskop	Axio Imager Z.1 (Zeiss, Nemčija)
pH-meter	H-221, Hanna instruments, Anglija
vodna kopel	KambičWB-30 STE, Slovenija
sonikator	MSE 150 W Ultrasonic Disintegrator Mk2,
	MSE Scientific Instruments, Anglija
spektrofluorimeter	VarianCary Eclipse, Avstralija
spektrofotometri	Hewlet Packard 8453, ZDA
	Varian Cary 100 Bio, Avstralija
stresalnik	KambičWB-30 STE, Slovenija
3.1.8 Bakterijski sevi	
Escherichia coli DH5α	F ⁻ , <i>end</i> A1, <i>gyr</i> A96, <i>thi</i> -1, <i>hsd</i> R17(r_{K}^{-} , m_{K}^{+}), <i>sup</i> E44, <i>rel</i> A1, F 80D <i>lac</i> ZD M15, D (lacZYA-argF),U169

Za sev sta značilna visoka učinkovitost transformacije in visok donos plazmidov ob izolaciji. Sev smo uporabljali za kloniranje in namnoževanje plazmidov.

Escherichia coli JM109	endA1, gyrA96, hsdR17($r_{K}^{-}m_{K}^{+}$), mcrB ⁺ , recA1, relA1, supE44, thi-1, Δ (lac-proAB), F'[traD36, proAB, lacI ^q Z Δ M15]
Escherichia coli M15(pREP4)	NaI ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ ,Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ (QIAgen)
Escherichia coli BL21(DE3)	B, F ⁻ , dcm, ompT, hsdS($r_{\rm B}^{-}m_{B}^{-}$), gall(DE3)

Sev BL21(DE3) je izpeljava seva B bakterije *E.coli*. V gen *int* ima vstavljen fragment DNA, ki nosi gen za RNA-polimerazo faga T7, promotor *lacUV5* in *lacI* (kodira represor gena lac, ki nadzira promotor *lacUV5*). Tako sev BL21(DE3) omogoča visoko raven izražanja rekombinantnih proteinov, ki so zapisani na vektorjih s promotorjem T7. Sintezo ekspresijskega proteina sprožimo z dodatkom IPTG-ja v gojišče, ki omogoči prepis T7 RNA-polimeraze.

Poleg tega sta pri tem sevu okvarjena gena *lon* in *ompT*, ki kodirata proteaze, ki bi lahko razgradile rekombinantne proteine.

Escherichia coli BL21(DE3)pLysS

B, F⁻, *dcm*, *ompT*, *hsd*S_B($r_{B}^{-}m_{B}^{-}$), *gal*(DE3) [pLysS Cam^r]

Različica seva BL21(DE3) z dodatnim plazmidom zagotavlja prisotnost večjih količin lizocima T7, naravnega inhibitorja T7 RNA-polimeraze. S tem je omogočena večja kontrola indukcije izražanja in sinteze rekombinantnega proteina.

3.2 METODE

3.2.1 Elektroforeza

3.2.1.1 Agarozna elektroforeza

Agarozno elektroforezo smo uporabljali za preverjanje ustreznosti velikosti fragmentov DNA pri postopkih kloniranja ter za izolacijo fragmentov določene dolžine (rezanje lis DNA iz gela). DNA smo po končani elektroforezi vizualizirali z etidijevim bromidom (Sambrook in Russel, 2001).

Elektroforezo smo uporabljali še za metodo elektroforeznega zamika (ang. "Electrophoretic mobility shift assay", EMSA). Tehnika EMSA temelji na dejstvu, da proteinov prosta DNA v elektroforezi potuje hitreje od DNA, vezane v komplekse s proteini. Posledično prihaja pri DNA, na katero so vezani proteini, do zaostanka v potovanju po gelu. Prednost te tehnike je, da ni potrebna popolna čistost proteinskega vzorca, če ni drugega DNA-vezavnega proteina ali proteina, ki vpliva na vezavo. S tehniko lahko določimo približno stehiometrijo vezave proteina na DNA. Ob prehodu kompleksa DNA-protein v gel se ločita DNA z vezanim proteinom in DNA brez vezanega proteina. Posledično se, ko ni doseženo nasičenje DNA, na elektroforetskem gelu ločita dve lisi, lisa DNA ter lisa DNA z vezanim proteinom (Sambrook in Russel, 2001).

V poskusu EMSA smo lineariziranemu plazmidu (pUC19/*Eco*RI) dodali protein Alba1, Alba2 ter kompleks obeh (1 : 1) v naraščajočih koncentracijah proteina, kot negativno kontrolo smo uporabili samo linearizirani plazmid brez dodanih proteinov. Protein z DNA smo inkubirali 1 uro na sobni temperaturi in na 50 °C. Elektroforeza je potekala pri napetosti 1 V/cm.

Kot standard smo uporabljali Lambda DNA/PstI Marker proizvajalca Fermentas (λ /PstI).

3.2.1.2 Elektroforeza NaDS

Z elektroforezo NaDS smo spremljali faze čiščenja rekombinantnih proteinov Alba1 in Alba2. Elektroforeza (Laemmli, 1970) je potekala v aparaturi Mini Protean II Cell (BioRad) v gelih debeline 0,75 mm. Gel sta sestavljala ločevalni gel različnih zamreženosti in 4-odstotni nanašalni gel. V preglednici 1 so navedene količine raztopin, ki smo jih uporabili za pripravo akrilamidnih gelov NaDS:
	4 %	10 %	12 %	15 %	18 %	20 %
dH2O	2,033 mL	1,34 mL	1,117 mL	0,893 mL	0,466 mL	0,245 mL
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	0,833 mL					
10 % (w/v) SDS	33 µL	33 µL	33 μL	33 µL	33 μL	33 µL
30 % aa/bis-aa	0,433 mL	1,1 mL	1,333 mL	1,65 mL	1,98 mL	2,2 ml
10 % APS	16,7 μL					
TEMED	1,7 μL	1,7 µL				
V _{TOT}	3,33 mL					

Preglednica 1: Sestava akrilamidnih gelov NaDS različnih zamreženosti.
Table 1: Composition of SDS-acrilamide gels at different degrees of polimerisaion.

Vzorcem smo pred nanosom na elektroforezo dodali 1/6 volumna nanašalnega pufra za NaDS-PAGE (6x), jih 10 min inkubirali v vreli vodi ter nato ohladili v ledeni kopeli.

Proteina Alba1, Alba2 ter kompleks Alba1/Alba2 smo nanesli na elektroforezo NaDS, brez reducenta (DTT), da bi raziskali vpliv reducenta na proste skupine –SH ter njihovo potencialno vlogo pri oligomerizaciji proteinov.

3.2.1.3 Nativna elektroforeza

Nativno elektroforezo smo izvedli na sistemu PhastSystem (Švedska). Uporabili smo homogen 20-odstotni gel istega proizvajalca. Elektroforezo smo izvedli s kislimi agaroznimi blazinicami. Vzorec je potoval proti negativno nabiti elektrodi (reverzna elektroda). Kot protein za primerjavo smo uporabili ekvinatoksin II, ki je velik 19,82 kDa in ima pI 10,5 in je po pričakovanjih primerljiv z lastnostmi proteinov Alba arheje *Aeropyrum pernix* (Hames, 1990).

3.2.2 Gojenje hipertermofilne arheje Aeropyrum pernix in izolacija genomske DNA

3.2.2.1 Gojenje arheje Aeropyrum pernix v tekočem gojišču

Gojenje je potekalo na dva ekvivalentna načina.

- Prvi način gojenja mikroorganizma je potekal v erlenmajericah v vodni kopeli s stresalnikom (Kambič). Metoda je omogočala gojenje manjših volumnov (do 0,1 L) z več hkratnimi paralelkami.
- Drugi način gojenja mikroorganizma je potekal v aerobnem bioprocesu z enkratnim polnjenjem v steklenici z mešanjem (Milek in sod., 2005). Način je omogočal gojenje večjih količin biomase kot prvi (volumen brozge do 0,8 L), vendar smo lahko izvedli le eno gojenje hkrati.

Prirast biomase smo pri obeh gojenjih spremljali preko optične gostote pri 650 nm (OD₆₅₀).

3.2.2.2 Izolacija genomske DNA arheje Aeropyrum pernix

Genomsko DNA (gDNA) arheje *A. pernix* smo izolirali iz kulture v pozni eksponentni fazi. Celice smo od gojišča ločili s 15-minutnim centrifugiranjem pri pospešku 4000×g in 4 °C. DNA smo izolirali po standardni metodi za izolacijo DNA (Pitcher in sod., 1989). Nato smo dobljeno DNA čistili še z več zaporednimi kloroform-fenolnimi ekstrakcijami do stopnje, ko je interfaza nečistoč med ekstrakcijo popolnoma izginila (do 10 kloroformfenolnih ekstrakcij). Čistost dobljene DNA smo preverjali z razmerjem absorbanc pri 260 nm in 280 nm, razmerje $A_{260/280}$ očiščene DNA je bilo $1,73 \pm 0,02$. Koncentracijo DNA smo določili spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 260 nm in 25 °C, uporabili smo ekstinkcijski koeficient, podan na mol baznih parov $\xi_{260} = 12800 \text{ (cm}\cdot\text{Mbp)}^{-1}$.

3.2.3 Priprava in izolacija rekombinantnih proteinov Alba

3.2.3.1 Namnoževanje in izolacija plazmidov

Plazmide smo transformirali v bakterijo *Escherichia coli* DH5α, namnožili celice v prekonočni kulturi LB z ustreznim antibiotikom (Sambrook in Russel, 2001). Vsi uporabljeni plazmidi so bili izolirani s kompletom za izolacijo plazmidne DNA proizvajalca Promega (Wizard^R SV Gel and PCR Clean-Up System) (Zimmermann in sod., 1998) oziroma proizvajalca QIAquick (Gel Extraction Kit) (Vogelstein in Gillespie, 1979).

3.2.3.2 Kloniranje

Kompetenco uporabljenih sevov bakterije *Escherichia coli* smo vzbudili s kompletom za vzbujanje kompetence bakterij proizvajalca Fermentas (TransformAidTM, Bacterial Transformation Kit).

3.2.3.2.1 Namnoževanje plazmidov

Plazmid pQE-30 UA smo pred vnašanjem v sevu za izražanje genov bakterije *Escherichia coli* M15 namnožili v sevu JM109, plazmid pETDuet pa smo namnožili v sevu DH5α, za ekspresijo smo uporabili sev bakterije *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Sambrook in Russel, 2001).

3.2.3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Zaporedji DNA proteinov Alba1 (APE1832.1) in Alba2 (APE1823) smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (ang. "polimerase chain reaction", PCR). V vseh reakcijah je bila kot matrična DNA uporabljena gDNA arheje *Aeropyrum pernix* (Bartlett in Stirling, 2003).

Za pomnoževanje gena za Alba1 in Alba2 smo uporabili naslednji program PCR:



3.2.3.2.3 GST-označeni produkti

Za izražanje APE1823 in 1832.1 smo uporabili fuzijo zaporedja proteina z označevalnikom glutation-S-transferazo (GST), ki je že bil vsebovan v plazmidu pGEX. Gena za proteina smo pomnožili s PCR. Uporabili smo naslednje oligonukleotidne začetnike (preglednica 2):

- Alba1 (APES060): APES060-F in APES060-R
- Alba2 (APE1823): APE1823-F in APE1823-R

Preglednica 2: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje genov proteinov Alba1 in Alba2 v ekspresijskem vektorju pGEX.

oligonukleotidni začetnik	zaporedje oligonukleotidnega začetnika	lastnosti
APES060-F	5'- TCgTgAggATCCATgTACAgCgTAgTgTCg -3'	BamHI, 30 bp, $T_m = 67 \ ^\circ C$
APES060-R	5'- CCgggAgAATTCCCCTAgCCTTTAgCAAC -3'	<i>Eco</i> RI, 29 bp, stop kodon, $T_m = 67 ^{\circ}\text{C}$
APE1823-F	5'- TAATgAggATCCATggCATgTgAgggAgC -3'	<i>Bam</i> HI, 29 bp, T _m = 68 °C
APE1823-R	5'- TTCAgTgAATTCTTAggCAgACTCgCCCg -3'	<i>Eco</i> RI, 29 bp, stop kodon, $T_m = 67 ^{\circ}\text{C}$

Table 2: Used primers for amplification of Alba1 and Alba2 genes in expression vector pGEX.

3.2.3.2.4 His-Tag-označeni produkti

pQE-30 UA (QIAgen) (Slika 10): pQE-30 UA je ekspresijski plazmid odporen na ampicilin. Sintezo kloniranega produkta induciramo preko operona *lacO* z IPTG. Proteini, klonirani v multiplo mesto za kloniranje (ang. "multy cloning site", MCS), nosijo označevalnik His-Tag (zaporedje 6 histidinov) na N-terminalnem koncu. Protein ne vsebuje mesta za rezanje s proteazo. Proteina Alba1 in Alba2 smo v plazmid vnesli preko združenih MCS1 in MCS2. Zapis za proteina smo v plazmid vnesli preko restrikcijskih mest *BamHI* (MCS1) in *PstI* (MCS2). Uspešnost kloniranja smo preverili z restrikcijo ter z določanjem nukleotidnega zaporedja vnesenega fragmenta DNA. Za ekspresijo proteina smo uporabili ekspresijski sistem pQE-30 UA/*E. coli* M15.

Segment DNA, ki kodira proteina Alba smo vnesli v plazmid. Fragment smo iz genomske DNA (gDNA) arheje *Aeropyrum pernix* pomnožili s PCR. Uporabljeni so bili naslednji oligonukleotidni začetniki (preglednica 3):

- Alba1 (APE1832.1): APE1832.1-F (mesto *Bam*HI) in APE1832.1-R (mesto *Pst*I)
- Alba2 (APE1823): APE1823-F (mesto *Bam*HI) in APE1823-RPstI (mesto *Pst*I)

Preglednica 3: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje genov za proteina Alba1 in Alba2 v ekspresijskem vektorju pQE-30 UA.

oligonukleotidni začetnik	zaporedje oligonukleotidnega začetnika	lastnosti
APE1832.1-F	5'- gTAAgAggATCCATgTCgATAgAgCCgCAg -3'	<i>Bam</i> HI, 30 bp, T _m = 66 °C
APE1832.1-R	5'- CCCgCACTgCAgCTAgCCTTTAgCAACTAC -3'	PstI, 30 bp, stop kodon, $T_m = 68 ^{\circ}\text{C}$
APE1823-F	5'- TTAAgAggATCCATggCATgTgAgggAgC -3'	<i>Bam</i> HI, 29 bp, T _m = 67 °C
APE1823-RPstI	5'- TTACgACTgCAgTTAggCAgACTCgCCC -3'	$PstI, 28 \text{ bp}, stop kodon, T_m = 67 ^{\circ}\text{C}$

Table 3: Used primers for amplification of Alba1 and Alba2 genes in expression vector pQE-30 UA.



Slika 10: Shematski prikaz plazmida pQE-30 UA (QIAGEN-Worldwide, 2003). Figure 10: Schematic view of plasmid pQE-30 UA (QIAGEN-Worldwide, 2003).

pETDuet-1 (Novagen) (Slika 11): ekspresijski plazmid je odporen na ampicilin, sintezo kloniranih produktov pa ravno tako kot pri plazmidu pQE-30 induciramo z IPTG preko operona *lac*. Plazmid ima dve multiple meste za kloniranje (MCS). MCS1 vsebuje fuzijo z zaporedjem za označevalnik His-Tag na N-terminalnem delu produkta, MCS2 označevalnika His-tag ne vsebuje. Plazmid smo uporabili za izolacijo proteina Alba2 (APE1823) s koekspresijo obeh proteinov Alba v ekspresijskem sistemu pETDuet-1/*E. coli* BL21. Protein Alba1 smo klonirali v MCS2, Alba2 pa v MCS1, posledično je bil pri koekspresiji obeh proteinov z označevalkom His-Tag označen le protein Alba2.

Za pomnoževanje zaporedja za protein s PCR smo uporabili naslednje oligonukleotidne začetnike (preglednica 4):

Preglednica 4: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje genov za proteina Alba1 in Alba2 v ekspresijskem vektorju pETDuet.

Table 4: Used primers for amplification of Alba1 and Alba2 genes in expression vector pETDuet

oligonukl.	zaporedje oligonukleotidnega začetnika	lastnosti
začetnik		
APE1832.1-	5'-gTAAgACATATggTgTCgATAgAgCCgCAgAA-3'	<i>Nde</i> I, 32 bp,
F-NdeI		$T_m = 72 \ ^\circ C$
APE1832.1-	5'-CCCgCAAgATCTCTAgCCTTTAgCAACTACAATT-3'	<i>Bgl</i> I, 34 bp,
R-BglII		stop kodon, $T_m = 73 \text{ °C}$
APE1823-F-	5'-TTAAgAggATCCgATggCATgTgAgggAgCAC-3'	BamHI, 32 bp,
BamHI		$T_m = 75 \circ C$
APE1823-R-	5'-TTACgACTgCAgTTAggCAgACTCgCCCgC-3'	<i>Pst</i> I, 30 bp,
PstI		stop kodon, $T_m = 76 \ ^{\circ}C$



Slika 11: Shematski prikaz plazmida pETDuet-1 (Novy in sod., 2002). Figure 11: Schematic view of plasmid pETDuet-1 (Novy in sod., 2002).

3.2.3.2.5 Kontrola kloniranih konstruktov

Po uspešni transformaciji smo plazmide ponovno izolirali ter jih podvrgli enakim restrikcijskim reakcijam, s katerimi so bili pridobljeni, da smo preverili, ali se je vključek res vgradil v plazmid. Plazmidom smo določili tudi nukleotidno zaporedje (Microsynth, Macrogen), da smo izločili potencialne mutacije, do katerih bi lahko prišlo zaradi napak polimeraze Taq.

Alba1 (APE1832.1): APE1832.1-F-NdeI in APE1832.1-R-BglII

Alba2 (APE1823): APE1823-F-BamHI in APE1823-R-PstI

3.2.3.3 Izolacija in čiščenje proteinov Alba

Pred gojenjem večjih količin peptida smo opravili vrsto poskusov za optimizacijo samega postopka. Ekspresijski sev bakterije *Escherichia coli* smo tako gojili v različnih gojiščih (LB, minimalno gojišče, 2YT), ekspresijo smo aktivirali v različnih fazah eksponentne rasti, bakterije smo gojili različno dolgo po aktivaciji (1 h, 2, h 4 h in 10 h), za aktivacijo smo uporabili različne koncentracije IPTG (0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM in 2 mM) ter po aktivaciji gojili bakterije pri različnih temperaturah (21 °C, 37 °C in 46 °C).

3.2.3.4 Izolacija z Ni-NTA

Ob izolaciji proteina Alba1 smo uporabili standardne pufre za izolacijo Ni-NTA, pri proteinu Alba2 smo namesto 300 mM NaCl v vseh pufrih uporabili 500 mM NaCl.

Celično biomaso smo od gojišča ločili s centifugiranjem (4000×g; 20 min) ter jo resuspendirali v 3 mL pufra za lizo na gram mokre biomase. Suspenzijo smo inkubirali na ledu 1 uro ter jo nato sonicirali na ledu dvanajst intervalov s 30 sekundami soniciranja in 30 sekundami pavze pri 40-odstotni moči (Sonics, VCX750). Lizate smo trikrat zaporedno centrifugirali pri 17000×g; 20 min. Supernatantu smo dodali agarozo Ni-NTA po protokolu proizvajalca, jo inkubirali ob rahlem stresanju na ledu 1 uro ter jo nato dali v kolono ter počakali, da se je posedla. Posedeno agarozo Ni-NTA smo dvakrat zaporedoma sprali s 5 mL pufra za spiranje ter nadaljevali spiranje z elucijskim pufrom. Frakcijam z elucijo smo nato zamenjali pufer (ultrafiltracija z ultrafiltracijskimi centrifugirkami Amicon MWCO 3 kDa ali s precipitacijo proteina z 80-odstotnim amonijevim sulfatom) ter jih nato čistili s sistemom kolon (FPLC), inkubacijo pri višji temperaturi (80–90 °C; 30 min do 60 min), večkratnim zaporednim zamrzovanjem ali pri koekspresiji z dodatnim Ni-NTA čiščenjem.

3.2.3.5 Čiščenje s FPLC

Delno očiščen ter odzračen vzorec (po Ni-NTA čiščenju) z zamenjanim pufrom (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) smo nadalje čistili s sistemom Äkta FPLC. Vzorce smo nanesli na ionsko izmenjevalno kolono (Mono STM HR 5/5) ter jih spirali z gradientom 0 M–1,0 M NaCl (gradient do 100 %, 40 mL). Izbrane frakcije, ločene z ionsko izmenjevalno kromatografijo, smo nato nanesli na kromatografisko kolono z ločevanjem po velikosti (Superdex 75 HR 10/30).

3.2.3.6 Ultrafiltracija

Vzorci, očiščeni s sistemom Äkta FPLC, so vsebovali nekaj manjših nečistoč. Z ultrafiltracijo (Amicon in Centricon) pri različnih izključitvenih molskih masah (3 kDa, 30 kDa in 50 kDa) smo nečistoče deloma odstranili. Ultrafiltracijo smo uporabljali tudi za zamenjavo pufra vzorcev ter za njihovo koncentriranje.

3.2.3.7 Zamrzovanje, visoka temperatura

Z namenom odstraniti nekatere nečistoče smo vzorce po končanem postopku čiščenja večkrat zaporedno inkubirali v 10-minutnih intervalih na –20 °C ter na 90 °C (Kumarevel in sod., 2007). Postopek je obsegal 10 zaporednih temperaturnih šokov.

3.2.4 Spektroskopija UV-Vis

3.2.4.1 Karakterizacija proteinov Alba ter termična stabilizacija DNA s proteini Alba, histoni in NaCl

Absorpcija svetlobe v UV-območju je posledica prehodov π -elektronov aromatskih baz v molekuli DNA. V nativni strukturi molekule DNA (dsDNA) je absorpcija v primerjavi z absorpcijo denaturirane enovijačne DNA (ssDNA) manjša zaradi manjšega števila možnosti prehodoa π -elektronov pri prvi. Dvojna vijačnica je stabilizirana z vodikovimi vezmi in hidrofobnimi interakcijami med bazami nukleotidov. Pri večjih temperaturah prihaja do denaturacije DNA (ločevanje verig dsDNA v ssDNA), temu pojavu pravimo tudi taljenje DNA. Stabilnost DNA je odvisna od vsebnosti razmerja baznih parov G+C proti baznim parom A+T. Če je vsebnost G+C baznih parov višja, je dsDNA bolj termostabilna. Točko, v kateri je delež denaturiranih molekul enak deležu molekul v nativnem stanju, imenujemo temperatura taljenja (ang. "melting temperature", T_m).

T_m smo določali na dva načina (Sliki 12 in 13):

 na UV-termogramu smo grafično določili polovično razdaljo med platojema termograma v obliki sigmoidne krivulje (Slika 12),



Slika 12: Grafično določanje temperature taljenja (T_m) na UV-termogramu. Figure 12: Grafic determination of melting temperature (T_m) on UV-thermogram.

na UV-termogramu smo s prvim odvodom določili točko prevoja (Slika 13).



Slika 13: Določanje temperature taljenja (T_m) na UV-termogramu s prvim odvodom. Figure 13: Determination of T_m on UV-thermogram with the use of 1^{st} derivative.

Pri nadaljnjih meritvah smo uporabili različne molekule DNA: gDNA, izolirana iz govejega priželjca; poli(dA-dT) · poli(dA-dT); poli(dG-dC) · poli(dG-dC); DNA, izolirana iz mikroorganizmov *Aeropyrum pernix, Escherichia coli* in *Haloferax mediterranei*.

Vzorce različnih DNA v 5 mM kakodilatnem pufru pri pH 7,0 smo segrevali s hitrostjo 0,5 °C/min do 99 °C ter spremljali spremembo v absorpciji pri 260 nm (A_{260}). Vpliv različne ionske jakosti v raztopini na termično stabilizacijo DNA smo preučevali v priostnosti NaCl (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 65, 80, 100, 150, 200, 250, 500 mM).

Pozitivno nabiti proteini, histoni, se vežejo na dsDNA in jo tako stabilizirajo. Izbrane DNA smo v 10 mM acetatnem pufru (pH 5,0) inkubirali z govejimi histoni (H7755) pri 25 °C. Histone smo molekulam DNA dodajali v molarnih razmerjih histon : DNAbp od 1 : 2000 do 1 : 120. Vzorce smo po inkubaciji segrevali s hitrostjo 0,5 °C/min do 99 °C in merili absorpcijo pri 260 nm.

Pri enakih pogojih smo proučevali vpliv proteina Alba1, Alba2 ter kompleksa obeh proteinov na termično stabilnost zgoraj omenjenih DNA.

