

VILNIAUS UNIVERSITETAS

ANDRIUS JASILIONIS

Peptidazių iš *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325 kolagenolizinio
aktyvumo analizė: M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio
oligopeptidazės ir U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės
charakterizavimas

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, biologija (01B)

Vilnius, 2016

Disertacija rengta 2011 – 2015 metais Vilniaus universitete

Mokslinė vadovė – prof. dr. Nomeda Kuisienė

(Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

... charakterizuoti objektus, kurie yra, tokiais, kokie jie yra...

De arte venandi cum avibus

Turinys

Santrumpų sąrašas	7
Įvadas	8
Tikslas	9
Uždaviniai	9
Ginamieji teiginiai	9
Mokslinis naujumas	10
1. Literatūros apžvalga	12
1.1. Kolageno struktūra ir erdvinės struktūros organizacija	12
1.2. Bakterijų kolagenolizinės peptidazės	17
1.3. Bakterijų metalo oligopeptidazės	24
1.4. Nenustatyto katalizinio mechanizmo fragmentiškai charakterizuotos bakterijų kolagenolizinės peptidazės	27
1.5. Geobacilų kolagenolizinės peptidazės	38
2. Metodai	41
2.1. Nukleorūgščių elektroforezė	41
2.2. Baltymų elektroforezė	41
2.3. Bioinformatinė analizė	41
2.4. <i>G. thermoleovorans</i> DSM 15325 kultivavimas	42
2.5. <i>G. thermoleovorans</i> DSM 15325 viduląstelių ir ekstraląstelių baltymų išskyrimas	43
2.6. <i>G. thermoleovorans</i> DSM 15325 kolagenolizinių peptidazių identifikavimas	43
2.7. GT-SM3B geno klonavimas	44
2.8. Rekombinantinės GT-SM3B raiškos įvertinimas bei produkavimo optimizavimas	45
2.9. Rekombinantinės GT-SM3B gryninimas	46
2.10. Kiekybinis oligopeptidolizinio aktyvumo įvertinimas	47
2.11. Kinetinė oligopeptidolizinio aktyvumo analizė	47
2.12. GT-SM3B hidrolizinio aktyvumo įvertinimas	48
2.13. Temperatūros ir pH įtakos GT-SM3B aktyvumui ir stabilumui charakterizavimas	48
2.14. Metalų jonų, chelatorių bei kitų junginių įtakos GT-SM3B aktyvumui charakterizavimas	49
2.15. GT-IU32 geno transkripcijos analizė	49
2.16. GT-IU32 geno klonavimas	50
2.17. Rekombinantinės GT-IU32 raiška ir gryninimas	51
2.18. GT-IU32 identifikavimas <i>G. thermoleovorans</i> DSM 15325 citoplazmoje	52
2.19. Rekombinantinės GT-IU32 oligomerizacijos charakterizavimas	53
2.20. Kalcio ir cinko jonų įtakos GT-IU32 termostabilumui įvertinimas	54
2.21. GT-IU32-CGD preparato produkcija	54
2.22. GT-IU32-CGD kristalinimas bei rentgeno spindulių difrakcijos duomenų surinkimas ir apdorojimas	56
2.23. GT-IU32-CGD erdvinės struktūros sprendimas ir analizė	56
2.24. GT-IU32 sąveikos su RNR analizė	58
2.25. Zimografija	60
2.26. Kiekybinis azokolio hidrolizės įvertinimas	61
2.27. Baltymų koncentracijos įvertinimas	61
2.28. Statistinė analizė	61

3. Rezultatai ir rezultatų aptarimas	62
3.1. Konstitutyviai <i>G. thermoleovorans</i> DSM 15325 produkuojamos kolagenolizinės peptidazės...	62
3.2. M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimiui priskirtina <i>G. thermoleovorans</i> DSM 15325 oligopeptidazė....	68
3.2.1. GT-SM3B sekos analizė	69
3.2.2. Rekombinantinės GT-SM3B optimizuota produkcija	72
3.2.3. Rekombinantinės GT-SM3B gryninimas	75
3.2.4. Temperatūros įtaka GT-SM3B aktyvumui bei stabilumui	76
3.2.5. pH įtaka GT-SM3B aktyvumui bei stabilumui.....	78
3.2.6. Metalų jonų bei skirtingų junginių įtaka GT-SM3B aktyvumui	79
3.2.7. GT-SM3B homodimerizacija bei substratinis specifiskumas.....	81
3.2.8. GT-SM3B funkcinė svarba <i>G. thermoleovorans</i> DSM 15325	84
3.3. U32 proteolizinių fermentų šeimai priskirtina <i>G. thermoleovorans</i> DSM 15325 peptidazė...86	
3.3.1. GT-IU32 sekos analizė	87
3.3.2. GT-IU32 geno transkripcija <i>G. thermoleovorans</i> DSM 15325	94
3.3.3. Viduląstelinė GT-IU32 raiška <i>G. thermoleovorans</i> DSM 15325	96
3.3.4. GT-IU32 oligomerizacija.....	98
3.3.5. Kalcio ir cinko jonų įtaka GT-IU32 termostabilumui	101
3.3.6. GT-IU32 aktyvumas bei substratinis specifiskumas	103
3.3.7. GT-IU32 kristalinimas.....	105
3.3.8. GT-IU32-CGD kristalinimas ir erdvinės struktūros sprendimas.....	107
3.3.9. GT-IU32-CGD erdvinė struktūra	108
3.3.10. GT-IU32-CGD erdvinei struktūrai giminingos erdvinės struktūros baltymai ..	110
3.3.11. GT-IU32 sąveika su RNR.....	111
3.3.12. GT-IU32 funkcinė svarba <i>G. thermoleovorans</i> DSM 15325	117
4. Rezultatų apibendrinimas	120
Išvados	129
Literatūros sąrašas	130
Publikacijų sąrašas.....	154
Bendradarbiavimas	155
<i>Curriculum vitae</i>	156

Santrumpų sąrašas

2-ME – 2-merkaptoetanolis

AT-PGR – atvirkštinės transkripcijos PGR

DTT – ditionitritolis

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis

EGTA – etilenglikolio tetraacto rūgštis

IPTG – izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas

L – Luria

LB – Luria-Bertani

NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato-poliakrilamido gelio elektroforezė

mM9 – modifikuota M9

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

PMSF – fenilmetansulfonilfluoridas

TCEP – tris(2-karboksietil)fosfinas

GT-KP100 – *G. thermoleovorans* DSM 15325 100 kDa kolagenolizinė peptidazė

GT-KP120 – *G. thermoleovorans* DSM 15325 120 kDa kolagenolizinė peptidazė

GT-KP130 – *G. thermoleovorans* DSM 15325 130 kDa kolagenolizinė peptidazė

GT-SM3B – *G. thermoleovorans* DSM 15325 sekretuojama M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio peptidazė

GT-IU32 – *G. thermoleovorans* DSM 15325 ilgosios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazė

GT-IU32-NGD – *G. thermoleovorans* DSM 15325 ilgosios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės N-galinis domenas

GT-IU32-CGD – *G. thermoleovorans* DSM 15325 ilgosios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės C-galinis domenas

GT-TU32 – *G. thermoleovorans* DSM 15325 trumposios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazė

Įvadas

Proteolizinių fermentų* – peptidinio ryšio hidrolazių – svarba organizmams daugialypė. Katalizuodamos peptidinio ryšio hidrolizę peptidazės užtikrina daugelį namų ūkio funkcijų bei baltymų įsisavinimą. Genomuose peptidazių genai sudaro 2-5 % visų genų (3).

Organizmų evoliucija lėmė proteolizinių fermentų specializaciją bei savitų charakteristikų derinių, optimalių funkcijų užtikrinimui, įgijimą, todėl peptidazių erdvinės struktūros, katalizinių ir reguliavimo mechanizmų charakteristikos heterogeniškos (4). Charakterizuoto katalizinio mechanizmo proteoliziniai fermentai priskiriami asparto rūgšties, cisteino, glutamo rūgšties, metalo, serino, treonino, mišraus mechanizmo peptidazėms arba asparagino liažėms, tuo tarpu nenustatyto katalizinio mechanizmo peptidazės formaliai priskiriamos vienam tipui (2, 5). Serino ir metalo peptidazės dominuoja organizmų genomuose (6). Nenustatyto katalizinio mechanizmo peptidazių genai sudaro mažiau nei vieną procentą visų peptidazių genų (2).

Proteoliziniai fermentai aktyviai tiriama, visgi didžioji peptidazių įvairovės dalis išlieka netirta (7, 2). Organizmų genomuose konservatyvių bei paplitusių galimai peptidazių genų, taip pat ir homologiškų nenustatyto katalizinio mechanizmo peptidazėms, įvairovė taip pat išlieka fragmentiškai tirta (7). Daugelio išsamiai charakterizuotų *in vitro* peptidazių funkcionalumas *in vivo* išlieka netirtas (4).

Nepatogeninių bakterijų koduojamų kolagenolizinių peptidazių įvairovė fragmentiškai charakterizuota, tuo tarpu patogeninių bakterijų kolagenolizinių peptidazių įvairovė bei funkcinė svarba detalai charakterizuotos (8, 9). Termofilinių proteolizinių bakterijų kolagenolizinis potencialas, tipišku atveju nustatomas tiriant bakterijų gebėjimą augti įsisavinant baltymus, tikslingai nebuvo tirtas (10), todėl termofilinių bakterijų kolageno įsisavinimo eiga bei fiziologinė svarba išlieka fragmentiškai charakterizuotos.

*Proteolizinių fermentų nomenklatura ir klasifikacija pateikta atsižvelgus į MEROPS duomenų bazės peptidazių nomenklatūros ir klasifikacijos rekomendacijas (<http://merops.sanger.ac.uk> (1, 2)).

Tikslas

Nustatyti *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyvių peptidazių kolagenolizinio aktyvumo svarbą kolageno įsisavinimui bei charakterizuoti M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio oligopeptidazę ir U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazę.

Uždaviniai

1. Nustatyti *G. thermoleovorans* DSM 15325 gebėjimą konstitutyviai produkuoti kolagenolizines peptidazes bei identifikuoti detektuotus fermentus.
2. Charakterizuoti *G. thermoleovorans* DSM 15325 sekretuojamą M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio oligopeptidazę.
3. Nustatyti ilgosios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės raišką *G. thermoleovorans* DSM 15325 bei charakterizuoti fermentą.
4. Charakterizuoti *G. thermoleovorans* DSM 15325 ilgosios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės erdvinę struktūrą.

Ginamieji teiginiai

1. *G. thermoleovorans* DSM 15325 gebėjimas konstitutyviai į ekstraląstelinę aplinką produkuoti kolagenolizines peptidazes atspindi proteolizinių geobacilų adaptyvų plastiškumą.
2. GT-SM3B – termostabili plataus substratinio specifiškumo cinko oligoendopeptidazė.
3. GT-IU32 charakteristikos rodo U32 proteolizinių fermentų šeimos struktūrinį bei funkcinį heterogeniškumą.
4. GT-IU32 specifiškai *in vitro* sąveikauja su dgRNR.

Mokslinis naujumas

Numatytas termofilinių bakterijų gebėjimas konstitutyviai produkuoti kolagenolizines peptidazes pirmą kartą patvirtintas detektavus *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyviai produkuotas kolagenolizines peptidazes. Charakterizavus *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyvių peptidazių kolagenolizinio aktyvumo sinergizmą, pirmą kartą nustatyta, jog termofilinės bakterijos pradeda skaidyti kolageną ekstraląstelinėje aplinkoje veikiant konstitutyvių kolagenolizinių peptidazių katabolinei kaskadai.

GT-SM3B iš *G. thermoleovorans* DSM 15325 yra pirmoji charakterizuota termofilinių bakterijų sekretuojama metalo oligopeptidazė bei pirmoji metalo oligopeptidazė, kuriai pritaikytas sekrecinis produkavimas. Nustatytų GT-SM3B charakteristikų derinys, lyginant su tirtų metalo oligopeptidazių charakteristikomis, išsiskiria, nes GT-SM3B būdingos charakteristikos anksčiau nustatytos charakterizuojant termoaktyvias metalo oligopeptidazes arba mezofilinių bakterijų metalo oligopeptidazes.

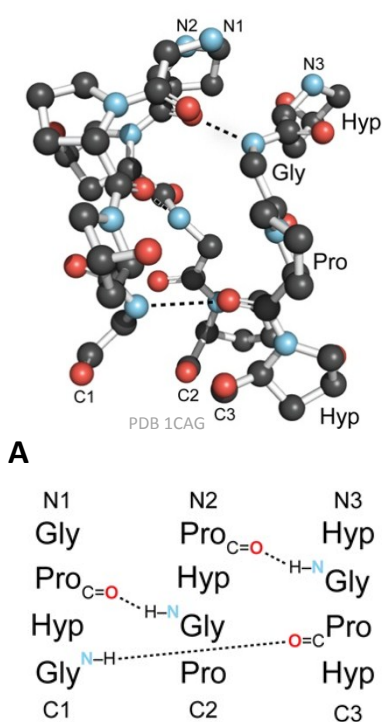
GT-IU32 iš *G. thermoleovorans* DSM 15325 yra pirmoji charakterizuota termofilinių bakterijų U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazė bei pirmoji bakterijų peptidazė, kurios specifiška sąveika su dgRNR nustatyta. Numatyta U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių modulinė domeninė organizacija pirmą kartą patvirtinta charakterizavus GT-IU32 domeninę organizaciją. Izoliuotas GT-IU32-CGD – pirmasis išspręstos erdvinės struktūros U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių domenas – išlieka vieninteliu charakterizuotos erdvinės struktūros U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių domenu, kurio funkcijos tiesiogiai nesietinos su katalizinio aktyvumo užtikrinimu.

Mokslinė reikšmė

Konstitutyvių kolagenolizinių peptidazių svarbos termofilinių bakterijų kolagenolizinio potencialo užtikrinimui charakterizavimas įgalina nuosekliai suvokti kolagenolizinio potencialo funkcinę svarbą bei kolageno skaidymo eigą. Charakterizavus GT-SM3B apibrėžtas oligopeptidazės biotechnologinis pritaikomumas. GT-SM3B ir GT-IU32 charakterizavimo rezultatai reikšmingi M3 ir U32 proteolizinių fermentų šeimų peptidazių savybių bei funkcinės svarbos suvokimui. *G. thermoleovorans* DSM 15325 kolagenolizinio potencialo bei kolagenolizinių peptidazių charakterizavimo rezultatai svarbūs siekiant plėtoti termofilinių bakterijų proteolizinių fermentų tyrimus.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Kolageno struktūra ir erdvinės struktūros organizacija



1 pav. Kolageno superspiralės erdvinė struktūra. A: superspiralės grandinių išsidėstymas; B: superspiralės grandinių sudaromos jungtys (11).

prokariotams nebūdingą fibrilinį kolageną. Patogeninėms bakterijoms kolagenazės – fibrilinio kolageno proteazės užtikrina virulentiškumą bei netiesiogiai svarbios mitybai, tuo tarpu nepatogeninėms bakterijoms kolagenazės užtikrina galimybę įsisavinti fibrilinį kolageną mitybai (13, 9).

Fibriliniam kolagenui būdinga hierarchinė struktūros organizacija bei gebėjimas suformuoti makromolekulinius agregatus. Stuburinių gyvūnų fibrilinio kolageno struktūrai būdingos tipinės struktūros charakteristikos, tačiau skirtingų baltymų struktūrose taip pat charakterizuoti fibrilinio kolageno struktūrai tipiški elementai (14). Baltymo struktūra, analogiška kolageno erdvinei struktūrai, jei baltymo erdvinėje struktūroje dominuoja trijų polipeptidinių grandinių formuojama superspiralė, kurios kiekvienos grandinės sekoje vienas ar kelis motyvai formuojami kartotinio motyvo Gly-Xaa-Xaa (15).

Kolagenas – esminis organizmų struktūrinis baltymas (1 pav.) (11). Archėjų ir bakterijų genai koduoja kartotinį aminorūgščių Gly-Xaa-Xaa motyvą, užtikrinantį kolageno erdvinę sanklodą, taigi prokariotų baltymų erdvinei struktūrai būdingi struktūros elementai, analogiški kolageno erdvinei struktūrai (12). Prokariotams pirmiesiems išnaudojus kolageno erdvinės sanklodos užtikrinamą funkcinį potencialą ir neišvengiamai susidūrus su būtinybe peptidolizuoti kolageną, ilgainiui prokariotų peptidazės pirmosios įgijo kolagenolizinį aktyvumą (8). Daugialąsčiuose kolagenas tapo būtinu ekstraląstelinio matrikso struktūrizuotumo užtikrinimui. Prokariotų kolagenolizinės peptidazės ilgainiui įgijo gebėjimą proteolizuoti

Tipišku atveju pastarieji struktūros elementai užtikrina baltymo gebėjimą spontaniškai formuoti makromolekulinius agregatus ekstraląstelinėje aplinkoje (16). Baltymai, kurių erdvinės struktūros organizacijoje dominuoja globuliniai domenai, tačiau būdingas taip pat ir analogiškai kolagenui superspiralizuotas domenas, charakterizuoti, bet superspiralizuota erdvinės struktūros sankloda tipiška tik fibriliniam kolagenui (14).

Charakterizuota daugiau nei trisdešimt stuburinių kolageno tipų, tačiau skirtingų kolagenų tipų erdvinėse organizacijose charakterizuotos analogiškų struktūrinių charakteristikų superspiralės. Detaliai charakterizuota I, II bei III tipų kolageno superspiralių erdvinė struktūra. Fibrilinio kolageno superspiralės sankloda – išėsta kairiojo sukinio II tipo poliprolino spiralė. Spirālės jungtys tik *trans*-izomerinės (17). Kolageno superspiralės topoizomerizacija *in vitro* ar *in vivo* nėra nustatyta (18). II tipo poliprolino spiralės saklodą užtikrina Gly-Xaa-Xaa motyvas, tipišku atveju antroji motyvo aminorūgštis – prolinas, trečioji – 4-hidroksiprolinas (11). Visgi skirtingų kolageno tipų kartotinio motyvo sekose identifikuotos taip pat ir kitos aminorūgštys. Motyvo sekos variabilitas svarbus, nes įgalina skirtingų kolageno tipų molekulėms įgyti savitas struktūros charakteristikas, svarbias kolageno tipų funkcionalumo specializacijai. Kolageno superspiralės šerdyje išsidėsto glicino C_α atomų vandenilio atomas, tuo tarpu aminorūgščių radikalai išsidėsto superspiralės išorėje, todėl nėra izoliuoti ir gali sudaryti skirtingos struktūrinės ir/ar funkcinės svarbos sąveikas (1 pav.) (17). Charakterizuotos dvi II tipo poliprolino spiralės sūchio periodiškumo simetrijos. Esminė superspiralės simetrija 10/3 – trys sūčiai dešimties aminorūgščių liekanų sekai, 26,8 Å ašinis pasikartojimas, tačiau superspiralės grandinės taip pat gali išsidėstyti simetrija 7/2 – du sūčiai septynių aminorūgščių liekanų sekai, 20 Å ašinis pasikartojimas (14, 11). Jei kolageno kartotinio Gly-Xaa-Xaa motyvo sekoje dominuoja iminorūgštys superspiralei būdinga 10/3 simetrija, tuo tarpu kartotinio motyvo seka – Gly-Pro-Hyp lemia superspiralės 7/2 simetriją (17). Pastaroji simetrija svarbi kolageno polipeptidinių grandinių spontaniškos superspiralizacijos užtikrinimui (11).

Kolageno superspiralės erdvinė struktūra nėra labili (19). Kolageno grandinių atomai išsidėstydami kolageno superspiralėje sudaro van der Valso sąveikas, kurios svarbios superspiralės sanklodos stabilumo palaikymui, tačiau superspiralės II tipo poliprolino spirālės sanklodos užtikrinimui svarbesnis sudarytų vandenilinių jungčių tinklas (1 pav.) (11).

Vandenilinės jungtys, sudaromos tarp amido ir karbonilo grupių, yra stabiliausias kolageno superspiralės vandenilinės jungtys (14). Kiekvienos kolageno superspiralės grandinės kartotinio Gly-Xaa-Xaa motyvo glicino amido grupė sudaro vandenilinę jungtį su vienos iš dviejų likusių superspiralės polipeptidinės grandinės kartotinio motyvo aminorūgšties liekanos už motyvo glicino karbonilo grupe. Tuo atveju, jei kartotinio motyvo sekoje už glicino sutinkamas, ne prolinas kolageno superspiralės grandinių atomai sudaro priešingos krypties vandenilines jungtis tarp minėtos aminorūgšties liekanos už glicino amido grupės ir vienos iš dviejų likusių superspiralės polipeptidinės grandinės kartotinio motyvo glicino karbonilo grupės (14). Pastarosios vandenilinės jungtys svarbios kolageno tipų, kurių polipeptidinėms grandinėms nėra tipiškas prolinas, superspiralės stabilumo užtikrinimui. Vandens molekulė, medijuojanti vandenilines jungtis tarp superspiralės grandinių aminorūgščių liekanų amido grupių ir glicino karbonilo grupės, taip pat gali sudaryti vandenilines jungtis su kolagenų kartotinio motyvo sekai tipišku 4-hidroksiprolinu (20).

Vandenilinės jungtys, sudaromos tarp kolageno superspiralės polipeptidinių grandinių C_{α} atomų vandenilio ir karbonilo grupės, taip pat svarbios, tačiau nėra esminės kolageno superspiralės stabilizavimui (11). Kolageno superspiralės polipeptidinių grandinių C_{α} atomų vandenilis sudaro vandenilines jungtis su vienos iš dviejų likusių superspiralės grandinių glicino vandenilio atomu arba prolino aminorūgšties liekanos karbonilo grupe. Charakterizavus kolageno superspiralės erdvinę struktūrą, nustatytos taip pat analogiškos vandenilinės jungtys, sudaromos 4-hidroksiprolino C_{α} atomų vandenilio ir vienos iš dviejų likusių superspiralės grandinių 4-hidroksiprolino karbonilo grupės (14).

Skirtingai nei tipiška baltymų erdvinės struktūros sanklodoms, kolageno polipeptidinės grandinės vandenilines jungtis sudaro tarpusavyje – tipišku atveju baltymų polipeptidinės grandinės vandenilines jungtis sudaro tarp polipeptido skirtingų aminorūgščių liekanų. Kolageno polipeptidinių grandinių sekose tipiškas glicino aminorūgšties liekanos kartotinumai užtikrina vandenilinių jungčių tinklo sudarymą II tipo poliprolino spiralinės sanklodoje (20).

Kolageno II tipo poliprolino spiralinės sankloda užtikrina fibrilinio kolageno erdvinės organizacijos stabilumą bei superspiralizacijos spontaniškumą. II tipo poliprolino spiralinės sanklodą stabilizuoja grandinių sudaromos jungtys, tuo tarpu II tipo poliprolino spiralinės sanklodą lemia kolageno polipeptidinių grandinių kartotinio motyvo Gly-Pro-Hyp sekoje sutinkamos iminorūgštys – prolinas ir 4-hidroksiprolinas (11). Kolageno superspiralinės kartotinio motyvo Gly-Pro-Hyp sekoje, tipiškoje stuburinių fibrilinių kolagenų polipeptidinėms sekoms, sutinkamas 4-hidroksiprolinas reikšmingai stabilizuoja kolageno superspiralinės erdvinę struktūrą (17). II tipo poliprolino spiralinės sankloda išsidėsčiusių polipeptidinių grandinių jungčių labilumą riboja Gly-Pro-Hyp motyvo prolino ir 4-hidroksiprolino C_α atomo radikalų žiedų bei papildomi steriniai efektai. Bakterijos negeba hidroksilinti prolino, todėl bakterijų baltymų kolageno analogiškos erdvinės struktūros domenų superspiralių stabilizavimo mechanizmas būdingi saviti eukariotų fibriliniams kolagenams nebūdingi superspiralinės stabilizavimo mechanizmai (14). Kolageno superspiralinės šerdis nėra hidrofobinė, todėl hidrofobinės jungtys superspiralinės stabilizavimui neturi įtakos. Vykstant kolageno polipeptidinių grandinių superspiralizacijai vyksta superspiralinės grandinių desolvatacija, svarbi superspiralizacijos spontaniškumo užtikrinimui (20).

Superspiralės – esminis baltymų erdvinės struktūrų elementas, tuo tarpu II tipo poliprolino spiralinės sankloda tipiška tik kolageniui. Baltymų, kurių domeninei organizacijai būdingas kolageniui analogiškos struktūros domenai, spiralinės trumpos bei neužtikrina makromolekulinių agregatų formavimo (18). Fibrilinių kolagenų superspiralinės efektyviai sąveikauja suformuodamos makromolekulinius agregatus (11).

Esminis fibrilinio kolageno makromolekulinis agregatas – fibrilė, spontaniškai formuojama (21) sąveikaujančių fibrilinio kolageno superspiralių (18). Prokariotų ir eukariotų produkuojamos kolagenazės geba proteolizuoti kolageno superspirales, sąveikaujančias tarpusavyje fibrilėje (22). Fibrilinio kolageno fibrilės kolageno superspiralės sudaro elektrostazines ir hidrofobines bei kovalentines jungtis (21).

Kolageno superspiralių grandinių aminorūgščių šoninių grandinių radikalai sudaro elektrostazines ir hidrofobines jungtis, tuo atveju jei kolageno superspiralės palankiai išsidėsto tarpusavio atžvilgiu. Hidrofobines kolageno superspiralių sritis sudarančias hidrofobines jungtis superspiralių sudaromos elektrostatinės jungtys izoliuoja (15). Kovalentiniai ryšiai svarbūs fibrilės stabilizavimui, tačiau nėra esminiai. Kiekvienos fibrilės kolageno superspiralės telopeptidas sudaro kovalentinį ryšį su žemiau išsidėsčiusios kolageno superspiralės aminorūgščių liekanų šoninių grandinių radikalais (15).

Bakterijų baltymai, kurių domeninei organizacijai būdingas kolagenui analogiškos erdvinės struktūros domenai, tipišku atveju charakterizuoti tyrus patogeninių bakterijų baltymus (23, 24, 25, 26, 27). *Streptococcus pyogenes* kamienų ląstelių paviršiaus baltymų Sc11 ir Sc12 domeninėje organizacijoje charakterizuoti superspiralizuoti domenai, kurių stabilumas analogiškas fibrilinio kolageno superspiralių stabilumui (28). Sc11 baltymą atpažįsta žmogaus I tipo kolageno receptoriai (29). *Escherichia coli* bei *Bacillus anthracis* kamienų baltymų struktūrose taip pat charakterizuoti kolagenui analogiškos struktūros domenai (26). Bakterijų baltymų kolagenui analogiškos struktūros domenai stabilizuoja elektrostatinės ir polinės šoninių grandinių jungtys (30). Prolino aminorūgšties liekanos taip pat svarbios bakterijų kolagenui analogiškos struktūros domenų sanklodų stabilizavimui (30). Baltymų kolagenui analogiškos struktūros domenai tipišku atveju užtikrina baltymų globulinių domenų stabilų išsidėstymą ir/ar izoliavimą arba užtikrina baltymų oligomerizaciją (18). Bakterijų baltymai, kurių domeninei organizacijai būdingi kolagenui analogiškos struktūros domenai, tipišku atveju – bakterijų paviršiaus baltymai, svarbūs sporos dangalų formavimui ar virulentiškumui (31, 26, 32).

Proteoliziniai fermentai tipišku atveju specifiški substrato erdvinei struktūrai (33). Proteoliziniai fermentai gebantys hidrolizuoti kolageną specifiški kolageno struktūros organizacijai, o kolagenolizinės oligopeptidazės taip pat specifiškos kolageno oligopeptidų grandinės sekai bei ilgiui (13). Kolagenolizinės peptidazės tiriamos daugiau nei penkiasdešimt metų, tačiau kolagenolizinių peptidazių įvardijimo atsižvelgus į substratinį specifiškumą apibrėžtys nėra nusistovėję. Charakterizavus peptidazės kolagenolizinį aktyvumą, hidrolazė pagrįstai įvardijama kolagenolizine. Kolagenazės sekretuojamos kolagenolizinės peptidazės proteolizuoja fibrilinį kolageną fiziologinėmis sąlygomis, tuo tarpu želatinazės peptidolizuoja denatūruotą fibrilinį kolageną. Kolagenolizinės oligopeptidazės, tipišku atveju viduląstelinės peptidazės, peptidolizuoja kolageno oligopeptidus (8). Prokariotai ir eukariotai fibrilinį kolageną skaido pasitelkdami minėtų specifiškumą kolagenolizines peptidazės (13, 10). Eukariotų kolageno skaidymo eiga, lyginant su prokariotų, išsiskiria, nes eukariotuose kolageno skaidymas griežtai reguliuojamas kartu eukariotų kolagenazės, kaip tipiška matrikso metalo proteinazės, pradinio kolageno skaidymo etapo metu hidrolizuoja kolageno polipeptidinę grandinę griežtai specifiškai superspiralės galų atžvilgiu (34).

Termofilinių bakterijų kolageno skaidymo eiga analogiška mezofilų kolageno skaidymo eigai, tačiau termofilams tipiškų charakteristikų kolagenazės nebūdingos (9, 8). Fibrilinis kolagenas nėra termostabilus (35), todėl termofilai įsisavina tik iš dalies denatūruotą kolageną (8). Pradinių kolageno skaidymo etapų metu aktyvios termofilų kolagenolizinės peptidazės peptidolizuoja iš dalies denatūruotą kolageną funkcinė svarba atitinka mezofilų bei eukariotų kolagenazes. Termofilams kolageno įsisavinimui taip pat svarbos kolagenolizinės oligopeptidazės (36).

1.2. Bakterijų kolagenolizinės peptidazės

Proteoliziniai fermentai klasifikuojami atsižvelgus į katalizės mechanizmą bei sekų homologiškumą (1, 2). Substratinis specifiškumas peptidazių

klasifikacijai nėra esminis kriterijus. Proteolizuoti ir/ar peptidolizuoti kolageną geba skirtingų katalizinių mechanizmų peptidazės ar oligopeptidazės, todėl kolagenolizinės peptidazės bei kolagenolizinės oligopeptidazės priskiriamos skirtingų proteolizinių fermentų tipų skirtingoms šeimoms (1, 2). Charakterizuotos bakterijų kolagenazės priskiriamos M9 bei S1, S8 ir S53 proteolizinių fermentų šeimoms (1). Charakterizuotos bakterijų kolagenolizinės oligopeptidazės priskiriamos M3, M4 ir M13 proteolizinių fermentų šeimoms (1). Tuo tarpu nenustatyto katalizinio mechanizmo fragmentiškai charakterizuotos bakterijų kolagenolizinės peptidazės priskiriamos U32 proteolizinių fermentų šeimai (1).

M9 proteolizinių fermentų šeimai priskiriamos *Vibrio* spp. ir klostridijų kolagenazės. *Vibrio* spp. kolagenazės sudaro M9 proteolizinių fermentų šeimos M9A pošeimį, tuo tarpu klostridijų kolagenazės priskiriamos M9 proteolizinių fermentų šeimos M9B pošeimiui. M9 proteolizinių fermentų šeimos M9A pošeimio holotipinė peptidazė – bakterijų kolagenazė V arba vibrio kolagenazė (MEROPS M09.001) iš *Vibrio alginolyticus* subsp. *iophagus* I.029, sekretuojama induktyvi peptidazė, svarbi bakterijų mitybai (37). Vibrio kolagenazė proteolizuoja žuvų fibrilinį kolageną užtikrindama *Vibrio alginolyticus* galimybę kolonizuoti žuvų audinius bei kartu įsisavinti kolageno oligopeptidus mitybai (38). Charakterizavus vibrio kolagenazės fiziologinę svarbą taip pat nustatyta, jog kolagenazės sekreciją reguliuoja deguonies kiekis bei temperatūra (39).

Vibrio kolagenazė geba proteolizuoti fibrilinį kolageną efektyviau nei eukariotų matrikso metalo proteinazės, tačiau analogiškai eukariotų kolagenazėms vibrio kolagenazė pradinio kolageno skaidymo etapo metu hidrolizuoja kolageno polipeptidinę grandinę specifiškai superspiralės galų atžvilgiu (38). Eukariotų kolagenazės aktyviausiai hidrolizuoja peptidinį ryšį tarp Gly-Leu ar Gly-Ile aminorūgščių liekanų, tuo tarpu vibrio kolagenazė – tarp Xaa-Gly aminorūgščių liekanų (1 lentelė) (37). Nors vibrio kolagenazės *in vivo* specifiškai proteolizuoja fibrilinį kolageną, kolagenazė *in vitro* proteolizavo baltymus, kurių sekoms būdingi glicino pasikartojimai (40).

M9 proteolizinių fermentų šeimos M9A pošeimiui priskiriama *Vibrio mimicus* kolagenazė iš *Vibrio mimicus* ATCC 33653 homologiška vibrio

kolagenazei, tačiau *Vibrio mimicus* kolagenazė išsiskiria savitu charakteristikų deriniu (41). Skirtingai nei vibrio kolagenazės *Vibrio mimicus* kolagenazės domeninei organizacijai nebūdingas C-galinis policistinės inkstų ligos tipo domenai (37). Už *Vibrio mimicus* kolagenazės katalizinio domeno sutinkamas konservatyvus Phe-Ala-Xaa-Trp-Xaa-Xaa-Thr jungimosi su fibriliniu kolagenu motyvas (42). *Vibrio mimicus* kolagenazės substratinis specifiškumas, lyginant su charakterizuotu vibrio kolagenazės substratinio specifiškumu, neanalogiškas, nes *Vibrio mimicus* kolagenazė neskaudo albumino ar kazeino (1 lentelė) (41).

1 lentelė. Charakterizuotos bakterijų kolagenolizinės peptidazės (9).

Šeima, Pošeimis	Grupė	Pavadinimas	Producentas	Molinė masė, kDa	Motyvas, Katalizinė triada	Substratai
M9A	II	<i>Vibrio mimicus</i> kolagenazė	<i>Vibrio mimicus</i> ATCC 33653	62	HEYTH	I, II, III tipo kolagenas, želatina, sintetiniai peptidai
		PrtVp	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 93	62	HEYTH	I, II, III tipo kolagenas, IV tipo kolagenas, sintetiniai peptidai
	III	Vibrio kolagenazė	<i>Vibrio alginolyticus</i> subsp. <i>iophagus</i> 1.029	82	HEYTH	Želatina, kazeinas, sintetiniai peptidai
		VPM	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> FYZ8621.4	90	HEYTH	I, II, III tipo kolagenas, IV tipo kolagenas, želatina, kazeinas, sintetiniai peptidai
M9B	I	Bakterijų kolagenazė G/A	<i>Clostridium histolyticum</i>	116	HEYTH	I, II, III tipo kolagenas
		ColA	<i>Clostridium perfringens</i> NCIB 10662	116	HEYTH	Azokolis, I tipo kolagenas, Pz-peptidas
	II	ColH	<i>Clostridium histolyticum</i>	98	HEYTH	I, II, III tipo kolagenas
S1	-	SOT	<i>Streptomyces omiyaensis</i>	23	His ⁷⁵ Asp ¹²⁰ Ser ²¹⁰	I tipo kolagenas, IV tipo kolagenas
		SGT	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 10137	23	His ⁷³ Asp ¹¹⁸ Ser ²⁰⁸	I tipo kolagenas
S8	-	Deseasinas MCP-01	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SM9913	66	Asp ⁴⁹ His ¹⁰⁴ Ser ²⁶⁹	I, II tipo kolagenas, IV tipo kolagenas, želatina, kazeinas, Pz-peptidas
		Mirokolsinas	<i>Myroides profundus</i> D25	56	Asp ¹²⁹ His ¹⁷⁴ Ser ³⁷⁸	I tipo kolagenas, želatina
S53	-	Kumamolizinas-As	<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i> NTAP-1	37	Glu ⁷⁸ Asp ⁸² Ser ²⁷⁸	Iš dalies denatūruotas I tipo kolagenas, želatina

Vibrio spp. kolagenazės – homologiškos cinko peptidazės, tačiau neanalogiško substratinio specifiškumo bei domeninės organizacijos.

Charakterizuotos *Vibrio* spp. kolagenolizinės peptidazės taip pat skirstomos į tris grupes. II ir III grupėms priskiriamos atitinkamai *Vibrio* kolagenazė ir *Vibrio mimicus* kolagenazės, tuo tarpu I grupę sudaro mažos molekulinės masės kolagenolizinės oligopeptidazės, priskiriamos M4 proteolizinių fermentų šeimai (43).

M9 proteolizinių fermentų šeimos M9B pošeimiui priskiriamos klostridijų kolagenazės, atsižvelgiant į substratinį specifiškumą fibrilinio kolageno tipams bei sintetiniams peptidams, analogiškai *Vibrio* sp. kolagenazėms skirstomos į grupes (1 lentelė) (44). M9 proteolizinių fermentų šeimos M9B pošeimio holotipinė peptidazė – bakterijų kolagenazė G/A (MEROPS M09.002) iš *Clostridium histolyticum* – pirmoji charakterizuota bakterijų kolagenazė, priskiriama I grupei (45). Plėtojus klostridijų kolagenolizinių peptidazių charakterizavimo strategiją išsamiai charakterizuotos abiejų grupių kolagenazės.

Klostridijų kolagenazės, taigi ir bakterijų kolagenazė G/A, proteolizuoja fibrilinio kolageno fibrilės superspirales, hidrolizuodama peptidinį ryšį tarp Xaa-Gly aminorūgščių liekanų – tarp kolageno polipeptidinės grandinės kartotinių motyvų. Charakterizuotas I ir II grupės klostridijų kolagenazių skirtingas specifiškumas peptidiniam ryšiui (1 lentelė) (46). Klostridijų kolagenazių, priskiriamų II grupei, substratinis specifiškumas mažiau išreikštas, tačiau klostridijų kolagenazės specifiškai hidrolizuoja kolageno superspiralės polipeptidinių grandinių peptidinius ryšius. Charakterizuotos klostridijų kolagenazės – tipiškos cinko endopeptidazės, tačiau pastarųjų fermentų erdvinę struktūrą stabilizuoja kalcio jonai (45).

Klostridijų kolagenazėms būdinga modulinė domeninė organizacija – skirtingas klostridijų kolagenazes sudaro skirtingų funkcijų domenai. *C. histolyticum* sekretuojamų ColG ir ColH kolagenazių, gebančių hidrolizuoti fibrilinio kolageno fibriles, C-galiniai domenai gali būti *in vivo* šalinami ribota proteolize (47). Klostridijų kolagenazių N-galinio domeno struktūroje charakterizuotas aktyvatoriaus elementas, tuo tarpu pastarųjų peptidazių aktyvųjį centrą formuojantys konservatyvūs motyvai (1 lentelė) išsidėstę

N-galinio domeno C-gale (48). Kolagenolizini klostridijų kolagenazių aktyvumą užtikrina N-galinis domenas, tačiau klostridijų kolagenazių domeninei organizacijai taip pat būdingi C-galiniai domenai, tipišku atveju vienas arba du sąveikos su kolagenu domenai bei vienas arba du policistinės inkstų ligos tipo domenai. Klostridijų kolagenazių C-galiniai domenai neturi įtakos peptidazių gebėjimui sąveikauti bei hidrolizuoti kolageno superspiralę, bet būtini peptidazių sąveikai su fibrilinio kolageno fibrilėmis (9).

I ir II grupės klostridijų kolagenazės *in vivo* sudaro fibrilinio kolageno katabolinę kaskadą, svarbią klostridijų mitybai ir patogeniškumui. Klostridijų kolagenazės – endopeptidazės, kurios aktyviai proteolizuoja fibrilinio kolageno fibrilių superspirales nespecifiškai kolageno superspiralės galų atžvilgiu (45). Charakterizavus klostridijų erdvines struktūras, nustatyta, jog N-galinio domeno aktyvatoriaus elementas yra labilus, todėl užtikrina kolagenazių substratų efektyvų patekimą į aktyvųjį centrą (48). Klostridijų kolagenazės užtikrina pastarųjų patogenų gebėjimą skaidyti fibrilinio kolageno fibriles neprodukuojant kolagenolizinių oligopeptidazių, nes klostridijų kolagenazėms būdingas oligoendopeptidazinis aktyvumas kolageno oligopeptidams (13).

C. histolyticum yra anaerobinis patogenas, žmogui sukeliantis dujų gangreną, todėl patogeno sekretuojamos kolagenazės – virulentiškumo veiksniai. *Clostridium perfringens* ir *Clostridium tetani* kamienų gebėjimas sekretuoti kolagenolizines peptidazes, homologiškas *C. histolyticum* kolagenazių sekoms, taip pat nustatytas (45).

S1 proteolizinių fermentų šeimai priskiriamos kolagenazės SOT iš *Streptomyces omiyaensis* ir SGT iš *Streptomyces griseus* ATCC 10137 aktyviai proteolizuoja I tipo kolageną (49). Nors streptomicetų produkuojamos kolagenazės homologiškos, tačiau proteazių substratinis specifiškumas skiriasi – SOT, skirtingai nei SGT, aktyviai proteolizuoja IV tipo kolageną, želatiną bei kazeiną (1 lentelė) (50). SOT ir SGT priskiriamos tripsinams, taigi demonstruoja analogišką tripsinams specifiškumą polipeptidinės grandinės sekai. Charakterizuotų streptomicetų kolagenazių termoaktyvumas, termostabilumas ir pH optimumas analogiškai. SOT erdvinės struktūros organizacijos

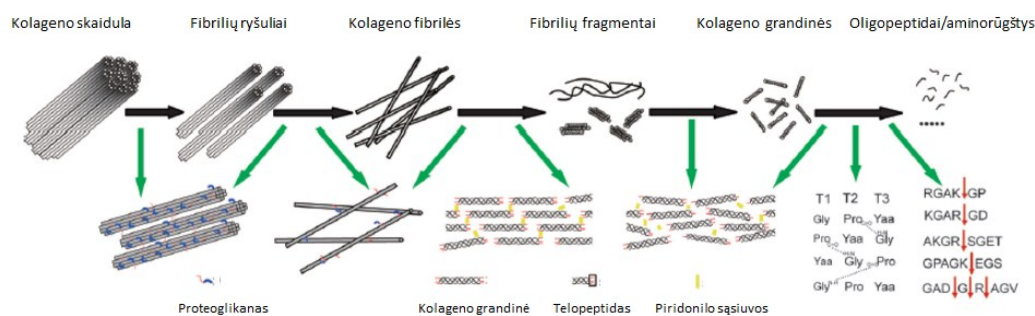
užtikrinimui svarbios Tyr⁷¹ ir Arg⁷², išsidėsčiusios kolagenazės N-galiniame domene (51). Pastarosios aminorūgščių liekanos neidentifikuotos SGT sekoje, kas netiesiogiai paaiškina skirtingą pastarųjų kolagenazių substratinį specifiškumą (50).

S8 proteolizinių fermentų šeimos S8A pošeimiui priskiriamos kolagenolizinės peptidazės deseasinas MCP-01 iš *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 ir mirokolsinas iš *Myroides profundus* D25, gebančios proteolizuoti fibrilinį kolageną, išsamiai charakterizuotos (9).

Charakterizavus deseasino MCP-01 erdvinę struktūrą nustatyta, jog katalizinio peptidazės domeno erdvinė struktūra analogiška subtilazių katalizinių domenų erdvinėms struktūroms (52). Deseasino MCP-01 erdvinės struktūros organizacijai taip pat būdingi jungties, konvertazės bei policistinės inkstų ligos tipo domenai. Pastarasis C-galinis domenas užtikrina deseasino MCP-01 sąveiką su kolageno superspirale (53). Deseasino MCP-01 katalizinis N-galinis domenas analogiškas subtilizinių, kurių kolagenolizinis aktyvumas nenustytas, kataliziniams domenams, tačiau kolagenolizinės peptidazės katalizinis centras mažiau izoliuotas katalizinio domeno struktūros elementų (52). Charakterizuotą deseasino MCP-01 sąveiką su fibrilinio kolageno superspirale užtikrinančią erdvinės struktūros elementą suformuoja trys kilpos, formuojamos rūgštinių ir aromatinių aminorūgščių liekanų. Charakterizuoti C-galiniai deseasino MCP-01 domenai nėra būtini kolagenolizinės peptidazės katalizinio aktyvumo užtikrinimui, tačiau deseasino MCP-01 konvertazės bei policistinės inkstų ligos tipo domenai reikšmingai efektyvina deseasino MCP-01 kolagenolizinį aktyvumą (54, 53).

Deseasinas MCP-01 gebėjo proteolizuoti I ir II tipo kolageną, IV tipo kolageną, želatiną bei nefrakcionuotą kolageno preparatą iš žuvų audinių (1 lentelė) (55). Tikslingai tyrus deseasino MCP-01 plataus substratinio specifiškumo užtikrinimo mechanizmą, nustatyta, jog kolagenolizinė peptidazė hidrolizuoja taip pat fibrilinio kolageno fibrilių proteoglikanus ir fibrilių superspiralių telopeptidus (54). Deseasinas MCP-01 specifiškumas polipeptidinės grandinės sekai nustatytas, tačiau neišreikštas (55).

Pseudoalteromonas sp. SM9913 yra psichrotolerantis kamienas, todėl charakterizuotas deseasino MCP-01 temperatūros optimumas buvo tikėtinas (54). Charakterizavus deseasino MCP-01 aktyvumą bei erdvinę struktūrą, kolagenolizinės peptidazės funkcinė svarba nebuvo tirta, tačiau pagrįstai tikėtina, jog plataus substratinio specifiškumo kolagenolizinė peptidazė svarbi *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 mitybai (55).



2 pav. Fibrilinio kolageno skaidulos kolagenolizė katalizuojama mirokolsino iš *Myroides profundi* D25 (56).

Mirokolsino iš *M. profundi* D25 erdvinei struktūrai būdingas C-galinis β -sąsukos domenai, tačiau pastarojo domeno svarba sąveikai su kolageno superspirale nenustatyta (56). Charakterizavus mirokolsino substratinį specifiškumą nustatyta, jog fermentas gebėjo proteolizuoti I ir II tipo kolageną, IV tipo kolageną, želatiną bei nefrakcionuotą kolageno preparatą iš žuvų audinių (1 lentelė) (56). Mirokolsino kolagenolizinio aktyvumo mechanizmas detalizuotas (2 pav.) (56). Pradinių fibrilinio kolageno fibrilės kolagenolizės etapų metu mirokolsinas proteolizuoja fibrilės proteoglikanus, vėliau fibrilės superspiralių telopeptidus, galiausiai aktyviai proteolizuoja kolageno superspirales polipeptidines grandines. Mirokolsinui specifiškumas polipeptidinės grandinės sekai nebūdingas, todėl kolagenolizinė peptidazė efektyviai peptidolizuoja kolageno polipeptidines grandines. *M. profundi* D25 produkuojamas mirokolsinas svarbus bakterijos mitybai (56).

S53 proteolizinių fermentų šeimai priskiriamas kumamolizinas-As iš *Alicyclobacillus sendaiensis* NTAP-1 – vienintelė sedolizinas priskiriama kolagenolizinė peptidazė (57). Kumamolizino-As erdvinė struktūra analogiška

subtiliziams būdingai erdvinės struktūros organizacijai. Visgi kumamolizino-As erdvinėje struktūroje nustatyti papildomi elementai, nes kolagenolizinės peptidazės molekulinė masė didesnė nei subtilizinių, kurių erdvinė struktūra charakterizuota (58). Kumamolizinas-As išsiskiria kaip ir kitos S53 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės katalizinės triados sandara (1 lentelė) (59). Charakterizavus kumamolizino-As aktyvumą, patvirtinta, jog kolagenolizinė peptidazė specifiskai peptidolizuoja iš dalies denatūruotą I tipo kolageną (57). Pastarasis substratinis specifiskumas buvo tikėtinas, nes *A. sendaiensis* NTAP-1 yra termoacidofilinė bakterija (60). Kumamolizinas-As specifiskai sąveikauja tik su iš dalies denatūruotu kolagenu (58). Charakterizuota kolagenolizinė peptidazė demonstravo išreikštą specifiskumą kolageno polipeptido grandinės sekai – aktyviausiai hidrolizavo peptidinį ryšį už arginino aminorūgšties liekanos (57). Kumamolizinas-As tikėtina svarbus *A. sendaiensis* NTAP-1 mitybai (60, 57).

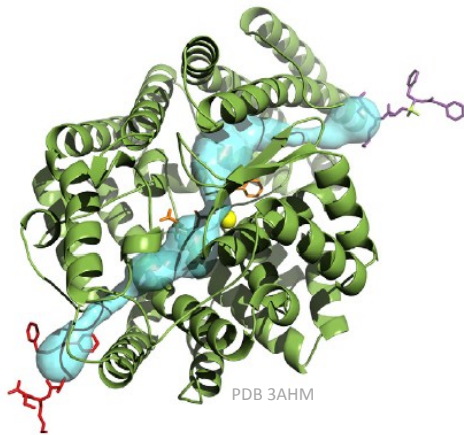
Bakterijų charakterizuotų kolagenolizinių peptidazių homologų genai identifikuoti daugelio bakterijų genomuose (1), tačiau charakterizuota tik maža bakterijų prokariotų įvairovės dalis. Eukariotų kolagenazės užtikrina specifines funkcijas, todėl eukariotų skirtingų kolagenolizinių peptidazių substratinis specifiskumas bei kolagenolizės eiga analogiška (61). Bakterijų kolagenolizinėms peptidazėms būdingi saviti substratinio specifiskumo bei kolagenolizės mechanizmai (9, 8).

1.3. Bakterijų metalo oligopeptidazės

Oligopeptidazės – peptidinio ryšio hidrolazės, hidrolizuojančios nestruktūrizuotus oligopeptidus, tačiau negebančios peptidolizuoti baltymų (62). Oligopeptidai, kurių grandinės ilgis tipišku atveju mažiau nei 30 aminorūgščių liekanų, gali patekti į oligopeptidazių aktyviuosius centrus, tuo tarpu ilgesnės grandinės oligopeptidų patekimas į oligopeptidazių aktyviuosius centrus izoliuojamas pastarųjų endopeptidazių struktūros elementų (3 pav.) (36, 64). Oligopeptidazės identifikuotos visų gyvybės domenų organizmų genomuose.

