

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maja MEGLEN

**VPLIV pH RASTNEGA MEDIJA NA VSEBNOST ZUNAJCELIČNIH
PROTEINOV TERMOFILNE ARHEJE *Aeropyrum pernix***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IMPACT OF pH GROWTH MEDIUM ON THE CONTENT OF
EXTRACELLULAR PROTEINS IN THERMOPHILIC ARCHAEOM
*Aeropyrum pernix***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju na Katedri za kemijo in v proteomskem laboratoriju na Katedri za biotehnologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za menotrico diplomskega dela imenovala prof. dr. Natašo Poklar Ulrich, za somentorico doc. dr. Polono Jamnik in za recenzenta doc. dr. Blaža Cigića.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrich

Somentorica: doc. dr. Polona Jamnik

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maja Meglen

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.222: 582.233: 547.96(043)=163.6
KG arheje / hipertermofili / *Aeropyrum pernix* / gojenje arhej / zunajcelični proteini / 2D-elektroforeza
AV MEGLEN, Maja
SA POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica) / JAMNIK, Polona (somentorica) / CIGIĆ, Blaž (recenzent)
KZ 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2008
IN VPLIV pH RASTNEGA MEDIJA NA VSEBNOST ZUNAJCELIČNIH PROTEINOV TERMOFILNE ARHEJE *Aeropyrum pernix*
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XI, 63 str., 10 pregl., 18 sl., 10 pril., 39 vir.
IJ sl
JI sl / en

AL V nalogi smo želeli ugotoviti, ali sprememba pH vrednosti rastnega medija vpliva na profil zunajceličnih proteinov termofilne arheje *Aeropyrum pernix*. Eksperimentalno delo je potekalo v dveh delih. Arhejo *Aeropyrum pernix* smo gojili v bioreaktorju ob stalnem mešanju in dovajjanju zraka pri temperaturi 92 °C, v rastnem mediju pri pH vrednostih 6, 7, 8 in 9. Brozgo smo s centrifugiranjem ločili na biomaso in rastni medij. Z ultrafiltracijo rastnega medija smo pridobili vzorce zunajceličnih proteinov, ki smo jih dializirali in nato koncentrirali s pomočjo centrifugirk z membrano. Koncentriranim vzorcem smo določili koncentracijo proteinov z metodo po Bradfordu. V drugem delu smo analizirali zunajcelične proteine z dvo-dimenzionalno elektroforezo. Kvantitativna primerjava 2-D profilov zunajceličnih proteinov pri treh različnih pH vrednostih (6, 7, 8) je pokazala, da so določene 2-D lise prisotne pri vseh treh pH vrednostih z enako intenzitetom, medtem ko smo pri nekaterih lisah opazili razliko v intenzitetu. Opazili smo tudi proteine, ki so bili prisotni oz. odsotni v vsaj enim vzorcu. Določene 2-D lise smo izrezali in jih poslali na identifikacijo z masno spektrometrijo. V izbranih 2-D elektroforetskih lisah je bilo identificiranih več zadevk (proteinov), v vseh lisah pa so bili identificirani ABC prenašalci, vendar šest različnih vrst. AK zaporedja šestih različnih ABC prenašalcev smo primerjali in ugotovili, da so si proteini med seboj različni. V nadaljevanju smo iskali podobnosti s prokarionti in evkarionti. Ugotovili smo, da so zaporedja štirih ABC prenašalcev najbolj podobna prenašalnim proteinom ostalih hipertermofilnih arhej, eno zaporedje pa je podobno ekstremofilnim bakterijam.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.222: 582.233: 547.96(043)=163.6
CX archaea / hyperthermophiles / *Aeropyrum pernix* / growth of archaeum / extracellular proteins / 2D-electrophoresis
AU MEGLEN, Maja
AA POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor) / JAMNIK, Polona (co-advisor) / CIGIĆ, Blaž (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2008
TI IMPACT OF pH GROWTH MEDIUM ON THE CONTENT OF EXTRACELLULAR PROTEINS IN THERMOPHILIC ARCHAEOBACTERIUM *Aeropyrum pernix*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 63 p., 10 tab., 18 fig., 10 ann., 39 ref.
LA sl
AL sl / en

AB The aim of our work was to investigate if change in pH value of growth medium can affect extracellular protein profile of thermophilic archaea *Aeropyrum pernix*. Research was divided into two parts. Archaea *Aeropyrum pernix* was cultivated in bioreactor at the following conditions (constant mixing and air supply, T = 92 °C; pH 6, 7, 8 and 9). Bioprocess broth was separated into biomass and growth medium. Extracellular proteins in the growth medium were obtained by ultrafiltration. The next phase included dialysis of samples and in the end proteins were concentrated using centrifuge tubes with membrane. Protein concentration in the samples was determined using Bradford method. In the second part of the research extracellular proteins were separated by 2-D electrophoresis. Quantitative comparison of 2-D profiles of extracellular proteins at particular pH values (6, 7, 8) showed that particular 2-D electrophoretic spots are present at all pH values with the same intensity, while at some spots difference in intensity was observed. Additionally, proteins, that were present or absent at least one pH value were also observed. Some of these proteins were cut from the gels and identified using mass spectrometry. For each selected spot many protein hits were obtained, in all ABC transporters were found, but six different types. Their aminoacid sequences were compared and identity was not found. Further step was to compare them with prokaryotes and eukaryotes, where we found that aminoacid sequences of four types of ABC transporters were mostly similar to transporter proteins of other hyperthermophilic archaea and one was similar to extremophilic bacteria.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ARHEJE-SAMOSTOJNA DOMENA	4
2.2 HIPERTERMOFILI	6
2.3 PRILAGODITVE ARHEJ NA ŽIVLJENJE PRI VISOKI TEMPERATURI	7
2.4 ENCIMI HIPERTERMOFILOV (TERMOCIMI)	7
2.5 GOJENJE HIPERTERMOFILOV	8
2.6 <i>Aeropyrum pernix</i>	10
2.6.1 Genom <i>A. pernix</i>	11
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI IN OPREMA	14
3.1.1 Materiali	14
3.1.2 Pribor in oprema	15
3.2 METODE	16
3.2.1 Gojenje arheje <i>Aeropyrum pernix</i>	16
3.2.1.1 Eksperimentalni del	16
3.2.2 Ultrafiltracija rastnega medija	17
3.2.2.1 Eksperimentalni del	18
3.2.3 Čiščenje vzorca z dializo	19
3.2.3.1 Eksperimentalni del	19
3.2.4 Koncentriranje vzorcev s centrifugiranjem v Eppendorf centrifugirkah z membrano	19

3.2.5 Določanje koncentracije proteinov	19
3.2.5.1 Eksperimentalni del	20
3.2.6 Dvo-dimenzionalna elektroforeza	20
3.2.6.1 1. dimenzija	20
3.2.6.2. 2. dimenzija	22
3.2.7. Detekcija proteinov na poliakrilamidnem gelu	24
3.2.8. Dokumentiranje gelov in obdelava slik	24
3.2.9. Masna spektrometrija	25
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	26
4.1 GOJENJE ARHEJE <i>A. pernix</i>	26
4.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJE ZUNAJCELIČNIH PROTEINOV	26
4.3 ANALIZA ZUNAJCELIČNIH PROTEINOV Z 2-D ELEKTROFOREZO	27
4.4 IDENTIFIKACIJA	33
4.5 PRIMERJAVA AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ ABC-PRENAŠALCEV	39
4.6 PRIMERJAVA AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ ABC-PRENAŠALCEV S PROGRAMOM BLAST	40
5 SKLEPI	43
6 POVZETEK	44
7 VIRI	45
ZAHVALA	49
PRILOGE	50

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Lastnosti genoma <i>A. pernix</i> (DOGAN, 2002)	13
Preglednica 2: Spojine, potrebne za pripravo gojišča.....	17
Preglednica 3: Sestava raztopine za rehidracijo trakov	21
Preglednica 4: Priprava ločilnega gela z 12 % zamreženostjo	22
Preglednica 5: Priprava pufra za uravnoteženje-osnovni	23
Preglednica 6: Sestava 1× NaDS elektroforeznega pufra.....	24
Preglednica 7: Barvanje proteinov s Simply Blue.....	24
Preglednica 8: Končni volumni vzorcev in koncentracije proteinov	27
Preglednica 9: Rezultati identifikacije (Yamazaki in sod., 2005; Yamazaki in sod., 2006; Kawarabayasi in sod., 1999)	33
Preglednica 10: Rezultati primerjave sekvenc ABC prenašalcev v programu BLAST	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Filogenetsko drevo živega sveta (Allers in Maverech, 2005).....	4
Slika 2: Vroči vrelec-tipičen habitat za arheje, Narodni park Yellowstone ZDA (Ute in Tumbula, 1999)	6
Slika 3 (levo): Optimalna temperatura rasti <i>A. pernix</i> , podvojevalni čas (»doubling time«) je bil izračunan iz naklona rastne krivulje (Sako in sod., 1996).....	9
Slika 4 (desno): Vpliv različnih pH vrednosti na rast <i>A. pernix</i> , podvojevalni čas je opisan pri sliki 3 (Sako in sod., 1996)	9
Slika 5: Rastne krivulje pri gojenju <i>A. pernix</i> pri 92 °C v medijih z različnimi viri morske vode: A-gojišče Marine broth 2216, B-naravna morska voda, C-umetna morska voda; normalizirane glede na začetno koncentracijo biomase (m/m_0) (Milek in sod., 2005).....	10
Slika 6: Arheja <i>Aeropyrum pernix</i> (Yamaguchi, 2002).....	11
Slika 7: Genom <i>A.pernix</i> K1 (Kawarabayasi in sod. 1999)	12
Slika 8: Kromosom <i>A. pernix</i> v obliki barvnih znakov, ki prikazujejo funkcije genov (DOGAN, 2002)	13
Slika 9: Shema masnega spektromетra (Clark, 2000)	25
Slika 10: Primerjava povprečnih vrednosti optične gostote, pomerjene ob koncu gojenja <i>A. pernix</i>	26
Slika 11: 2-D profil zunajceličnih proteinov pri različnih vrednostih pH. Za vsako pH vrednost so bile izvedene tri ponovitve.	28
Slika 12: Primer obdelave 2-D elektroforetske lise (obkrožena z rdečo barvo) s programom 2D-Dymension; analiza 1 ($R < 2$)	29
Slika 13: Primer obdelave 2-D elektroforetske lise (obkrožena z rdečo barvo) s programom 2D-Dymension; analiza 2 ($R > 2$)	30
Slika 14: Primer obdelave 2-D elektroforetske lise (obkrožena z rdečo barvo) s programom 2D-Dymension; analiza 3 (prisotnost / odsotnost v vzorcih)	31
Slika 15: 2-D profil zunajceličnih proteinov pri pH vrednosti 6	32
Slika 16: 2-D profil zunajceličnih proteinov pri pH vrednosti 7	32

Slika 17: 2-D profil zunajceličnih proteinov pri pH vrednosti 8..... 32

Slika 18: Filogenetsko drevo domene arhej (The Lowe Lab, 2008) 40

KAZALO PRILOG

Priloga A: Sistem za aerobni bioprocес z enkratnim polnjenjem v steklenici z mešanjem (Milek in sod., 2005)	50
Priloga B: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov po Bradfordu	51
Priloga C: Preglednica z AK zaporedji šestih različnih ABC prenašalcev	52
Priloga D: Obdelava izbranih AK zaporedij ABC prenašalcev z računalniškim programom CLUSTAL 2.0.8 in Legenda	55
Priloga E: AK zaporedje 1: ABC prenašalec, substrat-vezni proteinski prekurzor, pI 4,48	58
Priloga F: AK zaporedje 2: ABC prenašalec aminokisline z razvejano stransko verigo, pI 4,44	59
Priloga G: AK zaporedje 3: Oligopepidni ABC prenašalec, pI 4,33	60
Priloga H: AK zaporedje 4: domnevno ABC prenašalec, substrat-vezni protein, pI 4,90 ..	61
Priloga I: AK zaporedje 5: ABC prenašalec, substrat-vezni protein, pI 5,01	62
Priloga J: AK zaporedje 6: ABC prenašalec, substrat-vezni proteinski prekurzor, pI 5,04	63

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABC prenašalec	prenašalec z ATP-vezavno kaseto
Acil-CoA	acilkoencim A
ANOVA-test	analiza varianc; test, s katerim ugotovimo ali med skupinami obstajajo kakšne razlike
BSA	goveji serumski albumin
gi	<i>geneInfo identifier</i> , edinstveno določena koda za zaporedje
IEF	izoelektrično fokusiranje
M _r	molekulska masa [Da]
MS	masna spektrometrija
MWCo	izključitvena molekulska masa; mejna molekulska masa
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfat
PBS	fosfatni pufer s soljo
pI	izoelektrična točka
PMSF	fenilmethylsulfonil fluorid
NaDS-PAGE	natrijev dodecilsulfat poliakrilamidna gelska elektroforeza
TRIS HCl	tris(hidroksimetil)aminometan z vodikovim kloridom

1 UVOD

Danes razvrščamo vse poznane organizme v tri domene: evkarionte (Eucarya), bakterije (Bacteria) in arheje (Archaea). Celična organizacija arhej je bolj podobna prokariontskim bakterijam, mehanizem celičnih procesov pa je bolj soroden evkariontskim. Čeprav DNA analize vzorcev iz okolja kažejo na razširjenost arhej, pa veliko večino opisanih vrst uvrščamo med ekstremofilne pojavnne oblike. Med najbolj značilnimi so ekstremni halofili, metanogeni in ekstremni termofili (Cowan, 1992).

Ekstremofilni organizmi rastejo v okoljih, ki so za ostale organizme lahko letalna, skozi evolucijo pa so morali razvijati različne sposobnosti, ki so jim omogočale preživetje in jim nudili selektivno prednost pred ostalimi mikroorganizmi. Prilagojeni so na življenje v ekoloških nišah, kot so visoka temperatura, ekstremne vrednosti pH, visoke koncentracije soli in visoki tlaki. Zato so odličen model za preučevanje prilagajanja organizmov na ekstremna okolja (Adamlje, 2005).

Hipertermofili so organizmi, ki najbolje rastejo pri temperaturi nad 80 °C, pod 60 °C pa ne rastejo več (Stetter, 1996). Hipertermofili so sposobni heterotrofne rasti na proteinskih substratih kot edinem virusu dušika, ogljika in energije (Milek, 2005). Večina biotopov, iz katerih so izolirali hipertermofile, je anoksičnih zaradi majhne topnosti kisika pri visokih temperaturah in prisotnosti reducirajočih plinov. Zato je tudi večina hipertermofilnih arhej anaerobnih, *Aeropyrum pernix* pa je prvi odkriti striktno aerobni nevtrofilni predstavnik. *Aeropyrum pernix* so izolirali iz morske vode v priobalnem termalnem »solfatara« vrelcu na otoku Kodakara na Japonskem. Optimalna temperatura za njegovo rast je med 90 in 95 °C, optimalna pH vrednost okoli 7 in slanost 3,5 % (Sako in sod., 1996). Najznačilnejši kriterij razlikovanja arhej in bakterij je arhejska celična membrana, kjer sta glicerol in hidrofobni del v membranskih lipidih povezana z etrsko vezjo. Od mnogih hipertermofilov se *A. pernix* razlikuje po tem, da za membrano nima bipolarnega monosloja temveč dvosloj (Nekrep, 1996).

Encimi hipertermofilov so med najbolj stabilnimi znanimi encimi. Značilno za njih je, da so termostabilni in termoaktivni, kažejo tudi veliko odpornost proti proteolitični razgradnji, denaturaciji z organskimi topili in detergenti, ter obstojnost pri ekstremnih pH vrednostih (Niehaus, 1999). Za zunajcelične proteine velja, da so temperaturno precej bolj stabilni od intracelularnih in zato tehnološko zelo zanimivi (Vieille in Zeikus, 2001). Analiza genoma *A. pernix* je razkrila, da ima kar 30 % proteinov signalne sekvene za translokacijo skozi celično membrano, med temi pa je verjetno nekaj takih s proteinazno aktivnostjo. Poleg proteinaz so zanimivi tudi preostali encimi hipertermofilnih arhej s potencialom v biotehnioloških aplikacijah (Yamazaki in sod., 2006; Kawarabayashi in sod., 1999).

Z metodo dvo-dimenzionalne (2-D) gelske elektroforeze smo ločili vzorce proteinov. Ločba v prvi dimenziji, ki jo imenujemo izoelektrično fokusiranje (IEF), poteka v gelu z immobiliziranim pH gradientom, kjer se proteini ločijo zaradi različnega naboja, ki ga nosijo. Nabiti proteini potujejo po gradientu do tako imenovane izoelektrične točke (pI), kjer je njihov neto naboj enak nič. Proteini ločeni z IEF se v drugi dimenziji ločijo še na osnovi velikosti s klasično NaDS-elektroforezo (Sigma-Aldrich, 2003). S kombinacijo

dveh dimenzij je omogočena visoka ločljivost proteinov in analiza razlik v sintezi proteinov v proteomskejih študijah, preverjanje čistosti proteinov med izolacijo ter simultana ločitev večjega števila proteinov v enem vzorcu.

V hipotezi diplomske naloge smo predvidevali, da pH rastnega medija vpliva na profil zunajceličnih proteinov termofilne arheje *Aeropyrum pernix* in da so proteini prisotni v različnih koncentracijah. Eksperimentalno delo je zajemalo gojenje omenjenega organizma v bioreaktorju s proteinskim substratom pri različnih pH vrednostih, pripravo vzorcev zunajceličnih proteinov z ultrafiltracijo, analizo zunajceličnih proteinov z 2-D elektroforezo, primerjavo 2-D profilov zunajceličnih proteinov ter primerjavo AK zaporedij šestih različnih ABC prenašalcev s programom CLUSTAL in programom BLAST.

1.1 NAMEN DELA

Delovni organizem naše raziskave je bila aerobna hipertermofilna arheja *Aeropyrum pernix*, ki je predstavnik ekstremofilnih organizmov in ima optimalne pogoje rasti pri temperaturi 92 °C in pH 7,0. Rastni medij, na katerem najbolj uspeva, je tekoče gojišče z umetno morsko vodo ob dodatku tripton-peptona in natrijevega tiosulfata. Arheja izloča zunajcelične hidrolitične encime, ki sodelujejo pri metabolizmu substrata.

Namen raziskovalnega dela diplomske naloge je bil ugotoviti, ali sprememba pH rastnega medija iz nevtralnega (pH 7,0) v kislega (pH 6,0) in v bazičnega (pH 8,0 in 9,0) vpliva na prisotnost zunajceličnih proteinov. Z ultrafiltracijo rastnega medija smo pridobili koncentrirane vzorce proteinov, ki smo jih analizirali z 2-D elektroforezo. Razlike v 2-D elektroforetskih lisah so bile ugotovljene s statistično analizo (ANOVA-test). Primerjavo AK zaporedij ABC prenašalcev smo naredili s pomočjo računalniškega programa CLUSTAL 2.0.8. in programa BLAST.

Delovna hipoteza

Predvidevali smo, da pH vrednost rastnega medija vpliva na prisotnost različnih zunajceličnih proteinov in da so proteini prisotni v različnih koncentracijah.

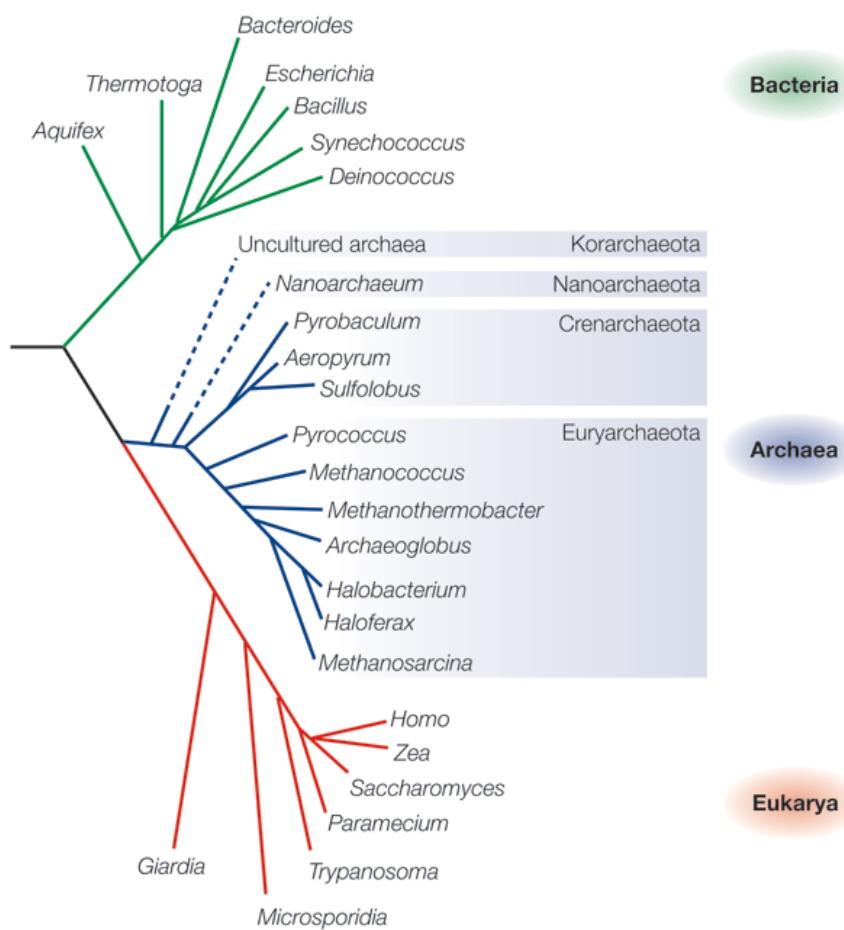
Zastavljeni nalogi

- gojenje celic *Aeropyrum pernix* v gojiščih z različimi pH vrednostmi
- priprava vzorcev zunajceličnih proteinov
- analiza zunajceličnih proteinov z 2-D gelsko elektroforezo
- primerjava 2-D profilov zunajceličnih proteinov
- preučevanje vpliva spremembe pH rastnega medija na vsebnost zunajceličnih proteinov

2 PREGLED OBJAV

2.1 ARHEJE-SAMOSTOJNA DOMENA

Konec sedemdesetih let prejšnjega stoletja so znanstveniki opozorili na pomanjkljivost delitve živih bitij le na prokarionte in evkarionte. Ta delitev je bila osnovana glede na odsotnost oziroma prisotnost celičnega jedra. Woese in Fox (1977) sta takrat že predlagala tripartitno delitev na domene Eubacteria, Archaeabacteria in Eukaryotes. Z razvojem molekularnih tehnik za ugotavljanje filogenetske sorodnosti organizmov in posledičnim odkrivanjem neobičajnih organizmov, je bila predlagana delitev na tri domene (slika 1): bakterije (Bateria), arheje (Archaea) in evkarionte (Eucarya) (Woese in sod., 1990).



Slika 1: Filogenetsko drevo živega sveta (Allers in Mevarech, 2005)

Za arheje in za prokarionte je značilno, da celice nimajo celičnega jedra ali drugih celičnih organelov. Celice teh organizmov se precej razlikujejo od evkariontskih, v premeru merijo

1 do 10 μm . Celične komponente arhej so obdane s celično membrano in togo celično steno. Zunanja površina je prekrita z bički (flageli), ki so potrebni za premikanje, in manjšimi izrastki, piliji, pretko katerih si prokarionti izmenjujejo DNA med spolnim razmnoževanjem ali pa se z njimi pritrjujejo na razne površine. V notranjosti celice je citoplazma, ki je gelu podobna heterogena suspenzija bioloških molekul (encimov, ribosomov in v jedrni regiji zvite DNA) (Boyer, 2005). Genom arhej je podoben evkariontskemu in je velik od $8,4 \times 10^8$ bp do $2,3 \times 10^9$ bp. Posebnost genoma arhej so proteini, ki so podobni histonom, in strukture, podobne nukleosomom. V vseh fenotipskih skupinah arhej je genom dopolnjen s plazmidi in elementi, podobnim bakteriofagom ali virusom (Nekrep, 1996).