Iz pridobljenih T_m iz UV-talilnih krivulj smo za asociacijo proteinov Alba ter preučevanih molekul DNA izračunali navidezne konstante asociacije pri različnih molskih razmerjih Alba/DNAbp. Navidezne konstante asociacije ($K_{app}^{T_m}$) smo izračunali po enačbi 1 (Komoda in sod., 1982):

$$\frac{1}{T_{\rm m}^{0}} - \frac{1}{T_{\rm m}} = \frac{R}{n_{\rm D}(\Delta H_{\rm WC})} \ln \left[1 + (K_{\rm app}^{\rm T_{\rm m}}) a_{\rm WC}^{\rm B} \right] \qquad \dots (1)$$

V enačbi predstavljata T_m^0 in T_m temperaturo taljenja molekul DNA in molekul DNA v kompleksu s proteini v Kelvinih, *R* plinsko konstanto, izraženo v kalorijah, n_D molsko razmerje vezave proteina Alba na DNA, ΔH_{WC} spremembo entalpije ob taljenju WC baznega para v odsotnosti proteina Alba in a_{WC}^{B} molarno koncentracijo proteina Alba. ΔH_{WC} za poli(dA-dT) · poli(dA-dT) je 7,6 kcal/(mol bp), za poli(dG-dC) · poli(dG-dC) je ΔH_{WC} 14,7 kcal/(mol bp) in za genomsko DNA, izolirano iz govejega priželjca, je ΔH_{WC} 8,5 kcal/(mol bp).

Histonom (H-7755), raztopljenim v miliQ vodi koncentracije 1 mg/mL, smo določili pHoptimum s titracijo s HCl ali NaOH od pH 1,1 do 13. Spremembe v konformaciji histonov zaradi spremembe pH smo spremljali z merjenjem absorpcije pri 280 nm (A_{280}). Pri meritvah je bil upoštevan faktor razredčevanja zaradi dodajanja kisline oz. baze.

3.2.4.2 Določanje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu

Za določanje koncentracije proteinov smo uporabili metodo po Bradfordu (Bradford, 1976). Pri metodi se barvilo Comassie briljantno modrilo veže na proteine, pri čemer se mu barva spremeni iz rdeče v modro, kar sledimo z merjenjem absorpcije pri 595 nm (A₅₉₅). Koncentracijo smo določali s kompletom "Bio-Rad Protein Assay" (Bradford, 1976) po navodilih proizvajalca. Umeritveno krivuljo smo naredili z raztopinami govejega serumskega albumina. Uporabili smo standardni postopek.

3.2.4.3 Določanje vsebnosti prostih skupin -SH v raztopini proteina

Proste skupine –SH smo določili z modificirano metodo po Ellmanu (Ellman, 1959). Proste skupine –SH ob dodatku 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzojske kisline) (DTNB) tvorijo 2nitro-5-tiobenzojsko kislino (TNB), katere ion ima izrazito rumeno barvo. Metoda tako temelji na barvni reakciji, ki jo spremljamo z merjenjem absorpcije pri 412 nm (A₄₁₂). Koncentracijo skupin –SH izračunamo po enačbi 2:

$$c_{SH} = c_{TNB^-} = \frac{A_{412}}{\xi \cdot l} \qquad \dots (2)$$

 c_{SH} predstavlja molarno koncentracijo prostih skupin –SH, c_{TNB^-} molarno koncentracijo iona tiobenzojske kisline, A_{412} absorpcijo pri 412 nm, ξ molarni absorpcijski koeficient iona tiobenzojske kisline, $\xi = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. V reakcijski mešanici je bila koncentracija proteinov 0,02 mM, koncentracija DTNB pa 5 mM, reakcija je potekala v 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0. Po dodatku Ellmanovega reagenta raztopini mešanice smo vzorce inkubirali 5 minut v temi na sobni temperaturi ter nato izmerili absorpcijo pri 412 nm.

3.2.5 Fluorescenčna spektroskopija

O fluorescenci govorimo, ko pri snovi pride do emisije svetlobe pri prehajanju elektronov iz višjih energijskih ravni na nižje. Za fluorescenco je značilno, da je energija emisije manjša od energije absorpcije. Fluorescenčna emisija se pojavi pri daljših valovnih dolžinah kot absorpcija svetlobe. Snovi, ki so sposobne fluorescirati, so fluorofori in jih delimo na interne in eksterne. Interni fluorofori imajo lastno fluorescenco in so prisotni v naravi. Lastna fluorescenca proteinov izvira iz aromatskih aminokislin (Trp, Tyr in Phe), med katerimi je indolna skupina Trp dominanten intrinzični fluorofor. Absorpcijske spektre merimo v območju med 220 in 400 nm; vrednosti v območju 300 – 400 nm podajo informacijo o prisotnosti nečistoč ali agregatov, peptidna vez ima absorpcijski vrh pri 220 nm, aromatski aminokislini (Trp in Tyr) pa pri 280 nm. Snovem, ki lastne fluorescence nimajo, je treba dodati eksterne fluorofore, ki so navadno sintetičnega izvora ali pa so modificirane biomolekule. Ti s svojo fluorescenco omogočajo spremljanje sprememb v vzorcih, ki lastne fluorescence nimajo (Lakowicz, 1999).

3.2.5.1 Spremljanje lastne fluorescence proteinov Alba

Proteina Alba1 in Alba2 vsebujeta aromatske aminokisline (Phe in Tyr) in imata zato lastno fluorescenco. Proteinoma smo s pomočjo te lastnosti preverjali čistost (ostanki imidazola od Ni-NTA čiščenja), določili pH-optimum ter proteina titrirali z različnimi dsDNA (genomska DNA, izolirana iz govejega priželjca, poli(dA-dT) · poli(dA-dT) in poli(dG-dC)).

Iz podatkov, pridobljenih s titracijo proteinov Alba z različnimi molekulami DNA, smo po spodnji enačbi določili konstanto vezave (K_{bin}) proteinov Alba na molekule DNA (Swillens, 1995):

$$F_{\rm B} = c \cdot \left(K_{\rm bin} + R_0 + L_0 - \sqrt{\left(K_{\rm bin} + R_0 + L_0 \right)^2 - 4 \cdot R_0 \cdot L_0} \right) \qquad \dots (3)$$

V zgornji enačbi $F_{\rm B}$ predstavlja delež vezanega liganda, $K_{\rm bin}$ konstanto vezave, R_0 koncentracijo vezavnih mest na molekuli DNA, L_0 koncentracijo proteina Alba.

3.2.5.2 Spremljanje fluorescence s fluorescenčnimi barvili

Molekula DNA nima lastne fluorescence, ki bi omogočala spremljanje njenih strukturnih sprememb z merjenjem fluorescence. V ta namen uporabljamo DNA-vezavna fluorescenčna barvila. Spremljali smo fluorescenco štirih fluorescenčnih barvil (Invitrogen, 2008):

 Hoechst 33258: Pentahidrat bis-benzimid fenol 4-[5-(4-metil-1-piperazinil)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-il]-trihidroklorid je AT-selektivno DNA-vezavno barvilo, veže se v manjši žleb DNA

 $(\lambda_{ex} = 352 \text{ nm}, \lambda_{em} = 461 \text{ nm}; \xi_{352 \text{ nm}} = 40,000 (\text{cm} \cdot \text{Mbp})^{-1}).$

- DAPI, dilacetat: 4',6-diamidino-2-fenilindol dilacetat je prav tako AT-selektivno, DNA-vezavno fluorescenčno barvilo
- $(\lambda_{ex} = 358 \text{ nm}, \lambda_{em} = 461 \text{ nm}; \xi_{344 \text{ nm}} = 21,000 (\text{cm} \cdot \text{Mbp})^{-1}).$
- Akridin oranž: 3,6-akridinediamin N,N,N',N'-tetrametil-monohidroklorid, DNAvezavno fluorescenčno barvilo

 $(\lambda_{ex} = 500 \text{ nm}, \lambda_{em} = 526 \text{ nm}; \xi_{500 \text{ nm}} = 53,000 (\text{cm} \cdot \text{Mbp})^{-1}).$

- DiBAC₄(3): bis-(1,3-dibutilbarbiturna kislina)trimetin oksonol je fluorescenčno barvilo, ki se veže na proteine in membrane $(\lambda_{ex} = 493 \text{ nm}, \lambda_{em} = 516 \text{ nm}; \xi_{493 \text{ nm}} = 140,000 \text{ (cm} \cdot \text{Mbp})^{-1}).$

Vsa barvila (razen DiBAC₄(3)) so bila raztopljena v vodi miliQ. DiBAC₄(3) je bil raztopljen v 25-odstotnem (v/v) etanolu, končna koncentracija etanola v merjenem vzorcu je bila nižja od 0,1 %. Koncentracije barvil smo določali spektrofotometrično (HP 8453 spectrophotometer, Hewlett Packard, ZDA) pri 25 °C. Uporabili smo ekstinkcijske koeficiente (ξ), navedene v prejšnjem odstavku.

3.2.5.3 Taljenje DNA arheje Aeropyrum pernix v prisotnosti fluorescenčnih barvil

Spremljali smo intenziteto fluorescence gDNA arheje *A. pernix* (10 μ M/bp) ter gDNA v prisotnosti fluorescenčnih barvil v odvisnosti od spremembe temperature. Uporabili smo štiri fluorescenčna barvila, Hoechest 33258, DAPI, akridin oranž in DiBAC₄(3), za vzbujanje vsakega barvila smo uporabili specifično vzbujevalno valovno dolžino (λ_{ex}) Temperaturo smo višali s hitrostjo 1 °C/min od 20 °C do 100 °C, vzorec smo med segrevanjem inkubirali 1 min pri dani temperaturi zaradi uravnoteženja stanja. Vsi eksperimenti so bili izvedeni pri molarnem razmerju DNA(bp) : fluorescenčno barvilo = 20 : 1 s končno koncentracijo barvila 0,5 μ M (10 mM HEPES, pH 7). Za vsak optično zaznan prehod smo določili T_m v točki prehoda, kjer je bil delež denaturiranosti molekule DNA 50 % (f_D = 0,5). Podane vrednosti T_m so povprečje treh ločenih meritev.

3.2.5.4 Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili

Celice ($OD_{650} = 1,0$) smo resuspendirali v raztopini za DSC in redčili desetkrat zaradi optimizacije meritev, v kiveti je bila tako koncentracija celic 0,027 mg suhe celične biomase na mL vzorca. Titracijo s fluorescenčnimi barvili smo izvedli pri 25 °C in 50 °C. Za Hoechst 33258 in DAPI smo pri titriranju spremljali fluorescenčno emisijo v območju od 400 do 600 nm, za akridin oranž in DiBAC₄(3) pa v območju od 500 nm do 700 nm. Za vsako barvilo smo za vzbujanje fluorescence uporabljali navedeno valovno dolžino (λ_{ex}) ter sprememljali spremembe v intenziteti fluorescence pri maksimumih, specifičnih za posamezna barvila (λ_{em}). Emisijske spektre barvil s celicami smo korigirali glede na faktor razredčitve, do katerega je prišlo zaradi dodajanja barvila, vsem spektrom smo odšteli bazno linijo. V točki, v kateri je signal fluorescenčnega barvila dosegel plato (se ni več spreminjal z naraščanjem števila celic), smo določili koncentracijo, ki je potrebna za nasičenje celic.

3.2.5.5 Sledenje termičnih prehodov in vezava fluorescenčnih barvil v celih celicah arheje *Aeropyrum pernix*

Celicam arheje *A. pernix* enakih koncentracij, kot smo jih uporabili za titracijo s fluorescenčnimi barvili, smo dodali fluorescenčna barvila v koncentracijah, potrebnih za nasičenje celic z barvili. Celice smo inkubirali v temi 2 uri na 50 °C ter jih nato segrevali od 20 do 100 °C s hitrostjo 1 °C/min pri valovnih dolžinah, specifičnih za posamezno barvilo (λ_{em}).

3.2.5.6 Interakcija živih in mrtvih celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili

Z namenom določiti odziv specifičnosti barvanja živih in liziranih celic arheje *A. pernix* smo merili intenziteto fluorescence suspenzij različnih razmerij živih in liziranih celic s fluorescenčnimi barvili. Vse celice so bile v 10 mM pufru HEPES s 512 mM NaCl, pH 7,0.

Koncentracija celic v kiveti je bila 0,027 mg suhe celične biomase na mL suspenzije.

Celice smo lizirali na tri načine:

- z izpostavitvijo destilirani vodi za 10 min,
- z avtoklaviranjem,
- z 10-minutno inkubacijo na 130 °C, kot je opisal Milek in sod. (2007).

Mešanico celic smo pred merjenjem fluorescence inkubirali na sobni temperaturi 10 minut. Uporabili smo naslednje koncentracije fluorescenčnih barvil (v kiveti): 10 μ M Hoechst 33258, 27 μ M DAPI, 10 μ M akridin oranž in 5 μ M DiBAC₄(3) (Črnigoj in sod., 2008).

3.2.6 CD-spektroskopija

Cirkularni dikroizem (ang. "circular dichroism", CD) je spektroskopska metoda, ki jo uporabljamo za merjenje optične aktivnosti molekul v raztopini. CD-spektre proteinov lahko zaznamo v dveh območjih (Schmid, 1989):

 v daljnem UV-območju (170 nm–250 nm) ali amidnem območju prevladujejo prispevki peptidnih vezi. CD v daljnjem UV-območju posreduje predvsem informacijo o sekundarni strukturi proteinov,

– v bližnjem UV-območju (250 nm–300 nm) prevladujejo prispevki aromatskih aminokislin in manj tudi disulfidnih vezi. CD-spekter v bližnjem UV-območju nam pove nekaj o terciarni strukturi proteinov.

CD-spektre izoliranih proteinov Alba1 in Alba2 ter kompleksa Alba1/Alba2 v daljnjem UV-območju smo merili na AVIV 62A DS spektropolarimetru v 1-milimetrski kvarčni kiveti. Pri poskusih je bil vzorec predinkubiran v pufru in v prisotnosti različnih molekul DNA 15 minut na sobni temperaturi. Končna koncentracija proteina ali kompleksa heterodimera je bila 0,2 mg/mL. Vsi poskusi na CD-spektrofotometru so bili izvedeni v 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0.

Opazovali smo vpliv različnih temperatur (25 °C, 50 °C, 70 °C, 90 °C in 25 °C po inkubacji na 90 °C) ter vpliv treh različni dsDNA (gDNA, izolirana iz govejega priželjca, poli(dA-dT) · poli(dA-dT) in poli(dG-dC) · poli(dG-dC)) na skupno sekundarno strukturo izoliranih proteinov v daljnjem UV-območju. S programi Plot, Raw2Con in Contin programskega paketa Contin smo iz CD-spektrov proteinov v daljnjem UV-območju določili posamezne deleže sekundarnih strukturnih elementov proteina v raztopini. CDspektre smo korigirali tako, da smo od spektrov najprej odšteli ustrezen spekter pufra (bazno linijo) posnetega pri enakih pogojih. Dobljenim vrednostim smo nato odšteli spektre samih DNA molekul (z že odštetimi baznimi linijami). Deleže elementov sekundarne strukture v proteinih Alba smo določili z uporabo baze Venyaminov, ki vsebuje 16 nativnih proteinov in 4 denaturirane proteine. S spodnjo enačbo (enačba 4) smo izračunali molarno eliptičnost na aminokislinski ostanek, $[\Theta]_{\lambda}$, v stopinjah na kvadratni centimeter na decimol, pri čemer je M_0 povprečna molska masa AK proteinov Alba1, Alba2 ter dimera teh dveh, Θ_{λ} izmerjena molarna eliptičnost v stopinjah, c koncentracija proteina v gramih na mililiter ter l optična pot žarka skozi vzorec (Provencher in Glockner, 1981).

$$\left[\Theta\right]_{\lambda} = \frac{M_0 \cdot \Theta_{\lambda}}{100 \cdot c \cdot l} \qquad \dots (4)$$

3.2.7 Površinska plazmonska resonanca (SPR)

Površinska plazmonska resonanca (ang. "Surface Plasmon Resonance", SPR) je eksperimentalna tehnika, s katero lahko preučujemo interakcije med biološkimi molekulami. Instrument (Biacore T100) sestavljajo senzorski čip, detektor in mikrotekočinski sistem, ki dovaja vzorec raztopine z analitom do površine čipa (leži v pretočni celici), na katerega je vezan ligand (Slika 14A). Uporabili smo senzorski čip Biacore SA (streptavidin). Čip ima na površini sloj zlata (spodaj stekleni nosilec), na katerega je preko dekstrana vezan streptavidin (Slika 14B). Ob vezavi molekul na čip se spremeni kot popolnega odboja svetlobe na čipu, preko katerega sledimo spremembam, ki so posledica vezave proteinov in DNA na čip (Slika 14C).



Slika 14: Površinska plazmonska resonanca (SPR); A: prikaz delovanja instrumenta SPR, B: prečni prerez streptavidinskega čipa, C: shematski prikaz senzorgrama SPR (ICPPR, 2008). Figure 14: Surface plasmon resonance (SPR); A: scheme of SPR instrument, B: cross section of SA sensor chip, C: scheme of SPR sensorgram (ICPPR, 2008).

V poskusih smo na površino čipa imobilizirali tri različne oligonukleotide DNA dolžine 35 bp, s katerimi smo imitirali zaporedja treh različnih molekul DNA (preglednica 5). Uporabljeni oligonukleotidi s svojim sredinskim delom imitirajo določeno zaporedje DNA. Na zunanjih koncih oligonukleotida smo dodali na vsaki strani 7 nukleotidov (gvanin oz. citozin), ki so povišali stabilnost dvoverižne oblike oligonukleotidov proizvajalca TIB Molbiol (Nemčija). Oligonukleotid "SPRpoliAT" s svojim sredinskim delom (21 bp) imitira zaporedja sintetične DNA poli(dA-dT) · poli(dA-dT), oligonukleotid "SPRpoliGC" imitira zaporedja sintetične DNA poli(dG-dC) · poli(dG-dC), "SPRspecAP" pa imitira splošno zaporedje DNA, ki ga najdemo v hipertermofilni arheji *A. pernix*. V vsakem dvojnovijačnem oligonukleotidu je imela le ena veriga kovalentno vezano molekulo biotina, preko katere se je oligonukleotid vezal na streptavidin na površini čipa.

Preglednica 5: Uporabljeni biotinilirani oligonukleotidni začetniki za vezavo na čip SPR SA. Komplementarne, nebiotinilirane verige niso prikazane.

Table 5: Oligonucleotides	used for Immobilization	n on SPR sensor	r chip SA.	Complementary,	non-biotinilated
strands are not shown.					

oligonukl. začetnik	zaporedje oligonukleotidnega začetnika	lastnosti
SPRpoliAT	5'- Biot-CCCCCCTATATATATATATATATATATATCCCCCCC -3'	35 bp,
		$T_m = 62 \ ^\circ C$
SPRpoliGC	5'- Biot-CCCCCCgCgCgCgCgCgCgCgCgCgCgCgCCCCCCC -3'	35 bp,
		$T_m = 87 \ ^\circ C$
SPRspecAP	5'- Biot-CCCCCCgTgAAAgCCTAgACAgCgAggCCCCCCC -3'	35 bp,
		$T_m = 76 \ ^\circ C$

Oligoukleotide DNA smo na čip nanašali do dosežene vrednosti 1000 RU (ang. "resonance unit"). Analit smo vodili preko liganda na čipu SPR v raztopini za SPR (50 mM NaH₂PO₄ 150 mM NaCl in 0,005 % P20; pH = 7,0), uporabili smo pretok 5 μ L/min; asociacija je potekala 7 minut in disociacija 6 minut. Analit so predstavljali Alba1, Alba2 in kompleks Alba1/Alba2. Kot pozitivno kontrolo vezave proteina na DNA smo uporabili raztopino govejih histonov, kot negativno kontrolo pa goveji serumski albumin (ang. "bovine serum albumin", BSA). Čip smo po vezavi analita na ligand regenerirali s tremi 60-sekundnimi cilkli z 2 M NaCl (pretok 5 μ L/min).

3.2.8 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Diferenčna dinamična kalorimetrija (ang. "Differential Scanning Calorimetry", DSC) je kalorimetrična analizna tehnika, s katero spremljamo konformacijske spremembe in fazne prehode v preiskovanem vzorcu kot funkcijo temperature (Kaletunç, 2001). Termični blok instrumenta DSC vsebuje dve celici, referenčno in vzorčno merilno celico. V instrumentu segrevamo obe celici hkrati s konstantno hitrostjo, kar omogoča v danem trenutku termično in kemijsko ravnovesje pri vseh temperaturah (Shriver in sod., 2001). Kadar pride v vzorčni celici do faznega prehoda, se spremni poraba energije glede na referenčno celico zaradi izenačitve temperaturne razlike med vzorčno in referenčno celico, ki jo zaznavajo termočleni v stenah okoli celic. Program kalorimetra zaznano razliko v temperaturi pretvori v toploto in toplotni tok (\dot{Q}) (enačba 5), ki predstavlja izhodni signal:

$$\dot{Q} = \frac{dQ}{dt} \begin{bmatrix} J\\s \end{bmatrix} \qquad \dots (5)$$

Termično inducirani procesi v vzorcu, pri katerih se toplota sprošča ali pa porablja, povzročijo torej spremembo v toplotnem toku, ki ga beležimo kot funkcijo temperature (termogram). Če termogram DSC normaliziramo, dobimo specifično toplotno kapaciteto (c_P) v odvisnosti od temperature. Iz enačbe 5 specifično toplotno kapaciteto (c_P) izrazimo z naslednjo enačbo (enačba 6):

$$c_{p} = \frac{\dot{Q}}{m \cdot \alpha} \left[\frac{J}{gK} \right] \qquad \dots (6)$$

kjer je α hitrost segrevanja [K/s] in m masa vzorca [g].

Fazni prehodi komponent vzorca in z njimi povezane spremembe toplotne kapacitete se na termogramu pokažejo kot vrhovi v bodisi pozitivni (absorpcija toplote) ali negativni (sproščanje toplote) smeri. Toplota, sproščena med posameznim faznim prehodom oziroma potrebna za njegov potek, je enaka površini pod posameznim vrhom (Kaletunç, 2001).

V merilno celico smo dali $80,0 \pm 0,5$ mg vlažne biomase (80 % vlage), v referenčni celici je bil volumen raztopine za DSC, ki je ustrezal deležu vode v vzorcu ($64,0 \pm 0,2$ mg). Segrevanje vzorca je potekalo od 25 °C do 180 °C s hitrostjo segrevanja 4 °C/min.

S to tehniko smo okarakterizirali cele celice arheje *A. pernix* v prisotnosti štirih različnih fluorescenčnih barvil (Hoechst 33258, DAPI, akridin oranž in DiBAC₄(3)). Biomaso smo po centrifugiranju dvakrat sprali z raztopino za DSC ter jo nato v temi inkubirali pri 25 °C (2 do 8 ur) in 50 °C (2 uri) v pufru DSC s koncentracijo barvila, ki je ustrezala nasičenju celic z barvilom.

S celicami smo uporabili naslednje koncentracije barvil:

- Hoechst 33258: 0,625; 3,125; 6,25 in 37,5 nmol/(mg suhe celične mase),
- DAPI: 50 nmol/(mg suhe celične mase),
- Akridin oranž: 3,75 nmol/(mg suhe celične mase),
- DiBAC₄(3) 0,075 in 0,375 nmol/(mg suhe celične mase).

Vse meritve so bile opravljene v tesno zaprtih merilnih celicah iz nerjavnega jekla, po vsaki meritvi smo celice stehtali, da smo preverili potencialno izgubo mase zaradi puščanja med meritvijo. Pred vsakim poskusom smo opravili meritev DSC s prazno vzorčno in referenčno merilno celico, ki smo jo kot korekcijo (bazna linija) odšteli od termograma vzorca.

Zaradi opaženih reverzibilnih prehodov DNA v celici (Milek in sod., 2007) smo v primeru barvila DAPI s predgretjem do različnih temperatur (100 °C in 110 °C) dosegli boljšo vidljivost vrha DNA na termogramu z denaturacijo ostalih celičnih komponent.

3.2.9 DIC in fluorescenčna mikroskopija

Mikroskopiranje celic arheje *A. pernix* smo opravili na mikroskopu Axio Imager Z.1 (Zeiss), s kamero HRc, mikroskop je razširjenem s sistemom ApoTome (Zeiss) za optimizacijo fluorescenčne mikroskopije. Za nefluorescenčno mikroskopijo smo uporabili mikroskopijo DIC (ang. "Differential Interference Contrast").

Mikroskopija DIC je tehnika, ki povečuje kontraste v tansparentnih vzorcih. Slika, ki jo daje mikroskop, je podobna sliki, ki jo daje fazno kontrastna mikroskopija, vendar pa za razliko od te nima svetlega difrakcijskega sija okoli opazovanih objektov. DIC deluje na podlagi ločevanja polarizirane svetlobe na dva žarka, ki gresta po rahlo drugačni poti skozi preparat, kjer je optična pot žarka različna, pride ob ponovni združitvi teh dveh do interference med njima, kar da sliki vtis tridimenzionalnosti glede na optično gostoto vzorca.