Tipišku atveju oligopeptidazėms būdingas išreikštas specifiškumas oligopeptido grandinės sekai, todėl oligopeptidazės *in vivo* užtikrina skirtingas funkcijas (62).

Charakterizuotos oligopeptidazės priskiriamos M3, M4, M13 ir S9 proteolizinių fermentų šeimoms (1). S9 proteolizinių fermentų šeimai priskiriamos prolilo oligopeptidazė ir oligopeptidazė B iš eukariotų. Pastarųjų oligopeptidazių *in vivo* substratai fiziologiškai svarbūs peptidai (65, 66).



3 pav. Pz-peptidazės A iš *Geobacillus collagenovorans* MO-1 erdvinė struktūra pažymint substrato patekimo tunelius (63).

Mezofilinių bakterijų prolilo oligopeptidazės ir oligopeptidazės B homologai taip pat charakterizuoti. M3 proteolizinių fermentų šeimai priskiriamos tipiškos bakterijų metalo oligopeptidazės – oligopeptidazė A ir oligopeptidazė F (67). M4 proteolizinių fermentų šeimai priskiriamų peptidazių oligopeptidolizinis aktyvumas taip pat nustatytas. M13 proteolizinių fermentų šeimai priskiriama bakterijų oligopeptidazė O (1). Bakterijų metalo oligopeptidazės yra cinko peptidazės analogiško katalizinio mechanizmo (68). M3, M4 ir M13 proteolizinių fermentų šeimų bakterijų oligopeptidazių esminis aktyvųjį centrą formuojantis elementas yra konservatyvus cinko oligopeptidazių motyvas His-Glu-Xaa-Xaa-His, kurio histidiniai funkcionuoja cinko katijono ligandais, tuo tarpu motyvo glutamatas – katalizinė aminorūgštis liekana. Trečiuoju cinko jono ligandu funkcionuojantis glutamatas sutinkamas už konservatyvaus cinko oligopeptidazių motyvo (68). Oligopeptidazė A homologiška žinduolių timeto oligopeptidazėms, todėl priskiriama M3 proteolizinių fermentų M3A pošeimiui, tuo tarpu oligopeptidazė F priskiriama M3 proteolizinių fermentų M3B pošeimiui. Charakterizuotos oligopeptidazės O homologiškos neprilizinui, taigi priskiriamos M13 proteolizinių fermentų šeimai (1).

Charakterizuotos oligopeptidazės, tipiškų atveju, yra viduląstelinės monomerinės metalo peptidazės. Eukariotų oligopeptidazių funkcinė svarba

charakterizuota, tuo tarpu charakterizuotų oligopeptidazių homologų iš prokariotų funkcinė svarba nėra detalizuota (69, 63). Tikslingai tyrus pienarūgščių bakterijų oligopeptidazių O funkcinę svarbą nustatyta, jog pastarosios hidrolazės svarbios kazeino įsisavinimui (70). Kitų bakterijų oligopeptidazių funkcinė svarba baltymų oligopeptidų katabolizmo užtikrinimui taip pat numanoma. Oligopeptidazės A svarba *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium išgyvenimui anglies stygiaus sąlygomis netiesiogiai patvirtinta (71).

Bakterijų metalo oligopeptidazės taip pat svarbios namų ruošos funkcijų užtikrinimui. Siekiant nustatyti oligopeptidazės F iš *Lactococcus lactis* kamienų substratus, *in vivo* nustatyta oligopeptidazės svarba baltymų sekrecijos užtikrinimui, nes pastaroji oligopeptidazė aktyviai oligopeptidolizavo signalinį peptidą (72). Oligopeptidazės A svarbą *E. coli* namų ruošos funkcijų užtikrinimui netiesiogiai patvirtinto *in vitro* nustatytas oligopeptidazės gebėjimas peptidolizuoti lipoproteino signalinį peptidą (73). *Bacillus subtilis* viduląstelinės oligopeptidazės F raiškos padidinimas lėmė bacilos sporuliacijos stabdymą, nes oligopeptidazė *in vivo* peptidolizavo PhrA pentapeptidą (74). *Mycoplasma hyopneumoniae* patogeno, sukeliančio kiaulių ligas, detektuotas viduląstelinės oligopeptidazės F aktyvumas netiesiogiai atspindi pastarosios oligopeptidazės svarbą virulentiškumo užtikrinimui (75).

Oligopeptidazės O homologai iš *Porphyromonas gingivalis* 381, *Mycobacterium tuberculosis* ir *Streptococcus pneumoniae* produkuojami į ekstraląstelinę aplinką svarbūs patogenų virulentiškumui (76, 64, 77). *Bacillus licheniformis* N22 ir *Bacillus amyloliquefaciens* 23-7A sekretuojamų oligopeptidazių F funkcinė svarba nebuvo tirta formaliai apibrėžus tikėtiną funkcinę svarbą bacilų mitybai ir/ar Phr feromonų šeimos propeptidų brendimui (78, 79).

Bakterijų oligopeptidazės – biotechnologijai svarbios endopeptidazės, užtikrinančios apibrėžto grandinės ilgio peptidų produkavimą taip pat ir iš stabilių gyvūnų baltymų – fibrilinio kolageno, keratino ar elastino (63). Metalo oligopeptidazės iš mezofilinių bakterijų taikomos aukštos pridėtinės vertės

oligopeptidų ruošimui. Pastarieji oligopeptidai plačiai naudojami medicinoje, kosmetikoje bei maisto pramonėje (13). Visgi žemas mezofilų oligopeptidazių termoaktyvumas ir/ar termostabilumas riboja oligopeptidazių diegimą biotechnologinių užduočių įgyvendinimui. Termofilinių bakterijų oligopeptidazių charakterizavimo strategijos plėtotė užtikrintų minėtų problemų sprendimą, nes tipišku atveju termofilinių bakterijų proteoliziniai fermentai termoaktyvūs ir termostabilūs.

1.4. Nenustatyto katalizinio mechanizmo fragmentiškai charakterizuotos bakterijų kolagenolizinės peptidazės

Nenustatyto katalizinio mechanizmo fragmentiškai charakterizuotos bakterijų kolagenolizinės peptidazės priskiriamos U32 proteolizinių fermentų šeimai (80, 1). Galimai peptidazės, kurių genai *in silico* priskiriami U32 proteolizinių fermentų šeimai, identifikuoti visų gyvybės domenų organizmų genomuose, tačiau U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazės visgi nebūdingos vienaląsčiams eukariotams bei grybams (1). Eukariotai, kurių genomuose neidentifikuoti U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių genai, tikėtina, jog U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazes prarado evoliucionuodami (81). Galimai peptidazės genas *in silico* priskiriamas U32 proteolizinių fermentų šeimai, jei geno sekoje identifikuojamas U32 proteolizinių fermentų šeimos domenai ir/ar konservatyvus U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių Glu-Xaa-Phe-Xaa-Xaa-Gly-[Ser/Ala]-[Leu/Ile/Val/Met]-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Cys-[Leu/Ile/Val/Met]-Ser motyvas. U32 proteolizinių fermentų šeimai priskiriami daugiau nei 2700 genų, tipišku atveju anotuotų bakterijų ir archėjų genomuose, suskirstytų atsižvelgus į homologiškumą U32 proteolizinių fermentų šeimos tipinių peptidazių sekoms (4 pav.) (1). U32 proteolizinių fermentų šeimos *Porphyromonas*, *Helicobacter* ir *Salmonella* tipų kolagenazės iš mezofilinių bakterijų bei U32 proteolizinių fermentų šeimai priskiriamos galimai peptidazės YrpA ir YrpB iš *Yersinia ruckeri* 150 bei galimai peptidazė Mk0906 iš *Methanopyrus kandleri* AV19 tikslingai tirtos, tuo tarpu kelių kitų

U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių taip pat fragmentiškai charakterizuota transkripcija ir/ar raiška prokariotuose.

U32 proteolizinių fermentų šeimos holotipinė bei kartu *Porphyromonas*-tipo kolagenazių tipinė PrtC peptidazė (MEROPS U32.001) iš *Porphyromonas gingivalis* ATCC 53977 – viena pirmųjų *Porphyromonas* spp. detektuotų bei tirtų kolagenazių (82). PrtC homodimerizacija nustatyta analizine gelfiltracija (83). PrtC monomero katalizinis aktyvumas nenustatytas, tuo tarpu kolagenazės homodimero kolagenolizinis aktyvumas nustatytas (83). PrtC homodimeras proteolizuoja azokolį, fibrilinį I tipo kolageną, tirpų I tipo kolageną, fibrilinį III tipo kolageną bei peptidolizuoja temperatūra denatūruotą I tipo kolageną, bet nehidrolizavo IV tipo kolageno, želatinos, kazeino ar sintetinio Pz-peptido (84, 83, 85, 86). Kalcio katijonai ir cistatino baltymas stimuliavo PrtC aktyvumą, o cinko ir geležies katijonai bei histatino baltymas, etilendiaminotetraacto rūgštis (EDTA), *p*-chloro merkuribenzoinė rūgštis kolagenazės aktyvumą slopino (83). Visgi prielaida, jog PrtC – cisteino peptidazė, nepatvirtinta, nes reduktoriai 2-merkaptoetanolis (2-ME) ir ditionitritolis (DTT) taip pat nežymiai slopino PrtC homodimero aktyvumą (83). Rekombinantinę PrtC peptidazę, produkavus heterologine raiška *Escherichia coli* NTS1, fermento aktyvumas nedetektuotas, todėl tikėtina, jog *E. coli* gebėjo specifiskai slopinti rekombinantinės PrtC aktyvumą citoplazmoje (83).

PrtC peptidazės svarba *Porphyromonas gingivalis* virulentiškumui netiesiogiai patvirtinta PrtC geną gausiai nustatčius žmogaus dantenu ligų sukėlėjų mikrobiomo metagenome (87). PrtC peptidazės svarba virulentiškumui *in vitro* patvirtinta nustatčius tiesioginę priklausomybę tarp PrtC koncentracijos ir endotelio ląstelių ECV304 kultūros produkuojamų uždegimo citokinų (88). Pritaikant PrtC geną dantenu ligų diagnostikai, nustatytas geno sekos variabilumas *P. gingivalis* kamienuose (89), todėl siekiant PrtC geną taikyti diagnostikai geno sekoje sėkmingai identifikuoti konservatyvūs regionai (90). PrtC genas – specifiskas dantenu ligų, sukeltų *P. gingivalis* žymuo, nes nebūdingas kitiems dantenu ligų sukėlėjams (91). Charakterizuotas PrtC geno variabilumas, sėkmingai pritaikytas *P. gingivalis*

U32 proteolizinių fermentų šeima

MEROPS U32.001 <i>Porphyromonas</i> -tipo kolagenazės
MEROPS U32.002 <i>Helicobacter</i> -tipo kolagenazės
MEROPS U32.003 <i>Salmonella</i> -tipo kolagenazės
MEROPS U32.004 Mername-AA261 galimai peptidazės (<i>Clostridium beijerinckii</i>) ir homologai
MEROPS U32.A01 YhbV baltymo (<i>Escherichia coli</i>) grupės baltymai
MEROPS U32.A02 yrrN (<i>Bacillus subtilis</i>) grupės baltymai
MEROPS U32.UPW U32 proteolizinių fermentų šeimos grupei nepriskirtos peptidazės

4 pav. U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių grupės (1, 2).

kamienų virulentiškumo įvertinimui – skirtingo virulentiškumo *P. gingivalis* kamienams būdingi skirtingos sekos PrtC genai (92). Žmonių, sergančių dantenu ligomis, sukeltomis *P. gingivalis*, nustatytas serumo reakingumas prieš PrtC peptidazę atspindi peptidazės produkciją į ekstraląstelinę aplinką (93).

Kačių dantenu ligų sukėlėjo *Porphyromonas gingivalis* VPB 3457 genome PrtC geno homologas taip pat identifiukuotas, tuo tarpu kačių, sergančių dantenu ligomis, sukeltomis *P. gingivalis*, serume nustatyti antikūnai prieš PrtC peptidazę iš *P. gingivalis* VPB 3457 (88). Skirtingai nei rekombinantinė PrtC peptidazė iš *P. gingivalis* ATCC 53977, sukeliančio dantenu ligas žmonėms, rekombinantinė PrtC peptidazė iš *P. gingivalis* VPB 3457, patogeninio katėms, peptidolizavo želatiną, bet rekombinantinės PrtC peptidazės iš *P. gingivalis* VPB 3457, analogiškai PrtC peptidazei iš *P. gingivalis* ATCC 53977, aktyvumą slopino chelacija EDTA (94).

Žmonių urogenitalinės sistemos patogeno *Proteus mirabilis* HI4320 koduojamo geno, homologiško PrtC peptidazės genui, išveiklinimas reikšmingai mažino patogeno kolonizacijos efektyvumą *in vivo* pelėse (95). PrtC peptidazės iš *Proteus mirabilis* tyrimas *in vitro* nebuvo plėtotas, tačiau išveiklinus PrtC peptidazės geną *P. mirabilis* gebėjimas skaidyti azokazeiną reikšmingai sumažėjo (95).

U32 proteolizinių fermentų šeimos *Helicobacter*-tipo kolagenazių tipinė HP0169 peptidazė (U32.002) iš *Helicobacter pylori* P149 identifikuota detektuojant *in vivo* mongolinėse smiltelėse patogeno virulentiškumo veiksnius svarbius, skrandžio epitelio kolonizavimui (96). HP0169 geno išveiklinimas sumažino *Helicobacter pylori* viduląstelių baltymų preparato gebėjimą proteolizuoti azokolį beveik 50 %, tuo tarpu *H. pylori* viduląstelių baltymų preparatą, išskirtą iš patogeno, kurio genome HP0169 genas neišveiklintas veikiant EDTA, nustatytas gebėjimo proteolizuoti azokolį sumažėjimas beveik 75 % (96). Išveiklinus HP0169 geną *H. pylori* sekretomo baltymų koncentruoto preparato kolagenolizinio aktyvumo, substratu naudojant I tipo fibrilinį kolageną, nenustatyta. Rekombinantinės HP0169 kolagenolizinis aktyvumas, substratu naudojant I tipo fibrilinį kolageną, *in vitro* tiesiogiai taip pat nustatytas (96).

HP0169 homologus koduojantys genai identifikuoti streptokokų, gebančių aktyviai skaidyti kolageną, genomuose (97). Rekombinantinė smc11 iš *Streptococcus mutans* GS-5 ser. c, homologiška HP0169, proteolizavo I tipo kolageną (98). Fragmentiškai charakterizuotos smc11 homodimero aktyvumas detektuojamas želatinos zimografija. Chelacija EDTA slopinino smc11 aktyvumą, tačiau fenantrolinas neturėjo įtakos kolagenolizinės peptidazės aktyvumui (98). *S. mutans* GS-5 ser. c baltymų sąveikos su kolagenu domenai smc11 sekoje neidentifikuoti (99). *Streptococcus mutans* UA159 koduojamos galimai peptidazės SMU.761, kurios seka identiška smc11 iš *S. mutans* GS-5 ser. c sekai, genas intensyviau transkribuojamas kultivuojant kamieną taikant gliukozės perteklių, lyginant su pastarojo geno transkripcijos intensyvumu kamieną kultivuojant taikius sumažintą gliukozės koncentraciją (100). SMU.761 genas identifikuotas taip pat ir neišreikšto patogeniškumo streptokokų kamienų genomuose (101), visgi SMU.761 funkcinė svarba *S. mutans* UA159 virulentiškumui numanoma (97), tačiau išlieka netirta.

U32 proteolizinių fermentų šeimos *Salmonella*-tipo kolagenazių tipinės Clg peptidazės (U32.003) iš *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium fagotipas DT104, fragmentiškai charakterizavus funkcinę svarbą, tyrimas *in vitro* nebuvo plėtotas. Clg peptidazė identifikuota siekiant nustatyti

antibiotikams atsparių *Salmonella enterica* kamienų sekretuojamą citotoksina, sukeltą karvių organų gleivinių ląstelių citopatišką fenotipą (102). Rekombinantinės Clg sukeltas citopatiškumas HEp-2 ląstelių kultūrai *in vitro* nustatytas, tuo tarpu *in vivo* nustatytas Clg sukeltas citopatiškumas BALB/c pelių enterocitams (103). Nustatant *S. enterica* sekretuojamą citotoksina, Clg peptidazės genas identifikuotas *S. enterica* kamienuose, tačiau Clg peptidazės geno transkriptas tipišku atveju nenustatytas (103). Tikslingai tyrus Clg peptidazės geno transkripcijos valdymą, nustatyta, jog SlyA – vienas esminių salmonelų genų transkripcijos valdymo veiksnių (104) – represuoja Clg peptidazės geno transkripciją (105). Clg peptidazės geno transkripcijos indukcija nustatyta tik *S. enterica* kamienuose, kurių genomuose identifikuota salmonelų genų, užtikrinančių atsparumą antibiotikams, I tipo santalka. Visgi minėtos santalkos genų koduojamų baltymų svarba Clg peptidazės geno transkripcijos valdymui išlieka nedetalizuota. Clg peptidazės funkcionalumo valdymas, valdant peptidazės sekreciją ir/ar SlyA degradaciją *S. enterica* citoplazmoje, numanomas (105). Charakterizuojant Clg peptidazės geno transkripcijos valdymą taip pat patvirtinta Clg peptidazės svarba *S. enterica* išgyvenimui jaučio makrofaguose (105).

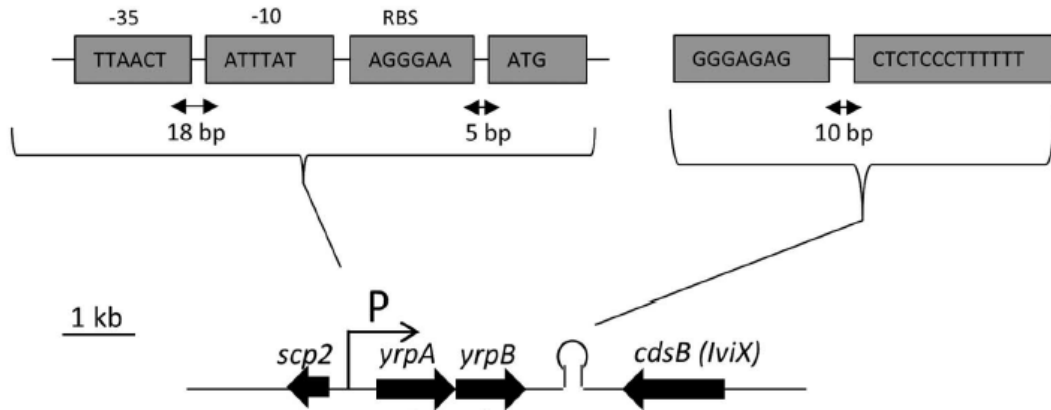
Salmonella enterica subsp. *enterica* ser. Saintpaul NPG koduojamos Clg peptidazės geno transkripciją *in vitro* indukuoja streso neuroendokrininiai veiksniai. Clg peptidazės iš *S. enterica* neuropatinių kamienų sekrecijos svarba minėtų patogeninių kamienų gebėjimui kirsti kraujo-smegenų barjerą, sukeltą karvių encefalopatijas, *in vivo* patvirtinta (106).

Salmonella enterica subsp. *enterica* ser. Enteritidis CVI-1 sekretuojamos YegQ peptidazės, homologiškos Clg peptidazės sekai, svarba virulentiškumui *in vitro* nustatyta naudojant viščiukų makrofagų ląstelių HD-11 kultūrą (107). YegQ peptidazė užtikrina *S. enterica* įsiskverbimą į makrofagus. Charakterizuojant YegQ peptidazės funkcinę svarbą tiesiogiai nustatyta peptidazės sekrecija. YegQ peptidazės katalizinis aktyvumas *in vitro*, substratais naudojant azokolį ir želatiną, nenustatytas (107).

Aeromonas spp. judrių rūšių kamienų genomuose identifikavus U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazę koduojantį geną, kartu nustatytas geno variabilumas (108). U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazė iš *Aeromonas* spp. *in vitro* išlieka netirta. *Aeromonas veronii* RY001 genome acg geno, koduojančio kolagenolizinę peptidazę, homologišką Clg peptidazei, išveiklinimas lėmė kamieno kolagenolizinio potencialo sumažėjimą beveik 50 %, nepriklausomai įvertinus enterobakterijos ląstelių bei ląstelių ekstraląstelių baltymų gebėjimą proteolizuoti azokolį, tuo tarpu *A. veronii* RY001 želatinoliziniam, kazeinoliziniam ar elastinoliziniam potencialui acg geno išveiklinimas neturėjo įtakos (108). Koduojamo Clg homologo svarba patogeno virulentiškumo užtikrinimui netiesiogiai nustatyta *in vitro* vertinant *A. veronii* RY001, kurio genome acg genas išveiklintas, adhezyvumą, invazyvumą bei citotoksiškumą naudojant karpio epitelios EPC ląstelių kultūrą. *A. veronii* RY001 koduojamo acg geno išveiklinimas turėjo reikšmingos įtakos kamieno adhezyvumui ir invazyvumui, nes išveiklinus acg geną nustatytas minėtų virulentiškumo charakteristikų sumažėjimas apytiksliai 50 % (108). *A. veronii* RY001 koduojamo acg geno išveiklinimas taip pat sumažino patogeno citotoksiškumą beveik 50 % (108). Letali dozė vertinus acg geno išveiklinimo įtaką *A. veronii* RY001 patogeniškumui *in vivo* auksinėse žuvelėse ir BALB/c pelėse padidėjo atitinkamai 1,8 ir 4 kartus (108).

U32 proteolizinių fermentų šeimos yrrN (*Bacillus subtilis*) grupei priskiriama smcol2 peptidazė iš *S. mutans* GS-5 ser. c, patogeno genome identifikavus peptidazės geną, klonuota. Rekombinantinė smcol2 peptidazė proteolizavo I tipo kolageną, želatinolizinis peptidazės aktyvumas *in vitro* taip pat nustatytas (109). Sąveikos su kolagenu domenai būdingi *S. mutans* GS-5 ser. c baltymų domeninei organizacijai smcol2 sekoje neidentifikuoti (99). *S. mutans* UA159 koduojamos galimai peptidazės SMU.759, kurios seka identiška smcol2 iš *S. mutans* GS-5 ser. c sekai, genas analogiškai SMU.761 genui, intensyviau transkribuotas kultivuojant kamieną taikant gliukozės perteklių, lyginant su pastarojo geno transkripcijos intensyvumu kamieną kultivuojant taikius sumažintą gliukozės koncentraciją (100).

U32 proteolizinių fermentų šeimos grupei nepriskiriamos galimai peptidazės YrpA (MEROPS U32.UPW) ir YrpB (MEROPS U32.UPW) iš *Y. ruckeri* 150 tikslingai tirtos plėtojant patogeno virulentiškumo mechanizmų



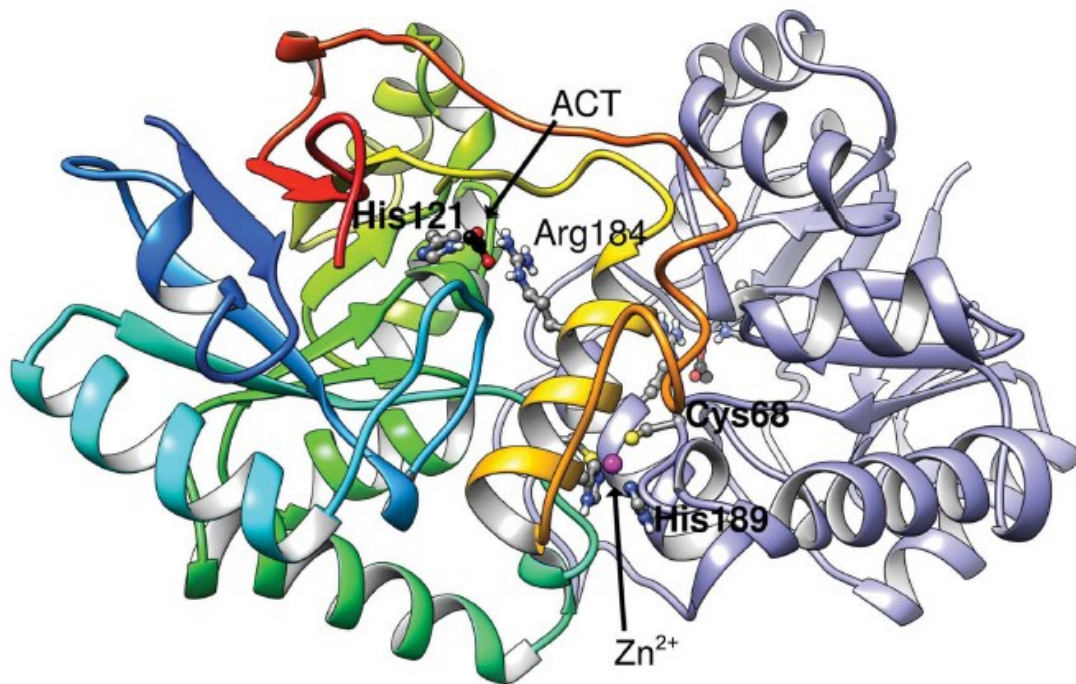
5 pav. U32 proteolizinių fermentų šeimai priskiriamų YrpA ir YrpB iš *Yersinia ruckeri* 150 genų numatyta genomine organizacija, schemoje pažymėtas scp2 genas koduoja membraninį sterilių nešiklį, tuo tarpu cdsB (lviX) genas koduoja cisteino desulfidazę (110).

charakterizavimo strategiją (111). Lašišinių žuvų virškinimo sistemos patogeno koduojamų galimai peptidazių YrpA ir YrpB genai sudaro operoną (5 pav.), kurio transkripciją indukuoja, kaip tipiška bakterijų induktyvioms peptidazėms (112), enterobakterijų kultivavimas terpėje, papildytoje baltymais (110). *Y. ruckeri* 150 kultivavimas mikroaerofilinėmis sąlygomis taip pat indukavo *yrpAB* operono transkripciją (110). Charakterizavus *yrpAB* transkripcijos valdymą nustatyta, jog YrpA ir YrpB genų transkripciją intensyviausia *Y. ruckeri* 150 kultivuoiant terpėje, papildytoje kazeinu ar kazeino hidrolizatu mikroaerofilinėmis sąlygomis, taigi sinergistinis terpės sudėties ir aeracijos sąlygų efektas, intensyviausiai skatinantis *yrpAB* operono transkripciją, patvirtintas (110). *Y. ruckeri* 150 kultivavimo terpės papildymas želatina, aminorūgštimis, amonio chloridu ar gliukoze neturėjo įtakos YrpA ir YrpB genų transkripcijai. Kultivavimo temperatūra, osmotinis stresas bei skirtingas kultivavimo terpės pH taip pat nekeitė *yrpAB* operono transkripcijos intensyvumo (110). Siekiant nustatyti YrpA ir YrpB svarbą enterobakterijų fiziologijai ir/ar virulentiškumui, pastarąsias galimai peptidazes koduojantys genai išveiklinti. YrpA ar YrpB geno

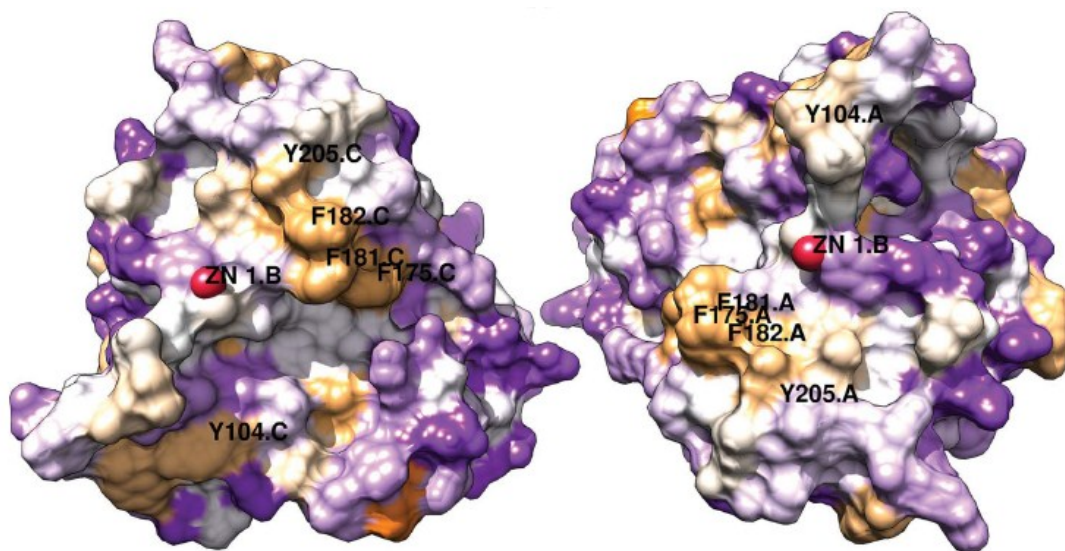
išveiklinimas neturėjo įtakos *Y. ruckeri* 150 kultūros augimo dinamikai, kultivuojant terpėje papildytoje kazeinu, tuo tarpu *in vivo* vaivorykštiniuose upėtakiuose, įvertinus YrpA koduojančio geno išveiklinimą, nustatytas išreikštas letalios *Y. ruckeri* 150 dozės padidėjimas, netiesiogiai patvirtinęs YrpA svarbą enterobakterijos virulentiškumui (110). YrpA ar YrpB charakterizavimas *in vitro* nebuvo plėtotas, visgi charakterizavus pastarųjų galimai peptidazių genų transkripcijos valdymą bei įvertinus genų išveiklinimo įtaką *Y. ruckeri* 150 augimo dinamikai, galimai peptidazių svarba patogeno mitybai nepatvirtinta, todėl tikėtina, jog užtikrina žuvies audinių kolonizavimą (110). YrpA ir YrpB homologai, sudarantys tikėtiną *yrpAB* operonui analogiškos sandaros operoną, identifikuoti *Yersinia* spp. kamienuose, taip pat ir patogeniškuose žmogui, todėl U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių svarba *Yersinia* spp. virulentiškumui pagrįstai tikėtina (110, 111).

U32 proteolizinių fermentų šeimos grupei nepriskiriamos galimai peptidazės Mk0906 (MEROPS U32.UPW) iš *M. kandleri* AV19 charakterizuota erdvinė struktūra, tačiau rekombinantinės Mk0906 katalizinis aktyvumas, *in vitro* substratais naudojant I tipo kolageną ir kazeiną, nenustatytas (113).

Mk0906 kristalinosi suformavusi homodimerą (6A pav.). Charakterizuota galimai peptidazės monomero erdvinė struktūra – iškreipta TIM β/α -statinė, be $\alpha 8$ spiralės (7 pav.). Gretinus Mk0906 erdvinę struktūrą su charakterizuotomis baltymų erdvinėmis struktūromis nustatyta, jog Mk0906 erdvinės struktūros sankloda gimingiausia vario homeostazės baltymui iš *Shigella flexneri* 2a 301 bei fosforibozilantranilato izomerazei iš *Thermotoga maritima*. TIM β/α -statinės sankloda yra tipiška baltymų erdvinės struktūros sankloda (114), tačiau Mk0906 sanklodai būdingi saviti erdvinės struktūros elementai. Mk0906 struktūroje TIM β/α -statinės sanklodai nebūdinga $\alpha 8$ spiralė, o $\beta 7$ - $\beta 8$ juostų elementas išštas (7 pav.). Pastarąjį erdvinės struktūros elementą taip pat formuojanti $\alpha 7$ spiralė, skirtingai nei tipiskai būdinga TIM β/α -statinės sanklodai, išsidėstydama statinės viršuje kerta statinės C-galo pusę (7 pav.). Tobulos TIM β/α -statinės sanklodai būdingas $\alpha 7$ spiralės išsidėstymas statinės šone, tuo tarpu Mk0906 struktūroje statinės šone išsidėsčiusi išštas $\alpha 7$ - $\beta 8$ kilpa.



A



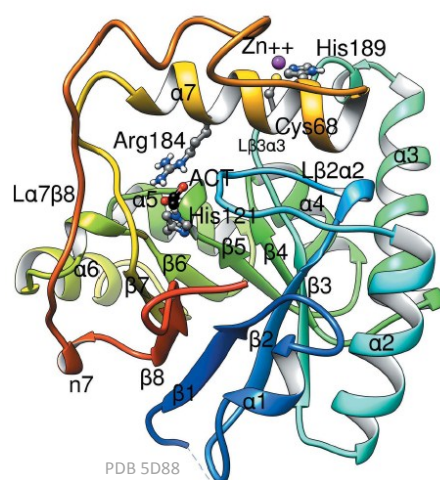
B

6 pav. Mk0906 homodimero erdvinė struktūra. A- Mk0906 monomerų sąveika homodimero molekulėje, pažymint koordinuojamą cinko joną bei su monomerais sąveikaujantį acetato joną; B- Mk0906 monomerų sąveikos paviršiai, pažymint monomerų koordinuojamą cinko joną bei paviršių hidrofobiškumą (113).

Pastaroji kilpa, $\alpha 7$ spiralė bei atsikišusi $\beta 2$ - $\alpha 2$ kilpa suformuoja gaubto pavidalo struktūros elementą, charakterizuotą statinės C-galo pusėje. Mk0906 homodimerizuojantis $\alpha 7$ spiralė ir $\alpha 7$ - $\beta 8$ kilpa suformuoja monomerų sąveikos paviršių (6 pav.) (113).

Charakterizavus Mk0906 monomerų tarpusavio sąveikas nustatyta, jog Mk0906 struktūroje monomerai sąsajos tipo sąveika koordinuoja cinko joną (6B pav.). Metalo katijonas simetriškai koordinuojamas konservatyvių Cys⁶⁸ ir His¹⁸⁹, funkcionuojančių jono ligandais. Mk0906 homodimero kiekvieno monomero $\beta 3$ - $\alpha 3$ kilpos motyvas Cys⁶⁸-nepolinė aminorūgštis liekana-Gly-Xaa-Xaa-His-Leu⁷⁴ bei $\alpha 3$ spiralės motyvas

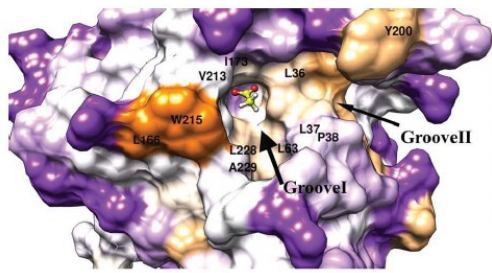
Asn¹⁸⁵-nepolinė aminorūgštis liekana-Phe-Ser-His¹⁸⁹ užtikrina monomerų gebėjimą sudaryti sąsajos tipo sąveiką su cinko jonu homodimerizuojantis (6 pav.). Archėjų bei bakterijų U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių sekose motyvai, užtikrinantys sąsajos tipo sąveikos suformavimą Mk0906 homodimero



7 pav. Mk0906 monomero erdvinės struktūros sankloda. Baltymo polipeptido N-galo išsidėstymas pažymėtas mėlyna spalva, C-galo – raudona. Cinko jono koordinavimas Cys⁶⁸ ir His¹⁸⁹ bei acetato sąveika su baltymo molekule Arg¹⁸⁹ ir His¹²¹ detaliai atvaizduotos (113).

sekose (113). Mk0906 monomerų tarpusavio sąveikos paviršių formuojančios $\alpha 7$ spiralės ir $\alpha 7$ - $\beta 8$ kilpos žemiau galimai peptidazės monomerų sąsajos tipo sąveikos su cinko jonu jungiasi hidrofobinėmis ir vandenilinėmis jungtimis, kurios taip pat svarbios tarpusavyje sąveikaujančių Mk0906 monomerų sąveikai homodimero molekulyje. Mk0906 monomerai tarpusavyje sąveikauja tampriai, išreikštai dideliu paviršiaus plotu (6 pav.) (113).

Mk0906 katalizinis aktyvumas *in vitro* nenustatytas. Galimai peptidazės homodimero struktūroje erdvinės struktūros elementai, tipiški peptidazių erdvinėms struktūroms, taip pat nenustatyti (7 pav.). Visgi tipiški fermentams, kurių erdvinės struktūros sankloda analogiška Mk0906 erdvinės struktūros



8 pav. Mko906 numatytas aktyvusis centras, pažymint acetato joną, griovelius vedančius į bei iš numatyto aktyviojo centro, kartu pažymint paviršių hidrofobiškumą (113).

sanklodai, Mko906 monomero TIM β/α -statinės β -statinės C-galo pusėje nustatytas tikėtinas galimai peptidazės aktyvusis centras (8 pav.). Mko906 tikėtiną aktyvųjį centrą sudaro $\alpha 7$ spiralės Arg¹⁸⁴, izoliuota minėtos spiralės bei greta išsidėsčiusių aminorūgščių liekanų (8 pav.).

Išsprendus Mko906 erdvinę struktūrą tikėtiname galimos peptidazės aktyviajame centre, nustatytas acetato jonas, sąveikaujantis su tikėtino aktyviojo centro aminorūgščių liekanų šoninėmis grandinėmis. Tikėtinas Mko906 aktyvusis centras priemas tik hidrofobinėms aminorūgščių grandinėms ar hidrofobinėms molekulėms, nes molekulių patekimas į tikėtiną aktyvųjį centrą įmanomas tik hidrofobinių aminorūgščių liekanų suformuotais grioveliais (8 pav.) (113). Griovelis, vedantis į Mko906 tikėtiną aktyvųjį centrą, dengiamas tikėtina labilia arka, suformuota Ser²³⁰, Gly²¹³, Glu²³², Pro²³³ ir Pro²³⁴, todėl galimai peptidazei Mko906 tikėtina išreikšta substratinė specializacija. Griovelis, vedantis iš Mko906 aktyviojo centro, izoliuotas $\beta 2$ - $\alpha 2$ kilpos C-galo bei $\alpha 7$ - $\beta 8$ kilpos N-galo (8 pav.) (113).

Patogeninių bakterijų U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių transkripcija ir/ar raiška fragmentiškai charakterizuota. *Streptococcus pneumoniae* R6 koduojamos U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazės spr1282 transkripcija slopinama ląstelės atsako į rūgštinį stresą metu (115). U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių SA1441 ir SA1440 iš *Staphylococcus aureus* 113 genų transkripciją skatina patogeno kultivavimas planktoninį augimą arba bioplėvelių formavimą palaikančiomis sąlygomis (116). *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168 koduojamų U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių yrrN ir yrrO genų transkripciją slopino bacilų kultivavimas palaikius žemą temperatūrą (117) bei superoksidu ir peroksidu sukeltas stresas (118). Nustačius U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių PA3912 ir PA3913 iš *Pseudomonas*

aeruginosa PAO1 genų transkripcijos skatinimą patogeną kultivuojant terpėje, papildytoje nitratais aerobinėmis sąlygomis (119), tirta pastarųjų galimai peptidazių svarba patogeno metabolizmui anaerobinėmis sąlygomis bei patogeno virulentiškumui (120). PA3912 ir PA3913 svarba *P. aeruginosa* PAO1 augimui kultivuojant patogeną anaerobinėmis sąlygomis patvirtinta – išveiklinus PA3912 ir/ar PA3913 geną *P. aeruginosa* PAO1 neaugo anaerobinėmis sąlygomis, tačiau patogeno virulentiškumui *in vivo* salotoje PA3912 neturėjo įtakos (120).

U32 proteolizinių fermentų šeimai priskiriamų peptidazių genomine ir operonine organizacija, substratinis specifiškumas bei fiziologinė svarba skiriasi, todėl apibrėžti tipiškas pastarosios šeimos peptidazių charakteristikas keblu. Tipišku atveju organizmų chromosomose identifikuojami keli genai, koduojantys U32 proteolizinių fermentų šeimai priskirtinas peptidazes, kurių sekrecija *in silico* nenumatoma (1). Patogenų U32 proteolizinių fermentų šeimai priskiriamos peptidazės tipišku atveju svarbios virulentiškumo užtikrinimui (95, 96, 108, 110). U32 proteolizinių fermentų šeimai priskiriamų peptidazių sekų homologiškumas atspindi mažai tikėtiną šeimos peptidazių struktūrinės organizacijos heterogeniškumą (113), tačiau šeimos peptidazių funkcinis heterogeniškumas pagrįstai tikėtinas (82, 121, 93, 113).

1.5. Geobacilų kolagenolizinės peptidazės

Geobacilų genomuose identifikuota didelė galimai peptidazes koduojančių genų įvairovė (1). Peptidazės, koduojamos geobacilų, tirtos, tačiau charakterizuotos tik kelios geobacilų kolagenolizinės peptidazės. Charakterizuotos kolagenolizinės oligopeptidazės Pz-peptidazė A ir B iš *Geobacillus collagenovorans* MO-1 priskiriamos M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimiui, tuo tarpu termolizino homologai, gebantys proteolizuoti fibrilinį kolageną, priskiriami M4 proteolizinių fermentų šeimai (1). Kolagenolizinė endopeptidazė iš *G. collagenovorans* MO-1 priskiriama S8 proteolizinių fermentų šeimos S8A pošeimiui (1).

Pz-peptidazės A iš *G. collagenovorans* MO-1 substratinis specifiškumas nustatytas, o kolagenolizinės oligopeptidazės erdvinė struktūra charakterizuota

(3 pav.) (36, 63). Charakterizuota oligopeptidazė yra tipiška cinko oligopeptidazė, aktyviai peptidolizuojanti kolageno oligopeptidus. Proteolizinis Pz-peptidazės A aktyvumas nenustatytas. Taikant sintetinius oligopeptidus nustatyta, jog oligopeptidazė peptidolizuoja imtinai 4-13 aminorūgščių liekanų grandinės ilgio peptidus. Pz-peptidazės A specifiškumas substrato aminorūgščių grandinės sekai nustatytas, tačiau neišreikštas (122). Charakterizuota oligopeptidazė efektyviausiai hidrolizavo peptidinį ryšį tarp Leu-Gly aminorūgščių liekanų. Pz-peptidazės A aktyvumą slopino EDTA, fenantrolinas, o taip pat 2 mM Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} ir Cu^{2+} katijonų koncentracija (36).

Charakterizavus Pz-peptidazės A erdvinę struktūrą, patvirtintas oligopeptidazės priskirtinumas cinko oligopeptidazėms. Pz-peptidazės A aktyvųjų centrą suformuoja tipiška cinko oligopeptidazėms konservatyvus cinko oligopeptidazių motyvas His-Glu-Xaa-Xaa-His bei trečiuoju cinko jono ligandu funkcionuojantis glutamatas (63). Nors Pz-peptidazės A erdvinė struktūra analogiška M3 proteolizinių fermentų šeimai priskiriamų neurolizino ir timeto oligopeptidazės erdvinėms struktūroms, oligopeptidazės struktūrai būdingi taip pat ir saviti elementai. Pz-peptidazės A monomero globulė kompaktiška, o į aktyvųjų centrą veda du tuneliai, kertantys oligopeptidazės monomero globulę įkypai (3 pav.) (63). Charakterizavus Pz-peptidazės A erdvinę struktūrą nustatyta, jog Trp³⁷⁷ indolo žiedo labilumas lemia oligopeptidazės specifiškumą substrato gradinės ilgiui (63). Pz-peptidazės A polipeptidinėje grandinėje sutinkamos šešios cisteino liekanos, tačiau charakterizavus kolagenolizinės oligopeptidazės erdvinę struktūrą disulfidiniai tilteliai nenustatyti. M3 proteolizinių fermentų šeimos oligopeptidazėms cisteinų *in vivo* sudaromos sąveikos tikėtina svarbios fermento aktyvumo reguliavimui (122).

Pz-peptidazė B iš *G. collagenovorans* MO-1 – oligopeptidazės F homologas. Nustatytos Pz-peptidazės B aktyvumo bei substratinio specifiškumo charakteristikos analogiškos Pz-peptidazės A charakteristikoms, nes Pz-peptidazė B efektyviausiai hidrolizavo peptidinį ryšį tarp Leu-Gly aminorūgščių liekanų (36, 123). Pz-peptidazė B kristalinta, tačiau oligopeptidazės

erdvinė struktūra nėra charakterizuota (124). Skirtingai nei Pz-peptidazė A, Pz-peptidazė B geba homodimerizuotis (36).

Charakterizuotų *G. collagenovorans* MO-1 kolagenolizinių peptidazių sekos homologiškos, visgi peptidazių epitopai skirtingi. Pz-peptidazės A ir B yra termoaktyvios bei termostabilios endopeptidazės, kurių katalizinis mechanizmas ir substratinis specifiškumas analogiški (36). *G. collagenovorans* MO-1 kolagenolizinės peptidazės išsamiai charakterizuotos *in vitro*, tačiau peptidazių funkcinės svarbos charakterizavimo strategija nebuvo plėtotą. Viduląstelinių Pz-peptidazių A ir B svarba *G. collagenovorans* MO-1 gebėjimui įsisavinti kolageną išlieka numanoma (13).

Geobacilų sekretuojami termolizino homologai – bacilolizinais iš *Geobacillus stearothermophilus* MK232 ir *Geobacillus stearothermophilus* TELNE bei stearylizinas iš *Geobacillus stearothermophilus* CU21 – plataus substratinio specifiškumo cinko endopeptidazės, gebančios proteolizuoti azokolį (125, 126).

Kolagenolizinė endopeptidazė iš *G. collagenovorans* MO-1 priskiriama S8 proteolizinių fermentų šeimos S8A pošeimui aktyviai proteolizavo I tipo kolageną, IV tipo kolageną bei želatiną, tačiau oligopeptidolizinis endopeptidazės aktyvumas, substratais naudojusi sintetinius oligopeptidus, nenustatytas (127). Termoaktyvi bei termostabili endopeptidazė, homologiška subtilizinas, proteolizavo fibrilinį kolageną į skirtingo grandinių ilgio kolageno oligopeptidus. *G. collagenovorans* MO-1 sekretuojama kolagenolizinė endopeptidazė gebėjo homodimerizuotis (127). Tikslingai tyrus kolagenolizinės endopeptidazės domeninę organizaciją nustatytas hidrolazei būdingas C-galinis sąveikos su kolagenu domeną. Pastarąjį domeną suformuoja kartotinis 20 aminorūgščių motyvas. Charakterizavusi kolagenolizinės endopeptidazės iš *G. collagenovorans* MO-1 sąveiką su kolagenu nustatyta, jog peptidazės sąveiką su kolageno superspirale užtikrina vandenilinės jungtys (128). Sekretuojamos kolagenolizinės peptidazės funkcinė svarba *G. collagenovorans* MO-1 mitybai bei peptidazės gebėjimas su viduląstelinėmis Pz-peptidazėmis sudaryti katabolinę kaskadą, užtikrinančią kolageno įsisavinimą, numanoma (10, 122).

2. Metodai

2.1. Nukleorūgščių elektroforezė

Nukleorūgščių išskirstymui naudoti 1 % (masė/tūris) agarozės geliai. Elektroforezė vykdyta įprastos sudėties TAE buferyje palaikant 5-10 V/cm įtampą. Nukleorūgščių vizualizavimui agaroziniai geliai papildyti 0,5 µg/mL etidžio bromido. Išskirstant DNR fragmentus klonavimui į vektorius, etidžio bromidu ruošiami geliai nebuvo papildomi, gelių dažymas atliktas po elektroforezės. Geliai analizuoti bei fotografuoti apšvietus UV.

2.2. Baltymų elektroforezė

Baltymų bei oligopeptidų mišinių išskirstymui naudota vienakryptė, vertikalioji, nutrūkstama, glicino natrio dodecilsulfato-poliakrilamido gelio elektroforezė (NDS-PAGE) (129). NDS-PAGE, esant kambario temperatūrai, vykdyta naudojant koncentruojančiuosius ir išskirstančiuosius, atitinkamai, 4 ir 12 % akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido (santykis 37,5:1) gelius, palaikant 30 V/cm įtampą. Mėginių užnešimui naudotas 5x mėginio buferis (50 mM TRIS-HCl pH 6,8/20 °C buferis su 4 % (masė/tūris) NDS ir 20 % (tūris/tūris) glicerolio bei 0,01 % (masė/tūris) bromfenolio mėlynojo arba 50 mM TRIS-HCl pH 6,8/20 °C buferis su 20 mM 2-ME ir 4 % (masė/tūris) NDS bei 20 % (tūris/tūris) glicerolio ir 0,01 % (masė/tūris) bromfenolio mėlynojo). Jei kitaip nenurodyta, gauti mišiniai prieš užnešimą 5 min. kaitinti 95 °C. Baltymai bei oligopeptidai vizualizuoti pagal gamintojo rekomendacijas dažant PageBlue Protein Staining solution (Thermo Fisher Scientific).

2.3. Bioinformatinė analizė

Signaliniai peptidai bei pastarųjų peptidų ilgis numatyti SignalP 4 serveriu (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (130)). Homologiškų sekų paieška naudojantis National Center for Biotechnology Information BLAST+ 2 serveriu (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (131)) atlikta Standard Protein BLAST taikant blastp pradinius parametrų nustatymus. MEGA 6

programa (132) naudota sekų analizei bei sulyginimui. Sekų identiškumas procentais apskaičiuotas naudojus Jotun Hein metodą, taikant PAM250 verčių lentelę MEGALIGN komponentu iš LASERGENE 6 (DNASTAR). Daugybiniai polipeptidų sekų palyginiai atlikti ClustalX 2 programa (133), taikant pradinis programos parametrų nustatymus. Baltymų antrinė struktūra numatyta I-TASSER 4 serveriu (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> (134)). Konservatyvūs baltymų sekų motyvai bei baltymų domeninė organizacija nustatyta NCBI Conserved Domain Database 3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml> (135)), PROSITE 20 (<http://www.prosite.expasy.org> (136)) ir Pfam 28 (<http://pfam.xfam.org> (137)) duomenų bazių serveriais. Promotoriai numatyti Softberry BPROM (138), terminatoriai numatyti Softberry FindTerm (138), taikius pradinis programų parametrų nustatymus. Terminatoriai taip pat numatyti ARNold serveriu (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/> (139, 140)). Charakterizuotų peptidazių operoninė organizacija numatyta Softberry FGENESB (138), taikius pradinis programos parametrų nustatymus bei *in silico* įvertinta MicrobesOnline (<http://www.microbesonline.org> (141)) ir Prokaryotic Operon Database (<http://operons.ibt.unam.mx/OperonPredictor/> (142)) duomenų bazėse.