Večina znanih predstavnikov arhej je bila izolirana iz ekstremnih okolij ali zelo specializiranih ekoloških niš. Domena arhej se deli na tri glavna karljestva: *Crenarchaeota*, ki zajamejo termofilne arheje, *Euryarchaeota*, kjer najdemo ekstremne halofile, sulfatne reducente, termofilne heterotrofe in matanogene bakterije in *Korarchaeota*, ki obsega trenutno le dva predstavnika, identificirana na podlagi DNA analize vzorcev iz okolja (Milek, 2005). Huber in sod. so leta 2002 predlagali poimenovanje novega kraljestva z imenom *Nanoarchaeota*. Opisali so namreč novo vrsto hipertermofilnega simbionta *Nanoarchaeum equitans*. V stabilnih anaerobnih okoljih, kot so močvirja, barje, poplavljena področja in komposti, so prisotne predvsem striktno anaerobne metanogene arheje. Ekstremno halofilne in ekstremno termofilne arheje so v sedimentih slanih voda ter podmorskih vrelcih, v tleh pa teh predstavnikov še niso identificirali (Stres, 2001).

Najbolj razširjena je delitev arhej na osnovi fenotipskih lastnosti. Delijo se na ekstremne termofile, ekstremne halofile in metanogene (Cowan, 1992), najdemo tudi psihrofile (najhitreje rastejo pri temperaturi pod 15 °C in ne rastejo nad 20 °C), piezofile (rastejo pri tlaku, večjem od atmosferskega), alkalofile (rastejo pri pH nad 9) in acidofile (rastejo pod pH 3) (Milek, 2005).

Posebnosti arhej so specifični rRNA motivi, lipidi z etersko vezjo (evkarionti in bakterije imajo estersko vez), sestava celične stene je edinstvena, nekateri rodovi so sposobni producirati metan. Replikacijski, transkripcijski in translacijski molekulski mehanizem arhej je bolj soroden evkariontskemu, metabolne značilnosti in celična organizacija pa bolj bakterijskim (Bernander, 1998).

Preživetje v okolju, kjer večina organizmov nima nobenih možnosti za obstoj, je odvisno od prilagoditev, ki so pogojene z osnovnimi tipi makromolekul (DNA, lipidi, ogljikovi hidrati, proteini). Proučevanje teh prilagoditev je ključno za razumevanje mehanizmov, ki v določenem okolju ekstremofilom omogočajo preživetje. S pogleda biotehnologije so zanimivi encimi s sposobnostjo ohranjanja katalitične aktivnosti v ekstremnih pogojih (Milek, 2005).

2.2 HIPERTERMOFILI

Hipertermofilni organizmi so tisti organizmi, ki imajo optimalno temperaturo rasti nad 80 °C in niso sposobni rasti pod 60 °C (Stetter, 1996). Prvič so hipertermofile opisali v 80-ih letih prejšnjega stoletja, ob koncu 20. stoletja je bilo opisanih že več kot 70 vrst hipertermofilov, razvrščenih v 10 rodov. Večina teh predstavnikov spada med Arheje, ki so na univerzalnem filogenetskem drevesu uvrščeni najbližje hipotetičnemu skupnemu predniku vsega živega (Milek, 2005). Meja najvišje temperature, kjer so mikroorganizmi sposobni življenja, se pomika navzgor, tudi nad temperaturo 121 °C, ki je temperatura avtoklaviranja, ki naj bi uničila vse prisotne mikroorganizme (Kasheff in Lovley, 2003). Potencialni vir hipertermofilov so predvsem globokomorski vrelci, kjer je voda pod velikim tlakom in temperature veliko višje od 100 °C. Večino hipertermofilnih arhej so izolirali iz geotermalno ogretilih tal ali voda, ki vsebujejo elementarno žveplo ali pa sulfide. Termofilne arheje naseljujejo tudi vroče vrelce v Yellowstonskem narodnem parku v ZDA (slika 2). V okolju »solfatara« (vulkansko območje, kjer prihajajo na površje plini in para) prevladuje poleg visoke temperature tudi alkalno do zmerno kislo ali zelo kislo stanje in anoksični pogoji (Adamlje, 2005).



Slika 2: Vroči vrelec-tipičen habitat za arheje, Narodni park Yellowstone ZDA (Ute in Tumbula, 1999)

Večina hipertermofilov je heterotrofnih organotrofov. To pomeni, da energijo pridobivajo s katabolizmom organskih substratov. Skoraj vsi kot vir energije izkoriščajo proteinske substrate, le nekateri so zmožni kot edini vir energije izkoriščati ogljikove hidrate. Pri hipertermofilih poznamo dva tipa organotrofnega katabolizma. Rast organizmov pri prvem tipu je odvisna od zunanjih prejemnikov elektronov, kot so žveplo, sulfat, tiosulfat, kisik in nitrat. Pod temi pogoji pride do oksidacije organskih spojin do CO₂, pri tem se skladišči

energija, ki nastaja pri anaerobni ali aerobni respiraciji. Pri drugem tipu pa gre za fermentativni tip katabolizma, kjer nastajajo končni produkti, kot so acetat in druge hlapne organske kisline, laktat, butanol, CO₂ in drugi (Milek, 2005).

2.3 PRILAGODITVE ARHEJ NA ŽIVLJENJE PRI VISOKI TEMPERATURI

Celica, ki se v svoji neposredni okolini sooči z nenadno spremembo, je izpostavljena stresu. Stresni dejavnik je lahko fizikalni (povišanje temperature) ali kemijski (spremembu pH, spremembu slanosti). Celica se odziva na stres z najrazličnejšimi prilagoditvami. Vsaka prilagoditev pa ima svojo mejo in življenje pri visokih temperaturah zahteva drastične spremembe. Tako imajo lipidi arhej to posebnost, da je izoprenoidna veriga vezana z etersko vezjo na glicerol na mestih sn-2,3, medtem ko so pri bakterijah in evkariontih nerazvezjane maščobne kisline vezane na glicerol z estersko vezjo na mestih sn-1,2. Pri večini hipertermofilov je osnovni lipid kaldarheol, ki oblikuje membrano v obliki bipolarega monosloja. To omogoča povečano termostabilnost njihovih membran, saj je takšna membrana bolj rigidna. Kadar pride do ciklizacije znotraj verige, je ta učinek še večji. Liposome, pripravljene iz arhej, so poimenovali arheosomi (Milek, 2005).

Mehanizem, ki omogoča termostabilnost, ni en sam, temveč se prepleta več možnosti. Zaporedje aminokislin se od zaporedja mezofilnih homologov skorajda ne razlikuje, kar dokazuje, da že majhne spremembe veliko vplivajo na termostabilnost. Stabilnost pri posameznih proteinih naj bi bila povezana z večjim številom vodikovih vezi, elektrostatskih interakcij med nabitimi in polarnimi aminokislinskimi ostanki znotraj encima in med njegovimi podenotami, s povečano hidrofobnostjo ipd. Pri mnogih encimih pa je stabilnost odvisna tudi od zunanjih faktorjev okolja kot so koncentracija soli, vezava kofaktorjev, povečan tlak (Vieille in Zeikus, 2001).

Temperatura vpliva tudi na stabilnost nukleinskih kislin, saj je od nje odvisna količina energije, ki je potreba za taljenje dvojne vijačnice DNA. Pri neki določeni temperaturi pa je stabilnost dvojne vijačnice odvisna od deleža GC baznih parov in nadzvitosti vijačnice (Cavicchioli in sod., 2000). Za prokarionte značilna kovalentno povezana dvojna vijačnica krožne DNA naj bi bila že sama v principu stabilnejša od linearne DNA. Posebnost hipertermofilnih prokariontov pa je edinstven tip DNA-topoizomeraze, imenovane reverzna giraza, ki omogoča pozitivno nadzvitje molekule DNA in tako dodatno pripomore k njeni stabilnosti. Namreč, pri veliki večini organizmov je molekula DNA negativno nadzvita. Pri termofilnih arhejah so našli zelo enostavne histone, ki so sicer značilnost evkariotskega genoma, ki naj bi znatno povišali temperaturo taljenja DNA. Na slednje naj bi vplivala tudi koncentracija soli (Terpinc, 2006).

2.4 ENCIMI HIPERTERMOFILOV (TERMOCIMI)

Velik biotehniški potencial ponujajo toplotno odporni encimi, ki služijo kot edinstven model za razumevanje stabilnosti proteinov. Encimi hipertermofilov so termostabilni in

termoaktivni, kažejo pa tudi veliko odportnost proti proteolitični razgradnji, denaturaciji z organskimi topili in detergenti, ter veliko obstojnost pri ekstremnih pH. Pri mnogih predstavnikih hipertermofilnih arhej je bila ugotovljena znotrajcelična in tudi zunajcelična proteazna aktivnost. Proteaze so tudi komercialno zanimivi encimi, v svetu jih proizvedejo več kot katerekoli druge skupine encimov, obstaja tudi veliko zanimanje za odkrivanje novih hipertermofilnih proteaz, ki bi bile uporabne za biotehnološke namene (Niehaus in sod., 1999). Toplotno stabilne proteinaze z optimalno aktivnostjo med 85 °C in 115 °C so izolirali iz hipertermofilnih rodov arhej *Desulfurococcus*, *Sulfolobus*, *Staphylothermus*, *Thermococcus* in *Pyrococcus*. Iz *A. pernix* so izolirali intracelularno serinsko proteinazo s temperaturnim optimumom pri 90 °C in stabilnostjo do 110 °C (Chavez Crocker in sod., 1999). V okolje pa izloča ekstracelularno metaloproteinazo aeropirolizin, ki je ena od temperaturno najbolj obstojnih proteinaz, ki je daljši čas stabilna tudi pri temperaturi 125 °C (Sako in sod., 1997).

Za ekstracelularne proteine velja, da so temperaturno precej bolj stabilni od intracelularnih, lahko tudi do 20 °C nad maksimalno temperaturo rasti in zato tehnološko zelo zanimivi (Vieille in Zeikus, 2001). Analiza genoma *A. pernix* je razkrila, da ima kar 30 % proteinov signalne sekvence za translokacijo skozi celično membrano, med temi pa je verjetno nekaj takih s proteinazno aktivnostjo. Poleg proteinaz so zanimivi tudi preostali encimi hipertermofilnih arhej s potencialom v biotehnoloških aplikacijah: alkohol-dehidrogenaze, esteraze, glikozil-hidrolaze, DNA-polimeraze (Yamazaki in sod., 2006; Kawarabayasi in sod., 1999).

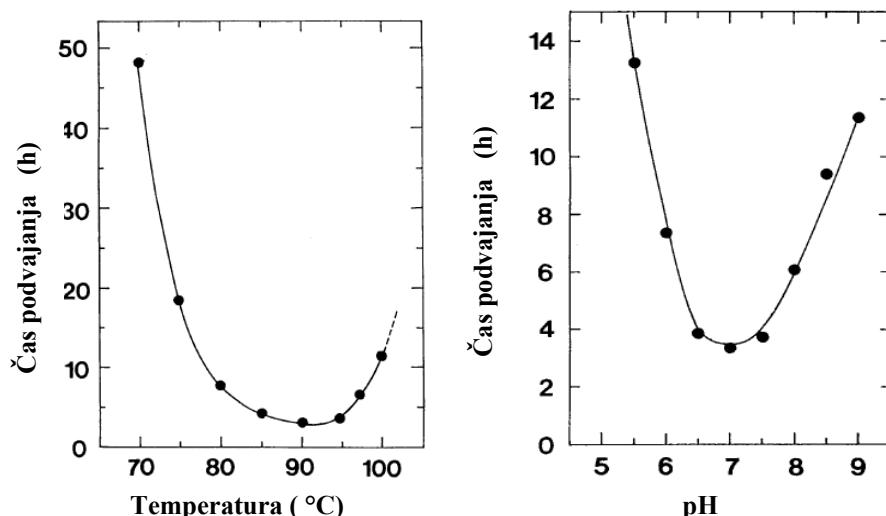
2.5 GOJENJE HIPERTERMOFILOV

Odkrivanje in spoznavanje najrazličnejših vrst hipertermofilnih arhej je vodilo raziskave v smer optimiziranja rasti in rastnih pogojev za gojenje *in vitro*, z namenom pridobivanja čim večje količine biomase, termostabilnih encimov in biokemičnih sestavin za uporabo v proizvodnji (Kim in Lee, 2003).

Visoka temperatura, ki je potrebna za rast, predstavlja vir težav pri gojenju hipertermofilov *in vitro*. Klasična želirna sredstva (agar) za pripravo trdnih gojišč niso primerna, prav tako ni mogoča uporaba plastičnih petrijevk, ker je povečano izhlapevanje, manjša je topnost plinov, pod vplivom visokih temperatur se sestavine rastnih medijev lahko spremenijo in delujejo zaviralno na mikroorganizem (Milek, 2005). Raziskave kažejo, da visoka temperatura povzroči kemijske spremembe rastnega medija, to pa je tudi eden glavnih razlogov za omejeno rast hipertermofilov *in vitro*. Ekstremofilni mikroorganizmi, zlasti hipertermofili, imajo nizko gostoto celic, da to izboljšamo pa je potrebna optimizacija rasti (Milek in sod., 2005).

Kim in Lee (2003) sta raziskovala vpliv sladkorjev, aminokislin in nukleotidnih baz na rast *A. pernix*. Poročata, da je rast *A. pernix* inhibirana s produkti Maillardove reakcije, ki so posledica dodanega kvasnega ekstrakta v gojišče, le-ta pa lahko vsebuje trehalozo. Nadalje poročata, da je za rast *A. pernix* bistvena baza adenin in šest aminokislin: Arg, Ile, Leu,

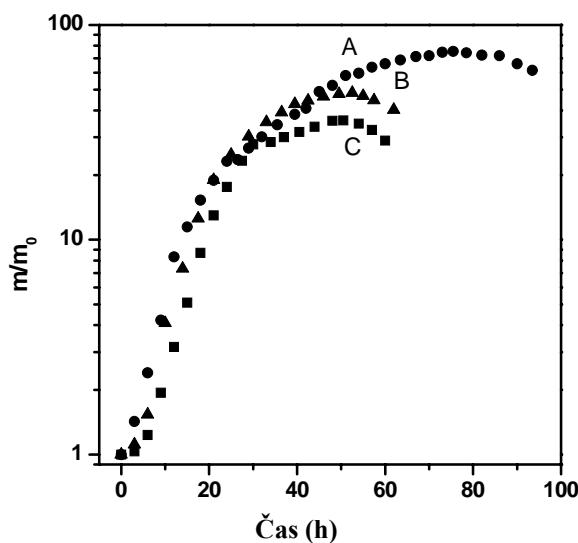
Lys, Met, Val. Ob odkritju arheje *A. pernix* (Sako in sod., 1996) so ugotovili, da le-ta za rast potrebuje kompleksna proteinska gojišča kot so kvasni ekstrakt, triptikazni pepton, tripton ali goveja juha. Rast so spodbudili z dodatkom tiosulfata, vendar tiosulfat za rast ni obvezen.



Slika 3 (levo): Optimalna temperatura rasti *A. pernix*, podvojevalni čas (»doubling time«) je bil izračunan iz naklona rastne krivulje (Sako in sod., 1996)

Slika 4 (desno): Vpliv različnih pH vrednosti na rast *A. pernix*, podvojevalni čas je opisan pri sliki 3 (Sako in sod., 1996)

Vpliv pH vrednosti medija na rast *A. pernix* so raziskovali Milek in sodelavci (2005). Opazili so, da je rast najhitrejša ($\mu = 0,17 \text{ h}^{-1}$) v začetni fazni gojenja pri pH 7, pri pH 8 je bila specifična hitrost rasti $0,13 \text{ h}^{-1}$, pri pH 6 pa $0,09 \text{ h}^{-1}$. Maksimalna koncentracija biomase je bila v primeru pH 7 in pH 8 dosežena po približno 70 urah in je znašala $0,46 \text{ g suhe mase/L}$. Pri pH 6 je maksimalna koncentracija biomase znašala $0,30 \text{ g suhe mase/L}$, dosežena pa je bila po 90 urah gojenja. Hipertermofilna arheja *A. pernix* ni bila zmožna rasti v gojišču s pH 5. Raziskovali so tudi vpliv vira morske vode (slika 5) in sicer tako, da so gojili organizem v naravnih morskih vodih, umetnih morskih vodih in gojišču Marine broth 2216 (Difco™, Becton, Dickinson in Co., Sparks). V začetnih 15 urah gojenja so največjo specifično hitrost rasti ugotovili v gojišču Marine broth ($\mu = 0,17 \text{ h}^{-1}$). Maksimalna koncentracija biomase v primeru obeh morskih vod je bila dosežena po 40 urah gojenja, v primeru gojišča Marine broth pa po 70 urni kultivaciji. S primerjavo rezultatov je bilo ugotovljeno, da je za gojenje *A. pernix in vitro* najprimernejše gojišče Marine broth (Milek in sod., 2005).

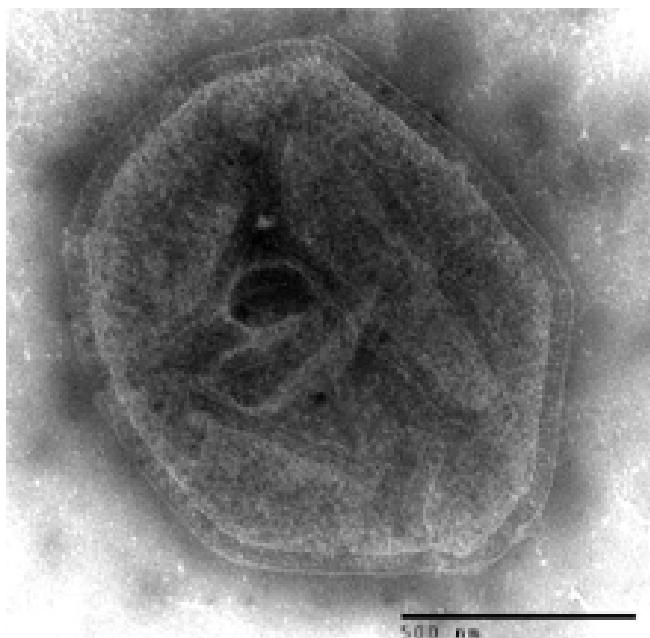


Slika 5: Rastne krivulje pri gojenju *A. pernix* pri 92 °C v medijih z različnimi viri morske vode: A-gojišče Marine broth 2216, B-naravna morska voda, C-umetna morska voda; normalizirane glede na začetno koncentracijo biomase (m/m_0) (Milek in sod., 2005)

2.6 *Aeropyrum pernix*

Večina biotopov, iz katerih so izolirali večino hipertermofilne arheje, je anoksičnih zaradi majhne topnosti kisika pri visokih temperaturah in prisotnost reducirajočih plinov. Tako je večina hipertermofilnih arhej anaerobnih.

Arheja *Aeropyrum pernix* (slika 6) je bila prvič opisana leta 1996 (Sako in sod., 1996) kot prva nevtrofilna, striktno aerobna hipertermofilna arheja, ki spada v kraljestvo Crenarchaeota. Izolirali so jo leta 1993 iz morske vode v priobalnem termalnem »solfatara« vrelcu na Japonskem raziskovalci iz skupine Y. Sako (Univerza v Kyotu, Japonska). Celica je sferične oblike in v premeru velika 0,8-1,0 µm. *Aeropyrum pernix* optimalno raste pri temperaturi med 90 in 95 °C, pH vrednost okoli 7 in 3,5 % slanosti.



Slika 6: Arheja *Aeropyrum pernix* (Yamaguchi, 2002)

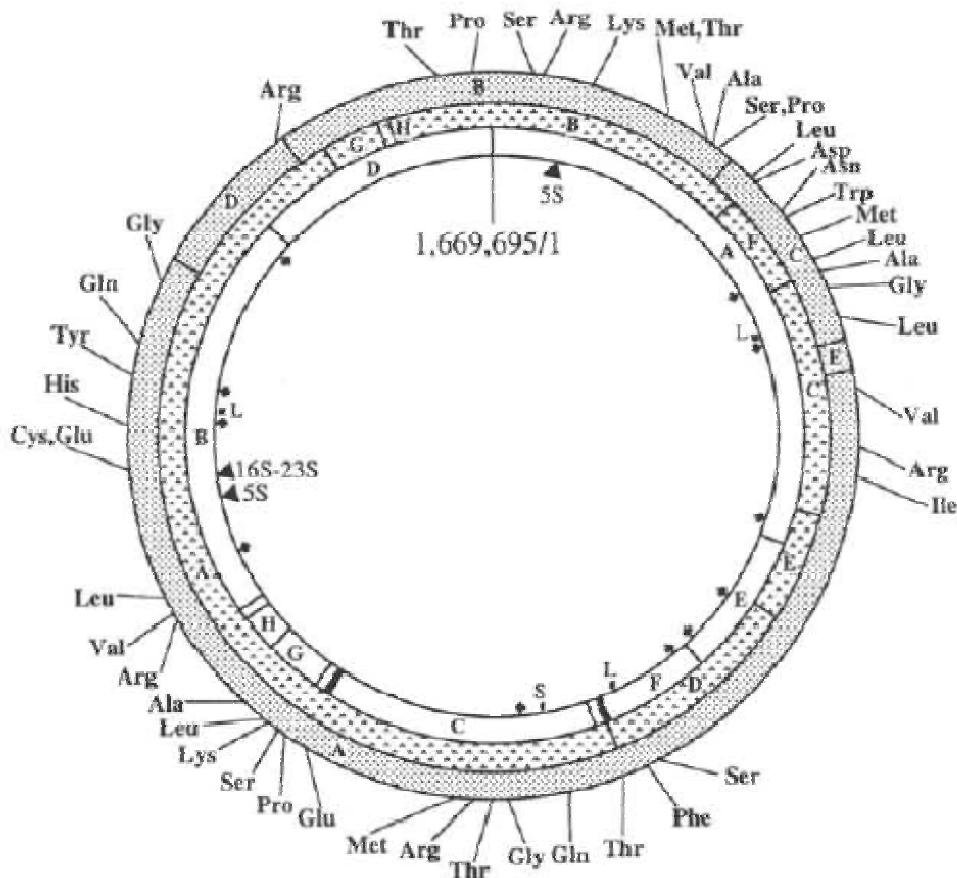
Podvojevalni čas v optimalnih pogojih je relativno kratek in znaša 200 min. Med aerobno rastjo kot substrate izkorišča različne kompleksne proteinske spojine. Tiosulfat omogoča rast brez tvorbe plina H_2S (Sako in sod., 1996). V primeru prisotnosti reducirajočih ogljikovih hidratov in triptona je rast *A. pernix* močno inhibirana.

A. pernix se razlikuje od mnogih hipertermofilov po tem, da za membrano nima bipolarnega monosloja temveč dvosloj, katerem je osnovni lipid predvsem sesterterpanilarheol (na glicerol etersko vezana C₂₅-C₂₅). Polarne lipide v 91 oziroma 9 % predstavljata C₂₅-C₂₅-arhetidil(glukozil)inozitol oziroma C₂₅-C₂₅-arhetidilinozitol (Adamlje, 2005).

V zadnjih nekaj letih so pri *A. pernix* odkrili in karakterizirali mnogo zanimivih encimov, kot na primer alkohol-dehidrogenazo, ADP-odvisno DNA-ligazo, ATP-odvisno glukokinazo, proteinaze in druge. Gene za večino teh encimov so tudi uspešno klonirali in izrazili v mezofilnih gostiteljih, največkrat v bakteriji *E. coli* (Milek, 2005).

2.6.1 Genom *A. pernix*

Kot prvemu predstavniku kraljestva Crenarchaeota so celotno sekvenco genoma *A. pernix* objavili leta 1999 (Kawarabayasi in sod., 1999). Celotna sekvenca genoma *A. pernix* vsebuje 1669695 bp, kar je več kot polovica manj od genoma bakterije *E.coli*.

Slika 7: Genom *A.pernix* K1 (Kawarabayasi in sod. 1999)

Pri preučevanju metaboličnih poti, ki *A. pernix* omogočajo aeroben način življenja, so znanstveniki pogrešali gen, ki kodira α -ketoglutarat-dehidrogenazo, ki sodeluje pri Krebsovem ciklu. Našli pa so gene, ki kodirajo dve podenoti feredoksin-oksidoreduktaze, ki ima enako funkcijo kot prej omenjeni encim. Prav tako so našli tudi ostale gene, ki so pomembni za dihalno verigo, vključno s superoksid-dismutazo, ki je prisotna pri vseh aerobnih organizmih. Odkrili so tudi, da genomu *A. pernix* manjka več genov, in sicer manjkajo:

- tisti geni, ki kodirajo homologe histonov; te so našli tako pri evkariontih kot pri predstavnikih kraljestva Euryarchaeotes,
- geni, ki bi bili homologni genom prokariotske celične delitve *ftsZ* in *minD*.