Za fluorescenčno mikroskopiranje smo uporabili sete filtrov v odvisnosti od uporabljenega fluorescenčnega barvila:

- set FS01 za UV-območje svetlobnega spektra (Hoechst 33258 in DAPI),
- set FS09 za modro območje svetlobnega spektra (akridin oranž, DiBAC₄(3), BacLightTM),
- set FS15 za zeleno območje svetlobnega spektra (akridin oranž, BacLightTM).

Celice arheje *A. pernix* smo za mikroskopiranje resuspendirali v 10 mM HEPES s 513 mM NaCl, pH 7,0. Mrtve celice smo pridobili z 10-minutno inkubacijo na 130 °C (Milek in sod., 2007). Koncentracije barvil, uporabljenih pri mikroskopiranju, so bile naslednje: 1,5 mM Hoechst 33258; 1,2 mM DAPI; 2,2 mM akridin oranž; 1,6 mM DiBAC₄(3); 1 mM SYTO 9 in 20 mM propidijev jodid, zadnji barvili sta iz kompleta BacLightTM (Berney in sod., 2007). Pred mikroskopiranjem smo na rob krovnega stekla dodali 10 μ L barvila ter pustili, da je barvilo prešlo v preparat zaradi kapilarnega toka. Pri barvanju z Hoechst 33258 barvila nismo dodajali na preparat. Zaradi boljše efektivnosti barvanja smo suspenzijo celic v pufru inkubirali v temi z barvilom na 50 °C 1 uro. Barvila iz kompleta BacLightTM smo po navodilih proizvajalca v suspenzijo celic dodali 10 minut pred mikroskopiranjem. Komplet vsebuje 2 barvili: SYTO 9 ($\lambda_{ex} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 635$ nm). Kot referenčni organizem za primerjavo učinkovitosti kompleta smo uporabili bakterijo *E. coli* (10 mM HEPES z 0,9 % NaCl, pH 7,0).

4 REZULTATI

V potrditev prve delovne hipoteze smo (glej 1.2 Delovni hipotezi):

- z UV-spektrofotometrom izvedli termično denaturacijo po sestavi različnih molekul DNA ter tako določili odvisnost termične stabilnosti DNA od koncentracije soli;
- z UV-spektrofotometrom izvedli termično denaturacijo različnih molekul DNA v kompleksih z evkariontskimi histoni, histonom smo določili tudi pH-optimum;
- rekombinantna proteina Alba1 in Alba2 poskusili proizvesti v več ekspresijskih sistemih, pri vsakem sistemu smo določili optimalno produkcijo vnesenega proteina, pred začetkom pridobivanja gena smo preverili nukleinsko zaporedje kloniranega gena;
- rekombinantna proteina očistili z različnimi tehnikami ter ustreznost izoliranih proteinov preverili z LC/MS-MS;
- okarakterizirali pridobljena proteina; določili smo jima pH-optimum, optimalno koncentracijo različnih molekul DNA za vezavo na protein, termično stabilnost različnih DNA v kompleksih s proteini, z metodo elektroforeznega zamika smo pokazali, da se proteini vežejo na DNA; z metodo cirkularnega dikroizma smo pri različnih temperaturah ocenili delež posameznih elementov sekundarnih struktur v prostem proteinu in vezanim na različne molekule DNA, z metodo plazmonske resonance smo okarakterizirali hitrost vezave proteinov na različne molekule DNA.

V skladu z drugo delovno hipotezo smo (glej 1.2 Delovni hipotezi):

- s spektrofluorimetrom in DSC kalorimetrom določili potrebno koncentracijo barvila, prehajanje ter vpliv in vezavo fluorescenčnih barvil na celice arheje *Aeropyrum pernix* pri sobni ter povišani temperaturi;
- izvedli termično denaturacijo DNA v prisotnosti fluorescenčnih barvil;
- s spektrofluorimetrom in fluorescenčno mikroskopijo opazovali razliko v odzivu živih ter mrtvih celic na fluorescenčna barvila ter preverili potencialno uporabnost barvil za ločevanje med živimi in mrtvimi celicami arheje *A. pernix* na področju fluorescenčne mikroskopije in pretočne citometrije.

Vse poskuse smo opravili v najmanj dveh ponovitvah.

4.1 STABILIZACIJA DNA Z NaCl

Termično denaturacijo, različnih molekul DNA smo v 5 mM kakodilatnem pufru (pH 7,0) pri različnih koncentracijah NaCl določali na dva načina: pri polovici prehoda iz nativnega v denaturirano stanje ter s prvim odvodom.

Vpliv koncentracije NaCl na T_m DNA smo spremljali pri 4 različnih molekulah DNA (Slika 15): pri sintetičnih poli(dA-dT) · poli(dA-dT) in poli(dG-dC) · poli(dG-dC)) DNA ter gDNA, izoliranih iz hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix*, ekstremno halofilne arheje *Haloferax mediterranei* in bakterije *Escherichia coli*.



Slika 15: Termična stabilnost (T_m) različnih molekul DNA v 5 mM kakodilatnem pufru pri pH 7,0 v odvisnosti od naraščajoče koncentracije NaCl.

Figure 15: Thermal stability of different DNA molecules in dependance of increasing NaCl concentration. DNA molecules were incubated in 5 mM cacodilate buffer, pH 7,0.

Rezultati termične denaturacije različnih molekul DNA pri določenih koncentracijah NaCl so predstavljeni v preglednici 6.

Molekula DNA	T _m 0 mM NaCl (°C)	T _m 250 mM NaCl (°C)	Δ povišanja T _m (°C)
Aeropyrum pernix	$72 \pm 0,5$	$95 \pm 0,5$	$23 \pm 0,5$
poli(dA-dT) · poli(dA-dT)	$35 \pm 0,5$	$68 \pm 0,5$	$33 \pm 0,5$
poli(dG-dC) · poli(dG-dC)	$94 \pm 0,5$	97 ± 0.5 (pri 5 mM NaCl)	-
Escherichia coli	$65 \pm 0,5$	$92 \pm 0,5$	$27 \pm 0,5$
Haloferax mediterranei	$68 \pm 0,5$	$96 \pm 0,5$	$28 \pm 0,5$

Preglednica 6: Primerjava T_m različnih molekul DNA v prisotnosti 0 in 250 mM NaCl pri pH 7,0. Table 6: Comparison of T_m of different DNA molecules with 0 and 250 mM NaCl, pH 7,0.

4.2 TERMIČNA STABILIZACIJA DNA S HISTONI

4.2.1 pH-titracija govejih histonov (H-7755)

Z UV-spektroskopijo smo opazovali spremembe absorpcijskih spektrov govejih histonov pri 280 nm zaradi vpliva pH. Spremembe v tem območju smo v glavnem pripisali spremembam v okolici tirozinskih in fenilalaninskih ostankov. Za histone je značilno, da so v fizioloških pogojih v razvitem stanju. Da bi določili pH-območje nativnega stanja histonov, smo ob titraciji histonov (1 mg/mL) s HCl in NaOH spremljali absorbanco pri valovni dolžini 280 nm. Iz pH-titracijske krivulje govejih histonov (Slika 16) smo ugotovili, da se v območju pH okoli 10,0 pojavi konformacijski prehod.



Slika 16: pH-titracija vodne raztopine govejega histona. A_{280}/A_{280}^0 je normalizirana vrednost absorpcijskega spektra.

Figure 16: pH-titration of bovine histone in solution. A_{280}/A_{280}^0 represents normalized values of measured absorption spectra.

4.2.2 Termična stabilizacija DNA s histoni

Vpliv histonov na termično stabilnost različnih molekul DNA (genomska DNA, izolirana iz govejega priželjca, poli(dA-dT) \cdot poli(dA-dT) in poli(dG-dC) \cdot poli(dG-dC)) smo spremljali spektrofotometrično. Uporabili smo 20 µM raztopino DNA (10 mM acetatni pufer, pH 5,0). Vpliv histonov na termično stabilnost DNA smo preučevali pri različnih molskih razmerjih histon : DNAbp ([mol histon] : [mol DNAbp]), do razmerja, ko je prišlo do obarjanja DNA. Vzorce smo inkubirali na sobni temperaturi tri ure pred začetkom meritev.

Vpliv histonov na sintetične alternirajoče DNA (poli(dG-dC) · poli(dG-dC)) smo spremljali z UV-spektroskopijo.

Temperatura taljenja genomske DNA iz govejega priželjca pri pH 5,0 (10 mM acetatni pufer) je bila 46 °C. V kompleksu s histoni se je pri najvišjem molskem razmerju histon : DNAbp (1 : 150) zvišala ($T_m = 74$ °C; Slika 17).



Slika 17: UV-talilne krivulje genomske DNA izolirane iz govejega priželjca pri različnih molskih razmerjih histon : DNAbp (1 : od 2000 do 150). Puščica označuje naraščanje koncentracije histona. Figure 17: UV-melting curves of genomic DNA isolated from calf thymus at different molar ratios histone : DNAbp (1 : 2000–150). Arrow indicates increase in histone concentration.

Termično denaturacijo poli(dA-dT) \cdot poli(dA-dT) DNA smo lahko izvedli pri razmerjih histon : DNAbp, ki so bila nižja od razmerja 1 : 130 (vsebovala so manj ali enako količino histona kot pri tem razmerju), saj je pri višjih razmerjih prišlo do kondenzacije DNA. Temperatura taljenja (T_m) poli(dA-dT) \cdot poli(dA-dT) DNA pri pH 5,0 (10 mM acetatni pufer) je bila 27 °C, T_m v prisotnosti histona v razmerju 1 mol histona na 130 molbp pa 58 °C (Slika 18).



Slika 18: UV-talilne krivulje poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA pri različnih molskih razmerjih histon : DNAbp (1 : od 2000 do 130). Puščica označuje naraščanje koncentracije histona. Figure 18: UV-melting curves of poly(dA-dT) · poly(dA-dT) DNA at different molar ratios histone : DNAbp (1 : 2000–130). Arrow indicates increase in histone concentration.

Poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA smo podvrgli taljenju z govejimi histoni, najvišje razmerje DNA in histona, pri katerem še ni prišlo do obarjanja DNA, je bilo 1 : 120. T_m poli(dG-dC) · poli(dG-dC) pri pH 5,0 brez histonov (10 mM acetatni pufer) je bila 79 °C, z naraščanjem koncentracije histonov pa je bila temperatura taljenja pri najvišjem doseženem razmerju (1 mol histona na 120 mol DNAbp) 96 °C. Opazili smo, da je prehod poli(dG-dC) · poli(dG-dC) postal pri molskih razmerjih, višjih od 1 : 500, dvostopenjski. Drugi prehod se je ob povečevanju koncentracije histonov destabiliziral, saj je T_m pri najvišjem molskem razmerju histonov padla z 79 °C na 43 °C (Slika 19).



Slika 19: UV-talilne krivulje poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA pri različnih molskih razmerjih histon : DNAbp (1 : od 2000 do 120). Puščici označujeta naraščanje koncentracije histona. Figure 19: UV-melting curves of poly(dG-dC) · poly(dG-dC) DNA at different molar ratios histone : DNAbp (1 : 2000–120). Arrows indicate increase in histone concentration.

4.3 TERMIČNA STABILIZACIJA DNA S PROTEINI ALBA

4.3.1 Izolacija in čiščenje proteinov Alba

4.3.1.1 Kloniranje ter ekspresija proteinov Alba

Izražanje proteinov Alba v plazmidih pGEX v ekspresijskem sistemu bakterije *Escherichia coli* BL21 ni bilo uspešno, saj so bili izraženi proteini v celičnem lizatu netopni. Težave netopnosti produktov smo se poskušali izogniti z gojenjem v bogatejšem gojišču (2YT) in v minimalnem gojišču, vendar rezultati niso bili bistveno boljši. Gojenje pri nižji temperaturi (21 °C), različne koncentracije IPTG, ki je bil potreben za aktivacijo sinteze produktov (končna koncentracija IPTG 0,25; 0,5; 1 in 2 mM), in različno dolgi časi rasti bakterije *E. coli* po aktivaciji z IPTG (1, 2, 4 in 10 ur gojenja po aktivaciji) prav tako niso dali pričakovanih količin ekspresije proteina. Nadaljnjo uporabo tega ekspresijskega sistema smo za pridobivanje proteinov Alba zato opustili.

Izražanje proteinov v plazmidu pQE-30 UA je bilo v kombinaciji z bakterijo *Escherichia coli* M15 uspešnejše. Optimalno ekspresijo proteinov Alba smo dosegli z aktivacijo z 1 mM IPTG. Večjo topnost produkta smo dosegli, ko smo po aktivaciji bakterije *E. coli* gojili nadaljnjih 10 ur na 46 °C.

Protein Alba2 smo zaradi težav med izolacijo in čiščenjem izrazili v plazmidu pETDuet-1 v bakteriji *E. coli* BL21. Protein Alba2 je bil v tem konstruktu označen z označevalnikom His-tag, dodatno je plazmid nosil tudi zaporedje za protein Alba1, vendar ta za razliko od Alba2 ni imel označevalnika His-tag. Tudi tu smo zaradi boljše topnosti proteina gojili bakterijo po aktivaciji nadaljnjih 10 ur pri 46 °C.

4.3.1.2 Izolacija in čiščenje rekombinantnih proteinov Alba

4.3.1.2.1 Izolacija proteina Alba1

Po končanem gojenju in lizi celic (*E. coli* M15; pQE-30 UA) smo bistri supernatant (Slika 20b) najprej očistili z afinitetno kromatografijo (Ni-NTA) (Slika 20c). Nato smo vzorec očistili na sistemu FPLC z ionsko izmenjevalno kolono Mono STM HR 5/5. Frakcije s proteinom Alba1 smo nato očistili še s kolono z ločevanjem po velikosti, Superdex 75 HR (Slika 20d). Pridobljeni vzorec je bil čist, brez primesi ostalih proteinov. Čistost proteina smo sproti preverjali z NaDS-elektroforezo. Čistim vzorcem smo z ultrafiltracijo (Amicon) zamenjali pufer. Tako očiščen protein smo očistili še ostankov potencialnih proteinskih kontaminant z nekajkratno 10-minutno alternirajočo inkubacijo na 90 °C ter -20 °C. Protein smo hranili v 50 mM NaH₂PO₄ pH 7,0 na -20 °C, koncentracija proteina je bila 2,5 mg/mL. Ustreznost proteina smo preverili z analizo LC/MS-MS.



Slika 20: Sestavljena slika gelov NaDS PAGE (20 %) prikazuje stopnje čistosti proteina Alba1 med procesom izolacije; (a) PageRuler proteinska lestvica, (b) bister celični lizat, (c) elucija z Alba1 po afinitetni kromatografiji Ni-NTA, (d) očiščeni protein. Protein Alba1 je na sliki gela na prepotovani razdalji, ki ustreza velikosti proteinov okoli 12 kDa.

Figure 20: SDS PAGE gel (20 %) showing separate steps in the process of Alba1 purification; (a) standard protein ladder, (b) clear cell lysate, (c) elution from Ni-NTA column after affinity cromatography, (d) purified protein. Alba1 corresponds to the size of 12 kDa.

4.3.1.2.2 Izolacija proteina Alba2

Uporaba sistema pQE-30 UA/E. coli M15 za izolacijo proteina Alba2 se je izkazala kot manj uspešna. Po uspešnem gojenju (Slika 21b) ter čiščenju z afinitetno kromatografijo Ni-NTA (Slika 21c) proteina s kromatografijo za ločevanje po velikosti nismo mogli zadostno očistiti zaradi prevelikih izgub med samim čiščenjem (obarjanje). Skozi proces čiščenja proteina Alba2 se je ohranjal tudi približno 70 kDa velik protein. Z analizo LC/MS-MS smo ugotovili, da gre za protein bakterije E. coli (GroEL), koncentracija tega proteina se je čiščenjem relativno glede na koncentracijo proteina Alba2 (zaradi izgub letega) povečevala (kolona Ni-NTA ter FPLC koloni Superdex 75 HR 10/30 in Mono STM HR 5/5 (FPLC)) (Slika 21e). Protein se je ob odstranjevanju imidazola po čiščenju s kromatografijo Ni-NTA intenzivno obarjal, kar smo lahko do neke mere preprečili le s povišanjem NaCl v raztopini s proteinom (50 mM NaH₂PO₄ s 500 mM NaCl pH 7). Zaradi potrebe po visoki koncentraciji soli ni bilo mogoče očistiti proteina z razpoložljivimi ionsko izmenjevalnimi kolonami, saj se protein na ionski izmenjevalec ni vezal. Delno očiščen vzorec smo po izolaciji Ni-NTA poskusili očistiti s filtriranjem preko ultrafiltracijskih membran (MWCO: 3, 10, 30 in 50 kDa). Tako Alba2 kot tudi GroEL nista prehajala ultrafiltracijske membrane ne glede na premer por (Slika 21d).



Slika 21: Sestavljena slika gelov NaDS PAGE (20 %) prikazuje stopnje čistosti med procesom izolacije proteina Alba2 izraženega v sistemu pQE-30 UA/*Escherichia coli* M15; (a) proteinska lestvica PageRuler, (b) bister celični lizat, (c) elucija s proteinom Alba2 po afinitetni kromatografiji Ni-NTA, (d) dodatno očiščen vzorec po čiščenju z ultrafiltracijo (membrane s premerom por 3 kDa–50 kDa), (e) GroEL po eluciji kromatografske kolone za ločevanje po velikosti.

Figure 21: SDS PAGE gel (20 %) showing separate steps in the process of Alba2 purification. The protein was expressed in pQE-30 UA/*Escherichia coli* M15; (a) standard protein ladder, (b) clear cell lysate, (c) elution from Ni-NTA column after affinity cromatography, (d) purification with ultrafiltration (membranes with pore diammeter 3 kDa–50 kDa), (e) GroEL after elution of cromatographyc gel column.

Zaradi nenehne kontaminacije vzorca s proteinom GroEL smo protein Alba2 kot koekspresijo obeh proteinov, Alba1 in Alba2, izrazili v sistemu pETDuet-1/*E. coli* BL21.

Gojenje in aktivacija z IPTG sta bili enaki kot pri ekspresiji Alba2 v ekspresijskem sistemu pQE-30 UA/*E. coli* M15. Po lizi celic smo bistri supernatant najprej očistili s kromatografijo Ni-NTA. Na afinitetni nosilec Ni-NTA se je zaradi označevalnika His-tag vezal le protein Alba2, posledično se je večina proteina Alba1 sprala že pred elucijo proteina Alba2 (Slika 22b). Protein v ustreznih frakcijah (kjer je bil protein Alba2 v večini) smo nato oborili z 80-odstotnim (NH₄)₂SO₄ (w/v) ter oborjene proteine raztopili v 50 mM NaH₂PO₄ pH 7,0 (Slika 22c). Vzorce smo nato inkubirali na 90 °C pol ure in jih s tem očistili dela proteinskih kontaminant, ki so izvirale iz proteoma bakterije *E. coli* (Slika 22d). Bistri supernatant smo ponovno nanesli na nosilec Ni-NTA ter s tem odstranili sledove proteina Alba1 (Slika 22e). Pridobljeni protein je bil popolnoma čist, v 50 mM NaH₂PO₄ pH 7,0 je bila koncentracija proteina 3,2 mg/mL.



Slika 22: Sestavljena slika gelov NaDS PAGE (20 %) prikazujej stopnje čistosti med procesom izolacije proteina Alba2, izraženega v sistemu pETDuet-1/*Escherichia coli* BL21; (a) PageRuler proteinska lestvica, (b) frakcija elucije, ki vsebuje protein Alba2 po prvem čiščenju s kolono Ni-NTA (c) topna frakcija vzorca, očiščenega s kromatografijo Ni-NTA ter dodatno očiščenega z obarjanjem z 80-odstotnim (NH₄)₂SO₄, (d) vzorec, očiščen s kromatografijo Ni-NTA, z obarjanjem z 80-odstotnim (NH₄)₂SO₄ ter inkubiran na 90 °C 45 minut, (e) končno očiščeni protein po drugem čiščenju z Ni-NTA.

Figure 22: SDS PAGE gel (20 %) showing separate steps in the process of Alba2 purification, expressed in pETDuet-1/*Escherichia coli* BL21 system. (a) standard protein ladder, (b) elution from Ni-NTA column after affinity cromatography, (c) soluble fraction after Ni-NTA cromatography followed by aggregation with 80 % (NH₄)₂SO₄, (d) soluble fraction after Ni-NTA cromatography followed by aggregation with 80 % (NH₄)₂SO₄, and incubation of the sample at 90 °C for 45 min, (e) final purification step after the second Ni-NTA cromatography.

4.3.2 pH-stabilnost proteinov Alba

Da bi določili pH-stabilnost proteinov Alba, smo spremljali naravno fluorescenco in merili fluorescenčne emisijske spektre v območju od 285 nm do 600 nm ($\lambda_{ex} = 310$ nm) v pH-območju od 1 do 14. Slika 23 prikazuje, kako se emisijske fluorescenčne intenzitete pri valovni dolžini 310 nm spreminjajo s spreminjanjem pH-vrednosti. Pri pH-titraciji Alba1

opazimo več prehodov, ki so posledica strukturnih prehodov in različnih protonacijskih/deprotonacijskih ravnotežij. V kislem pH-območju imata dve aminokislini protonacijsko/deprotonacijsko ravnotežje pK_a(Glu) = 4,25 in pK_a(Asp) = 3,65 (Slika 23).

Titracija proteina Alba2 za razliko od Alba1 kaže drugačno obnašanje ob spremembi vrednosti pH. Prehodi niso ostri (Slika 23). Tudi tu v pH-območju med 4 in 5 opazimo prehod zaradi aminokislin Glu in Asp. Razliko v fluorescenci v pH-območju okoli 7 lahko pripišemo disulfidnemu mostičku v molekuli Alba2 med Cys³ (v zanki L1) in Cys⁹⁴ (v β 3) ali pa His, ki imajo vrednost pKa 6,0 v prosti obliki. Manjše spremembe v fluorescenci zaradi spremembe pH so lahko tudi posledica vsebnosti aminokislin Lys, Arg in Tyr v proteinih Alba.



Slika 23: Sprememba fluorescenčne intenzitete proteinov Alba1 in Alba2 pri 310 nm v 50 mM NaH₂PO₄ v odvisnosti od spremembe pH.

Figure 23: The change of fluorescence intensity of Alba1 and Alba2 proteins at 310 nm in 50 mM NaH₂PO₄ in dependance of various pH values.

4.3.3 Nativna elektroforeza PAGE proteinov Alba

Proteini Alba (približno 11 kDa–12 kDa, pI 9,2) so na nativni elektroforezi (sistem Phast, 20-odstotni homogen gel, reverzna elektroda) prepotovali enako razdaljo kot ekvinatoksin II (19,82 kDa, pI 10,2). Pri Alba2 opazimo dve lisi, od katerih verjetno šibkejša ustreza monomerni obliki proteina, močnejša pa tako, kot pri Alba1, najverjetneje predstavlja dimerno obliko. Ekvivalentne lise monomera pri proteinu Alba1 nismo opazili. (Slika 24)



Slika 24: Nativna elektroforeza PAGE z 20-odstotnim homogenim gelom sistema Phast; (a) ekvinatoksin II, (b) Alba1, (c) Alba2 in (d) kompleks Alba1/Alba2.

Figure 24: Native PAGE electrophoresis with 20 % homogenous gel for Phast system; (a) equinatoxin II, (b) Alba1, (c) Alba2 and (d) complex Alba1/Alba2.

4.3.4 Vsebnost prostih skupin –SH v proteinih Alba

Protein Alba1 se je v elektroforeznem polju v 20-odstotnem akrilamidnem gelu z NaDS v odsotnosti reducenta DTT gibal kot protein, velik približno 24 kDa (Slika 25b), zelo šibko liso smo opazili tudi pri velikosti 13 kDa. Alba1 je ob prisotnosti DTT (Slika 25e) potoval kot protein, velik približno 13 kDa, velikost je ustrezala zelo šibki lisi pri proteinu Alba1 brez DTT (Slika 25b). Pri Alba1 smo ob odsotnosti DTT opazili tudi šibkejše lise, ki so ustrezale velikostim 24 kDa, 34 kDa in 43 kDa (Slika 25e). Protein Alba2 se je gibal (v odsotnosti in prisotnosti reducenta) kot protein, velik približno 15 kDa (Sliki 25c in 25f). Pri potovanju kompleksa Alba1/Alba2 po elektroforeznem gelu smo (v odsotnosti in prisotnosti reducenta) opazili ločeni lisi, veliki 13 kDa in 15 kDa, ki sta ustrezali posameznima proteinoma Alba1 in Alba2 (Sliki 25d in 25g).