2.4. *G. thermoleovorans* DSM 15325 kultivavimas

G. thermoleovorans DSM 15325 (N-3) (Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros Mikroorganizmų kultūrų kolekcija (Vilnius, Lietuva)) biomasės prieaugiui, palaikymui bei grynumo patikrinimui kolonijų klonavimo metodu naudotas maitinamasis agaras ruoštas pagal gamintojo rekomendacijas.

Modifikuota M9 (mM9) (N. Kriučichina ir N. Kuisienė, nepublikuoti rezultatai) terpė naudota *G. thermoleovorans* DSM 15325 suspensijos kultivavimui. Naudotą mM9 terpę 50 mM MES-NaOH pH 6,5 buferyje sudarė (mL/L): 5x druskų tirpalas, 200; 1 M MgSO₄, 2; 1 M CaCl₂, 0,1; 1000x vitaminų tirpalas, 1; 10x aminorūgščių tirpalas, 100; bei D-gliukozė 2,5 g/L. Druskų koncentrato tirpalas (g/L): KH₂PO₄, 15; NaCl, 2,5; NH₄Cl, 5. Vitaminų koncentrato tirpalas (mg/L): D-biotinas, 10; *myo*-inozitolis, 100; niacinas, 100;

piridoksinas, 100; riboflavinas, 100; tiaminas, 100. Aminorūgščių koncentrato sudėtis pateikta (143). Kamienas kultivuotas Erlenmėjerio kolbose, užpildant ne daugiau kaip ketvirtadalį kolbų tūrio, aeruojant 180 rpm. Augimas vertintas matuojant optinį tankį (OT), esant 600 nm.

2.5. *G. thermoleovorans* DSM 15325 viduląstelinių ir ekstraląstelinių baltymų išskyrimas

G. thermoleovorans DSM 15325 baltymai išskirti iš vėlyvos eksponentinės augimo fazės kultūros, kultivuotos mM9, palaikant 60 °C. Kamieno kultūra, naudota baltymų išskyrimui, ruošta atliekant tris persėjimus, inokuliuojant 5 % (tūris/tūris) vėlyvos stacionarios augimo fazės kultūros, taip pat augusios mM9, palaikant 60 °C.

Baigus kultivavimą ląstelės iš kultūrinio skysčio surinktos centrifuguojant 7000×g, 20 min., esant 4 °C. Ląstelės du kartus praplautos 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/60 °C. Praplovus, į pastarąjį buferį resuspenduotos ląstelės lizuotos ultragarsu (ciklas: 30 s pulsas (20 kHz, amplitudė 35 %, 500 W), 30 s pauzė; viso 30 ciklų) šaldant lede. Ląstelių nuolaužos pašalintos centrifuguojant 12000×g, 20 min., esant 4 °C. *G. thermoleovorans* DSM 15325 išskirto lizato viduląstelinių baltymų preparatas 12 val. dializuotas prieš resuspendavimo buferį tūrių santykiu 1:5000, esant 4 °C. Kamieno kultūrinio skysčio supernatanto ekstraląsteliniai baltymai išskirti, palaikant 4 °C, precipitacija išsūdzius 80 % (NH₄)₂SO₄ įsotinimu. Ekstraląstelinių baltymų precipitatas nusodintas centrifuguojant 12000×g, 30 min., esant 4 °C ir resuspenduotas 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/60 °C buferyje. Gautas preparatas 12 val. dializuotas prieš resuspendavimo buferį tūrių santykiu 1:5000, esant 4 °C.

2.6. *G. thermoleovorans* DSM 15325 kolagenolizinių peptidazių identifikavimas

Išskirtų *G. thermoleovorans* DSM 15325 viduląstelinių ir ekstraląstelinių baltymų elektroforeziniai profiliai analizuoti atlikus NDS-PAGE. Želatiną ir iš dalies denatūruotą I tipo kolageną peptidolizuojančių kolagenolizinių peptidazių aktyvumas detektuotas minėtų substratų zimografija. Detektuotų

peptidazių molekulinės masės nustatytos remiantis baltymų molekulinų masių žymeniu atsižvelgus į zimogramų geliuose įpolimerintų substratų įtaką baltymų elektroforeziniam mobilumui (144, 145). Kolagenolizinių peptidazių identifikavimui masių spektrometrija išpjauti NDS-PAGE gelio fragmentai su išsidėsčiusiais nustatytas peptidazių molekulinės masės atitinkančių molekulinų masių baltymais.

Detektuotų kolagenolizinių peptidazių tikėtinas išsidėstymas poliakrilamido gelyje nepriklausomai nustatytas įvertinus azokolio hidrolizės intensyvumą. Identiškai, kaip vykdant zimografiją, išplovus NDS iš NDS-PAGE gelio, poliakrilamido gelis ties baltymų molekulinų masių žymens žinomų masių standartais išpjautytas. Gelio fragmentai homogenizuoti šaldant FastPrep-24 (MP Biomedicals) homogenizatoriumi, naudojant 0,1 mm ø stiklo granules (ciklas: 20 s homogenizavimo (5 m/s), 40 s pauzė; viso 5 ciklai). Baltymai iš homogenizuotų gelio fragmentų 12 val. eliuoti į 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/60 °C buferį su 20 mM CaCl₂, purtant 1000 rpm, palaikant 4 °C. Kolagenolizinės peptidazės baltymų preparatuose detektuotos įvertinus azokolio hidrolizės intensyvumą.

Išpjautų gelio fragmentų su *G. thermoleovorans* DSM 15325 kolagenolizinėmis peptidazėmis mėginiai saugoti 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/20 °C buferyje, esant 4 °C. Baltymų iš gelio fragmentų mėginių peptidų aminorūgščių sekos *de novo* identifikuotos masių spektrometrija MALDI TOF/TOF-MS/MS ESI-TRAP ($p < 0,05$) veikiant tripsinu, Lenkijos mokslų akademijos Biochemijos ir biofizikos instituto Masių spektrometrijos laboratorijoje (Varšuva, Lenkija).

2.7. GT-SM3B geno klonavimas

Visos sekos GT-SM3B genas klonuotas į raiškos vektorių pET-28c(+) (Novagen) oligopeptidazės seką papildant N-galiniu šešių histidino liekanų formuojamu giminingumo inkaru bei trombino atpažįstama aminorūgščių seka. GT-SM3B genas pagausintas polimerazine grandinine reakcija (PGR) matrica naudojant *G. thermoleovorans* DSM 15325 genomine DNR bei pradmenų porą M03007kaust1F ir M03007kaust1RRS (2 lentelė). Pradmenys parinkti, įvedant restrikcijos endonukleazių atpažįstamas sekas, PRIMERSELECT komponentu

2 lentelė. Pradmenys.

Pradmuo	Seka, 5'-3'	Geno regionas, nt	Restrikcijos endonukleazės seka, pabraukta
M03007kaust1F	CAT ATG <u>GCT</u> <u>AGC</u> ATG ARG CGC TGG C	1-13	<i>NheI</i>
M03007kaust1RRS	<u>TCG</u> <u>GAT</u> <u>CCG</u> TCA TGT AGA CCG CTG ACG	1840-1857	<i>BamHI</i>
GEOCOL-F	CGG GCC AAC GCT GAC AAC TTT ACG	163-186	-
GEOCOL-R	GAA CCT TGA CGA TTT GCA GCG GAT GG	1194-1219	-
LITCOL-F	GGT <u>CGG</u> <u>ATC</u> <u>CCC</u> ATG CTT TTA AAA AAT G	1-16	<i>BamHI</i>
LITCOL-R	TTT <u>GCG</u> <u>GCC</u> <u>GCT</u> TAA TTC TCC TTT CTC	1254-1269	<i>NotI</i>
U32pCriFw	CAC <u>CAT</u> <u>GGT</u> <u>GTT</u> AAA AAA TGA ACG	1-20	<i>NcoI</i>
U32pCriRv	CTA <u>GTC</u> <u>GAC</u> TTA ATT CTC CTT TCT C	1254-1269	<i>SalI</i>

iš LASERGENE 6 (DNASTAR). Pradmenų sudarymui naudotos galimai oligopeptidazių F genų sekos iš *Geobacillus* sp. C56-T3, *Geobacillus* sp. Y412MC52, *Geobacillus* sp. Y412MC61, *Geobacillus kaustophilus* HTA426 bei *Geobacillus thermoleovorans* CCB_US3_UF5 genomų. GT-SM3B geno PGR mišinyje buvo DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), 0,25 μM kiekvieno pradmens ir 10 ng matricos. PGR vykdyta: pradinė denatūracija 2 min./95 °C; 29 gausinimo ciklai, kurių kiekvieną sudarė 1 min./95 °C, 2 min./60 °C ir 3 min./72°C; galutinė elongacija 7 min./72 °C. PGR produktas restrikuotas bei T4 DNR ligaze (Thermo Fisher Scientific) liguotas į vektorių pagal gamintojo rekomendacijas. Ligacijos produktai elektroporuoti į *Scherichia coli* DH5α (F⁻ *endA1 hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺) *glnV44 thi-1 λ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR nupG Δ(lacZYA-argF)-U169 Φ80dlacZΔM15*) (Novagen). Sekoskaita patikrinta rekombinantinė plazmidė išskirta iš atrinktos kolonijos elektroporuota į baltymų raiškos kamieną *Escherichia coli* BL21 (DE3) (F⁻ *ompT hsdS_B*(r_B⁻, m_B⁻) *gal dcm lon λ(DE3 (lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5))*) (Novagen). Abiem atvejais transformantai išsėti ant agarizuotos (15 g/L) Luria-Bertani (LB) (146) terpės (g/L): peptono, 10; mielių ekstrakto, 5; NaCl, 10; papildytos kanamicinu 30 μg/mL ir kultivuoti 12 val. palaikant 37°C.

2.8. Rekombinantinės GT-SM3B raiškos įvertinimas bei produkavimo optimizavimas

E. coli BL21 (DE3) transformantai su GT-SM3B raiškos konstruktu kultivuoti LB terpėje su kanamicinu (30 μg/mL) 12 val., aeruojant 180 rpm,

palaikant 37 °C. Siekiant įvertinti pradinių GT-SM3B heterologinės raiškos sąlygų įtaką tikslinio baltymo išėigai bei tirpumui LB terpė su kanamicinu inokuliuota 1 % (tūris/tūris) pastarąja kultūra ir kultivuota Erlenmėjerio kolbose, užpildant ne daugiau kaip ketvirtadalį tūrio, identišškai kaip inokuliatas. Kultūrai pasiekus OT₆₀₀ 0,5 heterologinė GT-SM3B raiška 4 val. indukuota 1 mM izopropil-β-D-tiogalaktopiranozido (IPTG).

Prenkant tirpios GT-SM3B produkavimui optimalias sąlygas buvo parenkamos skirtingos esminių raiškos parametrų vertės: *E. coli* BL21 (DE3) kultūros tankis pradėdant indukciją OT₆₀₀ 0,5, 0,8; temperatūra raiškos indukcijos metu 25, 30 °C; indukavimui taikyta IPTG koncentracija 0,1, 0,5, 1 mM; raiškos indukcijos trukmė 2, 4, 12 val. Optimizavimas atliktas raiškos kultūros kultivuoiant 20 mL terpės identišškai kaip vykdant GT-SM3B raišką pradinėmis sąlygomis bei kiekvienai kultūrai taikant skirtingas GT-SM3B raiškos parametrų kombinacijas. Optimizuojant LB terpė palyginta su įprastos sudėties M9 (147) terpe, papildyta kazeino hidrolizatu 1 % (masė/tūris), vertinant terpės tinkamumą tirpios GT-SM3B produkcijai.

Rekombinantinės GT-SM3B raiškos išėiga *E. coli* BL21 (DE3) lizato tirpioje ir netirpioje frakcijose, o taip pat raiškos kamieno koncentruotame sekretome įvertinta matuojant oligopeptidolizinį aktyvumą bei NDS-PAGE.

2.9. Rekombinantinės GT-SM3B gryninimas

Jei kitaip nenurodyta, gryninimas vykdytas esant kambario temperatūrai. Iš kultūrinio skysčio su sekretuota GT-SM3B *E. coli* BL21 (DE3) ląstelės pašalintos centrifuguojant 7000×g, 30 min., esant 4 °C. Raiškos kultūros kultūrinio skysčio supernatanto baltymai išskirti, palaikant 4 °C, precipitacija išsūdžius imtinai nuo 30 iki 80 % (NH₄)₂SO₄ įsotinimu. Baltymų precipitatas nusodintas centrifuguojant 12000×g, 30 min., esant 4 °C ir resuspenduotas buferyje A (20 mM TRIS-HCl pH 8,4/20 °C). Gautas preparatas 12 val. dializuotas prieš buferį A tūrių santykiu 1:5000, esant 4 °C. Dializatas užneštas į anijoninės chromatografijos kolonėlę UNO Q6 (12 × 53 mm) (Bio-Rad), ekvilibruotą buferiu A. Baltymai eliuuoti buferiu A, papildytu 1 M NaCl.

Iš dalies išgryninta rekombinantinė GT-SM3B surinkta pratekėjusioje frakcijoje. Pastaroji dializuota 12 val. prieš buferį B (20 mM MES-NaOH pH 5,6/20 °C) tūrių santykiu 1:5000, esant 4 °C. Atlikus dializę mėginys užneštas į buferiu B ekvilibruotą UNO S1 (7 × 35 mm) (Bio-Rad) katijoninės chromatografijos kolonėlę. Rekombinantinė oligopeptidazė eliuuota 30 mL linijiniu NaCl (0-1 M) gradientu buferyje B, taikant 1 mL/min pratekėjimo greitį. Galiausiai frakcijos su GT-SM3B apjungtos bei 12 val. dializuotos prieš 50 mM HEPES-NaOH pH 7,3/60 °C tūrių santykiu 1:3000, esant 4 °C. Rekombinantinės GT-SM3B preparato grynumas įvertintas NDS-PAGE.

2.10. Kiekybinis oligopeptidolizinio aktyvumo įvertinimas

GT-SM3B oligopeptidolizinis aktyvumas kiekybiškai vertintas substratu naudojant Karbobenzoksi-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala-OH (Fluka). Reakcijos mišinį 50 mM HEPES-NaOH pH 7,3/60 °C buferyje, bendrame 60 µL tūryje sudarė 2 µM substrato ir 0,5 µg rekombinantinės oligopeptidazės. Atlikus reakcijų inkubavimą 10 min., purtant 350 rpm, palaikant 60 °C, vykdyta ninhidrino reakcija (148, 149) ir matuotas sugerties pokytis esant 570 nm kontrole naudojant neinkubuotą reakcijos mišinį. Peptidolizės produktų koncentracija apskaičiuota pagal standartinę tiesę, kurios sudarymui naudotas Gly-Pro-Ala (Fluka) tripeptidas. Oligopeptidolizinio aktyvumo vienetas apibrėžtas kaip GT-SM3B kiekis, optimaliomis reakcijos sąlygomis katalizuojantis 1 µM produktų susidarymą per minutę. Specifinis oligopeptidolizinis aktyvumas išreikštas vienetais mg baltymo.

2.11. Kinetinė oligopeptidolizinio aktyvumo analizė

Kinetinės rekombinantinės GT-SM3B charakteristikos V_{max} ir K_M nustatytos atlikus Karbobenzoksi-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala-OH peptidolizės pradinio greičio įvertinimą, taikius dešimtį skirtingų substrato koncentracijų iš imtinai 0,05-5 K_M . Kiekybinis oligopeptidolizinio aktyvumo įvertinimas vykdytas esant pH ir temperatūrai, optimaliems GT-SM3B. Gauti matavimų rezultatai apdoroti bei analizuoti kartu apskaičiuojant kinetines charakteristikas GraFit 7 (Erithacus Software) programa.

2.12. GT-SM3B hidrolizinio aktyvumo įvertinimas

Skirtingų grandinės ilgių kolageno oligopeptidų mišiniai ruošti iš želatinos iš kiaulės odos (MP Biomedicals), I tipo kolageno iš žiurkės uodegos (Fluka) bei nefrakcionuoto kolageno preparato iš jungiamojo audinio (Proteina). Baltymai homogenizuoti 12 val. veikiant 100 mM acto rūgštimi, esant 4 °C. Homogenizatai 12 val. dializuoti prieš 50 mM HEPES-NaOH pH 7,3/60 °C tūrių santykiu 1:3000, esant 4 °C. GT-SM3B hidrolizinis aktyvumas, substratais naudojant skirtingų tipų kolageno oligopeptidų mišinius, įvertintas identišškai kaip vykdant GT-SM3B kiekybinį oligopeptidolizinio aktyvumo įvertinimą.

2.13. Temperatūros ir pH įtakos GT-SM3B aktyvumui ir stabilumui charakterizavimas

Siekiant charakterizuoti temperatūros įtaką GT-SM3B kataliziniam aktyvumui, oligopeptidolizinis aktyvumas įvertintas 50 mM HEPES-NaOH pH 7,3 buferyje, taikant temperatūras imtinai nuo 10 iki 95 °C. GT-SM3B termostabilumas nustatytas atliekant rekombinantinės oligopeptidazės preparato pradinį 1 val. inkubavimą 60, 70 ir 80 °C 50 mM HEPES-NaOH pH 7,3 buferyje. Likutinis oligopeptidolizinis aktyvumas įvertintas po pradinio inkubavimo. Pastarųjų matavimų rezultatai palyginti su GT-SM3B oligopeptidoliziniu aktyvumu, įvertintu palaikant 60 °C, netaikius pradinio inkubavimo.

Skirtingų pH įtaka GT-SM3B aktyvumui charakterizuota įvertinant oligopeptidolizinį aktyvumą skirtinguose buferiuose: 50 mM natrio acetatas-acto rūgštis (pH 4-5), 50 mM MES-NaOH (pH 5-7), 50 mM HEPES-NaOH (pH 7-8) ir 50 mM glicinas-NaOH (pH 8-10). GT-SM3B pH stabilumas charakterizuotas įvertinant likutinį oligopeptidolizinį aktyvumą atliekant pradinį fermento preparato inkubavimą 1 val., palaikant 40 °C buferiuose, kurių pH buvo imtinai nuo pH 4 iki 10.

2.14. Metalų jonų, chelatorių bei kitų junginių įtakos GT-SM3B aktyvumui charakterizavimas

Charakterizuojant Li^+ , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sn^{2+} , Ba^{2+} jonų įtaką GT-SM3B aktyvumui, oligopeptidazės preparato mėginiai inkubuoti 30 min., palaikant 40 °C, su 1 mM minėtų metalų chloridais. Taip pat įvertinta padidintos iki 10 mM Na^+ , K^+ , Ca^{2+} koncentracijos bei 350 mM Na^+ koncentracijos įtaka GT-SM3B aktyvumui. Charakterizuojant GT-SM3B identiškomis sąlygomis atlikti pradiniai inkubavimai su skirtingų grupių junginiais: chelatoriais (EDTA, etilenglikolio tetraacto rūgštimi (EGTA) (abiem atvejais 1 mM)), reduktoriais DTT, 2-ME, Tris(2-karboksietil)fosfinu (TCEP) (visais atvejais 1 mM)), detergentais (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Triton X-100, Triton X-305 (visais atvejais 0,1 % (tūris/tūris) ir 1 % (tūris/tūris))); Brij 35, Brij 58 (abiem atvejais 1 mM); natrio dodecilsulfatu (NDS) (1 mM ir 10 mM)), chaotropikais (guanidino-HCl (1 mM); karbamidu (1 mM ir 10 mM)). Glicerolio (1 % (tūris/tūris) ir 5 % (tūris/tūris)), etilenglikolio (0,1 % (tūris/tūris) ir 1 % (tūris/tūris)) bei fosforamidono (1 mM) įtaka oligopeptidazės aktyvumui taip pat charakterizuota. Atlikus pradinį GT-SM3B inkubavimą su nurodytais junginiais ir įvykdžius fermentines reakcijas matuotas oligopeptidolizinis aktyvumas. Kontrolėmis naudoti konkretaus junginio taikytos koncentracijos ir GT-SM3B mišiniai po atlikto pradinio inkubavimo, papildžius substratu.

2.15. GT-IU32 geno transkripcijos analizė

Siekiant detektuoti GT-IU32 geno transkriptą, įvertinant *G. thermoleovorans* DSM 15325 kultivavimo temperatūros įtaką peptidazės transkripcijai, vykdyta atvirkštinės transkripcijos PGR (AT-PGR).

Suminės RNR išskyrimui *G. thermoleovorans* DSM 15325 kultivuotas mM9 terpėje, palaikant 55 ar 70 °C. Inokuliatui pastariesiems kultivavimams taip pat kultivuoti palaikant 55 ar 70 °C. Inokuliavimas identiškas nurodytam aprašant *G. thermoleovorans* DSM 15325 viduląstelių ir ekstraląstelių

baltymų išskyrimą. Nepriklausomai iš trijų ląstelių mėginių, kamieną kultivavus 55 ar 70 °C, suminė RNR išskirta GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkiniu pagal gamintojo rekomendacijas. Ląstelės surinktos centrifuguojant 7000×g, 10 min., esant 4 °C, ir 15 min. palaikant 37 °C lizuotos 40 U lizocimo (Carl Roth) buferyje 10 mM TRIS-HCl pH 8/20 °C su 1 mM EDTA. Suminės RNR preparatai veikti RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific), taikant gamintojo rekomenduojamą koncentraciją. Galimos DNR priemaišos RNR preparatuose šalintos DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific), pagal gamintojo rekomendacijas.

Išskirti suminės RNR preparatai naudoti atvirkštinės transkripcijos reakcijai. Remiantis gamintojo rekomendacijomis, naudotas rinkinys RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Komplementarios DNR (kDNR) sintezei nuo RNR naudotas nespecifinis pradmuo Random Hexamer Primer iš minėto rinkinio.

Naudojant GEOCOL ir LITCOL pradmenų poras (2 lentelė) AT-PGR mišinyje buvo 10x Taq buferis su (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM kiekvieno dNTP, 0,25 μM kiekvieno pradmens, 1,25 U rekombinantinės Taq DNR polimerazės (Thermo Fisher Scientific) ir 10 ng kDNR. AT-PGR vykdyta: pradinė denatūracija 2 min./95 °C; 30 gausinimo ciklų, kurių kiekvieną sudarė 1 min./95 °C; 2 min./60 °C; ir 3 min./72 °C; galutinė elongacija 7 min./72 °C. GT-IU32 geno transkripcijos analizės kontrolės ruoštos atliekant AT-PGR, matrica naudojus suminės RNR preparatus.

Nepriklausomų dviejų transkripcijos analizės kartojimų rezultatai palyginti. Išskirtų suminės RNR preparatų degradacija, kDNR sintezės efektyvumas bei AT-PGR rezultatai vertinti atlikus elektroforezę.

2.16. GT-IU32 geno klonavimas

Visos sekos GT-IU32 genas klonuotas į raiškos vektorių pET-28c(+) peptidazės seką papildant N-galiniu šešių histidino liekanų formuojamu giminingumo inkaru ir T7 tipo inkaru bei inkarus skiriančia trombino atpažįstama aminorūgščių seka. GT-IU32 genas pagausintas PGR matrica naudojant

G. thermoleovorans DSM 15325 genomine DNR bei pradmenų porą LITCOL-F ir LITCOL-R (2 lentelė). Pradmenys parinkti, įvedant restrikcijos endonukleazių atpažįstamas sekas, PRIMERSELECT komponentu iš LASERGENE 6. Pradmenų sudarymui naudotos U32 proteolizinių fermentų šeimos *Helicobacter*-tipo galimai kolagenazių genų sekos iš *Geobacillus thermoleovorans* NG80-2, *G. kaustophilus* HTA426 bei *Geobacillus* sp. WCH70 genomų. Disertacijos autorius aprašytą GT-IU32 geno klonavimą atliko vykdydamas pradinį GT-IU32 charakterizavimą rengdamas magistro darbą.

GT-IU32-CGD produkcijai visos sekos GT-IU32 genas klonuotas į raiškos vektorių pCri-7a (150) mutuoiant $\text{Leu}^2 \rightarrow \text{Val}$. Tikslinė mutacija buvo būtina vykdant klonuojamo geno sekos adaptavimą vektoriui bei kartu įgalino nepapildyti GT-IU32 sekos aminorūgštimis. Klonavimui GT-IU32-CGD produkcijai peptidazės geno seka pagausinta PGR matrica naudojant pET-28c(+) ir visos GT-IU32 geno sekos konstrukta bei pradmenų porą U32pCriFw ir U32pCriRv (2 lentelė). Pradmenys sudaryti atsižvelgus į įvedamas restrikcijos endonukleazių atpažįstamas sekas bei atliekamą mutavimą. GT-IU32 geno PGR mišinyje buvo 10x cloned Pfu buferis, 2,5 U *PfuTurbo* DNR polimerazės (Stratagene), 0,25 mM kiekvieno dNTP, 0,3 μM kiekvieno pradmens ir 20 ng matricos. PGR vykdyta: pradinė denatūracija 2 min./95 °C; 30 gausinimo ciklų, kurių kiekvieną sudarė 30 s/95 °C; 2 min./65 °C; ir 2 min./68 °C; galutinė elongacija 10 min./68 °C. PGR produktas restriktuotas bei T4 DNR ligaze liguotas į vektorių pagal gamintojo rekomendacijas. Ligacijos produktai bei sekoskaita patikrinta rekombinantinė plazmidė, išskirta iš atrinktos kolonijos, termošoku transformuoti į *E. coli* BL21 (DE3), paruoštas veikus CaCl_2 . Transformantai išsėti ant agarizuotos LB terpės, papildytos kanamicinu 30 μg/mL, ir kultivuoti 12 val., palaikant 37 °C.

2.17. Rekombinantinės GT-IU32 raiška ir gryninimas

Ruošiant inokuliatą *E. coli* BL21 (DE3) transformantai su viso GT-IU32 geno raiškos konstruktu pET-28c(+) kultivuoti LB terpėje su kanamicinu (30 μg/mL) 12 val., aeruojant 180 rpm, palaikant 37 °C. Pastarąja kultūra 1 % (tūris/tūris)

inokuluota LB terpė su kanamicinu. Inokuluota kultūra kultivuota Erlenmėjerio kolbose užpildant ne daugiau kaip ketvirtadalį kolbų tūrio identiška kaip inokuliatas. Kultūrai pasiekus OT₆₀₀ 0,6, rekombinantinės GT-IU32 raiška 4 val. indukuota 0,5 mM IPTG. Peptidazės raiška įvertinta NDS-PAGE. Taikytos raiškos parametrų vertės parinktos disertacijos autoriui atlikus rekombinantinės GT-IU32 raiškos *E. coli* BL21 (DE3) optimizavimą rengiant magistro darbą.

Jei kitaip nenurodyta, gryninimas vykdytas esant kambario temperatūrai. *E. coli* BL21 (DE3) ląstelės su rekombinantine GT-IU32 surinktos centrifuguojant 7000×g, 20 min., esant 4 °C. Du kartus praplautos ir resuspenduotos 50 mM TRIS-HCl pH 7,5/20 °C buferyje su 20 mM 2-ME ir 250 mM NaCl bei 10 mM imidazolo, ląstelės lizuotos ultragarsu (ciklas: 20 s pulsas (20 kHz, amplitudė 35 %, 500 W); 40 s pauzė; viso 20 ciklų) šaldant lede. Lizatas centrifuguotas 12000×g, 20 min., esant 4 °C. Supernatantas filtruotas naudojant ø 0,22 µm porų filtrą (Carl Roth). Rekombinantinė GT-IU32 gryninta nikelio giminingumo chromatografija, naudojant dervas HisPur Ni-NTA Resin (Thermo Fisher Scientific) arba Ni-NTA agarozę (QIAGEN), atsižvelgus į gamintojų rekomendacijas. Užnešus baltymų preparatą, praplovimas vykdytas 50 mM TRIS-HCl pH 7,5/20 °C buferiu su 20 mM 2-ME ir 250 mM NaCl bei 50 mM imidazolo. Eliucija vykdyta 50 mM TRIS-HCl pH 7,5/20 °C buferiu su 20 mM 2-ME ir 250 mM NaCl bei 250 mM imidazolo. Atlikus gryninimą GT-IU32 preparatas 12 val. dializuotas tūrių santykiu 1:3000, esant 4 °C. Rekombinantinės GT-IU32 preparato grynumas įvertintas NDS-PAGE.

2.18. GT-IU32 identifikavimas *G. thermoleovorans* DSM 15325 citoplazmoje

Vykdyt natyvios GT-IU32 identifikavimą išskirtame *G. thermoleovorans* DSM 15325 viduląstelinių baltymų preparate, atlikta preparato NDS-PAGE. Poliakrilamido gelio fragmentas su tikėtina išsidėsčiusia natyvia GT-IU32 ties baltymų molekulinė masių žymens 50 kDa masės standartu išpjautas. Natyvios GT-IU32 identifikavimui masių spektrometrija būtinų referentinių oligopeptidų gavimui, atlikus

rekombinantinės GT-IU32 preparato NDS-PAGE, išpjautas poliakrilamido gelio fragmentas su rekombinantine peptidaze.

Išpjautų gelio fragmentų mėginiai saugoti 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/20 °C buferyje, esant 4 °C. Natyvi GT-IU32 identifikuota masių spektrometrija MALDI TOF/TOF tandemine LC-MS/MS ($p \leq 0,05$) veikiant tripsinu, Vilniaus universiteto Biochemijos instituto Proteomikos centre (Vilnius, Lietuva).

2.19. Rekombinantinės GT-IU32 oligomerizacijos charakterizavimas

Analizinei gelfiltracijai, charakterizuojant GT-IU32 oligomerizaciją bei optimizuojant sąlygas, stabilizuojančias monomerinį peptidazės būvį, naudota Superdex 200 10/300 GL (10 × 300 mm) (GE Healthcare) kolonėlė. Gelfiltracija, esant kambario temperatūrai, vykdyta atsižvelgus į gamintojo nurodytas naudotos kolonėlės parametrų vertes, naudojant 20 mM TRIS-HCl pH 7,5/20 °C buferį su 150 mM NaCl. Oligomerizacijos tyrimui GT-IU32 gryninta identišškai kaip produkuojant GT-IU32-CGD, tačiau nevykdant ribotos proteolizės bei antrosios preparatyvinės gelfiltracijos. Tiriant GT-IU32 oligomerizaciją, po gryninimo peptidazės preparato buferis pakeistas į analizinės gelfiltracijos buferį ultrafiltruojant Vivaspin 15 (Sartorius Stedim Biotech) filtratoriais pagal gamintojo rekomendacijas. Pakeitus buferį, nevykdant inkubavimo, vykdyta analizinė gelfiltracija. Tuo atveju, jei oligomerizacija tirta po GT-IU32 preparato buferio pakeitimo vykdžius inkubavimą, peptidazės preparatas papildytas Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics), taikant gamintojo rekomenduojamą koncentraciją.

Vertinant reduktorių (DTT (1 mM ir 5 mM), 2-ME (10 mM), TCEP (1 mM)) bei stiprios joninės jėgos (NaCl (0,5 M)) įtaką GT-IU32 oligomerizacijai, analizinė gelfiltracija vykdyta gelfiltracijos buferį papildant nurodytų koncentracijų junginiais. GT-IU32 preparato buferio pakeitimui į analizinės gelfiltracijos buferį su taikyta konkretaus reduktoriaus koncentracija ar 0,5 M NaCl naudota ultrafiltracija. Jei peptidazės preparatas po buferio pakeitimo inkubuotas prieš analizinę gelfiltraciją, preparatas papildytas Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail. Skirtingų junginių įtaka

GT-IU32 oligomerizacijai apibrėžta palyginus peptidazės būvių koncentracijų santykį, stebėtą veikiant nurodytos koncentracijos junginiu, su nustatytu būvių santykiu, analizinę gelfiltraciją vykdžius naudojant 20 mM TRIS-HCl pH 7,5/20 °C buferį su 150 mM NaCl.

Detektuotų GT-IU32 oligomerizacijos būvių molekulinės masės apskaičiuotos naudojantis kalibracine kreive, sudaryta nustatius žinomos molekulinės masės baltymų standartų iš Bio-Rad ir GE Healthcare gelfiltracijos kalibravimo rinkinių elucijos tūrius, kalibravimą vykdant analizinės gelfiltracijos sąlygomis.

2.20. Kalcio ir cinko jonų įtakos GT-IU32 termostabilumui įvertinimas

Siekiant įvertinti kalcio ir cinko jonų įtaką rekombinantinės GT-IU32 termostabilumui, peptidazės preparatas po gryninimo 12 val. dializuotas prieš 50 mM TRIS-HCl pH 7,4 buferį su 10 mM 2-ME arba 50 mM TRIS-HCl pH 7,4 buferį su 10 mM 2-ME ir 1 mM CaCl₂, arba 50 mM TRIS-HCl pH 7,4 buferį su 10 mM 2-ME ir 1 mM ZnCl₂, arba 50 mM TRIS-HCl pH 7,4 buferį su 10 mM 2-ME ir 1 mM CaCl₂ bei 1 mM ZnCl₂ tūrių santykiu 1:3000, esant 20 °C. Atlikus dializę, mėginiuose nustatyta GT-IU32 koncentracija. Rekombinantinės peptidazės 0,5 mg/mL koncentracijos 200 µL mėginiai 1 val. inkubuoti, palaikant 37, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80 ir 95 °C. Denatūravusi GT-IU32 atskirta centrifuguojant 12000×g, 15 min., esant 4 °C. Atskyrus denatūravusią GT-IU32, nustatyta likutinė peptidazės koncentracija. Vertinant kalcio ir cinko jonų įtaką, rekombinantinės GT-IU32 termostabilumas 50 mM TRIS-HCl pH 7,4 buferyje su 10 mM 2-ME laikytas kontrole.

2.21. GT-IU32-CGD preparato produkcija

Heterologinė GT-IU32 raiška vykdyta *E. coli* BL21 (DE3) kultivuojant LB terpėje, papildytoje kanamicinu (30 µg/mL), aeruojant 250 rpm, palaikant 37 °C. Raiškos kamieno kultūrai pasiekus OT₅₅₀ 0,8, rekombinantinės GT-IU32 raiška 5 val. indukuota 1 mM IPTG. Selenometioninu derivuojamos GT-IU32 heterologinė raiška atlikta identišškai, tačiau raiškos kamieno kultivavimui taikyta įprastos

sudėties M9 (147) terpė, papildyta aminorūgštimis metioniną pakeitus selenometioninu. Centrifuguojant 7000×g, 30 min., esant 4 °C, surinktos ląstelės su rekombinantine GT-IU32 du kartus praplautos buferiu A (50 mM TRIS-HCl pH 8/20 °C su 20 mM 2-ME ir 250 mM NaCl) bei resuspenduotos į minėtą buferį, papildytą DNase I (Roche Diagnostics) ir Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, taikant gamintojo rekomenduojamas koncentracijas. Ląstelės lizuotos 1,35 kBar, palaikant 4 °C, naudojant aukšto slėgio ląstelių homogenizatorių (Constant Systems). Homogenizato tirpi frakcija su GT-IU32 atskirta centrifuguojant 50000×g, 1 val., esant 4 °C. Gautas preparatas filtruotas naudojant ø 0,22 µm porų filtrą (Merck Millipore). Rekombinantinės GT-IU32 raiška įvertinta NDS-PAGE.

Vykdamas nikelio giminingumo chromatografiją, preparatas su GT-IU32 užneštas į Ni-NTA agarozę (Invitrogen), ekvilibruotą buferiu A. GT-IU32 eliuota buferiu B (50 mM TRIS-HCl pH 8/20 °C su 20 mM 2-ME ir 250 mM NaCl bei 150 mM imidazolo). Iš dalies išgrynintos GT-IU32 preparatas užneštas į HiLoad 26/60 Superdex 75 (26 × 60 mm)(GE Healthcare) kolonėlę, ekvilibruotą buferiu C (20 mM TRIS-HCl pH 8/20 °C su 1 mM TCEP ir 150 mM NaCl). Atlikus gelfiltraciją, GT-IU32 preparato grynumas įvertintas NDS-PAGE. Apjungus frakcijas su GT-IU32, preparatas iki 30 mg/mL koncentruotas ultrafiltruojant Vivaspin 15 filtratoriais pagal gamintojo rekomendacijas. Ribota rekombinantinės GT-IU32 proteolizė vykdyta inkubuojant 48 val., palaikant 37 °C. Atlikus ribotą proteolizę, GT-IU32-CGD atskirtas centrifuguojant 10000×g, 10 min., esant 4 °C. Supernatantas filtruotas naudojant ø 0,22 µm porų filtrą. GT-IU32-CGD preparatas užneštas į HiLoad 26/60 Superdex 75 kolonėlę, ekvilibruotą buferiu D (20 mM TRIS-HCl pH 7,5/20 °C su 1 mM TCEP ir 50 mM NaCl). Gelfiltracija išgryninto GT-IU32-CGD preparatas iki 75 mg/mL koncentruotas Vivaspin 15 ir 500 (Sartorius Stedim Biotech) filtratoriais pagal gamintojo rekomendacijas bei papildytas 1 mM fenilmetansulfonilfluorido (PMSF). GT-IU32-CGD preparato grynumas ir stabilumas įvertintas NDS-PAGE.

2.22. GT-IU32-CGD kristalinimas bei rentgeno spindulių difrakcijos duomenų surinkimas ir apdorojimas

Prenkant palankias sąlygas GT-IU32-CGD kristalinimui, naudojant skirtingus tirpalų rinkinius, kristalinimas vykdytas garų difuzijos metodu sėdinčiuose lašuose 96×2 -šulinėlių MRC plokštelėse (Innovadyne). GT-IU32-CGD preparato lašai suformuoti įnešant Cartesian Nanodrop robotu (Genomic Solutions), Ispanijos nacionalinės mokslinių tyrimų tarybos Barselonos molekulinės biologijos instituto Kristalinimo padalinyje (Barcelona, Ispanija). Kristalinimo plokštelės kristalinimo inkubatoriuje (Bruker) inkubuotos 168 val., nepriklausomai palaikant 4 ar 20 °C. Tinkamiausios sąlygos GT-IU32-CGD kristalinimui iš parinktų palankių GT-IU32-CGD kristalinimui sąlygų atrinktos ir taikytos kristalinant baltymą iš μL eilės preparato tūrio 24-šulinėlių Cryschem kristalinimo plokštelėse (Hampton Research). Natyvūs ir selenometioninu derivuoti GT-IU32-CGD kristalai, krio-apsaugoti pakopomis mirkant rezervuarų tirpaluose su didėjančia glicerolio koncentracija iki 20-25 % (tūris/tūris).

Pilni difrakcijos duomenų rinkiniai surinkti kristalus šaldant skystu azotu (Oxford Cryosystems), palaikant -173 °C. Natyvaus GT-IU32-CGD kristalų difrakcijos duomenys surinkti naudojant PILATUS 6M pikselių detektorių (DECTRIS) Europos sinchrotrono spindulių linijoje ID29 (Grenoblis, Prancūzija). Selenometioninu derivuotų GT-IU32-CGD kristalų difrakcijos duomenys surinkti naudojant Quantum 315r CCD detektorių (Area Detector Systems Corporation) SOLEIL sinchrotrono spindulių linijoje PROXIMA 1 (Paryžius, Prancūzija). Surinkti difrakcijos duomenys (3 lentelė) apdoroti XDS programa (151) ir SCALA komponentu (152) iš CCP4 (153).

2.23. GT-IU32-CGD erdvinės struktūros sprendimas ir analizė

Vieno bangos ilgio anomalinė difrakcija, naudojant selenometionino išvestinę, taikyta GT-IU32-CGD erdvinei struktūrai išspręsti SHELXD programa (154). Kristalų difrakcijos duomenys (3 lentelė) surinkti parinkus bangos ilgį, atitinkantį maksimalią seleno absorbciją. Simetrijos grupė nustatyta

SHELXE programa (154). Pradinis GT-IU32-CGD erdvinės struktūros modelis sudarytas naudojant eksperimentinį elektronų tankio žemėlapi TURBO-FRODO programa (155) Silicon Graphics Octane2 platformoje (Silicon Graphics International), tikslintas PHENIX programa (156), BUSTER programa (157) bei SHELXL programa (154). Modelis taikytas išsprendžiant natyvią baltymo

3 lentelė. Kristalografijos duomenys.

Duomenų rinkinys	Natyvus GT-IU32 kristalas	Selenometioninu derivuotas GT-IU32 kristalas
Erdvinė grupė	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P3 ₂ 2 ₁
Gardelės parametrai, Å	a= 28,40; b= 36,3; c= 65,67	a= 45,55; b= 45,55; c= 60,9
Bangos ilgis, Å	0,9724	0,9791
Atspindžių skaičius	200643	131989
Unikalių atspindžių skaičius	27941	26349
Rezoliucijos intervalas, Å	32,8-1,1 (1,16-1,1)*	39,5-1,15 (1,21-1,15)
Pilnumas, %	98,8 (96)	99,7 (98,8)
Anomalinis pilnumas, %		97,2 (91)
R _{sulieta}	0,116 (0,159)	0,036 (0,348)
R _{r.i.m.} (= R _{me as})**	0,125 (0,172)	0,045 (0,459)
R _{p.i.m.} **	0,046 (0,066)	0,026 (0,296)
I/σ(I)	13,7 (8,6)	19 (3,3)
B veiksnys (Wilsono), Å ²	6,6	11,4
Vidutinis kartotinumumas	7,2 (6,3)	5 (3,7)
Rezoliucijos intervalas naudotas patikslinimui, Å	∞-1,1	∞-1,15
Naudotų patikslinimui atspindžių skaičius	27158	25557
Patikslinimo rinkinio atspindžių skaičius	734	792
R _{krist.} **	0,123	0,141
R _{neprikl.} **	0,163	0,17
Baltymo atomų skaičius	760	692
Tirpiklio molekulių skaičius	108	80
Ligandų skaičius	katijonas; acetatas	sulfatas
Vidutinis kvadratinis jungties ilgio nuokrypis, Å	0,015	0,014
Vidutinis kvadratinis kampo nuokrypis, °	2,33	2,44
Vidutinis B veiksnys baltymo atomams, Å ²	10,4	18,3
Pagrindinės grandinės išsidėstymo kampo analizė***		
Liekanos	85	78
Išskirtys	-	-
Viso liekanų	87	80

*skliaustuose pateiktos vertės išorinei sferai; **158; ***159

erdvinę struktūrą molekulinio pakeitimo metodu (160) Phaser programa (161). Stereocheminių GT-IU32-CGD erdvinės struktūros charakteristikų vertės įvertintos MolProbity programa (159) ir WHAT_CHECK komponentu iš WHAT IF (162). Sąveikaujančių baltymų molekulių sąveikos paviršiai ir artimos molekulių atomų sąveikos nustatytos CNS programa (163). Baltymų porinės sąveikos paviršiai apskaičiuoti PISA serveriu (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html (164)). Baltymų molekulių paviršiaus formos komplementarumas apskaičiuotas SC komponentu (165) iš CCP4. Išspręstos GT-IU32-CGD erdvinės struktūros sugretinimas su charakterizuotomis baltymų erdvinėmis struktūromis atliktas DALI serveriu (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/ (166)). GT-IU32-CGD erdvinės struktūros grafinis pateikimas paruoštas TURBO-FRODO programa ir UCSF Chimera programa (167).

2.24. GT-IU32 sąveikos su RNR analizė

Rekombinantinės GT-IU32 *in vitro* sąveikos su RNR nustatymui bei specifiškumo įvertinimui vykdytos kibimo prie membranos ir elektroforezinio mobilumo poslinkio analizės.

Pasirinktos RNR bei DNR fragmentas (4 lentelė) pažymėti 5'-gale ^{32}P izotopu. Žymėjimas radioaktyviu izotopu iš ATP- γ - ^{32}P (Hartmann Analytic) vykdytas panaudojant T4 polinukleotidilkinazę (Thermo Fisher Scientific), reakciją vykdytą pagal gamintojo rekomendacijas. Pažymėjus atliktas gryninimas gelfiltracija, naudojant dervą Sephadex G-25, Illiustra MicroSpin G-25 kolonėlėmis (GE Healthcare) pagal gamintojo rekomendacijas. Pažymėtų RNR ir DNR fragmento (abiem atvejais 4 pM/ μL ; 1750 cpm/pM) preparatams naudotas 50 mM TRIS-HCl pH 7,5/30 °C buferis su 10 mM 2-ME.

Rekombinantinės GT-IU32 ir žymėtų RNR ar DNR fragmento preparatų skirtingų santykių 25 μL tūrio sąveikos mišiniai 50 mM TRIS-HCl pH 7,5/30 °C buferyje su 10 mM 2-ME inkubuoti 10 min., palaikant 30 °C. Vertinant sąveikos specifiškumą, po inkubavimo sąveikos mišiniai papildyti taikytą nurodytos RNR ar DNR fragmento, nežymėtų radioaktyviu izotopu, preparatų koncentracija, inkubavimą pratęsiant 10 min., palaikant 30 °C.

4 lentelė. GT-IU32 sąveikos su nukleorūgštimis įvertinimui pasirinktos nukleorūgštys.

Nukleorūgštis	Seka, 5'-3'
136 bp DNR fragmentas	GTC GCT CTC GAC TTC GGC CCC CTG CCG CGC GGC GGT CGT CGA GGC GCT CGA AAC CCG CGA CGC CGA CCG ACT CGT CGT CCG CGC CGA CGG ACT CGA ACG CCG GTA CGA CGC CGA CGC GAC CGG CTT GCT CGT CGC C
<i>E. coli</i> suminė tRNR frakcija	
27 nt vgRNR fragmentas	ATG TTC AAA CGA TCA ATC TAC GTA TAA
poliuridilo rūgštis	
44 nt sarcino-ricino kilpos fragmentas	GGG GGG CUC UUC CUA GUA CGA GAG GAC CGG AAG GGA CGC ACC UC
26 bp dgRNR fragmentas	UGG CCA CUA CAC CAU UGG UAA

Kibimo prie membranos analizė, esant kambario temperatūrai, vykdyta pasitelkiant taškinį pernešimą į membranų sistemą vakuuminiu filtravimu. Membranų sistemos viršutiniam sluoksniui naudota Pure Nitrocellulose unsupported 0,45 μM Transfer Membrane BC (AppliChem), viduriniam – Amersham Hybond-N⁺ (GE Healthcare) nailono membrana, apatiniam sluoksniui naudojant Whatman Grade GB005 Gel Blotting Paper 1,5 mm (GE Healthcare). Pernešimas atliktas membranų sistemą kiekvieno taško atžvilgiu ekvilibravus 400 μL sąveikos mišinio buferio, prieš pernešimą sąveikos mišinius skiedžiant mišinio buferiu iki 200 μL tūrio. Pernešus sąveikos mišinius kiekvieno taško atžvilgiu atliktas praplovimas du kartus 200 μL mišinio buferio. Galiausiai membranoms leista išdžiūti esant kambario temperatūrai. Rezultatai įvertinti po 2 val. membranų ekspozicijos prieš fosforescencinį ekraną FLA3000 phosphor imager (Fuji Photo Film) nuskaičius ekranus. Densitometrija atlikta AIDA Image Analyzer 4 (Raytest) programa.

Elektroforezinio mobilumo poslinkio analizė, esant kambario temperatūrai, vykdyta sąveikos mišinius išskirstant 8 % poliakrilamido gelyje nedenaatūruojančiomis sąlygomis, palaikant ~7 V/cm įtampą. Elektrofozerė vykdyta įprastos sudėties TBE buferyje, naudojant 5x mėginio buferį (50 mM TRIS-HCl pH 7,5/20 °C buferis su 10 mM 2-ME ir 50 % (tūris/tūris) glicerolio bei 0,01 % (masė/tūris) bromfenolio mėlynojo), palaikius ~10 V/cm įtampą, atliekant gelio ekvilibravimą buferiu. Išskirsčius gelis praplautas distiliuotu vandeniu bei 10 min. fiksuotas 50 % (tūris/tūris) metanolio ir 10 % (tūris/tūris)

acto rūgšties tirpalu. Fiksavimo tirpalas išplautas distiliuotu vandeniu. Fiksuotas poliakrilamido gelis 2 val. džiovintas vakuume, palaikant 70 °C. Rezultatai įvertinti po 2 val. membranų ekspozicijos prieš fosforescencinį ekraną FLA3000 phosphor imager nuskaičius ekranus.

2.25. Zimografija

Zimografija, esant kambario temperatūrai, vykdyta neredukuojančiomis sąlygomis analogiškai NDS-PAGE, naudojant 7,5 arba 12 % išskirstančiuosius gelius su įpolimerintais homogenizuotais substratais: želatina (2 arba 5 mg/mL), I tipo kolagenu iš žiurkės uodegos bei nefrakcionuoto kolagenu preparatu iš jungiamojo audinio (abiem atvejais 5 mg/mL). Albuminas iš jaučio serumo (Carl Roth), kazeinas iš karvės pieno (Fluka), elastinas iš jaučio kaklo raiščio (Sigma-Aldrich), keratinas iš vilnos (TCI EUROPE) (visais atvejais 5 mg/mL) homogenizavus taip pat naudoti substratais zimografijai. Substratai įpolimerinimui homogenizuoti 12 val. veikiant 100 mM acto rūgštimi, esant 4 °C (144). Homogenizatai 12 val. dializuoti prieš distiliuotą vandenį tūrių santykiu 1:3000, esant 4 °C.

NDS iš zimogramų gelių išplautas 0,1 % (tūris/tūris) Triton X-100. Pastarasis detergentas išplautas gausiai praplovus 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/20 °C buferiu arba 50 mM HEPES-NaOH pH 7,3/20 °C buferiu. *G. thermoleovorans* DSM 15325 kolagenolizinių peptidazių detekcijai zimogramų geliai inkubuoti naudojant detekcijai optimizuotus buferius: 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/60 °C buferį su 20 mM CaCl₂ arba 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/60 °C buferį su 20 mM CaCl₂ ir 10 μM ZnCl₂. GT-SM3B katalizinio aktyvumo įvertinimui zimogramų geliai inkubuoti 50 mM HEPES-NaOH pH 7,3/60 °C buferyje. Zimogramų geliai GT-IU32 aktyvumo įvertinimui inkubuoti 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/50 °C buferyje su 20 mM CaCl₂ ir 10 μM ZnCl₂ bei 200 mM NaCl ir 40 μM Brij 35. Jei kitaip nenurodyta, zimogramų geliai inkubuoti 12 val., palaikant 60 °C. Katalizinis aktyvumas vizualizuotas zimogramų gelius dažant PageBlue Protein Staining solution pagal gamintojo rekomendacijas.