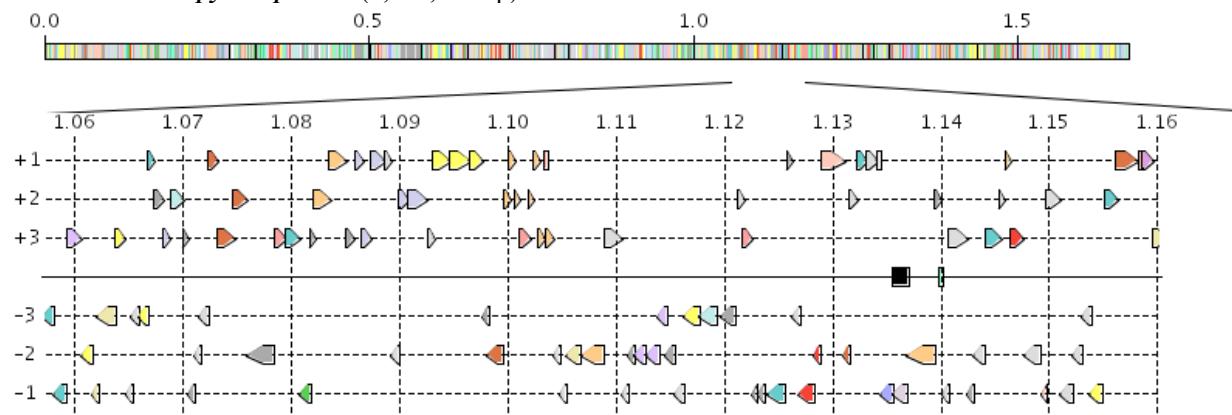
Aeropyrum je bil tudi prvi mikrob z znanim zaporedjem, ki mu je manjkal gen *ftsZ*, ki so ga so takrat našli pri vseh prosto živečih bakterijah in arhejah (MicrobeWiki, 2004).

Sekvence genoma je bila določena z uporabo treh različnih restriktijskih encimov, imenovanih *Pac* I, *Sgf* I in *Swa* I. Dobljene fragmente, dolžine 1 kb in 2 kb, so izolirali in jih klonirali v vektor UC118. Nukleotidno sekvencioniranje je potekalo z metodo »shotgun« kloniranja, potrditev nukleotidne sekvene pa so opravili z uporabo PCR začetnih nukleotidov.

Od skupno 2694 restriktijskih mest (ORF-mesta) je bilo ugotovljeno 23,5 % genov z domnevno funkcijo, 19,4 % sekvenč je registriranih, vendar ni poznane funkcije. Ostalih 57,1 % ne pokaže podobnosti s poznanimi sekvenčami. RNA geni določajo enojno 16S-23S rRNA, dva 5S rRNA gena in 47 tRNA genov, ki vključujejo 14 genov z intronsko strukturo. Vsa določena ORF-mesta in RNA kodirajoče regije predstavljajo 89,12 % celotne dolžine genoma. Vsebnost dušikovih baz v genomu: 21,6 % adenina, 28,4 % citozina, 28,0 % gvanina in 22,1 % timina (Kawarabayasi in sod., 1999; Yamazaki in sod., 2006).

Preglednica 1: Lastnosti genoma *A. pernix* (DOGAN, 2002)

Velikost genoma:	1669696 bp
Vsebnost G+C:	56,3 %
Število restriktijskih mest (ORF):	1700
Kodirajoča območja:	88,8 %
5S, 16S in 23S rRNA geni:	samo 1
srp RNA geni:	1
tRNA geni:	47
Ponavljanje sekvenč:	15

Kromosom *Aeropyrum pernix* (1,669,696 bp)

Legenda:

	Metabolizem
	Genetski procesi
	Izmenjava informacij med okoljem in celico
	Celični procesi
	Ostale funkcije
	Neuvrščeni
	rRNA
	tRNA
	Ponovitev

Slika 8: Kromosom *A. pernix* v obliki barvnih znakov, ki prikazujejo funkcije genov (DOGAN, 2002)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI IN OPREMA

3.1.1 Materiali

Za eksperimentalno delo smo uporabili naslednje materiale:

- 20 mmol/L pufer HEPES, N-[2-hidroksietil]piperazin-N'-[2-etan-sulfonska kislina] (Sigma)
- 20 mmol/L pufer MES, 2-morfolinoetansulfonska kislina (Sigma-Aldrich)
- akrilamid/bisakrilamid (30 % / 0,8 %) (Sigma-Aldrich)
- amonijev persulfat; APS (Sigma)
- barvilo Simply Blue Safe Stain (Invitrogen)
- bidestilirana voda (ddH₂O)
- borna kislina (Merck)
- Bradfordov reagent Protein assay (Bio Rad)
- bromfenol modro (Merck)
- BSA, goveji serumski albumin (Sigma)
- CHAPS, 3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonat (Sigma)
- destilirana voda (dH₂O)
- ditiotreitol, DTT (Sigma-Aldrich)
- etanol (Merck)
- etilendiaminotetraocetna kislina; EDTA (Kemika)
- fenilmethylsulfonyl fluorid, PMSF (Sigma-Aldrich)
- glicerol (Sigma-Aldrich)
- glicin (Merck)
- IPG pufer, imobiliziran pH gradient 3 - 10 (Bio Rad)
- jodacetamid, JAA (Sigma Ultra)
- kvasni ekstrakt (Difco, Becton, Dickinson & Co.)
- metanol (Merck)
- mikroorganizem: hipertermofilna arheja *Aeropyrum pernix* K1 – JCM 9820 iz japonske zbirke mikroorganizmov (Japan Collection of Microorganisms)
- mineralno olje (Sigma-Aldrich)
- natrijev dihidrogenfosfat, NaH₂PO₄ (Kemika)
- natrijev dodecilsulfat; NaDS (Sigma-Aldrich)
- natrijev hidrogenfosfat, Na₂HPO₄ (Kemika)
- natrijev klorid, NaCl (Merck)
- natrijev tiosulfat pentahidrat, Na₂S₂O₃ x 5H₂O (Merck)
- ocetna kislina (Merck)
- pepton (Becton, Dictkinson & Co.)
- proteinski standard Bench Mark (Invitrogen)

- sol za akvarijske ribice: Reef salt (AZOO)
- TEMED, N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin (Sigma)
- tiourea (Riedel)
- tris (hidroksimetil)-aminometan; Tris baza (Merck)
- urea (Sigma-Aldrich)

3.1.2 Pribor in oprema

Aparature:

- avtoklav (Sutjeska)
- avtomatske pipete (Eppendorf)
- centrifuga 5415 (Eppendorf)
- centrifuga Rotanta 460R (Hettich)
- GBOX : HR (Syngene)
- hladilnik (LHT Škofja Loka)
- kadička za NaDS PAGE Mini Protean (Bio Rad)
- magnetni mešalnik IKA WERKE RCT basic
- magnetni mešalnik MM510 (Tehnica Železniki)
- mešalnik Vibromix 104EV (Tehnica Železniki)
- mikrovalovna pečica Candy
- pH meter MA5705 (Iskra)
- spektrofotometer (TECAN)
- stresalna miza (Biometra)
- tehnicka AT201 (Mettler Toledo)
- tehnicka EXACTA 2200EB (Tehnica Železniki)
- ultrafiltracijska celica 8200 (Amicon)
- ultrazvočna kopel (Bandelin)
- usmernik Power Pac 1000 (Bio Rad)
- zamrzovalnik (-80 °C) (Heto)

Steklovina (različni proizvajalci):

- centrifugirke
- čaše
- erlenmajerice
- komplet za filtracijo z vakuumom
- lijak
- merilni valji
- pipete

Plastični material:

- 7 cm trakovi z imobiliziranim pH gradientom 3-6 (Bio Rad)
- dializno črevo, premer 7 mm (Serva)
- nastavki za avtomatske pipete (Eppendorf)
- polipropilenske epruvete po Eppendorfu (Eppendorf)
- prozorna mikrotiterska plošča (Costar)

Ostalo:

- aluminijasta folija
- magnetno mešalo
- membrana MWCO 10 kDa (Millipore AMICON YM10)
- membranski filter MR, pore velikosti 0,45 µm in 0,20 µm (Sartorius)
- parafilm
- plin N₂ (Messer, Ruše)

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje arheje *Aeropyrum pernix*

Aeropyrum pernix je hipertermofilna arheja, ki smo jo gojili v tekočem gojišču z umetno morsko vodo, pripravljeno s soljo za akvarijske ribice in dodatku tripton-peptona ter natrijevega tiosulfata pri različnih pH vrednostih: 6,0; 7,0; 8,0 in 9,0. Sol za akvarijske ribice (Reef salt, AZOO) posnema sestavo morske vode in vsebuje soli, ki so vir ogljika in dušika. Gojenje je potekalo v zaprtem sistemu z enkratnim polnjenjem v steklenici (med potekom gojenja nismo dodajali sestavin niti jih nismo odvzemali). Da smo omogočili potek aerobnega bioprosesa smo skonstruirali sistem s kontrolo temperature, prezračevanjem in mešanjem (Priloga A).

Gojenje *A. pernix* je potekalo v paralelki za vsako vrednost pH.

3.2.1.1 Eksperimentalni del

Priprava gojišča: za gojenje *Aeropyrum pernix* smo uporabljali tekoče gojišče z umetno morsko vodo. Gojišče smo pripravili tako, da smo v 1000 mL filtrno steklenico z debelo steno zatehtali spojine, ki so podane v preglednici 2. Posamezne komponente smo raztopili in dopolnili z destilirano vodo do 0,72 L in dobro premešali. pH vrednost rastnega medija smo uravnali na pH metru z dodatkom 4 mol/L NaOH ali 1 mol/L HCl in tako pripravljeno gojišče avtoklavirali 20 min pri 121 °C.

Preglednica 2 : Spojine, potrebne za pripravo gojišča

	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
sol za akvarijske ribice Reef salt	24,48 g	24,48 g	24,48 g	24,48 g
pepton	3,60 g	3,60 g	3,60 g	3,60 g
kvasni ekstrakt	0,72 g	0,72 g	0,72 g	0,72 g
natrijev pentahidrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$)	0,72 g	0,72 g	0,72 g	0,72 g
pufer HEPES, končna konc. 20 mmol/L	/	3,43 g	3,43 g	/
pufer MES, končna konc. 20 mmol/L	2,88 g	/	/	/
boratni pufer, končna konc. 20 mmol/L	/	/	/	28,8 mL
destilirana voda	0,72 L	0,72 L	0,72 L	0,72 L

Gojenje: aseptično smo v gojišče inokulirali 80 g čiste kulture *A. pernix* (pH 7, hranjeno v hladilniku). Gojenje je potekalo na magnetnem mešalniku z grelno ploščo. Mešanje je bilo nastavljeno na 700 min^{-1} , temperatura na 92°C in uravnavana preko senzorja, potopljenega v gojišču. Prezračevanje smo omogočili z dovajanjem zraka preko $0,45 \mu\text{m}$ filtra ob pretoku okoli $0,5 \text{ L/min}$ v gojišče preko frite s poroznostjo $25-50 \mu\text{m}$, potopljene 2-3 mm nad magnetnim mešalom. Izhlapevanje vode smo preprečili z Liebigovim hladilnikom, pritrjenim na odprtini za izhod zraka.

Po 40 urah kultivacijo hipertermofilne arheje *A. pernix* prekinemo. V tem času celice *A. pernix* dosežejo pozno eksponentno fazo rasti, optična gostota znaša približno 1,0, kar ustreza $1,4 \times 10^9 \text{ celic/mL}$. Celotno brozgo smo prelimi v štiri plastične centrifugirke in centrifugirali 12 min pri 10000 rpm in velikosti rotorja 14 JA.

Supernatantu smo dodali 1 mL 0,1 mol/L raztopine EDTA in 1 mL 0,1 mol/L raztopine PMSF ter ga čez noč shranili v hladilniku pri 4°C .

Priprava 0,1 mol/L raztopine PMSF pufra:

87,1 mg PMSF

5 mL 100 % etanol

PMSF raztopimo v etanolu, alikvotiramo 1 mL raztopine v epice in zamrznemo na -20°C .

Priprava 0,1 mol/L raztopine EDTA:

372,2 mg EDTA

dH₂O do 10 mL

Raztopino hranimo v hladilniku.

3.2.2 Ultrafiltracija rastnega medija

Ultrafiltracijo uvrščamo med membranske separacijske procese, njena »gonilna sila« je tlačna razlika, ki povzroči fluks permeata skozi membrano. V tem procesu koncentriramo ekstracellularne proteine na osnovi velikosti delcev. Enostavne molekule prehajajo skozi membrano, večje (proteini) pa ostanejo na površini membrane.

Uporabljena ultrafiltracijska celica ima volumen 180 mL, uporabili smo alikvote filtrata 120-140 mL ter membrano MWCO 10 kDa, ki smo jo pred prvo uporabo rehidrirali v 10

% raztopini alkohola nato pa jo med posameznimi uporabami hranili v 10 % raztopini etanola na 4 °C. Ultrafiltracijo smo izvajali v tehnološkem laboratoriju pri temperaturi 4 °C.

3.2.2.1 Eksperimentalni del

Priprava 1 × PBS pufra:

50 mL 3 mol/L raztopine NaCl

20 mL 0,435 mol/L raztopine Na₂HPO₄ + 0,08045 mol/L raztopine NaH₂PO₄

dodamo dH₂O do 1000 mL

Pufer hranimo v hladilniku na 4 °C.

Priprava 0,2 mol/L raztopine PMSF pufra:

174,2 mg PMSF

5 mL 100 % etanol

PMSF smo raztopili v etanolu, alikvotirali 1 mL v epice in shranili na -20 °C.

Filtracija: 600 mL supernatanta smo filtrirali s pomočjo kompleta za filtracijo z vakuumom (»nuča«), ki je priključen na vodni vir, le ta ustvarja podtlak, zaradi katerega potuje medij skozi membranski filter. Uporabili smo membranska filtra dveh velikosti: 0,45 µm in 0,20 µm.

Ultrafiltracija: pred uporabo smo ultrafiltracijsko membrano spirali z destilirano vodo ter jo vstavili z bleščečo stranjo navzgor v ultrafiltracijsko celico. Sestavili smo telo celice in dodali alikvot 140 mL filtrata nato smo celico zaprli in vključili mešanje. Previdno smo priključili celico na vir plina (tlak 2 bara). Plin N₂ ustvarja v celici tlačno razliko, zaradi katere manjši delci potujejo skozi membrano, večji delci (zunajcelični proteini) pa se na membrani koncentrirajo. Postopek smo ponavljali, dokler nismo ultrafiltrirali 600 mL filtrata.

Z ultrafiltracijo smo prenehali, ko je bilo v ultrafiltracijski celici nad membrano še približno 1 mL filtrata (koncentrat). Odstranili smo vir dušika, koncentratu mad membrano v celici pa smo dodali 1 mL 1 × PBS. Po 45 min mešanja smo ponovno dodali 1 mL 1 × PBS in počakali še 45 min (vključeno mešanje). V tem času so proteini desorbirali iz membrane v raztopino koncentrata in pufra. S pomočjo mikropipete smo prenesli koncentrat proteinov v sterilno polipropilensko epruveto in dodali ustrezni volumen 0,2 mol/L raztopine PMSF, da je bila koncentracija raztopine PMSF v koncentriranem vzorcu 5 mmol/L. Koncentrat smo zamrznili pri -20 °C do naslednje uporabe.

3.2.3 Čiščenje vzorca z dializo

Med dializo majhne molekule difundirajo skozi selektivno prepustno membrano in se tako ločijo od velikih molekul. Dializa se uporablja za izmenjavo soli oz. pufra v vzorcu, ki vsebuje makromolekule. Vzorec namestimo v membrano, zapremo in potopimo v izbrani pufer. Gonilna sila dialize je razlika v koncentraciji topljencev na obeh straneh, zato pride do izenačenja koncentracije topljencev med vzorcem in dializatom (Vrhovnik, 2007).

3.2.3.1 Eksperimentalni del

Odrezali smo približno 15 cm dolge dializne cevi, premera 7 mm (hranjena v hladilniku v zaprti vrečki in v raztopini) in jo namočili v dH₂O, s katero smo izprali tudi notranjost cevi. V cev smo previdno odpipetirali koncentriran vzorec proteinov ter cev neprepustno zaprli na obeh koncih. Napolnjeno cev smo postavili v veliko čašo z 0,50 L 1 × PBS pufera. Volumen pufera je bil približno 100-krat večji od volumna vzorcev. Čašo smo prekrili s parafilmom. Pazili smo, da cev ni bila prepognjena ali zavita in da jo mešalo ni zadevalo. Po štirih urah dializiranja smo pufer zamenjali s sveže pripravljenim. Dializa je potekala pri stalnem mešanju in pri 4 °C.

Z dializo smo prenehali po 16 urah. Vzorec iz dializne cevi smo prenesli v 2 epici in 2 min centrifugirali na 10000 obr/min. Supernatant smo prenesli v novo epico in ga shranili na -20 °C.

3.2.4 Koncentriranje vzorcev s centrifugiranjem v Eppendorf centrifugirkah z membrano

S pipeto smo dodali 500 µL vzorca na membrano v Eppendorf-centrifugirki z membrano in centrifugirali 15 min pri 12000 obr/min nato pa odlili filtrat. Postopek smo ponavljali, dokler nismo centrifugirali celoten volumen vzorca (5 mL). Na membrani so ostali proteini, zato smo membrano s proteini obrnjeno prenesli v čisto centrifugirko. Na zgornji del membrane smo dodali 400 µL mešanice pufrov 1 × PBS in 5 mmol/L raztopine PMSF ter centrifugirali 10 min pri 3000 obr/min. Pri tem se proteini desorbirajo iz membrane v vzorec, ki smo ga shranili na -20 °C do naslednje uporabe.

3.2.5 Določanje koncentracije proteinov

Za določanje koncentracije proteinov smo uporabili metodo po Bradfordu (1976). Metoda temelji na vezavi barvila Comassie brilliant blue G-250 na protein. Pri tem se rjava barva barvila spremeni v modro, absorpcijski maksimum barvila pa se spremeni iz 465 na 595 nm. Barvilo se veže na protein zelo hitro (približno 2 minut), kompleks protein-barvilo pa je stabilen približno 1 uro.

3.2.5.1 Eksperimentalni del

Za umeritveno krivuljo (Priloga B) smo kot standard uporabili goveji serumski albumin (BSA) s koncentracijo 2 mg/mL. Odpipetirali smo 50 µL ustreznega razredčenega BSA in sicer tako, da so koncentracije BSA v kivetih znašale: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/mL. Tako pripravljenim standardnim raztopinam smo dodali 5 mL Bradfordovega reagenta ($5\times$ redčen koncentrat z bidestilirano vodo), premešali in počakali 5 minut. Nato smo odpipetirali 200 µL premešane raztopine v mikrotitersko ploščo in pomerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Iz izmerjenih absorbanc in znanih koncentracij standardnih raztopin smo narisali umeritveno krivuljo, iz katere smo kasneje odčitali koncentracije proteinov.

Za analizo smo z vzorcem postopali kot pri umeritveni krivulji. Pri slepem vzorcu pa smo namesto vzorca proteinov uporabili mešanico pufrov 1 × PBS in 5 mmol/L raztopine PMSF.

3.2.6 Dvo-dimenzionalna elektroforeza

Pri tej tehniki proteine ločujemo v dveh dimenzijah (2-D). Ločba v prvi dimenziji poteka v gelu z immobiliziranim pH gradientom, proteini se ločijo zaradi različnega naboja, ki ga nosijo. Nabolj je odvisen od števila kislih in bazičnih preostankov v proteinu. Nabiti proteini potujejo po gradientu do točke, kjer je njihov neto nabolj enak nič. To točko imenujemo tudi izoelektrična točka (pI), zaradi tega pa to tehniko imenujemo izoelektrično fokusiranje (IEF) (Sigma-Aldrich, 2003). Proteini ločeni z IEF se v drugi dimenziji ločijo še na osnovi velikosti s klasično NaDS-elektroforezo. Ta tehnika je zelo uporabna, ker omogoča tako ločevanje proteinov z identičnimi molekulskimi masami, ki se razlikujejo v izoelektrični točki, kot tudi proteinov s podobnimi izoelektričnimi točkami a z različnimi molekulskimi masami (Boyer, 2005).

S kombinacijo dveh dimenzij je omogočena visoka ločljivost proteinov in analiza razlik v sintezi proteinov v proteomskej študijah, preverjanje čistosti proteinov med izolacijo ter simultana ločitev tudi do 1000 proteinov v enem vzorcu.

2-D elektroforezo smo izvedli po metodi, ki jo je postavil O'Farrel (1975) z modifikacijo 1. dimenzije, ki vključuje uporabo komercialnih trakov z immobiliziranim pH gradientom (Görg, 1991).

3.2.6.1 1. dimenzija

1. dimenzija obsega več korakov:

- rehidracija trakov in nanos vzorcev
- izoelektrično fokusiranje

Rehidracija trakov

Uporabljali smo 7 cm trakove z imobiliziranim pH gradientom 3-6 (Bio Rad). Pred uporabo smo jih hranili na -20 °C. Za rehidracijo smo uporabili podstavek z režami in pokrovom, ki smo ga uravnali v ravnotežni položaj. V režo smo odpipetirali 124 µL raztopine za rehidracijo trakov (Preglednica 3), ki je vsebovala vzorec ($m_{proteinov} = 75 \mu g$). Zaščitno plastično folijo smo odstranili z anodnega konca traku in trak previdno, brez tvorbe mehurčkov, položili z gelom navzdol v režo ter prelili s 3 mL mineralnega olja. Podstavek smo prekrili s pokrovom in pustili čez noč na sobni temperaturi, da je potekala rehidracija.

Priprava raztopine za rehidracijo trakov:

Preglednica 3 : Sestava raztopine za rehidracijo trakov

Spojina	Količina	Končna koncentracija
urea	2,102 g	7 mol/L
tiourea	0,7608 g	2 mol/L
CHAPS	200 mg	2 % (w/v)
IPG pufer pH 3-10	500 µL	2 % (w/v)
*DTT	5 mg	65 mmol/L
dodamo ddH ₂ O do 5 mL		

*DTT dodamo neposredno pred uporabo

Pripravili smo raztopino in jo shranili v alikvotih po 500 µL na -20 °C. Neposredno pred uporabo smo v alikvot zatehtali in raztopili DTT.

Izoelektrično fokusiranje (IEF)

Po končani rehidraciji smo trakove narahlo sprali z bidestilirano vodo in jih z gelom navzgor osušili na filter papirju. Na ploščo, ki med potekom izolektričnega fokusiranja zagotavlja konstantno temperaturo 20 °C, smo nanesli 4 mL mineralnega olja in čezenj počasi postavili steklen podstavek z elektrodnimi priključki. Anodni priključek je bil nameščen na vrhu plošče. V podstavek smo nalili 10 mL mineralnega olja in čezenj položili plastično ploščo z vdolbinami, v katere smo položili trakove z gelom navzgor in s pozitivnim koncem na zgornjem delu plošče. Nato smo dva enako dolga elektrodna trakova namočili v bidestilirani vodi in ju osušili na filter papirju. Elektrodna trakova smo položili pravokotno na konce trakov in čez njiju namestili elektrodi. Trakove smo prelili s približno 150 mL mineralnega olja.

Pogoji izolektričnega fokusiranja pri 20 °C, način »gradient«:

1. faza	200 V	1 min
2. faza	3500 V	1 h 30 min
3. faza	3500 V	1 h 30 min

Po končanem IEF smo trakove shranili v plastični mapi pri temperaturi -80 °C do izvedbe 2. dimenzije.

3.2.6.2. 2. dimenzija

2. dimenzija obsega več korakov:

- vlitje gelov
- uravnoteženje trakov
- prenos trakov na ločilni gel
- NaDS-PAGE

Vlivanje gelov

Med stekleni plošči, ki oblikujeta kalup skupaj z ostalimi sestavnimi deli, smo najprej vili ločilni gel (8 mL za 2 gela) z 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida (Preglednica 4). Na zgornjo površino gela smo z mikropipeto nanesli plast bidestilirane vode, ki gelu preprečuje stik s kisikom in s tem omogoča enakomerno polimerizacijo. Gele smo vlivali 1 dan pred uporabo, pred uporabo smo vodo odlili in površino gela dobro osušili.