Slika 25: Elektroforeza NaDS PAGE prikazuje tvorjenje disulfidnih mostičkov pri proteinih Alba. Elektroforeza NaDS v odsotnosti reducenta DTT (b) Alba1, (c) Alba2 in (d) kompleks Alba1/Alba2 ter ob prisotnosti DTT (e) Alba1, (f) Alba2 in (g) kompleks Alba1/Alba2. (a) in (h) proteinska lestvica PageRuler. Figure 25: SDS PAGE electrophoresis shows disulphide bonding in Alba proteins. SDS PAGE in absence of DTT reducent (b) Alba1, (c) Alba2, (d) Alba1/Alba2 complex and in the pesence of DTT (e) Alba1, (f) Alba2 and (g) Alba1/Alba2 complex. (a) and (h) PageRuler protein ladder.

Z Ellmanovim reagentom smo v raztopini proteinov Alba1, Alba2 ter kompleksu Alba1/Alba2 določili proste skupine –SH. Raztopina proteina Alba1 je vsebovala približno 4 % prostih skupin –SH, raztopina Alba2 11,4 % in raztopina kompleksa Alba1/Alba2 16 % prostih skupin –SH. (preglednica 7)

Preglednica 7: Molski delež prostih skupin –SH na mol proteinov Alba. Table 7: Molar ratio of free –SH groups in Alba proteins.

	Molski delež prostih skupin vezi –SH v proteinu (%)
Alba1	$3,7 \pm 1,0$
Alba2	$11,4 \pm 1,0$
kompleks Alba1/Alba2	$16,3 \pm 1,0$

4.3.5 Vezava proteinov Alba na DNA



Slika 26: Titracija proteina Alba1 z DNA, izolirano iz govejega priželjca, poli(dA-dT) \cdot poli(dA-dT) DNA in poli(dG-dC) \cdot poli(dG-dC) DNA.

Figure 26: Titration of Alba1 with calf thymus DNA, $poly(dA-dT) \cdot poly(dA-dT)$ DNA and $poly(dG-dC) \cdot poly(dG-dC)$ DNA.



1/R (mol bp/mol proteina)

Slika 27: Titracija proteina Alba2 z DNA, izolirano iz govejega priželjca, poli(dA-dT) \cdot poli(dA-dT) DNA in poli(dG-dC) \cdot poli(dG-dC) DNA.

Figure 27: Titration of Alba2 with calf thymus DNA, $poly(dA-dT) \cdot poly(dA-dT)$ DNA and $poly(dG-dC) \cdot poly(dG-dC)$ DNA.

Iz podatkov, pridobljenih s titracijo proteinov Alba z različnimi molekulami DNA, smo izračunali vrednosti konstante vezave (K_{bin}) ter število nukleotidov, ki sodelujejo pri vezavi proteina Alba na molekulo DNA. Vrednosti K_{bin} se za oba proteina in vse tri vrste DNA gibajo v rangu 10⁵ (pri 25 °C). Pri vezavi proteina Alba na DNA sodeluje v vseh primerih 14 nukleotidov, z izjemo proteina Alba1 in GC-DNA, kjer sodeluje manj nukleotidov (10) (preglednica 8). Preglednica 8: Konstanta vezave (K_{bin}) ob vezavi proteinov Alba na različne molekule DNA in število nukleotidov, ki sodelujejo pri vezavi proteina in DNA.

Table 8: Binding constant (K_{bin}) for Alba proteins associations with different DNA molecules and number of nucleotides involved in binding of protein on a DNA.

	K _{bin}	Število baznih parov DNA ob vezavi (bp/protein)
Alba1		
CT-DNA	$(1,0\pm0,1)\cdot10^5$	14 ± 1
AT-DNA	$(1,2\pm0,1)\cdot10^{5}$	14 ± 1
GC-DNA	$(1,1\pm0,1)\cdot10^5$	10 ± 1
Alba2		
CT-DNA	$(1,3\pm0,1)\cdot10^5$	14 ± 1
AT-DNA	$(1,2\pm0,1)\cdot10^{5}$	14 ± 1
GC-DNA	$(1,3\pm0,1)\cdot10^5$	10 ± 1

4.3.6 Vpliv temperature na proteina Alba1 in Alba2

Raztopini proteinov Alba1 in Alba2 (brez DNA) v 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0, smo segrevali od 20 °C do 100 °C s hitrostjo segrevanja 0,5 °C/min. Protein Alba1 ob segrevanju ni pokazal večjih sprememb v absorbanci pri 280 nm. Ob segrevanju proteina Alba2 smo za razliko od Alba1 opazili prehod pri temperaturi 53 °C. (Slika 28)



Slika 28: Vpliv temperature na denaturacijo proteinov Alba1 in Alba2. Figure 28: Temperature-induced denaturation of Alba1 and Alba2 proteins.

4.3.7 UV-talilne krivulje DNA v prisotnosti proteinov Alba

Primerjava UV-absorpcijskih spektrov nativnih in denaturiranih molekul DNA v kompleksih s proteini Alba nam pokaže učinek termične stabilizacije na DNA, ki je posledica dodatka proteinov (v 50 mM NaH_2PO_4 , pH = 7,0). Spremljali smo spremembe pri valovni dolžini 260 nm, te smo pripisali denaturaciji molekul DNA.

 T_m glavnega prehoda DNA, izolirane iz govejega priželjca (CT-DNA), je okoli 83 °C, pri razmerju Alba1 : CT-DNA = 1 : 5 (podatki niso prikazani) se je T_m dvignila na 86 °C, torej za 3 °C, vendar je kljub majhni termični stabilizaciji prihajalo do občutnega kondenziranja molekule DNA, kar je razvidno pri razmerju 1 : 5 med temperaturami 40 °C in 80 °C. Ob dodatku Alba1 v razmerju 1 : 2 (podatki niso prikazani), prehoda nismo več opazili, saj je najverjetneje prišlo do kondenzacije DNA, kar je bilo opaziti tudi pri pregledu vzorca s prostim očesom. (Slika 29)



Slika 29: UV-talilne krivulje genomske DNA, izolirane iz govejega priželjca, in proteina Alba1 pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp (1 : 30 do 1 : 10), taljenje je potekalo od 10 °C do 100 °C. Puščica označuje naraščanje koncentracije proteina.

Figure 29: UV-melting curves of genomic DNA isolated from calf thymus incubated with Alba1 in different protein : DNAbp molar ratios (1 : 30 to 1 : 10), in the temperature range from 10 °C to 100 °C. Arrow indicates increase in protein concentration.

Dodajanje proteina Alba1 sintetični molekuli DNA poli(dA-dT) · poli(dA-dT) pri razmerjih od 1 : 30 do 1 : 5 opazne stabilizacije ni povzročilo, saj je bila temperatura taljenja pri vseh razmerjih Alba1/DNAbp (z izjemo razmerja 1 : 2) 62 °C. Pri razmerju



1 : 2 opazimo kondenziranje molekule DNA. (Slika 30)

Slika 30: UV-talilne krivulje poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA in proteina Alba1 pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp (1 : 30 do 1 : 5), taljenje je potekalo od 10 °C do 100 °C. Figure 30: UV-melting curves of poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA incubated with Alba1 at different protein : DNAbp molar ratios (1 : 30 to 1 : 5), in the temperature range from 10 °C to 100°C.

Vezava proteina Alba1 s sintetično molekulo DNA poli(dG-dC) \cdot poli(dG-dC) pri nobenem razmerju ni povzročila občutne termične stabilizacije, saj je bila razlika v T_m med najnižjim in najvišjim razmerjem DNAbp : Alba1 (1 : 30 do 1 : 2) le 1,5 °C. (Slika 31)



Slika 31: UV-talilne krivulje poli(dG-dC) \cdot poli(dG-dC) DNA in proteina Alba1 pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp (1 : 30 do 1 : 2), taljenje je potekalo od 25 °C do 100 °C. Puščica označuje naraščanje koncentracije proteina.

Figure 31: UV-melting curves of $poly(dG-dC) \cdot poly(dG-dC)$ DNA incubated with Alba1 at different protein : DNAbp molar ratios (1 : 30 to 1 : 2), in the temperature range from 25 °C to 100°C. Arrow indicates increase in protein concentration.

Protein Alba2 na genomsko DNA, izolirano iz govejega priželjca ($T_m = 82$ °C), ni imel linearnega stabilizacijskega učinka. Protein je DNA priželjca najprej (pri razmerjih 1 : 30 in 1 : 20) rahlo termično destabiliziral, pri višjih razmerjih (1 : 10; 5 in 2) je DNA molekulo stabiliziral (do 91 °C), pri teh razmerjih proteina glede na DNA je bilo opaziti tudi efekte kondenzacije DNA. (Slika 32)



Slika 32: UV-talilne krivulje genomske DNA, izolirane iz govejega priželjca, in proteina Alba2 pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp (1 : 30 do 1 : 10), taljenje je potekalo od 20 °C do 100 °C. Puščica označuje naraščanje koncentracije proteina.

Figure 32: UV-melting curves of genomic DNA isolated from calf thymus incubated with Alba2 at different protein : DNAbp molar ratios (1 : 30 to 1 : 10), in the temperature range from 20 °C to 100°C. Arrow indicates increase in protein concentration.

Protein Alba2 je sintetično DNA poli(dA-dT) · poli(dA-dT) s T_m 62 °C stabiliziral pri molskem razmerju proteina in DNA 1 : 2 za 7 °C (T_m = 69 °C). Termogrami kažejo dvofazni prehod pri razmerju proteina : DNAbp>1 : 5. Pri teh razmerjih prihaja verjetno do konformacijskih sprememb v molekuli DNA. (Slika 33)



Slika 33: UV-talilne krivulje poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA in proteina Alba2 pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp (1 : 30 do 1 : 2), taljenje je potekalo od 10 °C do 100 °C. Puščica označuje naraščanje koncentracije proteina.

Figure 33: UV-melting curves of $poly(dA-dT) \cdot poly(dA-dT)$ DNA incubated with Alba2 at different protein : DNAbp molar ratios (1 : 30 to 1 : 2), in the temperature range from 10 °C to 100°C. Arrow indicates increase in protein concentration.

Alba2 je ob dodatku k sintetični poli(dG-dC) \cdot poli(dG-dC) DNA to stabiliziral, T_m je bila pri razmeju 1 : 5 in 1 : 2 višja od 100 °C in je zaradi omejenega meritvenega območja instrumenta nismo mogli določiti (podatki niso prikazani). Pri obeh razmerjih je bilo opaziti tudi kondenzacijo DNA. (Slika 34)



Slika 34: UV-talilne krivulje poli(dG-dC) \cdot poli(dG-dC) DNA in proteina Alba2 pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp (1 : 30 do 1 : 10), taljenje je potekalo od 10 °C do 100 °C. Puščica označuje naraščanje koncentracije proteina.

Figure 34: UV-melting curves of $poly(dG-dC) \cdot poly(dG-dC)$ incubated with Alba2 at different protein : DNAbp molar ratios (1 : 30 to 1 : 10), in the temperature range from 10 °C to 100°C. Arrow indicates increase in protein concentration.

Dodatek kompleksa proteinov Alba1 in Alba2 h genomski DNA, izolirani iz govejega priželjca, je T_m DNA dvignil iz 83 °C (DNA brez proteinov) na 86 °C (razmerji proteinski kompleks : DNAbp 1 : 10 in 1 : 5) ter nato na 92 °C (razmerje 1 : 2). Pri slednjem razmerju opazimo poleg stabilizacijskega efekta tudi deformacijo krivulje zaradi kondenzacije DNA (Slika 35).


Slika 35: UV-talilne krivulje kompleksa proteinov Alba1/Alba2 in genomske DNA, izolirane iz govejega priželjca, pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp (1 : 30 do 1 : 5), 20 °C do 100 °C. Puščica označuje naraščanje koncentracije proteina.

Figure 35: UV-melting curves of genomic DNA isolated from calf thymus incubated with the complex of Alba1/Alba2 at different protein : DNAbp molar ratios (1 : 30 to 1 : 5), 20 °C to 100 °C. Arrow indicates increase in protein concentration.

Kompleks proteinov Alba1/Alba2 se je na poli(dA-dT) · poli(dA-dT) (AT-DNA) vezal kooperativno (razmerji 1 : 10 in 1 : 5). T_m AT-DNA se je dvignila iz 61 °C (brez dodanih proteinov) na 69 °C (razmerje 1 : 2) (Slika 36).



Slika 36: UV-talilne krivulje kompleksa proteinov Alba1/Alba2 in poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp (1 : 30 do 1 : 2), 25 °C do 100 °C. Puščica označuje naraščanje koncentracije proteina.

Figure 36: UV-melting curves of poli(dA-dT) \cdot poli(dA-dT) incubated with the complex of Alba1/Alba2 at different protein : DNAbp molar ratios (1 : 30 to 1 : 2), 25 °C to 100 °C. Arrow indicates increase in protein concentration.

Kompleks Alba1/Alba2 z vezavo na sintetično poli(dG-dC) · poli(dG-dC) (GC-DNA) ($T_m = 96 \,^{\circ}$ C) termično stabilizira molekulo DNA za približno 3 °C (pri razmerju GC-DNAbp : kopleks = 1 : 5). Dodatek proteinov Alba1/Alba2 pri razmerju 1 : 2 povzroči kondenzacijo DNA, v območju meritev denaturacije DNA nismo zaznali. (Slika 37)



Slika 37: UV-talilne krivulje kompleksa proteinov Alba1/Alba2 in poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA pri različnih molskih razmerjih protein : DNAbp (1 : 30 do 1 : 20), 25 °C do 100 °C. Puščica označuje naraščanje koncentracije proteina.

Figure 37: UV-melting curves of poly(dG-dC) \cdot poly(dG-dC) incubated with the complex of Alba1/Alba2 at different protein : DNAbp molar ratios (1 : 30 to 1 : 20), 25 °C to 100 °C. Arrow indicates increase in protein concentration.

Po enačbi 1 smo izračunali navidezne konstante asociacije $(K_{app}^{T_m})$ za molska razmerja proteinov Alba ter različnih molekul DNA, pri katerih smo opazili temperaturno stabilizacijo DNA (preglednica 9). Vrednosti $K_{app}^{T_m}$ so bile pri proteinih Alba1 in Alba2 v istem redu velikosti (10⁵), pri kompleksu Alba1/Alba2 pa do desetkrat višje (10⁶).

Preglednica 9: Navidezne konstante asociacije ($K_{app}^{T_m}$) za molska razmerja proteinov Alba in CT-DNA, AT-DNA in GC-DNA. Razmerja protein : DNAbp je 1 : 10, 1 : 5 in 1 : 2. Standardne napake ne presegajo 5 %. Table 9: Apparent association constants ($K_{app}^{T_m}$) for different molar ratios of Alba proteins and CT-DNA, AT-DNA and GC-DNA. Ratios protein : DNAbp were 1 : 10, 1 : 5 and 1 : 2. Standard errors are lower than 5 %.

- ,			
	$K_{\rm app}^{\rm T_m}$ (M ⁻¹) [1:10]	$K_{\rm app}^{{ m T}_{ m m}}$ (M ⁻¹) [1 : 5]	$K_{\rm app}^{{ m T_m}}$ (M ⁻¹) [1 : 2]
Alba1 z CT-DNA	$9,4 \cdot 10^{5}$	$3,7 \cdot 10^{5}$	$1,2 \cdot 10^{5}$
Alba1 z AT-DNA	$5,3 \cdot 10^{5}$	$2,6 \cdot 10^5$	$3,4 \cdot 10^{5}$
Alba1 z GC-DNA	$9,3 \cdot 10^{5}$	$5,5 \cdot 10^{5}$	$2,0 \cdot 10^{5}$
Alba2 z CT-DNA	$8,0 \cdot 10^{5}$	$3,7 \cdot 10^{5}$	$1,5 \cdot 10^{5}$
Alba2 z AT-DNA	$6,7 \cdot 10^{5}$	$6,9 \cdot 10^{5}$	$1,6 \cdot 10^5$
Alba2 z GC-DNA	$2,2 \cdot 10^{6}$	$1,2 \cdot 10^{6}$	$2,6 \cdot 10^5$
Alba1/Alba2 z CT-DNA	$1,9 \cdot 10^{6}$	$5,9 \cdot 10^{5}$	$4,1 \cdot 10^{5}$
Alba1/Alba2 z AT-DNA	$1,2 \cdot 10^{6}$	$1,2 \cdot 10^{6}$	$3,9 \cdot 10^{5}$
Alba1/Alba2 z GC-DNA	$6,2 \cdot 10^{6}$	$2,6 \cdot 10^{6}$	$3,3 \cdot 10^{5}$

4.3.8 Metoda elektroforeznega zamika s proteini Alba

Z metodo elektroforeznega zamika smo pokazali vpliv vezave proteina Alba1, Alba2 ter kompleksa obeh proteinov na linearno molekulo DNA (pUC19/*Eco*RI). Proteine smo z DNA inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi. Zaradi vpliva vezave proteinov Alba na DNA se hitrost njenega potovanja v električnem polju zmanjša. Iz slike 38 je razvidno, da je imel protein Alba1 večji vpliv na potovanje DNA v gelu kot Alba2, saj je potovanje DNA v elektroforeznem gelu bolj zavrl. Kompleks obeh proteinov je imel v primerjavi z učinkom samega proteina Alba1 tudi manjši učinek na zaviranje potovanja DNA v elektroforeznem gelu, kar nakazuje na vpliv proteina Alba2 na molekulo DNA ob skupni vezavi obeh proteinov kompleksa Alba1/Alba2 (Slika 38). Inkubacija proteinov Alba z lineariziranim plazmidom pri temperaturi 50 °C ni bistveno vplivala na potovanje DNA v elektroforeznem polju (pri sobni temperaturi), podatki potovanja plazmida inkubiranega s proteini Alba pri 50 °C niso prikazani.



Slika 38: Metoda elektroforeznega zamika linearne molekule DNA (pUC19/*Eco*RI) s proteini Alba. Ležeči trikotniki označujejo naraščanje koncentracije dodanih proteinov Alba (razmerja DNAbp : protein od 2 :1 do 1 : 10). Zunanja pasova na gelu sta lestvica DNA ($\lambda/PstI$).

Figure 38: Electrophoretic mobility shift assay shows the influence of Alba proteins binding on linear DNA (pUC19/*Eco*RI) electrophoretic mobility. The concentration of added Alba protein increases from left to right (DNAbp : protein ratios from 2 :1 to 1 : 10). Outer lanes are DNA standards ($\lambda/PstI$).

4.3.9 Vpliv temperature in vezave DNA na proteine Alba

Spremembe v sekundarni strukturi proteinov Alba, ki so posledica vpliva vezave različnih molekul DNA ter vpliva različnih temperatur, smo spremljali preko spektrov CD. Spektre smo spremljali v daljnjem UV-območju (200 nm–250 nm), ti nam podajo informacijo o sekundarni strukturi; β -strukture imajo karakteristični minimum pri 217 nm, α -strukture pa pri 209 in 220 nm (van Holde, 1985; Venyaminov in Yang, 1996). Spektre smo merili pri 25 °C, 50 °C, 70 °C in 90 °C ter ponovno pri 25 °C (R25 °C), s čimer smo preverili reverzibilnost vzpostavitve začetne sekundarne strukture po izpostavitvi proteina temperaturi 90 °C.



Slika 39: Spektri (cirkularni dikroizem) proteina Alba1 pri različnih temperaturah v daljnjem UV-območju (200 nm–250 nm). [A] brez vezane DNA, [B] v prisotnosti genomske DNA, izolirane iz govejega priželjca, [C] v prisotnosti poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA, [D] poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA.

Figure 39: Spectra (circular dichroism) of Alba1 protein at different temperatures in far UV-range (200 nm-250 nm). [A] without bound DNA, [B] in the presence of genomic calf thymus DNA, [C] in the presence of poly(dA-dT) \cdot poly(dA-dT) DNA and [D] in the presence of poly(dG-dC) \cdot poly(dG-dC) DNA.

Sekundarna struktura proteina Alba1 se v odsotnosti DNA z višanjem temperature ni bistveno spreminjala. Vsebnost α -vijačnic v proteinu je bila približno 22 %, delež β -ploskev je bil 51 % in delež β -zavojev 27 % (Slika 39A, Preglednica 10).

Protein Alba1 je ob dodajanju genomske DNA, izolirane iz govejega priželjca, prevzel manj urejeno strukturo – zmanjšal se je delež α -vijačnic in β -ploskev na račun povečanega deleža preostalih struktur (21 %). S poviševanjem temperature je protein spet zavzel bolj urejeno strukturo, z najbolj urejeno strukturo pri 90 °C (Slika 39B, Preglednica 10).

Pri dodajanju sintetičnih poli(dA-dT) · poli(dA-dT) in poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA nismo opazili bistvenih sprememb v razmerju sekundarnih struktur proteina Alba1 (Sliki 39C in 39D, Preglednica 10). Izjema je bil vpliv dodane poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA pri temperaturah 50 °C in 70 °C, kjer smo opazili povečanje deleža β -ploskev (11 %) na račun zmanjšanja deležev β -zavojev (-7 %) in preostalih struktur (-4 %), glede na sekundarno strukturo proteina Alba1 pri temperaturi 25 °C (Slika 39D, Preglednica 10). Torej je protein Alba1 ob dodani sintetični poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA zavzel malo bolj urejeno strukturo pri temperaturah 50 °C in 70 °C.

Preglednica 10: Ocena deležev posameznih elementov sekundarne strukture proteina Alba1 na podlagi

spektrov cirkularnega dikroizma v daljnjem UV-območju v odvisnosti od temperature in prisotnosti različnih molekul DNA.

Table 10: Evaluation of different secondary structure elements in Alba1 protein on the basis of circular dichroism spectra in far UV-range in dependance of temperature, when incubated with different DNA molecules.

Temperatura	delež	delež	delež	delež preostalih		
	α-vijačnic (%)	β-ploskev (%)	β-zavojev (%)	struktur (%)		
Alba1						
25 °C	23 2	50 ± 1	27 ± 2	0		
50 °C	22 ± 1	50 ± 1	27 ± 1	0		
70 °C	23 ± 1	54 ± 1	23 ± 1	0		
90 °C	22 ± 1	51 ± 1	27 ± 1	0		
R25 °C	22 ± 2	53 ± 1	25 ± 2	0		
Alba1 + CT-DNA						
25 °C	17 ± 1	42 ± 1	20 ± 1	21 ± 2		
50 °C	20 ± 1	45 ± 1	22 ± 1	12 ± 3		
70 °C	17 ± 1	45 ± 1	22 ± 1	13 ± 2		
90 °C	23 ± 1	51 ± 1	26 ± 1	0		
R25 °C	21 ± 1	50 ± 1	21 ± 1	8 ± 3		
Alba1 + AT-DNA						
25 °C	21 ± 1	49 ± 2	29 ± 1	0 ± 3		
50 °C	22 ± 1	51 ± 1	28 ± 1	0		
70 °C	23 ± 1	54 ± 1	23 ± 1	0		
90 °C	23 ± 2	51 ± 1	26 ± 2	0		
R25 °C	23 ± 1	52 ± 1	25 ± 1	0		
Alba1 + GC-DNA						
25 °C	23 ± 1	45 ± 2	28 ± 1	4 ± 3		
50 °C	20 ± 1	57 ± 1	23 ± 1	0		
70 °C	23 ± 1	56 ± 1	21 ± 1	0		
90 °C	20 ± 1	50 ± 2	28 ± 2	1 ± 4		
R25 °C	19 ± 2	54 ± 1	27 ± 2	0		



Slika 40: Spektri (cirkularni dikroizem) proteina Alba2 pri različnih temperaturah v daljnjem UV-območju (200 nm–250 nm). [A] brez vezane DNA, [B] v prisotnosti genomske DNA, izolirane iz govejega priželjca, [C] v prisotnosti poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA, [D] poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA. Figure 40: Spectra (circular dichroism) of Alba2 protein at different temperatures in far UV-range (200 nm–

250 nm). [A] without bound DNA, [B] in the presence of genomic calf thymus DNA, [C] in the presence of poly(dA-dT) \cdot poly(dA-dT) DNA and [D] in the presence of poly(dG-dC) \cdot poly(dG-dC) DNA.

Struktura Alba2 je v odsotnosti DNA pri vseh temperaturah, razen pri temperaturi 90 °C, vsebovala 11 % α -vijačnic, 60 % β -ploskev in 29 % β -zavojev. Pri 90 °C se je delež α -vijačnic znižal na 6 % na račun preostalih β -struktur (Slika 40A, Preglednica 11).

Protein Alba2 je (tako kot Alba1) ob dodajanju genomske DNA, izolirane iz govejega priželjca, in s poviševanjem temperature (od 25 °C do 90 °C) prevzel vse bolj urejeno strukturo. Pri 25 °C je bil delež α -vijačnic 7 %, delež β -ploskev 43 %, delež β -zavojev 19 % in delež preostalih struktur 31 %. S povečevanjem temperature se je povečal delež α -vijačnic (9 %), delež β -ploskev (66 %) in delež β -zavojev (25 %), medtem ko preostalih struktur pri 90 °C ni bilo več (Slika 40B, Preglednica 11).