2.26. Kiekybinis azokolio hidrolizės įvertinimas

Azokolis – I tipo kolagenas iš jungiamojo audinio, impregnuotas azo dažu (Sigma-Aldrich), praplovus (168) fermentinei reakcijai 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/60 °C buferyje su 20 mM CaCl₂ naudojant 2 mg substrato. Reakcijos 1 mL tūrio mišinys 1 val. inkubuotas purtant 1000 rpm, palaikant 60 °C. Atlikus inkubavimą, mišinys 10 min. šaldytas palaikant 4 °C. Nehidrolizuotas azokolis atskirtas centrifuguojant 7000×g, 10 min., esant 4 °C. Hidrolizės intensyvumas nustatytas matuojant fermentinės reakcijos supernatanto sugerties pokytį esant 520 nm, kontrole naudojant neinkubuotos fermentinės reakcijos supernatantą. Azokolio hidrolizės aktyvumo vienetas apibrėžtas kaip kiekis peptidazių reakcijos sąlygomis, lemiančių 1 mg produktų susidarymą (57). Specifinis azokolio hidrolizės aktyvumas išreikštas vienetais mg baltymų.

2.27. Baltymų koncentracijos įvertinimas

Baltymų koncentracija matuota naudojant Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas, standartu pasitelkiant albuminą. GT-SM3B ir GT-IU32 koncentracijos įvertintos matuojant sugertį esant 280 nm, atsižvelgus į molinį ekstinkcijos koeficientą.

2.28. Statistinė analizė

Jei kitaip nenurodyta, n= 3-8, rezultatų vertes laikant statistiškai patikimomis, jei $p \leq 0,05$, pateikiant vidurkius \pm standartinius nuokrypius.

3. Rezultatai ir rezultatų aptarimas

3.1. Konstitutyviai *G. thermoleovorans* DSM 15325 produkuojamos kolagenolizinės peptidazės

Charakterizuotas *G. thermoleovorans* DSM 15325 gebėjimas produkuoti termoaktyvias ir/ar termostabilias kolagenolizines peptidazes kokybiškai nustatytas geobacilų kultivavimui naudojant agarizuotas selektyvias terpes. Nustačius išreikštą *G. thermoleovorans* DSM 15325 gebėjimą produkuoti kolagenolizines peptidazes sudarytomis peptidazių raiškos indukciją skatinusiomis sąlygomis suformuluota prielaida, jog proteolizinių geobacilų gebėjimą įsisavinti kolageną užtikrina kolagenolizinio aktyvumo sinergizmas veikus konstitutyviai bei induktyviai produkuotoms kolagenolizinėms peptidazėms.

Vykdydžius *G. thermoleovorans* DSM 15325 kultivavimą mM9 terpėje, nesąlygojančioje induktyvios peptidazių raiškos, palaikius termofilo augimui optimalius pH ir temperatūrą – pH 6,5 ir 60 °C (169), geobacilos konstitutyviai produkavo kolagenolizines peptidazes. Atlikus kiekybinį kolagenolizinių peptidazių konstitutyvaus produkavimo intensyvumo įvertinimą, vertinus azokolio hidrolizės intensyvumą, didžiausias kolagenolizės intensyvumas nustatytas vėlyvos eksponentinės fazės *G. thermoleovorans* DSM 15325 kultūrinio skysčio supernatante. Optimizavus kolagenolizinių peptidazių iš geobacilų kultūrinio skysčio supernatanto išskyrimą precipitacija išsūdžius $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nustatyta, kad efektyviausiai konstitutyviai produkuotos kolagenolizinės peptidazės precipitavo išsūdžius imtinai nuo 60 iki 80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ įsotiniu.

Vėlyvos eksponentinės fazės *G. thermoleovorans* DSM 15325, kultivavus mM9 terpėje kamienui optimaliomis sąlygomis, kultūrinio skysčio supernatanto baltymų, precipitavusių išsūdžius 60 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ įsotiniu, preparate kolagenolizinės peptidazės želatinos zimografija detektuotos tarp 100-130 kDa. *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyviai produkuota artima 120 kDa kolagenolizinė peptidazė (GT-KP120) demonstravo želatinolizinį aktyvumą 11-98 °C. Didesnės molekulinės masės geobacilų

konstitutyviai produkuotos 130 kDa kolagenolizinės peptidazės (GT-KP130) želatinolizinis aktyvumas nustatytas 37-98 °C. Kamieno konstitutyviai produkuotas peptidazes visiškai inaktyvavo EDTA ir EGTA (abiem atvejais 10 mM), tuo tarpu Pefabloc SC (5 mM), fenantrolinas (10 mM) ir fosforamidonas (10 μM) neinhibavo peptidazių želatinolizinio aktyvumo.

Disertacijos autorius *G. thermoleovorans* DSM 15325 gebėjimą produkuoti kolagenolizines peptidazes bei detektuotų geobacilų konstitutyviai produkuotų GT-KP120 ir GT-KP130 pradinį charakterizavimą atliko rengdamas bakalauro darbą.

Siekus masių spektrometrija identifikuoti *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyviai produkuojamas kolagenolizines peptidazes, išskirti geobacilų kultūrinio skysčio supernatanto baltymai, precipitavę išsūdžius optimaliu produkuojamų peptidazių išskyrimui imtinai 80 % (NH₄)₂SO₄ įsotinimu. Kamieno viduląstelių kolagenolizinių peptidazių konstitutyvios raiškos įvertinimui išskirti viduląsteliniai baltymai. Viduląstelių ir ekstraląstelių baltymų išskyrimui *G. thermoleovorans* DSM 15325 kultivuotas taikius sąlygas, identiškas taikytoms vykdžius kamieno gebėjimo konstitutyviai produkuoti kolagenolizines peptidazes įvertinimą. Kultivavimui taikyta mM9 terpė, nesąlygojanti peptidazių raiškos indukcijos. Inokuliavimui kamieno kultūra taip pat kultivuota mM9 terpėje. *G. thermoleovorans* DSM 15325 baltymų preparatų ruošimo parametrai užtikrino geobacilų vėlyvos eksponentinės fazės neinduktyvių kolagenolizinių peptidazių išskyrimą.

Vykdžius *G. thermoleovorans* DSM 15325 gebėjimo konstitutyviai produkuoti kolagenolizines peptidazes pradinį įvertinimą, peptidazės detektuotos želatinos zimografija, neoptimizuota peptidazių detekcijai. Plėtojus geobacilų konstitutyviai produkuotų kolagenolizinių peptidazių detekciją, naudojus geobacilų viduląstelių ir ekstraląstelių baltymų preparatus, atliktas želatinos zimografijos optimizavimas, kartu kokybiškai įvertinus želatinos zimografijos parametru įtaką detektuotų peptidazių želatinoliziniui aktyvumui.

Zimografijai taikytos želatinos koncentracijos zimogramų geliuose sumažinimas nuo 5 mg/mL iki 2 mg/mL leido tiesiogiai lyginus su baltymų

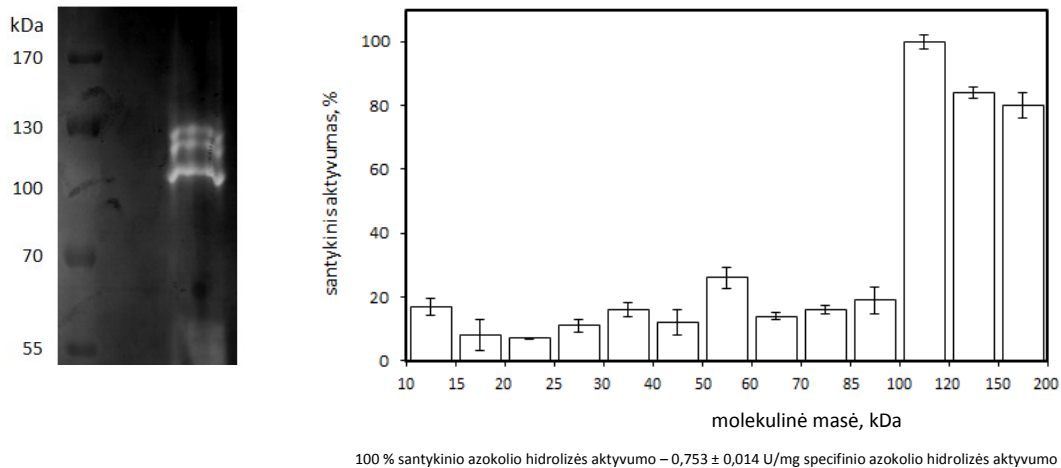
molekulinių masių žymens molekulinės masės standartais nustatyti detektuotų kolagenolizinių peptidazių molekulinės masės zimogramose. Analogiškai efektyvų NDS išplovimą iš zimogramų gelių užtikrino nuo 2,5 % (tūris/tūris) iki 0,1 % (tūris/tūris) sumažinta Triton X-100 koncentracija (nepateikti rezultatai).

Zimografijos inkubacinio buferio – 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/60 °C buferis su 20 mM CaCl₂ ir 10 μM ZnCl₂ bei 200 mM NaCl ir 40 μM Brij 35 – optimizavimo rezultatai leidžia teigti, jog 20 mM CaCl₂ būtinas GT-KP120 ir GT-KP130 aktyvumo užtikrinimui. Pastarųjų kolagenolizinių peptidazių želatinoliziniam aktyvumui 10 μM ZnCl₂ neturėjo įtakos, tačiau zimogramų gelius inkubavus 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/60 °C buferyje su 20 mM CaCl₂, geobacilų ekstraląstelinį baltymų preparate detektuota artimos 100 kDa molekulinės masės kolagenolizinė peptidazė (GT-KP100). *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyviai produkuotų GT-KP100, GT-KP120 ir GT-KP130 aktyvumui 200 mM NaCl bei 40 μM Brij 35 įtaka nenustatyta. Viduląstelinės *G. thermoleovorans* DSM 15325 kolagenolizinės peptidazės nedetektuotos. Geobacilų konstitutyviai produkuotų kolagenolizinių peptidazių katalizinio aktyvumo kokybiniam ir kiekybiniam įvertinimui optimizuotomis sąlygomis naudoti 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/60 °C buferis su 20 mM CaCl₂ arba 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/60 °C buferis su 20 mM CaCl₂ ir 10 μM ZnCl₂.

Visiškai 10 μM Zn²⁺ katijono slopinama GT-KP100, taikius 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/60 °C buferį su 20 mM CaCl₂, demonstravo analogišką GT-KP120 ir GT-KP130 substratinį specifiškumą 19-80 °C peptidolizuodama želatiną ir iš dalies denatūruotą I tipo kolageną iš žiurkės uodegos bei iš dalies denatūruotą kazeiną, o taip pat, skirtingai nei GT-KP120 ir GT-KP130, iš dalies denatūruotą albuminą, bet nepeptidolizavo iš dalies denatūruotų elastino ir keratino. GT-KP100 želatinolizinį aktyvumą inaktyvavo EDTA ir EGTA (abiem atvejais 1 mM), fenantrolinas (1 mM) bei fosforamidonas (10 μM), tuo tarpu Pefabloc SC (1 mM) peptidazės neinhibavo.

Fermentų identifikavimas masių spektrometrija zimogramų mėginiuose galimas (170, 171), tačiau pastaroji identifikavimo strategija negalėjo būti taikoma *G. thermoleovorans* DSM 15325 produkuotų kolagenolizinių peptidazių

detekcijai želatiną naudojus substratu. *Geobacilų* ekstraląstelinių baltymų preparate išskirtos kolagenolizinės peptidazės želatinos ir I tipo kolageno iš žiurkės uodegos zimografija detektuotos tarp 100-130 kDa (9 pav.). Želatina ir homogenizuotas kolagenas turi įtakos baltymų elektroforeziniam mobilumui (144, 172),



9 pav. Išskirtų kolagenolizinių peptidazių želatinolizinio aktyvumo detekcija zimografija.

10 pav. *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyviai produkuotų kolagenolizinių peptidazių išsidėstymo NDS-PAGE gelyje nustatymas, vertinant azokolio hidrolizės intensyvumą.

todėl, siekus patvirtinti kolagenolizinių peptidazių molekulinės masės nustatytas zimografija, nepriklausomai kolagenolizinių peptidazių tikėtinas išsidėstymas NDS-PAGE gelyje nustatytas įvertinus azokolio hidrolizės intensyvumą. GT-KP100, GT-KP120 ir GT-KP130 išsidėstymas tarp 100-130 kDa azokolio hidrolizės įvertinimu patvirtintas (10 pav.). Konstitutyviai produkuotos kolagenolizinės peptidazės demonstravo tolydų mobilumą poliakrilamido gelyje, nes buvo išskirtos iš gelio fragmentų virš 130 kDa. Kolagenolizinės peptidazės neišskirtos iš gelio fragmentų iki 100 kDa (10 pav.), kas vėlgi patvirtino nustatytą kolagenolizinių peptidazių išsidėstymą NDS-PAGE gelyje.

G. thermoleovorans DSM 15325 ekstraląstelinių baltymų iš baltymų preparato elektroforezinio profilio analizuoto molekulinų masių intervalo tarp 100-130 kDa detekcija masių spektrometrija patikimai ($p=0,01$) identifikuoti 48 baltymai (<http://proteom.pl/lookatthis/index.php>; mėginys 207192165kuis_h7). Identifikuotų baltymų homologiškumas charakterizuotų funkcijų baltymams leido *in silico* identifikuoti peptidazes, pasižyminčias taip pat ir kolagenoliziniu aktyvumu (5 lentelė). Identifikuotos *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyviai

produkuotos kolagenolizinės peptidazės homologiškos išsamiai charakterizuotoms cinko peptidazėms iš M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio ir M4 proteolizinių fermentų šeimos (1). GT-KP120 ir GT-KP130 – atitinkamai Pz-peptidazės A (DDBJ BAD99433.1; MEROPS M03.010; PDB 3AHM (63)) ir B (DDBJ BAD99434.1; MEROPS M03.007) homologai, GT-KP100 – bacilolizino (GenBank AEV20496.1; MEROPS M04.014) homologas.

Konstitutyvi *G. thermoleovorans* DSM 15325 produkuotų Pz-peptidazių A ir B iš *G. collagenovorans* MO-1 homologų produkcija netiesiogiai patvirtino numatytą (122) konstitutyvią Pz-peptidazių A ir B raišką homologų iš *G. thermoleovorans* DSM 15325 sekose signaliniai peptidai *in silico* nenumatyti (N. Kuisienė, nepublikuoti rezultatai), tačiau pastarosios homologų iš *G. thermoleovorans* DSM 15325 sekose signaliniai peptidai *in silico* nenumatyti (N. Kuisienė, nepublikuoti rezultatai), tačiau pastarosios oligopeptidazės detektuotos geobacilų ekstraktelinių baltymų preparate. Tikėtina, jog Pz-peptidazių A ir B homologų iš *G. thermoleovorans* DSM 15325

5 lentelė. Identifikuotos *G. thermoleovorans* DSM 15325 kolagenolizinės peptidazės.

Fermentas, seka	Molekulinė masė, M _r	Identifikuotų peptidų skaičius	Identifikuotų peptidų sekos	Dengimas, %	Įvertis
Bacilolizino homologas GenBankAEV20496.1	59789	6	N ⁶⁶ TFQLGGQAR ⁷⁵ G ²⁶⁶ SGIFTYDGR ²⁷⁵ N ⁴¹³ PDWEIGEDIYTPGIAGDALR ⁴³³ Y ⁴⁴¹ GDPDHYSK ⁴⁴⁹ Y ⁴⁵¹ TGTQDNGGVHTNSGIINK ⁴⁶⁹ A ⁵⁰⁰ LVYYLTPTS NFSQLR ⁵¹⁵	15	332
Pz-peptidazės A homologas DDBJ BAD99433.1	66849	8	Y ¹⁶ ERPDIQLQASFQEALDSFR ³⁶ A ³⁸ GSAALQHEAMK ⁴⁹ Q ¹¹⁹ LFALAETQLKT ¹²⁹ Y ¹³⁰ APAVVEDLQK ¹⁴¹ T ¹⁶⁶ LAQLQPFVESPDR ¹⁷⁹ E ¹⁹⁹ LDELYDELVHVR ²¹¹ L ²¹⁸ GFQNFVELGYAR ²³⁰ S ⁵⁴⁶ PFADGAVASVVGHIER ⁵⁶²	19	319
Pz-peptidazės B homologas DDBJ BAD99434.1	70213	2	L ⁴⁴⁸ YLLNHYLEGFR ⁴⁵⁹ A ⁵⁶³ GSSDYPIEVLK ⁵⁷⁴	3	82

konstitutyvi produkcija analogiška bacilose charakterizuotai (173, 174) autolizės nesąlygotai citoplazminių baltymų produkcijai į ekstraktelinę aplinką. *G. thermoleovorans* DSM 15325 identifikuoti Pz-peptidazių A ir B homologai zimogramose detektuoti suformavę homodimerus. Želatinos zimogramose

rekombinantiniai Pz-peptidazių A ir B homologai iš *G. thermoleovorans* DSM 15325 bei *Geobacillus thermoleovorans* 22 taip pat detektuoti suformavę homodimerus (N. Kuisienė, nepublikuoti rezultatai). Pz-peptidazė B iš *G. collagenovorans* MO-1 geba homodimerizuotis (36), tuo tarpu geobacilų Pz-peptidazė A – monomerinis fermentas (36, 63).

G. thermoleovorans DSM 15325 konstitutyviai sekretuotas bacilolizino homologas, priskirtinas termolizinams, detektuotas artimos 100 kDa molekulinės masės, nors apskaičiuota subrendusios kataliziškai aktyvios proteazės molekulės masė yra 34,6 kDa. Masių spektrometrija taip pat identifikuotas geobacilų sekretuotas, nesubrendęs, kataliziškai neaktyvus, 57,2 kDa bacilolizino homologas (5 lentelė). Termolizinių oligomerizacija nenustatyta (175, 176), tikėtina, kad sekretuoto bacilolizino homologo identifikavimą tarp 100-130 kDa lėmė fermento molekulių mobilumas sudarytomis sąlygomis. Bacilolizino homologas iš *G. thermoleovorans* DSM 15325 katalizuodamas želatinos, iš dalies denatūruoto I tipo kolageno iš žiurkės uodegos bei iš dalies denatūruotų albumino ir kazeino peptidolizę demonstravo, įprastai termolizinams, platų substratinį specifiškumą (125) bei termoaktyvumą, analogišką charakterizuotiems bacilolizinams iš geobacilų (177, 178). Sekretuotas bacilolizino homologas neskaidė iš dalies denatūruotų elastino ir keratino, bet hidrolizavo azokolį. Bacilolizino homologo gebėjimas hidrolizuoti azokolį leido patvirtinti zimografija detektuotų *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyviai produkuotų peptidazių išsidėstymą NDS-PAGE gelyje. *G. thermoleovorans* DSM 15325 produkuotų Pz-peptidazių A ir B charakterizuoti homologai azokolio nehidrolizuoja (36), o termolizinių bei termolizinių homologų gebėjimas hidrolizuoti azokolį charakterizuotas (179, 180).

Zimogramų gelius inkubavus buferyje su 10 μM ZnCl_2 geobacilų sekretuotas bacilolizino homologas nedetektuotas. Aktyvumo slopinimas didele Zn^{2+} katijono koncentracija – tipiška M3 ir M4 proteolizinių fermentų šeimų peptidazių charakteristika (181), visgi termolizinus inaktyvuoja mažesnė Zn^{2+} koncentracija (182). Zimogramų gelių inkubavimui taikyta 20 mM Ca^{2+} katijono koncentracija buvo būtina efektyviam bacilolizino homologo autodegradacijos

slopinimui ir/ar homologo termostabilumo užtikrinimui (183, 184). Kalcio katijonas buvo taip pat būtinas *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyviai produkuotų Pz-peptidazių homologų aktyvumo detekcijai. *G. collagenovorans* MO-1 charakterizuotų Pz-peptidazių kataliziniam aktyvumui Ca^{2+} katijono įtaka neišreikšta (36).

Peptidazių inhibitorių poveikio rezultatai patvirtino *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyviai produkuotų kolagenolizinių peptidazių priskyrimą cinko peptidazėms ir kartu bacilolizino homologo priskirtinumą termolizinams. Peptidazių inhibitorių poveikio rezultatai taip pat patvirtino kalcio katijono svarbą *G. thermoleovorans* DSM 15325 produkuotų peptidazių aktyvumui.

Kolagenolizinės peptidazės, konstitutyviai produkuotos *G. thermoleovorans* DSM 15325 kultivavus terpėje be peptidazių raiškos induktorių, gliukozę taikius anglies ir energijos šaltiniu, homologiškos išsamiai charakterizuotoms cinko peptidazėms. Detektavus pastarąsias hidrolazes, patvirtinta prielaida, jog *G. thermoleovorans* DSM 15325 gebėjimą įsisavinti kolageną užtikrina konstitutyviai ir induktyviai produkuojamos ekstraląstelinės kolagenolizinės peptidazės. Funkcionuodamos identifikuotos geobacilų peptidazės tikėtinai sudaro konstitutyvią katabolinę kaskadą, įgalinančią kolageno bei kitų tapusių prieinamais aplinkoje baltymų įsisavinimą, svarbų ląstelių mitybai. Skaidomų baltymų oligopeptidai, transportuoti į geobacilos citoplazmą, kartu tikėtinai lemia induktyvią peptidazių raišką, kas reikšmingai didina aplinkos oligopeptidų ir/ar baltymų įsisavinimo efektyvumą. *G. thermoleovorans* DSM 15325 gebėjimas konstitutyviai produkuoti ekstraląstelines kolagenolizines metalo peptidazes, tikėtinai sudarančias konstitutyvią katabolinę kaskadą, atspindi proteolizinių geobacilų adaptacinį plastiškumą.

3.2. M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimiui priskirtina *G. thermoleovorans* DSM 15325 oligopeptidazė

Nustačius *G. thermoleovorans* DSM 15325 gebėjimą konstitutyviai produkuoti metalo oligoendopeptidazes, priskirtinas M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimiui, tikėtinais su identifikuotais Pz-peptidazių homologais,

funkciškai sietinos homologiškos metalo oligoendopeptidazės anotuotuose geobacilų genomuose identifikuotos *in silico* analize (N. Kuisienė, nepublikuoti rezultatai). Geobacilos, kurių genomai anotuoti, koduoja išsamiai charakterizuotų Pz-peptidazių A ir B iš *G. collagenovorans* MO-1 homologus bei tikėtina sekretuojamą M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimiui priskirtiną galimai metalo oligoendopeptidazę. Termofilinių bakterijų sekretuojamos metalo oligopeptidazės išlieka netirtos. Remiantis apibrėžta geobacilų tikėtina sekretuojamos galimai metalo oligoendopeptidazės charakterizavimo svarba bei tikėtinu pastarosios peptidazės funkciniu sinergizmu su geobacilų konstitutyviai produkuojamomis Pz-peptidazėmis ir/ar kolagenolizinėmis proteazėmis, suformuluota tikėtinos *G. thermoleovorans* DSM 15325 sekretuojamos metalo oligopeptidazės (GT-SM3B), priskirtinos M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimiui, charakterizavimo strategija (N. Kuisienė, nepublikuoti rezultatai).

3.2.1. GT-SM3B sekos analizė

Nuo chromosomos pagausinus GT-SM3B geno seką patvirtinta prielaida, suformuluota remiantis *in silico* analize, jog *G. thermoleovorans* DSM 15325, kaip ir geobacilos, kurių genomai anotuoti, chromosomoje koduoja sekretuojamą metalo oligopeptidazę (N. Kuisienė). Pagausinimui naudojus pradmenų porą M03007kaust1F ir M03007kaust1RRS, gautas ~1900 bp ilgio PGR produktas. Sekoskaita nustatyta GT-SM3B geno seka, paskelbta GenBank suteikus Nr. KF779146. GT-SM3B genas – 1857 bp ilgio, koduojantis 618 aminorūgščių ilgio baltymą. GenBank suteiktas baltymo ID AHG94995.1. Apskaičiuota GT-SM3B molekulinė masė – 70,2 kDa, be numatyto 23 aminorūgščių signalinio peptido – 67,7 kDa.

GT-SM3B seka mažiausiai skiriasi nuo galimai oligopeptidazių F, anotuotų geobacilų genomuose, pastarųjų galimai oligopeptidazių sekose *in silico* numačius signalinius peptidus. Polipeptidų palyginimas leidžia teigti, jog GT-SM3B yra 99,2 % identiška *G. thermoleovorans* CCB_US3_UF5 oligopeptidazei F (GenBank AEV19421.1) ir 98,7 % identiška *Geobacillus* sp. C56-T3 oligopeptidazei F (GenBank ADI26721.1). GT-SM3B seka nuo

G. thermoleovorans CCB_US3_UF5 oligopeptidazės F skyrėsi penkiomis, o nuo *Geobacillus* sp. C56-T3 oligopeptidazės F – aštuoniomis aminorūgštimis. Pastarieji GT-SM3B homologai – tikėtinaai sekretuojamos galimai oligopeptidazės, homologiškos oligopeptidazei F, priskyrus M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimiui, anotuotos nuskaitytuose genomuose (1). Geobacilos, kurių genomai anotuoti, taip pat koduoja viduląstelinę oligopeptidazę F (1). Geobacilų viduląstelinių oligopeptidazių F sekos mažiau skiriasi nuo M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio holotipinės oligopeptidazės F – viduląstelinės oligopeptidazės iš *L. lactis* (1) – nei nuo tikėtinaai sekretuojamų galimai oligopeptidazių F iš geobacilų. Vienintele charakterizuota geobacilų viduląsteline oligopeptidaze F išlieka Pz-peptidazė B iš *G. collagenovorans* MO-1. GT-SM3B palyginus su viduląstelinėmis geobacilų galimai oligopeptidazėmis F nustatyta, jog GT-SM3B identiškumas svyruoja nuo 40,6 % identiškumo *Geobacillus* sp. C56-T3 viduląstelinei oligopeptidazei F (GenBank ADI27671.1) iki 38,9 % identiškumo *Geobacillus* sp. G11MC16 viduląstelinei oligopeptidazei F (GenBank EDY07555.1).

GT-SM3B analogiškai identiška charakterizuotoms sekretuojamoms oligopeptidazėms F (11 pav.). Lyginus GT-SM3B su *B. amyloliquefaciens* 23-7A charakterizuota (79) sekretuojama oligopeptidaze PepF_{Ba} (GenBank AAQ08885.2; MEROPS M03.007) nustatytas 40,3 % identiškumas, o su charakterizuota (78) sekretuojama Pz-peptidaze (DDBJ BAA13561.1; MEROPS M03.007) iš *B. licheniformis* N22 – 38,5 % identiškumas. GT-SM3B sekos identiškumas M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio išsamiai charakterizuotos (69) holotipinės peptidazės *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 oligopeptidazės F – PepF (GenBank AAK05825.1; MEROPS M03.007) sekai (11 pav.) siekia 34,2 % identiškumo. *G. collagenovorans* MO-1 viduląstelinėms Pz-peptidazėms A ir B, vienintelėms charakterizuotoms (36) termofilų metalo oligopeptidazėms, GT-SM3B atitinkamai 26,2 ir 39,5 % identiška. GT-SM3B seka 25,3 % identiška charakterizuotos erdvinės struktūros *Geobacillus stearothermophilus* galimai viduląstelinės oligoendopeptidazės (DDBJ BAD75248.1; MEROPS M03.010; PDB 2H1N (185)) Pz-peptidazės A homologo sekai.

(His⁴⁰⁰-Glu⁴⁰¹-Leu-Gly-His⁴⁰⁴) bei trečiasis cinko jono ligandas Glu (Glu⁴²⁸) nustatyti oligopeptidazės sekos *in silico* analize (11 pav.). Cinko jono ligandu funkcionuojanti glutamato liekana už cinko oligopeptidazių motyvo sutinkama bent už 18 aminorūgščių liekanų (67). GT-SM3B sekoje glutamato liekana už His-Glu-Xaa-Xaa-His motyvo sutinkama toliau – už 23 aminorūgščių liekanų. M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio charakterizuotos geobacilų oligopeptidazių erdvinės struktūros patvirtino už cinko oligopeptidazių motyvo už 23 aminorūgščių liekanų sutinkamos glutamato liekanos funkcionavimą trečiuoju Zn²⁺ ligandu (185, 63).

Nustatyta GT-SM3B domeninė organizacija tipiška oligopeptidazių F sekoms (1). GT-SM3B sekoje *in silico* identifikuoti M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio oligopeptidazių sekoms tipiškas N-galinis domenas, imtinai Glu¹²⁶-...-Arg¹⁸⁹, ir M3 proteolizinių fermentų šeimos domenas, imtinai Met²¹⁵-...-Leu⁵⁹⁵ (11 pav.). Gluzincinams konservatyvus domenas, imtinai Asp³⁴⁶-...-Glu⁴³⁵, taip pat identifikuotas GT-SM3B sekoje (11 pav.). Charakterizuotos metalo oligopeptidazės – gluzincinai (1), taigi GT-SM3B priskyrimas gluzincinams buvo tikėtinas.

GT-SM3B geno priskyrimas operonui nėra tikėtinas, nes peptidazės homologų genų, anotuotų nuskaitytuose geobacilų genomuose, priskyrimas operonams *in silico* nenumatytas (141, 142).

Nustatytas GT-SM3B sekos homologiškumas bakterijų oligopeptidazėms F, priskiriamoms M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimiui, ir kartu GT-SM3B sekoje identifikuoti konservatyvūs sekos elementai bei GT-SM3B sekos domeninė organizacija leidžia GT-SM3B priskirti M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimiui, apjungiančiam bakterijų metalo peptidazes, pasižyminčias išskirtinai tik oligopeptidoliziniu specifiškumu (1).

3.2.2. Rekombinantinės GT-SM3B optimizuota produkcija

GT-SM3B heterologinė produkcija taikytomis pradinėmis raiškos sąlygomis neturėjo įtakos *E. coli* BL21 (DE3) augimui. Taikytomis sąlygomis pasiekta GT-SM3B raiška didele išeiga, tačiau rekombinantinė oligopeptidazė

raiškos kamieno citoplazmoje agregavo prarasdama katalizinį aktyvumą. Didele išeiga produkuota rekombinantinė GT-SM3B be numatyto signalinio peptido taip pat agregavo raiškos kamieno citoplazmoje ir prarado aktyvumą (nepateikti rezultatai). Nors GT-SM3B seka, buvo papildyta N-galiniu šešių histidino liekanų formuojamu giminingumo inkaru bei trombino atpažįstama aminorūgščių seka *E. coli* BL21 (DE3) atpažino, kaip *in silico* numatyta, natyvų GT-SM3B signalinį peptidą. Pradinės GT-SM3B raiškos sąlygos užtikrino sąlyginai menkos išeigos rekombinantinės oligopeptidazės sekrecinę produkciją, nepakankamą tikslinį baltymą detektuoti NDS-PAGE, specifinis produkuoto fermento aktyvumas $0,02 \pm 0,005$ U/mg. Įvertinus GT-SM3B heterologinę raišką pradinėmis sąlygomis, vykdytas tikslinio baltymo raiškos optimizavimas siekiant parinkti sąlygas, ribojančias GT-SM3B agregavimą *E. coli* BL21 (DE3) citoplazmoje ir/ar padidinančias oligopeptidazės sekrecinės produkcijos išeigą.

Metalo oligopeptidazių heterologinė raiška, indukavus maža IPTG koncentracija, raiškos indukcijos metus palaikius žemą temperatūrą, tipišku atveju užtikrina didelę rekombinantinių oligopeptidazių raiškos išeigą bei tirpumą (186). Visgi raiškos temperatūros ir/ar induktoriaus koncentracijos sumažinimas neriboją GT-SM3B agregavimo raiškos kamieno citoplazmoje. GT-SM3B raiškos išeiga temperatūrą raiškos indukcijos metu nuo 37 °C sumažinus iki 30 ar 25 °C analogiškai padidėjo, bet raiška 30 ar 25 °C neriboją tikslinio baltymo agregavimo. IPTG koncentracija, taikyta raiškos indukavimui, taip pat teigiamai koreliavo su rekombinantinės GT-SM3B kiekiu, bet vėlgi neriboją oligopeptidazės agregavimo. Mažesnis raiškos kamieno kultūros tankis, pradėjus raiškos indukciją, OT₆₀₀ 0,5 palyginus su 0,8, nežymiai padidino GT-SM3B raiškos išeigą, bet neturėjo įtakos agregavimui. Rekombinantinės GT-SM3B agregavimo *E. coli* BL21 (DE3) citoplazmoje neriboją ir raiškos indukcijos trukmės ilginimas nuo 2 iki 4 ir 12 val., lėmęs tolydų tikslinio baltymo kiekio mažėjimą raiškos kamieno citoplazmoje. Heterologinė GT-SM3B raiška neturėjo įtakos raiškos kamieno augimo dinamikai, nepriklausomai kokiomis sąlygomis vykdyta oligopeptidazės raiška

optimizavimo metu. Pastarasis rezultatas netiesiogiai patvirtina prielaidą, jog agregavusi GT-SM3B buvo kataliziškai neaktyvi *E. coli* BL21 (DE3) citoplazmoje. Parinkti sąlygas ribojančias GT-SM3B agregavimą heterologinės raiškos metu *E. coli* BL21 (DE3) citoplazmoje nepavyko.

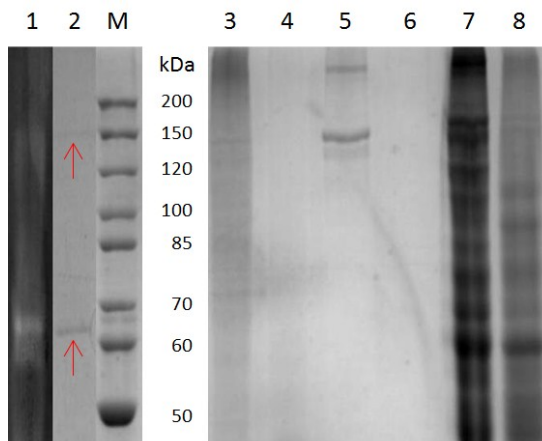
Didelė rekombinantinės GT-SM3B sekretinės produkcijos išėiga užtikrinta rekombinantinės oligopeptidazės raišką indukavus *E. coli* BL21 (DE3) kultūrai pasiekus OT_{600} 0,5, raišką vykdžius 4 val., indukavimui taikius 0,5 mM IPTG, raiškos indukacijos metu palaikius 30 °C. GT-SM3B produkcija gryninimui vykdyta taikius minėtas heterologinės raiškos parametrų vertes, parinktas optimizavimo metu, optimalias rekombinantinės oligopeptidazės sekretijai. LB terpę, taikytą GT-SM3B sekretinei produkcijai, pakeitus M9 terpe papildyta kazeino hidrolizatu 1 % (masė/tūris), pasiekta tris kartus efektyvesnė sekretinės produkcijos išėiga, atitinkamai specifiniai aktyvumai $0,06 \pm 0,01$ U/mg ir $0,14 \pm 0,02$ U/mg. *E. coli* BL21 (DE3) sekretavus GT-SM3B parinktoje terpėje, vykdžius fermento sekretinį produkavimą ne ilgiau 4 val., rekombinantinės oligopeptidazės degradavimo raiškos kamieno ekstralastelinėmis proteazėmis nedetektuota. Optimalios GT-SM3B produkavimo sąlygos efektyvią fermento sekretiją užtikrino tikėtina pakeisdamos rekombinantinės oligopeptidazės agregavimo ir transportavimo iš raiškos kamieno citoplazmos pusiausvyrą. Didžiausia GT-SM3B sekretinės produkcijos išėiga pasiekta vykdžius rekombinantinės oligopeptidazės raišką skurdesnėje terpėje bei indukavus 0,5 mM IPTG koncentracija, todėl tikėtina, jog mažiau efektyvi heterologinė raiška pakeičia pusiausvyrą, efektyvindama GT-SM3B sekretiją iš *E. coli* BL21 (DE3). Visgi vykdžius GT-SM3B sekretinį produkavimą ne mažiau kaip pusė rekombinantinės GT-SM3B kiekio agregavo raiškos kamieno citoplazmoje.

GT-SM3B taikytas sekretinis produkavimas anksčiau rekombinantinių metalo oligopeptidazių produkcijai nebuvo taikytas. M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio peptidazės, produkuotos heterologine raiška, išliko tirpios raiškos kamienų citoplazmoje (123, 72). Vienintelė bakterijų metalo oligopeptidazė, kurios sekoje numatytas signalinis peptidas, PgPepO iš *P. gingivalis* 381,

produkuota heterologine raiška, išliko tirpia *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS citoplazmoje ir nebuvo sekretuota, raišką indukavus 1 val., palaikius 25-28 °C (187). Palanki gryninimui rekombinantinės GT-SM3B sekrecinė produkcija užtikrino nelinkusios agreguoti, subrendusios ir be papildomų nenatūvių polipeptido sekos fragmentų, aktyvios GT-SM3B gavimą.

3.2.3. Rekombinantinės GT-SM3B gryninimas

Rekombinantinė GT-SM3B gryninta iš 500 mL raiškos kultūros kultūrinio skysčio precipitacija išsūdzius $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei anijonų ir katijonų jonų mainų chromatografija pasiekus 36 kartų gryninimo efektyvumą. Daugelis *E. coli* BL21 (DE3) sekretomo baltymų iš GT-SM3B preparato atskirti anijonų mainų chromatografija. Katijonų mainų chromatografija GT-SM3B sukonzentruota bei iš rekombinantinės oligopeptidazės preparato atskirti likę *E. coli* BL21 (DE3) sekretomo baltymai. GT-SM3B preparato

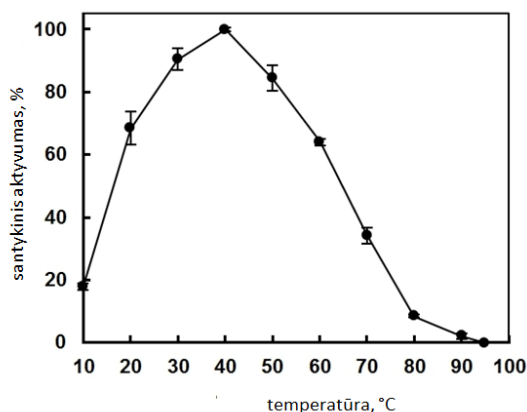


12 pav. GT-SM3B preparato grynimo bei oligopeptidazės hidrolizinio aktyvumo įvertinimas. 1: GT-SM3B želatinos zimografija; 2: GT-SM3B preparato baltymų elektroforezinis profilis; M: PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific); 3: Želatinos kontrolė; 4: Želatinos oligopeptidų hidrolizės GT-SM3B profilis; 5: I tipo kolageno kontrolė; 6: I tipo kolageno oligopeptidų hidrolizės GT-SM3B profilis; 7: Nefrakcionuoto kolageno preparato kontrolė; 8: Nefrakcionuoto kolageno preparato oligopeptidų hidrolizės GT-SM3B profilis.

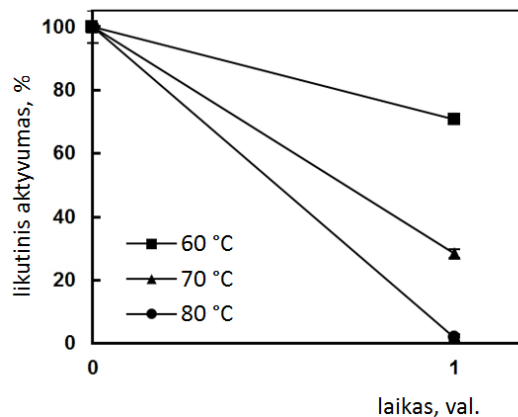
NDS-PAGE ir želatinos zimografija patvirtintas GT-SM3B grynumas, kartu detektavus oligopeptidazės homodimerizaciją (12 pav.). Viso išgryninta $0,34 \pm 0,02$ mg rekombinantinės GT-SM3B, specifinis aktyvumas $5,3 \pm 0,03$ U/mg. Gryninimo metu rekombinantinė GT-SM3B buvo stabili ir nedemonstravo polinkio agreguoti. Gryna rekombinantinė GT-SM3B oligopeptidazės mėginio buferyje taip pat buvo stabili bei neagregavo.

3.2.4. Temperatūros įtaka GT-SM3B aktyvumui bei stabilumui

Rekombinantinės GT-SM3B peptidolizinio aktyvumo matavimas, taikius dešimtį skirtingų temperatūrų, leido nustatyti, jog oligopeptidazė aktyviausia 40 °C (13 pav.). Nustatytas GT-SM3B temperatūros optimumas artimas PepF_{Ba} peptidazės optimumui – 45 °C (79) bei reikšmingai nesiskiria nuo *Bacillus licheniformis* Pz-peptidazės ir PgPepO peptidazių aktyvumui optimalios 37 °C temperatūros (78, 187). Lyginus GT-SM3B aktyvumo temperatūrinį optimumą su charakterizuotų metalo oligopeptidazių aktyvumui optimaliomis temperatūromis, tik *G. collagenovorans* MO-1 termoaktyvių Pz-peptidazių A ir B temperatūrų optimumai akivaizdžiai viršija GT-SM3B optimumą, atitinkamai 25 ir 30 °C (36). GT-SM3B mažiau termoaktyvi, nei galima tikėtis charakterizavus fermentą, koduojamą obligatinio termofilo *G. thermoleovorans* DSM 15325, kurio augimui optimali temperatūra yra 55-60 °C, tuo tarpu bakterijos neaugo palaikius žemesnę nei 55 °C temperatūrą (169). Charakterizuotos mezofilinių bakterijų sekretuojamos metalo oligopeptidazės – PepF_{Ba} peptidazė, *B. licheniformis* Pz-peptidazė, o taip pat PgPepO peptidazė, kataliziškai aktyviausios palaikius temperatūrą, identišką arba analogišką mezofilo augimui palankiausiai temperatūrai.



13 pav. Temperatūros įtaka GT-SM3B peptidoliziniui aktyvumui naudojant substratu Karbobenzoksi-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala-OH. 100 % – $5,3 \pm 0,03$ U/mg, oligopeptidazės peptidolizinis aktyvumas nustatytas esant oligopeptidazės aktyvumui optimaliai temperatūrai.



14 pav. Temperatūros įtaka GT-SM3B stabilumui. GT-SM3B likutinis peptidolizinis aktyvumas nustatytas substratu naudojant Karbobenzoksi-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala-OH. 100 % – $3,6 \pm 0,06$ U/mg, oligopeptidazės peptidolizinis aktyvumas nustatytas esant 60 °C.

Įvertinus GT-SM3B aktyvumo priklausomybę nuo temperatūros, stebėtas tolydus aktyvumo didėjimas nuo 10 °C iki aktyvumo maksimumo – 40 °C bei analogiškai tolydus aktyvumo mažėjimas virš oligopeptidazės aktyvumui optimalios temperatūros iki 80 °C. Fermento katalizinio aktyvumo priklausomybę nuo temperatūros atspindi varpo pavidalo kreivė, tuo tarpu katalizinio aktyvumo maksimumas neišreikštas (13 pav.). GT-SM3B aktyvumas 50 ir 60 °C siekė atitinkamai 84 ir 64 %, lyginus su nustatytu 40 °C maksimaliu oligopeptidazės aktyvumu. Charakterizuota GT-SM3B išsiskiria tolydžiu katalizinio aktyvumo mažėjimu virš optimalios fermento aktyvumui temperatūros iki 60 °C. Charakterizuotų metalo oligopeptidazių aktyvumo mažėjimas virš temperatūrinio optimumo, skirtingai nei GT-SM3B, išreikštas. Oligopeptidazės aktyvumas 10 °C siekė 18 % (13 pav.). Peptidolizinis GT-SM3B aktyvumas pradėjo išreikštai mažėti virš 60 °C, nustatytas 70 °C siekė 34 %, tuo tarpu 80 °C aktyvumas sumažėjo iki 2 %. GT-SM3B visiškai inaktyvavo 95 °C temperatūra (13 pav.). Charakterizuota oligopeptidazė demonstravo vieną plačiausių efektyvaus aktyvumo – daugiau nei 50 % aktyvumo lyginus su maksimaliu aktyvumu, intervalų, kada nors nustatytų metalo oligopeptidazei.

GT-SM3B demonstravo 71 % likutinio peptidolizinio aktyvumo po 1 val. fermento preparato inkubavimo 60 °C (14 pav.). Ekstrapoliuotas GT-SM3B termostabilumo pusperiodis ($t_{1/2}$), veikus minėta 60 °C temperatūra, – virš 1,5 val., oligopeptidazės $t_{1/2}$, veikus 70 °C, – apytiksliai 40 min., tuo tarpu 1 val. inkubavimas 80 °C beveik visiškai inaktyvavo GT-SM3B, likutinis peptidolizinis aktyvumas mažesnis nei 2 % (14 pav.).

Charakterizuoto GT-SM3B termostabilumo palyginimas (6 lentelė) su charakterizuotais metalo oligopeptidazių termostabilumais leidžia teigti, jog oligopeptidazės termostabilumas analogiškas Pz-peptidazės A iš *G. collagenovorans* MO-1 termostabilumui, bet GT-SM3B nežymiai mažiau termostabili nei Pz-peptidazė B iš *G. collagenovorans* MO-1. Bakterijų sekretuojamų metalo oligopeptidazių termostabilumas išlieka fragmentiškai charakterizuotu. Tikslingai tyrus *B. licheniformis* Pz-peptidazės termostabilumą, nustatytas oligopeptidazės termostabilumas 50 °C, bet Pz-peptidazę inaktyvuoja

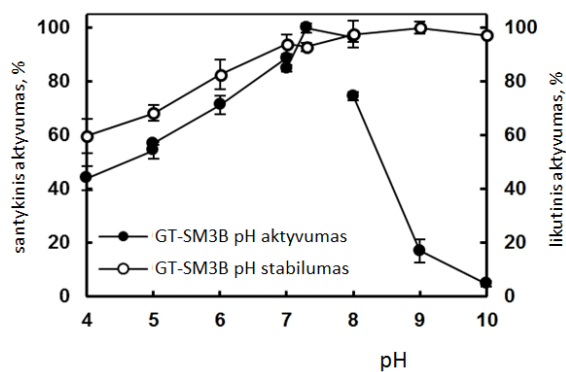
6 lentelė. Charakterizuotų bakterijų metalo oligopeptidazių termostabilumas.

Fermentas	Bakterija	$t_{1/2}$	Literatūros šaltinis
GT-SM3B	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> DSM 15325	40 min., 70 °C	Parengta disertacija
PepF	<i>Desulfotalea psychrophila</i> DSM 12343	30 min., 30 °C	(188)
Pz-peptidazė	<i>Bacillus licheniformis</i> N22	1 val., 50 °C	(78)
Pz-peptidazė B	<i>Geobacillus collagenovorans</i> MO-1	30 min., 75 °C	(36)
Pz-peptidazė A		30 min., 70 °C	
LEP I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremonis</i> H61	10 min., 55 °C	(189)
LEP II		10 min., 65 °C	(190)

inaktyvuoja temperatūra, aukštesnė nei 55 °C (78). PepF_{Ba} oligopeptidazė 1 val. stabili 40 °C (79). GT-SM3B vienintelė charakterizuota termostabili ekstraląstelinė metalo oligopeptidazė, nes termostabilesnė nei *B. licheniformis* Pz-peptidazė ir PepF_{Ba} peptidazė ar charakterizuotos ne termoaktyvios metalo oligopeptidazės.

3.2.5. pH įtaka GT-SM3B aktyvumui bei stabilumui

Rekombinantinė GT-SM3B demonstravo pH optimumą pH 7,3, analogišką PgPepO peptidazės optimumui pH 6,8-7 (187) bei PepF_{Ba} peptidazės optimumui pH 7 (79). *B. licheniformis* Pz-peptidazė, taip pat charakterizuota sekretuojama metalo oligopeptidazė, aktyviausia šarminesneje aplinkoje – pH



15 pav. pH įtaka GT-SM3B aktyvumui ir stabilumui. Skirtingų pH įtaka nustatyta esant 60 °C, substratu naudojant Karbobenzoksi-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala-OH. 100% – 3,6 ± 0,06 U/mg oligopeptidazės peptidolizinis aktyvumas nustatytas esant 60 °C.

aktyvumas, imtinai pH 5-8 intervale (15 pav.). Veikus rūgštiniu pH, oligopeptidazės aktyvumas tolydžio mažėjo iki 44 % hidrolizinio aktyvumo pH 4 (15 pav.). Nustatytas GT-SM3B aktyvumo priklausomybės nuo pH profilis demonstravo poslinkį į šarminį pH – oligopeptidazės aktyvumas pH 8 viršijo peptidolizinį

optimumas pH 7,8 (78). Palyginus GT-SM3B nustatytą pH optimumą su viduląstelinų metalo oligopeptidazių pH optimumais, akivaizdus GT-SM3B optimumo analogiškumas streptokokų oligopeptidazės F – PepB peptidazės pH optimumui pH 7,4 (191). GT-SM3B demonstravo efektyvų aktyvumą – daugiau nei 50 % aktyvumo lyginus su maksimaliu

aktyvumą, detektuotą pH 7 apytiksliai 7 %. GT-SM3B demonstravo išreikštą aktyvumo mažėjimą virš pH 8 (15 pav.), detektuotas aktyvumas pH 10 nesiekė 5 % (15 pav.). Rekombinantinė GT-SM3B buvo stabili pH 5-8, tačiau labiau rūgštinių ar šarminių sąlygų poveikis GT-SM3B mažino fermento aktyvumą. Likutinis GT-SM3B peptidolizinis aktyvumas pH 4 ir 9 siekė 60 %, pH 10 – 40 % (15 pav.).

Charakterizuota oligopeptidazė buvo efektyviai aktyvi ir stabili pH 5-8, palaikius 60 °C. Sutampančių bei apimančių platų pH intervalą GT-SM3B aktyvumo ir stabilumo priklausomybės nuo pH profilių charakteristikos – intervalo plotis bei poslinkis į šarminį pH, labiau analogiškos ne mezofilų sekretuojamų metalo oligopeptidazių profilams, bet profilams, būdingiems charakterizuotoms viduląstelinėms metalo oligopeptidazėms iš laktokokų (189, 69) ir *G. collagenovorans* MO-1 (36).