Preglednica 4: Priprava ločilnega gela z 12 % zamreženostjo

Št.	Spojina	Količina
1	ddH ₂ O	2,792 mL
2	1,5 mol/L raztopina TRIS HCl, pH 8,8	2,083 mL
3	10 % raztopina NaDS	82,5 µL
4	30 % raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 %, 0,8 %)	3,333 mL
5	10 % raztopina APS	41,68 µL
6	TEMED	4,18 µL

Kemikalije od št. 1 do 4 dodamo najprej in jih razplinimo na ultrazvočni kopeli 15 min, nato dodamo še kemikaliji 5 in 6. Količine ustrezajo za pripravo dveh gelov.

- Raztopine za pripravo ločilnega gela:

Priprava 1,5 M raztopine Tris HCl, pH 8,8:

Tris baza 36,3 g

dodamo 150 mL ddH₂O

uravnamo pH na 8,8 s koncentrirano raztopino HCl

dodamo ddH₂O do 200 mL

Priprava 10 % (w/v) raztopine NaDS:

NaDS 0,15 g

dodamo ddH₂O do 15 mL

Priprava 10 % (w/v) raztopine APS:

APS 0,1 g

dodamo ddH₂O do 1 mL

Uravnoteženje trakov

Trakove smo vzeli iz zmrzovalnika, jih prenesli v epruvete s 5 mL pufra za uravnoteženje I in jih stresali 15 min na stresalni plošči. Iz pufra za uravnoteženje I smo prenesli trakove v

epruvete z 5 mL pufra za uravnoteženje II in jih ponovno stresali 15 min. Pred prenosom na gel smo trakove osušili na filter papirju.

Preglednica 5: Priprava pufra za uravnoteženje-osnovni

Spojina	Količina	Končna koncentracija
1,5 mol/L raztopina Tris HCl, pH 8,8	2,5 mL	75 mmol/L
urea	18 g	6 mol/L
glicerol	15 mL	30 % (w/v)
NaDS	1 g	2 % (w/v)
bromfenol modro	0,001 g	0,001 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 50 mL		

Priprava pufra za uravnoteženje I:

DTT 0,05 g

dodamo pufer za uravnoteženje-osnovni (Preglednica 5) do 5 mL

Priprava pufra za uravnoteženje II:

JAA (jodacetamid) 0,24 g

dodamo pufer za uravnoteženje-osnovni (Preglednica 5) do 5 mL

Prenos trakov na ločilni gel

Na površino ločilnega gela smo odpipetirali agarozno raztopino, ki smo je segreli na 80 °C in takoj, previdno in brez mehurčkov spustili skozi trak, ki se je usedel na površino gela.

Priprava agaroznega gela:

Agaroza 0,5 g

Dodamo 1× NaDS elektroforezni pufer do 100 mL

Raztopino segrejemo v mikrovalovni pečici, da se agaroza raztopi in dodamo 1 kristalček barvila bromfenol modro.

NaDS-PAGE

Za ločevanje proteinov smo uporabljali NaDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo (NaDS-PAGE). NaDS (natrijev dodecilsulfat) je anionski detergent, ki denaturira proteinske molekule, jih odvije in obda s svojimi molekulami. Ker imajo molekule NaDS negativen naboj, imajo tudi vsi z NaDS denaturirani proteini negativen naboj, dolžina njihovega potovanja pa je obratnosorazmerna z njihovo velikostjo. Večje molekule potujejo počasneje od manjših, ker jim nosilec nudi večji upor (Sepčić in sod., 1997)

Priprava 1× NaDS elektroforeznega pufra

Preglednica 6: Sestava 1× NaDS elektroforeznega pufra

Spojina	Količina	Končna koncentracija
Tris baza	3,0 g	25 mmol/L
glicin	14,4 g	192 mmol/L
NaDS	1,0 g	0,1 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 mL		

Ko se je agarozna raztopina strdila, smo kalup namestili v posodi, kjer se nahajata elektrodi. Obe posodi smo napolnili z 1 × NaDS elektroforeznim pufrom (Preglednica 6), ki je bil pred uporabo 1 uro v hladilniku. Potovanje proteinov je potekalo v smeri anode, dokler barvilo bromfenol modro ni doseglo spodnjega roba gela.

Pogoji NaDS -PAGE:
konstantni tok 10 mA/gel
čas = 80 do 90 min

3.2.7. Detekcija proteinov na poliakrilamidnem gelu

Po končani elektroforezi je sledilo barvanje gelov z barvilo Simply Blue Safe Stain (Invitrogen). Koraki barvanja so podani v preglednici 7. Gele smo barvali takoj po končani elektroforezi.

Preglednica 7: Barvanje proteinov s Simply Blue

Korak	Raztopina	Čas
1- izpiranje	50 mL ddH ₂ O	3× 5 min
2- barvanje	75 mL barvilo Simply Blue Safe Stain	60 min
3- razbarvanje	50 mL ddH ₂ O	24 ur

3.2.8. Dokumentiranje gelov in obdelava slik

Gele smo dokumentirali z uporabo sistema za GBOX : HR (Syngene). Stalni parametri pri slikanju so bili: fokus-minimum, zoom kamere-minimum, čas izpostavitev: 50 ms.

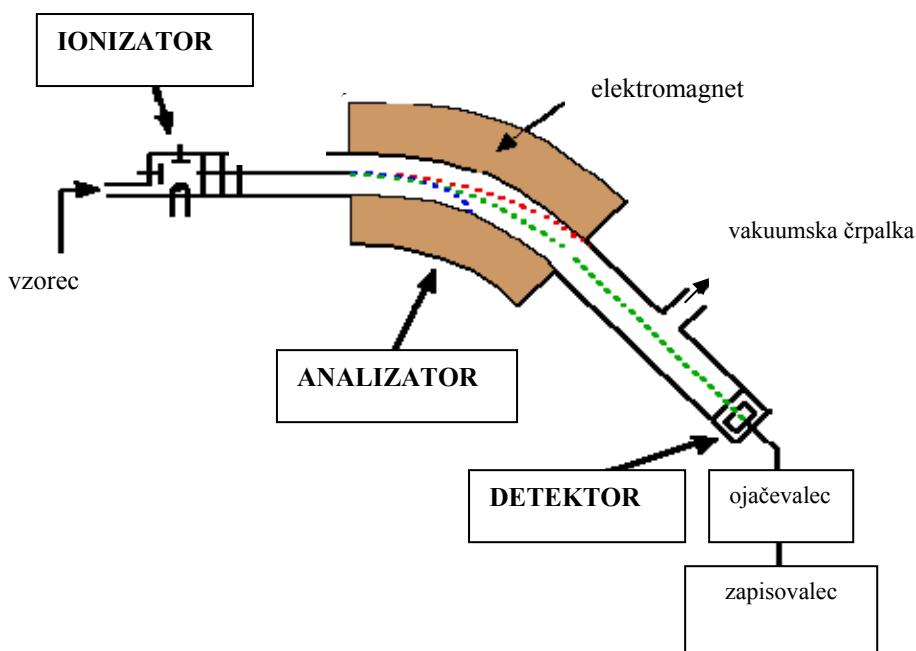
Slike gelov smo obdelali z računalniškim programom 2-D Dymension (Syngene). S tem programom lahko med sabo primerjami več gelov. Enega izmed njih postavimo kot kontrolo (1. gel), na katerega se ostali primerjajo. Program določi točno lego posameznih lis (nih obkroži) in kvantitativno ovrednosti vsako liso na podlagi vrednosti normaliziranega volumna. Sledi ujemanje in primerjava identičnih lis med geli (Cellini in sod., 2004). Skupne lise vseh gelov program obkroži s temno modro obrobo. Tako dobimo preglednico, ki izpiše številke lis, ki predstavljajo isto liso na vseh gelih in njihovo

razmerje normaliziranih volumnov glede na 1. gel (relativne vrednosti). Normaliziran volumen je razmerje med volumnom ene lise glede na celokupen volumen vseh lis na gelu. Vse poravnave proteinskih lis smo preverili z ročnim pregledovanjem slike.

3.2.9. Masna spektrometrija

Po primerjavi proteinskih profilov lahko zanimive proteine identificiramo z masno spektrometrijo (MS). Gre za ločevanje ionov glede na njihov količnik m/z (masa na naboj). Masni spektrometer je po navadi sestavljen iz treh delov – iz ionizatorja, analizatorja in detektorja (slika 9). V ionizatorju delci dobijo naboj, ki povzroči njihov odklon v analizatorju, katerega na koncu zazna detektor. Ena izmed najbolj pogostih metod identifikacije proteinov je prek določanja »prstnega odtisa« peptidnega fragmenta. Proteine hidroliziramo z uporabo proteolitskega encima, kot je tripsin, da dobimo posamezne peptidne fragmente, ki so specifični za vsak protein. Nato določimo maso teh peptidov s pomočjo masne spektrometrije – sistem MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer). Molekulske mase posameznih peptidov nam pomagajo identificirati protein glede na dostopne podatke v bazah in knjižnicah. Če to ni mogoče, lahko dodatno še določimo zaporedje aminokislin v peptidih z drugo vrsto masne spektrometrije (tandemska MS).

Alternativa uporabi 2-D-elektroforeze so različne izvedenke dveh zaporednih tekočinskih kromatografij, ki tako kot 2-D-elektroforeza ločijo proteine glede na dve lastnosti: glede na nanos vzorca na kolono (proteini se ločijo glede na maso) in zatem posamezne frakcije iz prve kromatografije nanesemo še na kolono, ki ločuje glede na naboj. V zadnjem času se razvijajo tudi pristopi direktne analize z masno spektrometrija, t.i. »shotgun proteomics«, pri kateri proteine razgradijo do peptidov, ki jih nato ločijo s kromatografijo in identificirajo z uporabo MS (Baebler, 2008).

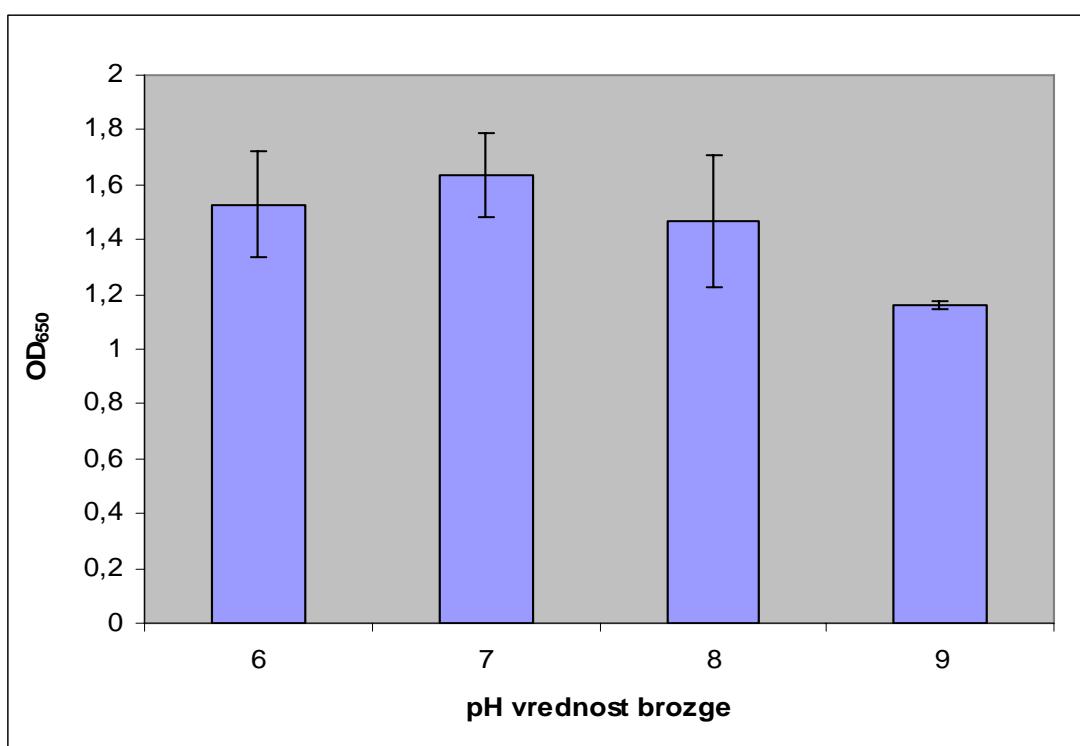


Slika 9: Shema masnega spektrometra (Clark, 2007)

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 GOJENJE ARHEJE *A. pernix*

Rast hipertermofilne arheje *A. pernix* v aerobnem biopresusu z enkratnim polnjenjem v steklenici z mešanjem med potekom kultivacije nismo spremljali, pomerili pa smo optično gostoto po 40 urah, ko smo prenehali z gojenjem. Optična gostota je bila največja pri vrednosti pH 7, malo nižja pri vrednosti pH 6, najnižja pa pri vrednosti pH 9 (slika 10).



Slika 10: Primerjava povprečnih vrednosti optične gostote, pomerjene ob koncu gojenja *A. pernix*

4.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJE ZUNAJCELIČNIH PROTEINOV

Predvidevali smo, da so koncentracije zunajceličnih proteinov v vzorcih majhne, zato smo predhodno vzorce koncentrirali s pomočjo Eppendorf centrifugirk z membrano. Končni volumen vzorca pri posamezni pH vrednosti sta združena volumna paralelnih volumnov pri kultivaciji pri posamezni pH vrednosti.

Koncentracijo proteinov smo določili z metodo po Bradfordu (1976). Za vsak vzorec smo po končani reakciji izmerili absorbanco pri 595 nm ter s pomočjo umeritvene krivulje (Priloga B) izračunali koncentracijo zunajceličnih proteinov.

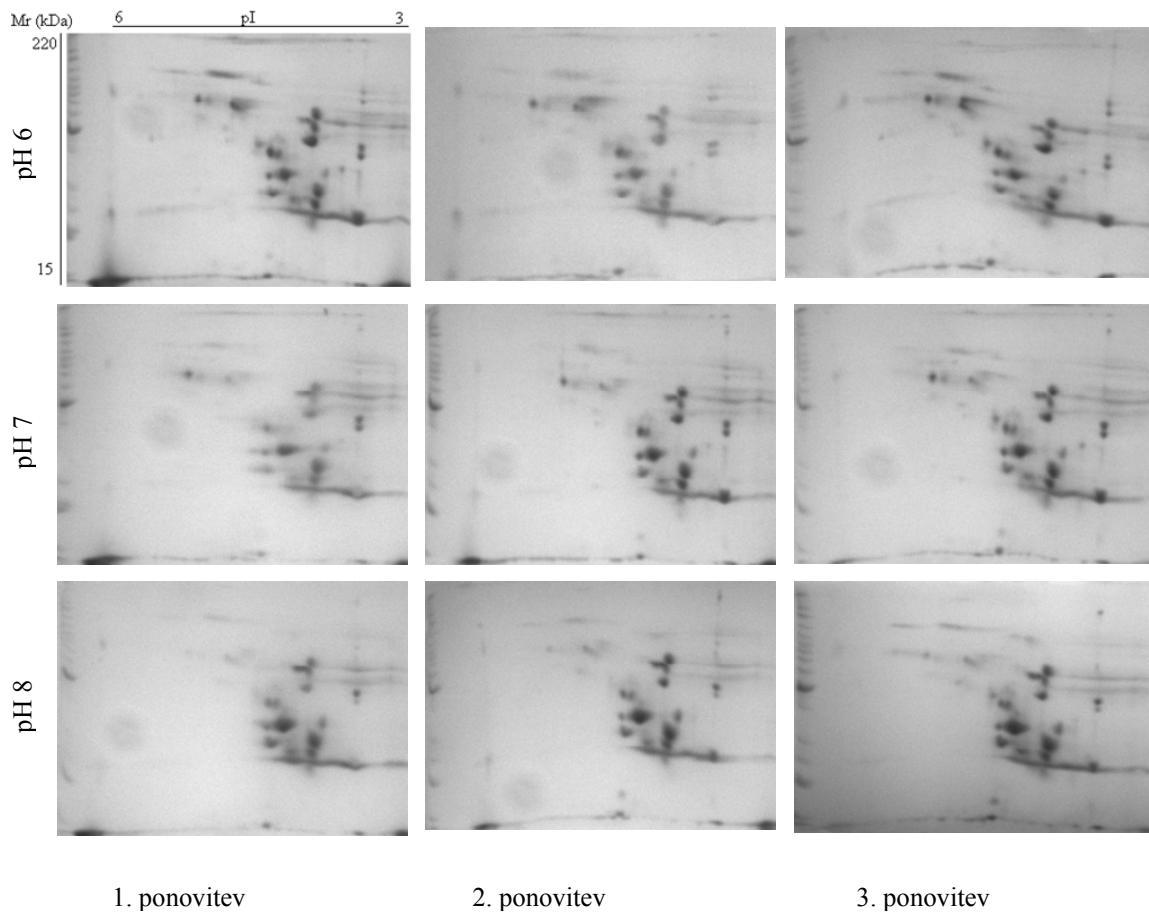
Preglednica 8: Končni volumeni vzorcev in koncentracije proteinov

Vzorec (kultivacija pri pH vrednosti)	Končni volumen (μL)	Koncentracija proteinov (g/L)	Koncentracija proteinov v 2,4 L brozge ($\times 10^{-3}$ g/L)
6	1000	5,12	12,28
7	800	3,40	8,16
8	800	2,28	5,46
9	200	0,10	0,24

Iz preglednice 8 je razvidno, da so koncentracije proteinov v vzorcih pH 6, pH 7 in pH 8 dovolj visoke za nadaljnje analize, medtem ko je bila v vzorcu pH 9 izmerjena prenizka koncentracija.

4.3 ANALIZA ZUNAJCELIČNIH PROTEINOV Z 2-D ELEKTROFOREZO

Pri treh vzorcih zunajceličnih proteinov (pH = 6,0; 7,0; 8,0) smo izvedli analizo z 2-D elektroforezo. Gele smo barvali z barvilom Simply Blue Safe Stain (Invitrogen). S pomočjo proteinskega standarda Bench Mark (Invitrogen) smo ocenili molekulsko maso (M_r) posameznih proteinov. Vrednosti so se gibale med 25 in 100 kDa. Izoelektrične točke (pI) 2-D elektroforetskih lis pa so bile v območju pH vrednosti od 3 do 6. Za vse proteine je bilo glede na potek pH gradiента v prvi dimenziji ugotovljeno, da imajo izoelektrično točko v kislem območju (Milek, 2005).



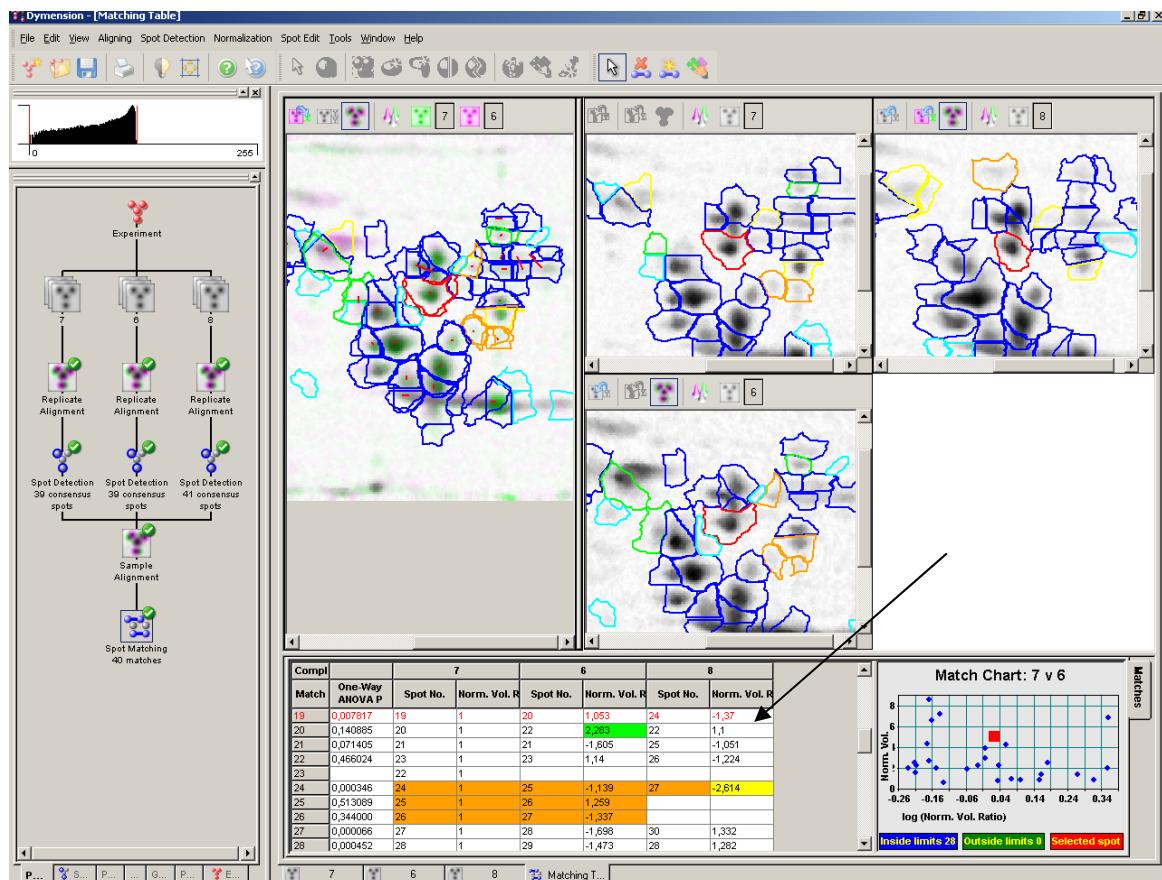
Slika 11: 2-D profil zunajceličnih proteinov pri različnih vrednostih pH. Za vsako pH vrednost so bile izvedene tri ponovitve.

S programom 2D-Dymension smo naredili primerjavo 2-D profilov zunajceličnih proteinov.

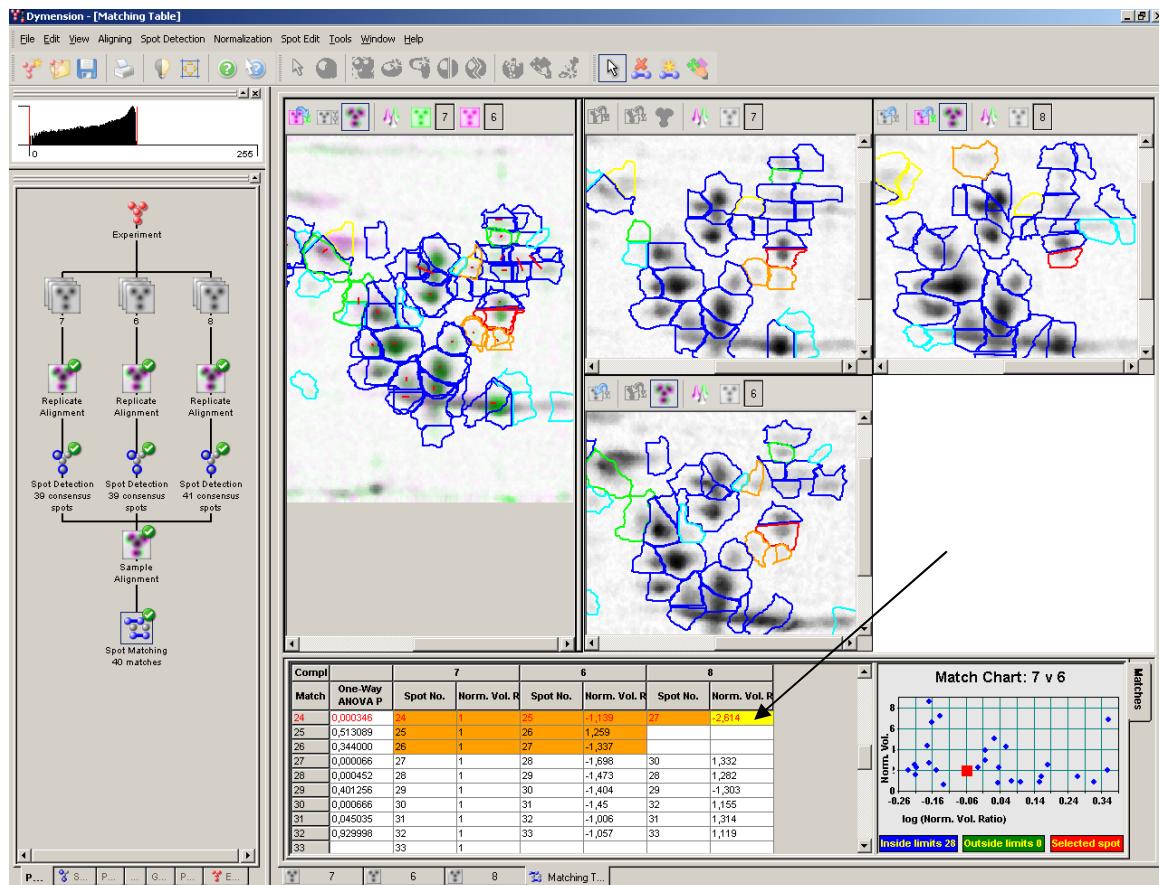
Naredili smo primerjavo vzorcev 6 in 8 glede na vzorec 7. Primerjali smo intenzitete (vrednosti normaliziranih volumnov) posameznih 2-D elektroforetskih lis in rezultate izrazili kot razmerje (R) normaliziranih volumnov 2-D lis vzorca 6 ali 8 glede na vzorec 7. Razliko v izražanju proteinov smo pripisovali le v primeru, ko je bilo razmerje intenzitet posameznih 2-D lis večje od 2 in je bila hkrati razlika statistično značilna, kar smo preverili z ANOVA testom ($p < 0,05$).