Pri dodajanju sintetične poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA in s poviševanjem temperature je protein zavzel manj urejeno strukturo. Najbolj sta se zmanjšala deleža β -ploskev (-7 %) in β -zavojev (-6 %) na račun pojavljanja preostalih sekundarnih struktur (14 %) (Slika 40C, Preglednica 11).

Ob dodatku sintetične poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA je protein Alba2 pri temperaturi 25 °C prevzel manj urejeno strukturo – zmanjšal se je delež α -vijačnic in β -ploskev na račun povečanega deleža preostalih struktur (14 %). S poviševanjem temperature je protein zavzel bolj urejeno strukturo, z najbolj urejeno strukturo pri 70 °C. Dodatno segrevanje kompleksa protein – DNA je ponovno porušilo sekundarne strukture (Slika 40D, Preglednica 11).

Preglednica 11: Ocena deležev posameznih elementov sekundarne strukture proteina Alba2 na podlagi spektrov cirkularnega dikroizma v daljnjem UV-območju v odvisnosti od temperature in prisotnosti različnih molekul DNA.

Table11: Evaluation of different secondary structure elements in Alba1 protein on the basis of circular dichroism spectra in far UV-range in dependance of temperature, when incubated with different DNA molecules.

Temperatura	delež	delež	delež	delež preostalih		
	α-vijačnic (%)	β- ploskev (%)	β-zavojev (%)	struktur (%)		
Alba2						
25 °C	10 ± 1	60 ± 1	29 ± 1	0		
50 °C	12 ± 1	59 ± 1	28 ± 1	0		
70 °C	11 ± 1	60 ± 1	29 ± 1	0		
90 °C	6 ± 2	48 ± 3	25 ± 2	21 ± 5		
R25 °C	11 ± 1	59 ± 1	30 ± 1	0		
Alba2 + CT-DNA						
25 °C	7 ± 1	43 ± 1	19 ± 1	31 ± 2		
50 °C	11 ± 1	48 ± 1	24 ± 1	17 ± 3		
70 °C	7 ± 1	43 ± 1	24 ± 1	26 ± 2		
90 °C	9 ± 1	67 ± 1	25 ± 1	0		
R25 °C	8 ± 1	47 ± 1	21 ± 1	24 ± 3		
Alba2 + AT-DNA						
25 °C	10 ± 2	57 ± 1	33 ± 2	0		
50 °C	10 ± 2	55 ± 2	32 ± 2	4 ± 4		
70 °C	4 ± 1	58 ± 2	27 ± 1	11 ± 3		
90 °C	9 ± 2	50 ± 3	27 ± 2	14 ± 6		
R25 °C	11 ± 2	59 ± 1	30 ± 2	0		
Alba2 + GC-DNA						
25 °C	8 ± 2	46 ± 3	32 ± 2	14 ± 5		
50 °C	12 ± 1	60 ± 1	28 ± 1	0		
70 °C	12 ± 2	65 ± 1	23 ± 2	0		
90 °C	8 ± 2	46 ± 3	27 ± 2	19 ± 6		
R25 °C	9 ± 2	56 ± 3	33 ± 2	3 ± 5		



Slika 41: Spektri (cirkularni dikroizem) kompleksa proteinov Alba1/Alba2 pri različnih temperaturah v daljnjem UV-območju (200 nm–250 nm). [A] brez vezane DNA, [B] v prisotnosti genomske DNA, izolirane iz govejega priželjca, [C] v prisotnosti poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA, [D] poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA.

Figure 41: Spectra (circular dichroism) of Alba1/Alba2 complex at different temperatures in far UV-range (200 nm–250 nm). [A] without bound DNA, [B] in the presence of genomic calf thymus DNA, [C] in the presence of poly(dA-dT) \cdot poly(dA-dT) DNA and [D] in the presence of poly(dG-dC) \cdot poly(dG-dC) DNA.

Kompleks Alba1/Alba2 je z višanjem temperature s 25 °C na 50 °C in 70 °C ohranil razmerje sekundarnih struktur; delež α -vijačnic kompleksa je bil 25 %, delež β -ploskev 48 % ter delež β -zavojev okoli 27 %. Segrevanje kompleksa Alba1/Alba2 je povzročilo povečanje v deležu β -ploskev (61 %) na račun β -zavojev (10 %) (Slika 41A, Preglednica 12).

Dodajanje genomske DNA, izolirane iz govejega priželjca, kompleksu proteinov Alba1/Alba2 je povzročilo zmanjšanje deleža urejenih sekundarnih struktur proteina na račun pojava ostalih struktur (28 %). Kot vsak posamezen protein je tudi kompleks Alba1/Alba2 s poviševanjem temperature (od 25 °C do 90 °C) spet zavzel bolj urejeno strukturo; najbolj se je povečal odstotek β -ploskev (65 %) (Slika 41B, Preglednica 12).

Pri dodajanju sintetičnih poli(dA-dT) · poli(dA-dT) DNA in poli(dG-dC) · poli(dG-dC) DNA kompleksu Alba1/Alba2 pri temperaturi 25 °C nismo opazili sprememb v razmerju sekundarnih struktur proteina. Ob povečevanju temperature se je povečal odstotek β ploskev, predvsem na račun β -zavojev (Sliki 41C in 41D, Preglednica 12). Preglednica 12: Ocena deležev posameznih elementov sekundarne strukture kompleksa proteinov Alba1/Alba2 na podlagi spektrov cirkularnega dikroizma v daljnjem UV-območju v odvisnosti od temperature in prisotnosti različnih molekul DNA.

Table 12: Evaluation of different secondary structure elements in Alba1/Alba2 complex on the basis of circular dichroism spectra in far UV-range in dependance of temperature, when incubated with different DNA molecules.

Temperatura	delež	delež	delež	delež preostalih	
	α-vijačnic (%)	β-ploskev (%)	β-zavojev (%)	struktur (%)	
Alba1/Alba2					
25 °C	27 ± 1	49 ± 1	24 ± 1	0	
50 °C	23 ± 1	50 ± 1	27 ± 1	0	
70 °C	25 ± 1	47 ± 1	28 ± 1	0	
90 °C	28 ± 3	61 ± 2	10 ± 3	0	
R25 °C	26 ± 1	49 ± 1	25 ± 1	0	
Alba1/Alba2 + CT	-DNA				
25 °C	19 ± 1	34 ± 1	19 ± 1	28 ± 3	
50 °C	21 ± 1	42 ± 1	16 ± 1	21 ± 2	
70 °C	24 ± 1	59 ± 1	17 ± 1	0	
90 °C	20 ± 2	65 ± 2	15 ± 2	0	
R25 °C	19 ± 1	44 ± 1	20 ± 1	17 ± 2	
Alba1/Alba2 + AT-DNA					
25 °C	27 ± 1	46 ± 1	27 ± 1	0	
50 °C	25 ± 1	50 ± 1	25 ± 1	0	
70 °C	18 ± 1	63 ± 1	19 ± 1	0	
90 °C	32 ± 4	68 ± 2	0 ± 3	0	
R25 °C	28 ± 2	46 ± 1	26 ± 2	0	
Alba1/Alba2 + GC-DNA					
25 °C	28 ± 2	46 ± 1	26 ± 2	0	
50 °C	24 ± 1	52 ± 1	24 ± 1	0	
70 °C	25 ± 1	45 ± 2	26 ± 2	4 ± 4	
90 °C	9 ± 6	91 ± 7	0	0	
R25 °C	21 ± 1	51 ± 1	27 ± 1	0	

4.3.10 Površinska plazmonska resonanca (SPR)

S površinsko plazmonsko resonanco (SPR) smo preverili stopnjo vezave proteinov Alba na oligonukleotide, s katerimi smo simulirali splošno zaporedje DNA (SPRspecAP). Vezava proteinov Alba na SPRpoliAT in SPRpoliGC je primerljiva z vezavo na SPRpoliAP. Vezava na oligonukleotide, ki so simulirali zaporedja sintetične DNA poli(dA-dT) · poli(dA-dT) in sintetične DNA poli(dG-dC) · poli(dG-dC), ni prikazana.



Slika 42: Senzorgram vezave proteina Alba1 na oligonukleotid SPRspecAP z SPR (RU-relativne enote). Figure 42: Sensorgram of binding of Alba1 protein to oligonucleotide SPRspecAP with SPR (RU-relative units).



Slika 43: Senzorgram vezave proteina Alba2 na oligonukleotid SPRspecAP z SPR (RU-relativne enote). Figure 43: Sensorgram of binding of Alba2 protein to oligonucleotide SPRspecAP with SPR (RU-relative units).

Vezava proteina Alba1 na SPRspecAP je potekala v primerjavi z vezavo proteina Alba2 hitreje. Protein Alba2 je kljub manjši hitrosti vezave na SPRspecAP dosegal plato na senzorgramu pri višjih količinah vezanega proteina kot Alba1 (plato, 12000 nM je pri 420 sekundah po začetku asociacije pri Alba1 4135 RU, pri Alba2 pa 7245 RU) (Sliki 42 in 43).



Slika 44: Senzorgram vezave kompleksa proteinov Alba1/Alba2 na oligonukleotid SPRspecAP z SPR (RU-relativne enote).

Figure 44: Sensorgram of binding of Alba1/Alba2 complex to oligonucleotide SPRspecAP with SPR (RU-relative units).

Senzorgram vezave kompleksa Alba1/Alba2 na SPRspecAP ima drugačno obliko, saj opazimo dvofazno vezavo na DNA. Hitrost vezave kompleksa je v prvem delu primerljiva s hitrostjo vezave proteina Alba1, v drugem delu je hitrost manjša. Kompleks (12000 nM) doseže pri 420 sekundah po začetku asociacije vrednost, ki je primerljiva z vrednostjo proteina Alba2 (7315 RU) (Slika 44).



Slika 45: Senzorgram vezave govejih histonov na oligonukleotid SPRspecAP z SPR (RU-relativne enote). Figure 45: Sensorgram of binding of bovine histone to oligonucleotide SPRspecAP with SPR (RU-relative units).

Histoni (2770 nM histoni) se na DNA vežejo z veliko hitrostjo vezave, 420 sekund po začetku asociacije doseže plato vrednost 2525 RU (Slika 45). BSA se na oligonukleotide ni vezal.

V preglednici 13 so prikazane količine vezanih proteinov na SPRspecAP ob koncu disociacije (10 sekund pred koncem disociacije) proteina iz oligonukleotida, kar predstavlja stopnjo stabilno vezanega proteina na SPRspecAP.

Preglednica 13: Vrednosti (v RU-relativne enote) vezanih proteinov na zaporedje 21 nukleotidov oligonukleotida SPRspecAP pri času 790 sekund po nanosu raztopine proteina na streptavidinski čip, 10 sekund pred koncem disociacije. (SA čip, pretok 5µL/min, 800 s)

Table 13: Values (in RU-relative units) of bound protein to sequence of 21nucleotides from oligonucleotide SPRspecAP at time of 790 seconds after application of proteins suspension on streptavidine sensor chip, 10 seconds before dissociation end. (SA chip, flow 5µL/min, 800 s)

koncentracija (nM)	AP-DNA (RU)	koncentracija (nM)	AP-DNA (RU)		
Alba1		Goveji histoni (pozitivna kontrola)			
1500	1070 ± 2	138	530 ± 1		
3000	1385 ± 2	277	1620 ± 2		
4000	1450 ± 1	831	1700 ± 1		
5000	1620 ± 2	1385	1555 ± 1		
6000	1560 ± 1	1940	1480 ± 1		
12000	1715 ± 1	2770	1460 ± 2		
Al	Alba2		BSA (negativna kontrola)		
1500	1690 ± 2	1500	$0,4 \pm 1$		
3000	4890 ± 2	3000	$0,1 \pm 1$		
4000	5000 ± 1	4000	$0,4 \pm 1$		
5000	5360 ± 1	5000	$0,4 \pm 1$		
6000	5490 ± 2	6000	0,6 ± 1		
12000	5820 ± 2	12000	0,6 ± 1		
Kompleks Alba1/Alba2					
1500	1925 ± 1				
3000	4920 ± 2				
4000	5190 ± 2				
5000	5370 ± 2				
6000	5500 ± 1				

 5820 ± 2

12000

4.4 VPLIV FLUORESCENČNIH BARVIL NA CELICE ARHEJE Aeropyrum pernix TER MOLEKULE DNA

Rigidnost celične membrane ekstremnih termofilov je večja zaradi lipidov, ki vsebujejo etrsko vez in celične stene specifične sestave. Določanje živosti celic z različnimi barvili je zato oteženo.

Preučevali smo primernost več fluorescenčnih barvil za razločevanje med živimi in mrtvimi celicami. Izmed različnih DNA-vezavnih fluorescenčnih barvil smo uporabili Hoecst 33258, DAPI, akridin oranž in $DiBAC_4(3)$.

4.4.1 Termična denaturacija molekul DNA v prisotnosti fluorescenčnih barvil

S fluorescenčno spektroskopijo smo določali učinek različnih fluorescenčnih barvil na termično stabilnost genomske DNA (gDNA), izolirane iz arheje *Aeropyrum pernix*. Temperatura taljenja pri pH 7,0 (10 mM HEPES) je bila določena iz UV-talilnih krivulj (Slika 46).

 T_m izolirane gDNA arheje *A. pernix* je bila 70 °C. Barvilo Hoechst 33258 termično stabilizira DNA za 11 °C ($T_m = 81$ °C), barvilo DAPI za 1 °C ($T_m = 71$ °C) in akridin

oranž za 5 °C ($T_m = 75$ °C). Opazili smo, da DiBAC₄(3) povzroči minimalno termično destabilizacijo gDNA ($T_m = 69$ °C) (Slika 46).



Slika 46: Termična denaturacija izolirane genomske DNA arheje *Aeropyrum pernix* v prisotnosti različnih fluorescenčnih barvil. f_D označuje molarno frakcijo denaturirane DNA. Figure 46: Thermal denaturation of gDNA isolated from *Aeropyrum pernix* incubated with different fluorescenč dyes. f_D represents molar fraction of denatured DNA.

4.4.2 Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili

Z namenom določiti optimalno koncentracijo uporabljenih fluorescenčnih barvil smo celice arheje *A. pernix* titrirali z različnimi fluorescenčnimi barvili. Titracijske krivulje nam podajo informacijo o stopnji nasičenosti celic s fluorescenčnimi barvili (Slika 47).

Titracijske krivulje celic arheje *A. pernix* s fluorescenčnimi barvili Hoechst 33258, DAPI, akridin oranž in DiBAC₄(3) so prikazane na sliki 47. Vezavno razmerje, izraženo v nmol barvila na mg suhe celične teže, je 163 ± 7 za Hoechst 33258, 456 ± 11 za DAPI, 144 ± 11 za akridin oranž in 178 ± 11 za DiBAC₄(3). Fluorescenčne titracijske krivulje so pokazale, da je nasičenje celic arheje *A. pernix* s fluorescenčnimi barvili primerljiva, razen za barvilo DAPI, ki je dvakrat višja (Slika 47).

Nasičenje celic s fluorescenčnimi barvili smo spremljali pri različnih inkubacijskih časih (2, 4, 8 ur) in različnih temperaturah inkubacije (25 °C in 50 °C). Vezavno razmerje barvila z arheje *A. pernix* je bilo neodvisno od temperature inkubacije, medtem ko je bila kintetika vezave odvisna od temperature. Pri 25 °C je bil čas, potreben za nasičenje celic z barviloma akridin oranž in DiBAC₄(3), najkrajši (2 uri), za nasičenje celic z DAPI so bile

potrebne 4 ure medtem ko je bila najdaljša inkubacija (8 ur) potrebna za nasičenje celic z barvilom Hoechst 33258. Z dvigom temperature na 50 °C smo skrajšali čas, potreben za nasičenje celic z vsemi barvili na, 2 uri.



Slika 47: Titracija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili. FI/FI₀ označuje normalizirano intenziteto fluorescence.

Figure 47: Titration of *Aeropyrum pernix* cells with different fluorescent dyes. FI/FI₀ represents normalized fluorescence intensity.

4.4.3 Sprememba fluorescence barvil s celicami ob spreminjanju temperature

Spremembe v intenziteti fluorescenčne emisije celic arheje *Aeropyrum pernix* v prisotnosti 10 μ M barvila Hoechst 33258, ki smo ga inkubirali s celicami 8 h na 25 °C in 2 h na 50 °C, se razlikujeta. Pri segrevanju celic, inkubiranih z barvilom 8 h na 25 °C, opazimo med 30 °C in 45 °C povišanje v intenziteti fluorescence, tega prehoda pri celicah, inkubiranih na 50 °C, ne opazimo. Upadanje fluorescenčne intenzitete se pri celicah, inkubiranih z barvilom na 50 °C, začne med segrevanjem že pri 60 °C, medtem ko začne intenziteta pri celicah, ki smo jih inkubirali na 25 °C, upadati šele pri 80 °C (Slika 48).

Spremembe v emisiji fluorescence ob segrevanju celic arheje *A. pernix* ob prisotnosti barvil DAPI (Slika 49), akridin oranž (podatki niso prikazani) in DiBAC₄(3) (podatki niso prikazani) se niso bistveno razlikovale glede na temperaturo inkubacije. Fluorescenčna intenziteta celic v kombinaciji z barvilom DAPI je s segrevanjem naraščala do približno 70 °C ter nato začela upadati. Fluorescenčne emisije celic arheje *A. pernix* z barviloma akridin oranž ali DiBAC₄(3) so naraščale v celotnem merilnem območju instrumenta (od 20 °C do 100 °C).



Slika 48: Relativna intenziteta fluorescence (FI/FI₀) barvila Hoechst 33258 v prisotnosti celic arheje *Aeropyrum pernix* v odvisnosti od temperature. Celice so bile inkubirane 8 h in 2 h pri temperaturah 25 °C in 50 °C.

Figure 48: Relative fluorescence intensity (FI/FI₀) of Hoechst 33258 and *Aeropyrum pernix* cells in dependance of temperature. Cells were incubated 8 h and 2 h at temperatures of 25 °C and 50 °C.



Slika 49: Relativna intenziteta fluorescence (FI/FI₀) barvila DAPI v prisotnosti celic arheje *Aeropyrum pernix* v odvisnosti od temperature. Celice so bile inkubirane 4 h in 2 h pri temperaturah 25 °C in 50 °C. Figure 49: Relative fluorescence intensity (FI/FI₀) of DAPI and *Aeropyrum pernix* cells in dependance of temperature. Cells were incubated 4 h and 2 h at temperatures of 25 °C and 50 °C.

4.4.4 Razlike v vezavi fluorescenčnih barvil glede na viabilnost celic arheje Aeropyrum pernix

Intenziteto fluorescence smo merili suspenzijam celic arheje *A. pernix* z različnimi deleži živih in mrtvih celic. Kot najuspešnejša metoda pridobivanja liziranih celic se je pokazala 10-minutna inkubacija celic na 130 °C, saj so tako pridobljene celice večinoma še ohranile splošno zunanjo celično strukturo. Kljub inaktivaciji večina celic ni lizirala, ampak je prevzela stanje "membranskih duhkov" (ang. "ghost").

Največjo razliko v intenziteti fluorescenčnega signala med živimi in mrtvimi celicami smo opazili pri inkubaciji celic arheje *A. pernix* z barvilom DAPI, saj je bil signal pri mrtvih celicah za 15 % nižji od signala pri živih celicah. Pri barvilu Hoechst 33258 je signal mrtvih celic upadel za 12 %, pri barvilu akridin oranž za 9 % in pri barvilu DiBAC₄(3) za 5 % (Slika 50).

Fluorescenčna signala živih in mrtvih celic *A. pernix*, ki smo jih inkubirali z barvilom akridin oranž in bi lahko služila za zaznavo molekul DNA pri $\lambda_{em} = 526$ nm in zaznavo molekul RNA pri $\lambda_{em} = 560$ nm se pri analizi s statističnim testom Anova nista bistveno razlikovala (SAS-Software, 1999).



Slika 50: Odvisnost intenzitete fluorescence od deleža živih celic arheje *Aeropyrum pernix*, inkubiranih s fluorescenčnimi barvili. FI/FI₀ označuje normalizirano intenziteto fluorescence. Figure 50: Dependance of fluorescence intensity regarding to percentage of live *Aeropyrum pernix* cells incubated with fluorescent dyes. FI/FI₀ represents normalized fluorescence intensity.

4.4.5 DSC termogrami celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili

Vpliv fluorescenčnih barvil na DNA ter druge celične komponente (npr. ribosome) lahko spremljamo z DSC. Termogram celih celic arheje *Aeropyrum pernix* inkubiranih z različnimi fluorescenčnimi barvili (pri pH 7,0; 10 mM HEPES, 260 mM NaCl), je prikazan na slikah 51–54. Vsi vzorci so bili inkubirani 2 uri pri 50 °C v temi v prisotnosti barvil ter nato predgreti na 100 °C. Kontrolne krivulje so bile narejene samo s celicami arheje *A. pernix* brez dodanih fluorescenčnih barvil.

Slika 51 prikazuje vpliv barvila Hoechst 33258 na termično stabilnost komponent celic arheje *A. pernix*. Dve glavni prekrivajoči se endotermi z vrhovoma pri temperaturah 119 °C (vrh b) in 133 °C (vrh c) predstavljata denaturacijo ribosomskih podenot (Milek in sod., 2007). Na termogramu opazimo manjši vrh (vrh a) pri 96,5 °C, ki se pojavi pred vrhovoma b in c ter predstavlja denaturacijo DNA. S poviševanjem koncentracije barvila Hoechst 33258 se je temperatura denaturacije vrha a premaknila k višjim temperaturam, medtem ko se temperatura denaturacije vrhov b in c ni bistveno spremenila (Slika 51, preglednica 14). Rezultati so pokazali, da se barvilo Hoechst 33258 veže le na DNA in ne vpliva na ostale celične komponente.



Slika 51: Termogrami (diferenčna dinamična kalorimetrija) celic arheje *Aeropyrum pernix* po inkubiranju z barvilom Hoechst 33258. Endoterme predstavljajo termograme celic arheje *Aeropyrum pernix* brez barvila [1] in v prisotnosti različnih koncentracij barvila Hoechst 33258 nmol/(mg suhe celične mase); [2] 0,625 nmol/mg; [3] 3,125 nmol/mg; [4] 6,25 nmol/mg; [5] 37,5 nmol/mg.

Figure 51: Thermograms (differential scanning calorimetry) of *Aeropyrum pernix* cells after incubation with s Hoechst 33258. Endoterms represent termograms of *Aeropyrum pernix* cells without dyes [1] and after incubation with different concentration of Hoechst 33258 nmol/(mg dry cell mass); [2] 0,625 nmol/mg; [3] 3,125 nmol/mg; [4] 6,25 nmol/mg; [5] 37,5 nmol/mg.



Slika 52: Termogrami (diferenčna dinamična kalorimetrija) celic arheje *Aeropyrum pernix* po inkubiranju z barvilom DAPI. Endoterme predstavljajo termograme celic arheje *Aeropyrum pernix* brez barvila [1] in ob različnih temperaturah predgretja; [2–4] v prisotnosti barvila DAPI koncentracije 50 nmol/(na mg suhe celične mase): [2] 100 °C; [3] 109 °C; [4] 112 °C.

Figure 52: Thermograms (differential scanning calorimetry) of *Aeropyrum pernix* cells after incubation with DAPI. Endoterms represent termograms of *Aeropyrum pernix* cells without dyes [1] and after incubation with DAPI at different temperatures of preheating; [2] 100 °C; [3] 109 °C; [4] 112 °C.

Slika 52 prikazuje termograme DSC celic arheje *A. pernix*, inkubiranih z barvilom DAPI pri različnih temperaturah predgretja. Celice so v kombinaciji z barvilom DAPI potrebovale višje temperature predgretja, saj smo na termogramih DSC vrh a, ki pripada DNA, videli šele pri temperaturah, višjih od 109 °C. Temperatura denaturacije DNA je 96,5 °C in se ob prisotnosti 50 nM barvila DAPI na mg suhe celične mase dvigne na 102 °C (Slika 52, preglednica 14).



Slika 53: Termogrami (diferenčna dinamična kalorimetrija) celic arheje *Aeropyrum pernix* po inkubiranju z barvilom akridin oranž. Endotermi predstavljata termograma celic arheje *Aeropyrum pernix* [1] brez barvila in [2] v prisotnosti 3,750 nmol/(na mg suhe celične mase) barvila akridin oranž.

Figure 53: Thermograms (differential scanning calorimetry) of *Aeropyrum pernix* cells after incubation with s acridine orange. Endoterms represent termograms of *Aeropyrum pernix* cells without dyes [1] and after incubation with 3,750 nmol/(mg dry cell mass) of acridine orange [2].