3.2.6. Metalų jonų bei skirtingų junginių įtaka GT-SM3B aktyvumui

Metalų chloridų ir skirtingų reagentų įtakos rekombinantinės GT-SM3B aktyvumui įvertinimo rezultatai pateikti atitinkamai 7 ir 8 lentelėse.

GT-SM3B aktyvumui neturėjo įtakos taikyta 1 mM Li^+ , K^+ , Sn^{2+} ir Ba^{2+} katijonų koncentracija bei padidinta 10 mM K^+ katijono koncentracija. Rekombinantinės oligopeptidazės katalizinį aktyvumą nežymiai stimuliavo 1 ir 10 mM Ca^{2+} katijono koncentracijos. GT-SM3B aktyvumą 1 mM Na^+ ir Mg^{2+} jonų koncentracijos stimuliavo apytiksliai 20 %. Visgi 10 ir 350 mM Na^+ katijono koncentracijų stimuliacinis poveikis GT-SM3B aktyvumui reikšmingai nesiskyrė nuo minėto 1 mM Na^+ stimuliacinio efekto. GT-SM3B nežymiai, apytiksliai 6 %, slopino 1 mM Co^{2+} jono, tuo tarpu 1 mM Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} katijonų koncentracija oligopeptidazės aktyvumą slopino apytiksliai 50 %. Trivalentis Fe^{3+} katijonas GT-SM3B peptidolizinį aktyvumą slopino daugiau nei 75 %.

Chelacija EDTA visiškai inaktyvavo GT-SM3B, tačiau identiška 1 mM EGTA koncentracija neturėjo įtakos oligopeptidazės kataliziniam aktyvumui. Reduktorių 1 mM koncentracijos įtaka GT-SM3B aktyvumui skirtinga. Oligopeptidazės aktyvumą slopino DTT ir 2-ME atitinkamai daugiau nei 65 % ir 9 %.

7 lentelė. Metalų jonų įtaka GT-SM3B aktyvumui.

Metalo jonas*	Santykinis aktyvumas, %
Kontrolė	100**
Li ⁺	105,23 ± 0,63
Na ⁺	127,67 ± 3,79
Na ⁺ , 10 mM	118,81 ± 0,8
Na ⁺ , 350 mM	118,55 ± 1,28
Mg ²⁺	121,33 ± 3,09
K ⁺	99,73 ± 1,34
K ⁺ , 10 mM	101,47 ± 2,42
Ca ²⁺	102,73 ± 0,84
Ca ²⁺ , 10 mM	105,56 ± 0,01
Mn ²⁺	49,12 ± 3,98
Fe ³⁺	23,83 ± 2,45
Co ²⁺	94,38 ± 1,41
Ni ²⁺	57,7 ± 5
Cu ²⁺	53,16 ± 1,78
Zn ²⁺	58,47 ± 0,69
Sn ²⁺	96,78 ± 1,33
Ba ²⁺	102,91 ± 2,02

*jei kitaip nenurodyta 1 mM.

**100 % santykinio aktyvumo 3,4 ± 0,06 U/mg GT-SM3B peptidolizinis aktyvumas, esant 60 °C.

koncentracijomis slopino GT-SM3B atitinkamai 7 ir 24 %. GT-SM3B priskyrimą gluzincinams *in silico* analize patvirtino nustatyta chelatorių, divalenčių metalų jonų bei fosforamidono įtaka oligopeptidazės aktyvumui. Charakterizuotos oligopeptidazės visiškas inaktyvavimas EDTA bei fosforamidonu leidžia teigti, jog divalentis katijonas būtinas fermento katalizinio aktyvumo palaikymui. Metalų katijono svarba GT-SM3B katalizinio aktyvumo užtikrinimui taip pat patvirtinta nustatant fermento aktyvumo slopinimą DTT. Oligopeptidazės polipeptide nesutinkamos cisteino liekanos, todėl aktyvumo slopinimas DTT sietinas su reduktoriaus gebėjimu chelatuoti katijonus (69). Charakterizuotas GT-SM3B aktyvumas nėra priklausomas nuo Ca²⁺ – priešingu atveju EGTA būtų inaktyvavusi fermentą. Tipiškai nuo cinko jono priklausomoms metalo peptidazėms (192) Zn²⁺ perteklius, taikius milimolinę katijono koncentraciją, reikšmingai slopino GT-SM3B aktyvumą.

TCEP stimuliavo GT-SM3B aktyvumą apytiksliai 10 %. Įvertinus detergentų poveikį charakterizuotos oligopeptidazės aktyvumui nustatytas aktyvumo slopinimas nuo apytiksliai 14 % veikus Triton X-100 taikyta 0,1 % (tūris/tūris) koncentracija iki visiško inaktyvavimo 10 mM NDS ir 1 mM Brij 35 ar Brij 58. GT-SM3B aktyvumas išliko nepakitęs veikus 1 ir 10 mM urėjos. Guanidino-HCl taikyta 1 mM koncentracija slopino fermentą beveik 20 %. Glicerolio 1 % (tūris/tūris) koncentracija GT-SM3B aktyvumą stimuliavo daugiau nei 11 %, bet glicerolio didesnė 5 % (tūris/tūris) koncentracija aktyvumą slopino apytiksliai 24 %. Etilenglikolis taikytomis

8 lentelė. Junginių įtaka GT-SM3B aktyvumui.

Junginys	Koncentracija	Santykinis aktyvumas, %
Kontrolė	–	100*
DTT	1 mM	28,09 ± 6,59
TCEP	1 mM	110,21 ± 3,32
2-ME	1 mM	86,75 ± 3,39
Karbamidas	1 mM	99,69 ± 0,58
	10 mM	98,47 ± 0,32
Guanidino-HCl	1 mM	78,74 ± 1,92
NDS	1 mM	52,83 ± 0,9
	10 mM	ND
Tween 20	0,1 %	67,08 ± 3,17
	1 %	36,09 ± 4,57
Tween 40	0,1 %	58,42 ± 2,76
	1 %	38,47 ± 0,39
Tween 60	0,1 %	61,97 ± 0,57
	1 %	22,76 ± 1,65
Tween 80	0,1 %	42,82 ± 1,36
	1 %	14,53 ± 0,86
Etilenglikolis	0,1 %	89,95 ± 3,03
	1 %	76,04 ± 1,21
Glicerolis	1 %	115,52 ± 3,81
	5 %	74,62 ± 1,4
Triton X-100	0,1 %	84,14 ± 0,85
	1 %	63,62 ± 2,42
Triton X-305	0,1 %	40,69 ± 1,97
	1 %	1,94 ± 0,8
Brij 35	1 mM	ND
Brij 58	1 mM	ND

*100 % santykinio aktyvumo 3,4 ± 0,06 U/mg GT-SM3B peptidolizinis aktyvumas, substratu taikius Karbobenzoksi-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala-OH heksapeptidą, palaikius 60 °C.
ND – nedetektuota

Charakterizuotos sekretuojamos ir termostabilios M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio oligopeptidazės, analogiškai GT-SM3B slopintos Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺ ir Cu²⁺ jonų 1 mM koncentracija. Pz-peptidazių iš *B. licheniformis* N22 ir *G. collagenovorans* MO-1 aktyvumus Mn²⁺ slopino mažiau nei GT-SM3B (78, 36). Charakterizuotos oligopeptidazės katalizinis aktyvumas Mg²⁺ intensyviau stimuliuotas nei *G. collagenovorans* MO-1 Pz-peptidazės B (36). Laktokokų oligopeptidazės F aktyvumą 1 M NaCl koncentracija mažino 25 % (193), taikytos Na⁺ jono koncentracijos imtinai iki 350 mM GT-SM3B aktyvumą stimuliavo.

Charakterizuota GT-SM3B išliko efektyviai aktyvi – daugiau nei 50 % aktyvumo lyginus su maksimaliu aktyvumu, veikus daugeliu junginių, kurių įtaka oligopeptidazės aktyvumui analizuota.

3.2.7. GT-SM3B homodimerizacija bei substratinis specifiškumas

Grynos rekombinantinės GT-SM3B preparato NDS-PAGE nustatyta oligopeptidazės homodimerizacija (12 pav.). Oligomeras, tikėtina, homodimeras suformuotas 67,7 kDa molekulinės masės GT-SM3B monomerų, nes oligomero molekulinė masė, lyginus su baltymų molekulinė masių žymens molekulinės masės standartais, artima 150 kDa. Rekombinantinės GT-SM3B

preparato NDS-PAGE taip pat parodė, jog charakterizuotos oligopeptidazės homodimero koncentracija mažesnė nei monomero. GT-SM3B monomero ir dimero hidrolizinis aktyvumas detektuotas želatinos zimografija (12 pav.). Oligopeptidolizinio aktyvumo zonos zimogramose atitiko oligopeptidazės oligomerinių būvių molekulinės mases, o katalizinio aktyvumo zonų plotas bei intensyvumas atitiko GT-SM3B monomero ir homodimero koncentracijas, įvertintas NDS-PAGE. Charakterizuotos GT-SM3B homodimerizacija buvo tikėtina atsižvelgus, jog oligopeptidazės charakterizuoti homologai – bacilų sekretuojamos oligopeptidazės PepF_{Ba} ir *B. licheniformis* Pz-peptidazė, išgryninti homooligomerizavosi formuodami dimerus (79, 78). Tikėtina, jog natyvus GT-SM3B *in vivo* būvis – suformuotas homodimeras, tuo tarpu *in vitro* rekombinantinės oligopeptidazės oligomeriniai būviai egzistuoja dinaminėje pusiausvyroje, kurioje vyrauja homodimerui analogiškai kataliziškai aktyvus monomeras. Sekretuojama M13 proteolizinių fermentų šeimos peptidazė PgPepO – monomerinė oligopeptidazė (187). Tipišku atveju viduląstelinės bakterijų metalo oligopeptidazės – taip pat monomerinės hidrolazės (194; 69, 193).

GT-SM3B substratinio specifiškumo įvertinimo rezultatai, naudojus substratais Karbobenzoksi-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala-OH heksapeptidą ir trumpų grandinių kolageno oligopeptidų mišinius, palaikius 60 °C, pateikti 9 lentelėje. Oligopeptidazė intensyviausiai hidrolizavo sintetinį heksapeptidą, nustatytos reakcijos K_M , V_{max} ir k_{cat} vertės, atitinkamai, – $2,17 \pm 0,04 \times 10^{-6}$ M; $2,65 \pm 0,03 \times 10^{-3}$ μM/min ir $5,99 \pm 0,07$ s⁻¹. GT-SM3B specifinis peptidolizinis aktyvumas 60 °C, beveik 36 % mažesnis, lyginus su oligopeptidazės peptidolizės maksimumu $5,3 \pm 0,03$ U/mg, pasiektu palaikius oligopeptidazės aktyvumui optimalią 40 °C temperatūrą. Specifinis GT-SM3B hidrolizinis aktyvumas substratais taikius kolageno oligopeptidų mišinius, paruoštus iš želatinos ir I tipo kolageno iš žiurkės uodegos, buvo analogiškas. Oligopeptidazės santykinis pastarųjų oligopeptidų mišinių hidrolizės aktyvumas trečdaliu mažesnis, lyginus su heksapeptido peptidolizės intensyvumu. GT-SM3B substratinio specifiškumo įvertinimui substratu naudojant kolageno oligopeptidų mišinį, paruoštą iš nefrakcionuoto kolageno

preparato iš jungiamojo audinio, nustatytas mažiausias hidrolizinis GT-SM3B aktyvumas. Proteolizinis GT-SM3B aktyvumas nenustatytas – oligopeptidazė nehidrolizavo azokolio, reakciją inkubavus 12 val., palaikius 30 ar 60 °C (nepateikti rezultatai). GT-SM3B hidrolizinis aktyvumas sėkmingai detektuojamas NDS-PAGE (12 pav.). Kolageno oligopeptidų mišinių hidrolizės reakcijų inkubavimas 12 val., palaikius 60 °C, padidino GT-SM3B katalizuojamos hidrolizės kokybinės detekcijos NDS-PAGE tikslumą.

9 lentelė. GT-SM3B substratinis specifiškumas.

Substratas	Specifinis aktyvumas, U/mg	Santykinis aktyvumas, %
Karbobenzoksi-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala-OH	3,4 ± 0,06	100*
Oligopeptidų mišinys iš želatinos	2,27 ± 0,03	66,8 ± 1,32
Oligopeptidų mišinys iš I tipo kolageno	2,19 ± 0,07	64,4 ± 3,2
Oligopeptidų mišinys iš nefrakcionuoto kolageno preparato	1,42 ± 0,2	41,8 ± 14,08

*100 % – GT-SM3B peptidolizinis aktyvumas, palaikius 60°C.

Substratais taikius kolageno oligopeptidų mišinius iš želatinos, I tipo kolageno iš žiurkės uodegos ir nefrakcionuoto kolageno preparato iš jungiamojo audinio nustatytas platus GT-SM3B substratinis specifiškumas. Demonstravusi platų oligopeptidolizinį specifiškumą kolageno peptidams, GT-SM3B nedemonstravo proteolizinio aktyvumo. M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimiui priskiriamos peptidazės hidrolizuoja imtinai 5-23 aminorūgščių liekanų grandinės ilgio peptidus (69, 79). Želatinos, I tipo kolageno iš žiurkės uodegos ir nefrakcionuoto kolageno preparato iš jungiamojo audinio homogenizavimas acto rūgštimi, o taip pat zimogramų gelių ir hidrolizės reakcijų inkubavimas, palaikius 60 °C, lėmė trumpų grandinių kolageno oligopeptidų galinčių patekti į GT-SM3B aktyvų centrą mišinių susidarymą. Charakterizuota GT-SM3B santykinai intensyviau hidrolizavo želatinos ir I tipo kolageno iš žiurkės uodegos oligopeptidų mišinius nei nefrakcionuoto kolageno preparato iš jungiamojo audinio oligopeptidų mišinį. Želatinos ir I tipo kolageno grandinių sekos identiškos, tuo tarpu nefrakcionuoto kolageno preparatą kartu su I tipo kolageno grandinėmis sudaro taip pat ir kitų tipų kolageno polipeptidai.

Karbobenzoksi-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala-OH galima substratą oligopeptidazių aktyvumo įvertinimui (71, 78) charakterizuota GT-SM3B aktyviai hidrolizavo tarp Gly-Gly ir/ar Pro-Gly aminorūgščių liekanų, nes M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio peptidazėms nebūdingas aminopeptidolizinis aktyvumas, kartu pastarosios šeimos M3B pošeimio oligopeptidazės nehidrolizuoja peptidinio ryšio toliau nei už ketvirtos aminorūgšties liekanos link C-galinio peptido galo (69).

3.2.8. GT-SM3B funkcinė svarba *G. thermoleovorans* DSM 15325

GT-SM3B substratinis specifiskumas bei oligopeptidazės charakteristikos, atsižvelgus į sąlygas, optimalias *G. thermoleovorans* DSM 15325 augimui, leidžia esminę GT-SM3B funkciją sieti su bakterijų mityba. Charakterizuotą oligopeptidazę koduojantis nuosaikus termofilas geba augti įsisavindamas aplinkos baltymus (169). Kolageno įsisavinimą *G. thermoleovorans* DSM 15325 užtikrina konstitutyviai ir induktyviai produkuojamos ekstraląstelinės kolagenolizinės peptidazės. Analogiškai kolageno įsisavinimui *G. thermoleovorans* DSM 15325 svarbios konstitutyvios ir induktyvios oligopeptidazės, hidrolizuojančios kolageno oligopeptidus geobacilos citoplazmoje. *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyviai į ekstraląstelinę aplinką produkuoja kolagenolizines peptidazes, Pz-peptidazių A ir B homologus bei bacilolizino homologą, sudarančias katabolinę kaskadą, užtikrinančią efektyvų bakterijų aplinkoje tapusio prieinamu kolageno įsisavinimą. Skaidydamos kolageno polipeptidus, konstitutyvios geobacilų katabolinės kaskados peptidazės, užtikrindamos bakterijų mitybą, kartu užtikrina kolageno skaidymo efektyvinimą, nes į geobacilos citoplazmą transportuoti kolageno oligopeptidai tikėtina indukuoja induktyvių peptidazių raišką. *G. thermoleovorans* DSM 15325 induktyvioms kolagenolizinėms peptidazėms ir/ar oligopeptidazėms padidinus kolageno polipeptidų skaidymo efektyvumą ekstraląstelinėje aplinkoje didėjanti kolageno oligopeptidų koncentracija, tikėtina, ribotų *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyvių Pz-peptidazių A ir B homologų produkciją į ekstraląstelinę aplinką.

Pz-peptidazių A ir B homologai, *G. thermoleovorans* DSM 15325 kultivavus mM9 terpėje be peptidazių raiškos induktorių, detektavus aktyvumą, identifikuoti masių spektrometrija geobacilų ekstraląstelinių baltymų preparate, tuo tarpu charakterizuotos *G. collagenovorans* MO-1, manoma (122), konstitutyvios Pz-peptidazės A ir B, detektuotos pastarosios geobacilos citoplazmoje, kultivavus Luria (L) terpėje (36). *G. collagenovorans* MO-1 genomą nėra nuskaitytas, todėl nėra žinoma, ar geobacilos koduoja GT-SM3B homologą. Kultivavus L terpėje, *G. collagenovorans* MO-1 sekretuoja serino subtilizinas priskiriamą kolagenolizinę endopeptidazę (127, 128).

GT-SM3B konstitutyvi raiška ir/ar konstitutyvi sekrecija nėra tikėtina. Charakterizuotos GT-SM3B hidrolizinis aktyvumas nenustatytas *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyvių viduląstelinių baltymų preparate. Geobacilų konstitutyviai į ekstraląstelinę aplinką produkuotų baltymų preparate GT-SM3B masių spektrometrija taip pat neidentifikuota (nepateikti rezultatai). Nenumačius GT-SM3B geno operoninės organizacijos vėlgi netiesiogiai patvirtinta tikėtina GT-SM3B induktyvi raiška *G. thermoleovorans* DSM 15325.

Kolageno oligopeptidams *G. thermoleovorans* DSM 15325 indukavus GT-SM3B raišką bei sekreciją, ekstraląstelinėje aplinkoje sekretuota oligopeptidazė, veikdama katabolinėje kaskadoje, hidrolizuotų trumpos grandinės kolageno oligopeptidus, susidariusius geobacilų ekstraląstelinėms kolagenolizinėms peptidazėms skaidžius kolageno polipeptidus. GT-SM3B oligopeptidolizinis aktyvumas geobacilų ekstraląstelinėje aplinkoje leistų didinti transportui į *G. thermoleovorans* DSM 15325 citoplazmą tinkamo ilgio kolageno peptidų koncentraciją. Patekę į *G. thermoleovorans* DSM 15325 citoplazmą kolageno oligopeptidai būtų hidrolizuojami viduląstelinių oligopeptidazių, tikėtina, Pz-peptidazių A ir B homologų, funkcionuojančių citoplazmoje geobacilai ribojus minėtų Pz-peptidazių homologų produkciją į ekstraląstelinę aplinką. Galimas GT-SM3B ir viduląstelinių *G. thermoleovorans* DSM 15325 metalo oligopeptidazių substratinio specifiškumo analogiškumas, tipiškas laktokokų bei laktobacilų metalo oligopeptidazėms (193, 195), pagrįstai tikėtinas.

GT-SM3B, funkcionuodama *in vivo*, skatintų kolageno įsisavinimą *G. thermoleovorans* DSM 15325, efektyvindama kolageno katabolinės kaskados etapą tarp kolageno proteolizės ir oligopeptidų skaidymo geobacilos citoplazmoje.

M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio bakterijų oligopeptidazės, užtikrinančios namų ruošos funkcijas, tiesiogiai nesietinos su bakterijų mityba, charakterizuotos (74, 75). GT-SM3B nėra konstitutyvi oligopeptidazė, todėl oligopeptidazės funkcinė svarba namų ruošos funkcijų užtikrinimui mažai tikėtina. Bacilų sekretuojamos metalo oligopeptidazės, PepF_{Ba} iš *B. amyloliquefaciens* 23-7A (79) ir Pz-peptidazė iš *B. licheniformis* N22 (78), manoma, svarbios ląstelių mitybai, tuo tarpu *P. gingivalis* 381 sekretuojama PgPepO oligopeptidazė svarbi patogeno virulentiškumo užtikrinimui (76).

3.3. U32 proteolizinių fermentų šeimai priskirtina *G. thermoleovorans* DSM 15325 peptidazė

U32 proteolizinių fermentų šeimai priskiriamos peptidazės išlieka nenustatyto katalizinio mechanizmo, tik fragmentiškai charakterizuotomis hidrolazėmis. Tirtų U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių, produkuotų patogenų, funkcinė svarba virulentiškumo užtikrinimui tiesiogiai nustatyta, bet pastarųjų peptidazių fiziologinės funkcijos nėra detalios suvoktos. Peptidazių, priskiriamų U32 proteolizinių fermentų šeimai, substratinis specifiškumas nėra tiksliai charakterizuotas, tipišku atveju U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės demonstruoja kolagenolizinį aktyvumą. Tirtų U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių homologų genai *in silico* identifikuoti visų gyvybės domenų organizmų genomuose (1). U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių tyrimo svarba apibrėžta (7), atsižvelgus į tikėtinai savitą hidrolazių katalizinį mechanizmą ir erdvinės struktūros organizaciją bei fiziologinių funkcijų svarbą, netiesiogiai pažymimą išreikšto paplitimo organizmų genomuose. Termofilinių bakterijų koduojamos U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės išlieka netirtos.

Apibrėžta U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių tyrimo svarba bei kartu pastarosios šeimos peptidazių fiziologinės funkcijos, tikėtinai svarbios geobacilų gebėjimo įsisavinti kolageną užtikrinimui, leido pagrįsti

G. thermoleovorans DSM 15325 peptidazės, priskirtos U32 proteolizinių fermentų šeimai, charakterizavimo svarbą. Galimai U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazes koduojantys genai identifikuoti geobacilų, kurių genomai anotuoti, chromosomose. Geobacilos viena už kitos koduoja skirtingų molekulinį masių U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazes. *G. thermoleovorans* DSM 15325 koduojamos ilgosios polipeptidinės grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės (GT-IU32) genas identifikuotas už trumposios polipeptidinės grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazę (GT-TU32) koduojančio geno, taip pat identifikuoto (196) geobacilos chromosomoje.

Pradinį GT-IU32 geno transkripcijos įvertinimą ir pradinį rekombinantinės GT-IU32 charakterizavimą disertacijos autorius atliko rengdamas magistro darbą. GT-IU32 tyrimo strategija plėtotą atsižvelgus į peptidazės pradinio transkripcijos įvertinimo ir pradinio charakterizavimo rezultatus.

3.3.1. GT-IU32 sekos analizė

Nuo chromosomos pagausinus GT-IU32 geno seką, patvirtinta prielaida, suformuluota remiantis *in silico* analize, jog *G. thermoleovorans* DSM 15325, kaip ir geobacilos, kurių genomai anotuoti, chromosomoje koduoja kolagenolizinę peptidazę, homologišką geobacilų ilgosios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazėms. Pagausinimui naudojus pradmenų porą LITCOL-F ir LITCOL-R gautas ~1300 bp ilgio PGR produktas. Sekoskaita nustatyta GT-IU32 geno seka, paskelbta GenBank suteikus Nr. JN628020. GT-IU32 genas – 1269 bp ilgio, koduojantis 422 aminorūgščių ilgio baltymą. GenBank suteiktas baltymo ID AEP39604.1. Apskaičiuota GT-IU32 molekulinė masė – 47,9 Da.

GT-IU32 seka mažiausiai skiriasi nuo galimai kolagenolizinių peptidazių, anotuotų geobacilų genomuose, pastarąsias geobacilų ilgosios 422 aminorūgščių polipeptidinės grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazes *in silico* priskyrus U32 proteolizinių fermentų šeimos *Helicobacter*-tipo kolagenazėms (1). Polipeptidų palyginimas leidžia teigti, jog GT-IU32 yra 99,5 % identiška geobacilų ilgosios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai

peptidazėms (DDBJ BAD76834.1; GenBank ACX77635.1; GenBank ADI25985.1; GenBank ADU94963.1; GenBank AEV20175.1; GenBank AGE23134.1; GenBank ESU70462.1; DDBJ GAD12620.1; DDBJ GAJ58075.1; GenBank KDE47364.1) ir 99,3 % identiška *Geobacillus* sp. A8 ilgosios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazei (GenBank EQB96026.1). GT-IU32 seka nuo tarpusavyje identiškų sekų geobacilų ilgosios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių skyrėsi dviemėmis, o nuo *Geobacillus* sp. A8 ilgosios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazės – trimis aminorūgštimis. Lyginus su geobacilų ilgosios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazėmis GT-IU32 seka labiausiai skiriasi, identiškumas tik 87,5 %, nuo *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621 koduojamos ilgosios grandinės pastarosios šeimos galimai peptidazės (GenBank EZP76253.1).

GT-IU32 sekos identiškumas geobacilų trumposios 309 aminorūgščių polipeptidinės grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazėms, *in silico* priskiriamoms U32 proteolizinių fermentų šeimos yrrN (*Bacillus subtilis*) grupės baltymams (1), svyravo nuo 36,7 % identiškumo *G. stearothermophilus* NUB3621 trumposios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazei (GenBank EZP76254.1) iki 34,1 % identiškumo tarpusavyje homologiškoms trumposios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazėms, koduojamoms *Geobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542 (GenBank KJX69648.1), *Geobacillus thermoglucosidasius* NBRC 107763 (DDBJ GAJ42350.1), *Geobacillus* sp. Y4.1MC1 (GenBank ADP73829.1), *Geobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93 (GenBank AEH47084.1), *Geobacillus thermoglucosidans* TNO-09.020 (GenBank EID45338.1). Išreikštas 36,1 % identiškumas, atsižvelgus į GT-IU32 homologiškumą geobacilų trumposios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazėmis, nustatytas GT-IU32 palyginus su GT-TU32 seka, koduojama *G. thermoleovorans* DSM 15325 (A. Drutel ir N. Kuisienė, nepublikuoti rezultatai).

U32 proteolizinių fermentų šeimos holotipinė bei kartu *Porphyromonas*-tipo kolagenazių tipinė *P. gingivalis* ATCC 53977 charakterizuota (83)

PrtC peptidazė (GenBank AAA25650.1; MEROPS U32.001) ir GT-IU32 yra 32,7 % identiškios (16 pav.). Polipeptidų sekų 32,7 % identiškumas (16 pav.) taip pat nustatytas GT-IU32 lyginus su tipine U32 proteolizinių fermentų šeimos *Helicobacter*-tipo kolagenazių *H. pylori* P149 charakterizuota (96) HP0169 peptidaze (GenBank ACJ07326.1; MEROPS U32.002). U32 proteolizinių fermentų šeimos *Salmonella*-tipo kolagenazių tipinei *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium fagotipas DT104 koduojamai charakterizuotai (103) Clg peptidazei (GenBank AAF42758.1; MEROPS U32.003) GT-IU32 seka identiška 34,5 %. Analogiškas 34,6 % GT-IU32 identiškumas nustatytas U32 proteolizinių fermentų šeimos yrrN (*Bacillus subtilis*) grupės baltymų tipinei *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 genome anotuotai galimai peptidazei yrrN (GenBank AIY94059.1; EMBL CAB14677.1; MEROPS U32.A02). Lyginus su U32 proteolizinių fermentų šeimos tipinėmis peptidazėmis, GT-IU32 seka labiausiai skiriasi, identiškumas atitinkamai tik 25,1 ir 21,1 %, nuo Mername-AA261 galimai peptidazės (*Clostridium beijerinckii*) ir homologų tipinės koduojamos *Clostridium beijerinckii* ATCC 35702 (GenBank AIU03030.1; MEROPS U32.004), *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8058 (GenBank ABR32921.1; MEROPS U32.004) sekos bei YhbV baltymo (*Escherichia coli*) grupės baltymų tipinės *Escherichia coli* K-12 MG1655 koduojamos galimai peptidazės YhbV (GenBank AAA57962.1; MEROPS U32.A01).

Charakterizuotos erdvinės struktūros *M. kandleri* AV19 koduojamos U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazės Mk0906 (GenBank AAM02119.1; MEROPS U32.UPW; PDB 5D88 (113)) sekai GT-IU32 seka identiška 26,7 % (17 pav). *S. mutans* GS-5 ser. c genome tikėtiną operoną sudarančioms U32 proteolizinių fermentų šeimos fragmentiškai *in vitro* charakterizuotoms (109, 98) peptidazėms smcol2 (GenBank AFM81192.1; MEROPS U32.A02) ir smcol1 (GenBank AAT66437.1; MEROPS U32.002) (16 pav.) GT-IU32 seka identiška atitinkamai 24,1 ir 48,8 %. GT-IU32 seka kartu identiškai homologiška *S. mutans* UA159 koduojamoms galimai peptidazėms SMU.759 (GenBank AAN58482.1; MEROPS U32.A02) ir SMU.761 (GenBank AAN58483.1; MEROPS U32.002) (16 pav.), nes pastarųjų baltymų sekos atitinkamai identiškios smcol2 ir smcol1 peptidazių sekoms.

Nustatytas 49 % neviršijantis GT-IU32 sekos identiškumas fragmentiškai charakterizuotų peptidazių, priskirtų U32 proteolizinių fermentų šeimai, sekoms pažymi fermento charakterizavimo naujumą bei aktualumą.

Geobacilų koduojamų U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių sekose, kartu GT-TU32 sekoje (197), signaliniai peptidai nenumatyti. GT-IU32 sekoje signalinis peptidas taip pat nenumatytas. Fragmentiškai charakterizuotų U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių, detektuotų kultūrinio skysčio supernatante (83, 95, 96), signaliniai peptidai *in silico* vėlgi nenumatyti. Konservatyvus U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių motyvas Glu-Xaa-Phe-Xaa-Xaa-Gly- [Ser/Ala] - [Leu/Ile/Val/Met] -Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Cys-[Leu/Ile/Val/Met]-Ser (Glu¹⁷⁹-Ala-Phe¹⁸¹-Ile-His-Gly¹⁸⁴-Ala¹⁸⁵-Met¹⁸⁶-Cys¹⁸⁷-Ser-Ala-Tyr-Ser-Gly¹⁹²-Arg-Cys¹⁹⁴-Val-Leu¹⁹⁶-Ser¹⁹⁷) nustatytas GT-IU32 sekoje *in silico* analize (16 pav.).

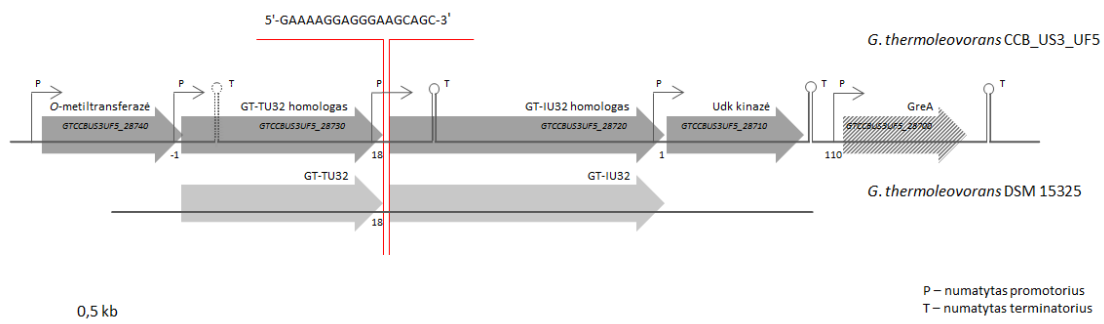
Nustatyta GT-IU32 domeninė organizacija tipiška geobacilų ilgosios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių sekoms (1). GT-IU32 sekoje *in silico* identifikuotas U32 proteolizinių fermentų šeimos domenai, imtinai Gly⁹⁵-...-Phe³²² (16 pav.). Triptofano sintazės α subvieneto fosfato jungimosi konservatyvus domenai, imtinai Pro²⁷-...-His¹³², taip pat tikėtinai identifikuoti GT-IU32 sekoje (16 pav.). U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių sekose tipišku atveju tikėtinai nustatomas TIM β/α -statinės sanklodos fosfato jungimosi konservatyvus domenai (1).

Bakterijų genomuose anotavus daugiau nei vieną U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazę koduojantį geną, tipišku atveju anotuoti genai *in silico* priskiriami vienam operonui. U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių SMU.759 ir SMU.761, koduojamų *S. mutans* UA159 genome, tirtų genų operoninė organizacija numatyta (141). *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 ir *Y. ruckeri* 150 tirti U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių genai, *in silico* taip pat priskiriami operonams, atitinkamai, *yrrMNOudk* ir *yrrAB* operonams (141, 142, 110). Geobacilų, kurių genomai anotuoti, koduojamų trumpųjų ir ilgųjų grandinių U32 proteolizinių fermentų šeimos

galimai peptidazių genai *in silico* priskiriami operonams, sandara identiškais *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 genome numatytam *yrrMNOudk* operonui.

G. thermoleovorans DSM 15325 genomą nėra nuskaitytas, todėl tikėtinas GT-IU32 geno priskyrimas operonui *in silico* analizuotas įvertinus *G. thermoleovorans* CCB_US3_UF5 anototame (GenBank CP003125.1) genome koduojamo GT-IU32 homologo geno operoninę organizaciją.

G. thermoleovorans CCB_US3_UF5 genai *GTCCBUS3UF5_28730* ir *GTCCBUS3UF5_28720*, atitinkamai koduojantys GT-TU32 ir GT-IU32 homologus, sudaro tikėtiną operoną su *GTCCBUS3UF5_28740* bei *GTCCBUS3UF5_28710* (18 pav.), koduojančiais atitinkamai kafeoil-KoA *O*-metiltransferazę bei uridino kinazę Udk. Transkripcijos veiksnį GreA koduojančio *GTCCBUS3UF5_28700* geno *in silico* priskyrimas numatytam



18 pav. U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių genų, koduojamų *Geobacillus thermoleovorans* CCB_US3_UF5 ir *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325 chromosomose, genominės bei operoninės organizacijų palyginimas.

operonui galimas, bet mažai tikėtinas. Numatyta *G. thermoleovorans* CCB_US3_UF5 operone GT-IU32 homologo genas koduojamas (18 pav.) už GT-TU32 homologo geno – geobacilų genomams tipiška trumposios ir ilgosios polipeptidinės grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių genų genominė organizacija taip pat identifikuota *G. thermoleovorans* DSM 15325 chromosomoje (197).

Operono genų promotoriai numatyti, tuo tarpu policistroninės iRNR sintezė gali būti nuo ρ veiksnio nepriklausomu būdu terminuojama už GT-TU32 homologo geno ir/ar už numatyto operono genų (18 pav.). Terminatorius už kafeoil-KoA *O*-metiltransferazės geno numatytas, bet mažiau patikimai.

Terminatoriaus seka nenumatyta už GT-IU32 homologo geno. Numačius tikėtino *G. thermoleovorans* CCB_US3_UF5 operono genų koordinuoto transkripcijos valdymo pobūdį, galima teigti, jog GT-IU32 homologo bei uridino kinazės Udk genų transkripcija negali būti atsietai valdoma.

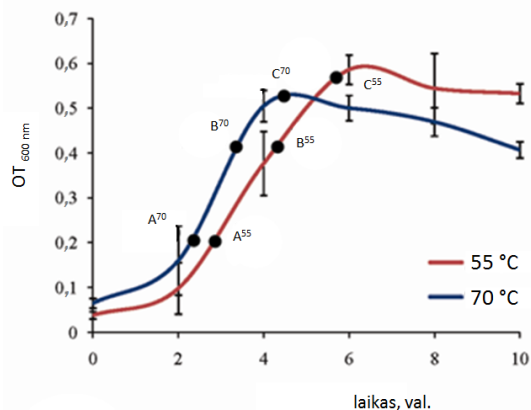
G. thermoleovorans CCB_US3_UF5 nuskaitytame genome anotuoto GT-IU32 homologo geno *in silico* nustatyta genomine ir operonine organizacija identiška numatytai geobacilų, kurių genomai anotuoti, GT-IU32 homologų genų genominei ir operoninei organizacijai (141, 142). GT-IU32 homologo iš *G. thermoleovorans* CCB_US3_UF5 genui numatytas analogiškas GT-IU32 homologo genui iš *G. kaustophilus* HTA426 transkripcijos valdymas (197). *G. thermoleovorans* DSM 15325 chromosomoje identifikuotas GT-TU32 ir GT-IU32 genų eiliškumas bei genus skiriančios sekos ilgis (A. Drutel ir N. Kuisienė, nepublikuoti rezultatai) identiški pastarųjų genų homologų eiliškumui bei skiriančios sekos ilgiui, nustatytiems geobacilų anotuotuose genomuose (18 pav.), todėl *G. thermoleovorans* DSM 15325 chromosomoje tikėtina GT-IU32 geno genomine ir operonine organizacija identiška nustatytiems anotavus nuskaitytus geobacilų genomus. GT-IU32 geno transkripcijos valdymas, neatsietas nuo bent uridino kinazę Udk koduojančio geno transkripcijos valdymo, analogiškas *in silico* numatytam GT-IU32 homologo geno iš *G. thermoleovorans* CCB_US3_UF5 ir *G. kaustophilus* HTA426 transkripcijos valdymui, išlieka pagrįstai tikėtina.

Nustatytas GT-IU32 sekos homologiškumas kolagenoliziniams peptidazėms, priskiriamoms U32 proteolizinių fermentų šeimai, ir kartu GT-IU32 sekoje identifikuotas konservatyvus U32 proteolizinių fermentų šeimos motyvas bei GT-IU32 sekos domeninė organizacija, leidžia GT-IU32 priskirti U32 proteolizinių fermentų šeimai, apjungiančiai nenustatyto katalizinio mechanizmo fragmentiškai charakterizuotas peptidazes, pasižyminčias kolagenoliziniu specifiškumu (1).

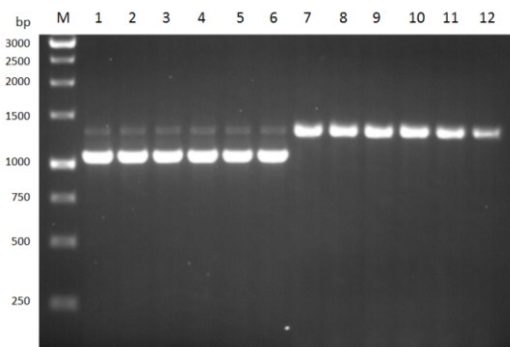
3.3.2. GT-IU32 geno transkripcija *G. thermoleovorans* DSM 15325

GT-IU32 geno transkripcija, palaikius 60 °C, nuo induktorių nepriklausė, tuo tarpu peptidazės geno transkripcijos priklausomybė nuo *G. thermoleovorans* DSM 15325 kultūros augimo fazės nustatyta palaikius optimalią nuosaikais termofilo augimui 60 °C temperatūrą (169). Suminės RNR preparatų išskyrimui *G. thermoleovorans* DSM 15325 kultivuotas mM9 terpėje be oligopeptidų ir/ar baltymų – tipišku peptidazių raiškos induktorių (112). GT-IU32 geno sekos transkriptas nustatytas geobacilų suminės RNR preparatuose, išskirtuose iš eksponentinės augimo fazės kultūros. *G. thermoleovorans* DSM 15325 žūties fazės kultūros ląstelėse GT-IU32 geno transkriptas nenustatytas, tačiau nustačius imtinai nuo 133 nt GT-IU32 geno transkripto fragmentą, žūties fazės geobacilų ląstelėse nustatyta GT-IU32 geno transkripto degradacija nuo 5'-galo. Pradinį GT-IU32 geno transkripcijos *G. thermoleovorans* DSM 15325 įvertinimą disertacijos autorius atliko rengdamas magistro darbą.

Temperatūros įtakos GT-IU32 geno transkripcijai įvertinimas atliktas tyrimo schema, taikyta vykdžius pradinį GT-IU32 geno transkripcijos įvertinimą. GT-IU32 genas geobacilų kultūros žūties fazės metu nėra transkribuojamas,



19 pav. Suminės RNR preparatų išskyrimui pasirinkti *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325 kultūros augimo momentai, geobacilas kultivuojant mM9 terpėje, palaikant 55 °C ar 70 °C.



20 pav. GT-IU32 geno transkripto detekcija suminiuose RNR preparatuose. 1-6: AT-PGR produktai, gauti GEOCOL pradmenų pora, matrica naudojusi išskirtų suminių RNR preparatų, atitinkamai A⁵⁵-C⁷⁰, kDNR; 7-12: AT-PGR produktai, gauti LITCOL pradmenų pora, matrica naudojusi išskirtų suminių RNR preparatų, atitinkamai A⁵⁵-C⁷⁰, kDNR.

todėl GT-IU32 geno transkripcija vertinta *G. thermoleovorans* DSM 15325, išskyrus suminės RNR preparatus iš eksponentinės augimo fazės ląstelių (19 pav.), kultivuotų mM9 terpėje palaikius termofilo augimui žemiausią 55 °C ir aukščiausią 70 °C temperatūrą (169). Išskirtų RNR preparatų stabilumas įvertintas analizavus preparatų 16S bei 23S rRNR integralumą – preparatų degradacija nenustatyta. AT-PGR naudojus GEOCOL ir LITCOL pradmenų poras, matrica naudojus atvirkštinės transkripcijos reakcijų metu didele išeiga paruoštus kDNR preparatus, GT-IU32 geno transkriptas detektuotas visuose preparatuose (20 pav.). Suminės RNR preparatai išskirti kamieną kultivavus mM9 terpėje, negalinčioje sąlygoti GT-IU32 geno transkripcijos indukcijos. Analizės rezultatai leidžia teigti, jog eksponentinės augimo fazės metu *G. thermoleovorans* DSM 15325, palaikius termofilo augimui žemiausią ir aukščiausią augimo temperatūrą, transkribuoja GT-IU32 geną konstitutyviai.

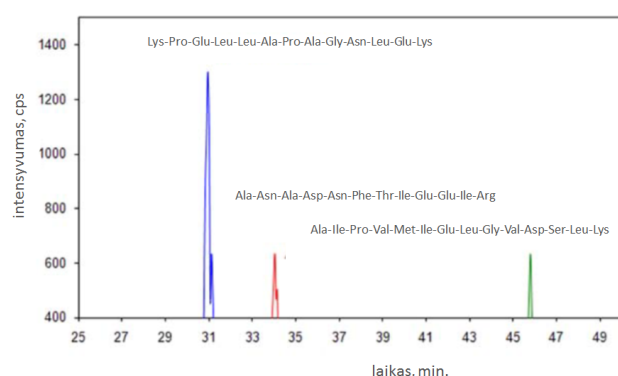
Charakterizuota GT-IU32 geno transkripcija *G. thermoleovorans* DSM 15325 analogiška GT-TU32 geno transkripcijos pobūdžiui (196, 197). Nepriklausoma GT-IU32 geno transkripcija nėra tikėtina – *G. thermoleovorans* DSM 15325 eksponentinės augimo fazės ląstelėse nustatyta vėlgi konstitutyvi bei nuo geobacilų kultivavimo temperatūros nepriklausoma bicistroninės iRNR, koduojančios GT-TU32 ir GT-IU32, transkripcija (197), patvirtinusi *in silico* numatytą koordinuotą pastarųjų baltymų operoninės organizacijos genų transkripcijos valdymą.

U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių genų transkripcija bei kartu pastarosios šeimos peptidazių genų transkripcijos valdymas tirti fragmentiškai. *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium fagotipas DT104 koduojamas Clg peptidazės genas transkribuojamas induktyviai (105). *Methanococcoides burtoni* DSM 6242 ir *Methanobrevibacter smithii* R15 kultivavimas palaikius žemesnę nei augimui optimali temperatūrą pastarųjų psichrofilinių archėjų U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių atitinkamai Mbur_1527 ir Mpsy_2191 genų transkripcijos intensyvumui neturėjo įtakos (198, 199). *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 koduojamų U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių yrrN ir yrrO, priskirtų *in silico* numatytam *yrrMNOudk* operonui, transkripciją slopina taip pat ir bacilų kultivavimas palaikius žemą temperatūrą (117). Patvirtinus numatytą *Y. ruckeri* 150 genų,

koduojančių U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazes YrpA ir YrpB, operoninę organizaciją (5 pav.) nustatyta, jog U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių genų sudaryto *yrpAB* operono transkripciją indukuoja taip pat ir enterobakterijų kultivavimo terpės papildymas baltymais (110).

3.3.3. Viduląstelinė GT-IU32 raiška *G. thermoleovorans* DSM 15325

Natyvi GT-IU32 identifikuota *G. thermoleovorans* DSM 15325 viduląstelių baltymų preparate masių spektrometrija. Natyvios peptidazės detekcija vykdyta linijinės jonų gaudyklės žvalgos masių spektrometrija bei masių spektrometrija daugybinės reakcijos sulyginimo stebėsenos (MRM) metodu, pasitelkus QTRAP 4000 masių spektrometro trigubą kvadrupolį. *G. thermoleovorans* DSM 15325 lizato baltymų iš analizuoto molekulinio masių intervalo detekcija jonų gaudyklės žvalgos masių spektrometrija patikimai identifikuota skaitlinga baltymų įvairovė



21 pav. GT-IU32 aptikimas masių spektrometrija *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325 lizato baltymų frakcijoje. Natyvios GT-IU32 oligopeptidų elucijos užlaikymo trukmės detektuotos MRM metodu pagal 690,4/728,4, 698,4/760,4 ir 742,9/1104,6 jonų m/z tranzicijas.

detektuoti oligopeptidai: Lys-Pro-Glu-Leu-Leu-Ala-Pro-Ala-Gly-Asn-Leu-Glu-Lys (Mascot įvertis 32, $p=0,01$), Ala-Asn-Ala-Asp-Asn-Phe-Thr-Ile-Glu-Glu-Ile-Arg (Mascot įvertis 31, $p=0,01$) ir Ala-Ile-Pro-Val-Met-Ile-Glu-Leu-Gly-Val-Asp-Ser-Leu-Lys (Mascot įvertis 35, $p=0,01$) patikimai GT-IU32 identifikuojantys *G. thermoleovorans* DSM 15325 citoplazmoje (21 pav.). Geobacilų viduląstelių baltymų preparate masių spektrometrija detektuota akivaizdžiai maža natyvios GT-IU32 koncentracija. Konstitutyvios GT-IU32 raiškos *G. thermoleovorans* DSM 15325

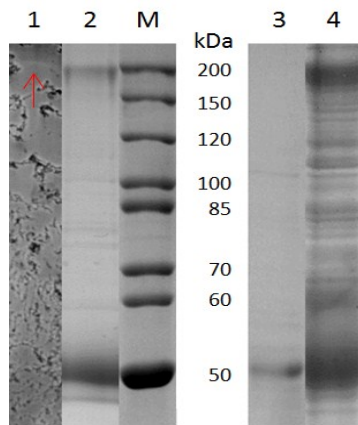
(nepateikti rezultatai), bet natyvios GT-IU32 aptikti nepavyko. Jautresnis tiesioginės detekcijos MRM metodas (200) naudojus referentinius oligopeptidus, gautus rekombinantinę GT-IU32 proteolizavus tripsinu, tikslingai pritaikytas natyvios GT-IU32 aptikimui geobacilų lizato baltymų frakcijoje. Sulyginimui naudojus aštuoniolikos referentinių oligopeptidų rinkinį

eksponentinės augimo fazės metu, kamieną kultivavus mM9 terpėje, palaikius optimalią augimui 60 °C temperatūrą (169), nustatymas masių spektrometrija patvirtino GT-IU32 geno transkripcijos įvertinimo rezultatus. Masių spektrometrija linijinės jonų gaudyklės žvalgos ir MRS metodais koncentruotame *G. thermoleovorans* DSM 15325 ekstraląstelinių baltymų preparate, išskirtame geobacilas kultivavus identiška lizato baltymų preparato išskyrimui, natyvi GT-IU32 neaptikta (nepateikti rezultatai) – *in silico* nenumatyta peptidazės sekrecija nenustatyta. *G. thermoleovorans* DSM 15325 intensyviai augus neintensyvi GT-IU32 raiška citoplazmoje bei nenustatyta peptidazės sekrecija netiesiogiai pažymi taip pat ir specifines pastarosios hidrolazės funkcijas, tikėtina, nesietinas su ląstelės mityba.

U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių kokybinė ir/ar kiekybinė detekcija proteomuose nėra tikslingai vykdyta. Galimai peptidazių, *in silico* priskiriamų U32 proteolizinių fermentų šeimai, lokalizacija ir/ar ląstelės fiziologijos įtaka pastarųjų peptidazių raiškai masių spektrometrija anksčiau nebuvo tirta. Visgi U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazės identifikuotos analizavus prokariotų proteomus bei analizavus prokariotų proteomų adaptyvumą. GT-IU32 homologas patikimai identifikuotas *Geobacillus thermoleovorans* T80 eksponentinės augimo fazės proteome vykdžius geobacilos citoplazminės frakcijos tirpių baltymų identifikavimą (201). U32 proteolizinių fermentų šeimos *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 koduojamos yrrN ir yrrO galimai peptidazės identifikuotos bacilos citoplazmoje netiesiogiai nustačius mažą yrrN ir yrrO koncentraciją (202). Bacilų proteomuose yrrN ir yrrO homologai masių spektrometrija taip pat identifikuoti citoplazmoje netiesiogiai nustačius mažą yrrN ir yrrO homologų koncentraciją (203, 204). *Bacillus licheniformis* DSM 13 nustatyta konstitutyvi yrrN ir yrrO homologų raiška (204). U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazė Mbur_1527 patikimai identifikuota psichrofilinės archėjos *M. burtoni* DSM 6242 proteome (205). *Acholeplasma laidlawii* PG8 koduojama ACL_0345 galimai peptidazė, *in silico* priskirta U32 proteolizinių fermentų šeimai, netiesiogiai nustačius induktyvią raišką, identifikuota bakterijos proteome (206).