Analiza s programom je pokazala sledeče:

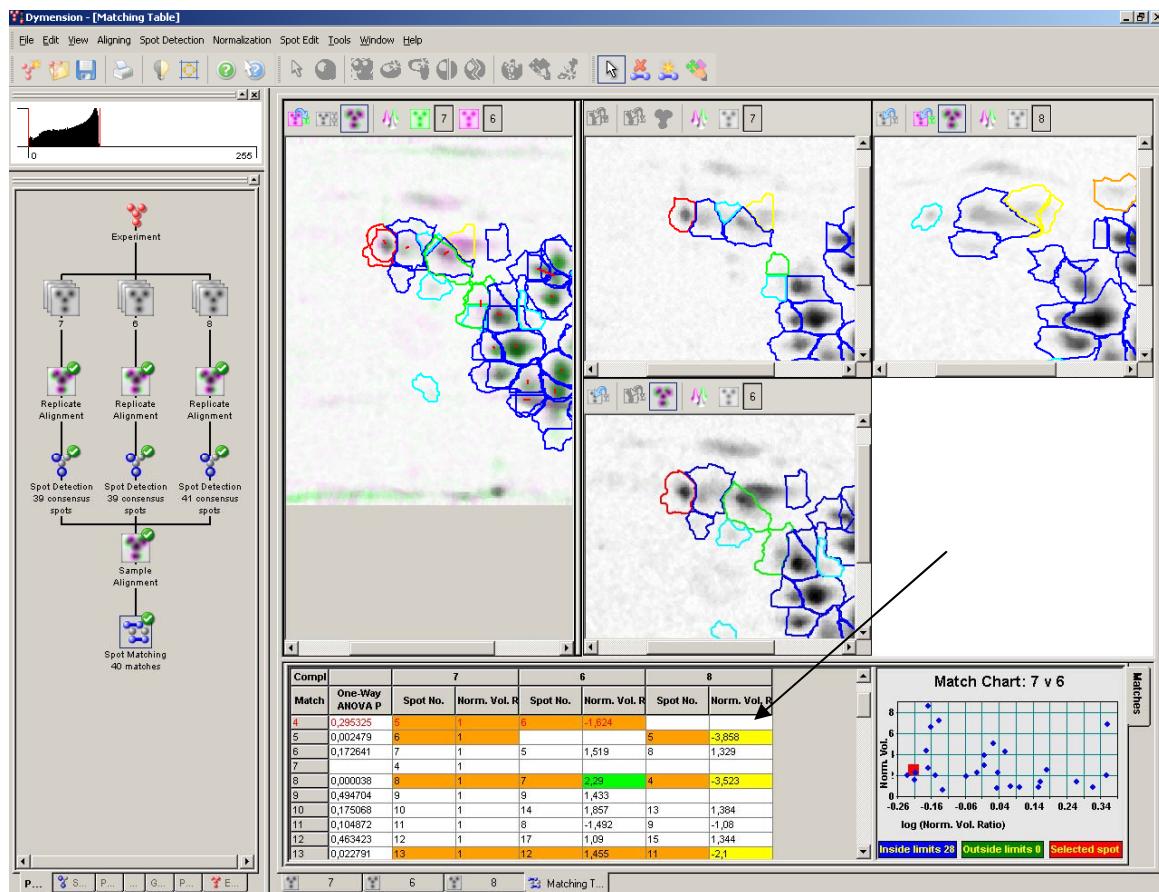
1. določeni proteini so bili prisotni v vseh treh vzorcih, ($R < 2$); primer je prikazan na sliki 12.
2. določeni proteini so bili prisotni v vseh treh vzorcih (6, 7 in 8), ($R > 2$); primer prikazuje slika 13.
3. nekateri proteini so bili prisotni oziroma odsotni v vsaj enem vzorcu; primer je prikazan s sliko 14.



Slika 12: Primer obdelave 2-D elektroforetske lise (okrožena z rdečo barvo) s programom 2D-Dymension; analiza 1 ($R < 2$)



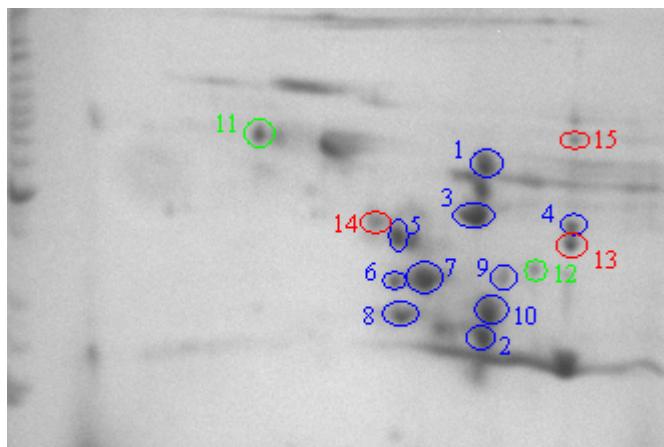
Slika 13: Primer obdelave 2-D elektroforetske lise (obkrožena z rdečo barvo) s programom 2D-Dymension; analiza 2 ($R > 2$)



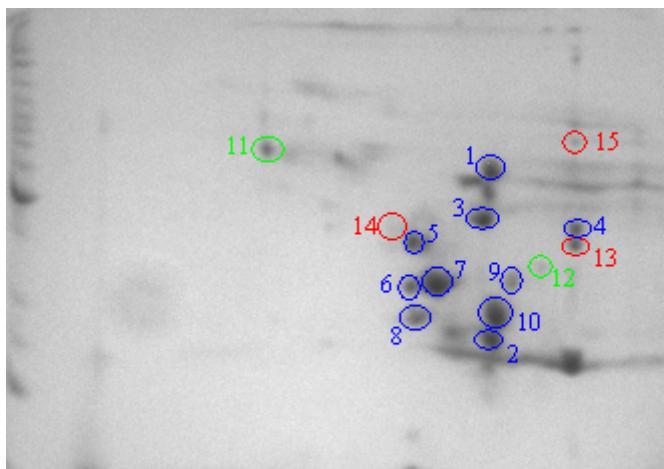
Slika 14: Primer obdelave 2-D elektroforetske lise (obkrožena z rdečo barvo) s programom 2D-Dymension; analiza 3 (prisotnost / odsotnost v vzorcih)

Zanimala nas je identiteta proteinov (2-D elektroforetskih lis), zato smo že omenjene lise izrezali in jih poslali na identifikacijo. Izrezane lise so označene in ostevilčene na slikah 15, 16 in 17, in sicer z:

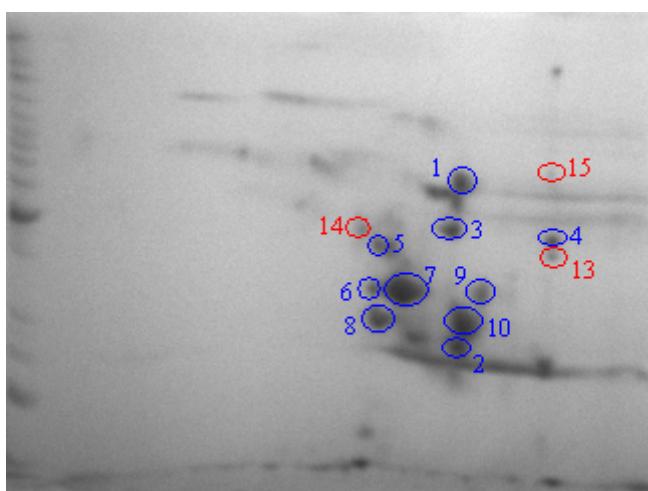
- modro barvo (proteini, ki imajo $R < 2$), številke 1-10
- rdečo barvo (proteini, ki imajo $R > 2$), številke 13, 14, 15
- zeleno (proteini, ki so prisotni / odsotni v vsaj enem vzorcu), številki 11 in 12.



Slika 15: 2-D profil zunajceličnih proteinov pri pH vrednosti 6, *



Slika 16: 2-D profil zunajceličnih proteinov pri pH vrednosti 7, *



Slika 17: 2-D profil zunajceličnih proteinov pri pH vrednosti 8, *

* Za vsako pH vrednost je prikazan reprezentativni gel.

4.4 IDENTIFIKACIJA

Identifikacija 2-D elektroforetskih lis je bila izvedena z masno spektrometrijo (LC-MS/MS) (Univerza v Aberdeenu, Škotska). Preglednica 9 prikazuje rezultate identifikacije 2-D elektroforetskih lis, izbrani pa so tisti proteini, ki so ustrezali pogoju: pokritost sekvence >10 % in »score« proteina >100.

Preglednica 9: Rezultati identifikacije (Yamazaki in sod., 2005; Yamazaki in sod., 2006, Kawarabayasi in sod., 1999)

Št. lise	R	Ime proteina	Lastnosti in vrednosti		Funkcija
1	pH 6= -1,429 pH 8= - 1,08	ABC-prenašalec, substrat-vezni proteinski prekurzor	M _r	83861	Membranski proteini, ki pomagajo pri prenosu različnih vrst substratov (presnovni produkti, lipidi in steroli) preko zunanje in notranje celične membrane. Omogočajo prenos substanc, kot so makromolekule, majhne molekule in ioni, v celico in med celicami.
			pI	4,48	
			pokritost sekvence >10 %	24	
			»score«	577	
			gi	118431437	
		2-metilcitrat-dehidrataza	M _r	50743	Sodeluje pri presnovi ogljikovih hidratov. Metilcitratni cikel se začne z razpadom propionata do metilcitrata ter naprej do sukcinata, končni produkt je piruvat. Namen je pridobivanje energije in hranil.
			pI	5,61	
			pokritost sekvence >10 %	41	
			»score«	287	
			gi	118431750	
		Hipotetično protein APE_0061.1	M _r	48091	Nepoznana (ni podoben nobenemu znanemu proteinu)
			pI	5,50	
			pokritost sekvence >10 %	19	
			»score«	161	
			gi	118430860	
		Leucin-amonipeptidaza	M _r	52412	Je eksopeptidazni hidrolitični peptidni encim, ki sprosti AK iz N-terminalnega konca proteina ali polipeptida. Največjo katalitično hitrost ima, ko je prva AK leucin.
			pI	5,91	
			pokritost sekvence >10 %	17	
			»score«	141	
			gi	118431875	

Nadaljevanje, Preglednica 9: Rezultati identifikacije (Yamazaki in sod., 2005; Yamazaki in sod., 2006, Kawarabayasi in sod., 1999)

Št. lise	R	Ime proteina	Lastnosti in vrednosti		Funkcija
2	pH 6= -1,00 pH 8= -1,08	Delta-1-pirolin-5-karboksilat-dehidrogenaza	M _r	61689	Vlogo ima pri metabolizmu aminokislin. Encim delta-1-pirolin-5-karboksilat-dehidrogenaza ima dvojno funkcijo. Deluje na notanji membrani mitohondrija, za delovanje potrebuje ATP in NADH. Katalizira razcep glutamata do delta-1-pirolin-5-karboksilata. To je kritičen korak pri <i>de novo</i> biosintezi pirolina in ornitina. Je »hitrostno omejitveni« encim pri sintezi pirolina.
			pI	6,33	
			pokritost sekvence >10 %	16	
			»score«	121	
			gi	118431207	
3	pH 6= +1,053 pH 8= -1,37	ABC prenašalec aminokislin z razvejano stransko verigo	M _r	53643	Sodeluje pri membranskem transportu aminokislin. Protein pomaga pri prenosu metabolitov, ionov ali elektronov skozi celično membrano, znotraj celice ali v fluidnem tkivu.
			pI	4,44	
			pokritost sekvence >10 %	44	
			»score«	900	
			gi	14601070	
		Superoksid-dismutaza	M _r	24562	Ima pomembno vlogo pri celičnih procesih. Superoksid-dismutaza katalizira redukcijo superoksidnega aniona pri nastanku vodikovega peroksidu. Pomembno vlogo ima pri obrambi celice pred strupenimi vplivi kisikovih radikalov.
			pI	6,50	
			pokritost sekvence >10 %	44	
			»score«	328	
			gi	14600936	
		ABC-prenašalec, substrat-vezni proteinski prekurzor	M _r	83861	Membranski proteini, ki pomagajo pri prenosu različnih vrst substratov (presnovni produkti, lipidi in steroli) preko zunanje in notranje celične membrane. Omogočajo prenos substanc, kot so makromolekule, majhne molekule in ioni, v celico in med celicami.
			pI	4,48	
			pokritost sekvence >10 %	35	
			»score«	691	
			gi	118431437	
		Aspartat-aminotransferaza	M _r	41237	Sodeluje pri metabolizmu aminokislin, saj olajša pretvorbo aspartata in α -ketoglutarata do oksaloacetata in glutamata.
			pI	6,36	
			pokritost sekvence >10 %	16	
			»score«	107	
			gi	14602053	

Nadaljevanje, Preglednica 9: Rezultati identifikacije (Yamazaki in sod., 2005; Yamazaki in sod., 2006, Kawarabayasi in sod., 1999)

Št. lise	R	Ime proteina	Lastnosti in vrednosti		Funkcija
4	pH 6= -1,605 pH 8= -1,051	Oligopeptidni ABC prenašalec, oligopeptidni vezni protein	M _r	101706	Omogoči vodeno gibanje oligopeptidnih molekul v celico in med celicami.
			pI	4,33	
			pokritost sekvence >10 %	34	
			»score«	1339	
			gi	118431519	
5	pH 6= +1,14 pH 8= -1,224	Verjetno ABC prenašalec, substrat-vezni protein	M _r	64754	So membranski proteini, ki pomagajo pri prenosu različnih vrst substratov (presnovni produkti, lipidi in steroli) preko zunanje in notranje celične membrane.
			pI	4,90	
			pokritost sekvence >10 %	53	
			»score«	1305	
			gi	118431798	
6	pH 6= -1,404 pH 8= -1,303	ABC prenašalec, substrat-vezni protein	M _r	52207	So membranski proteini, ki pomagajo pri prenosu različnih vrst substratov (presnovni produkti, lipidi in steroli) preko zunanje in notranje celične membrane.
			pI	5,01	
			pokritost sekvence >10 %	44	
			»score«	427	
			gi	118431538	
7	pH 6= -1,473 pH 8= +1,282	ABC prenašalec, substrat-vezni protein	M _r	52207	So membranski proteini, ki pomagajo pri prenosu različnih vrst substratov (presnovni produkti, lipidi in steroli) preko zunanje in notranje celične membrane.
			pI	5,01	
			pokritost sekvence >10 %	44	
			»score«	427	
			gi	118431538	
		Superoksid-dismutaza	M _r	24562	Ima pomembno vlogo pri celičnih procesih. Superoksid-dismutaza katalizira redukcijo superoksidnega aniona pri nastanku vodikovega peroksida. Pomembno vlogo ima pri obrambi celice pred strupenimi vplivi kisikovih radikalov.
			pI	6,50	
			pokritost sekvence >10 %	30	
			»score«	269	
			gi	14600936	
		Hipotetično protein APE_0898.1	M _r	93324	Nepoznana (ni podoben nobenemu znanemu proteinu)
			pI	4,68	
			pokritost sekvence >10 %	11	
			»score«	113	
			gi	118431254	

Nadaljevanje, Preglednica 9: Rezultati identifikacije (Yamazaki in sod., 2005; Yamazaki in sod., 2006, Kawarabayasi in sod., 1999)

Št. lise	R	Ime proteina	Lastnosti in vrednosti		Funkcija
8	pH 6= -1,00 pH 8= +1,314	ABC prenašalec, substrat-vezni protein	M _r	52207	So membranski proteini, ki pomagajo pri prenosu različnih vrst substratov (presnovni produkti, lipidi in steroli) preko zunanje in notranje celične membrane.
			pI	5,01	
			pokritost sekvence >10 %	40	
			»score«	374	
			gi	118431538	
		Protein-disulfid-oksidoreduktaza	M _r	27545	Ima vlogo pri energijski presnovi. Katalizira nastanek disulfine vezji v beljakovini proteinih. Protein-disulfid-oksidoreduktaze so ubikvitarni redoks encimi.
			pI	472	
			pokritost sekvence >10 %	14	
			»score«	170	
			gi	14600959	
9	pH 6= -1,698 pH 8= +1,332	ABC prenašalec aminokislin z razvejano stransko verigo	M _r	53643	Sodeluje pri membranskem transportu aminokislin. Protein pomaga pri prenosu metabolitov, ionov ali elektronov skozi celično membrano, znotraj celice ali v fluidnem tkivu.
			pI	4,44	
			>10 % pokritost sekvence	40	
			score	817	
			gi	14601070	
		Superoksid-dismutaza	M _r	24562	Ima pomembno vlogo pri celičnih procesih. Superoksid-dismutaza katalizira redukcijo superoksidnega aniona pri nastanku vodikovega peroksida. Pomembno vlogo ima pri obrambi celice pred strupenimi vplivi kisikovih radikalov.
			pI	6,50	
			pokritost sekvence >10 %	34	
			»score«	235	
			gi	14600936	
10	pH 6= -1,45 pH 8= +1,155	ABC prenašalec aminokislin z razvejano stransko verigo	M _r	53643	Sodeluje pri membranskem transportu aminokislin. Protein pomaga pri prenosu metabolitov, ionov ali elektronov skozi celično membrano, znotraj celice ali v fluidnem tkivu.
			pI	4,44	
			pokritost sekvence >10 %	48	
			»score«	908	
			gi	14601070	
		TRAP prenašalec, topljenec-vezne komponente	M _r	40010	Sodeluje pri membranskem transportu.
			pI	4,52	
			pokritost sekvence >10 %	24	
			»score«	308	
			gi	118431921	

Nadaljevanje, Preglednica 9: Rezultati identifikacije (Yamazaki in sod., 2005; Yamazaki in sod., 2006, Kawarabayasi in sod., 1999)

Št. lise	R	Ime proteina	Lastnosti in vrednosti		Funkcija
11	pH 6 = -1,624 pH 8= /	Superoksid-dismutaza ABC-prenašalec, substrat-vezni proteinski prekurzor 2-metilcitrat-dehidrataza	M_r	24562	Igra vlogo pri celičnih procesih. Superoksid-dismutaza katalizira redukcijo superoksidnega aniona pri nastanku vodikovega peroksida. Pomembno vlogo ima pri obrambi celice pred strupenimi vplivi kisikovih radikalov.
			pI	6,50	
			pokritost sekvence >10 %	47	
			»score«	294	
			gi	14600936	
12	pH 6 = +1,26 pH 8= /	Periferni protein	M_r	90238	So membranski proteini, ki pomagajo pri prenosu različnih vrst substratov (presnovni produkti, lipidi in steroli) preko zunanje in notranje celične membrane.
			pI	5,04	
			pokritost sekvence >10 %	36	
			»score«	791	
			gi	118430987	
13	pH 6= -1,139 pH 8= -2,614	Oligopeptidni ABC prenašalec, oligopeptidni vezni protein	M_r	50743	Sodeluje pri presnovi ogljikovih hidratov. Metilcitratni cikel se začne z razpadom propionata do metilcitrata ter naprej do sukcinata, končni produkt je piruvat. Namen je pridobivanje energije in hranljivih produktov.
			pI	5,61	
			pokritost sekvence >10 %	17	
			»score«	232	
			gi	118431750	
			M_r	162525	Pri G ⁻ arhejah ima pomembno vlogo pri mehanski stabilizaciji celice.
			pI	3,84	
			pokritost sekvence >10 %	11	
			»score«	354	
			gi	118431124	
			M_r	101706	Omogoči vodeno gibanje oligopeptidnih molekul v celico in med celicami.
			pI	4,33	
			pokritost sekvence >10 %	34	
			»score«	1170	
			gi	118131519	

Nadaljevanje, Preglednica 9: Rezultati identifikacije (Yamazaki in sod., 2005; Yamazaki in sod., 2006, Kawarabayasi in sod., 1999)

Št. lise	R	Ime proteina	Lastnosti in vrednosti		Funkcija
14	pH 6 = +2,28 pH 8 = +1,0	Verjetno ABC prenašalec, substrat-vezni protein	M_r	64754	So membranski proteini, ki pomagajo pri prenosu različnih vrst substratov (presnovni produkti, lipidi in steroli) preko zunanje in notranje celične membrane..
			pI	4,90	
			pokritost sekvence >10 %	57	
			»score«	1385	
			gi	118431798	
		NADP-odvisna glutamat-dehidrogenaza	M_r	46142	Sodeluje pri metabolizmu aminokislín. Encim katalizira reakcijo: L-glutamat + H ₂ O + NAD ⁺ = 2-oksoglutarat + NH ₃ + NADH + H ⁺ . NAD(+) -odvisna glutamat dehidrogenaza pretvori glutamat do amonijaka in α-ketoglutarata.
			pI	6,42	
			pokritost sekvence >10 %	11	
			»score«	171	
			gi	118431434	
		Hipotetično protein APE_2446	M_r	39053	Nepoznana (ni podoben nobenemu znanemu proteinu)
			pI	4,66	
			pokritost sekvence >10 %	26	
			»score«	100	
			gi	14602070	
15	pH 6 = +2,09 pH 8 = +1,5	Oligopeptidni ABC prenašalec, oligopeptidni vezni protein	M_r	101706	Omogoči vodeno gibanje oligopeptidnih molekul v celico in med celicami.
			pI	4,33	
			>10 % pokritost sekvence	34	
			score	1141	
			gi	118131519	
		Acil-aminokislinski sprostitveni encim	M_r	70461	Je encim, ki katalizira reakcijo hidrolize-dodaja vodikove in hidroksilne ione k molekulam, ki se posledično razcepi na dve manjši oziroma na bolj preproste.
			pI	5,72	
			pokritost sekvence >10 %	28	
			»score«	222	
			gi	118431816	

Legenda: Proteini, ki so obarvani enako, pomenijo enake zadeekte pri različnih 2-D elektroforetskih lisah

2-metilcitrat dehidrataza	-----
Superoksid dismutaza	-----
Oligopeptidni ABC prenašalec, oligopeptidni vezni protein	-----
ABC prenašalec, substrat vezni-proteinski prekurzor	-----
ABC prenašalec, substrat vezni-proteinski prekurzor	-----
ABC prenašalec, substrat-vezni protein	-----
ABC prenašalec aminokislin z razvejano stransko verigo	-----
Verjetno ABC prenašalec, substrat-vezni protein	-----

Kot 1. zadetek se je pri vseh izbranih 2-D elektroforetskih lisah pojavil ABC prenašalec, in sicer smo ugotovili ABC prenašalce šestih različnih skupin (glede na vrednosti pI, gi, M).