Učinek barvila akridin oranž na termogram DSC arheje *A. pernix* je bil podoben kot učinek barvila Hoechst 33258. Akridin oranž je pri koncentraciji 3,75 nmol/(na mg suhe celične mase) povzročil premik T_m vrha a s 96,5 °C na 99,5 °C. Poleg vpliva na temperaturo taljenja DNA smo opazili tudi premik vrhov b in c: povišanje T_m vrha b (za 1 °C) in znižanje T_m vrha c (za 1 °C), kar nakazuje, da se je barvilo vezalo tudi na ribosome (Slika 53, preglednica 14).

Za razliko od ostalih barvil, ki so zaradi svoje vezave nanjo DNA termično stabilizirali, smo opazili drugačen učinek barvila DiBAC₄(3). S povečevanjem koncentracije barvila DiBAC₄(3) se je temperatura taljenja DNA pri 0,375 nmol barvila DiBAC₄(3) na mg suhe celične mase znižala za 5 °C (s 104,4 °C na 98,9 °C) (Slika 54, preglednica 14).



Slika 54: Termogrami (diferenčna dinamična kalorimetrija) celic arheje *Aeropyrum pernix* po inkubiranju z barvilom DiBAC₄(3). Endoterme predstavljajo termograme celic arheje *Aeropyrum pernix* brez barvila [1] in ob različnih koncentracijah barvila DiBAC₄(3) nmol/(mg suhe celične mase); [2] 0,075 nmol/mg in [3] 0,375 nmol/mg.

Figure 54: Thermograms (differential scanning calorimetry) of *Aeropyrum pernix* cells after incubation with DiBAC₄(3). Endoterms represent termograms of *Aeropyrum pernix* cells without dyes [1] and after incubation with different concentration of DiBAC₄(3) nmol/(mg dry cell mass); [2] 0,075 nmol/mg; [3] 0,375 nmol/mg.

Table 14: The influence of different fluorescent dyes on DSC-transitions in <i>Aeropyrum pernix</i> .			
	vrh a (°C)	vrh b (°C)	vrh c (°C)
Kontrola			
Brez predgretja	$104,4 \pm 0,5$	$119,0\pm0,5$	$132,8\pm0,5$
Predgretje na 100 °C	$96,5\pm0,5$	$117,5 \pm 0,5$	$133,8 \pm 0,5$
Hoechst 33258			
Predgretje na 100 °C			
Koncentracije barvil:			
0,625 nmol/(mg suhe celične mase)	$97,7\pm0,5$	$117,3 \pm 0,5$	$132,2 \pm 0,5$
3,125 nmol/(mg suhe celične mase)	$100,4 \pm 0,5$	$118,0 \pm 0,5$	$131,4 \pm 0,5$
6,250 nmol/(mg suhe celične mase)	$102,8 \pm 0,5$	$118,4 \pm 0,5$	$132,2 \pm 0,5$
37,500 nmol/(mg suhe celične mase)	_	$118,0 \pm 0,5$	$131,8 \pm 0,5$
DAPI			
Predgretje na 100 °C	—	$116,6 \pm 0,5$	$132,0 \pm 0,5$
Predgretje na 109 °C	$102,3 \pm 0,5$	$117,4 \pm 0,5$	$132,5 \pm 0,5$
Predgretje na 112 °C	$101,7 \pm 0,5$	$119,7 \pm 0,5$	$132,2 \pm 0,5$
Koncentracija barvila: 50 nmol/(mg suhe celične mase)			
Akridin oranž			
Predgretje na 100 °C	$99,6 \pm 0,5$	$118,7 \pm 0,5$	$133,0 \pm 0,5$
Koncentracija barvila: 3,750 nmol/(mg suhe celične mase)			
DiBAC ₄ (3)			
Koncentracije barvil:			
0,075 nmol/(mg suhe celične mase)	$101,2 \pm 0,5$	$118,3 \pm 0,5$	$132,5 \pm 0,5$
0,375 nmol/(mg suhe celične mase)	$98,9\pm0,5$	$118,3 \pm 0,5$	$132,5 \pm 0,5$

Preglednica 14: Vpliv fluorescenčnih barvil na DSC-prehode pri arheji *Aeropyrum pernix*. Table 14: The influence of different fluorescent dyes on DSC-transitions in *Aeropyrum per*

4.4.6 Fluorescenčna mikroskopija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili

Z metodo fluorescenčne mikroskopije smo poskušali okarakterizirati uporabnost štirih fluorescenčnih barvil pri določevanju živosti celic arheje *Aeropyrum pernix*. Pred tretiranjem celic arheje *A. pernix* s fluorescenčnimi barvili smo preverili avtofluorescenco samih celic, ki se je izkazala za zanemarljivo (rezultati niso prikazani) pri uporabi vseh uporabljenih filtrov (FS01, FS09 in FS15).



Slika 55: DIC/fluorescenčni mikrograf celic arheje *Aeropyrum pernix* z barvilom Hoechst 33258: (I) DIC mikrograf suspenzije živih celic, (II) fluorescenčni mikrograf suspenzije živih celic, (III) DIC mikrograf suspenzije mrtvih celic in (IV) fluorescenčni mikrograf suspenzije mrtvih celic. Puščice s številko 1 označujejo žive celice, puščice s številko 2 mrtve celice arheje *Aeropyrum pernix*.

Figure 55: DIC/fluorescent micrograph of *Aeropyrum pernix* cells in presence of Hoechst 33258: (I) DIC micrograph of living cells suspension, (II) fluorescent micrograph of living cells suspension, (III) DIC micrograph of dead cells suspension, (IV) fluorescent micrograph of dead cells suspension. Arrowheads 1; living cells, arrowheads 2; dead cells.

Mikrografi kažejo, da 2-urna inkubacija na 50 °C s fluorescenčnim barvilom Hoechst 33258 pred mikroskopiranjem na viabilnost celic ni vplivala. Barvilo je obarvalo tako žive kot mrtve celice, razlika je bila le v intenziteti fluorescence, saj je bila pri liziranih celicah nižja (Slika 55).



Slika 56: DIC/fluorescenčni mikrograf celic arheje *Aeropyrum pernix* z barvilom DAPI: (I) DIC mikrograf suspenzije živih celic, (II) DIC mikrograf suspenzije mrtvih celic in (IV) fluorescenčni mikrograf suspenzije mrtvih celic. Puščice s številko 1 označujejo žive celice, puščice s številko 2 mrtve celice arheje *Aeropyrum pernix*.

Figure 56: DIC/fluorescent micrograph of *Aeropyrum pernix* cells in presence of DAPI: (I) DIC micrograph of living cells suspension, (II) fluorescent micrograph of living cells suspension, (III) DIC micrograph of dead cells suspension, (IV) fluorescent micrograph of dead cells suspension. Arrowheads 1; living cells, arrowheads 2; dead *Aeropyrum pernix* cells.

Pri uporabi fluorescenčnega barvila DAPI za vizualizacijo celic je pri živih celicah vidna sredinska obarvanost (najverjetneje zaradi vezave na DNA). Mrtve celice so bile obarvane bolj enakomerno (Slika 56).



Slika 57: DIC/fluorescenčni mikrograf celic arheje *Aeropyrum pernix* z barvilom akridin oranž: (I) DIC mikrograf suspenzije celic arheje *Aeropyrum pernix*, (II) združeni fluorescenčni mikrograf suspenzije celic, posnet pri dveh valovnih dolžinah, ki prikazuje lokalizacijo DNA (rumeno-zeleno) in RNA (rdeče) v celicah, (III) fluorescenčni mikrograf suspenzije celic, ki prikazuje lokalizacijo molekul DNA v celicah in (IV) fluorescenčni mikrograf suspenzije celic, ki prikazuje lokalizacijo molekul RNA v celicah. Puščice s številko 1 označujejo žive celice, puščice s številko 2 mrtve celice arheje *Aeropyrum pernix*.

Figure 57: DIC/fluorescent micrograph of *Aeropyrum pernix* cells in presence of acridine orange: (I) DIC micrograph of *Aeropyrum pernix* cells suspension, (II) fluorescent micrograph of cells suspension merged from two captures taken at different λ_{em} showing localization of DNA (yellowish-green) and RNA (red) in the cell, (III) fluorescent micrograph of cells suspension showing localization of DNA in the cells and (IV) fluorescent micrograph of cells suspension showing localization of RNA in the cells

Akridin oranž je ob uporabi dveh različnih filtrov (FS09 in FS15) omogočal vizualizacijo tako DNA ($\lambda_{ex} = 500 \text{ nm}/\lambda_{em} = 526 \text{ nm}$) kot tudi molekul RNA ($\lambda_{ex} = 460 \text{ nm}/\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$). S prekrivanjem slik pridobljenih z uporabo obeh filtrov, smo dosegli jasno zeleno obarvanost (DNA), ki je bila lokalizirana predvsem centralno, ter uniformno razporejeno rdečo obravanost, ki je bila posledica vezave barvila akridin oranž na RNA. Pri živih celicah smo tako opazili oba tipa obarvanja, pri liziranih celicah pa rumeno-zelenega obarvanja ni bilo in smo opazili le uniformno rdeče obarvanje celic (Slika 57).



Slika 58: DIC/fluorescenčni mikrograf celic arheje *Aeropyrum pernix* z barvilom DiBAC₄(3): (I) DIC mikrograf suspenzije živih celic, (II) fluorescenčni mikrograf suspenzije živih celic, (III) DIC mikrograf suspenzije mrtvih celic in (IV) fluorescenčni mikrograf suspenzije mrtvih celic. Puščice s številko 1 označujejo žive celice, puščice s številko 2 mrtve celice arheje *Aeropyrum pernix*.

Figure 58: DIC/fluorescent micrograph of *Aeropyrum pernix* in presence of DiBAC₄(3): (I) DIC micrograph of living cells suspension, (II) fluorescent micrograph of living cells suspension, (III) DIC micrograph of dead cells suspension, (IV) fluorescent micrograph of dead cells suspension. Arrowheads 1; living cells, arrowheads 2; dead *Aeropyrum pernix* cells.

Pri uporabi fluorescenčnega barvila DiBAC₄(3) smo opazili obarvanost živih in mrtvih celic arheje *A. pernix*. Ob lizi celic se je intenziteta obarvanosti ozadja povečala (Slika 58).



Slika 59: Fluorescenčni mikrograf celic bakterije *Escherichia coli* in arheje *Aeropyrum pernix* v prisotnosti barvil SYTO9 in propidijevega jodida (komplet BacLightTM): (I) žive celice bakterije *Escherichia coli*, (II) lizirane celice bakterije *Escherichia coli*, (III) žive celice arheje *Aeropyrum pernix* in (IV) lizirane celice arheje *Aeropyrum pernix*. Puščice s številko 1 označujejo žive celice, puščice s številko 2 mrtve celice. Figure 59: Fluorescent micrographs of the *Escherichia coli* and *Aeropyrum pernix* cells in the presence of the two fluorescent dyes, SYTO9 and propydium iodide (BacLightTM kit). (I) live *Escherichia coli* cells, (II) live *Aeropyrum pernix* cells and (IV) lysed *Aeropyrum pernix* cells. Arrowheads 1; living cells, arrowheads 2; dead cells.

Za določanje viabilnosti celic arheje *A. pernix* smo uporabili tudi splošno uporabljan komplet "Live/Dead BacLightTM kit" (Berney in sod., 2007). Slika 59 prikazuje dobro ločevanje med živimi (I) in mrtvimi (II) celicami bakteirje *E. coli* z uporabo omenjenega kompleta. Uporaba kompleta za ločevanje živih in mrtvih celic arheje *A. pernix* je prav tako pokazala drugačno obarvanost živih (III) in mrtvih (IV) celic, vendar z nižjo intenziteto fluorescence kot pri uporabi kompleta s celicami bakterije *E. coli* (Slika 59).



Slika 60: DIC/fluorescenčni mikrografi celic arheje *Aeropyrum pernix*, obarvanih s fluorescenčnim barvilom DiBAC₄(3), v kombinaciji z ostalimi fluorescenčnimi barvili: (I, II, III) Hoechst 33258; (IV, V, VI) DAPI in (VII, VIII, IX) akridin oranž. Razdelki slike I, IV in VII predstavljajo DIC mikrografe; razdelki II, III, V, VI, VIII in IX pa fluorescenčne mikrografe. Puščice s številko 1 označujejo žive celice, puščice s številko 2 mrtve celice.

Figure 60: DIC/fluorescen micrographs of *Aeropyrum pernix* cells incubated with fluorescent dye DiBAC₄(3) in combination with other fluorescent dyes: (I, II, III) Hoechst 33258; (IV, V, VI) DAPI in (VII, VIII, IX) acridine orange. Panels I, IV and VII represent DIC micrographs; panels II, III, V, VI, VIII and IX represent fluorescent micrographs. Arrowheads 1 represents; living cells, arrowheads 2 represents; dead cells.

Slika 60 prikazuje barvanje celic arheje *A. pernix* z barvilom DiBAC₄(3) v kombinacji z ostalimi fluorescenčnimi barvili (Hoechst 33258, DAPI in akridin oranž). Razdelki I, IV in VII so posneti z mikroskopijo DIC in prikazujejo pogled na celice brez vzbujene fluorescence. Pri kombinaciji barvil smo uporabili filtre, ki prepuščajo svetlobo različnih valovnih dolžin, tako je omogočeno opazovanje emisije svetlobe pri specifičnih valovnih dolžinah. Za opazovanje razdelkov II in V smo uporabili filter FS01, za opazovanje razdelkov III, VI in IX filter FS09 ter za opazovanje razdelka VIII filter FS15 (glej poglavje 3.2.9).

Ob kombiniranju barvila DiBAC₄(3) z barvilom Hoechst 33258 (razdelki I–III) kljub uporabi različnih filtrov nismo opazili vidne razlike v obarvanosti med živimi in mrtvimi celicami.

Kombiniranje barvila DiBAC₄(3) in DAPI je pokazalo, da se ob uporabi filtra FS09 žive celice ločijo od mrtvih na podlagi intenzitete obarvanja celic, saj so mrtve celice manj

intenzivno obarvane od živih (Slika 60, razdelek VI).

Skupna uporaba barvil DiBAC₄(3) in akridin oranž je z uporabo filtra FS09 jasno pokazala razliko v fluorescenci med živimi in mrtvimi celicami. Akridin oranž je žive celice centralno obarval rumeno-zeleno, medtem ko smo tako pri živih kot mrtvih celicah opazili uniformno rdečo obavanost (Slika 60, razdelek IX). Opazili smo, da so celice ob daljši časovni izpostavljenosti omenjeni kombinaciji barvil odmirale, najverjetneje zaradi vpliva barvila akridin oranž.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V delovnih hipotezah (1.2 Delovni hipotezi) smo predvideli, da fluorescenčna barvila pri višjih temperaturah hitreje prehajajo v celice arheje *Aeropyrum pernix*, kjer se vežejo na DNA ali RNA molekulo in jo stabilizirajo. Spremembe smo opazovali s sledečimi metodami: diferenčna dinamična kalorimetrija, fluorescenčna mikroskopija in fluorescenčna spektroskopija. S pripravo rekombinantnih proteinov Alba arheje *A. pernix* smo preučevali njihovo vlogo in vlogo histonov pri stabilnosti molekule DNA. Spremembe smo opazovali z metodami, ki so vključevale UV-Vis spektroskopijo, CD-spektroskopijo, fluorescenčno spektroskopijo, površinsko plazmonsko resonanco in elektroforetske metode.

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Termična stabilizacija molekule DNA

Stabilizacija nukleinskih kislin pri hipertermofilnih arhejah poteka na več načinov (Grosjean in Oshima, 2007):

- z višjo vsebnostjo baznih parov G+C pri molekulah RNA;
- z vezavo pozitivno nabitih ionov (K^+ , Na^+ in Mg^{2+}) ter dolgih poliaminov na molekule DNA;
- s kovalentnimi modifikacijami nukleinskih kislin (večinoma pri molekulah RNA);
- s tvorjenjem kompaktnih terciarnih struktur (dodatno zvita DNA, reverzna giraza, proteini Alba);
- z vezavo s termostabilnimi proteini (histoni, proteini Alba, drugi DNA-vezavni proteini);
- s pomočjo učinkovitih popravljalnih mehanizmov ter večimi hkratnimi kopijami kromosoma celic v eksponentni fazi rasti.

Termična stabilnost molekule DNA arheje *Aeropyrum pernix* je pogojena tudi s koncentracijo NaCl, saj je v odsotnosti NaCl T_m 72 °C (okoli 20 °C nižje od temperaturnega optimuma rasti arheje). Da bi pokazali prispevek elektrostatskih interakcij, ki prispevajo k temperaturni stabilnosti molekule DNA, izolirane iz arheje *A. pernix*, smo temperaturno denaturacijo DNA pri pH 7,0 spremljali v prisotnosti od 0 mM do 500 mM NaCl (Slika 15).

Poleg vpliva prisotnosti soli na termično stabilnost molekule DNA izolirane iz arheje *A. pernix* smo preučevali tudi vpliv soli na stabilnost drugih molekul DNA: DNA, izolirane iz bakterije *Escherichia coli* in arheje *Haloferax mediterranei*, ter sintetičnih DNA poli(dA-dT) · poli(dA-dT) (AT-DNA) in poli(dG-dC) · poli(dG-dC) (GC-DNA).

Izmed izbranih molekul DNA je najbolj stabilna GC-DNA, ki ima T_m pri 0 mM NaCl 94 °C. DNA, izolirana iz arheje *A. pernix*, ima pri omenjenih pogojih T_m 72 °C. Z višanjem koncentracije soli so se molekule DNA termično stabilizirale (Slika 15). Med molekulami DNA, izoliranimi iz mikroorganizmov, se je s poviševanjem koncentracije soli termično najhitreje stabilizirala DNA iz arheje *Haloferax mediterranei*, ki je plato dosegla pri 160 mM NaCl ($T_m = 97$ °C). DNA arheje *A. pernix* se je s poviševanjem koncentracije NaCl stabilizirala malo manj, ($T_{m(300 \text{ mM NaCl})} = 95$ °C). Dobljeni rezultati sovpadajo z

življenjskim okoljem uporabljenih mikroorganizmov, saj je *H. mediterranei* ekstremno halofilna arheja, izpostavljena visokim koncentracijam soli, in ima tako NaCl velik vpliv na metabolizem in stabilizacijo biomolekul tega mikroorganizma. Ob nadaljnjem povečevanju koncentracije NaCl smo opazili, da T_m molekule DNA arheje *A. pernix* še ni popolnoma dosegla platoja niti pri 500 mM NaCl ($T_m = 98,5$ °C). Zanimivo je tudi, da 0,5 M NaCl ustreza koncentraciji soli v življenjskem okolju arheje *A. pernix* in verjetno do bistveno višjih stabilizacij s soljo v naravnem okolju mikroorganizma ne prihaja.

Izmerjene T_m molekule DNA arheje *A. pernix* so nižje od izračunanih z enačbo (7), ki jo predlagata Cantor in Schimmel (1980). Razlike izračunanih in izmerjenih T_m DNA arheje *A. pernix* se večajo z višanjem koncentracije NaCl (pri 150 mM NaCl je razlika 3 °C, pri 0,5 M NaCl pa 5,5 °). Odstopanje vrednosti je lahko posledica modificiranih baz v nukleinskih kislinah, kar je z evolucijskega aspekta manj verjetno glede na to, da so izmerjeni T_m nižji od pričakovanih. Bolj verjetno je, da prihaja zaradi drugačne bazne sestave v hipertermofilih do rahlo drugačne sposobnosti vezanja ionov na molekulo DNA, kar posledično vpliva tudi na termično stabilnost molekule DNA.

$$T_{\rm m} = 16, 6 \cdot \log C_{\rm S} + 41 \cdot \chi_{\rm GC} + 81, 5 \qquad \dots (7)$$

 $C_{\rm s}$ predstavlja molarno koncentracijo NaCl (mol/L), $\chi_{\rm GC}$ predstavlja odstotek baznih parov GC v molekuli DNA (Cantor in Schimmel, 1980).

Tako pri evkariontih kot tudi pri nekaterih arhejah so splošno poznani histoni, bazični proteini, ki so s svojo vezavo na DNA odgovorni za njihovo stabilizacijo in pakiranje v celicah.

Z namenom pokazati, kakšen je vpliv evkariontskih histonov na termično stabilnosti molekule DNA, smo spektrofotometrično spremljali spremembe v termični stabilnosti različnih molekul DNA ob prisotnosti govejih histonov. Najprej smo histonom določili pH-območje njihovega nativnega stanja tako, da smo ob titraciji histonov s HCl in NaOH spremljali absorbanco pri valovni dolžini 280 nm (Slika 16). Iz vrednosti UV-absorpcijskih spektrov pri različnih pH-vrednostih smo opazili, da pride do ostrega prehoda okoli pH 10,0. Najverjetneje pride do prehoda zaradi ionizacije tirozinskih ostankov pri visokih pH-vrednostih (Miteva in sod., 2000). Za nadaljnje raziskave smo izbrali pH 5,0 saj je bilo to območje, v katerem so bili goveji histoni stabilni.

Vpliv govejih histonov na termično stabilnost molekule DNA smo preučevali z uporabo sintetičnih AT-DNA in GC-DNA ter genomske DNA, izolirane iz govejega priželjca (CT-DNA). Uporabili smo različna molska razmerja histon : DNAbp od 1 : 2000 do približno 1 : 130. Za najvišja razmerja histon : DNAbp smo izbrali tista, pri katerih še ni prišlo do kondenzacije DNA in so bila za CT-DNA 1 : 150, za AT-DNA 1 : 130 ter za GC-DNA 1 : 120. Histoni se v povprečju vežejo na 146 bp DNA, v odvisnosti od strukture DNA (Slike 17, 18 in 19).

Ob dodatku histonov GC-DNA v razmerjih histon : DNAbp 1 : 300 do 1 : 120 smo opazili močnejši destabilizacijski efekt. Do blažje destabilizacije je prišlo ob dodatku histonov CT-DNA pri razmerjih 1 : 230 do 1 : 150. Spremembo iz konformacije B-DNA v Z-DNA največkrat v fizioloških pogojih izzovejo proteini, ki imajo alternirajoča zaporedja

aminokisline lizin (LXL) (Herbert in Rich, 1999; Kim in sod., 2006). Destabilizacijo, ki jo opazimo, verjetno lahko pripišemo spremembi konformacije molekule DNA iz B- v Z-DNA obliko do katere je prišlo ob dodajanju histonov. Do spremembe v konformaciji DNA je verjetno prišlo pri baznih parih GC, ko so histoni dosegli kritično vrednost razmerja protein : DNAbp, ki je bila za GC-DNA približno 1 : 300, za CT-DNA pa približno 1 : 230. Sprememba konformacije, ki jo opisujeta Herbert in Rich (1999) ter Kim in sod. (2006), je v skladu z našimi rezultati.

Rezultati so potrdili predvidevanja, da histoni termično stabilizirajo molekule DNA. Prav tako je bila stopnja stabilizacije pričakovano odvisna od bazne sestave molekul DNA.

5.1.2 Izolacija in karakterizacija proteinov Alba

V rodu *Aeropyrum* homologi histonov niso poznani. Njihovo vlogo najverjetneje vsaj deloma prevzemajo pred kratkim odkriti proteini Alba (Sandman in Reeve, 2005). Naš namen je bil očistiti in okarakterizirati proteine Alba iz arheje *A. pernix* ter preučiti njihovo vlogo pri stabilizaciji molekule DNA.

Čiščenje proteinov Alba1 in Alba2 smo izvedli v različnih ekspresijskih sistemih. Zaradi netopnosti proteina smo oba gojili na temperaturi, ki je za rast bakterije *Escherichia coli* mejna (46 °C). Večjih težav s čiščenjem proteina Alba1 nismo imeli, saj smo vse nečistoče odstranili s kombinacijo afinitetne kromatografije, ionske izmenjevalne kromatografije in kromatografije z ločevanjem po velikosti ter obarjanjem z (NH₄)₂SO₄ in z inkubacijo na 90 °C (Slika 20). Alba2, ki smo ga pridobili s sistemom pQE-30 UA/*E. coli* M15 ni prehajal ultrafiltracijskih membran s porami, večjimi od velikosti proteina Alba2 (MWCO 50 kDa) kar kaže na to, da sta bila proteina Alba2 in GroEL najverjetneje vezana v kompleks (Slika 21). Glavne težave pri čiščenju proteina Alba2 je poleg obarjanja ciljnega proteina in kontaminacije s proteinom bakterije *E. coli* v ekspresijskem sistemu pETDuet-1/*E. coli* BL21 predstavljalo odstranjevanje proteina Alba1, ki je ostal v vzorcu zaradi koekspresije obeh proteinov v istem ekspresijskem sistemu. Slednjo težavo smo zaobšli z večkratnim čiščenjem z afinitetno kolono Ni-NTA (Slika 22).