3.3.4. GT-IU32 oligomerizacija

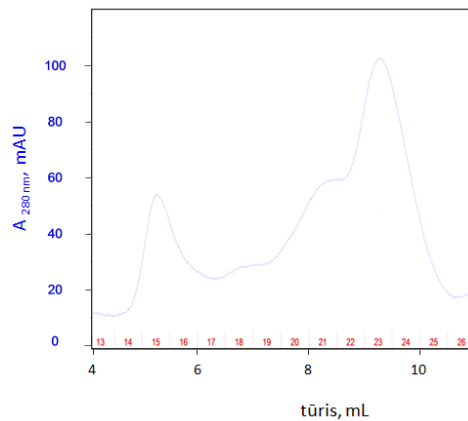
GT-IU32 raiškos *E. coli* BL21 (DE3) įvertinimas NDS-PAGE kartu leido detektuoti rekombinantinės peptidazės tikėtina homotetramerą (22 pav.). Grynos rekombinantinės GT-IU32 preparato gelfiltracija peptidazės gebėjimą oligomerizuotis *in vitro* patvirtino. GT-IU32 monomerai detektuoti frakcijose tarp 44-75 kDa, kas atitiko apskaičiuotą rekombinantinės peptidazės molekulinę masę – 51,5 kDa, jungėsi suformuodami homodimerą, detektuotą frakcijose tarp 75-158 kDa (23 pav.). GT-IU32 preparato gelfiltracija patikimai patikslinti fermento homooligomero pradinio molekulinės masės nustatymo NDS-PAGE rezultatai ir paneigta GT-IU32 homotetramerizacija. Peptidazės monomerų susijungimas į trimerą mažai tikėtinas – trimerinės U32 proteolizinių fermentų



22 pav. Rekombinantinės GT-IU32 preparato grynumo, homooligomerizacijos bei peptidazės oligomerinių būvių kolagenolizinio aktyvumo įvertinimas. 1: GT-IU32 iš dalies denatūruoto I tipo kolageno zimografija neredukuojančiomis sąlygomis; 2: GT-IU32 preparato baltymų elektroforezinis profilis neredukuojančiomis sąlygomis; M: PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific); 3: GT-IU32 preparato baltymų elektroforezinis profilis redukavus 2-ME; 4: GT-IU32 raiškos *E. coli* BL21 (DE3) įvertinimas NDS-PAGE neredukuojančiomis sąlygomis.

šėimos peptidazės nėra žinomos. Raiškos kamieno lizate tirpi rekombinantinė GT-IU32 gelfiltracijos buferyje agregavo, nustatyta agregato molekulinė masė virš 440 kDa (23 pav.). Gelfiltracija GT-IU32 agregatas charakterizuotas stabiliu oligomeriniu būviu. Santykinių GT-IU32 monomero ir homodimero koncentracijų priklausomybė *in vitro* demonstravo nusistovinę dinaminę pusiausvyrą, kurioje vyrauja monomeras. GT-IU32 monomero vyravimas, lyginus su dimero koncentracija, akivaizdus NDS-PAGE (22 pav.). Nustatyta homooligomerizacijos dinaminė pusiausvyra riboja GT-IU32 agregavimo gelfiltracijos buferyje charakterizavimą. Visgi mažai tikėtina, jog agreguotų tik išskirtinai GT-IU32 dimeras arba monomeras (207).

Rekombinantinės GT-IU32 monomerų tarpusavio sąveika homodimero molekulėje nebuvo suardyta denatūruojančiomis sąlygomis – vykdžius NDS-PAGE, tuo tarpu NDS-PAGE naudojus mėginio buferį su 20 mM 2-ME rekombinantinės GT-IU32 homodimeras nedetektuotas (22 pav.). GT-IU32 sekoje sutinkamos aštuonios Cys (Cys¹⁰⁹, Cys¹⁸⁷, Cys¹⁹⁴, Cys²¹⁰, Cys²¹¹, Cys²¹⁴, Cys²⁹⁰, Cys³⁰⁹) liekanos (16 pav.). Geobacilų koduojamų ilgųjų grandinių U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių sekose Cys¹⁸⁷, Cys¹⁹⁴, Cys²¹⁰, Cys²¹¹, Cys²¹⁴, Cys²⁹⁰, Cys³⁰⁹ konservatyvūs identiška GT-IU32 sekai. Atsižvelgus į NDS-PAGE nustatytą GT-IU32 homodimerizacijos ribojimą 2-ME bei GT-IU32 sekos atspindimą peptidazės polinkį potencialiai sudaryti disulfidinius tiltelius, gelfiltracija analizuota reduktorių įtaka GT-IU32 oligomerizacijai.



23 pav. GT-IU32 oligomerinių būvių molekulinės masės nustatymas analizine gelfiltracija neredukuojančiomis sąlygomis. Eliucijos tūriai, atsižvelgus į kolonėlės kalibravimą, apytiksliai iki 6 mL – virš 440 kDa, 7-8,5 mL – 75-158 kDa, 8,5-9,5 mL – 44-75 kDa.

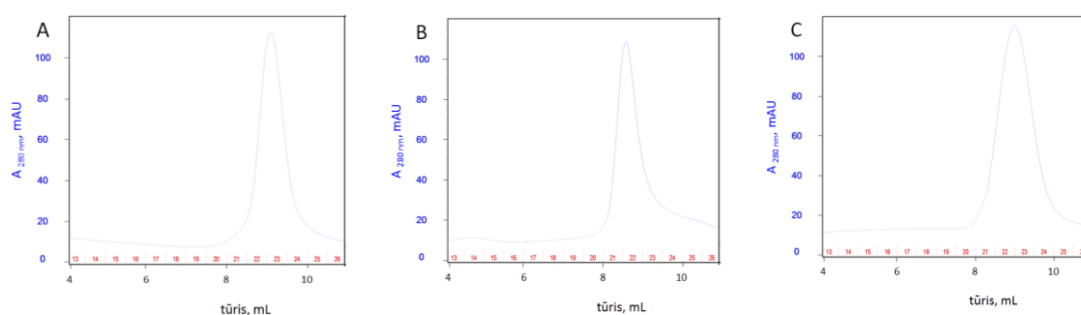
Rekombinantinės U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės smc011 homodimerizacija nustatyta želatinos zimografiją vykdžius neredukuojančiomis sąlygomis (98). Analizine gelfiltracija nustatyta U32 proteolizinių fermentų šeimos holotipinės PrtC peptidazės dimerizacija, tačiau kokio tipo jungtimis rekombinantiniai monomerai jungėsi suformuodami PrtC homodimerą nebuvo tirta (83). Rekombinantinė U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazė Mk0906 gryninta gelfiltracija, redukavus 2 mM DTT koncentracija (113). Rekombinantinės SA1440 galimai peptidazės iš *S. aureus* 113, priskiriamos U32 proteolizinių fermentų šeimai, homodimerizacija druskų tilteliais nustatyta gelfiltracija (S. Trillo-Muyo, nepublikuoti rezultatai). Siekiant įvertinti joninės jėgos įtaką GT-IU32 oligomerizacijai, rekombinantinės peptidazės preparatas veiktas 0,5 M NaCl.

Reduktoriai *in vitro* riboja GT-IU32 oligomerizaciją. Rekombinantinį fermentą redukavus 5 mM DTT (24A pav.), 10 mM 2-ME (24B pav.) ar 1 mM TCEP (24C pav.) peptidazės homodimeras ir agregatas gelfiltracija nenustatyti. Rekombinantinį

fermentą silpniau redukavus 1 mM DTT koncentracija, nustatytas peptidazės homooligomerizacijos dinaminės pusiausvyros poslinkis monomero koncentracijos didėjimo kryptimi, tačiau visiškai taikyta DTT koncentracija GT-IU32 homodimerizacijos ir agregacijos neribojo. Stipri joninė jėga nekeitė peptidazės homooligomerizacijos dinaminės pusiausvyros (nepateikti rezultatai).

GT-IU32 charakterizavimo metu redukavus, ribojus peptidazės homooligomerizaciją, tirpus monomerinis rekombinantinės peptidazės būvis efektyviai stabilizuotas. Rekombinantinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazės SA1441 ir SA1440 iš *S. aureus* 113 buvo linkusios agreguoti, išlikdamos tirpios tik redukuojančiomis sąlygomis (S. Trillo-Muyo, nepublikuoti rezultatai). Rekombinantinė smc11 peptidazė buvo netirpi raiškos kamieno citoplazmoje (98). Linkusios agreguoti rekombinantinės GT-TU32 oligomerizaciją analizavus NDS-PAGE detektuotas tik monomerinis galimai peptidazės oligomerinis būvis (196, 197).

Daugelis U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių – monomeriniai baltymai (107, 109), tačiau U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės, gebančios oligomerizuotis suformuodamos homodimerą, taip pat fragmentiškai charakterizuotos (83, 98). Vienintelė charakterizuotos erdvinės struktūros



24 pav. Redukcijos A: 5 mM DTT; B: 10 mM 2-ME; C: 1 mM TCEP įtaka GT-IU32 oligomerizacijai, nustatant oligomerinių būvių molekulinės masės analize gelfiltracija. Eliucijos tūriai, atsižvelgus į kolonėlės kalibravimą, apytiksliai iki 6 mL – virš 440 kDa, 7-8,5 mL – 75-158 kDa, 8,5-9,5 mL – 44-75 kDa.

U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazė Mk0906 kristalinosi suformavusi homodimerą, monomerams tarpiai dideliu paviršiaus plotu susijungus Zn^{2+} katijono koordinavimu bei hidrofobinėmis ir vandenilinėmis jungtimis (6 pav.) (113). Charakterizuotas *in vitro* rekombinantinės GT-IU32

monomerų susijugimas į homodimerą, tikėtinai disulfidiniais tilteliais, taip pat netiesiogiai nustatytas vertinus smc011 peptidazės substratinį specifiškumą (98). Rekombinantinės GT-IU32 monomeras – *in vitro* vyraujantis peptidazės būvis, visgi GT-IU32 homodimeras – tikėtinai natyvus fermento oligomerinis būvis, *in vivo* užtikrinantis fiziologines funkcijas *G. thermoleovorans* DSM 15325.

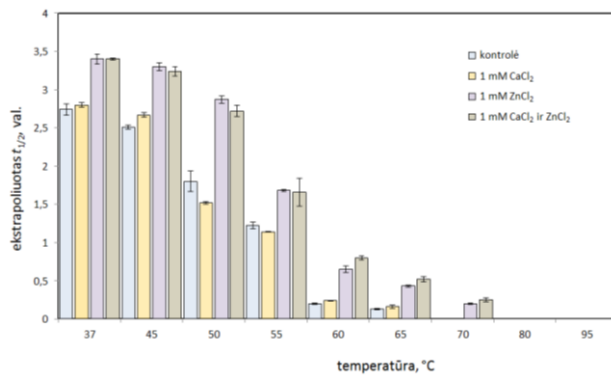
3.3.5. Kalcio ir cinko jonų įtaka GT-IU32 termostabilumui

Peptidazių, priskiriamų U32 proteolizinių fermentų šeimai, katalizinio aktyvumo mechanizmas nenustatytas (5), tačiau EDTA inaktyvavo *in vitro* fragmentiškai charakterizuotas U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazes (83, 94, 98). Kalcio ir cinko katijonų įtaka U32 proteolizinių fermentų šeimos holotipinės PrtC peptidazės kataliziniam aktyvumui tirta (83), tuo tarpu charakterizuotų U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių termostabilumas ar galima minėtų metalų katijonų įtaka peptidazių termostabilumui išlieka netirta.

GT-IU32 termostabilumo įvertinimo rezultatai (25 pav.) parodė, jog *in vitro* rekombinantinės peptidazės monomeras stabilus palaikius žemesnę nei 55 °C temperatūrą. GT-IU32 termostabilumas tolydžio mažėjo 37-55 °C (25 pav.), veikus pastarąja temperatūra ekstrapoliuotas fermento $t_{1/2}$ – virš 1,2 val. Kalcio katijonas neturėjo įtakos peptidazės termostabilumui. Analizavus termostabilumą, GT-IU32 preparatą papildžius taikyta 1 mM Ca^{2+} koncentracija, $t_{1/2}$ buvo beveik identiški nustatytiems kontrolinėmis sąlygomis (25 pav.). Ekstrapoliuotas rekombinantinio GT-IU32 monomero $t_{1/2}$, veikus 55 °C bei 1 mM Ca^{2+} – virš 1,1 val. Cinko jonas reikšmingai didino GT-IU32 monomero termostabilumą (25 pav.). Charakterizuoto fermento monomero termostabilumo mažėjimas 37-55 °C, veikus 1 mM Zn^{2+} , išliko tolydžiu, bet neišreikštu. Visgi, veikus cinko jonu, GT-IU32 prarado, kaip ir kontrolinėmis sąlygomis, termostabilumą virš 55 °C (25 pav.). Nustatytas GT-IU32 $t_{1/2}$, fermentą palaikius 55 °C, veikus 1 mM Zn^{2+} , apytiksliai 1,7 val. Galimas sinergistinis efektas, didinantis GT-IU32 termostabilumą, rekombinantinės peptidazės monomerą veikus 1 mM Ca^{2+} ir Zn^{2+} koncentracijomis, nenustatytas.

Kalcio ir cinko katijonais veikus GT-IU32, nustatytas $t_{1/2}$ analogiškas nustatytiems $t_{1/2}$ peptidazę veikus tik 1 mM Zn^{2+} (25 pav.).

Cinko katijono svarba U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių erdvinės struktūros organizacijai patvirtinta išsprendus galimai peptidazės Mk0906 homodimero erdvinę struktūrą. Mk0906 monomerų sąsajos tipo sąveika su cinko katijonu bei hidrofobinės ir vandenilinės jungtys užtikrina monomerų tarpusavio sąveiką dimero molekulėje (113). Homodimeras – taip



25 pav. Kalcio ir cinko jonų įtaka GT-IU32 monomero termostabilumui.

pat tikėtinai natyvus GT-IU32 oligomerinis būvis, tačiau GT-IU32 monomerų sąsajos tipo sąveika su cinko katijonu nėra tikėtina – GT-IU32 polipeptido sekoje *in silico* nenustatyti jungimosi motyvai, užtikrinantys sąveiką su metalo katijonu, taip pat ir

archėjinės Mk0906 galimai peptidazės sekos motyvai, kurių cisteino ir histidino liekanos funkcionuoja Zn^{2+} ligandais. Mk0906 homodimero monomerų simetriškas Zn^{2+} jono koordinavimas konservatyviais Cys⁶⁸ ir His¹⁸⁹ (7 pav.) nesietinas su katijono svarba kataliziniam aktyvumui (113). Cinko jono įtaka, didinanti rekombinantinės GT-IU32 monomero termostabilumą, įvertinta peptidazės oligomerizaciją visiškai ribojančiomis sąlygomis, sietina su erdvinės peptidazės monomero struktūros stabilizavimu dėka monomero sąveikos su katijonu, bet taip pat nesietina su Zn^{2+} svarba kataliziniam GT-IU32 aktyvumui. Žinoma ribota įvairovė (68) jungimosi motyvų, kurių nei vienas nustatytas GT-IU32 sekoje, užtikrinančių fermento molekulės katalizinio tipo sąveiką su cinko katijonu, tuo tarpu struktūrinio tipo GT-IU32 monomero sąveika su cinko jonu, koordinuojamu nenustatytos sekos jungimosi motyvo/-ų ligandais funkcionuojančių aminorūgščių liekanų, išlieka tikėtina. Skirtingų funkcijų baltymams būdingas molekulės erdvinės struktūros stabilumo ir/ar termostabilumo užtikrinimas struktūrinio tipo sąveika su cinko katijonu (208, 209).

GT-IU32 genas transkribuojamas *G. thermoleovorans* DSM 15325 augus 55-70 °C, tačiau *in vitro* nustatytas sąlyginai mažas rekombinantinės peptidazės monomero termostabilumas, taip pat ir veikus taikyta cinko jono koncentracija. Didesnis nei monomero GT-IU32 homodimero – tikėtina natyvaus peptidazės būvio, termostabilumas, dėka monomerų tarpusavio sąveikos ir monomerų struktūrinio tipo sąveikos su cinko katijonais, paaiškintų fermento stabilumą bei kartu funkcionalumą *G. thermoleovorans* DSM 15325 fiziologinėmis sąlygomis.

3.3.6. GT-IU32 aktyvumas bei substratinis specifiškumas

Rekombinantinės GT-IU32 aktyvumą įvertinus zimografija nustatyta, jog peptidazė katalizuoja iš dalies denatūruoto I tipo kolageno iš žiurkės uodegos peptidolizę tuo atveju, jei zimografija vykdyta neredukuojančiomis sąlygomis. Zimografiją atlikus neredukuojančiomis sąlygomis – neribojus GT-IU32 oligomerizacijos, kolagenolizinio aktyvumo zona zimogramose stebėta virš 100 kDa, kas atitiko GT-IU32 homodimero molekulinę masę. GT-IU32 monomero kolagenolizinis aktyvumas nenustatytas. Rekombinantinė kolagenolizinė peptidazė neskaidė želatinos, o taip pat iš dalies denatūruotų albumino, kazeino, elastino, keratino. Disertacijos autorius rekombinantinės GT-IU32 aktyvumo bei substratinio specifiškumo pradinį įvertinimą atliko rengdamas magistro darbą.

Plėtojus GT-IU32 tyrimą, peptidazės homodimero kolagenolizinis aktyvumas zimografija detektuotas kokybiškai įvertinus aktyvumo intensyvumą (22 pav.). Masių spektrometrija analizavus zimogramos kolagenolizinio aktyvumo zoną, patvirtintas GT-IU32 kolagenolizinis aktyvumas (nepateikti rezultatai). GT-IU32 aktyvumo detekcija zimografija, atsižvelgus į rekombinantinės peptidazės monomero termostabilumą, vykdyta zimogramų gelius inkubavus 20 val., palaikius 50 °C temperatūrą. I tipo kolageno iš žiurkės uodegos homogenizavimas acto rūgštimi bei substrato *in vitro* inkubavimas 50 °C lėmė oligopeptidų susidarymą, ribojusį GT-IU32 aktyvumo kiekybinį įvertinimą, tačiau kokybiškai peptidazės aktyvumas bei aktyvumo intensyvumas *in vitro* patikimai įvertinti zimografija.

Nustatytas išreikštas GT-IU32 aktyvumo substratinis specifiskumas substrato aminorūgščių grandinės sekai bei erdvinei struktūrai būdingas U32 proteolizinių fermentų šeimos *Porphyromonas*-tipo kolagenazėms (84, 83, 85, 86, 94), taip pat tikėtinas nedetalizuoto substratinio specifiskumo U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazėms. GT-IU32 homodimeras hidrolizavo iš dalies denatūruotą I tipo kolageną iš žiurkės uodegos, bet neskaidė iš dalies denatūruoto I tipo kolageno iš jaučio odos (197), kas vėlgi atspindi išreikštą peptidazės substratinį specifiskumą.

Charakterizuotas rekombinantinės GT-IU32 substratinis specifiskumas analogiškas PrtC, HP0169 ir smc011 peptidazių kolagenolizinio aktyvumo specifiskumui. Holotipinė U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazė PrtC iš *P. gingivalis* ATCC 53977 peptidolizuoja taip pat ir temperatūra denatūruotą I tipo kolageną, bet nehidrolizuoja želatinos (83). HP0169 peptidazė peptidolizuoja homogenizuotą I tipo kolageną iš jaučio odos (96). Fragmentiškai charakterizuota smc011 peptidazė taip pat proteolizuoja I tipo kolageną iš jaučio odos ir hidrolizuoja želatiną (98). Rekombinantinė GT-IU32 nehidrolizuoja nedenaatūruoto I tipo kolageno – kolagenolizinė peptidazė nehidrolizavo azokolio reakcijas inkubavus 20 val., palaikius 30 ar 50 °C (nepateikti rezultatai). U32 proteolizinių fermentų šeimos *Porphyromonas*, *Helicobacter* ir *Salmonella* tipų kolagenazės iš mezofilų nedenaatūruotą I tipo kolageną proteolizuoja (83, 96, 109).

Fragmentiškai *in vitro* charakterizuotos U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės – vangios hidrolazės. Rekombinantinių U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių katalizinis aktyvumas *in vitro* reikšmingai kokybiškai ir/ar kiekybiškai patikimai detektuotas taikius ilgus reakcijų inkubavimus (83, 85, 96, 98, 109). GT-IU32 kolagenolizinis aktyvumas taip pat vangus – patikimai kokybiškai detektuotas zimogramose zimogramų gelius inkubavus bent 20 val., palaikius 50 °C temperatūrą. Visgi dalies U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių aktyvumas *in vitro*, taikius ilgus reakcijų inkubavimus, nedetektuotas. Rekombinantinės galimai peptidazės GT-TU32 aktyvumas želatinos ir I tipo kolageno iš jaučio odos zimografija nedetektuotas

zimogramų gelius inkubavus 18 val., palaikius 37 ar 60 °C (196, 197). Rekombinantinė galimai peptidazė Mk0906 neredukuojančiomis sąlygomis, taikius įvairius reakcijų parametrus, neskaidė I tipo kolageno iš žiurkės uodegos, reakcijas inkubavus taip pat ir 16 val., palaikius 37 °C, bei kazeino reakcijas inkubavus 4 val., palaikius 37 °C (113).

Katalizinio aktyvumo bei substratinio specifiškumo charakteristikos, būdingos GT-IU32, analogiškos nustatytoms U32 proteolizinių fermentų šeimos fragmentiškai *in vitro* charakterizuotoms peptidazėms. GT-IU32 homodimero kolagenolizinis aktyvumas, nenustačius peptidazės monomero katalizinio aktyvumo, tikėtina patvirtina homodimerizacijos svarbą peptidazės funkcionalumui *in vivo* bei leidžia teigti, jog GT-IU32 homodimeras – tikėtina natyvus peptidazės oligomerinis būvis. U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių PrtC ir smc11 kataliziškai aktyvūs taip pat tik homodimerai, todėl gebančių homodimerizuotis U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių homodimerai – tikėtina *in vivo* funkcionalus natyvus oligomerinis būvis (83, 98).

3.3.7. GT-IU32 kristalinimas

Rekombinantinės GT-IU32 kristalinimui naudoti skirtingi tirpalų rinkiniai. Kristalinimas vykdytas garų difuzijos metodu sėdinčiuose lašuose, nepriklausomai palaikius 4 ar 20 °C. Siekus parinkti sąlygas, užtikrinančias kolagenolizinės peptidazės kristalinimą, taikytos GT-IU32 koncentracijos tarp 40-80 mg/mL neredukavus arba peptidazės oligomerizaciją ribojus, redukavus 5 mM DTT ar 20 mM 2-ME. Taikytomis sąlygomis rekombinantinė GT-IU32 demonstravo išreikštą polinkį agreguoti, tačiau neprecipitavo formuodama kristalus. Sąlygų, užtikrinančių U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių SA1441 ir SA1440 iš *S. aureus* 113, taip pat demonstravusių išreikštą polinkį agreguoti, kristalinimą, parinkti nepavyko (S. Trillo-Muyo, nepublikuoti rezultatai). Rekombinantinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazės Mk0906 kristalinimas vykdytas garų difuzijos metodu sėdinčiuose lašuose, palaikius 25 °C, naudojus 10 mg/mL koncentracijos baltymo preparatą 20 mM TRIS-HCl pH 7,5/25 °C

buferyje su 2 mM DTT ir 200 mM NaCl, naudojus 2,5 M natrio acetato pH 7/25 °C rezervuaro tirpalu, užtikrino Mk0906 kristalinimą (113).

Plėtojus GT-IU32 erdvinės struktūros tyrimo strategiją, siekta charakterizuoti peptidazės erdvinę struktūrą, charakterizavus tikėtinų GT-IU32 domenų erdvinės struktūras, atsižvelgus, jog izoliuoti domenai geba palaikyti natyvią erdvinę struktūrą (210, 211). GT-IU32 domenai ribota proteolize (212, 213) izoliuoti sėkmingai. Ribota rekombinantinės GT-IU32 monomero proteolizė chimotripsinu A, tripsinu, trombinu, subtilizinu, kaspaze ar ulilizinu, taikius įvairius reakcijų parametrus, neužtikrino, proteolizės produktų molekulinės masės nustatčius NDS-PAGE, peptidazės monomero domenų izoliavimo (nepateikti rezultatai). Patikimai iš dalies išgrynintą GT-IU32 monomerą į N-galinį, imtinai Met¹-...-His³³³, 37,5 kDa domeną (GT-IU32-NGD) ir C-galinį, imtinai Ser³³⁴-...-Asn⁴²², 10,4 kDa domeną (GT-IU32-CGD) proteolizavo vėlyvos eksponentinės augimo fazės *E. coli* BL21 (DE3) serino proteazė/-ės. GT-IU32-NGD ir GT-IU32-CGD molekulinės masės patvirtinos masių spektrometrija, izoliuotų GT-IU32 monomero domenų polipeptidų sekos patvirtintos Edmano degradacija ir masių spektrometrija (nepateikti rezultatai). Izoliuoto GT-IU32-NGD agregacija *in vitro* ribojo sąlygų, užtikrinančių domeno kristalinimą, parinkimą, tuo tarpu GT-IU32-CGD *in vitro* išliko tirpiu – tinkamiausios sąlygos domeno kristalinimui atrinktos.

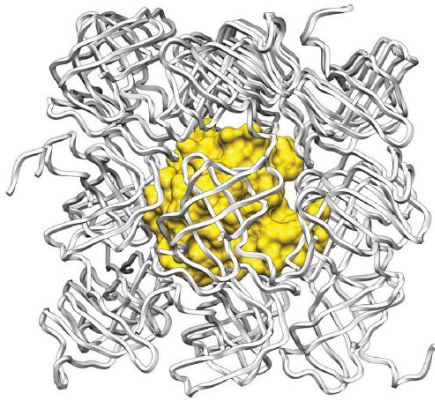
GT-IU32 sekos N-galinių domenų U32 proteolizinių fermentų šeimos domeno, imtinai Gly⁹⁵-...-Phe³²², ir triptofano sintazės α subvieneto fosfato jungimosi domeno, imtinai Pro²⁷-...-His¹³², *in silico* identifikavimą (16 pav.) patvirtino GT-IU32-NGD izoliavimas ribota proteolize. Numačius GT-IU32 antrinę struktūrą nustatyta, jog GT-IU32 sekos regionas, imtinai Asp³²⁰-...-Arg³³⁹, nėra struktūrizuotas, raiškos kamieno proteazės/-ių gebėjimas hidrolizuoti GT-IU32 polipeptidą tarp His³³³-Ser³³⁴ aminorūgščių liekanų taip pat netiesiogiai atspindi regiono nestruktūrizuotumą. GT-IU32 sekos regionas, imtinai Pro³²³-...-Arg³³⁹ (16 pav.), numatytas peptidazės izoliuotų domenų jungties regionas, tikėtinai užtikrinantis GT-IU32-NGD ir GT-IU32-CGD lankstumą tarpusavio atžvilgiu. Tikėtinai GT-IU32 erdvinės struktūros labilumas galimai ribojo peptidazės kristalinimą – tipiška labilios erdvinės struktūros organizacijos baltymams (211).

3.3.8. GT-IU32-CGD kristalinimas ir erdvinės struktūros sprendimas

Tinkamiausios sąlygos natyvaus GT-IU32-CGD kristalinimui – kristalinimas palaikius 20 °C, naudojus 75 mg/mL koncentracijos baltymo preparatą 20 mM TRIS-HCl pH 7,5/20 °C buferyje su 1 mM TCEP ir 50 mM NaCl bei 1 mM PMSF, naudojus 100 mM natrio acetato, 200 mM amonio acetato ir 30 % (masė/tūris) polietilenglikolio 4000 pH 4,6/20 °C rezervuaro tirpalu. Tinkamiausios sąlygos selenometioniniu derivuoto GT-IU32-CGD kristalinimui – identiškos sąlygoms, tinkamiausioms natyvaus GT-IU32-CGD kristalinimui, tačiau naudojus 100 mM natrio citrato, 2 M (NH₄)₂SO₄ pH 5,5/20 °C rezervuaro tirpalu. Natyvus ir selenometioniniu derivuotas GT-IU32-CGD precipitavo formuodamas aukštos skiriamosios gebos atitinkamai ortorombinius, priklausančius P2₁2₁2₁ erdvinei grupei, užtikrinusius 1,1 Å maksimalią rezoliuciją (3 lentelė) ir trigonalius, priklausančius P3₂21 erdvinei grupei, užtikrinusius 1,15 Å maksimalią rezoliuciją (3 lentelė), kristalus su viena baltymo molekule asimetriniam vienetai.

GT-IU32-CGD erdvinė struktūra išspręsta (S. Trillo-Muyo) dėka selenometioniniu derivuoto GT-IU32-CGD vieno bangos ilgio anomalinės difrakcijos. Sprendus selenometioniniu derivuoto GT-IU32-CGD erdvinę struktūrą, nustatyti du seleno atomai baltymo monomerui asimetriniame vienete. GT-IU32-CGD erdvinės struktūros modelis, apėmęs visos baltymo polipeptidinės grandinės išsidėstymą, sudarytas remiantis surinktais difrakcijos duomenimis, naudotas natyvaus GT-IU32-CGD kristalo struktūros išsprendimui. Asimetriniame vienete nustatyta viena natyvaus GT-IU32-CGD molekulė, katijonas – tikėtina Na⁺ katijonas, acetato anijonas ir 108 tirpiklio molekulės. Esminiai kristalografijos duomenų surinkimo ir galutinio molekulės erdvinės struktūros modelio sudarymo parametrai pateikti 3 lentelėje.

Natyvaus GT-IU32-CGD kristale apskaičiuotas tirpiklio kiekis sudarė tik 24,5 %, Matjuso koeficiento V_M 1,63 Å³/Da (214). Selenometioniniu derivuoto GT-IU32-CGD kristale apskaičiuotas tirpiklio kiekis sudarė 30 %, Matjuso koeficiento V_M 1,75 Å³/Da. Analizavus natyvaus GT-IU32-CGD kristalo kristalinę gardelę (26 pav.), nustatytas kompaktiškas baltymo molekulių



26 pav. GT-IU32-CGD molekulės, pažymėtos geltona spalva, sąveika su gretimomis GT-IU32-CGD molekulėmis išsidėstant kristale.

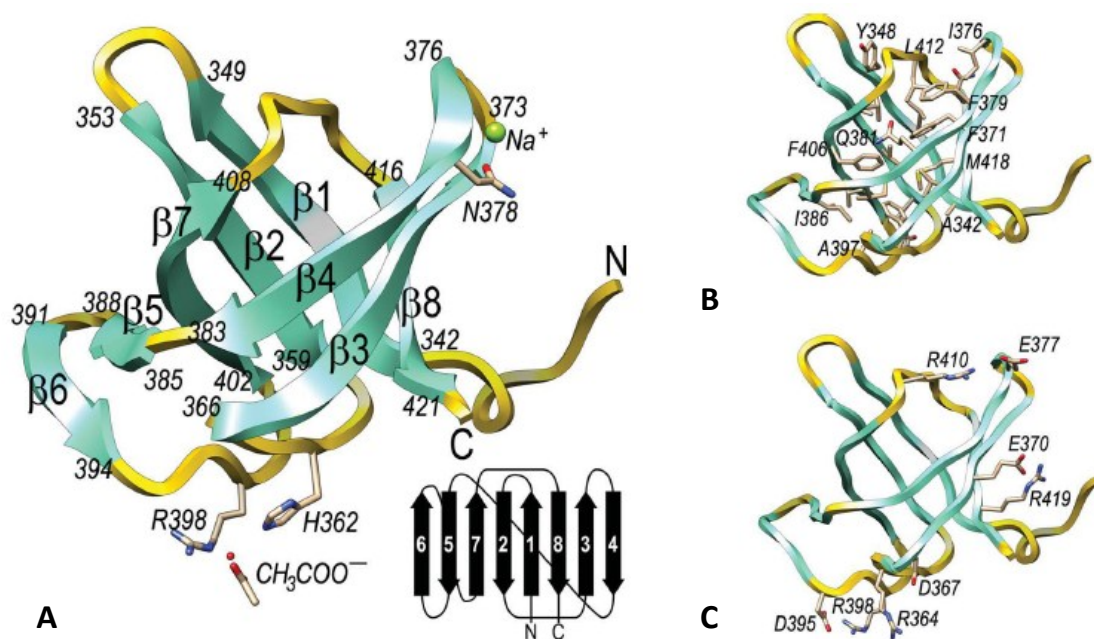
sąveikomis. Natyvaus GT-IU32-CGD molekulių tarpusavio sąveikų plotas – 3480 \AA^2 , sudaro 65 % viso molekulės paviršiaus ploto, tipišku atveju pastaroji baltymų kristalų charakteristika tarp 15-49 % (215). Dideliu paviršiaus plotu sąveikaujančių natyvių GT-IU32-CGD molekulių paviršiaus formos komplementarumas 0,69 (26 pav.). Tarpusavyje tarpiai sąveikaujančių baltymų molekulių paviršiaus formos komplementarumas tipišku atveju tarp 0,64-0,76 (165). Natyvaus GT-IU32-CGD molekulių išsidėstymas kristale vienas kompaktiškiausių charakterizuotų baltymų kristalams. Natyvaus ir selenometioninu derivuoto GT-IU32-CGD kristaluose apskaičiuotas tirpiklio kiekis reikšmingai mažesnis nei būdinga baltymų kristalams, tipišku atveju mažo tirpiklio kiekio baltymų kristalai geba stipriau difraguoti (216).

Stiprus GT-IU32-CGD kristalų gebėjimas difraguoti įgalino išspręsti GT-IU32-CGD erdvinę struktūrą aukšta rezoliucija. GT-IU32-CGD koordinatės ir struktūriniai veiksniai paskelbti PDB, suteikus identifikacinį kodą 4HE6 natyvaus GT-IU32-CGD modeliui ir identifikacinį kodą 4HE5 selenometioninu derivuoto GT-IU32-CGD modeliui.

3.3.9. GT-IU32-CGD erdvinė struktūra

GT-IU32-CGD erdvinė struktūra – kompaktiška bei iškreipta atvira β -statinė, suformuota aštuonių β -juostų, atitinkamai $\beta 1$ - $\beta 8$ β -lakšto (27A pav.). Statinės sanklodą suformuoja išsuktas, išriestas ir arkas suformuojantis antilygiagretus

β -lakštas. Nustatyta β -lakšto β -juostų topologija – $\beta 6$ - $\beta 5$ - $\beta 7$ - $\beta 2$ - $\beta 1$ - $\beta 8$ - $\beta 3$ - $\beta 4$, β -juostų tarpusavio sąveikos atitinkamai -1; +3; +1; -6; -1; +2; +3 (27A pav.). Kraštinės β -juostos $\beta 4$ ir $\beta 6$ nesąveikauja tarpusavyje pagrindinių grandinių jungtimis. Tobulos statinės sanklodai artima sankloda išsidėsčiusios β -juostos $\beta 4$ ir $\beta 7$ su $\beta 1$ - $\beta 3$ ir $\beta 8$ (27A pav.), taip pat nesąveikauja tarpusavyje pagrindinių grandinių jungtimis. Tarpe tarp β -lakšto kraštų išsidėsto Phe³⁷⁹, Gln³⁸¹, Lys⁴⁰⁹ ir Arg⁴¹⁰ šoninės grandinės (27B pav.). Statinę suformuojantis β -lakštas apšaučia hidrofobinę ertmę, formuojamą Ala³⁴², Val³⁴⁵, Tyr³⁴⁸, Ala³⁵⁵, Val³⁵⁷, Ala³⁵⁹, Phe³⁶³, Val³⁶⁹, Phe³⁷¹, Ile³⁷⁶, Phe³⁷⁹, Ile³⁸³, Gln³⁸¹, Ala³⁹⁷, Val⁴⁰⁴, Phe⁴⁰⁶, Val⁴⁰⁸, Leu⁴¹², Asn⁴¹⁶ ir Met⁴¹⁸ šoninių grandinių, tuo tarpu statinės paviršiuje dominuoja hidrofilinių aminorūgščių liekanų šoninės grandinės. Statinės paviršiuje Asp³⁶⁷...Arg³⁶⁴, Glu³⁷⁰...Arg⁴¹⁹, Glu³⁷⁷...Arg⁴¹⁰ ir Asp³⁹⁵...Arg³⁹⁸ šoninės grandinės sudaro druskų tiltelius (27C pav.). Katijonas – tikėtina, Na⁺ katijonas, ir acetato anijonas



27 pav. GT-IU32-CGD erdvinė struktūra. A: GT-IU32-CGD erdvinės struktūros sankloda bei β -juostų sudaromų sąveikų topologija; B: GT-IU32-CGD hidrofobinę ertmę formuojančios aminorūgščių liekanos; C: GT-IU32-CGD erdvinėje struktūroje charakterizuoti druskų tilteliai.

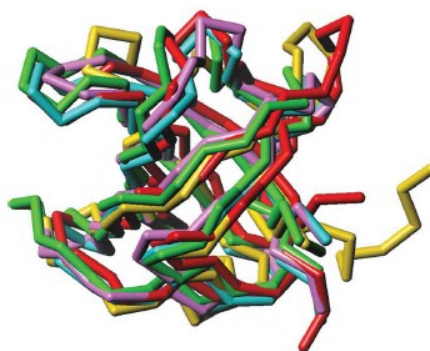
sąveikauja su statinės paviršiuje išsidėsčiusių aminorūgščių liekanų šoninėmis grandinėmis. Trikampę bipiramidinę katijono koordinavimo sferą suformuoja penki deguonies atomai, atitinkamai Asn³⁷⁸ O ^{δ 1}, Gly³⁷³ O, Ile³⁷⁶ O, tirpiklio

molekulė ir simetriškai sietinas Asp³⁹⁵ O^{δ2}. Acetato anijono karboksilato vienas deguonies atomų sąveikauja su His³⁶² N^{ε2}, Arg³⁹⁸ N^{η2} atomais ir tirpiklio molekule, likęs deguonies atomas sąveikauja su Arg³⁹⁸ N^ε atomu, tirpiklio molekule ir simetriškai sietinu Gln³⁵⁸ N^{ε2} atomu. GT-IU32-CGD polipeptidinės grandinės, imtinai Ser³³⁴-...-Phe³⁴¹ ir Asn⁴²², neformuoja β-statinės sanklodos (27A pav.).

GT-IU32-CGD erdvinę struktūrą suformuoja imtinai Ala³⁴²-...-Glu⁴²¹ (16 pav.), nes pirmosios aštuonios ir paskutinė ribota proteolize izoliuoto domeno polipeptidinės grandinės aminorūgščių liekanos nėra struktūrizuotos. GT-IU32-NGD ir GT-IU32-CGD lankstumas tarpusavio atžvilgiu užtikrinamas numatyto nestruktūrizuoto jungties regiono (16 pav.) netiesiogiai patvirtintas išsprendus GT-IU32-CGD erdvinę struktūrą, charakterizavus imtinai Ser³³⁴-...-Phe³⁴¹ nestruktūrizuotumą. Išspręsta GT-IU32-CGD erdvinė struktūra patvirtino GT-IU32 domeninės organizacijos charakterizavimo ribota proteolize rezultatus.

3.3.10. GT-IU32-CGD erdvinei struktūrai giminingos erdvinės struktūros baltymai

Gretinus su charakterizuotomis baltymų erdvinėmis struktūromis nustatyta, jog GT-IU32-CGD erdvinės struktūros sankloda giminingiausia transliacijos elongacijos veiksmų LepA/EF4 (PDB 3CB4 (217)), EF-Tu (PDB 2C77 (218)) ir EF-1α (PDB 1SKQ (219)) bei transliacijos terminacijos veiksmo eRF3 (PDB 3E20 (220)) domenu erdviųjų struktūrų sanklodai – Z įvertis tarp 10,9-11, vidutinis kvadratinis jungties ilgio nuokrypis tarp 1,7-2 Å, sugretinus 78-80 aminorūgščių liekanų grandinių ilgio polipeptidų išsidėstymą (28 pav.). GT-IU32-CGD erdvinės struktūros



28 pav. GT-IU32-CGD erdvinės struktūros sanklodos, pažymėtos geltona spalva, sugretinimas su LepA/EF4, pažymėta žalia spalva, EF-Tu, pažymėta raudona spalva, EF-1α, pažymėta mėlyna spalva, bei eRF3, pažymėta violetine spalva, erdviųjų struktūrų sanklodomis.

sugretinimas su giminingomis baltymų erdvinėmis struktūromis leido nustatyti analogiškas sanklodos architektūras ir topologijas kartu nustačius analogiškai sudaromas jungtis, nors gretintų polipeptidų sekos tik 8-19 % identiškos.

GT-IU32-CGD erdvinei struktūrai giminingos erdvinės struktūros domenai charakterizuoti translacijos elongacijos ir terminacijos veiksmų struktūrose, taip pat charakterizavus N-galinį guanino nukleotido jungimosi domeną (221). Elongacijos veiksmų GT-IU32-CGD erdvinei struktūrai giminingos erdvinės struktūros domenai sąveikauja su aminoacilintomis tRNR bei su antibiotikais, keičiančiais ribosomų veikimą (221, 218).

Nustatytas GT-IU32-CGD erdvinės struktūros sanklodos giminingumas translacijos veiksmų domenų erdvinių struktūrų sanklodai (28 pav.), leidžia teigti, jog GT-IU32-CGD tikėtinai yra GT-IU32 sąveikos su RNR domenas.

3.3.11. GT-IU32 sąveika su RNR

Nustatytas GT-IU32-CGD erdvinės struktūros giminingumas translacijos veiksmų domenų, sąveikaujančių su tRNR, erdvinei struktūrai leido suformuluoti prielaidą, jog GT-IU32 geba specifiskai sąveikauti su nukleorūgščių molekulėmis.

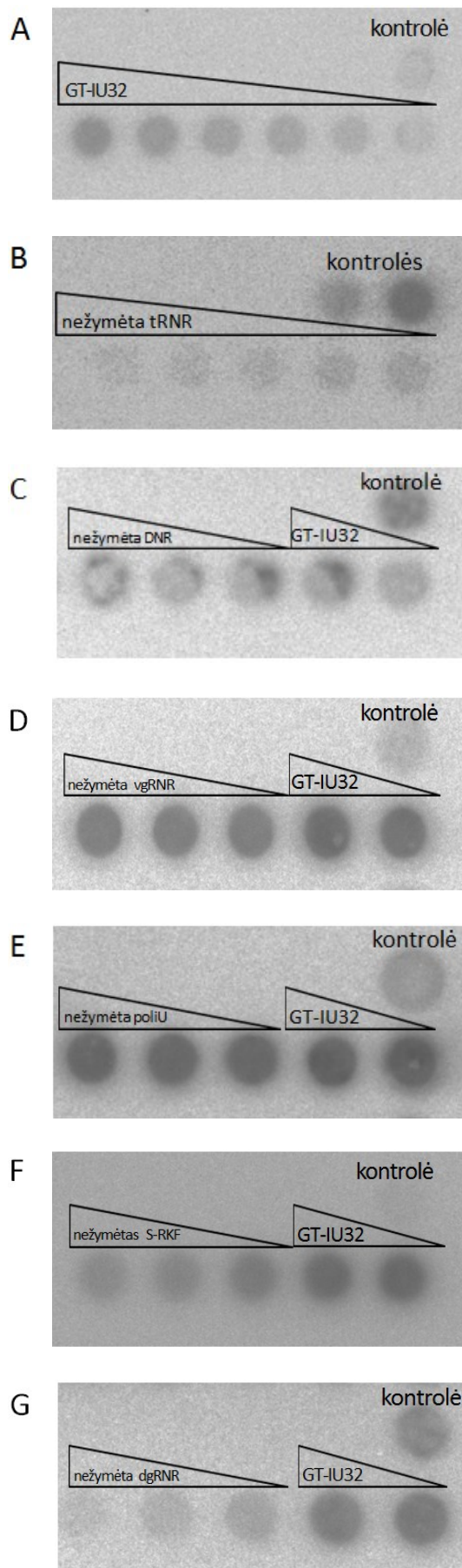
Pradinis GT-IU32 sąveikos su nukleorūgštėmis nustatymas atliktas taikius *E. coli* suminę tRNR frakciją. Kibimo prie membranos analize rekombinantinės GT-IU32 monomero *in vitro* sąveika su tRNR nustatyta (29A pav.). Sąveikos mišiniams taikius 4 pM žymėtos tRNR, o GT-IU32 monomero koncentracijai svyravus tarp 0,4-4 pM nustatyta tiesioginė sąveikaujančių monomero ir žymėtos tRNR koncentracijos priklausomybė nuo GT-IU32 monomero koncentracijos. Densitometrija nustatius sąveikaujančių GT-IU32 monomero ir žymėtos tRNR koncentraciją, sąveikos mišiniams taikius skirtingus stechiometrinius monomero ir tRNR koncentracijų santykius nustatyta (29A pav.), jog GT-IU32 monomeras *in vitro* sąveikauja su viena tRNR molekule. GT-IU32 monomero *in vitro* sąveikos su tRNR specifiskumas nustatytas (29B pav.), įvertinus nežymėtų tRNR gebėjimą, taikius nežymėtos *E. coli* suminės tRNR frakcijos koncentracijas tarp 4-160 pM, pakeisti sąveikaujančias žymėtas tRNR, atsižvelgus į GT-IU32 monomero sąveikos su tRNR stechiometrinių santykį (222). GT-IU32 sąveika su tRNR nustatyta bei nustatytos sąveikos stechiometrija ir specifiskumas tirti

peptidazės oligomerizaciją ribojus redukavus 10 mM 2-ME koncentracija. Rekombinantinės GT-IU32 oligomerizacija neredukuojančiomis sąlygomis ar redukavus 2 mM 2-ME koncentracija neturėjo įtakos GT-IU32 sąveikai su tRNR (nepateikti rezultatai).

Plėtojus GT-IU32 *in vitro* sąveikos su nukleorūgščių molekulėmis tyrimą, įvertintas GT-IU32 monomero sąveikos su nukleorūgštimis specifiškumas, taikius pasirinktas RNR ar DNR fragmentą (4 lentelė). Kibimo prie membranos analize nustatyta nespecifiška rekombinantinės GT-IU32 monomero *in vitro* sąveika su 136 bp ilgio DNR fragmentu (29C pav.).

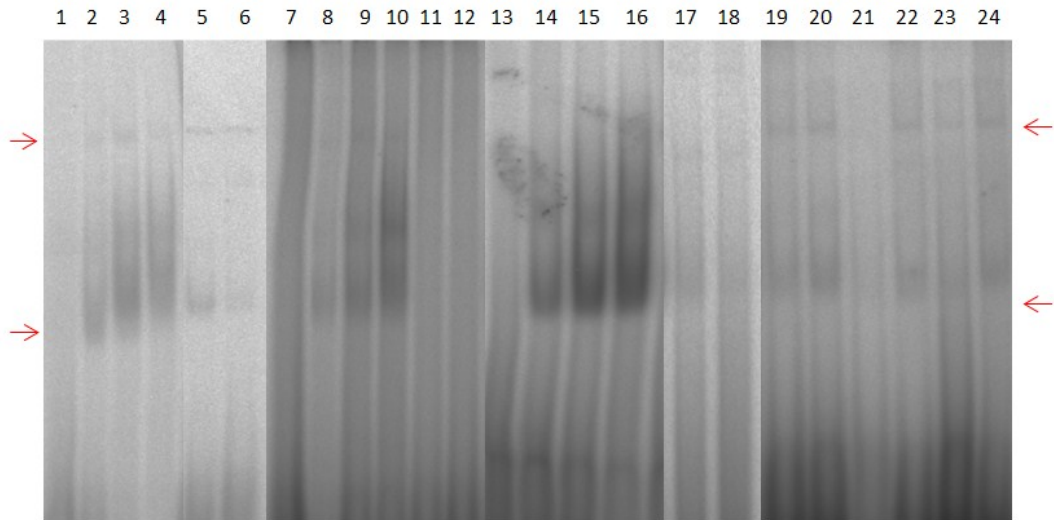
Nustatyta GT-IU32 monomero *in vitro* sąveika su vgRNR, neformuojančiomis antrinės struktūros – 27 nt ilgio vgRNR fragmentu ir poliuridilo rūgšties molekule – taip pat nebuvo specifiška (29D ir 29E pav.). GT-IU32 monomeras *in vitro* su vgRNR, formuojančia antrinę struktūrą – 44 nt ilgio sarcino-ricino kilpos fragmentu bei 26 bp ilgio dgRNR fragmentu, sąveikavo specifiškai (29F ir 29G pav.). Sąveikos mišiniam taikius 4 pM žymėto 44 nt ilgio sarcino-ricino kilpos fragmento ar žymėto 26 bp ilgio dgRNR fragmento, o GT-IU32 monomero koncentracijai svyravus tarp 0,4-4 pM, nustatyta (29F ir 29G pav.) tiesioginė sąveikaujančių monomero ir žymėto 44 nt ilgio sarcino-ricino kilpos fragmento ar žymėto 26 bp ilgio dgRNR fragmento koncentracijos priklausomybė nuo GT-IU32 monomero koncentracijos. Specifiškų GT-IU32 monomero sąveikų su tRNR, 44 nt ilgio sarcino-ricino kilpos fragmentu ir 26 bp ilgio dgRNR fragmentu nustatytos sąveikų K_d vertės, atitinkamai, – $2,86 \pm 0,43$ nM; $3,25 \pm 0,19$ nM ir $3,97 \pm 0,21$ nM. Kibimo prie membranos analize *in vitro* patikimai nustatytas GT-IU32 monomero gebėjimas specifiškai sąveikauti su vgRNR, formuojančia komplementarius dvigrandžius antrinės struktūros elementus ir su dviejų komplementarių RNR grandinių dgRNR fragmentu.

Elektroforezinio mobilumo poslinkio analizės rezultatai patvirtino GT-IU32 monomero gebėjimą specifiškai *in vitro* sąveikauti su tRNR, 44 nt ilgio sarcino-ricino kilpos fragmentu ir 26 bp ilgio dgRNR fragmentu (30 pav.).