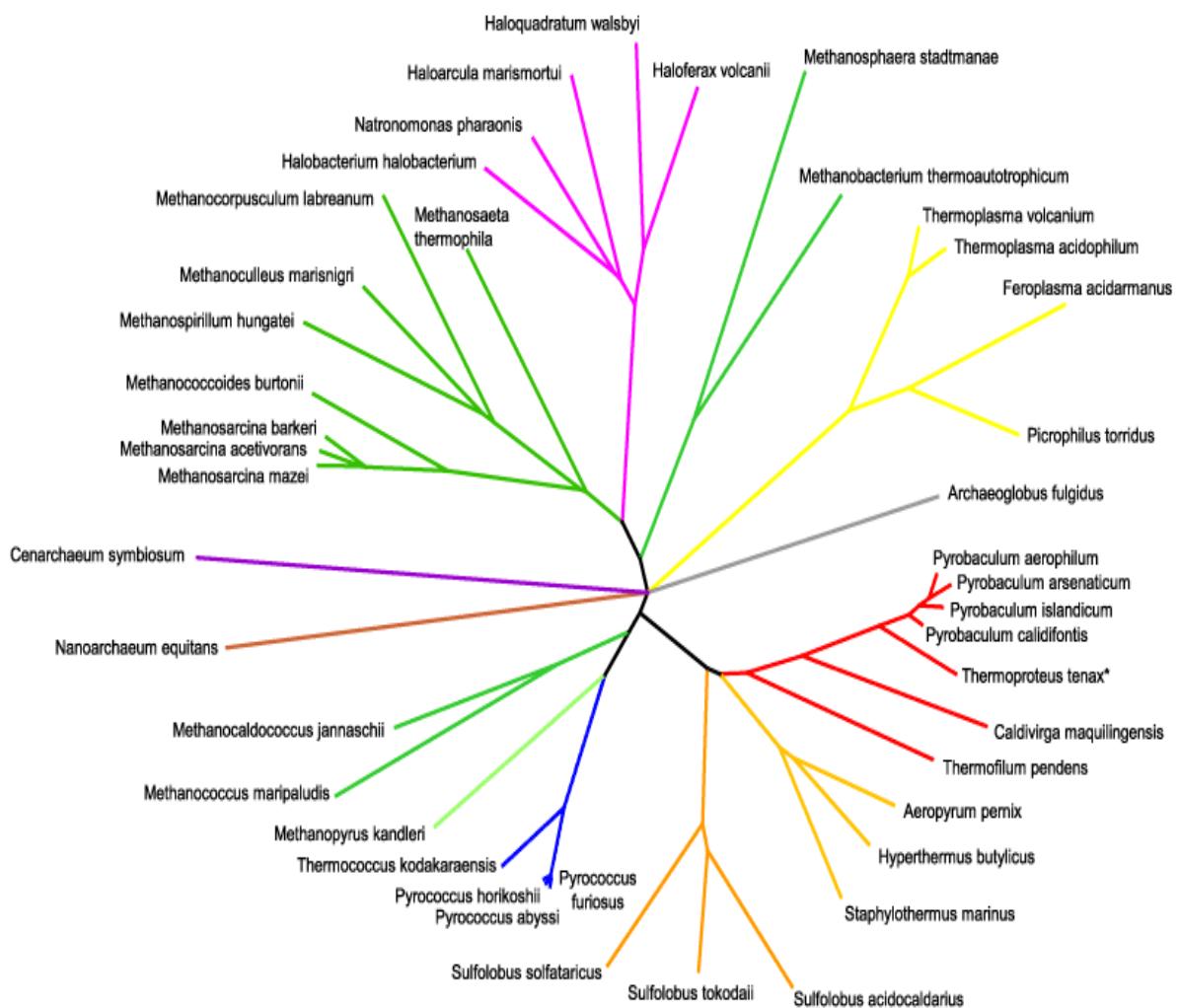
Ostali identificirani proteini, ki so ali imeli nizek »score« ali pokritost sekvence nižjo od 10 %, so bili: deoksiriboza-fosfat-aldolaza, NADP-odvisna glutamat-dehidrogenaza, acil-CoA-dehidrogenaza, pernisin, aminopeptidaza, 5-metil-tioadenozin-fosforilaza II, riboflavin-sintaza, deoksiribozafosfat-aldolaza, Glu-tRNA-aminotransferaza, termosom (alfa poenota), spermidin-sintaza, acil-aminokislinski sprostitveni encim, karboksipeptidaza ter mnogo hipotetičnih proteinov, ki še niso poznani.

4.5 PRIMERJAVA AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ ABC-PRENAŠALCEV

AK zaporedja omenjenih prenašalcev smo primerjali glede homologije s programom CLUSTAL 2.0.8 (Priloga C in Priloga D). Na enem mestu se je pojavila identična aminokislina (» * «), in sicer je bila ugotovljena identičnost pri aminokislini glicin (oznaka G). Ugotovili nismo niti podobnosti med ABC transporterji, saj se je visoka podobnost (» : «) oziroma srednja podobnost (» . «) pojavila na manj kot dvajsetih mestih in sicer pri AK s hidrofobnimi funkcionalnimi skupinami (Priloga D), npr.: izolevcin, leucin, valin in alanin. Med izbranimi ABC prenašalci šestih skupin ni bilo ugotovljene homologije.

4.6 PRIMERJAVA AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ ABC-PRENAŠALCEV S PROGRAMOM BLAST

BLAST je kratica za bioinformacijsko »knjižnico«, ki omogoča primerjavo sekvenc aminokislin (AK) ali sekvenc DNA v posameznem zapisu z vsemi ostalimi AK ali sekvencami v bazi. AK zaporedja omenjenih ABC prenašalcev, identificiranih iz *A. pernix*, smo primerjali z AK zaporedji prokariontov in evkariontov in ugotavljali podobnosti med njimi.



Slika 18: Filogenetsko drevo domene arhej (The Lowe Lab, 2008)

Priloge E, F, G, H, I in J prikazujejo razporeditev dobljenih zadetkov glede na »score« (označeni z različnimi barvami). Na prilogah so oštreljeni tisti zadetki (mikroorganizmi), ki so podani v preglednici 10.

V preglednici so zbrani tisti mikroorganizmi, ki imajo najmanj 30 % zaporedij AK identičnih in hkrati podobnih vsaj 50 % AK zaporedij pri podobnih ali enakih prenašalnih proteinih, kot smo jih identificirali iz arheje *A. pernix*. Mikroorganizmi, ki jih uvrščamo v

domeno arheje, so v preglednici obarvani črno, z modro barvo pa so označeni mikroorganizmi iz domene bakterij.

Preglednica 10: Rezultati primerjave AK zaporedij ABC prenašalcev v programu BLAST

AK zaporedje 1: ABC prenašalec, substrat-vezni proteinski prekurzor	AK zaporedje 2: ABC prenašalec aminokislin z razvejano stransko verigo	AK zaporedje 3: oligopepidni ABC prenašalec
1 <i>Staphylothermus marinus</i>	1 <i>Korarchaeum cryptofilum</i>	1 <i>Staphylothermus marinus</i>
2 <i>Hyperthermus butylicus</i>	2 <i>Pyrobaculum arsenaticum</i>	2 <i>Pyrococcus abyssi</i>
3 <i>Pyrococcus furiosus</i>	3 <i>Pyrobaculum aerophilum</i>	3 <i>Pyrobaculum aerophilum</i>
4 <i>Pyrococcus horikoshii</i>	4 <i>Pyrobaculum calidifontis</i>	4 <i>Pyrobaculum calidifontis</i>
5 <i>Pyrococcus abyssi</i>	5 <i>Cenarchaeum symiosum</i>	5 <i>Thermoproteus neutrophilus</i>
6 <i>Thermococcus peptoniphilus</i>	6 <i>Pyrobaculum islandicum</i>	6 <i>Pyrobaculum islandicum</i>
7 <i>Pyrobaculum calidifontis</i>	7 <i>Thermoproteus neutrophilus</i>	7 <i>Pyrobaculum arsenaticum</i>
8 <i>Pyrobaculum aerophilum</i>	8 <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	8 <i>Nitrosopumilus maritimus</i>
9 <i>Pyrobaculum arsenaticum</i>	9 <i>Thermofilum pendes</i>	
10 <i>Thermofilum pendes</i>	10 <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	
	11 <i>Thermoproteus tenax</i>	
AK zaporedje 4: domnevno ABC prenašalec, substrat-vezni protein	AK zaporedje 5: ABC prenašalec, substrat-vezni protein	AK zaporedje 6: ABC prenašalec, substrat-vezni proteinski prekurzor
1 <i>Hyperthermus butylicus</i>	1 <i>Hyperthermus butylicus</i>	1 <i>Korarchaeum cryptofilum</i>
2 <i>Staphylothermus marinus</i>	2 <i>Staphylothermus marinus</i>	2 <i>Thermotoga maritima</i>
3 <i>Pyrococcus furiosus</i>	3 <i>Pyrococcus furiosus</i>	3 <i>Thermotoga petrophila</i>
4 <i>Pyrococcus horikoshii</i>	4 <i>Pyrococcus horikoshii</i>	4 <i>Elusimicrobium minutum</i>
5 <i>Pyrococcus abyssi</i>	5 <i>Pyrococcus abyssi</i>	5 <i>Petrotoga mobilis</i>
6 <i>Thermofilum pendes</i>	6 <i>Thermofilum pendes</i>	6 <i>Thermotoga lettingae</i>
7 <i>Thermotoga petrophila</i>	7 <i>Thermotoga petrophila</i>	7 <i>Halothermothrix orenii</i>
8 <i>Thermotoga maritima</i>	8 <i>Thermotoga maritima</i>	8 <i>Thermosiphon melanesiensis</i>
	9 <i>Thermotoga lettingae</i>	9 <i>Fervidobacterium nodosum</i>
	10 <i>Thermus thermophilus</i>	10 <i>Deinococcus geothermalis</i>
	11 <i>Rhizobium leguminosarum</i>	11 <i>Deinococcus radiodurans</i>

Ugotovili smo, da so AK zaporedja 1, 2, 3 in 4 enaka ali podobna prenašalnim proteinom drugih predstavnikov arhej (slika 18). AK zaporedje 5 je podobno tako arhejam kot ekstremomofilnim predstavnikom bakterij, AK zaporedje 6 pa ima podobnost s ekstremomofilnimi bakterijami povsod, razen v prvem zadetku. To zaporedje predstavlja ABC prenašalec, substrat-vezni proteinski prekurzor (proteinska lisa št. 11, 1. zadetek), ki je bil po primerjavi 2-D profilov zunajceličnih proteinov označen kot 2-D elektroforezna lisa, ki je prisotna oziroma odsotna v vsaj enem vzorcu. Namreč, ta protein ni bil prisoten v vzorcu pH 8.

Ugotavljali smo tudi, ali se je kateri mikroorganizem pojavil pri vseh AK zaporedjih. Takega predstavnika ni bilo moč najti niti med arhejami, niti med hipertermofilnimi bakterijami. Mikroorganizmi, ki se pojavijo največkrat, so predstavniki arhej iz kraljestva Crenarchaeota (*Staphylothermus marinus*, *Thermofilum pendes*) in kraljestva Euryarchaeota (*Pyrococcus abyssi*) (pojavijo se v štirih AK zaporedjih) in pri predstavnikih ekstremofilnih bakterij rod *Thermotoga* sp (hipertermofili) (pojavi se v treh AK zaporedjih).

Za nadaljnje zaključke bi bilo vsekakor potrebno mnogo več analiz. Najprej bi bilo potrebno pridobiti večjo koncentracijo zunajceličnih proteinov v vzorcih in odstraniti prenašalne proteine, da bi lahko iskali druge proteine, ki bi bili zanimivi za biotehnološko uporabo.

5 SKLEPI

- Optična gostota, pomerjena ob prekinitvi kultivacije hipertermofilne arheje *A. pernix*, je bila največja pri vrednosti pH 7, malo nižja pri vrednosti pH 6, najnižja pa pri vrednosti pH 9.
- Z metodo po Bradfordu smo določili koncentracijo proteinov v koncentriranih vzorcih. Koncentracije proteinov v vzorcih pH 6,0; pH 7,0 in pH 8,0 so bile dovolj visoke za nadaljnje analize, medtem ko je bila v vzorcu pH 9,0 izmerjena prenizka koncentracija.
- Po analizi proteinov z 2-D elektroforezo smo na gelu razločili vsaj 20 2-D elektroforetskih lis. Po obdelavi 2-D profilov s programom smo našli: 1. proteine, ki imajo enako intenzitetu ($R < 2$) in so prisotni v vseh treh vzorcih, 2. proteine, ki so različni v intenziteti ($R > 2$) in prisotni v vseh treh vzorcih, in 3. proteine, ki so prisotni oz. odsotni v vsaj enim vzorcu. Omenjene proteine smo poslali na identifikacijo.
- Analiza rezultatov identifikacije proteinskih lis je pokazala, da so v vseh 2-D elektroforetskih lisah prisotni ABC prenašalci, vendar šestih različnih skupin.
- Primerjava aminokislinskih zaporedij omenjenih ABC prenašalcev ni pokazala identičnosti med njimi kot tudi ne podobnosti.
- Primerjava AK zaporedij omenjenih prenašalcev z AK zaporedji prokariontov in evkariontov je pokazala: 1. podobnost z drugimi predstavniki arhej (AK zaporedje 1, 2, 3 in 4), 2. podobnost z arhejami in ekstremofilnimi bakterijami (AK zaporedje 5) in 3. podobnost z ekstremofilnimi bakterijami (AK zaporedje 6).
- Vpliv pH rastnega medija na izražanje zunajceličnih proteinov pokaže AK zaporedje 6, ki predstavlja ABC prenašalec, substrat-vezni proteinski prekurzor, ki v vzorcu 8 ni bil prisoten (prisoten v vzorcu 6 in 7).
- Analiza naših rezultatov identifikacije 2-D lis je pokazala tudi, da proteinaze niso prisotne v visokih koncentracijah, ki smo jih pričakovali glede na to, da arheja za rast potrebuje proteinske substrate.

6 POVZETEK

Arheje (Archaea) predstavljajo eno izmed najmanj raziskanih skupin mikroorganizmov. Največ ekstremofilnih organizmov najdemo ravno v domeni arhej. Prilagojeni so na življenje v ekoloških nišah, kot so visoka temperatura, ekstremne vrednosti pH, visoke koncentracije soli in visoki tlaci.

Hipertermofili so organizmi, ki imajo optimalno temperaturo rasti nad 80 °C in ne rastejo pod 60 °C. Izolirali so jih iz geotermalno ogretih tal in voda. Večina hipertermofilnih arhej je anaerobna, *Aeropyrum pernix* pa je eden redkih striktnih aerobov.

Aeropyrum pernix je prva nevtrofilna, striktno aerobna, hipertermofilna arheja. Optimalna temperatura za njeno rast je med 90 in 95 °C, optimalna pH vrednost okoli 7 in slanost 3,5 %. Zaradi rasti arheje pri visoki temperaturi je *A. pernix* izredno težavna za gojenje.

V okviru diplomske naloge smo žeeli ugotoviti, ali spremembu pH rastnega medija vpliva na izražanje zunajceličnih proteinov. Eksperimentalno delo smo začeli z gojenjem arheje. Uporabili smo aerobni proces z enkratnim polnjenjem v bioreaktorju z mešanjem, ob uporabi gojišča tripton-pepton z dodatkom natrijevega tiosulfata pri pH vrednosti 6,0; 7,0; 8,0 in 9,0. Temperatura gojenja je bila 92 °C, čas gojenja je bil 40 ur. Sledilo je centrifugiranje bioprocесne brozge ter ultrafiltracija rastnega medija. Temu je sledilo čiščenje vzorcev z dializo, nato pa smo vzorce proteinov koncentrirali v Eppendorf centrifugirkah z membrano. S to tehniko smo dobili dovolj velike koncentracije proteinov za nadaljnje analize. Koncentracijo proteinov smo določili z metodo po Bradfordu.

V nadaljevanju smo proteine analizirali z dvo-dimenzionalno elektroforezo. Po končanem barvanju smo na gelu razločili vsaj 20 2-D elektroforetskih lis. S programom 2D-Dymension smo naredili primerjavo 2-D profilov zunajceličnih proteinov. Rezultate smo izrazili kot razmerje normaliziranih volumnov 2-D lis vzorca 6 ali 8 glede na vzorec 7. Razliko v izražanju proteinov smo pripisovali le, ko je bilo razmerje intenzitet posameznih 2-D lis večje od 2 in je bila hkrati razlika statistično značilna, kar smo preverili z ANOVA testom. Po obdelavi 2-D profilov s programom smo našli: 1. proteine, ki imajo enako intenziteto ($R < 2$) in so prisotni v vseh treh vzorcih, 2. proteine, ki so različni v intenziteti ($R > 2$) in prisotni v vseh treh vzorcih, in 3. proteine, ki so prisotni oz. odsotni v vsaj enem vzorcu. Omenjene proteine smo poslali na identifikacijo.

Z analizo rezultatov identifikacije 2-D elektroforetskih lis smo ugotovili, da so v vseh lisah prisotni ABC prenašalci. Ker smo jih dobili tako pogosto in ker je poznana sekvenca genoma, smo primerjali njihova AK zaporedja s programom CLUSTAL 2.0.8. Ugotovili smo, da ABC prenašalci niso identični, saj je primerjava AK zaporedij pokazala identičnost le na enem mestu pri aminokislini glicin. Primerjava AK zaporedij je pokazala tudi, da si ABC prenašalci niso niti podobni. Že omenjena AK zaporedja smo nato primerjali še v programu BLAST, ki omogoča primerjavo sekvenc aminokislin ali sekvenc DNK v posameznem zapisu z vsemi ostalimi AK ali sekvencami v bazi. Ugotovili smo, da so zaporedja štirih ABC prenašalcev najbolj podobna prenašalnim proteinom ostalih hipertermofilnih arhej, eno zaporedje pa je podobno ekstremofilnim bakterijam.

7 VIRI

Adamlje U. 2005. Vpliv temperature in pH na strukturne lastnosti membrane hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix* K1. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 6-11

Allers T., Mevarech M. 2005. Archaeal genetics-the third way. Nature Reviews, 6: 58-73

Baebler Š., Gruden K. 2007. Sistemska biologija. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo. (oktober 2007) <http://www.zrss.si/bzid/geni/pdf/baebler-clanek.pdf> (avgust 2008): 213-223

Bernander R. 1998. Archaea and the cell cycle. Molecular Microbiology, 29: 955-961

Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 5-28, 88-89

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle pf protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254

Cavicchioli R., Thomas T., Curmi P.M.P. 2000. Cold stress response in Archaea. Extremophiles, 4: 321-331

Cellini F., Chesson A., Colquhoun I., Constable A., Davies H.V., Engel K.H., Gatehouse A.M., Karenlampi S., Kok E.J., Leguay J.J., Lehesranta S., Noteborn H.P., Pedersen J., Smith M. 2004. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. Food and Chemical Toxicology, 42: 1089-1125

Chavez Crocker P., Sako Y., Uchida A. 1999. Purification and characterization of an intracellular heat-stable proteinase (pernilase) from the marine hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. Extremophiles, 3: 3-9

Clark J. 2000. The mass spectrometer. Database Chemguide
<http://www.chemguide.co.uk/analysis/masspec/howitworks.html> (avgust, 2008): 7 str.

Cowan D.A. 1992. Biotechnology of the Archaea. Trends in Biotechnology, 10: 315-322

DOGAN-Database Of the Genomes Analyzed at NITE. 2002. *Aeropyrum pernix*. Tokyo, National Institute of Technology and Evaluation
<http://www.bio.nite.go.jp/dogan> (avgust 2008): 1 str.

Görg A. 1991. Two-dimensional electrophoresis. Nature, 349: 545-546

Huber H., Hohn M.J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V.C., Stetter K.O. 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, 417: 63-67

Kashefi K., Lovley D.R. 2003. Extending the upper temperature limit for life. *Science*, 301: 934

Kawarabayasi Y., Hino Y., Horikawa H., Yamazaki S., Haikawa Y., Jin-No K. 1999. Complete Genome Sequence of an Aerobic Hyper-thermophilic Crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Research*, 6: 83-101

Kim K. W., Lee S.B. 2003. Growth of the hyperthermophilic marine archaeon *Aeropyrum pernix* in a defined medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95: 618-622

MicrobeWiki. 2006. *Aeropyrum pernix*. Ohio, Kenyon College, Department of Biology (16. avgust, 2006)
<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aeropyrum> (avgust 2008): 1 str.

Milek I. 2005. Termična inaktivacija in biokemična karakterizacija biološko aktivnih substanc hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 2-19

Milek I., Cigič B., Skrt M., Poklar-Ulrich N. 2005. Optimization of growth for hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* on a small-batch scale. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 9: 805-809

Nekrep F.V. 1996. Bakterije in arheje. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 15-49

Niehaus F., Bertoldo C., Kähler M., Antranikian G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 711-729

O'Farrel P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250: 4007-4021

Sako Y., Chavez Crooker P., Ishida Y. 1997. An extremely heat-stable extracellular proteinase (aeropyrolysin) from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *FEBS Letters*, 415: 329-334

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 °C. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 1070-1077

Sepčić K., Anderluh G., Maček P., Turk T. 1997. Biokemijski praktikum. Ljubljana, Studentska organizacija Univeze: 58-61

Sigma-Aldrich. 2003. Isoelectric focusing. Gillingham, Bio analytix, Advances in analytical Chemistry (februar 2003)

http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/4242/fl_analytix2_2003.pdf (september 2008): 10 str.

Stetter K.O. 1996. Hyperthermophilic prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews, 18: 149-158

Stres B. 2001. Molekulsko odkrivanje in sledenje bakterij rodu *Pseudomonas* in podskupine *Pseudomonas stutzeri* v vzorcih iz okolja. Magistrsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 5-5

Terpinc P. 2006. Arheje in antioksidanti. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 4-12

The Lowe Lab. 2008. Archaeal genome browsers. Santa Cruz, University of California, Biomolecular Engineering
<http://lowelab.ucsc.edu/> (september 2008): 1 str.

Ute C.V., Tumbula D.L. 1999. Archaea: from genomics to physiology and the origin of life. Trends in Cell Biology, 9: 159-161

Vieille C., Zeikus G.J. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65: 1-43

Vrhovnik M. 2007. Karakterizacija alanin-aminopeptidaze in leucin-aminopeptidaze iz fižolovih listov glede na oskrbo z vodo. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 28-29

Woese C.R., Fox G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74: 5088-5090

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: 4576-4579

Yamaguchi K. 2002. *Aeropyrum pernix*. Tokyo, National Institute of Technology and Evaluation. (december 2002)
http://www.bio.nite.go.jp/dogan/MicroTop?GENOME_ID=ape (avgust 2008): 1 str.

Yamazaki S., Kikuchi H., Kawarabayasi Y. 2005. Characterization of a whole set of tRNA molecules in an aerobic hyper-thermophilic Crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. DNA Research, 12: 403-416

Yamazaki S., Yamazaki J., Nishijima K., Otsuka R., Mise M., Ishikawa H., Sasaki K., Tago S., Isono K. 2006. Proteome analysis of an aerobic hyper-thermophilic Crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. Molecular & Cellular Proteomics, 5: 811-823

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrich za vse strokovne nasvete in pregled diplomske naloge.

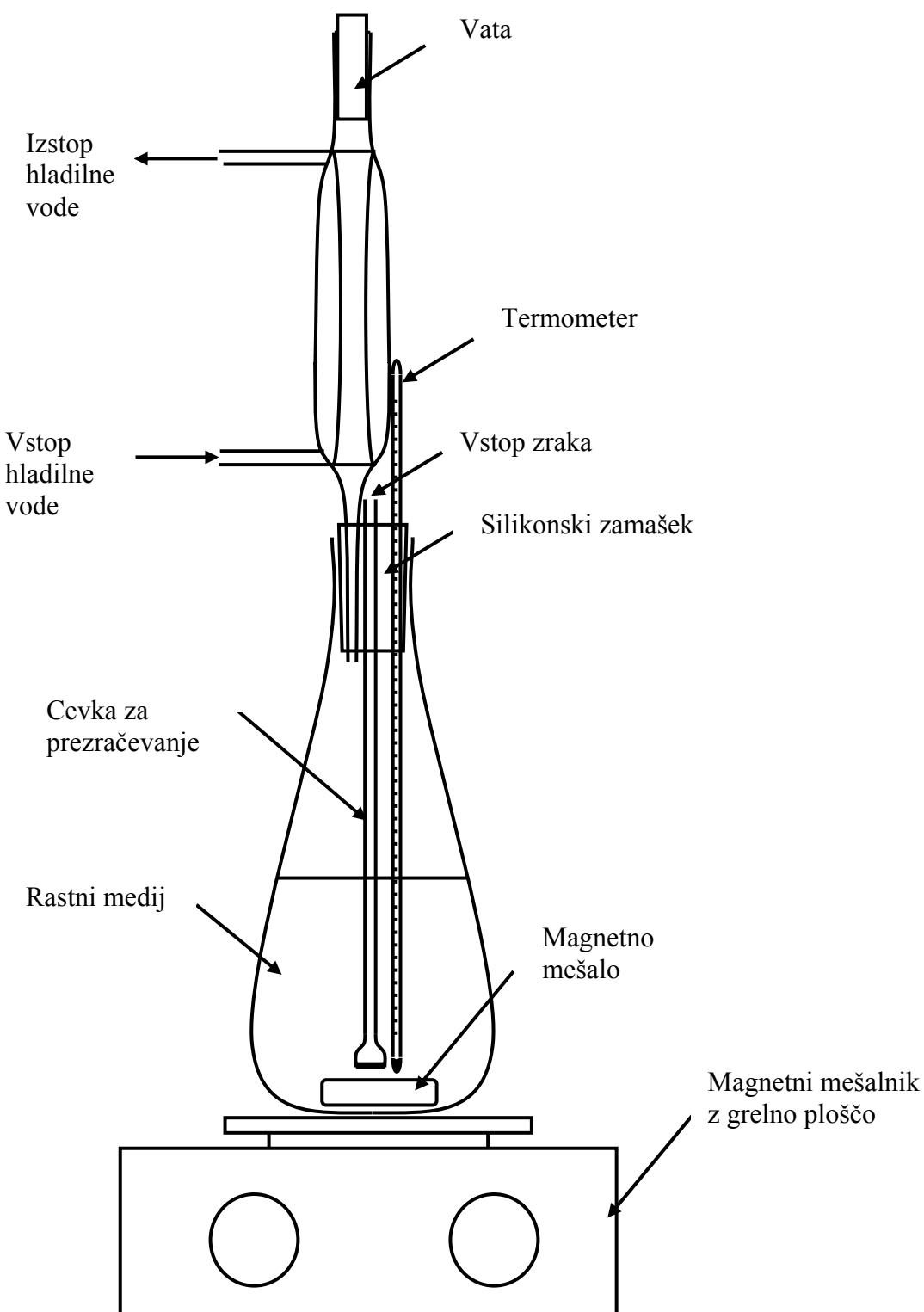
Za pomoč pri delu v proteomskem laboratoriju in pri pisanju diplome, za kritičen pregled diplome in za vse strokovne nasvete se še posebej zahvaljujem somentorici doc. dr. Poloni Jamnik.

Za pregled diplome se zahvaljujem recenzentu doc. dr. Blažu Cigiću.

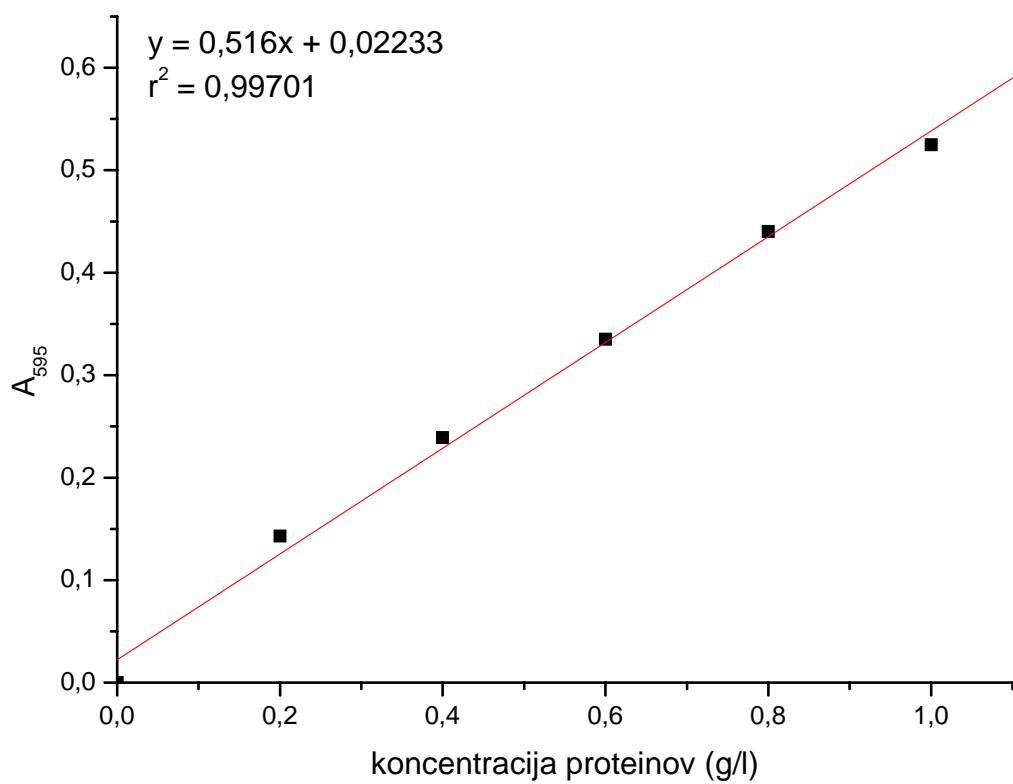
Hvala Mihi, Dejanu in Andreju ter preostalim zaposlenim na Katedri za kemijo in Kateri za biotehnologijo, ki ste mi kakorkoli priskočili na pomoč pri delu v laboratoriju.

Hvala za podporo moji družini, prijateljem in Urošu.

PRILOGE



Priloga A: Sistem za aerobni bioprocес z enkratnim polnjenjem v steklenici z mešanjem (Milek in sod., 2005)



Priloga B: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov po Bradfordu

Priloga C: Preglednica z AK zaporedji šestih različnih ABC prenašalcev

Legenda:

Zaporedna št. 2-D lise/št. zadetka, Ime proteina, pI proteina, zaporedje AK

1/1, ABC prenašalec, substrat-vezni proteinski prekurzor, pI 4,48

1 MALEDRRLLI AGAVVVVIVI LAAVYLMGGG EGAPETVTSP TETTPAATT
 51 PTETGTETPT ETQPAQTTPA ETTTPEGPQA MVIETSK**AFV** **VVGPGAYVP**
 101 **DFDPK**GKPVI AVKFQVDEEN TKPVEESVSF VDINPAFYRN EYADALIMVG
 151 RKSADPFIRES AVYEAVYK**LS** **NEEVPILWLG** **QYKVVFVYWS** **WVK**GLYYHPT
 201 LDIRFDLISE DPNAPVVDLG FGGYSNGPNT WVDVTFGWPD TFDPAADYET
 251 FGWHIWHNIG QTLVTFWKDE TTELTPELAV AWAHNEDSTE WYFVIRGGVK
 301 AFDNWNNKTY DVTAVDVLFT IWRIARLSDL PSWMITEFVD VNNSQVLTEE
 351 EFNQLLGQGG IYASYGGFSG EVK**SLDELLQ** **AFGYSGGTAG** **VVK**IKLYYPY
 401 APILSIFADP FTSVIPMK**YI** **FDNVEELOQK** YEEALEASNY GKNPAAWEA
 451 IGTGENEPISH ILLHQKPIAT GPYYVKDYKE **GSYIILEYNP** **YYWNK**ELWQD
 501 LYGDQDKPQHE LAIFLINDDA VSRIETMK**SG** **QADTGAIPLD** **RLEDIKGYAL**
 551 **EGTNFQIIVE** **EKGLSPVIVF** IVLNAMKEPF NNTKVR**QALM** YAIPFDQIKT
 601 SVYAGYIERL **NGVLPAGFLG** **HNDDIVTQYE** **FNIVK**KARELI KESGINPSDY
 651 TIKIWYNKGN TQREKVNAML KTIWGNLGFN VVVEPLEWPT LLSRTEKGDF
 701 DVWIVGWAPD YLDPDNYAGP LFYGGTK**FTV** **LDVNQFQSLS** **ELRAFFSG**

2/1, ABC prenašalec aminokislin z razvejano stransko verigo, pI 4,44

1 MNVAKIGAVL LALALIAPVL FATPALYTAA AQPTTITIGA LLPLTGDLQS
 51 YGVR**AQAAVQ** **VAVEDVNAYL** **ESKNAWFRLD** **LKV**EDTQT**KP** **DVA**VQKF**N**SL
 101 **VAQGIKFIVG** PMTSAEVKKL **KDLADQNNVL** **IISPSSTAIE** **LKIAGDNVFR**
 151 **FCPTDDVQSK** AIGALARDLG LKGAVIINRA DTWGNGLMEA TKEVLEN
 201 EVASVYSYNP ESPNFSGIAS QANGDVESILV SKYGKDKVAV VAIGFKEVVE
 251 LFSAAADYET LESVLWIGSD GTAQLSEFTT DPLARE**EFSVS** **TLFINPLFSP**
 301 **AATEAQEKVR** **QEVVAK**IGEE PDAYS LAAYD AVWAIALALL QAGPM
 351 MVNKVKELL**P** QITTSDEF**FAQ** FAATGKF**PLD** EGGDRATADY DWHIVAK**IGG**
 401 EYKWVKAGVY KG**VED**KNEWV TIEGLGK**TFP** QLFQEK**FTP**A ETETETSPSP
 451 TQAETTPPTPT PEETETETAE EGGVSTTLIA AIIIVIVIA AAAYFFLRSR
 501

Nadaljevanje, priloga C: Preglednica z AK zaporedji šestih različnih ABC prenašalcev
4/1, oligopepidni ABC prenašalec, pI 4,33

1 MRTSLARILI AAVMIAIFIL PSIPLVTLAS AQAGQPVETI TFK**TVTDMTA**
 51 **DIVEVGSGNA DIFLWSQPLK** NYLDIPQDV ANIDLIPSSS TFTALAINLA
 101 SNIYDSTKQG EIVVK**VNGPG DYETIQGVQI PGLVYKNSLD AFGSNWVDIT**
 151 **QVDPNDRNIE FNPGVKKIR QALQLIVDRS FLVNGIYQGS ANPMLTAIRS**
 201 GHPAYEWVAD IPEELGVTSV ADVATAQQLM EAINELNQI YAEYGYQLVF
 251 **KDDPLAPGGK WLYFVYPDGT EVPVEVNFLI RVEDERLDLG RQIANWIESY**
 301 LWIKVNRIER TRT**IVTPLVY GINPIQTSIDT IGGRLWHLYT EGWVSVTDDP**
 351 IYWAR**YDVAF FYAPLRGYGP NHRVQDWFW FNPEMYELGY KLYFGNYTPD**
 401 **QVDQLREDIR TLTRLGLEEV PRVFLTENLE FFPINKNRVT GLIFGTTTGL**
 451 WSMWGIRTSR TVDGNLTIV FSAAGALFLS PWNPVLGFTD IYSEVIR**YQV**
 501 **ADFGMYAHPV TGIPVPIRES WNVEVNPDG PVPDDAMVYD PVENKWITVG**
 551 EAKA**QGKDYI PGVGSVVSEG AQASAKVTFD FVLGKWHDGT DMTLADILGV**
 601 LAFYYEWA FD DSQITGQPDP YYDSEIDGAV TGTLLELIYGI KIVDEDTIEV
 651 YTPYLDVDP A LIASTIDMWV WTPLHMI AL EKA**VVEDPGG TNYGWTDREA**
 701 **TGEIAV DLLK HPDVIAQM AS ELVGQPEALK YVNGLNLLSQ SDMDARLQAY**
 751 **VNFINEKGHA VVFNGPFMVE SYDPNANVME LVFFEDYPLG KGFIPPOLLE**
 801 **VTRNNVYGTI ETAPPTTTTE TTPTETTTTE TTTTETETTP TETTPAQTVV**
 851 ITKTVEKT VT QVQTETVTKT QVETQTETVT ATTTVTTGVS TTVLAAIIIL
 901 II LAAA AFFY LRRQG

5/1, domnevno ABC prenašalec, substrat-vezni protein, pI 4,90

1 MGQTNR RTTI YIAAVILIA II AAALYIAT RQAPETVETE TETAAETTPA
 51 TKTEAQMV EL KPLTGNVRED IVNIARY**LSA NGVTEAKYRV HGSGDPNSIM**
 101 **RVYGGIVEAAA RLNLKILEEEG VNFKIVIEDI KFSANADEPA KVFFQSFPPLK**
 151 **QEADIIAVSY RWISTFAKEG YLLDITDYAN AYMGSELEDY YDSLWSSVTY**
 201 KGRIYALPQD TEARPLYILK PVMECLGYDA WDIAAK**IDSG EYTWKDVMRI**
 251 AKE**AVIDKGCS EWGVIHRKGS AHPDLVQFY AFGGEFTGSD PDKLYLNLEA**
 301 LYKWLAVEYA LAR**NGLTPEN MLEWDWAKQI HPTIVSAKTA FDIGGTWYWT**
 351 **EWQTKKYYTD PQTGEQRGLT PEEVKERFAY SLFPAGEPK SPVTL SQPFV**
 401 WMISANAGK I NPKYDDLKEA YHRIAFL LIL KANDPDLVAI HSIVSAHIP
 451 REKA**ALLMDD QEFVGKLAQG NLDMFVSDEA REAFVEIAKK TAHPINIEFL**
 501 KNVTYMLEYT HIPPLHPSYQ PLAEFF**KDAV DFVLKGQMTP EEATNYVVQK**
 551 **IRADPELAET IEIVGSIPSG WQISP**

6/1, ABC prenašalec, substrat-vezni protein, pI 5,01

1 MSSRRSLRRG EATSRYLLVG AAI VVIIILL ALGYYFYSQG AAETTTGPLT
 51 GEAGEGAETT PETTTSPAAT ETPGEVTLIW ASTQLVPPTE QQFVK**EELL**P
 101 **PFTQETGIKV EFIGMSYGDL NVRLQSEMES GKVTISLIAD LHGGLDLYAS**
 151 KGWL EDLSK**F GALEGREFPQ VLEDYSRLYI G IKAYVPWLTA TYVFVNVKEA**
 201 FK**YLPPGLSE EDVITGSEKW TYDALLEWAK NIEAATGQKP LGFPAGPKGL**
 251 **FHRFLHGYLY PSFTGAQVKN FDSPEAVQMW SYLKELWNYV HPQSTVYEAM**
 301 AAPLLNGEVL IAWDHTARIK DAI**VQKPDEF VVVPAPAGPK GRGYILVIVG**
 351 LAIPK**NAPHQ DAAWKLIEYL TRPEVQSLIL EKVGFPAVS GVSEK LPEGP**
 401 LK**VLAQGVGN QLNTPDSLVA LIPSLGEK GG DFRNTYREAF K AIVLEGKDP**
 451 **QQVLPELKQY LLSLFQATGA SLPPPDE**

Nadaljevanje, priloga C: Preglednica z AK zaporedji šestih različnih ABC prenašalcev
11/1, ABC prenašalec, substrat-vezni proteinski prekurzor, pI 5,04

1 MSNSRSIGVR IAIAALIIVF IIVAAWQLFT TPGGETASP TTETVASPT
51 EAPKETIAPE VNNPPYAIAR ASSLFAKVGE VIEFDGTL SK DPDGKIVEYV
101 WDFGDGTAF GAKVSHAYEL PGSYIVVLTV KDDKGAVDTN DETLLYITVE
151 IGDIPQSPDS PPVAVISSDK DIVTPGEEVS FDGSSSWAWV EKKEDDKVSI
201 VKSVEAITEY VWDFGDGT TA TGKSVTHTFE KPGSYPVKLT VKAVNGKTAS
251 AIKTIRVVEE KKGPAIQLKH PDTIIVARIG EPQGLDPAFA HDTASAEIID
301 NVYERLVWTT KNFKEIKPWL AERWEIKDNG TTYIFYIRKG VKFHNGEELT
351 AYDVEYSFKR LLVLDLPQGH VRQIKPFLID EWDPDQIDQA IRAIDKYTVV
401 FKLKKPFAPF LRILASDYAF VIINKKWAIE HGDWDPSLPK SEWSKFRGKI
451 NDYIMRNPMG TGPYKMEWV PGQRIVLERF EDYWQGPAPT KRVVIMFVPE
501 LSTRLLMLKN GDVDIADIPV SYKSQVENVP GITIFTGAAT NVVEFIQFNF
551 NISKIPEGDT IWPDFFTDVN VRKAFAYA FP YEEFIEKAYQ GLAIRARACV
601 PPGWPGYVEA YNYEYDPEKA AEYFKKAWGG RVWEEGFVIT AFYNAGNEQR
651 RIALELLAES LQKINPKFKL RVQALDWPVY LEKMENFELP LFAIGDWINY
701 LDPHIAVEQQ LASYSILFQSL GGGYSNPKVD ELIKQAALET DPQKREELYK
751 QIQLIALRED VPQIYTVYPT VFVVMRDWI Q GYFYNPFYGG IWYYALT KG

Priloga D: Obdelava izbranih AK zaporedij ABC prenašalcev z računalniškim programom CLUSTAL 2.0.8 in Legenda

CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment

sequence1	-----MALEDRRLLIAAGAVVVVIVILAAVYLMGGGEGAPETVTSPTEETTPAATTPT	52
sequence6	-----MSNSRSIGVRIAIAALIIVIFIIVAAWQLFTTPGGGETASPTTTETVASPTEAP	53
sequence4	-----MGFQTNRTTIYIAAVILIAIIAAALYIATRQAPETVETETET--AAETTPA	50
sequence5	MSSRRSLRGEATSYLLVGAAIVVIILLALGYYFYSGQAAETTTGPLTGEAGEGAETT	60
sequence3	-----MRTSLARILIAAVMIAIFILPSIPLVTLASAQAGQPVEITFKTVTDMTADI	52
sequence2	-----MNWAKIGAVLLALALIAPVLFATPALYTAAAQPTTITIGALLPLTGDL	48
: : : : :		
sequence1	ETGTETPTETQPAQTTPAETTPPEGPQAMVIETSKAFFVVVGPGAYVPDFDPKGKPVIAV	112
sequence6	KETIAPEVNNPPYAIARASSLFAKVGEVIEFDGTLSKDPDGKIVEYVWDFG---DGTTAF	110
sequence4	TKTEAQMVELKPLTGNVREDIVN-----IARYLSANG----VTEA	86
sequence5	PETTTSPAATETPG-----EV	76
sequence3	VEVGSGNADIFLWSQPLKNYLDIPQDVMANIDLIPSSSTFTALAINLASNIYDSTKQGEI	112
sequence2	QSYGVR-----AQAAV	59
: : : : :		
sequence1	KFQVDEENTKPVEESVSFVDINPAFYRNEYADALIMVGRK-----SADP	156
sequence6	GAKVSHAYELPGSYIVVILTVKDDKGAVDNTDETLLYITVE-----IGDI	154
sequence4	KYRVHGSGDPNSIMRVYGVIEAAARLNKILEEEGVNFKIV-----IEDI	130
sequence5	TLIWASTQLVPPTEQQFVKEELLPPFTQETGIKEFIGMS-----YGDL	120
sequence3	VVKVNGPGDYETIQGVQIPGLVYKNSLDAFGSNWVDITQVDPNDRNIEFPFGVKKIRQA	172
sequence2	QVAVEDVNAYLESKNAWFRLDLKVEDTQTKPDVAVQKFNS-----LVAQG	104
: : : : :		
sequence1	FIREAVYEAVYKLSNEEVPIILWLQGYKVVVFVYWSWVKGLYYHPTLDIFDLISEDPNAPV	216
sequence6	PQSPDSPPVAVISSDKDIVTPGEEVSFDGSSSWAWVE-----KKEDDKVSIVKSVEAITE	209
sequence4	KFSANADEPAKVFQQS---FPLKQEADIIIAVSYRWIS-----TFAKEGYLLDI	175
sequence5	NVR-----LQSEMESGV	133
sequence3	LQLIVDRSFLVNGIYQGSANPMLTAIRSGHPAYEWVADIPEELGVTSADVATAQQLMEE	232
sequence2	IKFIVG-----PMTSA	115
: : : : :		
sequence1	VDLGFGGYSNGP-----NTWVDVTFGWPDTFDPAAODYETFGWHIWHN-----	258
sequence6	YVWDFGDGTAT-----GKSVTHTFEKPGSYPVKLTVKAVN-----	245
sequence4	TDYANAYMSEL-----EDYYDSLWS-----	196
sequence5	TISLIADLHGGL-----DLYAS-----	150
sequence3	AINELNQIYAEYGYQLVFKDDPLAPGGKWLIFYVYPDGTEVPVEVNFLIRVEDERLDGCRQ	292
sequence2	EVKKLKDLADQN-----	127
: : : : :		
sequence1	IGQTLVTFWKDDETTELTPELAVAWAHNEDSTEWYFVIRGGVKAFDNWNNKTYDVTAVDVL	318
sequence6	-GKTASAIAKTIRVVEEKKGPAIQLKHPTDIIVARIGEPQQLDPAFAHDTASAEEIIDNVYE	304
sequence4	-----SVTYKGRIYALPQDTEARPLYILKPKVMECLG-----YDAWDIAAKIDSGEYT	244
sequence5	-----KGWLEDLSKFGALEGREFPQVLEDYSR-----LYGIKAYVPWLATY	192
sequence3	IANWIESYLWIKVNRIERTRTIVTPLVYGINPIQTSDTIGGRILWHLYTEGWVSVTDDPIY	352
sequence2	-----NVLIISPSSTAIELKIAAGDNVFRFCP-----TDDVQSKAIGALA	166
: : : : :		
sequence1	FTIWRARIQLSLDPSWMITEFVDVNNSQLTEEEFNQ-LLGQGGIY--ASYGGFSGEVKSL	375
sequence6	RLVWTTKMFKEIKPWLAERWEIKDNGTTIIFYIRKG-VKFHNGE--LTAYDVEYSFKRL	361
sequence4	KDVMRIAKEAVDKG--CSEWGVIRKGSAHPDLVQF-YAAGGEF--TGSD---PDKLY	295
sequence5	VFVVNKEAFKYLPPGLSEEDVITGSEKWTYDALLEW-AKNIIEATGQKPLGFPAQPKGLF	251
sequence3	WARYDVAFFYAPLRGYGPNHRYQDWFWFNPEMYELGYKLYFGNYTPDQVDQLREDIRTL	412
sequence2	RDLGLKGAVIINRADTWGNGLMEATKEVLENEGVEVASVSYNPESPNFSGIASQANGDV	226
: : : : :		

Nadaljevanje, priloga D: Obdelava izbranih AK zaporedij ABC prenašalcev z računalniškim programom CLUSTAL 2.0.8 in Legenda

sequence1	DELLQAFG-----	YSGGTAGVVKIKLYYPYA	401
sequence6	LVLDPQG-----	HVRQIKPFLIDEWDPDQI	387
sequence4	LNLEALYK-----	WLAVEYALARNGLTPENM	321
sequence5	HRFLHGYL-----	YPSFTGAQVKNFDSPEAV	277
sequence3	TRLGLEEVPRVFLTENLEFFPINKRVTGLIFGTTGLWSMWGIRTSRTVDGNLTVIEFS		472
sequence2	ESLVSKYG-----	KDKVAVVAIGFKEVVELF	252
:			
sequence1	PILSIFADPFTSVIPMKYIFDNVEELQG-KYEEALEASN-----	YGKNPAWEAYI	451
sequence6	DQAIRAIKDKYTVVFKLKKPFAPFLRILASDYAFVIINKK-----	WAIEHGDWDPSI	438
sequence4	LEWDWAKQIHPIHTIVSAKTAFD---IGGTWYWTEWQTKK-----	YYTDPPQTGEQRG	368
sequence5	QMWSYSLKEWLWNVVHQPSTVYE---AMAAPLLNGEVЛИA-----	WDHTARIKDAIV	324
sequence3	AAGALFLSPWNPNVLGFTDIYSEVIRYQVADFGMYAHPPVTGIPVPIRESWNVEVNPDGIPV		532
sequence2	SAAADYETLESVLWIGSDGTAQLSEFTTDPLAREFSVST-----	LFINPLFSPA	301
:			
sequence1	GTGENEPS---HILLHQKPIATGPYYVKDYKEGSYIILEYNPYYWNKELWQDLYG-QDK		506
sequence6	PKSEWSKFRGKINDYIMRNPMGTGPYKMVEWVPGQRIVLERFEDYW-----	QGP	487
sequence4	LTPEEVKER---FAYS LFPAGEPGKSPVTL SQPFVWMISAN-----	AGK	409
sequence5	QKPD-----EFVVVPAPAGP-----		339
sequence3	PDDAMVYDPVENKWITVGEAKAQGKDYIPGVGSVVSEGAQASAKVTFDFVLGKWHDTDM		592
sequence2	ATEAQEKVR---QEVVAKIGEE-----		320
*			
sequence1	PQHELAIFIINDDAVSRIETMKSGQAD-----TGAIPLDR---LEDIKGYALEG		552
sequence6	APTKRVVIMFVPELSTRLLMLKNGDVD-----IADIPVSYKSQVENPGITIFT		536
sequence4	LNPKYDDLKEAYHRIAFLLLILKANDPD-----LVAIHSIVSAHIPREKAALLM		458
sequence5	-KGRGYILVIVGLAIPKNAHQDAWK-----LIEYLTRPEVQSLILEKGFFP		387
sequence3	TLADILGVLAFYEWAFDDSQITGQPDPPYYDSEIDGAVTGTLELIYGIKIVDEDTIEVYT		652
sequence2	--PDAYS LAAYDAVWAIALALLQAGPMD-----NPDEMVN		353
.			
sequence1	TNFQIIVEEKGLSPVIVFIVLN--AMKEPFNNTKVRQALMYAIPFDQIKTSVYAGYIERL		610
sequence6	GAATNVVEFIQFNFNISKIPEGDTIWPDFFTVDNVVRKAFAYAFFYEEFIEKAYQGLAIRA		596
sequence4	DDQEUVGKLAQGNLDMFVSDEAR---EAFVEIAKKTAPHINIEFLKNVTYMLEYTHIPP		514
sequence5	AVSGVSEKLPEGPLKVLAQGVGN-----QLNTPDSLVALIPSILGEKGDFR-----		433
sequence3	PYLDVDPALIASTIDMWVWTPLHMIIALEKAVVEDPGGTNYGWTDREATGEIAV DLLKHP		712
sequence2	KVKELLPQITTSDEFAQFAATGK---FPLDEGGDRATAODYDWHIVAKIGGEYKWKAG-		408
.			
sequence1	NGVLPAGFLGHNDDIVTQYEFNIVKARELIKESG---INPSDYTIKIWYNKGNTQREKVA		667
sequence6	RACVPPPGWPGYVEAYN---YEYDPEKAAEYFKKAWGGRVWEEGFVITAFYNAGNEQRRIAL		654
sequence4	---LHPSYQPLAEFFKDAVDFVLIKQGQMTPEATN-----YVVQKIRADPEL		557
sequence5	-----NTYREAFKAIVLEGKDPQQVLP-----ELKQYLL		462
sequence3	DVIAQMASELVGQPEALKYVNGLNLLSQSDMDARLQAYVNFINKEGHAVVFNGPFMVESY		772
sequence2	-----VYKGVEDKNEWVTIEGLKTFP-----QLFQEKF		437
:			
sequence1	NMLKTIWGNLG--FNVVVEPLEWPTLLSRTEKGDFDVWIVGWAPDYLDP-----		714
sequence6	ELLAESLQKINPKFKLRLVQALDWPVYLEKMFNFEPLFAIGDWINYLDPHIAVEQQLASY		714
sequence4	AETIEIVGSIPSGWQISP-----		575
sequence5	SLFQATGASLPPPDE-----		477
sequence3	DPNANVMELVFFEDYPLGKGFIPPQLLEVTRNNVYGTIEТАPPTTTETTPTETTTETT		832
sequence2	TPAETETETSPSPPTQAEATTPTPTPEETETETAEGGVSTT-----		477
.			
sequence1	-----DNYAGPLFYGGTKFTVLDVNQFQS-----LSE		741
sequence6	SLFQSLGGGYSNPKVDELIKQAALETDPQKREELYKQIQLIALREDVPQIYTVYPTVFVV		774
sequence4	-----		

Nadaljevanje, priloga D: Obdelava izbranih AK zaporedij ABC prenašalcev z računalniškim programom CLUSTAL 2.0.8 in Legenda

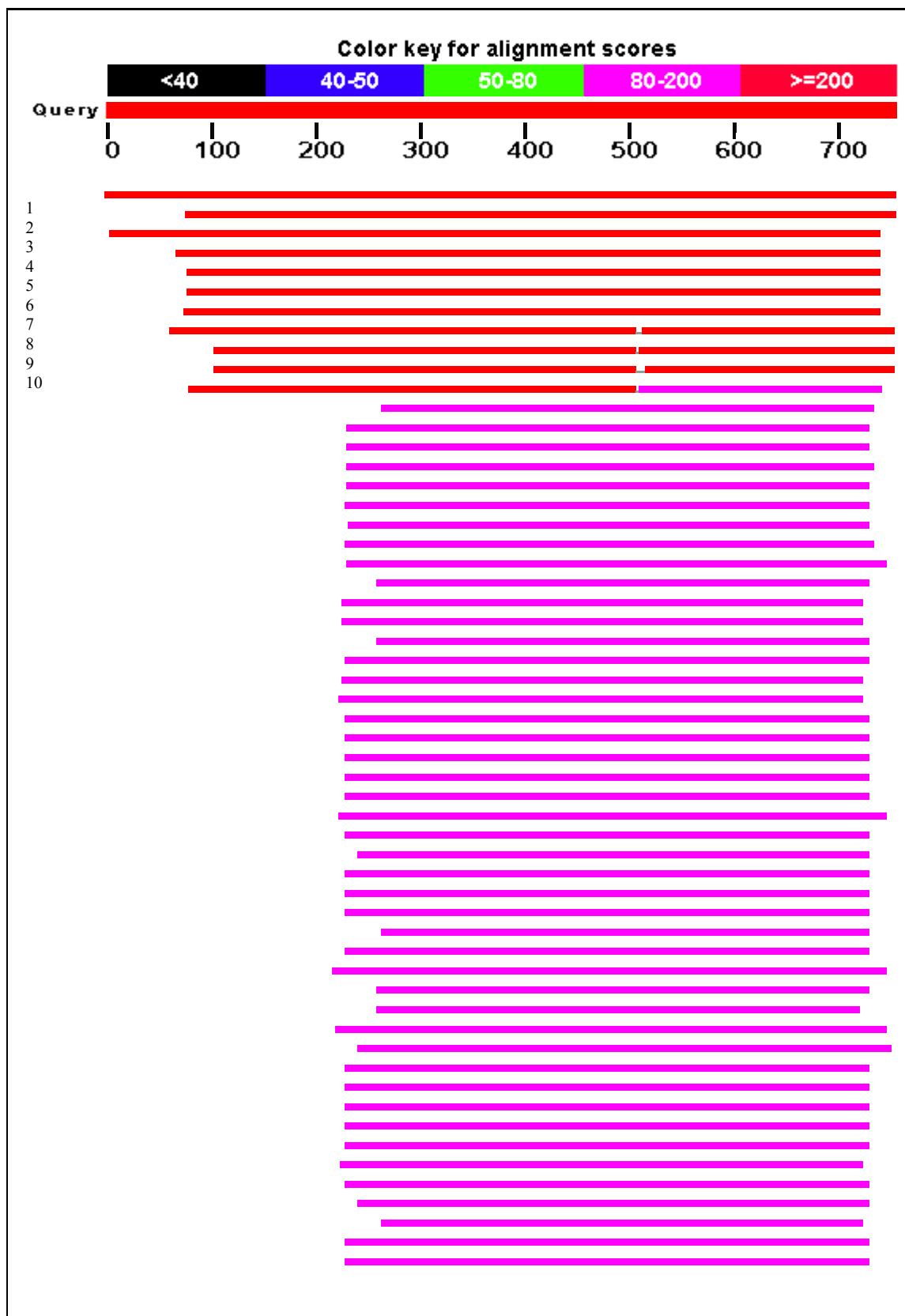
sequence5	-----	
sequence3	TTETETTPTE TPAQTVVITKTV EKT TV KTQV QTET VTKT QVE TQ ET TVT AT TTV TTGVSTT	892
sequence2	-----	L 478
sequence1	LRAFFSG -----	748
sequence6	MRDWI QGYFYNPFYGGIWYYALT KG	799
sequence4	-----	
sequence5	-----	
sequence3	VIAAIIILITLAAAFFY ILRRQG--	915
sequence2	IAAIIIIIVIVIAAAAYFFLRSR --	500

Legenda:

Oznake:

- » * « pomeni homologijo v zaporedjih aminokislin v razporeditvi vseh sekvenc
- » : « pomeni visoko podobnost v zaporedjih AK v razporeditvi vseh sekvenc
- » . « pomeni srednjo podobnost v zaporedjih AK v razporeditvi vseh sekvenc

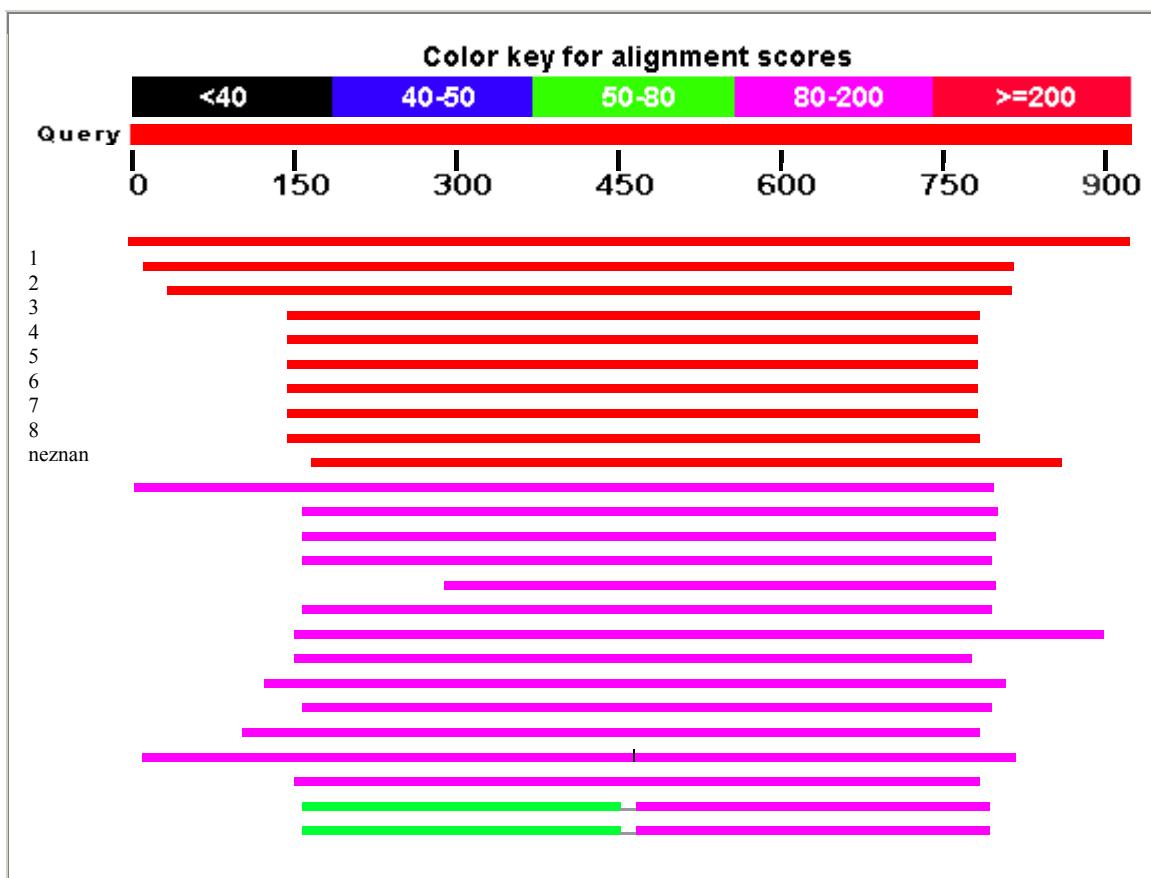
Koda aminokisline	Barva	Funkcionalna skupina	
AVFPMILW	RDEČA	majhne + hidrofobne, vključno z aromatičnimi (brez aminokisline tirozin)	
DE	MODRA	kisle	
RK	PINK	bazične (brez aminokisline histidin)	
STYHCNGQ	ZELENA	hidroksilne + sulfhidrilne + amido + aminokislina glicin	
Ostale	SIVA	/	
Aminokislina	Oznaka	Aminokislina	Oznaka
alanin	A	leucin	L
arginin	R	lizin	K
asparagin	N	metionin	M
asparaginska kislina	D	fenilalanin	F
cistein	C	prolin	P
glutaminska kislina	E	serin	S
glutamin	Q	treonin	T
glicin	G	triptofan	W
histidin	H	tirozin	Y
izolevcin	I	valin	V



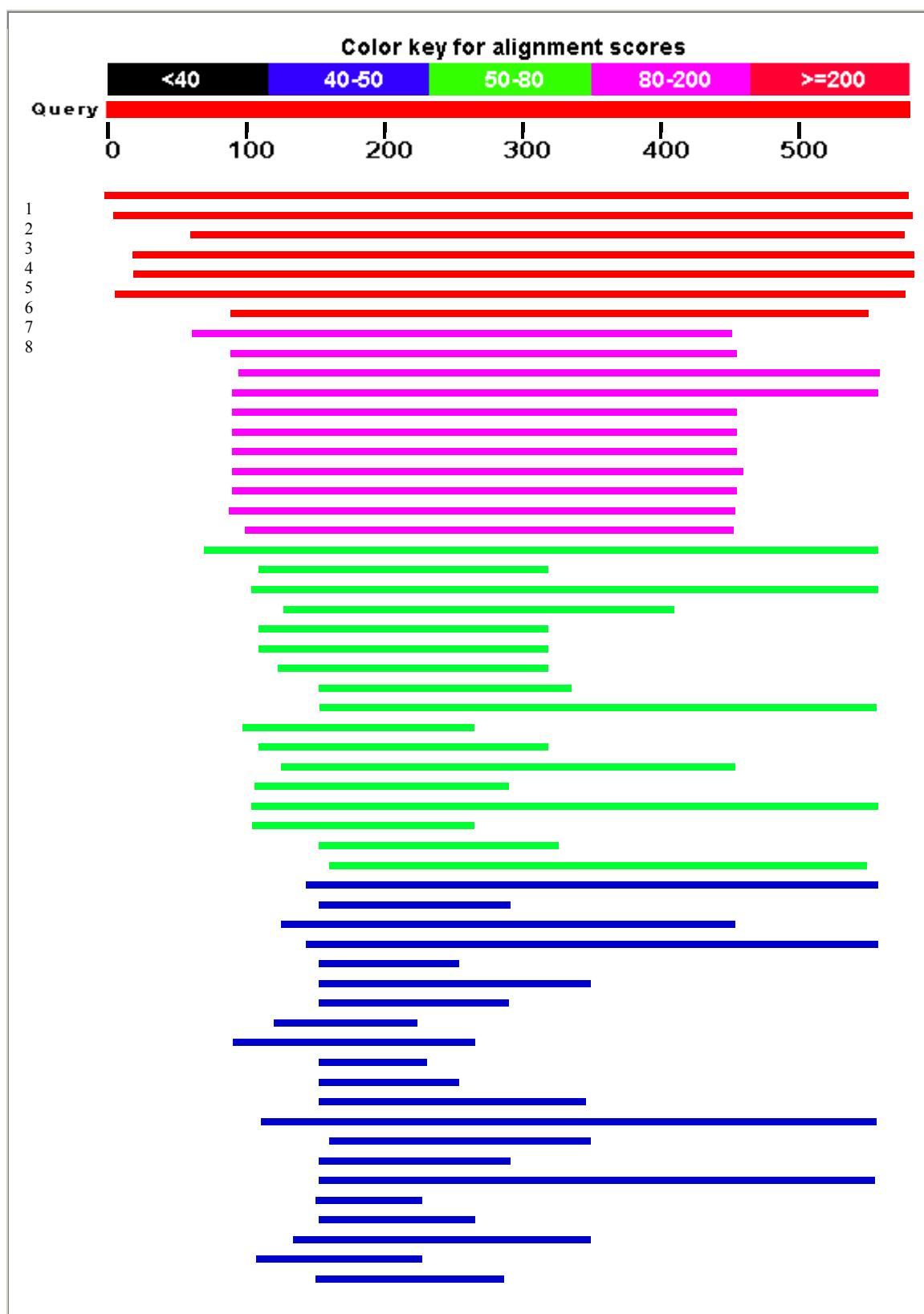
Priloga E: AK zaporedje 1: ABC prenašalec, substrat-vezni proteinski prekurzor, pI 4,48



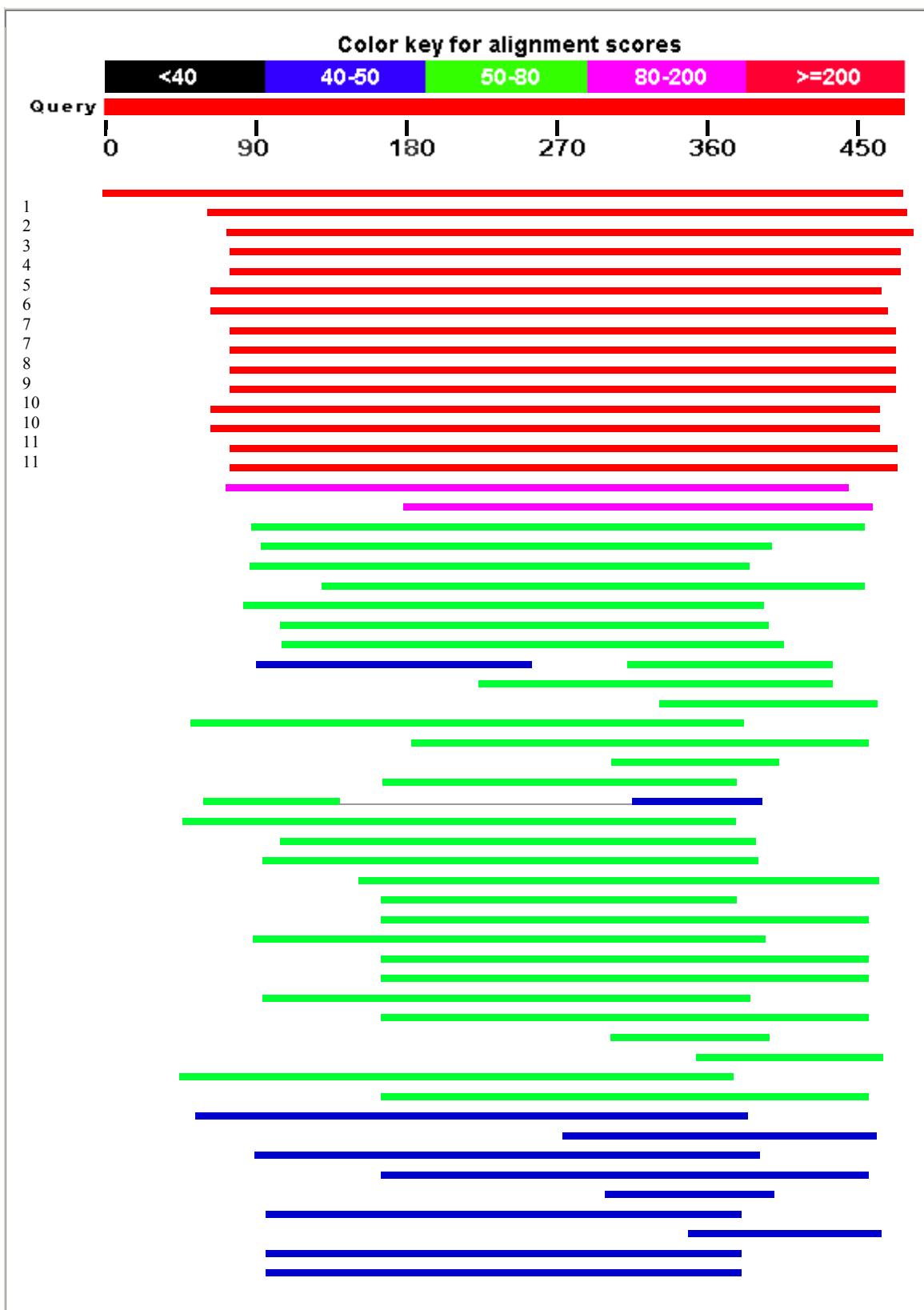
Priloga F: AK zaporedje 2: ABC prenašalec aminokisline z razvejano stransko verigo, pI 4,44



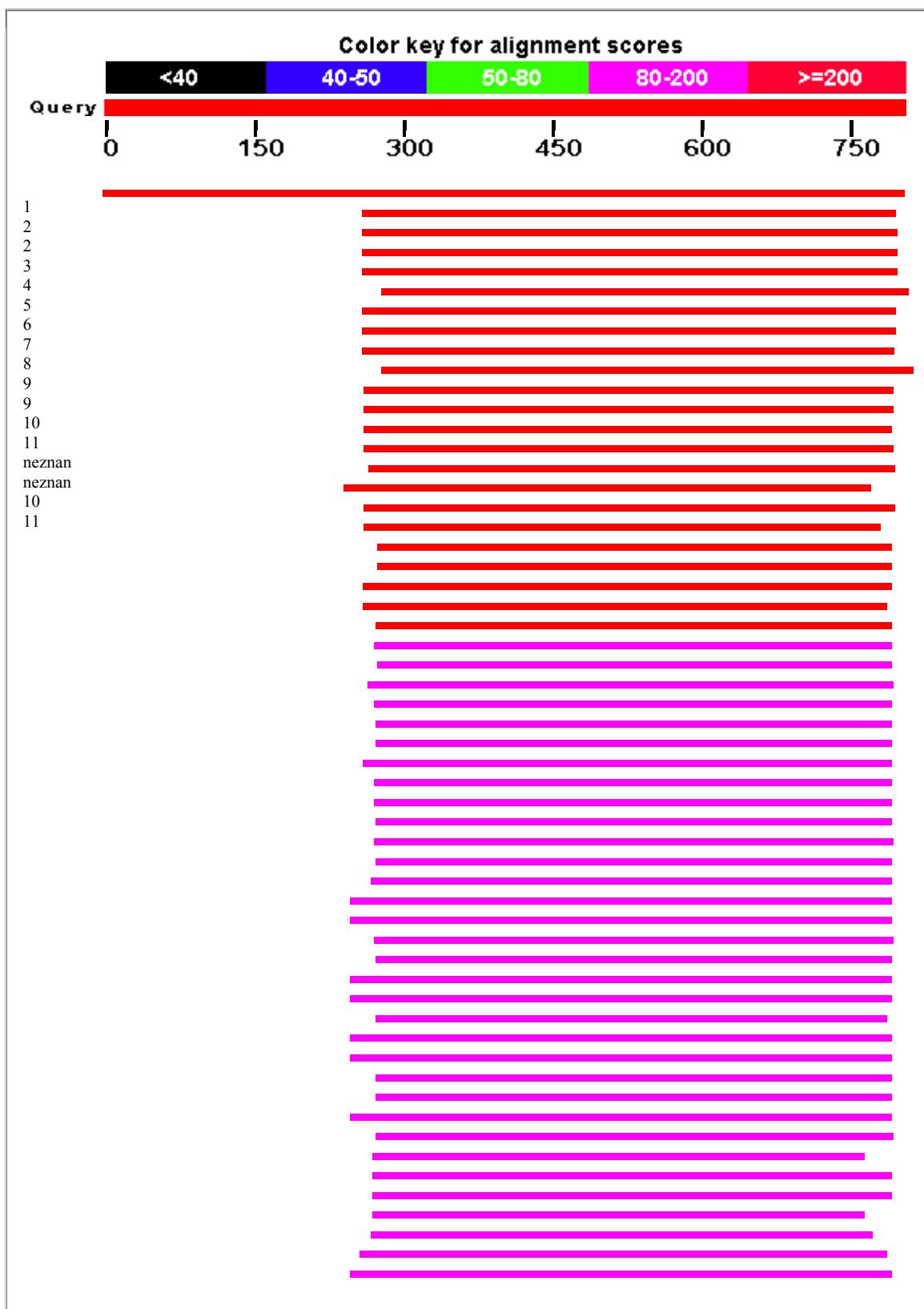
Priloga G: AK zaporedje 3: Oligopeptidi ABC prenašalec, pl 4,33



Priloga H: AK zaporedje 4: domnevno ABC prenašalec, substrat-vezni protein, pI 4,90



Priloga I: AK zaporedje 5: ABC prenašalec, substrat-vezni protein, pl 5,01



Priloga J: AK zaporedje 6: ABC prenašalec, substrat-vezni proteinski prekurzor, pI 5,04