Preden smo lahko določili vpliv proteinov Alba na termično stabilnost molekul DNA, smo okarakterizirali oba očiščena proteina. V ta namen smo uporabili različne spektroskopske metode (UV-, fluorescenčna in CD-spektroskopija). Tako smo lahko ovrednotili strukturne spremembe proteinov pri različnih pH-vrednostih (Slika 23), različnih molskih razmerjih molekul DNA (Sliki 26 in 27) in temperaturah (Slika 28).

pH-stabilnost proteinov smo spremljali z opazovanjem njunih naravnih fluorescenc v območju 285 nm do 600 nm ter v pH-območju od 1 do 14. pH-titracija proteina Alba1 je pokazala več prehodov, ki so posledica sprememb v protonacijskih/deprotonacijskih ravnotežjih, kot je npr. to znano za protein Alba Ssh10b iz arheje *Sulfolobus shibitae* (Mao in sod., 2007). Pri pH-titraciji proteina Alba2 prehodi niso bili tako ostro definirani, deloma je k temu prispevala tudi nižja naravna fluorescenca, saj Alba2 vsebuje le en tirozin (Slika 23).

Nativna elektroforeza je pokazala, da v raztopini proteini Alba nastopajo v obliki dimerov (Slika 24). Skupni naboj (pri pH 7,0) proteinov Alba1 (3+) in Alba2 (1+) je bil primerljiv z
nabojem ekvinatoksina II (2+), ki smo ga uporabili za standard. Enako razdaljo potovanja lis teh treh proteinov (in kompleksa Alba1/Alba2) v nativni elektroforezi lahko tako pripišemo v veliki meri njihovi velikosti. Proteini Alba (ki so približno polovico manjši od ekvinatoksina II) so v elektroforeznem polju prepotovali enako razdaljo kot ekvinatoksin II, po čemer lahko sklepamo, da so bili proteini Alba v obliki dimerov. Ugotovitve sovpadajo s podatki, ki jih najdemo za homologe proteinov Alba v drugih hipertermofilnih arhejah (Xue in sod., 2000; Edmondson in sod., 2004; Jelinska in sod., 2005; Kahsai in sod., 2005; Kumarevel in sod., 2007). V mikroorganizmu je lahko trenutna sestava heterodimerov in homodimerov najverjetneje odvisna od fiziološkega stanja, v katerem je celica, čeprav je celični nivo nekaterih Alba proteinov (Ssh10b, *Sulfolobus shibatae*) enak ne glede na fazo celičnega cikla (Guo in sod., 2003).

Določanje prostih skupin –SH v proteinih Alba v raztopini je razkrilo 4-odstotni v Alba1, 11,5-odstotni v Alba2 in 16-odstotni molski delež skupin na mol proteina v kompleksu Alba1/Alba2 (Preglednica 7). Protein Alba1 je v akrilamidni elektroforezi v odsotnosti reducenta potoval kot homodimer, Alba2 pa kot monomer (Slika 25). Zaradi odsotnosti reducenta sklepamo, da se je med aminokislinskima ostankoma Cys⁴⁷ dveh molekul Alba1 vzpostavil disulfidni mostiček, ki je omogočil stabilno formiranje homodimera. Čeprav Alba2 vsebuje dva cisteinska ostanka (Cys³ in Cys⁹⁴), se med njima ni tvoril intermolekularni disulfidni mostiček. Med cisteinoma se mostiček najverjetneje vzpostavi intramolekularno in tako povezuje β -zanko L1 in β 3 ploskev s čimer naj bi se molekula dodatno stabilizirala (Kumarevel in sod., 2007).

Proteini Alba so DNA-vezavni proteini, zato smo s titracijo DNA določili optimalna molska razmerja za vezavo proteina in molekul DNA (Sliki 26 in 27). Oktameri evkariontskih histonov so v primerjavi s proteini Alba približno desetkrat večji. Okoli evkariontskega histonskega oktamera se navije približno 146 bp superzvite DNA (Sandman in Reeve, 2005), medtem ko se predvidoma dimeri proteinov Alba vežejo na vsaj 12 bp DNA (Xue in sod., 2000; Kumarevel in sod., 2007). Naši rezultati so pokazali, da se oba proteina Alba iz arheje *A. pernix* vežeta na približno 14 bp CT-DNA in AT-DNA z izjemo GC-DNA, kjer se proteina Alba1 in Alba2 vežeta na približno 10 bp. Vrednosti kostante vezave K_{bin} (Enačba 3) so v območju 10⁵ (25 °C). Nekateri Alba proteini (Ssh10b) se dokazano vežejo na DNA vezati bolj kompaktno (Cui in sod., 2003).

5.1.3 Vezava proteinov Alba na DNA

Vezavo proteinov Alba smo potrdili z metodo elektroforeznega zamika (Slika 38). Ob dodatku proteina Alba1, Alba2 in kompleksa obeh proteinov smo zaznali zaviranje potovanja linearne DNA v elektroforeznem polju. Protein Alba1 je s svojo vezavo na DNA povzročil največji zamik v potovanju v elektroforetskem polju, sledil mu je učinek vezave kompleksa proteinov Alba1/Alba2, najmanj pa je hitrost potovanja DNA v električnem polju elektroforeze zavrla vezava proteina Alba1. Glede na to, da se kljub zelo majhni hitrosti potovanja v gelu niso formirale lise DNA, ki je bila v svojem potovanju skozi gel zadržana zaradi vezave proteinov, lahko glede na vzorec potovanja v elektroforezi sklepamo, da gre za vezavo protein-DNA, ki ni specifična za nukleotidno zaporedje.

Vpliv vezave proteinov Alba na termično stabilnost treh molekul DNA (AT-DNA, GC-

DNA in CT-DNA) smo preverili s taljenjem molekul DNA ob prisotnosti proteina Alba1, Alba2 ter kompleksa Alba1/Alba2 (Slike 29 do 37). Tako posamezna proteina kakor tudi kompleks obeh so pri CT-DNA povzročali kondenziranje DNA ter termično stabilizacijo (Slike 29, 32 in 35). Pri termični denaturaciji AT-DNA in proteinov Alba smo opažali predvsem efekt termične stabilizacije, efekt kondenzacije DNA ob povečevanju razmerja z vezanim proteinom Alba2 na DNA je bil v primerjavi s proteinom Alba1 manj opazen. V primeru dodatka proteina Alba2 k AT-DNA smo opazili tudi delni efekt destabilizacije, ki bi lahko bil posledica spremembe v konformaciji DNA iz oblike B-DNA v obliko Z-DNA (Slike 30, 33 in 36). Ob taljenju GC-DNA v prisotnosti proteinov Alba smo ob dodatku Alba2 ter kompleksa obeh opazili intenzivno kondenzacijo DNA pri višjih razmerjih vezanega proteina, zanimivo pa efekta kondenzacije ob dodatku Alba1 nismo zaznali (Slike 31, 34 in 37). Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da je efekt kondenzacije DNA preferiran ob dodatku proteina Alba1 ali kompleksa Alba1/Alba2 ter ob višji vsebnosti baznih parov GC v zaporedju DNA. Značilne oblike termogramov ob destabilizaciji DNA, ki jo opazimo predvidoma zaradi spremembe konformacije B-DNA v Z-DNA, pri dodatku proteinov Alba k molekulam DNA smo opazili ob dodatku Alba2 k CT-DNA (Slika 32).

Termična stabilnost proteina Alba2 (0 M NaCl) je 53 °C, torej relativno majhna (Slika 28). Alba2 najverjetneje vsebuje intramolekularno disulfidno vez, s katero molekula pridobi na termostabilnosti, kot opisuje Kumarevel in sod. (2007). Podatek preseneča, saj bi glede na večjo stabilnost Alba1 ter odsotnost intramolekularnih vezi –SH pričakovali večjo termično stabilnost proteina Alba2. Pri UV-taljenju molekul DNA s proteinom Alba opazimo termično stabilizacijo DNA, po čemer lahko sklepamo, da se protein veže na DNA in je tudi bolj stabilen kot v raztopini brez DNA. Prosta oblika proteina v celici je lahko tudi dodatno stabilizirana z ioni v celičnini ali celo s šaperoni.

Vrednosti izračunane navidezne konstante asociacije $(K_{app}^{T_m})$ so v mikromolarnem rangu $(10^5 \text{ do } 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1})$ in so primerljive s konstantami asociacije proteinov Alba iz drugih hipertermofilnih arhej, ki so v nano- in mikromolarnem rangu (Preglednica 9).

S CD-spektroskopijo v daljnjem UV-območju smo ugotavljali spremembe v sekundarnih strukturah proteinov Alba v odvisnosti od vezave na različne molekule DNA. Ker je arheja *A. pernix* hipertermofilna, z optimumom delovanja encimov pri povišanih temperaturah, smo preverili vsebnost sekundarnih struktur pri različnih temperaturah (25 °C do 90 °C).

Sekundarna struktura proteina Alba1 brez dodane DNA se pri različnih temperaturah ni bistveno spreminjala (Slika 39A, Preglednica 10). Ob dodatku CT-DNA se je neurejenost molekule povečala, razen pri temperaturi 90 °C, kjer je struktura ostala enaka strukturi proteina brez dodane DNA (Slika 39B, Preglednica 10). Struktura proteina pri 90 °C se ni veliko spreminjala niti ob dodatku AT-DNA in GC-DNA (Sliki 39C in 39D, Preglednica 10), delež β -zank, preko katerih najverjetneje poteka vezava na DNA, je bil za protein Alba1 pri 90 °C povsod približno 27 %. Zanimivo je, da je le prisotnost genomske DNA, izolirane iz govejega priželjca, pri temperaturah od 25 °C do 70 °C povzročila znižanje urejenih sekundarnih struktur na račun preostalih struktur (15 %).

Alba2 vsebuje manj α -vijačnic (Alba1 23 %, Alba2 10 %) in več β -ploskev (Alba1 50 %, Alba2 pa 60 %). Delež β -zavojev je v proteinu Alba2 (26 %) pri 90 °C enak ne glede na

prisotnost in tip DNA, tako kot pri proteinu Alba1. Sorazmerno visokega deleža neurejenih struktur pri 90 °C, ki je prisoten pri proteinu brez DNA ter ob dodatku AT-DNA in GC-DNA ob dodatku CT-DNA, pri Alba2 ne opazimo (Slika 40, Preglednica 11).

Vsebnost α -vijačnic v proteinskem kompleksu Alba1/Alba2 v primerjavi s posameznima proteinoma bolj variira. Vsebnost α -vijačnic v strukturi kompleksa pri 90 °C je brez DNA 28 %, ob dodatku CT-DNA 20 %, AT-DNA 32 % in GC-DNA 9 %. Vsebnost β -zavojev pri 90 °C je v proteinskem kompleksu brez DNA ter kompleksu s CT-DNA med 10 % in 15 %, ob dodatku sintetičnih AT-DNA in GC-DNA pa β -zavojev ni (0 %). Struktura proteinov Alba1 in Alba2 se ob vezavi v kompleks spremeni, prav tako se struktura drugače spreminja ob dodatku DNA (Slika 41, Preglednica 12).

Na splošno se sekundarna struktura proteinov Alba iz arheje *A. pernix* razlikuje od struktur proteinov Alba iz drugih hipertermofilnih arhej, o katerih poročajo v literaturi. Protein Alba Sso10b2 arheje *Sulfolobus solfataricus* ima 35 % α -vijačnic, 20 % β -ploskev in 45 % β -zavojev (Biyani in sod., 2005). Sac10a iz arheje *Sulfolobus acidocaldarius* vsebuje 49 % α -vijačnic, 14 % β -ploskev in 16 % β -zavojev (Edmondson in sod., 2004). SSh10b (*Sulfolobus shibatae*) vsebuje pri 25 °C 51 %, pri 80 °C pa 55 % α -vijačnic (Xue in sod., 2000). Proteina Alba arheje *A. pernix* se od opisanih razlikujeta predvsem po manjši vsebnosti α -vijačnic (10 do 27 %) ter višjem deležu β -ploskev (50 %–60 %), saj ostali avtorji opisujejo proteine Alba, kjer prevladujejo α -vijačnice. Terciarne strukture proteinov Alba s CD-spektroskopijo zaradi majhnega števila tirozinskih aminokislinskih ostankov nismo analizirali.

Površinska plazmonska resonanca je pokazala, da se protein Alba1 (Slika 42) veže na splošno zaporedje DNA (SPRspecAP) z večjo hitrostjo kot Alba2 (Slika 43). Alba2 ima večjo afiniteto za DNA od Alba1 (disociacija proteina Alba1 iz DNA je hitrejša), zato ga po končani fazi disociacije ostane na DNA več stabilno vezanega (12 µM Alba1 1715 RU, 12 µM Alba2 5820 RU; Preglednica 13).

Pri kompleksu Alba1/Alba2 (Slika 44) opazimo najprej večjo hitrost vezave, ki je podobna hitrosti vezave proteina Alba1. Po dosegu kritične koncentracije na površini čipa nastopi druga faza vezave kompleksa na DNA, ki ima manjšo hitrost vezave in je bolj podobna hitrosti vezave proteina Alba2. Količina stabilno vezanega kompleksa po končani fazi disociacije Alba1/Alba2 na DNA je skoraj enaka kot pri proteinu Alba2 (Preglednica 13). Senzorgrami kompleksa Alba1/Alba2 kažejo kompleksnejši model vezave kompleksa na DNA in sovpadajo s hipotezo, ki jo je opisal Cui in sod. (2003). Sklepamo lahko na več različnih hipotetičnih modelov vezave obeh proteinov na DNA. Pri prvem modelu se ob vezavi kompleksa najprej zasede le del vezavnih mest na DNA, na katerih šele po dosegu določene koncentracije začne prihajati do dodatne, tesnejše vezave proteina na DNA. Pri drugem modelu se veže na DNA samo del kompleksa (Alba1) in šele ob določeni koncentraciji v povezavi z DNA začne sodelovati tudi drugi del kompleksa, ki ima manjšo hitrost vezave, a večjo afiniteto za DNA (Alba2). Regeneracija streptavidinskega čipa s tremi cikli z 2 M NaCl je bila uspešna.

Proteini Alba imajo poleg DNA-vezavne vloge, kjer s svojo vezavo in vnašanjem dodatnih navojev DNA stabilizirajo, tudi RNA-vezavno vlogo. Z vezavo na molekule RNA tako najverjetneje stabilizirajo molekule mRNA, tRNA ter tudi ribosome z vezavo na rRNA in

tako na celičnem nivoju odločilno stabilizirajo nukleinske kisline. (Guo in sod., 2003; Huang, 2008)

5.1.4 Karakterizacija vpliva fluorescenčnih barvil na celice arheje *Aeropyrum pernix* ter na molekule DNA

Zaradi rigidnosti celične membrane hipertermofilnih arhej (Ulrih in sod., 2007) najdemo različne zapise o slabšem prehajanju fluorescenčnih barvil v celice hipertermofilnih arhej. Preučili smo prehajanje ter vpliv fluorescenčnih barvil na celice in njihovo DNA. Tri barvila so bila DNA-vezavna (Hoechst 33258, DAPI in akridin oranž), četrto barvilo pa se veže na membrane in proteine (DiBAC₄(3)). Vezava vseh treh DNA-vezavnih barvil je povzročila termično stabilizacijo molekule DNA (Slika 46), dodatek barvila DiBAC₄(3) pa je termično stabilnost DNA rahlo zmanjšal, čeprav se glede na literaturo na molekule DNA ne veže in posledično nanje ne bi smel vplivati.

Ob spremljanju intenzitete fluorescenčne emisije med poviševanjem temperature v suspenziji celic arheje *Aeropyrum pernix* s fluorescenčnim barvilom smo v termogramu zaznali znižanje v intenziteti emisije, ki ga pripisujemo denaturaciji celične DNA le pri barvilih Hoechst 33258 in DAPI (Sliki 48 in 49). Pri inkubaciji barvila Hoechst 33258 s celicami smo ob segrevanju celic pri temperaturi približno 40 °C opazili še povišanje v intenziteti. Zanimivo je, da se, pri segrevanju celic arheje *A. pernix*, inkubiranih z barvilom Hoechst 33258 na 50 °C, intenziteta fluorescence pri segrevanju do 60 °C skoraj ne spreminja in je ves čas maksimalne vrednosti. Medtem ko je v primeru brez predinkubacije, začetna intenziteta fluorescence celic *A. pernix* značilno nižja, in doseže prej omenjeno (maksimalno) vrednost šele pri 50 °C. Opažene razlike so po vsej verjetnosti posledica prehajanja barvila preko membrane ob povišanju temperatre, torej barvilo vstopi v celice že ob predinkubaciji na 50 °C in ne šele kasneje, pri višjih temperaurah (Slika 48).

Termogrami DSC celic arheje *A. pernix* in DNA-vezavnih barvil Hoechst 33258 in DAPI so razkrili, da se barvili vežeta samo na molekulo DNA in na ostale celične komponente ne vplivata (Sliki 51 in 52). Barvilo akridin oranž se poleg vezave na DNA veže tudi na druge celične komponente (vrhova b in c slike 53). Vrhova b in c na termogramu v glavnem predstavljata celične ribosome, glede na to, da je akridin oranž tako DNA- kakor tudi RNA-vezavno barvilo lahko pričakujemo, da se veže na rRNA molekule ribosoma, ki so tudi bistvene za njegovo nemoteno delovanje. Opažanje v veliki meri potrjuje tudi dejstvo, da celice, ki so bile pred mikroskopiranjem obarvane s tem barvilom, hitreje odmirajo kot nebarvane celice oz. celice, izpostavljene ostalim trem barvilom. Barvilo DiBAC₄(3) se v celici veže predvsem na proteinske komponente (torej vrhova b in c), za čuda pa rahlo vpliva tudi na stabilnost DNA v celici, po čemer lahko sklepamo, da se veže tudi na DNA celice (Slika 54), kar potrjuje tudi opažena temperaturna destabilizacija DNA ob dodatku tega barvila (Slika 46).

5.1.5 Fluorescenčna mikroskopija celic arheje Aeropyrum pernix s fluorescenčnimi barvili

Barvilo Hoechst 33258 je obarvalo tako mrtve kakor tudi žive celice arheje Aeropyrum pernix, mrtve celice so bile manj intenzivno obarvane kot žive (Slika 55). Zaradi počasnega prehajanja barvila v celice je bila potrebna inkubacija celic z barvilom na 50 °C. Ob uporabi barvila DAPI v kombinaciji s celicami smo opazili jasno centralno obarvanost v intaktnih celicah, medtem ko v liziranih celicah namesto centralne obarvanosti opazimo bolj enakomerno razporejeno obarvanost (Slika 56). Akridin oranž v celicah obarva molekule DNA in molekule RNA, kar lahko s pridom izkoristimo za ločevanje med živimi in mrtvimi celicami. V mrtvih celicah arheje A. pernix prevladuje rdeča barva (posledica vezave barvila na molekule RNA), ki je razporejena po vsej celici medtem ko imajo žive celice poleg rdeče tudi dodatno zeleno centralno obarvanost (posledica vezave barvila na molekule DNA). Za rdečo barvo, ki jo pripisujemo molekulam RNA v celicah arheje A. pernix, so verjetno v veliki meri odgovorne molekule rRNA ter tudi tRNA (molekule mRNA so kratkožive) (Slika 57) (Huang, 2008). Žal se je izkazalo, da je akridin oranž za celice nekoliko toksičen saj pospeši njihovo lizo. Barvilo DiBAC₄(3) kljub nekaterim poročilom v literaturi (Beck in Huber, 1997) ni selektivno obarvalo mrtvih ali živih celic. Žive celice so se obarvale bolj intenzivno od mrtvih, pri mrtvih celicah smo opazili intenzivnjšo obarvanost okolice celic (Slika 58). Komplet BacLightTM (Berney in sod., 2007) je žive in mrtve celice arheje A. pernix ločil z največjo gotovostjo (žive celice so bile zelene, mrtve rdeče), čeprav je bilo ločevanje v primerjavi z ločevanjem pri tipskem organizmu bakteriji E. coli nekoliko slabše (Slika 59).

Na podlagi barvanja celic areje Aeropyrum pernix s kombinacijo fluorescenčnih barvil Hoechst 33258 in DiBAC₄(3) živih celic od mrtvih nismo mogli zanesljivo razlikovati. Mrtve celice so bile ob uporabi filtra, ki omogoča opazovanje vezanega barvila Hoechst 33258, rahlo šibkeje obarvane od živih celic. Pri kombinaicji barvil DAPI in $DiBAC_4(3)$ smo opazili pri živih celicah rahlo močnejšo obarvanost, z barvilom DAPI, ki je bila razporejena centralno, za razliko od mrtvih celic, kjer je bila obarvanost za odtenek šibkejša ter bolj enakomerno razporejena po vsej celici. Skupna uporaba barvila akridin oranž ter barvila DiBAC₄(3) je povzročila pri živih celicah jasno centralno zeleno obarvanost (vezava barvila akridin oranž na molekule DNA) ter enakomerno rdečo obarvanost po vsej celici (vezava barvila na molekule RNA). Rdeče obarvanje celice, tako v živih, kakor tudi v mrtvih celicah je posledica vezave barvila akridin oranž na molekule RNA (predvsem rRNA ter tRNA) (Huang, 2008). Pri kombinaciji barvil akridin oranž in DiBAC₄(3) lahko specifično obarvanje živih in mrtvih celic pripišemo predvsem vezavi barvila akridin oranž na molekule DNA in RNA. Barvilo DiBAC₄(3) živih in mrtvih celic arheje A. pernix ni različno obarvalo kot opisujejo nekateri avtorji (Beck in Huber, 1997; de Poorter in Keltjens, 2001; Alakomi in sod., 2005). (Slika 60)

5.2 SKLEPI

Naravna termična stabilizacija molekul DNA v hipertermofilih je mogoča na več načinov, dva od njih sta: z višanjem koncentracije NaCl ter z vezavo histonov oz. drugih DNA-vezavnih proteinov. Mehanizem stabilizacije molekul DNA v hipertermofilu *Aeropyrum pernix* najverjetneje vključuje vezavo proteinov Alba1 (gen APE1832.1) in Alba2 (gen APE1823). Produkcija rekombinantnih proteinov Alba v bakteriji *Escherichia coli* je najbolje potekala pri povišani temperaturi (46 °C), saj je protein tako ostajal v topni obliki. Sami proteini Alba molekule DNA termično ne stabilizirajo toliko kot histoni. Histoni lahko povzročajo spremembo konformacije B-DNA v Z-DNA. Proteini Alba, ki tudi povzročajo kondenzacijo DNA verjetno ravno tako (le v manjši meri) povzročajo spremembo v konformaciji DNA. Predvidevamo, da je molekula DNA (med drugim) v hipertermofilni arheji *A. pernix* stabilizirana v kombinaciji s proteini Alba in prisotnostjo NaCl.

Ob vezavi DNA-vezavnih fluorescenčnih barvil ta molekulo DNA stabilizirajo. Nekatera DNA-vezavna barvila se poleg DNA vežejo tudi na druge celične komponente. Razločevanje živih in mrtvih celic arheje *A. pernix* je poleg kompleta BacLightTM najbolje potekalo z uporabo kombinacije barvil akridin oranž in DiBAC₄(3).

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Hipertermofilne arheje so prilagojene za preživetje v okoljih z zelo visokimi temperaturami. Ostri pogoji silijo organizme v prilagajanje svojih makromolekul na visoke temperature. Arheja Aeropyrum pernix je striktno aerobni hipertermofil, ki ima optimum rasti pri 92 °C. Zaradi potrebe po organizaciji ter stabilizaciji DNA je v evkariontskih celicah DNA pakirana v komplekse s histoni. Zaradi rasti pri visokih temperaturah in zaradi odsotnosti histonov pri arheji A. pernix njihovo vlogo pri stabilizaciji DNA nadomeščajo majhni bazični proteini Alba v kombinaciji z ioni v celici. V genomu arheje A. pernix sta poznani dve zaporedji, ki nosita zapis za potencialna analoga evkariontskih histonov v arhejah (APE1823 in APE1832.1). Namen dela je bil z uporabo različnih tehnik izolirati in okarakterizirati DNA-vezavna proteina hipertermofilne arheje A. pernix. Raziskave so vključevale vpliv koncentracije NaCl, vpliv govejih histonov ter proteinov Alba na termično stabilizacijo različnih molekul DNA. V ta namen smo dva DNA-vezavna proteina Alba1 in Alba2 izrazili v različnih sistemih za izražanje genov ter ju okarakterizirali. Karakterizacija interakcij je potekala z UV-, fluorescenčno in CDspektroskopijo, metodo elektroforeznega zamika, površinsko plazmonsko resonanco ter diferenčno dinamično kalorimetrijo. Opisali smo medsebojno delovanje proteinov ter različnih molekul DNA pri različnih temperaturah. Pokazali smo, da se proteina vežeta na molekule DNA ter hkrati tudi vplivata na njihove lastnosti (termična stabilnost, hitrost potovanja v elektroforeznem polju). Dobljene rezultate smo primerjali z vplivom NaCl ter govejih histonov na termično stabilizacijo molekul naravnih in sintetičnih DNA. Ugotovili smo, da očiščeni proteini Alba s svojo vezavo na DNA le to termično stabilizirajo, vendar v manjši meri kot višje koncentracije NaCl in goveji histoni. Dodatno smo raziskali vpliv in uporabnost različnih fluorescenčnih barvil na celice arheje A. pernix. Rigidnost membrane pri hipertermofilnih arhejah izhaja iz sestave lipidov v membranah. Ti vsebujejo etrsko vezane fitanilne verige namesto estrsko vezanih maščobnih kislin, ki jih najdemo v membranah bakterij in evkariontov. Membrane hipertermofilov so posledično, še posebej pri sobnih temperaturah, manj prepustne (Ulrih in sod., 2007). Neprepustnost membran pogosto ovira prehajanje fluorescenčnih barvil, ki preko bakterijskih membran prehajajo veliko hitreje. Vzajemen vpliv različnih fluorescenčnih barvil na molekule DNA ter na celice arheje A. pernix smo preučevali s kombinacijo kalorimetričnih, spektrofotometričnih ter mikroskopskih tehnik. Pokazali smo, da fluorescenčna barvila ob vezavi molekulo DNA stabilizirajo. Nekatera DNA-vezavna barvila vežejo poleg DNA tudi druge celične komponente. Razločevanje med živimi in mrtvimi celicami hipertermofilne arheje A. pernix je poleg komercialno dostopnega kompleta BacLightTM (Berney in sod., 2007) najbolje potekalo z uporabo kombinacije barvil akridin oranž in $DiBAC_4(3)$.