29 pav. GT-IU32 sąveikos su nukleorūgštimis nustatymas bei sąveikos specifiškumo įvertinimas kibimo prie membranos analize. A: GT-IU32 gebėjimo sąveikauti su *E. coli* sumine tRNR frakcija įvertinimas, taikius 4 pM žymėtos tRNR, o GT-IU32 monomero koncentracijai svyravus tarp 0,4-4 pM; B: GT-IU32 sąveikos su *E. coli* sumine tRNR frakcija specifiškumo įvertinimas, taikius 4 pM sąveikaujančių GT-IU32 ir žymėtos *E. coli* suminės tRNR frakcijos koncentracijai svyravus tarp 0,4-160 pM; GT-IU32 sąveikos C: su 136 bp DNR fragmentu, D: su 27 nt vgRNR fragmentu, E: su poliuridilo rūgšties molekule, F: su 44 nt ilgio sarcino-ricino kilpos fragmentu, G: su 26 bp dgRNR fragmentu nustatymas bei nustatytų sąveikų specifiškumo įvertinimas. C-G nustatant GT-IU32 monomero sąveiką su nukleorūgštimi taikyta 4 arba 8 pM GT-IU32 koncentracija ir 4 pM žymėtos nukleorūgšties. C-G nustatant GT-IU32 monomero sąveikos su nukleorūgštimi specifiškumą taikyta 4 pM sąveikaujančių GT-IU32 ir žymėtos nukleorūgšties, nežymėtos nukleorūgšties koncentracijai svyravus tarp 0,4-160 pM.

GT-IU32 homodimero gebėjimas specifiskai *in vitro* sąveikauti su vgRNR, formuojančia komplementarius dvigrandžius antrinės struktūros elementus, ir su dviejų komplementarių RNR grandinių dgRNR fragmentu sąveikos mišinių

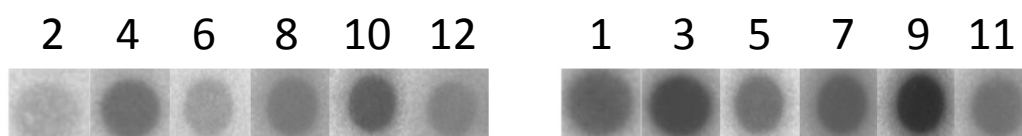


30 pav. GT-IU32 sąveikos su dgRNR specifiskumo bei sąveikos specifiskumo RNR grandinės sekai įvertinimas elektroforezinio mobilumo poslinkio analize. 1: 4 pM žymėta *E. coli* suminės tRNR frakcija; 2-4: GT-IU32 sąveika su žymėta *E. coli* suminės tRNR frakcija, taikant atitinkamai 2, 4 arba 8 pM GT-IU32 ir 4 pM žymėtos *E. coli* suminės tRNR frakcijos; 5-6: GT-IU32 sąveikos su *E. coli* suminės tRNR frakcija specifiskumo įvertinimas, taikant 4 pM sąveikaujančių GT-IU32 ir žymėtos *E. coli* suminės tRNR frakcijos, ir nežymėtos *E. coli* suminės tRNR frakcijos 4 arba 8 pM; 7-12: GT-IU32 sąveikos bei sąveikos specifiskumo su 44 nt sarcino-ricino kilpos fragmentu įvertinimas, analogiškai kaip pateikta 1-6; 13-18: GT-IU32 sąveikos bei sąveikos specifiskumo su 26 bp dgRNR fragmentu įvertinimas, analogiškai kaip pateikta 1-6. 19-24: GT-IU32 sąveikos su dgRNR specifiskumo RNR grandinės sekai įvertinimas. 19-20: 4 pM nežymėtos *E. coli* suminės tRNR frakcijos gebėjimas pakeisti 19: su GT-IU32 sąveikaujančio 4 pM žymėto 44 nt sarcino-ricino kilpos fragmento, 20: su GT-IU32 sąveikaujančio 4 pM žymėto 26 bp dgRNR fragmento; 21-22: 4 pM nežymėto 44 nt sarcino-ricino kilpos fragmento gebėjimas pakeisti 21: su GT-IU32 sąveikaujančios 4 pM žymėtos *E. coli* suminės tRNR frakcijos, 22: su GT-IU32 sąveikaujančio žymėto 4 pM 26 bp dgRNR fragmento; 23-24: 4 pM nežymėto 26 bp dgRNR fragmento gebėjimas pakeisti 23: su GT-IU32 sąveikaujančios 4 pM žymėtos *E. coli* suminės tRNR frakcijos, 24: su GT-IU32 sąveikaujančio 4 pM žymėto 44 nt sarcino-ricino kilpos fragmento. Raudonos rodyklės žymi GT-IU32 oligomerinių būvių sąveiką su nukleorūgštimis.

išskirstymo poliakrilamido gelyje metu GT-IU32 suformavus homodimerus taip pat nustatytas elektroforezinio mobilumo poslinkio analize (30 pav.). Sąveikos mišiniams taikius 4 pM žymėtos tRNR, žymėto 44 nt ilgio sarcino-ricino kilpos fragmento ar žymėto 26 bp ilgio dgRNR fragmento, o GT-IU32 monomero koncentracijai svyravus tarp 0,4-4 pM, sąveikos mišinius išskirsčius poliakrilamido gelyje, kokybiškai nustatyta (30 pav.) tiesioginė sąveikaujančių

monomero ir žymėtos tRNR, žymėto 44 nt ilgio sarcino-ricino kilpos fragmento ar žymėto 26 bp ilgio dgRNR fragmento koncentracijos priklausomybė nuo GT-IU32 monomero koncentracijos. Elektroforezinio mobilumo poslinkio analize nustatytos GT-IU32 monomero ir homodimero *in vitro* sąveikos su 27 nt ilgio vgRNR fragmentu, poliuridilo rūgšties molekule ir 136 bp ilgio DNR fragmentu nebuvo specifinės (nepateikti rezultatai).

Kibimo prie membranos ir elektroforezinio mobilumo poslinkio analizėmis įvertinus GT-IU32 sąveikos su nukleorūgštimis specifiskumą, nustatytas išreikštas peptidazės gebėjimas specifiskai *in vitro* sąveikauti su dgRNR, tačiau GT-IU32 sąveikos specifiskumas dgRNR grandinės sekai



31 pav. GT-IU32 sąveikos su dgRNR specifiskumo RNR grandinės sekai įvertinimas kibimo prie membranos analize. 2-4: 4 pM nežymėtos *E. coli* suminės tRNR frakcijos gebėjimas pakeisti 2: su GT-IU32 sąveikaujančio 4 pM žymėto 44 nt sarcino-ricino kilpos fragmento, 4: su GT-IU32 sąveikaujančio 4 pM žymėto 26 bp dgRNR fragmento; 6-8: 4 pM nežymėto 44 nt sarcino-ricino kilpos fragmento gebėjimas pakeisti 6: su GT-IU32 sąveikaujančios 4 pM žymėtos *E. coli* suminės tRNR frakcijos, 8: su GT-IU32 sąveikaujančio žymėto 4 pM 26 bp dgRNR fragmento; 10-12: 4 pM nežymėto 26 bp dgRNR fragmento gebėjimas pakeisti 10: su GT-IU32 sąveikaujančios 4 pM žymėtos *E. coli* suminės tRNR frakcijos, 12: su GT-IU32 sąveikaujančio 4 pM žymėto 44 nt sarcino-ricino kilpos fragmento. 1,3,5,7,9,11 kontrolės atitinkamai 2,4,6,8,10,12 – 4 pM sąveikaujančių GT-IU32 ir žymėtos nukleorūgšties.

nenustatytas – peptidazė specifiskai sąveikavo su skirtingų sekų dgRNR (31 ir 30 pav.), gebančiomis pakeisti viena kitą specifiskos GT-IU32 sąveikos su dgRNR atžvilgiu (31 ir 30 pav.). GT-IU32 sąveikos su nukleorūgštimis specifiskumą taip pat patvirtino nustatyta tiesioginė sąveikaujančių peptidazės ir nukleorūgšties koncentracijos priklausomybė nuo peptidazės koncentracijos, tik tuo atveju jei GT-IU32 sąveikavo su nukleorūgštimi specifiskai. Kibimo prie membranos analize netiesiogiai nustatyta GT-IU32 homodimero gebėjimą specifiskai sąveikauti su tRNR patvirtino elektroforezinio mobilumo poslinkio analizės rezultatai. Sąveikos mišinių išskirstymo poliakrilamido gelyje metu, GT-IU32, silpniau redukavus, suformavo homodimerus, todėl elektroforezinio mobilumo poslinkio analize tiesiogiai kokybiškai įvertintas taip pat ir GT-IU32

homodimero sąveikos su tRNR, 44 nt ilgio sarcino-ricino kilpos fragmentu ar 26 bp ilgio dgRNR fragmentu specifiškumas. GT-IU32 homodimeras *in vitro* sąveikavo su dgRNR specifiškai.

Specifiškos rekombinantinės GT-IU32 sąveikos su dgRNR neribojta taikyta 2 ar 10 mM 2-ME koncentracija. Kalcio ir/ar cinko jonai nebuvo būtini GT-IU32 sąveikos su dgRNR užtikrinimui – tipišku atveju minėtų metalų katijonai būtini baltymų sąveikos su dgRNR užtikrinimui (223, 224). Baltymai sąveikauja su ne trumpesne nei 9-10 bp ilgio dgRNR (225, 226), rekombinantinės GT-IU32 monomeras giminingiausiai sąveikavo su tRNR ir 44 nt ilgio sarcino-ricino kilpos fragmentu, tuo tarpu monomero sąveika su 26 bp ilgio dgRNR fragmentu buvo mažiau gimininga. GT-IU32 monomero specifiškos *in vitro* sąveikos su dgRNR vienos giminingiausių baltymo sąveikų su RNR, atsižvelgus į charakterizuotos erdvinės struktūros baltymų kompleksų su RNR kiekybiškai nustatytą komplekso molekulių tarpusavio sąveikų giminingumą (227). GT-IU32 sąveikos specifiškumas dgRNR grandinės sekai nenustatytas. Tipišku atveju baltymų sąveikos su dgRNR domenai nėra specifiški RNR grandinės sekai, tačiau specifiškai sąveikauja su išskirtinai tik A erdvinės formos dgRNR spiralės grandinių 2'-hidroksilo grupėmis ir fosforo rūgšties liekanomis (228, 229, 230).

Nustačius GT-IU32 gebėjimą specifiškai *in vitro* sąveikauti su dgRNR, patvirtinta prielaida, jog GT-IU32 geba specifiškai sąveikauti su nukleorūgščių molekulėmis. Baltymai, gebantys sąveikauti su RNR, tipišku atveju sąveikauja su RNR daugiau nei vienu domenu (231). Visgi specifiška GT-IU32 monomero *in vitro* sąveika su viena tRNR molekule netiesiogiai patvirtino peptidazės sąveiką su dgRNR vienu domenu. GT-IU32 homodimerizacija neturėjo įtakos peptidazės sąveikai su nukleorūgštimis, todėl tikėtina, jog GT-IU32 homodimerizaciją bei specifišką sąveiką su dgRNR užtikrina nepriklausomai funkcionuojantys GT-IU32 monomero domenai. GT-IU32-CGD funkcionavimas GT-IU32 sąveikos su dgRNR domenu išlieka pagrįstai tikėtinu. GT-IU32 specifiškai *in vitro* sąveikavo taip pat ir su tRNR, tačiau nustatytas peptidazės sąveikos su nukleorūgštimis specifiškumas nėra identiškas

transliacijos veiksnių, kurių struktūrose charakterizuoti GT-IU32-CGD erdvinei struktūrai giminingos erdvinės struktūros domenai, sąveikos su nukleorūgštimis specifiškumams (232, 221, 233, 234).

3.3.12. GT-IU32 funkcinė svarba *G. thermoleovorans* DSM 15325

GT-IU32 charakteristikos leidžia fermento funkcinę svarbą sieti su baltymų peptidolize *G. thermoleovorans* DSM 15325 citoplazmoje. Peptidolizuodama natyvius substratus GT-IU32 užtikrina, tikėtina, namų ruošos funkcijas, todėl *in vivo* peptidazės aktyvumas griežtai reguliuojamas. Nustatytas GT-IU32 gebėjimas specifiškai *in vitro* sąveikauti su dgRNR įgalino tikėtinai fermento *in vivo* substratais apibrėžti su RNR tikėtinai sąveikaujančius baltymus, svarbius ląstelės RNR funkcijų užtikrinimui ir/ar valdymui.

G. thermoleovorans DSM 15325 koduojamas GT-IU32 genas transkribuojamas konstitutyviai kamieno kultūros eksponentinės ir stacionarios augimo fazių metu. Neintensyvi GT-IU32 raiška geobacilos citoplazmoje taip pat netiesiogiai patvirtino fermento gebėjimą *in vivo* užtikrinti namų ruošos funkcijas. Patogenų U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių svarba bakterijų virulentiškumui *in vivo* patikimai nustatyta, nors pastarųjų virulentiškumo veiksnių fiziologinės funkcijos nėra detalios suvoktos (95, 96, 108, 110). Tipišku atveju patogenai, koduojantys U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazes, yra proteolizinės bakterijos, sekretuojančios skirtingas kolagenazes (82, 235), tačiau U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių – vangių kolagenazių, svarba patogenų kolagenolizinio potencialo užtikrinimui menka (85, 236, 95, 108). U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių funkcinė svarba patogenams nesietina su audinių kolonizavimu ir/ar kolageno įsisavinimu pagrįstai tikėtina. Galimai peptidazes, *in silico* priskirtinas U32 proteolizinių fermentų šeimai, koduojančių genų anotavimas nepatogenų genomuose taip pat atspindi tikėtiną U32 proteolizinių fermentų šeimos funkcinį heterogeniškumą (7, 1).

GT-IU32 iš *G. thermoleovorans* DSM 15325 nuosaikaus termofilo, įsisavinančio kolageną (169), funkcijos *in vivo* negali būti sietinos su virulentiškumu. Natyvos GT-IU32 katalizinis aktyvumas nenustatytas

detektavus geobacilų kolagenolizines peptidazes, o masių spektrometrija GT-IU32 identifikuota tik viduląstelinių baltymų preparate, todėl peptidazės specifinės funkcijos nesietinos su bakterijų mityba taip pat tikėtinos.

Išreikštas GT-IU32 specifiskumas substrato aminorūgščių grandinės sekai bei erdvinei struktūrai pažymi peptidazės griežtą substratinę specializaciją, tikėtina, jog *in vivo* GT-IU32 peptidolizuoja geobacilų baltymų kolagenui analogiškos erdvinės struktūros domenais. Skirtingos funkcinės svarbos baltymai su kolagenui analogiškos struktūros domenais identifikuoti *Firmicutes* tipo bakterijose (237, 31, 32). U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių gebėjimas peptidolizuoti hidrofobinius baltymų sekų regionus netiesiogiai patvirtintas charakterizavus galimai peptidazės Mk0906 erdvinę struktūrą. Mk0906 struktūroje nustatytas tikėtinas aktyvusis centras, prieinamas tik hidrofobinių aminorūgščių grandinėms ar hidrofobinėms molekulėms (113).

Palyginus GT-IU32 domeninę organizaciją su U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių domenine organizacija nustatyta, jog U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazėms tipišku atveju nebūdingas GT-IU32-CGD. Geobacilų koduojamų ilgosios polipeptinės grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių sekose GT-IU32-CGD identifikuotas, tačiau geobacilų koduojamų trumposios polipeptinės grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių sekose, taigi ir GT-TU32 sekoje, GT-IU32-CGD neidentifikuotas. Mk0906 struktūroje domenas, analogiškas GT-IU32-CGD, taip pat nenustatytas (113).

Reikšmingas GT-IU32-CGD erdvinės struktūros giminingumas transliacijos veiksmų domenų erdvinei struktūrai leido GT-IU32 funkcinę svarbą sieti su transliacija, tačiau pastaroji prielaida nepatvirtinta. GT-IU32 specifiskai *in vitro* sąveikavo su tRNR bei 44 nt ilgio sarcino-ricino kilpos fragmentu, tačiau analogiskai gimininga specifiska peptidazės monomero *in vitro* sąveika su 26 bp ilgio dgRNR fragmentu taip pat nustatyta. Rekombinantinės GT-IU32 sąveikos su RNR specifiskumas nėra identiškasis transliacijos veiksmų sąveikos su RNR specifiskumams, todėl atspindi neanalogiską kaip transliacijos veiksmų GT-IU32 sąveikos su RNR

molekulėmis fiziologinę svarbą *G. thermoleovorans* DSM 15325. Rekombinantinės GT-IU32 monomeras GTP nehidrolizavo, monomero įtaka transliacijai *in vitro* taip pat nenustatyta (nepateikti rezultatai). Patikimai nustatyta GT-IU32 specifiška sąveika su dgRNR netiesiogiai pažymi peptidazės svarbą namų ruošos funkcijų užtikrinimui. Apibrėžus baltymus su kolageniui analogiškos struktūros domenais, sąveikaujančius su RNR molekulėmis, svarbius RNR funkcijų užtikrinimui ir/ar valdymui, GT-IU32 tikėtinai *in vivo* substratais, galima teigti, jog peptidazės katalizuojamos peptidolizės fiziologinė svarba sietina su RNR funkcijomis ir/ar funkcijų valdymu ląstelėje.

Natyvios GT-IU32 aktyvumo reguliavimas nėra charakterizuotas, visgi *in vivo* pagrįstai tikėtinas peptidazės funkcijų valdymas skatinus arba ribojus GT-IU32 homodimerizaciją ir/ar sąveiką su RNR molekulėmis. Tikėtinas GT-IU32 reguliavimas keičiant peptidazės sąveikos su dgRNR giminingumą kartu leidžia GT-IU32-CGD tikėtino peptidazės sąveikos su RNR domeno funkcinę svarbą sieti su GT-IU32 funkcijų valdymu. Griežtas GT-IU32 *in vivo* užtikrinamų funkcijų valdymas netiesiogiai patvirtinas GT-IU32 geną *in silico* priskyrus operonui bei *in vitro* nenustačius natyvios GT-IU32 homodimero katalizinio aktyvumo. Griežtas kolagenolizinio aktyvumo reguliavimas taip pat numanomas U32 proteolizinių fermentų šeimos holotipinei PrtC peptidazei iš *P. gingivalis* ATCC 53977 (83).

Plėtojus GT-IU32 funkcijų tyrimą, siekta geobacilos genome išveiklinti peptidazės geną bei įvertinti kiekvienos U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių motyvo aminorūgšties svarbą peptidazės fiziologinėms funkcijoms, tačiau nesėkmingas *G. thermoleovorans* DSM 15325 kompetentiškumo optimizavimas ribojo GT-IU32 funkcijų *in vivo* tyrimą (nepateikti rezultatai). GT-IU32 charakteristikos, nustatytos fermentą tyrus *in vitro*, nepatvirtino GT-IU32 svarbos kolageno įsisavinimui, tačiau leidžia peptidazės aktyvumo fiziologinę svarbą sieti su namų ruošos funkcijų užtikrinimu. Tikėtina GT-IU32 funkcinė svarba *G. thermoleovorans* DSM 15325 patvirtina U32 proteolizinių fermentų šeimos funkcinių heterogeniškumą.

4. Rezultatų apibendrinimas

Geobacilos – biosferoje plačiai paplitusios bacilos, sutinkamos skirtingose ekonišose (238). Efektyvų geobacilų adaptacinį plastiškumą aplinkai užtikrina taip pat ir produkuojami, tipišku atveju, termoaktyvūs ir/ar termostabilūs kataboliniai fermentai (239, 240). Geobacilų skirtingų katabolinių fermentų gausa leidžia geobacilų ląstelėms mitybai įsisavinti daugelį junginių (241, 242, 243, 244, 245, 246). Proteolizinės geobacilos taip pat plačiai paplitusios skirtingose ekonišose (127, 247, 169). Geobacilų peptidazės tirtos charakterizavus svarbą ląstelės fiziologijai ir/ar mitybai (127, 36). Visgi anotuotų geobacilų genomų *in silico* analizė leidžia teigti, jog geobacilų peptidazės, taigi ir kolagenolizinės peptidazės, tirtos fragmentiškai. Geobacilų, gebančių augti įsisavinus kolageną, kolagenolizinis potencialas nėra tikslingai tirtas. Tipišku atveju, taikius selektyvias terpes, detektavus geobacilų gebėjimą skaidyti kolageną, svarbų ląstelių mitybai, formaliai apibrėžiama, jog detektuotą kolagenolizinį potencialą užtikrina induktyviai produkuotų kolagenolizinių peptidazių, sudarančių katabolinę kaskadą, sinergizmas (13, 10, 9). Tuo tarpu numanoma konstitutyviai produkuotų kolagenolizinių peptidazių svarba geobacilų ar kitų termofilinių bakterijų kolagenolizinio potencialo užtikrinimui išlieka netirta, todėl termofilų kolagenolizinis potencialas išlieka fragmentiškai charakterizuotu. Termofilinių bakterijų kolagenolizės fiziologinė svarba bei eiga išlieka nedetalizuotomis, nes pradiniai kolageno katabolizmo etapai nėra detalčiai charakterizuoti.

Siekus nustatyti bei charakterizuoti geobacilų konstitutyvų kolagenolizinį potencialą zimografija detektuotos konstitutyviai *G. thermoleovorans* DSM 15325 produkuotos kolagenolizinės peptidazės. Geobacilų ekstraląstelinį baltymų preparate detektuotos kolagenolizinės peptidazės sėkmingai identifikuotos masių spektrometrija. Nustatytą *G. thermoleovorans* DSM 15325 vėlyvos eksponentinės augimo fazės konstitutyvų kolagenolizinį potencialą užtikrina Pz-peptidazių A ir B homologai bei bacilolizino homologas. *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyvios katabolinės kaskados, įgalinančios kolageną pradėti skaidyti tik

kolagenui tapus prieinamu ląstelėms, charakterizavimas tiesiogiai patvirtino numanytą geobacilų konstitutyvių kolagenolizinių peptidazių svarbą kolageno įsisavinimui (122). Konstitutyvią kaskadą sudarančių peptidazių aktyvumo sinergizmo esminė fiziologinė svarba geobacilų mitybai pradinių kolageno katabolizmo etapų metu akivaizdi. Funkcionuojamos konstitutyvios kolagenolizinės peptidazės kartu tikėtinai didina kolageno įsisavinimo efektyvumą, nes kolageno oligopeptidai, transportuoti į geobacilos citoplazmą, indukuoja kolagenolizinių peptidazių produkciją. *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyvaus kolagenolizinio potencialo charakterizavimas, įgalinantis nuosekliai suvokti geobacilų kolagenolizinio potencialo fiziologinę svarbą bei kolageno skaidymo eigą, kartu pažymi geobacilų, o taip pat netiesiogiai kitų termofilinių proteolizinių bakterijų adaptacinę plastiškumą.

Konstitutyviai *G. thermoleovorans* DSM 15325 produkuotos kolagenolizinės peptidazės, homologiškos išsamiai charakterizuotoms cinko peptidazėms (36, 248), todėl *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyvios katabolinės kaskados kolagenolizinių peptidazių tyrimas nebuvo plėtotas. Nenustačius *G. thermoleovorans* DSM 15325 fragmentiškai charakterizuotų kolagenolizinių peptidazių homologų, geobacilų kolagenolizinių peptidazių tyrimas plėtotas fragmentiškai charakterizuotų kolagenolizinių peptidazių homologus identifikavus *in silico* analize anototų geobacilų genomuose. Siekus charakterizuoti tikėtinais su geobacilų konstitutyviomis kolagenolizinėmis peptidazėmis funkciškai sietinas metalo oligoendopeptidazes plėtota GT-SM3B charakterizavimo strategija. GT-IU32 tirta siekus charakterizuoti geobacilų nenustatyto katalizinio mechanizmo fragmentiškai tirtų proteolizinių fermentų šeimų kolagenolizines peptidazes.

Klonuotos GT-SM3B ir GT-IU32 sėkmingai produkuotos heterologine raiška *E. coli*, taikius optimizuotas raiškos parametrų vertes, pasiekus dideles rekombinantinių peptidazių išeigas. Rekombinantinė GT-SM3B, skirtingai nei rekombinantinė GT-IU32, agregavo raiškos kamieno citoplazmoje, tačiau raiškos kamienas sekretavo rekombinantinę oligopeptidazę. Anksčiau rekombinantinių metalo oligopeptidazių produkavimui netaikyta sekrecinė

produkcija optimizavus sėkmingai užtikrino efektyvų tirpios GT-SM3B gavimą. Charakterizuotos *G. thermoleovorans* DSM 15325 kolagenolizinės peptidazės, optimizavus gryninimo eigą, išgrynintos pasiekus beveik visišką daugiau nei 95 % grynumą. Gryninimo metu bei mėginio buferyje rekombinantinė GT-SM3B išliko stabili ir tirpi, tuo tarpu demonstravusios polinkį agreguoti rekombinantinės GT-IU32 tirpus būvis gryninimo metu bei mėginio buferyje stabilizuoti redukavus optimizuota 2-ME koncentracija.

GT-SM3B sekoje identifikuoti konservatyvūs sekos elementai tipiški metalo oligopeptidazėms, o nustatyta GT-SM3B domeninė organizacija tipiška charakterizuotų oligopeptidazių F sekoms (1). Visgi GT-SM3B charakterizavimo naujumą bei aktualumą pažymėjo charakterizuotos oligopeptidazės seką lyginus su charakterizuotų metalo oligopeptidazių sekomis nustatytas tik 40,3 % identiškumas PepF_{Ba} oligopeptidazei iš *B. amyloliquefaciens* 23-7A (79).

GT-SM3B tipišcai sekretuojamoms metalo oligopeptidazėms (78, 79) gebėjo homodimerizuotis. GT-SM3B monomeras ir dimeras, palaikius optimalius pH ir temperatūrą – pH 7,3 ir 40 °C, peptidolizavo Karbobenzoksi-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala-OH tarp Gly-Gly ir/ar Pro-Gly aminorūgščių liekanų, reakcijos K_M , V_{max} ir k_{cat} vertės, atitinkamai, $-2,17 \pm 0,04 \times 10^{-6}$ M; $2,65 \pm 0,03 \times 10^{-3}$ $\mu\text{M}/\text{min}$ ir $5,99 \pm 0,07$ s^{-1} . Pastarasis sintetinis heksapeptidas oligopeptidazių kinetinių charakteristikų nustatymui anksčiau nėra naudotas, todėl GT-SM3B kinetinės charakteristikos nelygintos su charakterizuotų metalo oligopeptidazių kinetinėmis charakteristikomis. Demonstravusi vieną plačiausių efektyvaus aktyvumo intervalų, kada nors nustatytų metalo oligopeptidazei, GT-SM3B efektyvus peptidolizinis aktyvumas nustatytas taip pat ir tarp 40-60 °C. Charakterizuotos geobacilų oligopeptidazės Pz-peptidazės A ir B iš *G. collagenovorans* MO-1 reikšmingai labiau termoaktyvios nei GT-SM3B, vienintelė charakterizuota termostabili sekretuojama metalo oligopeptidazė, tuo tarpu GT-SM3B termostabilumas analogiškas geobacilų charakterizuotoms oligopeptidazėms (36). GT-SM3B buvo efektyviai aktyvi ir stabili pH 5-8. Charakterizuotų laktokokų ir geobacilų metalo oligopeptidazių aktyvumo bei stabilumo priklausomybė nuo pH (189, 69, 36) analogiška charakterizuotai pH įtakai GT-SM3B

aktyvumui bei stabilumui. Metalų katijonų įtaka charakterizuotų metalo oligopeptidazių, taigi ir GT-SM3B aktyvumui – analogiška (69, 78, 36, 79). Biotechnologijoje naudojamų junginių įtaka oligopeptidazių aktyvumui nėra tikslingai charakterizuota. GT-SM3B išliko efektyviai aktyvi veikus daugeliu biotechnologijoje naudojamų junginių, kurių įtaka oligopeptidazės aktyvumui tikslingai analizuota. Nustatytas platus GT-SM3B oligopeptidolizinis specifiškumas kolageno peptidams taip pat pažymi charakterizuotos oligopeptidazės biotechnologinį pritaikomumą.

GT-IU32 sekoje identifikuotas konservatyvus sekos motyvas tipiškas U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazėms, o GT-IU32 domeninė organizacija tipiška geobacilų ilgosios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos galimai peptidazių sekoms (1). GT-IU32 charakterizavimo naujumą bei aktualumą taip pat pažymi charakterizuotos peptidazės seką lyginus su charakterizuotomis U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių sekomis nustatytas tik 48,8 % identiškumas tarpusavyje identiškų sekų fragmentiškai charakterizuotoms smcoll ir SMU.761 peptidazėms, atitinkamai iš *S. mutans* GS-5 ser. c ir *S. mutans* UA159 (98, 100).

GT-IU32 gebėjo homodimerizuotis disulfidiniiais tilteliais. Charakterizuotos U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės tipišku atveju yra monomeriniai baltymai (107, 109), tačiau U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės, gebančios homodimerizuotis, taip pat charakterizuotos (83, 98, 113). U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės homodimerizacija disulfidiniiais tilteliais nustatyta (98), tačiau taip pat nustatyta U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių homodimerizacija druskų tilteliais (S. Trillo-Muyo, nepublikuoti rezultatai) ar cinko jono koordinavimu bei hidrofobinėmis ir vandenilinėmis jungtimis (113). GT-IU32 dimeras tipišškai termoaktyvioms kolagenolizinėms peptidazėms (8) peptidolizavo iš dalies denatūruotą kolageną, tuo tarpu monomero aktyvumas nedetektuotas. Tuo atveju, jei gebančių homodimerizuotis charakterizuotų U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių aktyvumas detektuotas kataliziškai, aktyvūs tik homodimerai (83, 98). GT-IU32 demonstravo termostabilumą 37-55 °C. Charakterizavus GT-IU32 termostabilumą taip pat įvertinta kalcio ir cinko jonų

įtaka charakterizuotos peptidazės monomero termostabilumui. Kalcio katijonas neturėjo įtakos GT-IU32 termostabilumui, tuo tarpu cinko katijonas reikšmingai didino charakterizuotos peptidazės monomero termostabilumą. Galimas kalcio ir cinko jonų sinergistinis efektas GT-IU32 termostabilumui nenustatytas. U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių termostabilumas ar kalcio ir cinko katijonų įtaka termostabilumui anksčiau nebuvo tirta, tačiau cinko katijono svarba U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių struktūros organizacijai patvirtinta charakterizavus Mk0906 homodimero erdvinę struktūrą (113). Nustatytas išreikštas GT-IU32 aktyvumo substratinis specifiskumas substrato aminorūgščių grandinės sekai bei erdvinei struktūrai – charakterizuotos peptidazės homodimeras peptidolizavo tik iš dalies denatūruotą I tipo kolageną iš žiurkės uodegos – tipiškas detalizuoto substratinio specifiskumo U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazėms (83, 86, 94). GT-IU32 demonstravo vangų kolagenolizinį aktyvumą. Charakterizuotos U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazės tipišku atveju taip pat vangios kolagenolizinės peptidazės (83, 96, 98, 109).

Ribota proteolize izoliavus GT-IU32 monomero domenų, išlikęs tirpiu GT-IU32-CGD, optimizavus gryninimo eigą išgrynintas pasiekus beveik visišką daugiau nei 95 % grynumą. Gryninimo metu bei mėginio buferyje GT-IU32-CGD išliko stabilu ir tirpiu. GT-IU32-CGD erdvinė struktūra išspręsta aukšta rezoliucija, nes charakterizuotos erdvinės struktūros domenai precipitavo formuodamas kompaktiškos kristalinės gardelės ir žemo tirpiklio kiekio kristalus, gebėjusius stipriai difraguoti. GT-IU32-CGD erdvinė struktūra – kompaktiška bei iškreipta atvira β -statinė, suformuota aštuonių antilygiagrečių β -juostų β -lakšto. Skirtingai nei galima tikėtis, nustatytas reikšmingas GT-IU32-CGD erdvinės struktūros giminingumas transliacijos veiksnių domenų erdvinei struktūrai (217, 218, 219, 220). Elongacijos veiksnių GT-IU32-CGD giminingos erdvinės struktūros domenai sąveikauja su tRNR (221). Charakterizuotas GT-IU32 gebėjimas specifiškai *in vitro* sąveikauti su dgRNR netiesiogiai patvirtino GT-IU32-CGD funkcionavimą GT-IU32 sąveikos su dgRNR domenu. Virusų peptidazių, gebančių sąveikauti su RNR, domeninei organizacijai tipišku atveju būdingas vienas sąveikos su nukleorūgštimi domenai (249, 250).

Nors peptidazių gebėjimas sąveikauti su RNR molekulėmis charakterizuotas (251, 252, 250), tačiau pastaroji proteolizinių fermentų charakteristika nėra tipiška (1). Charakterizuotos peptidazės, sąveikaujančios su RNR, priskiriamos skirtingoms asparto rūgšties, cisteino arba serino peptidazių tipų šeimoms (1). Prokariotų ir eukariotų peptidazių, kurių gebėjimas sąveikauti su vgRNR nustatytas, užtikrina namų ruošos funkcijas, taigi pastarųjų hidrolazių aktyvumas griežtai reguliuojamas (252, 253). Virusų peptidazės, sąveikaujančios su RNR, svarbios virusų baltymų polipeptidų brendimui bei virusų replikacijai (254, 255). Tikslingai tyrus virusų peptidazių sąveikos su RNR specifiškumą bei sąveikos įtaką peptidazių funkcionalumui, nustatyta, jog virusų peptidazių vgRNR grandinės sekai specifiška *in vivo* sąveika su vgRNR svarbi peptidazių funkcionalumo reguliavimui (251, 254, 255).

Charakterizuota GT-IU32 domeninė organizacija – GT-IU32-NGD ir GT-IU32-CGD jungiami tikėtinais domenų lankstumą tarpusavio atžvilgiu užtikrinančio nestruktūrizuoto jungties regiono – patvirtino U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių numatytą modulinę domeninę organizaciją (1). GT-IU32-CGD erdvinė struktūra charakterizuota, tačiau GT-IU32 erdvinė struktūra išlieka neišspręsta, neišsprendus GT-IU32-NGD, demonstravusio išreikštą polinkį agreguoti, erdvinės struktūros. Pradinio GT-IU32 charakterizavimo metu GT-IU32 erdvinė struktūra *in silico* nenumatyta, nes U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių erdvinės struktūros nebuvo tirtos (D. Kazlauskas, nepublikuoti rezultatai). Schacherl *et al.*, 2015 charakterizuota Mk0906 erdvinė struktūra – iškreipta TIM β/α -statinė. Pastaroji galimai peptidazė išlieka vienintele charakterizuotos erdvinės struktūros U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidaze. Mk0906 seka *in silico* atitinka GT-IU32-NGD, tuo tarpu Mk0906 struktūroje domenas, analogiškas GT-IU32-CGD, nenustatytas (113). GT-IU32-NGD sekos identiškumas Mk0906 sekai nepakankamas *in silico* patikimai numatyti GT-IU32-NGD erdvinę struktūrą. Visgi nustatytas GT-IU32 sekos homologiškumas Mk0906 bei GT-IU32 sekoje tikėtinais nustatytas TIM β/α -statinės sanklodos fosfato jungimosi domenas TIM β/α -statinės sanklodos GT-IU32-NGD erdvinės struktūros organizaciją

netiesiogiai patvirtino. Nenustačius GT-IU32 homodimerizacijos įtakos charakterizuotos peptidazės sąveikai su nukleorūgštimis, tikėtina, jog GT-IU32 homodimerizaciją bei sąveiką su nukleorūgštimis užtikrina nepriklausomai funkcionuojantys GT-IU32 monomero domenai. GT-IU32-CGD tikėtino sąveikos su dgRNR domeno svarba GT-IU32 homodimerizacijai nėra tikėtina, tuo tarpu GT-IU32-NGD tikėtino katalizinio domeno svarba GT-IU32 homodimerizacijai pagrįstai tikėtina. GT-IU32 gebėjo homodimerizuotis disulfidiniais tilteliais, o charakterizuotos peptidazės sekoje cisteino liekanos sutinkamos tik GT-IU32-NGD sekoje. GT-IU32 homodimero tikėtino labilumo, lemiamo GT-IU32-CGD lankstumo disulfidiniais tilteliais susijungusių GT-IU32-NGD atžvilgiu, svarba GT-IU32 monomero sąveikai su dgRNR akivaizdi. GT-IU32-NGD struktūrinio tipo sąveika su cinko katijonu, reikšmingai didinusi GT-IU32 monomero termostabilumą, išlieka pagrįstai tikėtina – GT-IU32-CGD sąveika su minėtu katijonu, charakterizavus domeno erdvinę, struktūrą nenustatyta.

Pagauginus GT-SM3B ir GT-IU32 genų sekas bei *in vitro* detektavus GT-SM3B ir GT-IU32 aktyvumą, patvirtinta prielaida, jog *G. thermoleovorans* DSM 15325 chromosomoje koduoja sekretuojamą M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio metalo oligopeptidazę ir ilgosios grandinės U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazę. GT-IU32 geno transkripcijos ir GT-IU32 raiškos charakterizavimas *G. thermoleovorans* DSM 15325 taip pat patvirtino, jog GT-IU32 genas, kaip ir GT-TU32 genas (196, 197), nėra pseudogenas.

GT-SM3B ir GT-IU32 – termoaktyvių bei termostabilių kolagenolizinių endopeptidazių charakteristikos leidžia apibrėžti neanalogišką charakterizuotų peptidazių homodimerų, tikėtina, *in vivo* funkcionalių natyvių oligomerinių būvių funkcinę svarbą *G. thermoleovorans* DSM 15325. Numačius GT-SM3B geno induktyvią raišką bei sekreciją ir *in vitro* charakterizavus GT-SM3B kolagenolizinį aktyvumą, substratais naudojus kolageno oligopeptidų mišinį, netiesiogiai patvirtinta charakterizuotos oligopeptidazės svarba *G. thermoleovorans* DSM 15325 mitybai. Charakterizavus eksponentinės augimo fazės metu konstitutyvią, nuo kultivavimo temperatūros nepriklausomą

GT-IU32 geno transkripciją bei neintensyvią GT-IU32 raišką ir *in vitro* detektavus GT-IU32 vangų kolagenolizinių aktyvumą, kartu nustatčius išreikštą substratinę specializaciją, nepatvirtinta charakterizuotos peptidazės svarba *G. thermoleovorans* DSM 15325 mitybai. Bakterijų kolagenolizinių peptidazių sąveikos su kolagenu domenai (8, 9), charakterizavus GT-IU32 domeninę organizaciją, nenustatyti, tuo tarpu charakterizuotai peptidazei būdingas GT-IU32-CGD, tikėtina užtikrinantis charakterizuotą GT-IU32 išreikšto giminingumo specifišką sąveiką su dgRNR. GT-IU32 sekos elementai, atitinkantys Mk0906 struktūroje nustatytą tikėtiną aktyvų centrą, prieinamą tik hidrofobinėms aminorūgščių grandinėms ar hidrofobinėms molekulėms (113), neidentifikuoti. Visgi GT-IU32-NGD tikėtino GT-IU32 katalizinio domeno struktūrinės organizacijos elementai, užtikrinantys aktyviojo centro prieinamumą mažos molekulinės masės fibriliniams substratams, bet ribojantys globulinių substratų patekimą į aktyvų centrą, pagrįstai tikėtini – GT-IU32 homodimeras peptidolizavo tik iš dalies denatūruotą kolageną. GT-IU32 homodimeras geobacilos citoplazmoje, tikėtina, peptidolizuoja su RNR molekulėmis sąveikaujančių baltymų, svarbių ląstelės RNR funkcijų užtikrinimui ir/ar valdymui, kolagenui analogiškos struktūros domenais. GT-IU32 charakteristikos leidžia charakterizuotos peptidazės funkcinę svarbą sieti su namų ruošos funkcijų užtikrinimu *G. thermoleovorans* DSM 15325.

Charakterizavus *G. thermoleovorans* DSM 15325 konstitutyviai produkuotų ekstraląstelinių kolagenolizinių peptidazių svarbą proteolizinių geobacilų kolagenolizinio potencialo užtikrinimui, taip pat netiesiogiai nustatytas geobacilų gebėjimas adaptyviai valdyti konstitutyvių kolagenolizinių metalo peptidazių produkciją į ekstraląstelinę aplinką bei kolageno įsisavinimo efektyvinimą. Proteolizinių geobacilų pradinių kolageno įsisavinimo etapų valdymo charakterizavimo svarba pažymi *G. thermoleovorans* DSM 15325 kolagenolizinio potencialo tyrimo plėtotės svarbą. GT-SM3B ir GT-IU32 charakterizavimo rezultatai taip pat pažymi charakterizuotų endopeptidazių tyrimo plėtotės svarbą. GT-SM3B svarba kolageno oligopeptidų įsisavinimui bei *G. thermoleovorans* DSM 15325

adaptaciniam plastiškumui *in vivo* išlieka nedetalizuotas. Charakterizuotos oligopeptidazės apibrėžtas biotechnologinis pritaikomumas taip pat išlieka nedetalizuotas. GT-IU32 kolagenolizinis aktyvumas patvirtintas, tačiau katalizinis mechanizmas išlieka nenustatytas. U32 proteolizinių fermentų šeimos funkcinis heterogeniškumas netiesiogiai patvirtintas, nepatvirtinus GT-IU32 svarbos *G. thermoleovorans* DSM 15325 mitybai, tačiau pagrįstai tikėtina GT-IU32 svarba namų ruošos funkcijų užtikrinimui *in vivo* išlieka nedetalizuota. Svarbu plėtoti GT-IU32 tyrimą atsižvelgus į pagrįstai tikėtiną GT-IU32 ir GT-TU32 tarpusavio sąveiką *G. thermoleovorans* DSM 15325 (197). Charakterizuotos erdvinės struktūros GT-IU32-CGD, tipišku atveju nebūdingo U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių domeninei organizacijai, tikėtina užtikrinamos GT-IU32 specifinės sąveikos su dgRNR funkcinė svarba išlieka nedetalizuota, tuo tarpu analogiški GT-IU32-CGD domenai visgi identifikuoti charakterizuotų U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių sekose (1), taip pat ir U32 proteolizinių fermentų šeimos holotipinės PrtC peptidazės sekoje (9).

Charakterizuotų GT-SM3B ir GT-IU32 priskirtinumas proteolizinių fermentų šeimoms patvirtintas (1, 256). GT-SM3B priskirta M3 proteolizinių fermentų šeimos M3B pošeimio oligopeptidazėms F – MEROPS M03.007 (1). GT-IU32 priskirta U32 proteolizinių fermentų šeimos *Helicobacter*-tipo kolagenazėms – MEROPS U32.002 (256). GT-IU32-CGD analogiški domenai sėkmingai identifikuojami U32 proteolizinių fermentų šeimos peptidazių sekose (137).

Išvados

1. Optimaliomis augimui sąlygomis *G. thermoleovorans* DSM 15325 eksponentinės augimo fazės metu konstitutyviai į ekstraląstelinę aplinką produkavo Pz-peptidazių A ir B bei bacilolizino homologus.
2. GT-SM3B – termostabili cinko oligoendopeptidazė, gebanti homodimerizuotis.
3. GT-SM3B monomerui ir homodimerui būdingas platus oligopeptidolizinis aktyvumas kolageno oligopeptidams.
4. GT-IU32 identifikuota *G. thermoleovorans* DSM 15325 viduląstelių baltymų preparate masių spektrometrija. Eksponentinės augimo fazės metu GT-IU32 konstitutyvi raiška nepriklausė nuo *G. thermoleovorans* DSM 15325 kultivavimo temperatūros.
5. Termoaktyvus GT-IU32 homodimeras peptidolizavo iš dalies denatūruotą I tipo kolageną. GT-IU32 homodimerizavosi disulfidiniais tilteliais bei specifiskai *in vitro* sąveikavo su dgRNR. Cinko katijonai didino GT-IU32 monomero termostabilumą.
6. Aukšta skiriamąja geba išspręsta GT-IU32-CGD erdvinė struktūra – kompaktiška bei iškreipta atvira β -statinė, suformuota aštuonių antilygiagrečių β -juostų β -lakšto, gimininga transliacijos veiksnių domenų struktūrai.

Literatūros sąrašas

1. Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A. 2014. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 42:D503-D509.
2. Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R. 2016. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 44:D343-D350.
3. Puente XS, Sánchez LM, Overall CM, López-Otín C. 2003. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 4:544-558.
4. Lopez-Otin C, Bond JS. 2008. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Chem Biol* 283:30433-30437.
5. Rawlings ND, Barrett AJ. 2013. Introduction: peptidases of unknown catalytic type, p 3747-3749. *In* Rawlings ND, Salvesen G (ed), *Handbook of proteolytic enzymes*, 3rd ed, vol 3. Academic Press, Cambridge, MA.
6. Page MJ, di Cera E. 2008. Evolution of peptidase diversity. *J Chem Biol* 283:30010-30014.
7. Rawlings ND. 2013. Identification and prioritization of novel uncharacterized peptidases for biochemical characterization. *Database* 2013 bat022. doi:10.1093/database/bat022.
8. Duarte AS, Correia A, Esteves AC. 2016. Bacterial collagenases – a review. *Crit Rev Microbiol* 42:106-126.
9. Zhang Y-Z, Ran L-Y, Li C-Y, Chen X-L. 2015. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Appl Environ Microbiol* 81:6098-6107.
10. Suzuki Y, Tsujimoto Y, Matsui H, Watanabe K. 2006. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *J Biosci Bioeng* 102:73-81.
11. Shoulders MD, Raines RT. 2009. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 78:929-958.
12. Engel J, Bächinger HP. 1999. Collagen-like sequences in phages and bacteria. *Proc Indian Acad Sci (Chem Sci)* 111:81-86.

13. Watanabe K. 2004. Collagenolytic proteases from bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:520-526.
14. Brodsky B, Persikov AV. 2005. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem* 70:301-339.
15. Hulmes DJS. 2008. Collagen diversity, synthesis and assembly, p 15-41. *In* Fratzl P (ed), *Collagen structure and mechanics*, Springer, New York, NY.
16. Ricard-Blum S, Ruggiero F, van der Rest M. 2005. The collagen superfamily. *Top Curr Chem* 247:35-84.
17. Engel J, Bächinger HP. 2005. Structure, stability and folding of the collagen triple helix. *Top Curr Chem* 247:7-33.
18. Birk DE, Bruckner P. 2005. Collagen suprastructures. *Top Curr Chem* 247:185-205.
19. Koide T, Nagata K. 2005. Collagen biosynthesis. *Top Curr Chem* 247:85-114.
20. Ayad S, Boot-Handford RP, Humphries MJ, Kadler KE, Shuttleworth CA. 1998. Collagen types I – XIX, p 43-125, *In* Ayad S, Boot-Handford RP, Humphries MJ, Kadler KE, Shuttleworth CA (ed), *The extracellular matrix. FactsBook*, 2 ed, Academic Press, San Diego, CA.
21. Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. 2007. Collagens at a glance. *J Cell Sci* 120:1955-1958.
22. Perumal S, Antipova O, Orgel JP. 2008. Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2824-2829.
23. Lukomski S, Nakashima K, Abdi I, Cipriano VJ, Ireland RM, Reid SD, Adams GG, Musser JM. 2000. Identification and characterization of the *scl* gene encoding a group A *Streptococcus* extracellular protein virulence factor with similarity to human collagen. *Infect Immun* 68:6542-6553.
24. Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M. 2002. A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Mol Microbiol* 45:169-178.
25. Waller LN, Stump MJ, Fox KF, Harley WM, Fox A, Stewart GC, Shahgholi M. 2005. Identification of a second collagen-like glycoprotein produced by

- Bacillus anthracis* and demonstration of associated spore-specific sugars. J Bacteriol 187:4592-4597.
26. Ghosh N, McKillop TJ, Jowitt TA, Howard M, Davies H, Holmes DF, Roberts IS, Bella J. Collagen-like proteins in pathogenic *E. coli* strains. PLoS One 7(6):e37872. doi: 10.1371/journal.pone.0037872.
 27. Whatmore AM. 2001. *Streptococcus pyogenes sclB* encodes a putative hypervariable surface protein with a collagen-like repetitive structure. Microbiology 147:419-429.
 28. Mohs A, Silva T, Yoshida T, Amin R, Lukomski S, Inouye M, Brodsky B. 2007. Mechanism of stabilization of a bacterial collagen triple helix in the absence of hydroxyproline. J Biol Chem 282:29757-29765.
 29. Yu Z, Mirochnitchenko O, Xu C, Yoshizumi A, Brodsky B, Inouye M. 2010. Noncollagenous region of the streptococcal collagen-like protein is a trimerization domain that supports refolding of adjacent homologous and heterologous collagenous domains. Protein Sci 19:775-785.
 30. Yu Z, Brodsky B, Inouye M. 2011. Dissecting a bacterial collagen domain from *Streptococcus pyogenes*: sequence and length-dependent variations in triple helix stability and folding. J Biol Chem 286:18960-18968.
 31. Leski TA, Caswell CC, Pawlowski M, Klinke DJ, Bujnicki JM, Hart SJ, Lukomski S. 2009. Identification and classification of *bcl* genes and proteins of *Bacillus cereus* group organisms and their application in *Bacillus anthracis* detection and fingerprinting. Appl Environ Microbiol 75:7163-7172.
 32. Zhao X, Wang Y, Shang Q, Li Y, Hao H, Zhang Y, Guo Z, Yang G, Xie Z, Wang R. 2015. Collagen-like proteins (ClpA, ClpB, ClpC, and ClpD) are required for biofilm formation and adhesion to plant roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. PloS One 10(2):e0117414. doi:10.1371/jpone.0117414.
 33. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev 62:597-635.
 34. Dioszegi M, Cannon P, van Wart HE. 1995. Vertebrate collagenases. Methods Enzymol 248:413-431.
 35. Lekina E, Meritts MV, Kuznetsova N, Leikin S. 2002. Type I collagen is thermally unstable at body temperature. Proc Natl Acad Sci USA 99:1314-1318.