6.2 SUMMARY

Hyperthermophilic Archaea are adapted to survive in environments with extremely high temperatures. These harsh conditions forced the organisms to evolve adaptations of macromolecules against high temperatures. Archaeon Aeropyrum pernix is strictly aerobic hyperthermophile with optimal growth temperature at 92 °C. With the need for organization and stabilization of DNA in eucaryiotic cells it is packed in complexes with histones. Because of growth at high temperatures lack of histones in A. pernix is compensated with basic Alba proteins. Two sequences for potential histone counterpart proteins were found in A. pernix genome (APE1823 and APE1832.1). The aim of this work was to isolate and characterise DNA binding proteins of hyperthermophilic archaeon A. pernix with the use of different techniques. For this reason we expressed two DNAbinding proteins Alba1 and Alba2 in different expression systems. Characterization of these interactions was done with methods of UV-, fluorescent and CD-spectroscopy, electrophoretic mobility shift assay, surface plasmon resonance and differential scanning calorimetry. We examined interaction of these peptides and different DNA molecules at different temperatures. We showed that proteins bind to DNA and in this manner influence on DNA properties (thermal stabilization, electrophoretic mobility). We compared our results with influence of NaCl and bovine histones on thermal stability of natural and synthetic DNA molecules. We concluded that isolated Alba proteins when binded to DNA thermally stabilize it. However the stabilization observed is lower than the one we observed when higher concentrations of NaCl or bovine histories were used. Additionally an influence of different fluorescent dyes on A. pernix cells was examined. With our research we wanted to get insight into correlation of NaCl concentration, bovine histories and Alba proteins on thermal stabilization of different DNA molecules. Rigidity of membranes of hyperthermophilic archaea arises from their lipid composition (in contrast to eucaryal and bacterial lipids, archaeal lipids are ether linked and not ester linked). For this reason membranes of hyperthermophiles tend to have rather impermeable membranes at room temperatures (Ulrih in sod., 2007). Influence of different fluorescence dyes on DNA molecules and A. pernix cells was examined with the combination of calorimetric, spectrometric and microscopic techniques. We showed that fluorescent dyes stabilise DNA molecules when bound to them. Some DNA-binding fluorescence dyes examined tend to bind to other cell components as well. The differing between live and dead A. pernix cells was optimal with BacLightTM kit, but if we compare the dyes tested, we could say that combination of acridine orange and $DiBAC_4(3)$ would be best for this demand.

7 VIRI

- Abe F., Horikoshi K. 2001. The biotechnological potential of piezophiles. Trends in Biotechnology, 19, 3: 102-108
- Alakomi H.L., Matto J., Virkajarvi I., Saarela M. 2005. Application of a microplate scale fluorochrome staining assay for the assessment of viability of probiotic preparations. Journal of Microbiological Methods, 62, 1: 25-35
- Altamura S., Cammarano P., Londei P. 1986. Archaebacterial and eukaryotic ribosomalsubunits can form active hybrid ribosomes. FEBS Letters, 204, 1: 129-133
- Aravind L., Iyer L.M., Anantharaman V. 2003. The two faces of Alba: the evolutionary connection between proteins participating in chromatin structure and RNA metabolism. Genome Biology, 4, 10: R 64, doi:10.1186/gb-2003-4-10-r64
- Barns S.M., Delwiche C.F., Palmer J.D., Pace N.R. 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 17: 9188-9193
- Bartlett J.M., Stirling D. 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. (Ed.). 226: 3-6
- Beck P., Huber R. 1997. Detection of cell viability in cultures of hyperthermophiles. FEMS Microbiology Letters, 148, 1: 11-14
- Bell S.D., Botting C.H., Wardleworth B.N., Jackson S.P., White M.F. 2002. The interaction of Alba, a conserved archaeal, chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. Science, 296, 5565: 148-151
- Bernander R. 1998. Archaea and the cell cycle. Molecular Microbiology, 29, 4: 955-961
- Berney M., Hammes F., Bosshard F., Weilenmann H.-U., Egli T. 2007. Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. Applied Environmental Microbiology, 73, 10: 3283-3290
- Bimboim H.C., Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res., 7, 6: 1513-1523
- Biou V., Shu F., Ramakrishnan V. 1995. X-Ray crystallography shows that translational initiation-factor IF3 consists of 2 compact alpha/beta domains linked by an alphahelix. Embo Journal, 14, 16: 4056-4064
- Biyani K., Kahsai M.A., Clark A.T., Armstrong T.L., Edmondson S.P., Shriver J.W. 2005. Solution structure, stability, and nucleic acid binding of the hyperthermophile protein Sso10b2. Biochemistry, 44, 43: 14217-14230

- Bohrmann B., Haider M., Kellenberger E. 1993. Concentration evaluation of chromatin in unstained resin-embedded sections by means of low-dose ratio-contrast imaging in stem. Ultramicroscopy, 49, 1-4: 235-251
- Bohrmann B., Kellenberger E., Arnoldschulzgahmen B., Sreenivas K., Suryanarayana T., Stroup D., Reeve J.N. 1994. Localization of histone-like proteins in thermophilic archaea byimmunogold electron-microscopy. Journal of Structural Biology, 112, 1: 70-78
- Bradford M.M. 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, 72, 1-2: 248-254
- Bräuner P., Huber R. 1984. Comparative measurements of membrane potentials with microelectordes and voltage-sensitive dyes. Biochimica et Biophysica Acta, 771: 208-216
- Breusegem S.Y., Clegg R.M., Loontiens F.G. 2002. Base-sequence specificity of Hoechst 33258 and DAPI binding to five (A/T)(4) DNA sites with kinetic evidence for more than one high-affinity Hoechst 33258-AATT complex. Journal of Molecular Biology, 315, 5: 1049-1061
- Cantor C.R., Schimmel P.R. 1980. Equilibria between single strands and double strands.
 V: Biophysical Chemistry part III: The behavior of biological molecules. Cantor
 C. R., Schimmel P. R. (Ed.). San Francisco, W.H. Freeman and Co.: 1134-1165
- Cavicchioli R., Curmi P.M.G., Saunders N., Thomas T. 2003. Pathogenic archaea: do they exist? Bioessays, 25, 11: 1119-1128
- Cowan D.A. 1992. Biotechnology of the Archaea. Trends in Biotechnology, 10, 9: 315-323
- Cubonova L., Sandman K., Hallam S.J., DeLong E.F., Reeve J.N. 2005. Histones in Cenarchaea. Journal of Bacteriology, 187, 15: 5482-5485
- Cui Q., Tong Y.F., Xue H., Huang L., Feng Y.G., Wang J.F. 2003. Two conformations of archaeal Ssh10b - The origin of its temperature-dependent interaction with DNA. Journal of Biological Chemistry, 278, 51: 51015-51022
- Črnigoj M., Kostanjšek R., Kaletunç G., Poklar Ulrih N. 2008. Effect of different fluorescent dyes on thermal stability of DNA and cell viability of the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. World Journal of Microbiology and Biotechnology: doi: 10.1007/s11274-008-9717-3
- de Poorter L.M.I., Keltjens J.T. 2001. Convenient fluorescence-based methods to measure membrane potential and intracellular pH in the Archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Journal of Microbiological Methods, 47, 2: 233-241

DeLong E.F. 1998. Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. Current

Opinion in Genetics & Development, 8, 6: 649-654

- Dinger M.E., Baillie G.J., Musgrave D.R. 2000. Growth phase-dependent expression and degradation of histones in the thermophilic archaeon *Thermococcus zilligii*. Molecular Microbiology, 36, 4: 876-885
- Eckburg P.B., Lepp P.W., Relman D.A. 2003. Archaea and their potential role in human disease. Infection and Immunity, 71, 2: 591-596
- Edmondson S.P., Kahsai M.A., Gupta R., Shriver J.W. 2004. Characterization of Sac10a, a hyperthermophile DNA-binding protein from Sulfolobus acidocaldarius. Biochemistry, 43, 41: 13026-13036
- Ellman G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics, 82, 1: 70-77
- ExPASy. 2008. ExPASy Proteomics Server. Geneva, Swiss Institute of Bioinformatics. <u>http://www.expasy.org/</u> (2008): 1 str.
- Fitz-Gibbon S.T., Ladner H., Kim U.J., Stetter K.O., Simon M.I., Miller J.H. 2002. Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 2: 984-989
- Frye R.A. 1999. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADPribosyltransferase activity. Biochemical and Biophysical Research Communications, 260, 1: 273-279
- Grosjean H., Oshima T. 2007. How nucleic acids cope with high temperature. V: Physiology and biochemistry of extremophiles. Gerday C., Glansdorff N. (Ed.). Oxford, Blackwell Publishing: 36-56
- Guo R., Xue H., Huang L. 2003. Ssh10b, a conserved thermophilic archaeal protein, binds RNA in vivo. Molecular Microbiology, 50, 5: 1605-1615
- Haidinger W., Szostak M.P., Jechlinger W., Lubitz W. 2003. Online monitoring of *Escherichia coli* ghost production. Applied and Environmental Microbiology, 69, 1: 468-474
- Hamaguchi K., Geiduschek E.P. 1962. The effect of electrolytes on the stability of deoxyribonucleate helix. Journal of the American Chemical Society, 84: 1329-1337
- Hames B.D. 1990. One-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. V: Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. Hames B. D., Rickwood D. (Ed.). New York, Oxford University Press: 1-147

Heinicke I., Muller J., Pittelkow M., Klein A. 2004. Mutational analysis of genes encoding

chromatin proteins in the archaeon *Methanococcus voltae* indicates their involvement in the regulation of gene expression. Molecular Genetics and Genomics, 272, 1: 76-87

- Herbert A., Rich A. 1999. Left-handed Z-DNA: structure and function. Genetica, 106, 1-2: 37-47
- Hewitt C.J., Nebe-Von-Caron G. 2001. An industrial application of multiparameter flow cytometry: Assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. Cytometry, 44, 3: 179-187
- Horikoshi K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63, 4: 735-750
- Huang L. 2008. The Sac10b protein family of Archaea. V: Extremophiles 2008. Cowan D., Burton S. (eds.). Cape Town, South Africa, University of Cape Town; University of the Western Cape: str. 17
- Huber H., Huber G., Stetter K.O. 1985. A modified DAPI fluorescence staining procedure suitable for the visualization of lithotrophic bacteria. Systematic and Applied Microbiology, 6: 105-106
- Huber R., Stetter K.O. 2001. Discovery of hyperthermophilic microorganisms. Hyperthermophilic Enzymes, 330: 11-24
- ICPPR. 2008. Infrastrukturni center za površinsko plazmonsko resonanco. Ljubljana, Mreža raziskovalnih infrastrukturnih centrov, Univerza v Ljubljani. <u>http://web.bf.uni-lj.si/bi/sprcenter/</u> (2008): 10 str.
- Invitrogen. 2008. Invitrogen The Handbook. USA, Invitrogen Corporation. <u>http://probes.invitrogen.com/</u> (2008): 10 str.
- Jelinska C., Conroy M.J., Craven C.J., Hounslow A.M., Bullough P.A., Waltho J.P., Taylor G.L., White M.F. 2005. Obligate heterodimerization of the archaeal Alba2 protein with Alba1 provides a mechanism for control of DNA packaging. Structure, 13, 7: 963-971
- Johnson D.B. 1998. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. FEMS Microbiology Ecology, 27, 4: 307-317
- Kahsai M.A., Vogler B., Clark A.T., Edmondson S.P., Shriver J.W. 2005. Solution structure, stability, and flexibility of Sso10a: A hyperthermophile coiled-coil DNAbinding protein. Biochemistry, 44, 8: 2822-2832
- Kaletunç G. 2001. Thermal analysis of bacteria using differential scanning calorimetry. V: Novel processes and control technologies in the food industry. Bozoglu F., Deak T., Ray B. (eds.). Amsterdam, IOS Press: str. 227-235

- Kapucinski J., Darzynkiewicz Z. 1990. Structure destabilization and condensation of nucleic acids by intercalators: Structure & Methods; DNA and RNA. V: Proceedings of the 6th conversation in the discipline biomolecular stereodynamics, 1990, New York, USA. Sarma R. H., Sarma M. H. (eds.). Schenectady, Adenine Press: str. 267-281
- Kawarabayasi Y., Hino Y., Horikawa H., Yamazaki S., Haikawa Y., Jin-no K., Takahashi M., Sekine M., Baba S.-i., Ankai A., Kosugi H., Hosoyama A., Fukui S., Nagai Y., Nishijima K., Nakazawa H., Takamiya M., Masuda S., Funahashi T., Tanaka T., Kudoh Y., Yamazaki J., Kushida N., Oguchi A., Aoki K.-i., Kubota K., Nakamura Y., Nomura N., Sako Y., Kikuchi H. 1999. Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic Crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. DNA Research, 6, 2: 83-101
- Kim Y.G., Park H.J., Kim K.K., Lowenhaupt K., Rich A. 2006. A peptide with alternating lysines can act as a highly specific Z-DNA binding domain. Nucleic Acids Research, 34, 17: 4937-4942
- Kiser J.R., Monk R.W., Smalls R.L., Petty J.T. 2005. Hydration changes in the association of Hoechst 33258 with DNA. Biochemistry, 44, 51: 16988-16997
- Komoda Y., Shimizu M., Kaneko S., Yamamoto M., Ishikawa M. 1982. Chemistry of Paragracine, a Biologically-Active Marine Base from Parazoanthus Gracilis (Lwowsky). Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 30, 2: 502-508
- Kumarevel T., Sakamoto K., Gopinath S.C., Shinkai A., Kumar P.K., Yokoyama S. 2007. Crystal structure of an archaeal specific DNA-binding protein (Ape10b2) from *Aeropyrum pernix* K1. Proteins, 71, 3: 1156-1162
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. Nature, 227, 5259: 680-&
- Lakowicz J.R. 1999. Principles of fluorescece spectroscopy. 2nd ed. New York, Kluwer Academic / Plenum: 698 str.
- Leuko S., Legat A., Fendrihan S., Stan-Lotter H. 2004. Evaluation of the LIVE/DEAD BacLight kit for detection of extremophilic archaea and visualization of microorganisms in environmental hypersaline samples. Applied and Environmental Microbiology, 70, 11: 6884-6886
- Luo X., Schwarz-Linek U., Botting C.H., Hensel R., Siebers B., White M.F. 2007. CC1, a novel crenarchaeal DNA binding protein. Journal of Bacteriology, 189, 2: 403-409
- Lurz R., Grote M., Dijk J., Reinhardt R., Dobrinski B. 1986. Electron-microscopic study of DNA complexes with proteins from the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Embo Journal, 5, 13: 3715-3721

Mallick P., Boutz D.R., Eisenberg D., Yeates T.O. 2002. Genomic evidence that the

intracellular proteins of archaeal microbes contain disulfide bonds. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 15: 9679-9684

- Mao Y.-J., Sheng X.-R., Pan X.-M. 2007. The effects of NaCl concentration and pH on the stability of hyperthermophilic protein Ssh10b. BMC Biochemistry, 8, 1: 28
- Marsh V.L., Peak-Chew S.Y., Bell S.D. 2005. Sir2 and the acetyltransferase, Pat, regulate the archaeal chromatin protein, Alba. Journal of Biological Chemistry, 280, 22: 21122-21128
- Matte-Tailliez O., Brochier C., Forterre P., Philippe H. 2002. Archaeal phylogeny based on ribosomal proteins. Molecular Biology and Evolution, 19, 5: 631-639
- Milek I., Cigić B., Skrt M., Kaletunc G., Ulrih N.P. 2005. Optimization of growth for the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* on a small-batch scale. Canadian Journal of Microbiology, 51, 9: 805-809
- Milek I., Črnigoj M., Ulrih N.P., Kaletunç G. 2007. *In vivo* characterization of thermal stabilities of *Aeropyrum pernix* cellular components by differential scanning calorimetry. Canadian Journal of Microbiology, 53, 9: 1038-1045
- Miteva M., Shosheva A., Atanasov B. 2000. Spectrophotometric titration of ionisable groups in proteins: a theoretical study. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 56, 10: 2033-2041
- Morii H., Yagi H., Akutsu H., Nomura N., Sako Y., Koga Y. 1999. A novel phosphoglycolipid archaetidyl(glucosyl)inositol with two sesterterpanyl chains from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 1436, 3: 426-436
- Nebe-von Caron G., Stephens P., Badley R.A. 1998. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. Journal of Applied Microbiology, 84, 6: 988-998
- Novy R., Yaeger K., Held D., Mierendorf R. 2002. Coexpression of multiple target proteins in *E. coli*. Novagen: str. 1
- Pitcher D.G., Saunders N.A., Owen R.J. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Letters in Applied Microbiology, 8, 4: 151-156
- Preston C.M., Wu K.Y., Molinski T.F., DeLong E.F. 1996. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen nov, sp, nov. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 13: 6241-6246

- Provencher S.W., Glockner J. 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular-dichroism. Biochemistry, 20, 1: 33-37
- QIAGEN-Worldwide 2003. The QIAexpressionist. A handbook for high level expression and purification of 6xHis tagged proteins. str. 24
- Reddy T.R., Suryanarayana T. 1988. Novel histone-like DNA-binding proteins in the nucleoid from the acidothermophillic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius* that protect DNA against thermal denaturation. Biochimica et Biophysica Acta, 949, 1: 87-96
- Reeve J.N., Bailey K.A., Li W.T., Marc F., Sandman K., Soares D.J. 2004. Archaeal histones: structures, stability and DNA binding. Biochemical Society Transactions, 32: 227-230
- Sako Y., Nomura N., Uchida A., Ishida Y., Morii H., Koga Y., Hoaki T., Maruyama T. 1996. Aeropyrum pernix gen nov, sp nov, a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100 degrees C. International Journal of Systematic Bacteriology, 46, 4: 1070-1077
- Sambrook J., Russel D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed. Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2344 str.
- Sandman K., Grayling R.A., Dobrinski B., Lurz R., Reeve J.N. 1994. Growth-phasedependent synthesis of histones in the archaeon *Methanothermus fervidus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91, 26: 12624-12628
- Sandman K., Reeve J.N. 2005. Archaeal chromation proteins: different structures but common function? Current Opinion in Microbiology, 8, 6: 656-661
- Sandman K., Soares D., Reeve J.N. 2001. Molecular components of the archaeal nucleosome. Biochimie, 83, 2: 277-281
- SAS-Software 1999. Ver.: 8.01, Cary: SAS Institute, Inc.
- Schmid F.X. 1989. Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. V: Protein structure: A practical approach. Creighton T. E. (eds.). Oxford, IRL Press: str. 355
- Shriver J.W., Peters W.B., Szary N., Clark A.T., Edmondson S.P. 2001. Calorimetric analyses of hyperthermophile proteins. Methods in Enzymology, 334: 389-422
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. Analytical Biochemistry, 150, 1: 76-85

Sorensen K. 1992. One Reagent Simultaneously Identifies the Salt and the Protein Peaks

on Desalting Column. Biotechniques, 12, 2: 235-236

- Stetter K.O. 1996. Hyperthermophilic procaryotes. FEMS Microbiology Reviews, 18, 2-3: 149-158
- Sullivan S., Sink D.W., Trout K.L., Makalowska I., Taylor P.M., Baxevanis A.D., Landsman D. 2002. The histone database. Nucleic Acids Research, 30, 1: 341-342
- Swillens S. 1995. Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations - Practical Aid for Computer-Analysis. Molecular Pharmacology, 47, 6: 1197-1203
- Ulrih N.P., Adamlje U., Nemec M., Sentjurc M. 2007. Temperature- and pH-induced structural changes in the membrane of the hyperthermophilic archaeon Aeropyrum pernix k1. Journal of Membrane Biology, 219, 1-3: 1-8
- van Holde K.E. 1985. Physical Biochemistry. (Ed.). New Jersey, Prentice Hall Inc.: 235-252
- Venyaminov S.Y., Yang J.T. 1996. Determination of protein secondary structure. V: Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. Fasman G. D. (Ed.). New York and London, Plenum Press: 69-107
- Vogelstein B., Gillespie D. 1979. Preparative and Analytical Purification of DNA from Agarose. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76, 2: 615-619
- Wang G.G., Guo R., Bartlam M., Yang H.T., Xue H., Liu Y.W., Huang L., Rao Z.H. 2003. Crystal structure of a DNA binding protein from the hyperthermophilic euryarchaeon *Methanococcus jannaschiii*. Protein Science, 12, 12: 2815-2822
- Wardleworth B.N., Russell R.J.M., Bell S.D., Taylor G.L., White M.F. 2002. Structure of Alba: an archaeal chromatin protein modulated by acetylation. Embo Journal, 21, 17: 4654-4662
- Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. 1990. Towards a natural system of organisms proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87, 12: 4576-4579
- Wu L.J. 2004. Structure and segregation of the bacterial nucleoid. Current Opinion in Genetics & Development, 14, 2: 126-132
- Xie Y.M., Reeve J.N. 2004. Transcription by an archaeal RNA polymerase is slowed but not blocked by an archaeal nucleosome. Journal of Bacteriology, 186, 11: 3492-3498

- Xue H., Guo R., Wen Y.F., Liu D.X., Huang L. 2000. An abundant DNA binding protein from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* affects DNA supercoiling in a temperature-dependent fashion. Journal of Bacteriology, 182, 14: 3929-3933
- Zhao K.H., Chai X.M., Marmorstein R. 2003. Structure of a Sir2 substrate, Alba, reveals a mechanism for deacetylation-induced enhancement of DNA binding. Journal of Biological Chemistry, 278, 28: 26071-26077
- Zimmermann M., Veeck J., Wolf K. 1998. Minimizing the exposure to UV light when extracting DNA from agarose gels. Biotechniques, 25, 4: 586-586

ZAHVALA

Hvaležen sem ženi Katarini, svojim domačim ter Kristanovim, ki so mi bili vedno in povsod brezpogojno ob strani.

Mentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrih se zahvaljujem za vodenje ter pomoč med mojim podiplomskim študijem. Ravno tako bi se rad zahvalil ostalima članoma komisije prof. dr. Romanu Jerali ter prof. dr. Petru Rasporju za strokovne in konstruktivne nasvete.

Zahvala gre tudi vsem prijateljem in kolegom, ki so mi stali ob strani ter mi, ko je bilo v njihovi moči pomagali in prenašali moje muhe. Iz srca se zahvaljujem: Andreju Razpotniku, Zdravku Podlesku, Fani Oven, Mateji Vidmar, Tanji Vilfan, Andreju Hanzlowsky, Ireni Oven, Barbari Piškur, Mateju Butala, Barbari Kastelic-Bokal, Ireni Pavešić, Borutu Jermanu, Matiji Rijavcu, Igorju Mileku, Dejanu Gmajnerju, Petri Terpinc, Vesni Hodnik, Mojci Beseničar Podlesek, prof. dr. Veroniki Abram, Lini Burkan, Tanji Rožman, Biserki Bakrač, Lei Gašperlin, Branimirju Bertoši, Andreji Križ, Andreju Bavdku, Cenetu Gostinčarju, Branki Tavzes, Matildi Urukalo

Hvala vsem sodelavcem Katedre za kemijo ter sodelavcem Oddelka za živilstvo za pomoč ter veliko veselih druženj tekom mojega študija.

Hvaležen sem tudi prof. dr. Gőnűl Kaletunç, doc. dr Evi Žerovnik, doc. dr. Roku Kostanjšku, prof. dr. Gregorju Anderluhu ter sodelavcem Katedre za genetiko, Katedre za biotehnologijo in Katedre za biokemijo, ki so mi omogočali delo v svojih laboratorijih.