36. Miyake R, Shigeri Y, Tatsu Y, Yumoto N, Umekawa M, Tsujimoto Y, Matsui H, Watanabe K. 2005. Two thimet oligopeptidase-like Pz peptidases produced by a collagen-degrading thermophile, *Geobacillus collagenovorans* MO-1. *J Bacteriol* 187:4140-4148.
37. Fukushima J, Shimura Y. 2013. Vibrio collagenase, p 604-606. *In* Rawlings ND, Salvesen G (ed), *Handbook of proteolytic enzymes*, 3rd ed, vol 1. Academic Press, Cambridge, MA.
38. Lecroisey A, Keil-Dlouha V, Woods DR, Perrin D, Keil B. 1975. Purification, stability and inhibition of the collagenase from *Achromobacter iophagus*. *FEBS Lett* 59:167-172.
39. Hare P, Long S, Robb FT, Woods DR. 1981. Regulation of exoprotease production by temperature and oxygen in *Vibrio alginolyticus*. *Arch Microbiol* 130:276-280.
40. Keil B. 1992. *Vibrio alginolyticus* ("Achromobacter") collagenase: biosynthesis, function and application. *Matrix Suppl* 1:127-133.
41. Lee JH, Kim GT, Lee JY, Jun HK, Yu JH, Kong IS. 1998. Isolation and sequence analysis of metalloprotease gene from *Vibrio mimicus*. *Biochim Biophys Acta* 1384:1-6.
42. Lee JH, Ahn SH, Lee EM, Jeong SH, Kim YO, Lee SJ, Kong IS. 2005. The FAXWXXT motif in the carboxyl terminus of *Vibrio mimicus* metalloprotease is involved in binding to collagen. *FEBS Lett* 579:2507-2513.
43. Kim SK, Yang JY, Cha J. 2002. Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease gene from *Vibrio parahaemolyticus* 04. *Gene* 283:277-283.
44. Bond MD, van Wart HE. 1984. Relationship between the individual collagenases of *Clostridium histolyticum*: evidence for evolution by gene duplication. *Biochemistry* 23:3092-3099.
45. van Wart HE. 2013. Clostridium collagenases, p 607-611. *In* Rawlings ND, Salvesen G (ed), *Handbook of proteolytic enzymes*, 3rd ed, vol 1. Academic Press, Cambridge, MA.
46. French MF, Bhowan A, van Wart HE. 1992. Identification of *Clostridium histolyticum* collagenase hyperreactive sites in type I, II, and III collagens: lack of correlation with local triple helical stability. *J Protein Chem* 11:83-97.

47. Matsushita O, Jung CM, Katayama S, Minami J, Takahashi Y, Okabe A. 1999. Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum*. J Bacteriol 181:923-933.
48. Eckhard U, Schönauer E, Nüss D, Brandstetter H. 2011. Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis. Nat Struct Mol Biol 18:1109-1114.
49. Uesugi Y, Arima J, Usuki H, Iwabuchi M, Hatanaka T. 2008. Two bacterial collagenolytic serine proteases have different topological specificities. Biochim Biophys Acta 1784:716-726.
50. Uesugi Y, Usuki H, Arima J, Iwabuchi M, Hatanaka T. 2011. Molecular dissection of *Streptomyces* trypsin on substrate recognition. Biochim Biophys Acta 1814:1295-1304.
51. Uesugi Y, Usuki H, Iwabuchi M, Hatanaka T. 2009. The role of Tyr71 in *Streptomyces* trypsin on the recognition mechanism of structural protein substrates. FEBS J 276:5634-5646.
52. Ran LY, Su HN, Zhao GY, Gao X, Zhou MY, Wang P, Zhao HL, Xie BB, Zhang XY, Chen XL, Zhang YZ. 2013. Structural and mechanistic insights into collagen degradation by a bacterial collagenolytic serine protease in the subtilisin family. Mol Microbiol 90:997-1010.
53. Wang YK, Zhao GY, Li Y, Chen XL, Xie BB, Su HN, Zhang YZ. 2010. Mechanistic insight into the function of the C-terminal PKD domain of the collagenolytic serine protease deseasin MCP-01 from deep sea *Pseudoalteromonas* sp. SM9913: binding of the PKD domain to collagen results in collagen swelling but does not unwind the collagen triple helix. J Biol Chem 285:14285-14291.
54. Chen XL, Xie BB, Lu JT, He HL, Zhang YZ. 2007. A novel type of subtilase from the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913: catalytic and structural properties of deseasin MCP-01. Microbiology 153:2116-2125.
55. Zhao GY, Chen XL, Zhao HL, Xie BB, Zhou BC, Zhang YZ. 2008. Hydrolysis of insoluble collagen by deseasin MCP-01 from deep-sea *Pseudoalteromonas* sp. SM9913: collagenolytic characters, collagen binding

- ability of C-terminal polycystic kidney disease domain, and implication for its novel role in deep-sea sedimentary particulate organic nitrogen degradation. *J Biol Chem* 283:36100-36107.
56. Ran LY, Su HN, Zhou MY, Wang L, Chen XL, Zhang XY, Xie B-B, Song XY, Shi M, Qin QL, Zhou BC, Zhang YZ. 2014. Characterization of a novel subtilisin-like protease myroicolsin from deep-sea bacterium *Myroides profundus* D25 and molecular insight into its collagenolytic mechanism. *J Biol Chem* 289:6041-6053.
 57. Tsuruoka N, Nakayama T, Ashida M, Hemmi H, Nakao M, Minakata H, Oyama H, Oda K, Nishino T. 2003. Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: purification, characterization, gene cloning, and heterologous expression. *Appl Environ Microbiol* 69:162-169.
 58. Wlodawer A, Li M, Gustchina A, Tsuruoka N, Ashida M, Minakata H, Oyama H, Oda K, Nishino T, Nakayama T. 2004. Crystallographic and biochemical investigations of kumamolisin-As, a serine-carboxyl peptidase with collagenase activity. *J Biol Chem* 279:21500-21510.
 59. Guo H, Wlodawer A, Guo H. 2005. A general acid-base mechanism for the stabilization of a tetrahedral adduct in a serine-carboxyl peptidase: a computational study. *J Am Chem Soc* 127:15662-15663.
 60. Nakayama T, Tsuruoka N, Akai M, Nishino T. 2000. Thermostable collagenolytic activity of a novel thermophilic isolate, *Bacillus* sp. strain NTAP-1. *J Biosci Bioeng* 89:612-614.
 61. Murphy G, Reynolds JJ. 2002. Extracellular matrix degradation, p 343-384. *In* Royce PM, Steinmann B (ed), *Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic and medical aspects*, 2ed, Wiley-Liss, New York, NY.
 62. Barrett AJ, Rawlings ND. 1992. Oligopeptidases, and the emergence of the prolyl oligopeptidase family. *Biol Chem Hoppe Seyler* 373:353-360.
 63. Kawasaki A, Nakano H, Hosokawa A, Nakatsu T, Kato H, Watanabe K. 2010. The exquisite structure and reaction mechanism of bacterial Pz-peptidase A toward collagenous peptides: X-ray crystallographic structure analysis of Pz-peptidase A reveals differences from mammalian thimet oligopeptidase. *J Biol Chem* 285:34972-34980.

64. Petretera A, Amstutz B, Gioia M, Hähnlein J, Baici A, Selchow P, Ferraris DM, Rizzi M, Sbardella D, Marini S, Coletta M, Sander P. 2012. Functional characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* zinc metallopeptidase Zmp1 and identification of potential substrates. *Biol Chem* 393:631-640.
65. Caler EV, Vaena de Avalos S, Haynes PA, Andrews NM, Burleigh BA. 1998. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion in *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J* 17:4975-4986.
66. Szeltner Z, Polgar L. 2008. Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidases. *Curr Protein Pept Sci* 9:96-107.
67. Rawlings ND, Barrett AJ. 2013. Introduction: metallopeptidases and their clans, p 325-370. *In* Rawlings ND, Salvesen G (ed), *Handbook of proteolytic enzymes*, 3rd ed, vol 1. Academic Press, Cambridge, MA.
68. Gomis-Rüth FX. 2008. Structure and mechanism of metallo-carboxypeptidases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43:319-345.
69. Monnet V, Nardi M, Chopin A, Chopin MC, Gripon JC. 1994. Biochemical and genetic characterization of PepF, an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* 269:32070-32076.
70. Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P. 2006. Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:394-406.
71. Vimr ER, Green L, Miller CG. 1983. Oligopeptidase-deficient mutants of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 153:1259-1265.
72. Lopez-Kleine L, Monnet V, Pechoux C, Trubuil A. 2008. Role of bacterial peptidase F inferred by statistical analysis and further experimental validation. *HFSP J* 2:29-41.
73. Novak P, Ray PH, Dev IK. 1986. Localization and purification of two enzymes from *Escherichia coli* capable of hydrolyzing a signal peptide. *J Biol Chem* 261:420-427.
74. Kanamaru K, Stephenson S, Perego M. 2002. Overexpression of the PepF oligopeptidase inhibits sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184:43-50.
75. Moitinho-Silva L, Kondo MY, Oliveira LCG, Okamoto DN, Paes JA, Machado MFM, Veronez CL, Motta G, Andrade SS, Juliano MA, Ferreira HB, Juliano L, Gouvea IE. 2013. *Mycoplasma hyopneumoniae* in vitro

- peptidase activities: identification and cleavage of kallikrein-kinin system-like substrates. *Vet Microbiol* 163:264-273.
76. Ansai T, Yu W, Urnowey S, Barik S, Takehara T. 2003. Construction of a *pepO* gene-deficient mutant of *Porphyromonas gingivalis*: potential role of endopeptidase O in the invasion of host cells. *Oral Microbiol Immunol* 18:398-400.
 77. Agarwal V, Kuchipudi A, Fulde M, Riesbeck K, Bergmann S, Blom AM. 2013. *Streptococcus pneumoniae* endopeptidase O (PepO) is a multifunctional plasminogen- and fibronectin-binding protein, facilitating evasion of innate immunity and invasion of host cells. *J Biol Chem* 288:6849-6863.
 78. Asdornnithee S, Himeji E, Akiyama K, Sasaki T, Takata R. 1995. Isolation and characterization of Pz-peptidase from *Bacillus licheniformis* N22. *J Ferment Bioeng* 79:200-204.
 79. Chao SH, Cheng TH, Shaw CY, Lee MH, Hsu YH, Tsai YC. 2006. Characterization of a novel PepF-like oligopeptidase secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* 23-7A. *Appl Environ Microbiol* 72:968-971.
 80. Rawlings ND, Barrett AJ. 1997. Classification of peptidases by comparisons of primary and tertiary structures, p 13-21. *In* Hopsu-Havu VK, Järvinen M, Kirschke H (ed), *Proteolysis in cell functions*, IOS Press, Amsterdam.
 81. Rawlings ND. 2014. Unusual species distribution and horizontal transfer of peptidases, p 285-314. *In* Orengo C, Bateman A (ed), *Protein families: relating protein sequence, structure, and function*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
 82. Potempa J, Pavloff N, Travis J. 1995. *Porphyromonas gingivalis*: a proteinase/gene accounting audit. *Trends Microbiol* 3:430-434.
 83. Kato T, Takahashi N, Kuramitsu HK. 1992. Sequence analysis and characterization of the *Porphyromonas gingivalis prtC* gene, which expresses a novel collagenase activity. *J Bacteriol* 174:3889-3895.
 84. Takahashi N, Kato T, Kuramitsu HK. 1991. Isolation and preliminary characterization of the *Porphyromonas gingivalis prtC* gene expressing collagenase activity. *FEMS Microbiol Lett* 84:135-138.
 85. Aoki T, Kuroki T, Otake S, Meyer TF. 1993. Molecular cloning of *Porphyromonas gingivalis* collagenase gene. *J Dent Res* 72(Suppl 1):S151.

86. Otogoto J, Kuramitsu HK. 1993. Isolation and characterization of the *Porphyromonas gingivalis prtT* gene, coding for protease activity. *Infect Immun* 61:117-123.
87. Wang J, Qi J, Zhao H, He S, Zhang Y, Wei S, Zhao F. 2013. Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Sci Rep* 3:1843. doi:10.1038/srep01843.
88. Wu Y, Chen L, Yan J, Zhuang C, Gu Z. 2007. Effect of *Porphyromonas gingivalis* PrtC on cytokine expression in ECV304 endothelial cells and its level in subgingival plaques from patients with chronic periodontitis. *Acta Pharmacol Sin* 28:1015-1023.
89. Bodinka A, Schmidt H, Henkel B, Flemmig TF, Klaiber B, Karch H. 1994. Polymerase chain reaction for the identification of *Porphyromonas gingivalis* collagenase genes. *Oral Microbiol Immunol* 9:161-165.
90. Slots J, Flynn MJ, Li G. 1995. Polymerase chain reaction analysis of the *Porphyromonas gingivalis* collagenase gene. *Clin Infect Dis* 20(Suppl 2):S167-S168.
91. Odell LJ, Baumgartner JC, Xia T, David LL. 1999. Survey for collagenase gene *prtC* in *Porphyromonas gingivalis* and *Porphyromonas endodontalis* isolated from endodontic infections. *J Endod* 25:555-558.
92. Wittstock M, Schmidt H, Flemmig TF, Karch H. 2000. Heterogeneity of the *prtC* gene of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 15:33-39.
93. Beikler T, Ehmke B, Wittstock M, Schmidt H, Karch H, Flemmig TF. 2003. Serum antibody reactivity against recombinant PrtC of *Porphyromonas gingivalis* following periodontal therapy. *J Periodontal Res* 38:276-281.
94. Norris JM, Love DN. 2000. The association of two recombinant proteinases of a feline strain of *Porphyromonas gingivalis* with periodontal disease in cats. *Vet Microbiol* 71:69-80.
95. Zhao H, Li X, Johnson DE, Mobley HLT. 1999. Identification of protease and *rpoN*-associated genes of uropathogenic *Proteus mirabilis* by negative selection in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Microbiology* 145:185-195.

96. Kavermann H, Burns BP, Angermüller K, Odenbreit S, Fischer W, Melchers K, Haas R. 2003. Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J Exp Med* 197:813-822.
97. Williams TL, Dao M. 2010. Prevalence of collagenase gene and activity in cariogenic streptococci, abstr K-770. Abstr 110th General Meeting of the American Society for Microbiology. ASM, Washington, DC.
98. Ioannides M. 2004. Detection, cloning, and analysis of a U32 collagenase in *Streptococcus mutans* GS-5. Master thesis. University of South Florida, Tampa, FL.
99. Han TK, Zhang C, Dao ML. 2006. Identification and characterization of collagen binding-activity in *Streptococcus mutans* wall-associated protein: a possible implication in dental root caries and endocarditis. *Biochem Biophys Res Commun* 343:787-792.
100. Moyer ZD, Zeng L, Burne RA. 2014. Modification of gene expression and virulence traits in *Streptococcus mutans* in response to carbohydrate availability. *Appl Environ Microbiol* 80:972-985.
101. Argimon S, Caufield PW. 2011. Distribution of putative virulence genes in *Streptococcus mutans* strains does not correlate with caries experience. *J Clin Microbiol* 49:984-992.
102. Carlson SA, Meyerholz DK, Stabel TJ, Jones BD. 2001. Secretion of a putative cytotoxin in multiple antibiotic resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104. *Microb Pathog* 31:201-204.
103. Wu MT, Carlson SA, Meyerholz DK. 2002. Cytopathic effects observed upon expression of a repressed collagenase gene present in *Salmonella* and related pathogens: mimicry of a cytotoxin from multiple antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104. *Microb Pathog* 33: 279-287.
104. Buchmeier N, Bossie S, Chen C-Y, Fang FC, Guiney DG, Libby SJ. 1997. SlyA, a transcriptional regulator of *Salmonella typhimurium*, is required for resistance to oxidative stress and is expressed in the intracellular environment of macrophages. *Infect Immun* 65:3725-3730.
105. Carlson SA, McCuddin ZP, Wu MT. 2005. SlyA regulates the collagenase-mediated cytopathic phenotype in multiresistant *Salmonella*. *Microb Pathog* 38:181-187.

106. Xiong N, Brewer MT, Anderson KL, Weeks KE, Carlson SA. 2011. Expression of a collagenase that enables blood-brain barrier penetration for *Salmonella* implicated in bovine encephalopathies. *Microb Pathog* 51:230-232.
107. Zhao Y. 2002. Virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Ph.D. thesis. Utrecht University, Utrecht.
108. Han HJ, Taki T, Kondo H, Hirono I, Aoki T. 2008. Pathogenic potential of a collagenase gene from *Aeromonas veronii*. *Can J Microbiol* 54:1-10.
109. Carson V. 2006. Cloning and analysis of putative collagenases of the U32 family in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus agalactiae* (Group B streptococci). Master thesis. University of South Florida, Tampa, FL.
110. Navais R, Méndez J, Pérez-Pascual D, Cascales D, Guijarro JA. 2014. The *yypAB* operon of *Yersinia ruckeri* encoding two putative U32 peptidases is involved in virulence and induced under microaerobic conditions. *Virulence* 5:1-6.
111. Deng H, Secombes CJ. 2014. Action in pairs: two tandem genes in the fish pathogen *Yersinia ruckeri* are virulence factors. *Virulence* 5:585-586.
112. Keil-Dlouha V, Misrahi R, Keil B. 1976. The induction of collagenase and a neutral proteinase by their high molecular weight substrates in *Achromobacter iophagus*. *J Mol Biol* 107:293-305.
113. Schacherl M, Montada AAM, Brunstein E, Baumann U. 2015. The first crystal structure of the peptidase domain of the U32 peptidase family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* D71:2505-2512.
114. Kunin V, Chan B, Sitbon E, Lithwick G, Pietrokovski S. 2001. Consistency analysis of similarity between multiple alignments: prediction of protein function and fold structure from analysis of local sequence motifs. *J Mol Biol* 307:939-949.
115. Martin-Galiano AJ, Overweg K, Ferrandiz MJ, Reuter M, Wells JM, de la Campa AG. 2005. Transcriptional analysis of the acid tolerance response in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 151:3935-3946.
116. Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Götz F. 2005. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol* 71:2663-2676.

117. Budde I, Steil L, Scharf C, Völker U, Bremer E. 2006. Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology* 152:831-853.
118. Mostertz J, Scharf C, Hecker M, Homuth G. 2004. Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. *Microbiology* 150:497-512.
119. Filiatrault MJ, Wagner VE, Bushnell D, Haidaris CG, Iglewski BH, Passador L. 2005. Effect of anaerobiosis and nitrate on gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 73:3764-3772.
120. Filiatrault MJ, Picardo KF, Ngai H, Passador L, Iglewski BH. 2006. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes involved in virulence and anaerobic growth. *Infect Immun* 74:4237-4245.
121. Houle MA, Grenier D, Plamondon P, Nakayama K. 2003. The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-gingipain. *FEMS Microbiol Lett* 221:181-185.
122. Watanabe K. 2013. Pz-peptidase A, p 536-539. In Rawlings ND, Salvesen G (ed), *Handbook of proteolytic enzymes*, 3rd ed, vol 1. Academic Press, Cambridge, MA.
123. Sugihara Y, Kawasaki A, Tsujimoto Y, Matsui H, Watanabe K. 2007. Potencies of phosphine peptide inhibitors of mammalian thimet oligopeptidase and neurolysin on two bacterial Pz peptidases. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:594-597.
124. Nakano H, Hosokawa A, Tagawa R, Inaka K, Ohta K, Nakatsu T, Kato H, Watanabe K. 2012. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Pz peptidase B from *Geobacillus collagenovorans* MO-1. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* F68:757-759.
125. van den Burg B, Eijsink V. 2013. Thermolysin and related *Bacillus metallopeptidases*, p 540-553. In Rawlings ND, Salvesen G (ed), *Handbook of proteolytic enzymes*, 3rd ed, vol 1. Academic Press, Cambridge, MA.
126. Mansfeld J. 2013. Stearolysin, p 554-560. In Rawlings ND, Salvesen G (ed), *Handbook of proteolytic enzymes*, 3rd ed, vol 1. Academic Press, Cambridge, MA.

127. Okamoto M, Yonejima Y, Tsujimoto Y, Suzuki Y, Watanabe K. 2001. A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. strain MO-1. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:103-108.
128. Itoi Y, Horinaka M, Tsujimoto Y, Matsui H, Watanabe K. 2006. Characteristic features in the structure and collagen-binding ability of a thermophilic collagenolytic protease from the thermophile *Geobacillus collagenovorans* MO-1. *J Bacteriol* 188:6572-6579.
129. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
130. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785-786.
131. Camacho C. 2013. BLAST+ release notes. *In* BLAST help, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD.
132. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729.
133. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JP, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
134. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. 2015. The I-TASSER suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12:7-8.
135. Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Bryant SH. 2014. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res* 43: D222-D226.
136. Sigrist CJA, de Castro E, Cerutti L, Cuče BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I. 2013. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res* 41:D344-D347.
137. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer ELL, Tate J, Punta M. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42:D222-D230.

138. Solovyev V, Salamov A. 2011. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences, p 61-78. *In* Li RW (ed), *Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies*, Nova Science Publishers, New York, NY.
139. Gautheret D, Lambert A. 2001. Direct RNA motif definition and identification from multiple sequence alignments using secondary structure profiles. *J Mol Biol* 313:1003-1011.
140. Macke TJ, Ecker DJ, Gutell RR, Gautheret D, Case DA, Sampath R. 2001. RNA Motif, an RNA secondary structure definition and search algorithm. *Nucleic Acids Res* 29:4724-4735.
141. Dehal PS, Joachimiak MP, Price MN, Bates JT, Baumohl JK, Dylan C, Friedland GD, Huang KH, Keller K, Novichkov PS, Dubchak IL, Alm EJ, Arkin AP. 2010. MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics. *Nucleic Acids Res* 38:D396-D400.
142. Taboada B, Ciria R, Martinez-Guerrero CE, Merino E. 2012. ProOpDB: Prokaryotic Operon DataBase. *Nucleic Acids Res* 40:D627-D631.
143. Leejeerajumnean A, Ames JM, Owes JD. 2000. Effect of ammonia on the growth of *Bacillus* species and some other bacteria. *Lett Appl Microbiol* 30:385-389.
144. Gogly B, Groult N, Hornebeck W, Godeau G, Pellat B. 1998. Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. *Anal Biochem* 255:211-216.
145. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. 1994. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 218:325-329.
146. Atlas RM. 2010. Media, alphabetical, p 934. *In* Atlas RM, *Handbook of microbiological media*, 4th ed, CRC Press, Boca Raton, FL.
147. Atlas RM. 2010. Media, alphabetical, p 981. *In* Atlas RM, *Handbook of microbiological media*, 4th ed, CRC Press, Boca Raton, FL.
148. Starcher B. 2001. A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. *Anal Biochem* 292:125-129.
149. Zhang Y, Fu Y, Zhou S, Kang L, Li C. 2013. A straightforward ninhydrin-based method for collagenase activity and inhibitor screening of collagenase using spectrophotometry. *Anal Biochem* 437:46-48.

150. Goulas T, Cuppari A, Garcia-Castellanos R, Snipas S, Glockshuber R, Arolas JL, Gomis-Rüth FX. 2014. The pCri system: a vector collection for recombinant protein expression and purification. *PLoS ONE* 9(11):e112643. doi:10.1371/journal.pone.0112643.
151. Kabsch W. 2010. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* D66:125-132.
152. Evans P. 2006. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* D62:72-82.
153. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AGW, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS. 2011. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* D67:235-242.
154. Sheldrick GM. 2010. Experimental phasing with *SHELXC/D/E*: combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* D66:479-485.
155. Carranza C, Inisan A-G, Mouthuy-Knoops E, Cambillau C, Roussel A. 1999. Turbo-Frodo, p 89-90. *In AFMB Activity Report 1996-1999*, CNRS-UPR 9039, Marseille.
156. Adams PD, Grosse-Kunstleve RW, Hung L-W, Ioerger TR, McCoy AJ, Moriarty NW, Read RJ, Sacchettini JC, Sauter NK, Terwilliger TC. 2002. *PHENIX*: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* D58:1948-1954.
157. Blanc E, Roversi P, Vornrhein C, Flensburg C, Leac SM, Bricogne G. 2004. Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in *BUSTER-TNT*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* D60:2210-2221.
158. Mallorqui-Fernandez N, Manandhar SP, Mallorqui-Fernandez G, Uson I, Wawrzonek K, Kantyka T, Sola M, Thøgersen IB, Enghild JJ, Potempa J, Gomis-Rüth FX. 2008. A new autocatalytic activation mechanism for cysteine proteases revealed by *Prevotella intermedia* interpain A. *J Biol Chem* 283:2871-2882.
159. Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. 2010. *MolProbity*: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* D66:12-21.
160. Huber R. 1965. Die automatisierte faltmolekülmethode. *Acta Cryst* 19:353-356.

161. McCoy AJ. 2007. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with *Phaser*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* D63:32-41.
162. Vriend G. 1990. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* 8:52-56.
163. Brünger AT, Adams PD, Clore GM, de Lano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL. 1998. Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* D54:905-921.
164. Krissinel E, Henrick K. 2005. Detection of protein assemblies in crystals, p 163-174. *In* Berthold MR, Glen R, Diederichs K, Kohlbacher O, Fisher I (ed), *Computational life sciences. Proceedings of the 1st International Symposium CompLife 2005*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
165. Lawrence MC, Colman PM. 1993. Shape complementarity at protein/protein interfaces. *J Mol Biol* 234:946-950.
166. Holm L, Rosenström P. 2010. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* 38:W545-W549.
167. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605-1612.
168. Chavira R, Burnett TJ, Hagemann JH. 1984. Assaying proteinases with azocoll. *Anal Biochem* 136:446-450.
169. Kuisiene N, Raugalas J, Chitavichius D. 2004. *Geobacillus lituanicus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1991-1995.
170. Peterson R, Grinyer J, Joss J, Khan A, Nevalainen H. 2009. Fungal proteins with mannanase activity identified directly from a Congo Red stained zymogram by mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 79:374-377.
171. Petkauskaite R, Lukosius D, Dębski J, Jasilionis A, Dadlez M, Kieraite I, Timonina A, Kuisiene N. 2014. Identification of proteins involved in starch and polygalacturonic acid degradation using LC/MS. *Cent Eur J Biol* 9:708-716.

172. Martinez-Moya TF, Newbold CJ, Wallace RJ, Moyano FJ. 2002. Effects of high-molecular-mass substrates on protein migration during sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 23:1-7.
173. Bendtsen JD, Kiemer L, Fausbøll A, Brunak S. 2005. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol* 5:58. doi:10.1186/1471-2180-5-58.
174. Yang CK, Ewis HE, Zhang XZ, Lu CD, Hu HJ, Pan Y, Abdelal AT, Tai PC. 2011. Nonclassical protein secretion by *Bacillus subtilis* in the stationary phase is not due to cell lysis. *J Bacteriol* 193:5607-5615.
175. Holmes MA, Matthews BW. 1982. Structure of thermolysin refined at 1.6 Å resolution. *J Mol Biol* 160:623-639.
176. Stark W, Pauptit RA, Wilson KS, Jansonius JN. 1992. The structure of neutral protease from *Bacillus cereus* at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem* 207:781-791.
177. Kubo M, Murayama K, Seto K, Imanaka T. 1988. Highly thermostable neutral protease from *Bacillus stearothermophilus*. *J Ferment Technol* 66:13-17.
178. Nishiya Y, Imanaka T. 1990. Cloning and nucleotide sequences of the *Bacillus stearothermophilus* neutral protease gene and its transcriptional activator gene. *J Bacteriol* 172:4861-4869.
179. van den Burg B, Eijsink VG, Stulp BK, Venema G. 1989. One-step affinity purification of *Bacillus* neutral proteases using bacitracin-silica. *J Biochem Biophys Methods* 18:209-219.
180. Mäkinen PL, Clewell DB, An F, Mäkinen KK. 1989. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain 0G1-10). *J Biol Chem* 264:3325-3334.
181. Auld DS. 2013. Catalytic mechanisms for metallopeptidases, p 370-396. *In* Rawlings ND, Salvesen G (ed), *Handbook of proteolytic enzymes*, 3rd ed, vol 1. Academic Press, Cambridge, MA.
182. Holmquist B, Vallee BL. 1974. Metal substitutions and inhibition of thermolysin: spectra of the cobalt enzyme. *J Biol Chem* 249:4601-4607.
183. Eijsink VGH, Veltman O, Aukema W, Vriend G, Venema G. 1995. Structural determinants of the stability of thermolysin-like proteinases. *Nat Struct Biol* 2:374-379.

184. Eijssink VGH, Matthews BW, Vriend G. 2011. The role of calcium ions in the stability and instability of a thermolysin-like protease. *Protein Sci* 20:1346-1355.
185. Gerdts CJ, Tereshko V, Yadav MK, Dementieva I, Collart F, Joachimiak A, Stevens RC, Kuhn P, Kossiakoff A, Ismagilov RF. 2006. Time-controlled microfluidic seeding in nL-volume droplets to separate nucleation and growth stages of protein crystallization. *Angew Chem Int Ed Engl* 45:8156-8160.
186. Oetjen J, Fives-Taylor P, Froeliger E. 2001. Characterization of a streptococcal endopeptidase with homology to human endothelin-converting enzyme. *Infect Immun* 69:58-64.
187. Awano S, Ansai T, Mochizuki H, Yu W, Tanzawa K, Turner AJ, Takehara T. 1999. Sequencing, expression and biochemical characterization of the *Porphyromonas gingivalis pepO* gene encoding a protein homologous to human endothelin-converting enzyme. *FEBS Lett* 460:139-144.
188. Miyake R, Kawamoto J, Wei YL, Kitagawa M, Kato I, Kurihara T, Esaki N. 2007. Construction of a low-temperature protein expression system using a cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. strain Ac10, as a host. *Appl Environ Microbiol* 73:4849-4856.
189. Yan TR, Azuma N, Kaminogawa S, Yamauchi K. 1987. Purification and characterization of substrate-size-recognizing metalloendopeptidase from *Streptococcus cremoris* H61. *Appl Environ Microbiol* 53:2296-2302.
190. Yan TR, Azuma N, Kaminogawa S, Yamauchi K. 1987. Purification and characterization of a novel metalloendopeptidase from *Streptococcus cremoris* H61. A metalloendopeptidase that recognizes the size of its substrate. *Eur J Biochem* 163:259-265.
191. Lin B, Averett WF, Novak J, Chatham WW, Hollingshead SK, Coligan JE, Egan ML, Pritchard DG. 1996. Characterization of PepB, a group B streptococcal oligopeptidase. *Infect Immun* 64:3401-3406.
192. Gomez-Ortiz M, Gomis-Rüth FX, Huber R, Aviles FX. 1997. Inhibition of carboxypeptidase A by excess zinc: analysis of the structural determinants by X-ray crystallography. *FEBS Lett* 400:336-340.
193. Baankreis R, van Schalkwijk S, Alting AC, Exterkate FA. 1995. The occurrence of two intracellular oligoendopeptidases in *Lactococcus lactis*

- and their significance for peptide conversion in cheese. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:386-392.
194. Tan PST, Pos KM, Konings WN. 1991. Purification and characterization of an endopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl Environ Microbiol* 57:3593-3599.
 195. Soeryapranataa E, Powersa JR, Ünlü G. 2007. Cloning and characterization of debittering peptidases, PepE, PepO, PepO2, PepO3, and PepN, of *Lactobacillus helveticus* WSU19. *Int Dairy J* 17:1096-1106.
 196. Drutel A. 2013. U32 peptidases among thermophilic bacteria: transcription analysis and cloning of the homolog of GK2550 from *Geobacillus thermoleovorans*. Bachelor thesis. Vilnius University, Vilnius.
 197. Drutel A. 2015. U32 peptidases of geobacilli: analysis of protein-protein interactions. Master thesis. Vilnius University, Vilnius.
 198. Campanaro S, Williams TJ, Burg DW, de Francisci D, Treu L, Lauro FM, Cavicchioli R. 2011. Temperature-dependent global gene expression in the Antarctic archaeon *Methanococcoides burtonii*. *Environ Microbiol* 13:2018-2038.
 199. Chen Z, Yu H, Li L, Hu S, Dong X. 2012. The genome and transcriptome of a newly described psychrophilic archaeon, *Methanlobus psychrophilus* R15, reveal its cold adaptive characteristics. *Environ Microbiol Rep* 4:633-641.
 200. Anderson L, Hunter CL, 2006. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol Cell Proteomics* 5:573-588.
 201. Graham RLJ, Pollock CE, Ternan NG, McMullan G. 2006. Top-down proteomic analysis of the soluble sub-proteome of the obligate thermophile, *Geobacillus thermoleovorans* T80: insights into its cellular processes. *J Proteome Res* 5:822-828.
 202. Wolff S, Otto A, Albrecht D, Zeng JS, Büttner K, Glückmann M, Hecker M, Becher D. 2006. Gel-free and gel-based proteomics in *Bacillus subtilis*: a comparative study. *Mol Cell Proteomics* 5:1183-1192.
 203. Stelder SK, Mahmud SA, Dekker HL, de Koning LJ, Brul S, de Koster CG. 2015. Temperature dependence of the proteome profile of the psychrotolerant pathogenic food spoiler *Bacillus weihenstephanensis* type strain WSBC 10204. *J Proteome Res* 14:2169-2176.

204. Voigt B, Albrecht D, Sievers S, Becher D, Bongaerts J, Evers S, Schweder T, Maurer K-H, Hecker M. 2015. High-resolution proteome maps of *Bacillus licheniformis* cells growing in minimal medium. *Proteomics* 15:2629-2633.
205. Goodchild A, Raftery M, Saunders NFW, Guilhaus M, Cavicchioli R. 2004. Biology of the cold adapted archaeon, *Methanococoides burtonii* determined by proteomics using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 3:1164-1176.
206. Chernov VM, Chernova OA, Medvedeva ES, Mouzykantov AA, Ponomareva AA, Shaymardanova GF, Gorshkov OV, Trushin MV. 2011. Unadapted and adapted to starvation *Acholeplasma laidlawii* cells induce different responses of *Oryza sativa*, as determined by proteome analysis. *J Proteomics* 7:2920-2936.
207. Amin S, Barnett GV, Pathak JA, Roberts CJ, Sarangapani PS. 2014. Protein aggregation, particle formation, characterization & rheology. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 19:438-449.
208. McCall KA, Huang C-C, Fierke CA. 2000. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* 130(Suppl 5):S1437-S1446.
209. Auld DS. 2009. The ins and outs of biological zinc sites. *Biometals* 22:141-148.
210. Rupp B. 2010. Protein structure, p 24. *In* Rupp B, *Biomolecular crystallography: principles, practice and application to structural biology*, Garland Science, New York, NY.
211. Rupp B. 2010. Proteins for crystallography, p 148. *In* Rupp B, *Biomolecular crystallography: principles, practice and application to structural biology*, Garland Science, New York, NY.
212. Fontana A, de Laureto PP, Spolaore B, Frare E, Picotti P, Zambonin M. 2004. Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim Pol* 51:299-321.
213. Gheyi T, Rodgers L, Romero R, Sauder JM, Burley SK. 2010. Mass spectrometry guided *in situ* proteolysis to obtain crystals for X-ray structure determination. *J Am Soc Mass Spectrom* 21:1795-1801.
214. Matthews BW. 1968. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* 33:491-497.
215. Carugo O, Argos P. 1997. Protein-protein crystal-packing contacts. *Protein Sci* 6:2261-2263.

216. Kantardjieff KA, Rupp B. 2003. Matthews coefficient probabilities: improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci* 12:1865-1871.
217. Evans RN, Blaha G, Bailey S, Steitz TA. 2008. The structure of LepA, the ribosomal back translocase. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4673-4678.
218. Parmeggiani A, Krab IM, Okamura S, Nielsen RC, Nyborg J, Nissen P. 2006. Structural basis of the action of pulvomycin and GE2270 A on elongation factor Tu. *Biochemistry* 45:6846-6857.
219. Vitagliano L, Ruggiero A, Masullo M, Cantiello P, Arcari P, Zagari A. 2004. The crystal structure of *Sulfolobus solfataricus* elongation factor 1 α in complex with magnesium and GDP. *Biochemistry* 43:6630-6636.
220. Cheng Z, Saito K, Pisarev AV, Wada M, Pisareva VP, Pestova TV, Gajda M, Round A, Kong C, Lim M, Nakamura Y, Svergun DI, Ito K, Song H. 2009. Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes Dev* 23:1106-1118.
221. Andersen GR, Nissen P, Nyborg J. 2003. Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends Biochem Sci* 28:434-441.
222. Rio DC. 2014. Electrophoretic mobility shift assays for RNA-protein complexes. *Cold Spring Harb Protoc* 2014(4):435-440. doi: 10.1101/pdb.prot080721.
223. Mathisen PM, Johnson JM, Kawczak JA, Tuohy VK. 1999. Visinin-like protein (VILIP) is a neuron-specific calcium-dependent double-stranded RNA-binding protein. *J Biol Chem* 274:31571-31576.
224. Brown RS. 2005. Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr Opin Struct Biol* 15:94-98.
225. Manche L, Green SR, Schmedt C, Mathews MB. 1992. Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol* 12:5238-5248.
226. Shen M, Xu Y, Jia R, Zhou X, Ye K. 2010. Size-independent and noncooperative recognition of dsRNA by the Rice stripe virus RNA silencing suppressor NS3. *J Mol Biol* 404:665-679.
227. Yang X, Li H, Huang Y, Liu S. 2013. The dataset for protein-RNA binding affinity. *Protein Sci* 22:1808-1811.

228. Masliah G, Barraud P, Allain FH. 2013. RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence. *Cell Mol Life Sci* 70:1875-1895.
229. Burge RG, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. 2014. Structural characterization of interactions between the double-stranded RNA-binding zinc finger protein JAZ and Nucleic Acids. *Biochemistry* 53:1495-1510.
230. Vuković L, Koh HR, Myong S, Schulten K. 2014. Substrate recognition and specificity of double-stranded RNA binding proteins. *Biochemistry* 53:3457-3466.
231. Lunde BM, Moore C, Varani G. 2007. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:479-490.
232. Gagnon MG, Lin J, Bulkley D, Steitz T. 2014. Crystal structure of elongation factor 4 bound to a clockwise ratcheted ribosome. *Science* 345:684-687.
233. Clementi N, Polacek N. 2010. Ribosome-associated GTPases: the role of RNA for GTPase activation. *RNA Biol* 7:521-527.
234. Wada M, Ito K. 2014. A genetic approach for analyzing the co-operative function of the tRNA mimicry complex, eRF1/eRF3, in translation termination on the ribosome. *Nucleic Acids Res* 42:7851-7866.
235. Jackson RJ, Lim DV, Dao ML. 1997. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*. *Curr Microbiol* 34:49-54.
236. Kuramitsu HK, Yoneda M, Madden T. 1995. Proteases and collagenases of *Porphyromonas gingivalis*. *Adv Dent Res* 9:37-40.
237. Boydston JA, Chen P, Steichen CT, Turnbough CL Jr. 2005. Orientation within the exosporium and structural stability of the collagen-like glycoprotein BclA of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 187:5310-5317.
238. Zeigler DR. 2014. The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? *Microbiology* 160:1-11.
239. Feng L, Wang W, Chen J, Ren Y, Zhao G, Gao C, Tang Y, Liu X, Han W, Peng X, Liu R, Wang L. 2007. Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from deep-subsurface oil reservoir. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5602-5607.

240. Shulami S, Raz-Pasteur A, Tabachnikov O, Gilead-Gropper S, Shner I, Shoham Y. 2011. The L-arabinan utilization system of *Geobacillus stearothermophilus*. J Bacteriol 193:2838-2850.
241. Shulami S, Gat O, Sonenshein AL, Shoham Y. 1999. The glucuronic acid utilization gene cluster from *Bacillus stearothermophilus* T-6. J Bacteriol 181:3695-3704.
242. Obojska A, Ternan NG, Lejczak B, Kafarski P, McMullan G. 2002. Organophosphonate utilization by the thermophile *Geobacillus caldxylosilyticus* T20. Appl Environ Microbiol 68:2081-2084.
243. Wang L, Tang Y, Wang S, Liu RL, Liu MZ, Zhang Y, Liang FL, Feng L. 2006. Isolation and characterization of a novel thermophilic *Bacillus* strain degrading long-chain n-alkanes. Extremophiles 10:347-356.
244. Abd Rahman RNZR, Leow TC, Salleh AB, Basri M. 2007. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. BMC Microbiol 7:77. doi:10.1186/1471-2180-7-77.
245. Tabachnikov O, Shoham Y. 2013. Functional characterization of the galactan utilization system of *Geobacillus stearothermophilus*. FEBS J 280:950-964.
246. Sharma P, Gupta S, Sourirajan A, Dev K. 2015. Characterization of extracellular thermophilic amylase from *Geobacillus* sp. isolated from Tattapani hot spring of Himachal Pradesh, India. Curr Biotechnol 4:202-209.
247. Hawumba JF, Theron J, Brözel VS. 2002. Thermophilic protease-producing *Geobacillus* from Buranga hot springs in Western Uganda. Curr Microbiol 45:144-150.
248. Kubo M, Imanaka T. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the highly thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. J Gen Microbiol 134:1883-1892.
249. Matthews DA, Smith WW, Ferre RA, Condon B, Budahazi G, Sisson W, Villafranca JE, Janson CA, McElroy HE, Gribskov CL, Worland S. 1994. Structure of human rhinovirus 3C protease reveals a trypsin-like polypeptide fold, RNA-binding site, and means for cleaving precursor polyprotein. Cell 77:761-771.
250. Bauerova-Zabranska H, Stokrova J, Strisovsky K, Hunter E, Ruml T, Pichova I. 2005. The RNA binding G-patch domain in retroviral protease is important for infectivity and D-type morphogenesis of Mason-Pfizer monkey virus. J Biol Chem 280:42106-42112.

251. Shih SR, Chiang C, Chen TC, Wu CN, Hsu JT, Lee JC, Hwang MJ, Li ML, Chen GW, Ho MS. 2004. Mutations at KFRDI and VGK domains of enterovirus 71 3C protease affect its RNA binding and proteolytic activities. *J Biomed Sci* 11:239-248.
252. Liu T, Lu B, Lee I, Ondrovicová G, Kutejová E, Suzuki CK. 2004. DNA and RNA binding by the mitochondrial lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate. *J Biol Chem* 279:13902-13910.
253. Shin JM, Yoo KJ, Kim MS, Kim D, Baek KH. 2006. Hyaluronan- and RNA-binding deubiquitinating enzymes of USP17 family members associated with cell viability. *BMC Genomics* 7:292. doi:10.1186/1471-2164-7-292.
254. Peters H, Kusov YY, Meyer S, Benie AJ, Bäuml E, Wolff M, Rademacher C, Peters T, Gauss-Müller V. 2005. Hepatitis A virus proteinase 3C binding to viral RNA: correlation with substrate binding and enzyme dimerization. *Biochem J* 385:363-370.
255. Hartl MJ, Bodem J, Jochheim F, Rethwilm A, Rösch P, Wöhrl BM. 2011. Regulation of foamy virus protease activity by viral RNA: a novel and unique mechanism among retroviruses. *J Virol* 85:4462-4469.
256. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. 2012. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 40:D343-D350.

Publikacijų sąrašas

1. Jasilionis A, Kuisiene N. 2015. Characterization of a novel thermostable oligopeptidase from *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325. *J Microbiol Biotechnol* 25:1070-1083.
2. Trillo-Muyo S, Jasilionis A, Domagalski MJ, Chrusz M, Minor W, Kuisiene N, Arolas JL, Sola M, Gomis-Rüth FX. 2013. Ultratight crystal packing of a 10 kDa protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* D69:464-470.
3. Jasilionis A, Kaupinis A, Ger M, Valius M, Chitavichius D, Kuisiene N. 2012. Gene expression and activity analysis of the first thermophilic U32 peptidase. *Centr Eur J Biol* 7:587-595.

Jasilionis A, Kuisienė N. 2012. Kolagenolizinės peptidazės iš *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325. Mokslas Gamtos mokslų fakultete: septintosios mokslinės konferencijos, vykusios 2012 m. spalio 5 d., pranešimai. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 7:48-59.

1. Jasilionis A, Kuisiene N. 2015. Identification of peptidases generating constitutive collagenolytic activity of *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325, abstr FEMS-0763. Abstr 6th Congress of European Microbiologists. FEMS, Maastricht, The Netherlands.
2. Jasilionis A, Polacek N, Kuisiene N. 2015. Determination of the RNA binding activity of the U32 peptidase from *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325. *J Biotechnol* 208(Suppl):S45.
3. Jasilionis A, Kuisiene N. 2013. Purification and characterization of the novel thermostable oligopeptidase F homolog of *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325, abstr P-134. Abstr 5th Congress of European Microbiologists. FEMS, Leipzig, Germany.

Bendradarbiavimas



prof. dr. F. Xavier Gomis-Rüth
Proteolizės laboratorija
Struktūrinės biologijos skyrius,
Ispanijos nacionalinės mokslinių tyrimų tarybos
Barselonos Molekulinės biologijos institutas
(Barselona, Ispanija)



^b
**UNIVERSITÄT
BERN**

prof. dr. Norbert Polacek
Tyrimų grupė
Mokslo fakulteto
Chemijos ir biochemijos skyrius,
Berno universitetas
(Bernas, Šveicarija)

Vilniaus universitetas
Gamtos mokslų fakultetas
Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

Jungtinis gyvybės mokslų centras, C 335
Saulėtekio al. 7
10257 Vilnius

andrius.jasilionis@gf.vu.lt

telefonas +37068618728

Gimimo data ir vieta
1985 05 09 Kaunas, Lietuva
Tautybė
lietuvis
Kalbos
lietuvių (gimtoji), anglų, rusų

Išsilavinimas

2011 – 2015	Biologijos doktorantūros studijos Vilniaus universitetas
2009 – 2011	Mikrobiologijos programa, Biologijos magistras (<i>Magna Cum Laude</i>) Vilniaus universitetas
2004 – 2009	Molekulinės biologijos programa, Biologijos bakalauras Vilniaus universitetas

Stipendijos

2015	Doktoranto stipendija už akademinis pasiekimus Lietuvos mokslo taryba
2015	Parama doktoranto akademinėi išvykai Lietuvos mokslo taryba
2014	Sciex-NMS ^{ch} programos stipendija Šveicarijos universitetų rektorių konferencija
2014	Doktoranto stipendija už akademinis pasiekimus Lietuvos mokslo taryba
2013	Doktoranto stipendija už akademinis pasiekimus Lietuvos mokslo taryba
2011	ERASMUS praktikos stipendija Vilniaus universitetas
2010	Studentų mokslinės praktikos stipendija Lietuvos mokslo taryba
2010	Studentų mokslinių tyrimų stipendija Lietuvos mokslo taryba

Straipsniai

Jasilionis A, Kuisiene N. 2015. Characterization of a novel thermostable oligopeptidase from *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325. *J Microbiol Biotechnol* 25:1070-1083.

Kieraite I, Petkauskaite R, Jasilionis A, Kuisiene N. 2015. Evaluation of the potential of free and immobilized thermophilic bacterial enzymes in the degradation of agro-industrial wastes. *Arch Biol Sci* 67:161-172.

Jasilionis A, Petkauskaite R, Kuisiene N. 2014. A novel type I thermostable pululanase isolated from a thermophilic starch enrichment culture. *Microbiology* 83:227-234.

Petkauskaite R, Lukosius D, Dębski J, Jasilionis A, Dadlez M, Kieraite I, Timonina A, Kuisiene N. 2014. Identification of proteins involved in starch and polygalacturonic acid degradation using LC/MC. *Centr Eur J Biol* 9:708-716.

Trillo-Muyo S, Jasilionis A, Domagalski MJ, Chrusz M, Minor W, Kuisiene N, Arolas JL, Sola M, Gomis-Rüth FX. 2013. Ultratight crystal packing of a 10 kDa protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* D69:464-470.

Jasilionis A, Kaupinis A, Ger M, Valius M, Chitavichius D, Kuisiene N. 2012. Gene expression and activity analysis of the first thermophilic U32 peptidase. *Centr Eur J Biol* 7:587-595.

Kitos publikacijos

Jasilionis A, Kuisiene N. 2015. Identification of peptidases generating constitutive collagenolytic activity of *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325, abstr FEMS-0763. Abstr 6th Congress of European Microbiologists. FEMS, Maastricht, The Netherlands.

Jasilionis A, Polacek N, Kuisiene N. 2015. Determination of the RNA binding activity of the U32 peptidase from *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325. *J Biotechnol* 208(Suppl):S45.

Kuisiene N, Petkauskaite R, Lukosius D, Jasilionis A. 2014. Liquid chromatography/mass spectrometry based identification, cloning and characterization of thermostable bacterial enzymes useful for the production of long-chain oligosaccharides from agro-industrial wastes. *N Biotechnol* 31(Suppl):S209-S210.

Jasilionis A, Kuisiene N. 2013. Purification and characterization of the novel thermostable oligopeptidase F homolog of *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325, abstr P-134. Abstr 5th Congress of European Microbiologists. FEMS, Leipzig, Germany.

Petkauskaite R, Kieraite I, Timonina A, Jasilionis A, Gerasimova J, Kuisiene N. 2012. Functional food ingredients for gut health: identification of thermophilic enzymes useful for the production of long-chain oligosaccharides, abstr P-204, p 128. Abstr 8th INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiology. INRA-Rowett, Clermont-Ferrand, France.

Jasilionis A, Kuisienė N. 2012. Kolagenolizinės peptidazės iš *Geobacillus thermoleovorans* DSM 15325. Mokslas Gamtos mokslų fakultete: septintosios mokslinės konferencijos, vykusios 2012 m. spalio 5 d., pranešimai. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 7:48-59.

Pedagoginė veikla	
pavasario semestras /2015 – 2016	Enzimologijos laboratoriniai darbai, bakalaurams Vilniaus universitetas Gamtos mokslų fakultetas
pavasario semestras /2015 – 2016	Enzimologija, bakalaurams Vilniaus universitetas Gamtos mokslų fakultetas
rudens semestras /2015 – 2016	Biotechnologijos laboratoriniai darbai, bakalaurams Vilniaus universitetas Gamtos mokslų fakultetas
pavasario semestras /2013 – 2014	Mikrobiologijos laboratoriniai darbai, bakalaurams Vilniaus universitetas Gamtos mokslų fakultetas

Darbo patirtis	
nuo /2015	lektorius Vilniaus universitetas Gamtos mokslų fakultetas Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra
2014	lektorius Vilniaus universitetas Gamtos mokslų fakultetas Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra
2011 – 2013	jaunesnysis mokslo darbuotojas Vilniaus universitetas Gamtos mokslų fakultetas Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra