



VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS  
MIKROBIOLOGIJOS IR BIOTECHNOLOGIJOS KATEDRA

Mikrobiologijos studijų programos magistrantas  
Andrius JASILIONIS

Magistrinis darbas

***Geobacillus lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup>  
kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno  
transkripcijos analizė bei klonavimas**

Darbo vadovė:  
dr. Nomedą KUISIENĖ

Vilnius 2011

***Geobacillus lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno  
transkripcijos analizė bei klonavimas**

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto  
Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje

Andrius JASILIONIS

Darbo vadovė:

Nomeda KUISIENĖ

# TURINYS

---

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS // 4

## IŠVADAS // 5

### 1. LITERATŪROS APŽVALGA

- 1.1 Kolagenai - kolagenolizės substratai // 6
- 1.2 Kolagenolizinės peptidazės // 10
  - 1.2.1 Eukariotų kolagenoliziniai fermentai // 13
  - 1.2.2 Prokariotų kolagenoliziniai fermentai // 15
    - 1.2.2.1 U32 kolagenolizinių peptidazių šeima // 18
- 1.3 Kolagenolizė: bendrasis modelis // 23
- 1.4 Praktinė kolagenolizės svarba // 24

### 2. METODAI

- 2.1 Tirti kamienai // 26
- 2.2 Medžiagos
  - 2.2.1 Medžiagos terpių ir buferių gamybai // 26
  - 2.2.2 Komerciniai rinkiniai // 26
  - 2.2.3 Medžiagos PGR ir nukleorūgščių vizualizavimui // 26
  - 2.2.4 Kitos medžiagos // 27
- 2.3 Terpės
  - 2.3.1 Terpės biomasės prieaugiui, palaikymui ir kultūros grynumo patikrinimui // 27
  - 2.3.2 Skysta terpė kamieno kultivavimui vykdant transkripcijos analizę // 27
- 2.4 Metodai
  - 2.4.1 Kultūros grynumo patikrinimas // 28
  - 2.4.2 Suminės RNR preparatų iš *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> išskyrimas // 28
  - 2.4.3 kDNR sintezė // 29
  - 2.4.4 U32.002 kolagenolizinės peptidazės transkripcijos analizė // 29
  - 2.4.5 U32.002 geno pagausinimas bei nuskaitymas // 30
  - 2.4.6 Kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno sekos analizė // 31
  - 2.4.7 Kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno klonavimas į daugiakopijinius vektorius // 31
  - 2.4.8 Kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno klonavimas į ekspresijos vektorių pET28c(+) // 32
  - 2.4.9 Kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno ekspresijos indukcija bei ekspresijos kamieno baltyminio preparato išskyrimas // 32
  - 2.4.10 Baltymų elektroforezė // 33
  - 2.4.11 U32.002 kolagenolizinės peptidazės ekspresijos sąlygų optimizavimas // 34
  - 2.4.12 Baltymų koncentracijos matavimas Bradford'o metodu // 35
  - 2.4.13 Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> jonų įtaka U32.002 kolagenolizinės peptidazės struktūriniam termostabilumui // 35
  - 2.4.14 Baltymų žimografija // 36

### 3. REZULTATAI

- 3.1 Suminės RNR preparatų išskyrimas bei jų stabilumo įvertinimas // 37
- 3.2 kDNR sintezė panaudojant atvirkštinę transkriptazę // 39
- 3.3 U32.002 kolagenolizinės peptidazės transkripcijos priklausomybė nuo kultūros augimo fazės // 39
- 3.4 Kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno sekos nuskaitymas bei analizė // 41
- 3.5 Kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno ekspresijos įvertinimas // 42
- 3.6 U32.002 kolagenolizinės peptidazės su bei be signalinės/pro sekos ekspresijos optimizavimas // 45
- 3.7 Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> jonų įtaka U32.002 kolagenolizinės peptidazės struktūriniam termostabilumui // 45
- 3.8 U32.002 peptidazės ekspresuotos *E. coli* BL21 (DE3) katalizinio aktyvumo įvertinimas // 47

### 4. REZULTATŲ APTARIMAS // 49

#### IŠVADOS // 56

#### SUMMARY // 57

#### PADĖKOS // 58

#### DALYVAVIMAS KONFERENCIJOSE // 59

#### LITERATŪROS SĄRAŠAS // 60

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

---

- AP - asparto peptidazė;
- APS - amonio persulfatas;
- ar. - aminorūgštis;
- Azokolis - Azo dye-impregnated collagen type I (liet. *I tipo kolagenas impregnuotas azo dažais*);
- BLAST - Basic local alignment search tool (liet. *pradinis lokalus sekų panašumo paieškos įrankis*);
- bp - bazių pora;
- Brij 35 - polioksietilenmonolaurilo eteris;
- CP - cisteino peptidazė;
- DEPC - dietildikarbonatas;
- DMSO - dimetilsulfoksidai;
- DSM(Z) - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen), (liet. *Vokietijos Tipinių Kultūrų Kolekcija*);
- EDTA - etilendiamintetraacto rūgštis;
- IPTG - izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozidas;
- kb - kilobazė (1000 bp);
- kDa - kilodaltonas (1000 Da);
- LB (Ag) - (agarizuota) Luria - Bertani terpė;
- MALDI - TOF/TOF tandeminė MS/MS - Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight tandem mass spectrometry (liet. *Lazerinė desorbcija/ionizacija padedant matricai - dviejų pakopų praskriejimo laiko tandeminė masių spektrometrija*);
- MES - 2-(N-morfolino)-etanosulfoninė rūgštis;
- mM9 - modifikuota mineralinė terpė numeris 9;
- MMP - matrikso metaloproteinazė (-s).
- MP - metalo peptidazė;
- NCBI - National Center for Biotechnology Information (liet. *Nacionalinis biotechnologinės informacijos centras*);
- NDS - natrio dodecilsulfatas;
- NDS-PAGE - Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (liet. *Natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė*);
- OT - optinis tankis;
- PGR - polimerazės grandininė reakcija;
- Pz substratas - 4-fenilazobenziloksikarbonil-L-leucilglicil-L-prolil-D-argininas;
- SP - serino peptidazė;
- TEMED - N,N,N',N' - tetrametiletildiaminas;
- TRIS - 2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diolis;
- Triton X-100 - t-oktilfenoksipolietoksietanolis.

## ĮVADAS

---

Bendraja prasme kolagenolizė - dalinė arba visiška konkretaus kolageno tipo molekulės proteolizė, vykstanti *in vivo* (fiziologinių ar pataloginių procesų metu) ar *in vitro*. Vandens molekulė, kaip įprasta hidrolizės reakcijoms, būtinas antrasis kolagenolizės proceso substratas. Kolagenolizę katalizuoja kolagenoliziniu specifiškumu pasižyminčios peptidazės (Chung *et al.*, 2004).

Kolagenai - vieni svarbiausių baltymų tiek atliekamų funkcijų, tiek biotechnologinio panaudojimo atžvilgiais. Jų panaudojimas neįmanomas be kolagenolizės proceso, taigi - kolagenolizinių peptidazių.

Tik nedaugeliui peptidazių būdingas kolagenolizinis specifiškumas. Eukariotų ir prokariotų skirtumai kolageno kaip kolagenolizės substrato produkavimo galimybės atžvilgiu, taip pat netapačios šio fibrilinio baltymo biologinės funkcijos šiuose gyvybės domenuose lėmė skirtumus tarp prokariotų ir eukariotų kolagenolizinių peptidazių (Murphy ir Reynolds, 2002).

Nors prokariotinės kolagenolizinės peptidazės tiriamos vis intensyviau, daugiau dėmesio skiriama patogeninių kamienų (*Clostridium*, *Porphyromonas* genčių) produkuojamoms kolagenazėms. Tuo tarpu nepatogeninių prokariotų kolagenazių tyrimai vykdomi rečiau. Ilgainiui tai gali lemti nevisavertį prokariotų kolagenazių biotechnologinio potencialo išnaudojimą bei iš dalies riboti pačio kolageno taikymą, sprendžiant konkrečias problemas.

Biotechnologinio panaudojimo poreikiams tenkinti būtina klonuoti kolagenolizinių peptidazių genus, pritaikant efektyvias ekspresijos sistemas.

### **Darbo tikslas:**

Atlikti termofilinių *Geobacillus* genties bakterijų U32.002 kolagenolizinės peptidazės geno transkripcijos analizę, klonuoti bei ekspresuoti šį geną, įvykdyti pirminį fermento charakterizavimą.

### **Tikslo įgyvendinimui suformuluotos užduotys:**

- Nustatyti termofilinės U32.002 kolagenolizinės peptidazės geno transkripcijos faktą bei transkripcijos priklausomybę nuo *Geobacillus lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> kultūros augimo fazės;
- Sukonstruoti pradmenis viso/be signalinės/pro sekos U32.002 kolagenolizinės peptidazės geno pagausinimui, naudojant *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> genomine DNR;
- Klonuoti termofilinės U32.002 kolagenolizinės peptidazės geną su/be signalinės/pro sekos į ekspresijos vektorių pET28c(+);
- Optimizuoti termofilinės U32.002 kolagenolizinės peptidazės su/be signalinės/pro sekos ekspresiją;
- Įvykdyti pirminį U32.002 kolagenolizinės peptidazės charakterizavimą.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

---

## 1.1 Kolagenai - kolagenolizės substratai

Šių baltymų pavadinimas taikomas nuo XIX a. vidurio, o pats terminas sudarytas sujungus du graikiškus žodžius: *kólla* - klijai bei *genos* – kilmė (Muona, 2001).

Nusakyti objektyvius kriterijus, kuriuos atitinkantį baltymą būtų galima priskirti kolagenams, sunku (Brodsky ir Persikov, 2005), o jokie suformuluoti kriterijai nelaikomi oficialiais (Blum-Ricard *et al.*, 2005). Kolagenams priskiriamos dvi būtinos sandaros ypatybės, būdingos didžiajai baltymo molekulės daliai: trijų polipeptidinių grandinių formuojama dešinio sukinio superspiralė, kurios kiekvienos grandinės sekoje vienas ar keli regionai, sudaryti iš pasikartojančio aminorūgščių motyvo - Gly-Xaa (bet kokia ar.)-Yaa (bet kokia ar.) (Hulmes, 2008).

Kiekvieną kolageno superspiralės grandinės tipą koduoja skirtingas genas. Be to, pačių kolageno tipų organizmuose sutinkama bent po kelis. Tai salygoja didelė šių genų įvairovė genomuose. Nepriklausomai nuo koduojamos grandinės tipo, kolagenų genai turi sritis, kurių koduojama polipeptidinė grandinė formuos superspiralę, bei sritis, lemsiančias nesuperspiralizuotas kolagenų molekulių dalis (Mouna, 2001). Chromosomose kolagenų genai, tipiniu atveju, pasiskirsto dispersiškai, nesitelkia konkrečioje dalyje (aptikti penkiolikoje žmogaus chromosomų) arba retais atvejais keli skirtingų tipų genai sudaro santalkas (Chu ir Prockop, 2002).

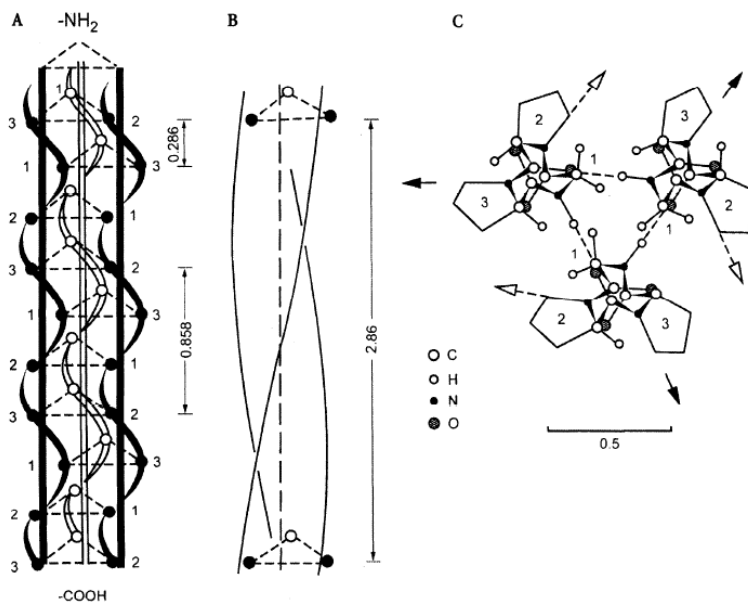
Alternatyvusis splaisingas - dažnas reiškiny tarp kolagenų, tačiau šis procesas apima transkripto sritis, kurių polipeptidinė grandinė neformuoja kolageno superspiralės. Kolagenų genų ekspresiją reguliuoja dvi veiksnių grupės: reguliaciniai sekos elementai (promotoriaus sritys, sekos intronų srityse ir kt.) bei įvairūs reguliaciniai baltymai (hormonai, citokinai) (Muona, 2001).

I-III tipo kolagenų grandinėse skiriamos trys struktūrinės ir funkcinės dalys:

- **N-GALINIS DOMENAS**, sudarytas iš sekos, užkoduotos pirmuosiuose aštuoniuose kolageno geno egzonuose. Jie koduoja signalinę seką ir N-propeptidą (bendras ilgis - apie 15 nm). Signalinės sekos ilgis varijuoja tarp 21 ir 27 ar. Signalinė seka būtina pernašai į endoplazminį tinklą, kas užtikrina brendimą ir sekreciją.
- **KOLAGENINIS DOMENAS**, suformuotas iš superspiralės struktūrą lemsiančios sekos, apribotos priekyje N, o pabaigoje C-telopeptidais, kurie sudaro nedideles globules šio domeno galuose. Šios vos keliolikos ar. ilgio sekos būtinos taisyklingam aukštesnių kolageno molekulės struktūrinių lygmenų susiformavimui, jas koduoja jungimosi egzonai. Domeno ilgis 300 nm.
- **C-GALINIS DOMENAS**, suformuotas globulę sudarančio C-propeptido, kurio ilgis 10 nm. Jį koduoja keturi egzonai. Pirmasis iš jų - jungimosi su C-proteinazės skėlimo vieta.

(pagal Chu ir Prockop, 2002 papildant iš Canty ir Kadler, 2005)

Subrendusi kolageno polipeptidinė grandinė tampa pro- $\alpha$  grandine. Kiekviena jų tapdama superspiralės (prokolageno) dalimi, formuoja prailgintą kairiojo sukinio poliprolino-II-tipo spiralę, žr. 1 pav. (Kadler *et al.*, 2007). Tipo nomenklatūrinio pavadinimo pagrindas - šios spiralės struktūrinis panašumas į poli-L-prolino sudaroma spiralę. Visos peptidinės jungtys spiraleje - tik *trans* izomerinės formos (Engel ir Bächinger, 2005). Sudaroma superspiralė įgyja dešinio sukinio konformaciją, vydama apie menamą bendrą ašį. Superspiralizaciją lemia pagrindinio kolagenų ar sekos motyvo Gly-Xaa-Yaa pasikartojimas kiekvienoje superspiralės grandinėje. Xaa poziciją dažniausiai (žmogaus kolagenuose 22 % visų ar. (Shoulders ir Raines, 2009)) užima Pro, o Yaa - Hyp. Nors šias dvi padėtis gali užimti bet kuri aminorūgštis priklausomai nuo kolageno tipo. Koks



**1 pav.** Kolageno trigubosios superspiralės modelis. Visi atstumai pateikti nm. Skaitmenų reikšmės: 1 žymi Gly, 2 (Xaa padėtyje) ir 3 (Yaa padėtyje) - Pro. A ir B schemose punktyrinė linija atspindi  $C_{\alpha}$  atomą, o C schemoje - vandenilines jungtis tarp Gly ir Pro (Yaa padėtyje). Toje pačioje schemoje rodyklės žymi radikalų (ne Pro žiedo) išsidėtyimo kryptį

(iš Engel ir Bächinger, 2005).

simetrijas (1 pav.). Šiuo metu teigiama, jog superspiralei būdingi abu tipai, tik skirtingose superspiralės vietose (Brodsky ir Persikov, 2005). Simetriją lemia ar., išsidėstančių Gly-Xaa-Yaa motyvo Xaa ir Yaa padėtyse, tipas (Engel ir Bächinger, 2005).

Jei šiose vietose bus retai sutinkamos imino rūgštys, superspiralės sritis įgis 10/3, ir, priešingai, didelė koncentracija, ypač pasikartojantis Gly-Pro-Hyp motyvo derinys, leis susidaryti 7/2 simetrijai (Shoulders ir Raines, 2009).

motyvo derinys besusidarytų, tik Gly  $C_{\alpha}$  atomų vandenilio molekulės išsidėsto superspiralės šerdyje. Joks kitas radikalas tiesiog netilptų, nesuardydamas superspiralizacijos. Tuo tarpu kitų ar. radikalai privalomai orientuojami į superspiralės išorę ir gali sudaryti įvairios funkcinės svarbos jungtis (Engel ir Bächinger, 2005).

Superspiralės periodiškumas iki šiol išlieka diskusijų objektu (Shoulders ir Raines, 2009). Difrakcijos tyrimai įrodė 10/3 (trys sūkliai, apimantys 10 ar. seką; 26,8 Å ašinis pasikartojimas) ir 7/2 (atitinkamai du sūkliai, apimantys 7 ar.; 20 Å ašinis pasikartojimas) tipų

Kolagenų superspiralės topoizomerizacija nėra žinoma nei *in vitro*, nei *in vivo* (Birk ir Bruckner, 2005).

Erdviškai artimas superspiralę sudarančių grandinių išsidėstymas sudaro sąlygas tarp jų susiformuoti van der Waals'o tipo sąveikoms, tačiau stabilizacijai svarbesnės dviejų tipų vandenilinės jungtys, suformuojančios šio tipo sąveikų tinklą:

- TARP AMIDO IR KARBONILO GRUPIŲ **NH ... OC**. Šio tipo vandenilinės jungtys yra stipriausios kolageno superspiralėje (Brodsky ir Persikov, 2005). Kiekvienos superspiralės Gly-Xaa-Yaa motyvo Gly NH grupė sudaro vandenilinį ryšį su vienos iš likusių grandinių Xaa padėtyje lokalizuotos ar. CO grupe (**NH<sub>(Gly)</sub> ... OC<sub>(Xaa)</sub>**) (Kadler *et al.*, 2007). Jei Xaa padėtį užima bet kokia ar., išskyrus Pro, vienai vandens molekulei atliekant mediatoriaus vaidmenį, susidaro priešingos krypties pirmosios vandenilinės jungties atžvilgiu jungtis tarp Xaa padėties ar. NH grupės ir kitos iš likusių dviejų grandinių Gly CO grupės (**CO<sub>(Xaa, ne Pro)</sub> ... H<sub>2</sub>O ... NH<sub>(Gly)</sub>**). Šio tipo ryšiai svarbūs superspiralės stabilumui, jei grandinėje retai sutinkamas Pro. Taip pat įrodyta, jog vandens molekulė, atlikdama minėtą mediatoriaus funkciją, gali formuoti vandenilinius ryšius su Hyp ar šoninių ar. grandinių atomais (Ayad *et al.*, 1998).
- TARP C<sub>α</sub> ATOMO IR KARBONILO GRUPIŲ **C<sub>α</sub> (H) ... OC**. Galimi du tipo variantai: jungtį sudaro Gly C<sub>α</sub>H iš vienos grandinės ir Gly arba Pro CO grupė iš kitos (**C<sub>α</sub>H<sub>(Gly)</sub> ... OC<sub>(Gly/Pro)</sub>**); antruoju atveju, Hyp C<sub>α</sub> sudaro jungtį su Hyp CO grupe iš kaimyninės grandinės (**C<sub>α</sub>(Hyp) ... OC<sub>(Hyp)</sub>**) (Brodsky ir Persikov, 2005). Abiem atvejais sudaromos energetiškai silpnos jungtys, tik papildančios NH ... OC jungtis (Shoulders ir Raines, 2009).

Apibendrinant vandenilinių ryšių įtaką superspiralės stabilizavimui, svarbu pabrėžti Gly pasikartojimo kas dvi ar. svarbą. Esminis kolagenų superspiralių skirtumas, lyginant su kitų baltymų vandenilinių jungčių formavimo dėsniniais, yra vandenilinių jungčių formavimas tarp trijų superspiralės grandinių, bet ne atskirai tarp vienos grandinės grupių, pasižyminčių priešingais daliniais krūviais (Koide ir Nagata, 2005).

Poliprolino II-tipo α spirālės konformaciją lemia imino ar. išsidėstymas Pro - Xaa ir Hyp - Yaa padėtyse. Šiuo atveju dar kartą paminėtina superspiralizacijos tarpinių procesų koordinavimo svarba: neįvykus potransliacinei modifikacijai, Pro - Yaa dar nebūtų modifikuotas į Hyp ir superspiralizacija nevyktų, nes tik poliprolino II-tipo α spirālės konformacija entropijos sąnaudas sumažina pakankamai, kad superspiralizacija taptų spontaniniu procesu (Shoulders ir Raines, 2009). Besijungiant trims grandinėms vykstantis jų paviršinio vandens praradimo efektas taip pat garantuoja superspiralizacijos spontaniškumą energetiniu požiūriu (Koide ir Nagata, 2005).

Aprašant superspiralės stabilumą, tiesiogiai turintį įtakos kolagenų funkcijai ir skaidymo ypatumams, būtina detaliau išanalizuoti Pro ir Hyp daromą poveikį šiam superspiralės parametrai.



Jau minėta, jog Gly-Pro-Hyp yra dažniausias kolagenų superspiralės grandinių struktūros motyvo derinys. Visos trys ar. stabilizuoja superspiralę dėl formuojamų vandenilinių jungčių, bet Pro ir Hyp stabilizacinė įtaka, skirtingai nei Gly, vien vandenilinių jungčių formavimu neapsiriboja. Poliprolino II-tipo spiralė tampa ypač nestabili, jei į jos sudėtį neįeina kritinio kiekio Pro ir Hyp (Engel ir Bächinger, 2005). Pro ir Hyp C<sub>α</sub> atomo radikalų žiedų ir kiti mažiau svarbūs steriniai efektai riboja bet kokio superspiralių poliprolino II-tipo α spiralių atomų ar jų grupių judėjimo galimybę apie formuojamas jungtis. Sukimasis blokuojamas, palaikant energetiškai, atsižvelgus į efektus, palankiausias konformacijas.

Prokolageno molekulės tarpląstelinėje erdmėje jungiasi į aukštesnės struktūrinės organizacijos molekulinis agregatus. Galimi trijų struktūros variantų agregatai: fibrilės, filamentai ir tinklai.

Nepaisant vis gausėjančios kolagenų ir į juos struktūra panašių baltymų skaičiui (vien stuburinių virš 50), šių baltymų klasifikacija vis dar fragmentiška (Hulmes, 2008). Stuburinių kolagenai skirstomi į tipus, kiekvieną jų žymint eilės numeriu (panaudojant romėniškus skaitmenis), atitinkančiu atradimo chronologiją. Ne stuburinių kolagenų net nebandoma objektyviai klasifikuoti. Jie tiesiog aprašomi, įvardijant struktūrinį panašumą į konkretų stuburinių tipą, arba baltymui parenkamas savitas pavadinimas.

Lokalizacijos atžvilgiu, apibendrinant, kolagenai lokalizuoti jungiamojo audinio ekstraląsteliniame matrikse. Tai struktūra, sujungianti audinio ląsteles į vieningą visumą. Matriksą sudaro netirpių (didžiąja dalimi sudaryta iš kolageno ir elastino fibrilių) ir tirpių (proteoglikanai ir glikoproteinai) polimerų frakcijos. Audinio savybes lemia frakcijų santykis, pvz., sausgyslėse dominuoja fibrilės, sudarančios skaidulas. Kolagenai taip pat gali sudaryti gelį neląsteliniame užpilde (Ayad, 1998).

Ligi šiol atrasti 29 stuburinių kolagenų (Shoulders ir Raines, 2009) tipai jungiami į klases:

- **FIBRILĘ SUFORMUOJANTYS:**
  - FIBRILINIAI (I\*, II\*\*, III\*\*, V\*, XI\*, XXIV, XXVII, XXVIII IR XXIX TIPAI).
  - SU FIBRILĖMIS SUSIJUNGIANTYS, TURINTYS SUPERSPIRALĖS PERTRAUKIMŲ (angl. FACIT - fibril-associated collagens with interrupted triple helices) (IX\*, XII\*\*, XIV\*\*, XVI, XIX, XX, XXI, XXII IR XXVI TIPAI).
- **INKARUOJANČIAS FIBRILES FORMUOJANTYS (VII\* TIPAS).**
- **TINKLUS FORMUOJANTYS (IV\*, VI\*, VIII\* IR X\*\* TIPAI).**
- **TRANSMEMBRANINIAI, TURINTYS SUPERSPIRALĖS PERTRAUKIMŲ** (angl. MACIT - membrane associated collagens with interrupted triple helices) (XIII, XVII\*\*, XXIII IR XXV TIPAI).
- **MULTIPLEKSINAI** (angl. MULTIPLEXIN - multiple triple helix domains and interruptions) (XV IR

## XVIII TIPAI).

(iš Birk ir Bruckner, 2005)

\* tipai - heterotrimerinės, \*\* tipai - homotrimerinės superspiralės sandaros. Heterotrimerinių tipų trigubą superspiralę sudaro dviejų arba trijų sandaros tipų grandinės, o homotrimerinių kolagenų superspiralė visuomet iš trijų vienodos sandaros grandinių (Canty ir Kadler, 2005). Nepažymėtų tipų superspiralės grandinių sandaros įvairovė neaprašyta.

Kolagenai aptinkami visuose gyvūnų karalystės taksonuose. Nors kolagenai yra dažniausiai sutinkami baltymai, vis dėlto jie nėra būtent šioje karalystėje atsiradusi evoliucinė naujovė (Hulmes, 2008). Kolagenų struktūros pagrindą - trigubą ar. motyvą (Gly-Xaa-Yaa) jau koduoja bakterijų, archėjų ir bakteriofagų genai. Motyvo nulemta triguboji superspiralė, kaip atskiras domenai, sutinkamas šių taksonų baltymų struktūrose. Pastarųjų molekulėse šis domenai atlieka struktūrizuojančias funkcijas, pvz., formuoja receptorių, adhezijos molekulių pagrindus (Brodsky ir Persikov, 2005).

Bakterijos, archėjos bei bakteriofagai - audinių neformuojantys organizmai, jiems nebuvo būtinybės struktūrizuoti audinių ekstraląstelinis matriksus, taigi neatsirado ir poreikis formuoti „tikruosius“ kolagenus. Tik susiformavus pirmiesiems daugialąščiams gyvūnams, audinių struktūrizavimui buvo išnaudotas superspiralės koduojančių sekų potencialas (Canty ir Kadler, 2005). Ilgainiui dar iš prokariotų paveldėtos trigubosios spiralės sekos evoliucionavo: duplikavosi, mutavo, įgijo intronus ir t.t. Dėl genų evoliucijos daugialąščiuose gyvūnuose ne tik susiformavo didžiulė superspiralinė domenų turinčių baltymų įvairovė, bet ir atsirado baltymų grupė - kolagenai, kurioje triguboji superspiralė tapo struktūros pagrindu (Chu ir Prockop, 2002). Evoliucionuodama ši grupė suformavo ne tik struktūrų, bet ir vykdomų funkcijų įvairoves (Kadler *et al.*, 2007).

Be abejo, stuburinių kolagenai skiriasi nuo bestuburių, tačiau, nepaisant didžiulės rūšinės gyvūnų įvairovės, pradedant pintimis, esminės fibrilinės organizacijos, kolagenų biosintezės ypatybės nedaug tepakito, išliko kolagenų molekulių savybė agreguotis (Kadler *et al.*, 1996).

## 1.2 Kolagenolizinės peptidazės

Kuri peptidazė laikytina kolagenolizine, tiesiogiai priklauso nuo susitarimo, ką įvardija pats „kolagenolizė“ terminas. Kaip jau minėta, bet kurio kolageno tipo molekulėje galima išskirti superspiralinės organizacijos domenai bei domenai, kuriems ši organizacija nebūdinga. Nors domenų erdvinė organizacija skiriasi, jie vis vien yra kolageno molekulės dalys, todėl plačiaja prasme abiejų organizacijų tipų domenų proteolizę būtų galima laikyti kolagenolize, o procesą katalizuojančias peptidazes - atitinkamai kolagenolizinėmis. Vertinant šiuo požiūriu,

kolagenolizinių peptidazių įvairovė būtų didžiulė. Tarp jų vos keliasdešimt (sumuojant eukariotų ir prokariotų) peptidazių sugebėtų skaidyti natyvius ir/ar iš dalies denatūruotus superspiralinius domenų, tuo tarpu didžioji dalis peptidazių skaidytų tik nesuperspiralizuotus domenų ir/ar visiškai denatūruotas kolageno superspirales - želatiną. Remiantis šiuo požiūriu, „kolagenolizės“ ir „kolagenolizinių peptidazių“ sąvokų vartojimas būtų neobjektyvus.

Subjektyvumo išvengta kolagenolize laikant tik natyvių ir/ar iš dalies denatūruotų kolagenų superspiralinės organizacijos domenų proteolizę. Peptidazė laikoma kolagenolizine (trumpiau tiesiog kolagenaze), jei ji katalizuoja natyvios ir/ar iš dalies denatūruotos kolagenų superspiralės proteolizę. Kolagenazių substratinis specifiškumas dažniausiai apima ir nesuperspiralinius kolagenų molekulių domenų, želatiną bei įvairius nekolagenus.

Nekolagenolizinė peptidazė gali, be įvairių kolagenams nepriskiriamų baltymų, proteolizuoti tik nesuperspiralinius kolagenų domenų bei želatiną. Ji, proteolizuodama nesuperspiralinius kolageno domenų, gali ištirpdyti kolageno molekules, bet negali katalizuoti kolagenų degradavimo, nes šio proceso metu proteolizuojami ir superspiralizuoti domenai (Stricklin ir Hibbs, 1988).

Konkrečios peptidazės priskyrimo kolagenazėms objektyvumą lemia substratinio specifiškumo tyrimų objektyvumas. Jų tikslumą riboja ištirtumo išsamumas, tik patikrinus peptidazės veikimą visų žinomų kolageno tipų natyvių ir iš dalies denatūruotų superspiralių atžvilgiu, peptidazę galima priskirti kolagenazėms arba ne. Nors kolagenolizinio specifiškumo įrodimo *in vitro* pakanka peptidazės priskirtinumui kolagenazėms, visada siekiama šį specifiškumą įrodyti ir *in vivo* (Murphy ir Reynolds, 2002).

Dalis autorių su pateikta terminų taikymo specifika nesutinka ir tik želatinoliziniu aktyvumu pasižyminčias peptidazes laiko kolagenolizinėmis. Darbe šiuo požiūriu nesivadovauta.

Prokariotų baltymų kolageno struktūros domenų superspiralės analogiškos eukariotų „tikrųjų“ kolagenų superspiralėms. Tuo tarpu eukariotų ir prokariotų kolagenoliziniai fermentai menkai panašūs struktūriniu organizacija ir atliekamomis funkcijomis. Taip pat netapati šių kolagenolizinių peptidazių inicijuojamos kolageno degradavimo *in vivo* eiga:

***JEI KOLAGENO DEGRADAVIMAS VYKSTA KATALIZUOJANT EUKARIOTŲ KOLAGENOLIZINEI PEPTIDAZEI.***

- specifiškai prisijungusi prie natyvios kolageno superspiralės kolagenazė skelia visas tris grandines visuomet toje pačioje bei vienintelėje jų polipeptidinės grandinės sekos vietoje. I tipo kolageno atveju  $\alpha_1$  skeliama tarp Gly<sup>775</sup>-Ile<sup>776</sup>,  $\alpha_2$  tarp Gly<sup>775</sup>-Leu<sup>776</sup>.
- suformuojami du superspiralės fragmentai: ilgesnysis -  $\frac{3}{4}$  superspiralės ilgio (TC<sub>A</sub>) ir trumpesnysis -  $\frac{1}{4}$  ilgio (TC<sub>B</sub>). Abiem atvejais ilgis vertinamas grandinių polipeptidinių grandinių N-galo atžvilgiu. I kolageno tipo atveju TC<sub>A</sub> molekulinė masė sudaro 225 kDa, TC<sub>B</sub> - 75 kDa.

- fragmentų superspiralinė organizacija prarandama, vyksta denatūracija - grandinės spontaniškai atsiktinai išsiskiria sudarydamos želatiną.
- želatina baigiama proteolizuoti įvairių nespecifinių ekstraląstelių peptidazių.

***PROKARIOTŲ KOLAGENOLIZINĖS PEPTIDAZĖS KATALIZUOJAMAS KOLAGENO SKAIDYMAS.***

- kolagenazė prisijungia nespecifinėje kolageno superspiralės vietoje ir kerpa visas tris polipeptidines grandines. Peptidinė jungtis gali būti hidrolizuojama tarp bet kurių tiek grandinės, tiek ir trigubojo motyvo (Gly-Xaa-Yaa) ar. liekanų.
- superspiralė suskaldoma į daugelį įvairių ilgių, ją sudariusių grandinių, fragmentų. Tai paaiškina greitesnį nei vykstant eukariotų kolagenolizei kolageno suskaidymą.
- fragmentus atakuoja ir hidrolizuoja nespecifiškos ekstraląstelinės bei viduląstelinės peptidazės (pvz. Pz-peptidazės)

(pagal Brett, 2005).

Pažymėtina, jog kolageno degradavimo produktai daugialąsčiams eukariotams nėra tiesiog nebaigtos skaidyti baltymo liekanos, jie turi įtakos įvairių baltymų sintezės intensyvumo reguliavimui, konkrečių ląstelių tipų formai, migracijai (pagal Brett, 2005).

Skirtingoje kolageno degradavimo eigoje atsispindi eukariotų ir prokariotų kolagenolizinių fermentų funkcinės svarbos skirtumai. Eukariotų kolagenolizinių fermentų biologinės funkcijos skiriamos į dvi dalis:

- **FIZIOLOGINĖS** - svarba organizmo vystymuisi, reprodukcijai, audinių ekstraląstelinio matrikso struktūrų organizavimui, kolagenų biosintezei ir jų makromolekulinių agregatų sudarymui.
- **PATOLOGIJAS LEMIANČIOS** - ekstraląstelinio matrikso silpninimas, fibrozinės ligos, patologinė audinių destrukcija.

Kolagenolizinių peptidazių svarba prokariotams:

- **VIRULENTIŠKUMO PALAIKYMAS** - patogeniniams prokariotams invazijos į audinius metu būtina skaidyti ekstraląsteliniam matrikse barjerams tampančius kolagenus, tokiu būdu pažeidžiant funkcinį audinio integralumą. Patogeninės bakterijos tiesiogiai skaido audinį - šeimininką arba netiesiogiai indukuoja latentines audinio ląstelių kolagenazes.
- **ĮGALINIMAS KOLAGENUS NAUDOTI KAIP ALTERNATYVIUS ENERGIJOS IR ANGLIES ŠALTINIUS.** Ši funkcija svarbesnė nepatogeniniams prokariotams.

(pagal Woessner, 1998, papildant iš Harrington, 1996 ir Hulmes, 2008)

Svarbu detaliau išnagrinėti veiksnius, galimai evoliucijos eigoje lėmusius tarp peptidazių įvykusį kolagenolizinio specifiškumo atsiradimą. Vykstant spontaniškoms agregacijoms, suformuodami makromolekulinius agregatus, kolagenai tampa itin stabiliomis biologinėmis struktūromis. Neišvengiamai kolagenus produkuojančiuose daugialąsčiuose gyvūnuose turėjo

atsirasti labai specifiški, struktūras skaidantys fermentai (Murphy ir Reynolds, 2002). Tuo tarpu, galima daryti prielaidą, jog prokariotų kolagenoliziniai fermentai evoliucijos bėgyje atsiradę anksčiau savų baltymų su kolagenolizininiais domenais skaidymui palaipsniui įgavo naujų funkcijų, tapdami pagalbininkais prokariotiniams patogenams bei leisdami pasitelkti eukariotų kolagenus kaip anglies ir energijos šaltinių alternatyvą.

Visos eukariotų ir prokariotų virulentiškumui svarbios kolagenazės - šiems organizmams būtini fermentai, kurių esminė, evoliucijos metu fiksuota funkcija - tikslingai katalizuoti kolagenolizę. Tuo tarpu, neatmestina galimybė, jog nepatogeninių prokariotų peptidazių kolagenolizinis specifiskumas lemia nepagrindinę šio specifiskumo peptidazių funkciją. Kolagenolizinės peptidazės nėra retos tarp nepatogeninių prokariotų, tarp patogenų šios specifiskumu pasižyminčios peptidazės sutinkamos dar dažniau.

Prokariotų biologiniams poreikiams paranku kolagenus greitai suskaldyti į daug fragmentų, savoms kolagenazėms netaikant sudėtingos aktyvacijos ir reguliacijos. Tuo tarpu eukariotų kolagenolizinės peptidazės ypač griežtai reguliuojamos ir sudėtingai aktyvuojamos, siekiant palaikyti tikslią pusiausvyrą tarp fiziologiškai būtinos kolagenolizės skatinimo ir ribojimo. Pusiausvyros praradimas lemia pataloginių funkcijų atsiradimą.

Pastarųjų metų keletu augalų (pvz. imbiero) rizomų tyrimai teikia pakankamą įrodymų kiekį leidžiančių teigti, jog augalai taip pat sugeba sintetinti kolagenazes (Kim *et al.*, 2007<sup>a</sup>).

### 1.2.1 Eukariotų kolagenoliziniai fermentai

Eukariotų kolagenoliziniai fermentai tiriami nuo 1962 metų, J. Gross'ui ir Ch. M. Lapière'ui išgryninus pirmą stuburinio kolagenazę (MMP1) iš buožgalvio uodegos audinių. Tipiniu atveju stuburinio gyvūno audiniai sintetina kolagenolizinių peptidazių rinkinį (pvz., MMP kartu su katapsiniais), be kolagenų galinčių skaidyti ir kitų tipų baltymus (Bode *et al.*, 1999).

Stuburinių kolagenoliziniai fermentai pasižymi didele molekuline mase. Dažniausiai kolageno skaidymą stuburinių audiniuose atlieka MP, rečiau sutinkamos SP ar kitų katalizinių tipų peptidazės (Watanabe, 2004).

Didžioji natyvią kolageno superspiralę proteolizuojančių eukariotų kolagenolizinių fermentų dalis klasifikuojami kaip MMP, kurios dar vadinamos matriksiniais (Nagase ir Woessner, 1999). Tai monomerinių (Chung *et al.*, 2004) nuo cinko ir kalcio priklausomų metalo endopeptidazių šeima, priklausanti metzincinų superšeimai. Visi metzincinai išsiskiria analogiška aktyviojo centro sandara: trys His liekanos sudaro  $Zn^{2+}$  jungimosi motyvą, o konservatyvioje sekos padėtyje lokalizuotas Met formuoja aktyviojo centro spiralinės posūkį (Palosaari, 2003). MMP atlieka įvairias

funkcijas ir plačiai paplitę, gyvosios gamtos taksonų atžvilgiu, sutinkamos net augaluose, dalyje bakterijų taksonų.

Gyvūnų MMP - ekstraląsteliniam matrikse veikiančios peptidazės. Galima teigti, jog šios šeimos proteolizuojamų substratų įvairovė apima visus gyvūnų matrikso baltymus. Didžioji dalis MMP sekretuojamos peptidazės, taip pat egzistuoja grupė membraninių MMP. Kiekvienai MMP atradimo chronologijos tvarka suteikiamas individualus numeris, tačiau plačiai naudojami ir trivialūs pavadinimai (Nagase ir Woessner, 1999).

Visom MMP būdingi analogiški molekulos domenai. Jų seka pateikiama nuo molekulos polipeptidinės grandinės N-pabaigos: signalinis peptidas, propeptido domenas, fibronektino struktūrai tapatus domenas (būdingas tik MMP2 ir 9), katalizinis domenas, jungiamasis regionas, hemopeksino struktūrai tapatus domenas. Įrodyta, jog dalis membraninių MMP gali skaidyti natyvią kolageno superspiralę. Šios grupės MMP hemopeksino struktūrai tapačiam domenui būdingos dvi papildomo struktūrinės dalys: transmembraninis regionas ir citoplazminė uodega.

MEROPS klasifikacijoje MMP priskiriamos M10A pošeimiui sujungiant 39 peptidazes. Žmoguje rasta 17 skirtingų MMP (Rawlings *et al.*, 2010). Pateikiamas, visuotinai pripažįstamas, MMP skirstymas į grupes nurodant tik kolagenoliziniu specifiskumu pasižyminčias: KOLAGENAZĖS: MMP1/8/13/18; STROMELIZINAI: MMP3/10; ŽELATINAZĖS: MMP2/9; MEMBRANINĖS MMP: 14/16/17/24/25; HETEROGENINĖS GRUPĖS MMP: 7/12/19/20/22/26 (Palosaari, 2003).

MMP veikla griežtai reglamentuojama endogeninių specifinių inhibitorių (MMP audinių specifinių inhibitorių) ir nespecifiškų peptidazinių inhibitorių (pvz. serumo  $\alpha_2$ -makroglobulino). Inhibitorių ir MMP balanso sutrikimai sukelia patologijas: aterosklerozę, osteoartritą, vėžio metastazių formavimąsi.

Stuburinių kolagenoliziniai fermentai - ekstraląsteliniai baltymai (signalinė seka - apie 20 ar. ilgio), sekretuojami kaip neaktyvūs pirmtakai. Jų aktyvacija vykdoma ląstelės išorėje. Tai sudėtingas procesas apimantis kaskada veikiančius stromelizinus ir keletą SP. Kaskadą reguliuoja MMP audinių inhibitoriai. Tik membraninės grupės MMP sekretuojamos jau aktyvios formos. Jų žimogenų aktyvavimą ląstelės citoplazmoje vykdo furinas (Bode, 1995).

Nors didžioji dauguma stuburinių kolagenolizinių fermentų sekretuojami konstitutyviai, jų transkripcija taip pat reguliuojama. Iš ląstelės išorės šiam procesui įtakos turi įvairūs augimo faktoriai, citokinai bei kiti mediatoriai. Transkripcijos suintensyvėjimas didina sekreciją - atitinkamai kolagenų skaidymą ekstraląsteliniam daugialąsčių matrikse (Dioszegi *et al.*, 1995).

Apibendrinant galima teigti, jog daugialąsčiuose eukariotuose kolagenų degradaciją katalizuoja kolagenolizinės peptidazės, priklausančios, remiantis struktūros bei funkcijų kriterijais, kelioms

skirtingoms grupėms. Kolagenolizinėms peptidazėms, veikdamos sinergistiškai, talkina įvairios nekolagenolizinės peptidazės.

Kolagenolizines peptidazes sekretuoja didžioji dalis eukariotų ląstelių tipų, šio specifiškumo fermentai būdingi praktiškai visiems audiniams (Stricklin ir Hibbs, 1988). Pats tipas lemia, kokių konkrečių kolagenazių spektrą ląstelė produkuos, kokiais kiekiais ir kokiomis fiziologinėmis ir (ar) patologinėmis aplinkybėmis. Be abejo, ir pačios kolagenazės tiek tarpusavyje grupės viduje, tiek kitų grupių atžvilgiu skiriasi substratiniu specifiškumu, veikimo sąlygomis, reguliavimo mechanizmais ir t.t.

Apibendrinant svarbu akcentuoti, jog tik daugelio skirtingų, viena kitą substratiniu specifiškumu ir reguliacinėmis galimybėmis papildančių kolagenolizinių peptidazių sudaromas tinklas eukariotiniam organizmui garantuoja sėkmingą kolagenolizę. Tuo tarpu vienų kolagenazių reguliacinė įtaka kitoms užtikrina tinkamą jų funkcijų atlikimą, veikiant *in vivo*.

### 1.2.2 Prokariotų kolagenoliziniai fermentai

Pirmosios bakterijų kolagenazės išskirtos 1953 metais. Ilgą laiką jos vangiai tirtos. Tikėtina, jog tai lėmė su tyrimų specifika susiję sunkumai, nes pirmieji bakterinių kolagenazių producentai buvo patogeniški mikroorganizmai (Häse ir Finkelstein, 1993). Pastarąjį dešimtmetį bakterijų kolagenoliziniai fermentai - intensyviai tiriami, sutelkiant vis didesnę dėmesį į išskirtus iš nepatogeninių producentų.

Bakterijų kolagenazės savo struktūra menkai homologiškos stuburinių kolagenoliziniams fermentams (Harrington, 1996). Prokariotų kolagenazių klasifikacija neišvystyta, nes prieinami duomenys dar pernelyg fragmentiški ir jų nepakanka objektyviai sistemai sudaryti (Watanabe, 2004).

Kolagenoliziniai bakterijų produkuojami fermentai, tipišku atveju, konstitutyviai sekretuojamos, didelės molekulinės masės monocinko metalo endopeptidazės. MP molekulinė masė dažniausia yra didesnė nei kitų katalizinių tipų peptidazių, tačiau kolagenolizinės MP ryškiai viršija net bendrai MP būdingą vidurkį. Aprašytos kolagenospecifiškos SP taip pat stambios molekulės (žr. 1 lentelę), todėl didelė masė sietina ne su kataliziniu tipu, bet su specifiškumu skaidyti kolagenus (Okamoto *et al.*, 2001). Manoma, jog molekulinę masę padidina už jungimąsi prie kolagenų atsakingo ir kolagenazę ant ląstelės paviršiaus inkaruojančio domenų egzistavimas kolagenolizinės peptidazės molekulėje. Inkaruojantis domenas būdingas ne visų bakterijų kolagenazių sandarai. Juo dažniausiai pasižymi patogeninės bakterijos. Joms minėtas domenas padeda išgyventi, taigi didelė patogeninių bakterijų kolagenazių molekulinė masė liudija evoliucijos užfiksuotą adaptaciją (Watanabe, 2004).

Be minėtų MP ir SP aprašytos ir bakterijų AP, galinčios degraduoti kolageną (žr. 1 lentelę). Kolagenospecifiškos MP hidrolizuoja peptidinę jungtį tarp kolagenų superspiralės  $\alpha$  spiralių grandinių tripleto Xaa ir Pro narių (Harrington, 1996). SP, skaidančios kolagenus, peptidinę jungtį hidrolizuoja tarp įvairesnių grandinės ar. liekanų (Okamoto *et al.*, 2001), pvz., serino karboksiproteinazė iš *Alicyclobacillus sendaiensis* NTAP-1 demonstruoja unikalų sugebėjimą skaidyti peptidinę jungtį tarp Arg ir Gly (Tsuruoka *et al.*, 2003). Kaip jau minėta, bakterijų kolagenolizinės peptidazės, priešingai nei stuburinių, kolageno superspiralę proteolizuoja nespecifiškai - ne konkrečioje kolageno molekulės vietoje. Tokios proteolizės rezultatas - skirtingo ilgio kolageno molekulių fragmentų mišinys. Taigi daugumos bakterijų domenai, lemiantis prisijungimą prie kolageno molekulės yra mažai specifiškas kolageno tipui (Watanabe, 2004).

**1 lentelė.** Bakterijų kolagenolizinės peptidazės, kurių biocheminės savybės detalizuotos

(adaptuota iš Watanabe, 2004)

| Rūšis                               | Katalizinis tipas | Kolagenazės lokalizacija                    | Molekulinė masė (kDa) | Domenas lemiantis jungimąsi prie kolageno molekulės |
|-------------------------------------|-------------------|---|-----------------------|---|
| <i>Clostridium histolyticum</i>     | MP                | Ląstelės išorėje                            | 116 (ColH)            | Yra   |
| <i>Clostridium perfringens</i>      |                   |   | 116 (ColG)            |   |
| <i>Vibrio alginolyticus</i>         |                   |   | 120 (ColA)            | Nenustatyta   |
| <i>Vibrio vulnificus</i>            |                   |   | 82                    |   |
| <i>Achromobacter lyticus</i>        | 45                |   |                       |   |
| <i>Geobacillus collagenovorans</i>  | SP                | Ląstelės išorėje arba su ląstele susijungęs | 50                    | Nenustatyta   |
| <i>Alicyclobacillus sendaiensis</i> |                   | Ląstelės išorėje                            | 105*2                 |   |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i>     | AP                | Su ląstele susijungę                        | 37                    | Nėra  |
| <i>Bacillus cereus</i>              |                   |   | 94                    |   |
| <i>Treponema denticola</i>          | MP                | Ląstelės išorėje                            | 37,8*2                | Yra   |
| <i>Streptococcus gordonii</i>       |                   |   | 55                    |   |
| <i>Bacillus cereus</i>              | SP                | Nenustatyta                                 | 105                   | Nenustatyta   |
| <i>Treponema denticola</i>          |                   | Ląstelės išorėje arba su ląstele susijungęs | 87                    |   |
| <i>Streptococcus gordonii</i>       | SP                | Ląstelės išorėje arba su ląstele susijungęs | 67                    | Nenustatyta   |
| <i>Treponema denticola</i>          |                   |   | 98                    |   |

Bakterijų jungimosi domenai nehomologiški stuburinių kolagenazių struktūrose nustatytiems, todėl daroma prielaida, kad bakterijose jie evoliucionavo nepriklausomai.

Stuburinių kolagenoliziniai fermentai veikia daugialąsčio organizmo viduje, esant neekstremalioms fiziologinėms sąlygoms, tuo tarpu bakterijų užimamos ekonišos labai įvairuoja



temperatūrinių ir pH sąlygų atžvilgiu. Bakterijoms evoliucionuojant tai negalėjo neturėti įtakos bakterijų fermentų savybėms, tarp jų ir kolagenoliziniu specifiškumu pasižyminčiosioms. Jau minėtos *A. sendaiensis* NTAP-1 karboksiproteinazės optimalus pH - 3,9 (Tsuruoka *et al.*, 2003).

Apibendrinant galima teigti, jog bakterijų kolagenazės išlieka aktyvios nuo vidutiniškai rūgščios iki ženkliai šarminės aplinkos (Häse ir Finkelstein, 1993). Temperatūrinis diapazonas, kuriame neprarandamas bakterijų kolagenazių katalizinis potencialas, taip pat yra platus. Dauguma veikia, esant mezofilams būdingoms temperatūroms, bet termofilų kolagenazės išlieka aktyvios ir esant aukštai temperatūrai (60 °C ir aukštesnei) (Okamoto *et al.*, 2001).

Daugelis bakterijų kolagenolizinių peptidazių kartu yra ir Pz-peptidazės, nes abiejų grupių atstovai skelia tokią pačią peptidinę jungtį sudarytą, tarp Leu ir Gly. Pz-peptidazės papildo kolagenazių veikimą baigiamuosiuose kolageno proteolizės etapuose, vykstančiuose ląstelės citoplazmoje (Watanabe, 2004).

Pz-peptidazės yra proteolizinių fermentų grupė skaldanti sintetinį (1963 metais sukurtą *Clostridium* genties kolagenazėms tirti) substratą 4-fenilazobenziloksikarbonil (Pz) - L-leucilglicil-L-prolil-D-argininą.

Tikrosios bakterijų Pz-peptidazės išskirtos iš *Geobacillus collagenovorans* MO-1 (Pz-peptidazė A (62 kDa) (M03.010) ir B (69 kDa) (M03.007)) ir viena iš *Bacillus licheniformis* (Miyake *et al.*, 2005). Šių peptidazių genai aptikti daugelyje *Geobacillus* genties kamienų. Pz-peptidazės nėra kolagenolizinės, nes neskaido natyvaus kolageno, bet yra svarbios bakterijoms įsisavinant kolagenolizės produktus. Struktūros atžvilgiu tai įprastos aktyviojo centro struktūros monocinko MP. Kaip ir stuburinių, bakterijų Pz-peptidazės specializuotos skaidyti oligopeptidus. Visgi Pz-peptidazės substrato specifiškumu akivaizdžiai skiriasi nuo bakterijų metalo oligopeptidazių grupės fermentų (Watanabe, 2004). Identifikavus tretinę Pz-peptidazės A struktūrą buvo nustatyta, jog aktyviojo centro skirtumai, lyginant su žinduoliuose veikiančiomis timeto oligopeptidazėmis, lemia substratinio specifiškumo skirtumus (Kawasaki *et al.*, 2010).

*G. collagenovorans* tipiniame kamienne nustatyta kolagenazė tirta tikslingai ir charakterizuota. Tai SP tipo peptidazė S08.142; specifiškai skaidanti I ir IV tipo kolagenus, kazeiną bei želatiną, bet visiškai nehidrolizuojanti oligopeptidinių substratų. Optimalus kolagenazės pH - nuo 7,1 iki 9,3; optimalus temperatūros intervalas siekia 60 °C, bet aktyvumas staiga krenta, perkopus 80 °C ribą. Fermentą visiškai inhibuoja Fe<sup>2+</sup> katijonai (Okamoto *et al.*, 2001).

Didžioji dalis šiuo metu žinomos bakterijų kolagenolizinių peptidazių priskiriama MP - M9 šeimai (MEROPS peptidazių duomenų bazės klasifikacijoje). Į jos sudėtį įeina *Clostridium* ir *Vibrio* genčių atstovų kolagenazės. Remiantis struktūra, šios kolagenazės - tik tolimai giminingi kolagenoliziniai fermentai. Todėl šeima padalinta į pošeimius: M9A - *Vibrio* genties kolagenazės, o

M9B - *Clostridium*. Pastarosios geriausiai charakterizuotos prokariotinės kilmės kolagenazės. Vien *C. histolyticum* geba sekretuoti 7 skirtingas kolagenazes. Tai skirtingų struktūrinių savybių peptidazės, tačiau jas vienija gebėjimas skaidyti natyvią kolageno superspiralę, peptidinį ryšį hidrolizuojant prieš Gly (Wart, 2004).

Likę bakterijų kolagenoliziniai fermentai priskiriami kitoms šeimoms. Sekretuojama *Cytophaga* genties bakterijos kolagenazė - citofagalizinas - sudaro M43 šeimą. C25 šeimą sudaro gingipainai (Rawlings *et al.*, 2010). Proteolizuojamos peptidinės jungties atžvilgiu gingipainai - griežtai specializuoti fermentai: gingipainas R (C25.001) hidrolizuoja peptidinę jungtį tik po Arg, o gingipainas K (C25.002) - po Lys. Abiem atvejais šios CP veikia dėka His<sup>343</sup> ir Cys<sup>471</sup> formuojamos katalitinės diados. Gingipainų veikimui būtina redukuojanti aplinka bei neutraliam artimas pH. Abu gingipainai laikomi esminiais *Porphyromonas gingivalis* kolagenolizinių potencialą palaikančias fermentais. Įrodyta, jog į plazminę membraną integruoti gingipainai geba savarankiškai proteolizuoti fibrilinius kolagenus, tuo tarpu su plazmine membrana struktūrinio komplekso nesudarantieji tikslingai skatina MMP aktyvumą (Guo *et al.*, 2010).

#### 1.2.2.1 U32 kolagenolizinių peptidazių šeima

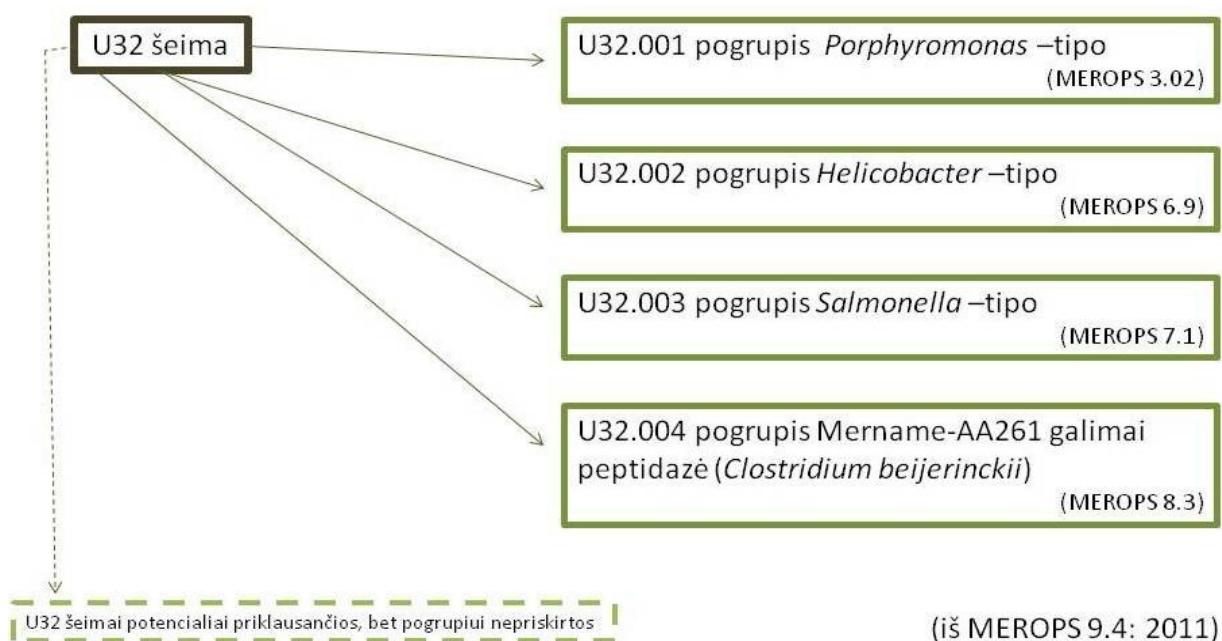
Tai viena seniausiai atrastų iš iki šiol necharakterizuotų gyvojo pasaulio peptidazių įvairovės šeimų. U32 šeimos peptidazių tyrimai pradėti 1991 m., identifikavus vienos iš *P. gingivalis* genų seką bei parodžius, jog ji koduoja kolagenolizinę peptidazę (Takahashi *et al.*, 1991). Didėjant sekoskaitos duomenų apimčiai buvo identifiukuota daugiau genų, kuriuose nustatytas konservatyvus motyvas, atitinkantis kolagenazės iš *P. gingivalis prtC* (angl. *proteinase with collagenase activity* - proteinazė, pasižyminti kolagenoliziniu aktyvumu) geno motyvą: E-x-F-x<sub>(2)</sub>-G-[SA]-[LIVM]-C-x<sub>(4)</sub>-G-x-C-x-[LIVM]-S (Rawlings *et al.*, 2010). Pastarųjų genų grupė MEROPS peptidazių klasifikacijoje apjungta, išskiriant į atskirą šeimą. Jai suteiktas U32 nomenklatūrinis kodas, U (angl. *unassigned*) - nenustatyto katalizinio tipo šeima ir eilės numeris neidentifikuoto katalizinio mechanizmo šeimų grupėje (Rawlings *et al.*, 2010).

2004 m., remiantis detaliu *Helicobacter pylori* virulentiškumo faktorių tyrimu (Kavernmann *et al.*, 2003), kurio metu nustatyta kolagenazės HP0169 seka bei aktyvumas, buvo išskirtas antrasis U32 pogrupis, atitinkamai - U32.002 *Helicobacter* tipo, į *prtC* geną panašius genus apjungiant į pirmą *Porphyromonas* pogrupį - U32.001. 2005 m. išskirtas trečiasis *Salmonella* tipo pogrupis U32.003, kurio prototipinė seka *Salmonella typhimurium clg* - galimai peptidazės genas (Carlson *et al.*, 2001). Galiausiai 2008 m. išskirtas ketvirtasis pogrupis pagal *Clostridium beijerinckii* galimai peptidazės *AA261* geno seką. Šis pogrupis išskirtas tik bioinformatines sekoskaitos duomenų

analizės pagrindu. Pastaruoju metu MEROPS klasifikacinė sistema dalį potencialiai U32 šeimos baltymus koduojančių genų apjungia į papildomą, penktąjį, pogrupį - pogrupiui nepriskirtas U32 peptidazes (žr. 2 pav.).

U32 atstovų genai identifikuoti daugiau nei 1000 bakterijų kamienų, priskiriamų didelei skirtingų genčių įvairovei, visgi U32 - tik prokariotuose sutinkama šeima (Rawlings *et al.*, 2010).

Biocheminis šeimos peptidazių charakterizavimas labai fragmentiškas. Iš dalies charakterizuotos tik aprašytų pogrupių holotipinės peptidazės.



**2 pav.** U32 kolagenolizinių peptidazių šeimos klasifikacija tarptautinėje MEROPS peptidazių ir jų inhibitorių duomenų bazėje.

Įrodyta, jog PrtC (U32.001) kolagenazė skaido azokolį, I tipo kolageną (tirpų, temperatūra destabilizuotą bei fibrilinį), III tipo kolageną (labai vangiai (Aoki *et al.*, 1993)). Ši peptidazė nesugeba hidrolizuoti želatinos, IV tipo kolageno, Pz-oligopeptido (Takahashi *et al.*, 1991; Kato *et al.*, 1992) bei kazeino (Otogoto ir Kuramitsu, 1993). Gel filtracija parodė, jog natyviomis sąlygomis PrtC veikia kaip iš dviejų 37,8 kDa monomerų formuojamas homodimeras. Pastarojo aktyvumą didina cistatino baltymas ir kalcio katijonai, inhibuoja - cinko ir geležies jonai. EDTA, *p*-chloromerkuribenzoinė rūgštis bei histatino baltymas taip pat veikė kaip inhibitoriai (Kato *et al.*, 1992). Visgi hipotezė, jog *prtC* koduojamas baltymas - CP, nebuvo patvirtinta (Watanabe, 2004), nes β-merkaptioetanolis ir ditiotrietolis veikia kaip silpni aktyvumo slopintojai (Kato *et al.*, 1992). Pažymėtina, jog, bandant nustatyti šios peptidazės aktyvumą pradiniuose baltymo preparato ruošimo etapuose, bendrame *Escherichia coli* ekspresijos kamienų citoplazminių baltymų preparate

to nepavyko padaryti. Manoma, jog ši bakterija gali sintetinti specifinį viduląstelinį U32 šeimos inhibitorių (Kato *et al.*, 1992). Sekvenuotuose *E. coli* genomuose aptinkama iki keturių skirtingų U32 šeimos genų (Fricke *et al.*, 2008), kas leidžia suformuluoti hipotezę, jog citoplazmoje būtina šių peptidazių inhibicija siekiant reguliuoti aktyvumą lokalizacijos atžvilgiu.

Bandant pritaikyti *prtC* geną kaip molekulinį žymenį kokybinei PGR reakcijai, siekiant greitai bei jautriai identifikuoti *P. gingivalis* diagnozuojant periodontitą, buvo nustatytas didelis šio geno sekos variabilumas skirtinguose rūšies kamienuose (Bodinka *et al.*, 1994). Atrinkus konservatyvias šios peptidazės geno sekos sritis pritaikymas sėkmingai *P. gingivalis* diagnostikai buvo įrodytas (Slots *et al.*, 1995). Vėlesni tyrimai parodė, jog *prtC* genas nėra būdingas kitiems nei *P. gingivalis* periodontito sukėlėjams. Be abejo šis specifiskumas rūšies kamienams didina diagnostinį PGR reakcijos, grindžiamos *prtC* sekos nustatymu, objektyvumą (Odell *et al.*, 1999). Geno variabilumas sėkmingai taikomas *P. gingivalis* molekulinei epidemiologinei analizei: skirtingo virulentiškumo lygio kamienams būdingi skirtingi *prtC* sekos variantai (Wittstock *et al.*, 2000). Įrodytas pacientų sergančių periodontitu, serumo reakingumas prieš PrtC peptidazę, tai leidžia teigti, jog šį baltymą *P. gingivalis* aktyviai sekretuoja, tačiau sekrecijos faktas nėra įrodytas (Beikler *et al.*, 2003). PrtC peptidazės svarbą periodontito vystymuisi, analizei, taikant ląstelių kultūras, įrodė tiesioginė priklausomybė tarp baltymo kiekio ir citokinų sekrecijos intensyvumo (Wu *et al.*, 2007).

PrtC peptidazę koduojančio geno ortologas (91 % sekos panašumo) buvo identifikuotas *P. gingivalis* kamienuose, sukeliančiuose periodontitą katėms. Gyvūnų, sergančių periodontitu, serume aptikti antikūnai prieš šią peptidazę. Naudojant rekombinantinį minėtos peptidazės preparatą, kurio gamybai buvo taikoma ekspresija *E. coli*, įrodytas peptidazės proteolizinis aktyvumas bent prieš želatiną, katalizę efektyviai inhibuojant EDTA (Norris ir Love, 2000).

Urogenitalinio trakto patogeno *Proteus mirabilis* genome taip pat identifikuotas U32.001 pogrupio peptidazės genas. Pastarojo seka artima *P. gingivalis prtC* geno sekai. *P. mirabilis B2* genas svarbus virulentiškumo raiškai *in vivo* (bent pelėse): geno išveiklinimas mažina *P. mirabilis* kolonizacijos efektyvumą. Nors *in vitro B2* geno produktas nebuvo analizuotas geno išveiklinimas taip pat mažina *P. mirabilis* azokazeino skaidymo intensyvumą. Bioinformatinė *B2* sekos analizė leidžia suformuluoti prielaidą, jog B2 baltymas yra sekretuojamas (Zhao *et al.*, 1999).

Antrojo U32.002 šeimos pogrupio peptidazių tyrimai, kaip ir pirmojo, yra fragmentiški. Analizuota tik holotipinė peptidazė HP0169 iš *H. pylori*. Įrodyta, jog tai - sekretuojamas baltymas, gebantis hidrolizuoti azokolį bei I tipo kolageną. Taip pat nustatyta, jog jo aktyvumą slopina EDTA. HP0169 svarba, kolonizuojant virškinamojo trakto epitelį, *in vivo* įrodyta, pasitelkiant smilteles (Kavermann *et al.*, 2003).

Trečiasis U32 šeimos pogrupis - U32.003 *Salmonella* tipo, plačiau nagrinėtas tik nustatant funkcinę pogrupio peptidazių funkciją *in vivo*. Pogrupio holotipinė peptidazė - Clg baltymas atrastas siekiant nustatyti, koks *S. typhimurium* toksinas lemia šio patogeno ypač antibiotikams atsparių kamienų citopatišką fenotipą (Carlson *et al.*, 2001). Nustatyta šios kolagenazės seka, o, taikant skenuojančią elektroninę mikroskopiją, įrodytas citotoksiškumas eukariotinėms ląstelėms (Wu *et al.*, 2002) bei būtinumas patogeno ląstelės gyvybingumui makrofaguose (Carlson *et al.*, 2005). Visgi *in vitro* Clg peptidazės kolagenolizinis aktyvumas nebuvo įrodytas, nors netiesiogiai identifikuota baltymo sekrecija. Clg ekspresija konkrečiuose *Salmonella* kamienuose griežtai kontroliuojama, iki šiol plačiau aprašytas tik pagrindinis *clg* ekspresijos represorius SlyA. Manoma, jog reguliacijos mechanizmas tiesiogiai susijęs su „pirmojo tipo *Salmonella* genominiu regionu (SGI 1)“ - rezistentiškumo genų santalka, bet nei mechanizmo veikimas, nei reguliaciniai baltymai plačiau nenagrinėti (Carlson *et al.*, 2005).

Virulentiškumo veiksmu įvardijamas ir antrasis analizuotas U32.003 pogrupio baltymas - yegQ iš *Salmonella enterica*. Pasitelkiant viščiuko gemalo makrofagus, įrodyta šio baltymo svarba patogeno prasiskverbimui į makrofagą. Išsamūs galutinės yegQ baltymo lokalizacijos tyrimai, nustatė, jog ši peptidazė aktyviai sekretuojama iš *S. enterica*, tačiau nei kolagenolizinio, nei želatinolizinio aktyvumų *in vitro* nepavyko aptikti (Zhao, 2002).

Analizuojamo pogrupio peptidazę koduojantis genas nustatytas *Aeromonas* genties rūšių kamienuose. Šių oportunistinių žmogaus bei žuvų gleivinės patogenų genomuose nustatyta viena U32.003 pogrupio peptidazės geno kopija. *Aeromonas veronii* šio geno funkcija *in vivo*, jį įvardijant *acg* (angl. *Aeromonas collagenase gene* – aeromono kolagenazės genas), tirta išsamiau. Lyginant laukinį kamieną su mutantu, kurio *acg* tikslingai išveiklintas buvo nustatytas, jog kolagenolizinis kamieno potencialas susilpnėjo perpus, tuo tarpu kazeinolizinis, želatinolizinis ir elastinolizinis nepakito. Mutantinio *A. veronii* kamieno su neaktyviu *acg* genu adhezyvumas bei invazyvumas kolonizuojamo epitelio atžvilgiu (kaip modelį taikant karpio epitelio ląstelių linijas) taip pat susilpnėjo. Išveiklinus *acg* geną *A. veronii* prarado didžiąją citotoksinio potencialo dalį, o letali dozė padidėjo dvigubai, kaip modelį *in vivo* pasitelkiant peles bei karpius (Han *et al.*, 2008). Deja, *acg* genas nebuvo klonuotas, o koduojamas baltymas nebuvo analizuotas *in vitro*.

U32.003 šeimos pogrupis fragmentiškai analizuotas taip pat ir B grupės streptokokuose. Klonavus U32 peptidazes iš *Streptococcus mutans* ir *Streptococcus agalactiae* *in vitro* įrodytas jų kolagenolizinis bei želatinolizinis aktyvumas (Carson, 2006). *S. mutans* U32 peptidazės katalizinį aktyvumą inhibavo EDTA, tačiau ne 1,10-fenantriolinas. Želatinos zimogramose šis fermentas veikė kaip aktyvus homodimeras (Ioannides, 2004). Tiesioginė biocheminė analizė siekiant nustatyti jungimosi prie kolageno domeną, pastarojo neidentifikavo (Han *et al.*, 2006).

Visuose *Geobacillus* kamienuose, kurių genomai visiškai nuskaityti, chromosomoje sutinkamas bent vienas vienakopijinis U32.002 (*Helicobacter*-tipo) pogrupio peptidazės genas (Rawlings *et al.*, 2010). Genų sekų identifikavimu tyrimai ir apsiribojo. U32 šeima nėra tirta nepatogenuose, juo labiau termofiluose. U32 šeimos genų transkripcijos faktas nėra įrodytas *Geobacillus* gentyje. Nors *Geobacillus* kamienų skaičius su visiškai nuskaitytu genomu didėja kitų potencialių kolagenolizinių peptidazių genų šių termofilų genomuose, taikant bioinformatinę analizę, neidentifikuojama. Kaip jau minėta 1.2.2 skyriuje, gana išsamiai charakterizuota kolagenazė iš *G. collagenovorans* nėra priskiriama U32 šeimai. Naujausios *Geobacillus* genties taksonominės revizijos šio kamieno nepriskiria *Geobacillus* genčiai, be to, visiškai sekvenuotuose *Geobacillus* kamienuose aprašytos kolagenazės geno neaptikta.

Apibendrinant U32 peptidazių šeimos literatūros analizę svarbu pažymėti, jog dalis autorių prognozuoja šeimai priskiriamų baltymų struktūrinį bei funkcinį heterogeniškumą (Beikler *et al.*, 2003; Carlson *et al.*, 2005). Teorinės prielaidos pastarajam teiginiui kaupiasi, gausėjant informacijos apie šios šeimos baltymus kiekiui. Neatmetama galimybė, jog U32 konservatyvusis regionas nėra susijęs su katalizinio potencialo ir/ar funkcijos *in vivo* palaikymu, bet yra reikšmingas natyvios baltymo erdvinės struktūros įgyjimui ir/ar palaikymui.

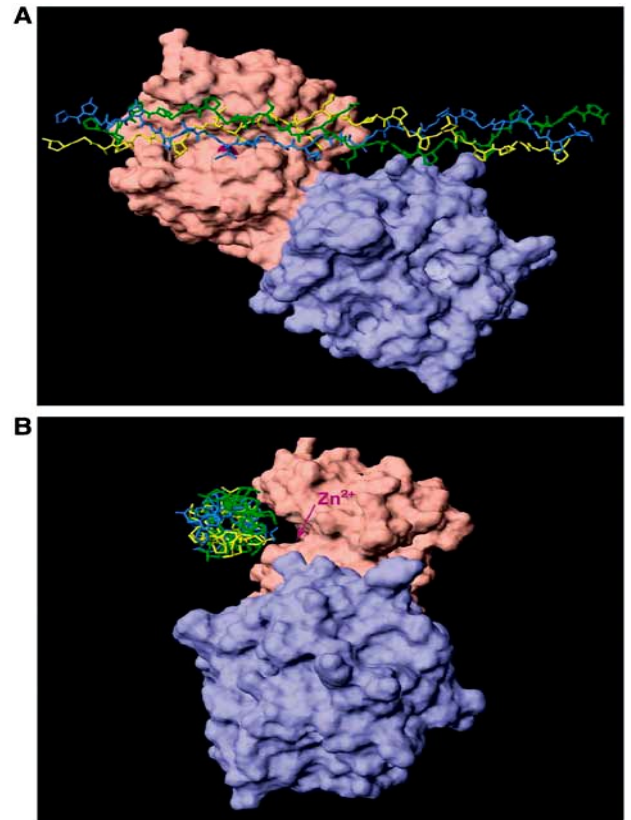
Hipotezė - U32 šeima, heterogeniška, šiuo metu jungianti tiek kolagenolizines peptidazes, tiek nepeptidazes, siekia į logišką visumą sujungti nors ir fragmentiškus, bet gan prieštarigus U32 analizės rezultatus. Dalis U32 peptidazių šeimos baltymų aprašytos, neabejotinai įrodant jų proteolizinio potencialo raišką (Kato *et al.*, 1992; Kavermann *et al.*, 2003; ir kt.). Visgi pastaruoju atveju tai „silpnos kolagenazės“, lyginant jų katalizinio aktyvumo parametrus, su pvz., *Clostridium* kolagenazėmis (Aoki *et al.*, 1993). Be to, U32 peptidazės funkcionuoja kaip pagalbinės proteazės, tipišku atveju papildančios aktyvesnių kolagenolizinių peptidazių kolagenolizinio potencialo raišką (Potempa *et al.*, 1995; Houle *et al.*, 2003). Tuo tarpu, kaip jau minėta, dalies klonuotų U32 galimai peptidazių katalizinio potencialo *in vitro* nepavyko nustatyti, neabejotinai įrodant jų svarbą bendro proteolizinio, konkretaus kamieno, potencialo raiškai. Išveiklinus U32 galimai peptidazės geną kamieno proteolizinis aktyvumas reikšmingai sumažėdavo. Pastaroji išvada sudaro pagrindą prielaidai, jog U32 peptidazės gali atlikti svarbias reguliacines funkcijas (Zhao, 2002; Carlson *et al.*, 2005; ir kt.). U32 galimai peptidazių genų identifikavimas bakterijų, kurios nepasižymi kolagenoliziniu aktyvumu, taip pat netiesiogiai grindžia prielaidą, jog U32 - heterogeninė šeima (Beikler *et al.*, 2003).

### 1.3 Kolagenolizė: bendrasis modelis

Ilgą laiką detalus kolagenolizės mechanizmas išliko neišspręsta mįsle. Tik pastarųjų metų tyrimai detaliam paaiškino proceso eigą molekulinio lygiu. Nagrinėjant kolagenolizę, būtina išanalizuoti, koku būdu vyksta pirmieji kolagenolizės etapai, sudarantys galimybę pasiekti proteolizuojamą peptidinę jungtį. Jos hidrolizė vyksta gerai ištirta eiga, kurios ypatumus lemia kolagenazės, kaip peptidazės, katalizinis tipas.

Atrastas mechanizmas paaiškino, koku būdu I tipo kolageno natyvią fibrilę skaido MMP1. Nustatyta, jog fibrilės protomerai - I tipo kolageno trigubosios superspiralės - šį agregatą sudaro taip, jog visos proteolizei labilios vietos yra apsaugotos. Pirmiausia turi įvykti dalinė apsaugotų vietų proteolizė, padaranti jas pažeidžiamomis. Dalinės proteolizės vieta ir eiga griežtai reglamentuota (Perumal *et al.*, 2008). MMP1, kaip ir kitų MMP atveju, atpažinti proteolizės vietai natyvioje kolageno superspiralėje reikia trijų domenų: katalizinio, C-galinio substratą atpažįstančio (hemopeksininės sandaros) ir pirmuosius du jungiančiojo (žr. 3 pav.). Pastarasis gali lankstytis, o jo ar. sekoje daug Pro. Manoma, jog substrato atpažinimo bei jungiantysis domenai dalyvauja prisijungime prie superspiralės ir jos išvyniojime (Chung *et al.*, 2004). C-galinis domenas vienas pats specifiskumo skaidyti natyvias kolagenų molekules nelemia, nors procesui yra labai svarbus, pvz. MMP3 struktūroje šis domenas yra, bet peptidazė vien tik todėl neskaido natyvių kolageno molekulių.

Aktyvusis MMP1 centras išsidėstęs kataliziniame domene lokalizuotame griovelyje. Jo konformacija per maža, kad į jį tilptų natyvi kolageno superspiralė. Postuluojama, jog prieš proteolizę, superspiralė lokaliai išvyniojama ir kiekviena ją sudariusi  $\alpha$  spirālės grandinė paeiliui patenka į MMP1 aktyvųjį centrą (Chung *et al.*, 2004). Atitinkamai substrato prisijungimo vietos turi turėti sekas skirtas išvyniojimui. Tai nėra įrodyta, todėl alternatyviai egzistuoja hipotezė, teigianti,



**3 pav.** MMP1 domeninė sandara bei jungimasis prie kolageno I tipo superspiralės. A - vaizdas iš priekio, B - pasukus 90° į kairę. Rožine spalva žymimas katalizinis MMP1 domenas, o mėlva - C-galinis substratą atpažįstantis. Cinko atomas pažymėtas violetine spalva, o jo lokalizaciją nurodo rodyklė

(iš Chung *et al.*, 2004).

jog MMP1 pasinaudoja temperatūros sukeltomis superspiralės grandinių fluktuacijomis, despiralizuodama susilpnėjęs superspiralės vidiniams ryšiams (Perumal *et al.*, 2008).

Prieš tai turi sekti MMP1 priartėjimas prie superspiralės. Fibrilinių kolageno tipų ji lokalizuota fibrilėje. Tai kompaktiškos sandaros agregatas, todėl atskira superspiralė konformaciškai neprieinama nei pačiai MMP1 (kolagenoliziniam fermentui bendruoju atveju), nei C-galiniam domeniui. Todėl kritiniu kolagenolizės momentu laikytina telopeptido sekos proteolizė. Ši seka lėmė fibrilės polimerizaciją ir liko jos sudėtyje procesui pasibaigus (Chung *et al.*, 2004). Iki šiol ginčijamasi ar šią proteolizę atlieka pati MMP1, ar specifiška telopeptidazė. Bet kokiu atveju telopeptido pašalinimas sukuria pakankamai vietos MMP1 ir ji jau gali prisijungusi despiralizuoti superspiralę. Tokia eiga, palaipsniui, sluoksnis po sluoksnio fibrilė „išvyniojama“ iki savojo centro. Susidaro iš dalies suskaidytų I tipo kolageno superspiralių mišinys - želatina. Jį baigia degraduoti želatinoliziniu specifiskumu pasižyminčios peptidazės (jų tarpe ir Pz-peptidazės) (Perumal *et al.*, 2008).

Apibendrinant, galima teigti, jog MMP kolagenolizės eiga ištirta gana išsamiai, tuo tarpu bakterijų kolagenolizinių fermentų mechanizmai vis dar apibūdinami fragmentiškai.

## 1.4 Praktinė kolagenolizės svarba

Žmonija kolagenų denatūravimo produktus naudoja nuo seniausių laikų. Egiptiečiai kolageną naudojo jau 4000 metų per. m. e., o Amerikos indėnų gentys - 1500 metų pr. m. e. kaip klijus. Juos tuo laiku ruošdavo vandenyje, kaitinant stambių raguočių sausgysles. Šiuolaikinę kolagenolizės reikšmę sudaro:

- TIESIOGINIS KOLAGENOLIZĖS TAIKYMAS, NAUDOJANT KOLAGENOLIZINES PEPTIDAZES. Tiek stuburinių, tiek bakterinės kilmės kolagenazės plačiai naudojamos medicinos poreikiams, taip pat kaip eksperimentiniai reagentai biotechnologijoje.

Medicinoje kolagenazės nepakeičiamos, greitinant komplikuoatų žaizdų gydymą, gydant stuburo tarpšlankstelių diskų patologijas (Brett, 2005). Modernus nudegimų, odos opų gydymas neįsivaizduojamas be šių peptidazių. Kolagenolizinės peptidazės taip pat pasitelkiamos kaip papildoma priemonė, gydant keletą vėžio formų (Woessner *et al.*, 1998). Mokslinėse laboratorijose kolagenazės padeda iš audinių išgauti ląstelių kultūras. Pabrėžiama, jog bakterinės kolagenazės puikiai minkština mėsą, todėl gali būti panaudotos maisto pramonės reikmėms (McCormick, 1999). Farmacijos laboratorijose intensyviai tiriamos bakterijų kolagenolizinės peptidazės, siekiant jų gebėjimą jungtis prie kolageno (žmogaus audiniuose taip pat) panaudoti farmaciniais tikslais (Watanabe, 2004).



Kolagenolizinius fermentus, produkuojamus bakterijų ir grybų, bandoma pasitelkti kovai su žemės ūkio naudmenų kenkėjais. Daugelio jų (pvz., parazitinių augalų nematodų) išorinių dangalų pagrindą sudaro kutikulės kolagenai, kurių suskaidymas kenkėją sunaikina.

Termofilinių bakterijų kolagenolizinius fermentus taip pat bandoma pritaikyti biotechnologiniuose procesuose. Termofilų kolagenazių naudojimas leistų sutrumpinti kolagenolizės laiką. Taip pat svarbu, kad termofilų naudojimo neriboja patogeniškumas (Watanabe, 2004).

- KOLAGENO PEPTIDŲ PANAUDOJIMAS. Šis terminas žymi kolagenų pramoninės kolagenolizės produktus (Watanabe, 2004). Kolageno peptidai taikomi kaip supresoriai daugelio jungiamojo audinio ligų atveju, pvz., artrito (Harrington, 1996). Įrodyta, jog, naudojant maisto papildus su kolagenu, mažėja tikimybė susirgti opalige, gerėja medžiagų apykaita odos audiniuose, mažėja kraujospūdis. Konkrečiais atvejais kolageno peptidai vartojami kaip priemonė, apsauganti nuo patogeninių bakterijų (Brett, 2005). Pastaraisiais metais ypač suaktyvėjo kolageno peptidų naudojimas kosmetikos pramonėje. Jie pradėti plačiai naudoti kaip drėkinamųjų kremų sudėtinė dalis. Kolagenų peptidai ir natyvūs kolagenai taip pat svarbūs plastikos chirurgijai bei dirbtinių odos pakaitalų gamybai (Harrington, 1996).

## 2. METODAI

---

### 2.1 Tirti kamienai

*G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> - obligatinis termofilas (augimui optimalios sąlygos: tarp 55 - 60 °C, pH 6,5), aerobas/fakultatyvus anaerobas, chemoorganotrofas, išskirtas iš Lietuvos naftos gręžinių Girkaliuose. Filogenetiškai kamienai artimiausi - *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366<sup>T</sup> ir *Geobacillus vulcani* DSM 13174<sup>T</sup> (Kuisienė *et al.*, 2004).

### 2.2. Medžiagos

#### 2.2.1 Medžiagos terpių ir buferių gamybai

D-biotinas; EDTA; MES; Tiaminas; TRIS (*AppliChem*, Vokietija); Amonio chloridas; Gliukozė (*Becton Dickinson and Co.*, JAV); Maitinamasis buljonas (*Biokar Diagnostics*, Prancūzija); Triton X-100 (*Ferak*, Vokietija); Agar-agaras; Cinko chloridas; Druskos rūgštis; Kalio dihidrofosfato anhidratas; L-cisteinas; L-metioninas; L-serinas; L-tirozinas; Magnio sulfato heptahidratas; Natrio chloridas; Natrio hidroksidas; Triptonas (*Merck*, Vokietija); L-alaninas; L-asparaginas; L-asparto rūgštis; L-fenilalaninas; L-glutaminas; L-glutamo rūgštis; L-histidinas; L-izoleucinas; L-prolinas; L-triptofanas; L-valinas (*Reanal*, Vengrija); Glicinas; Inozitolis; Ledinė acto rūgštis; Mielių ekstraktas; Niacinas; Piridoksinas; Riboflavinai (*Roth*, Vokietija); Brij 35; L-argininas; L-leucinas; L-lizinas; L-treoninas; Natrio azidas (*Serva*, Vokietija-JAV); Kalcio chlorido anhidratas (*Sigma*, JAV).

#### 2.2.2 Komerciniai rinkiniai

CloneJET<sup>TM</sup> PCR Cloning Kit; GeneJET<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit; GenJET<sup>TM</sup> RNA Purification Kit; Genomic DNA Purification Kit; InsTAclone<sup>TM</sup> PCR Cloning Kit; Rapid DNA Ligation Kit; RevertAid<sup>TM</sup> Premium First Strand cDNA Synthesis Kit; Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (*Fermentas*, Lietuva).

#### 2.2.3 Medžiagos PGR ir nukleorūgščių vizualizavimui

2x RNA Loading Dye; 6x DNA Loading Dye; 10x *Taq* Buffer su amonio sulfatu; 50x TAE buferis; dNTP Mix (2 mM kiekvieno); GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder; Magnio chlorido 25 mM tirpalas; MassRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix; *Pfu* DNA polimerazė; RiboRuler<sup>TM</sup> High Range RNA

Ladder; *Taq* DNA rekombinantinė polimerazė (*Fermentas*, Lietuva); Agarozė (*Lonza*, Šveicarija); DMSO, Etidžio bromidas (*Roth*, Vokietija).

## 2.2.4 Kitos medžiagos

Sacharozė (*AppliChem*, Vokietija); Akrilamidas; Bromfenolio mėlynasis-V; Kumasi mėlynasis G-250; N,N-metilenbisakrilamidas; TEMED (*Bio-Rad*, JAV); Merkaptioetanolis (*Ferak*, Vokietija); *Bam*HI; DEPC veiktas dH<sub>2</sub>O; DNase I, RNase-free; IPTG; *Not*I; PageBlue™ Protein Staining Solution; PageRuler™ Unstained Protein Ladder; Prestained Protein Molecular Weight Marker; RiboLock™ RNase Inhibitor; *Sal*I (*Fermentas*, Lietuva); Kazeinas iš karvės pieno; Tirpus I tipo kolagenas iš žiurkės uodegos (*Fluka*, Šveicarija); Keratinas iš ragų ir kanopų; Želatina iš kiaulės odos (*ICN Biomedicals, Inc.*, JAV); 2-izopropanolis; Chloroformas; Natrio acetatas; Ortofosforo rūgštis (*Merck*, Vokietija); Albuminas iš jaučio serumo; Ampicilino sulfatas; APS; Kanamicino sulfatas; Lizocimas; NDS (*Roth*, Vokietija); Elastinas iš jaučio kaklo raiščio (*Sigma*, JAV); Rektifikuotas etilo alkoholis (*Vilniaus degtinė*, Lietuva).

## 2.3. Terpės

### 2.3.1 Terpės biomasės prieaugiui, palaikymui ir kultūros grynumo patikrinimui

**Maitinamasis agaras:** Maitinamasis buljonas 2 % (svoris/tūris); Agaras 2 % (svoris/tūris). Sudėtinės dalys tirpinamos distiliuotame H<sub>2</sub>O (dH<sub>2</sub>O) iki numatyto tūrio. Terpė autoklavuojama 30 min. + 1,0 atm (121 °C), išpilstoma į Petri lėkšteles.

**Luria-Bertani (LB):** NaCl 10 g; Mielių ekstraktas 5 g; Triptonas 10 g. Sudėtinės dalys tirpinamos dH<sub>2</sub>O iki 1000 mL. Ruošiant agarizuotą LB (LB-Ag.) papildomai įdedama 15 g agaro. Terpė autoklavuojama 30 min. + 1,0 atm (121 °C). Terpei pravėsus ji papildoma atitinkamu kiekiu koncentruotų antibiotikų tirpalų ir išpilstoma.

### 2.3.2 Skysta terpė kamieno kultivavimui vykdant transkripcijos analizę

**Modifikuota mineralinė terpė numeris 9 (mM9):** 5x mM9 druskų tirpalas (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 g; NaCl 2,5 g; NH<sub>4</sub>Cl 5 g; tirpinama dH<sub>2</sub>O iki 1000 mL) 200 mL; Gliukozė 2,5 g; 1 M MgSO<sub>4</sub> (magnio sulfato heptahidrato 246 g; tirpinama dH<sub>2</sub>O iki 1000 mL) 2 mL; 1 M CaCl<sub>2</sub> (kalcio chlorido anhidrato 111 g; tirpinama dH<sub>2</sub>O iki 1000 mL) 0,1 mL; 1000x vitaminų tirpalas (D-biotinas 10 mg; Inozitolis 100 mg; Niacinas 100 mg; Piridoksinas 100 mg; Riboflavinai 100 mg; Tiaminas 100 mg; tirpinama dH<sub>2</sub>O iki 1000 mL) 1 mL; 10x aminorūgščių tirpalas (L-alaninas 178

mg; L-argininas 632 mg; L-asparaginas 300 mg; L-asparto rūgštis 266 mg; L-cisteinas 120 mg; L-fenilalaninas 165 mg; Glicinas 150 mg; L-glutaminas 240 mg; L-glutamo rūgštis 294 mg; L-histidinas 210 mg; L-izoleucinas 263 mg; L-leucinas 262 mg; L-lizinas 363 mg; L-metioninas 76 mg; L-prolinas 230 mg; L-serinas 210 mg; L-tirozinas 180 mg; L-treoninas 238 mg; L-triptofanas 51 mg; L-valinas 234 mg; ar. tirpinamos dH<sub>2</sub>O iki 1000 mL (Leejeerajumnean *et al.*, 2000) 100 mL; MES 9,76 g (50 mM) iki 1000 mL (Atlas, 2004).

Reikiamais tūriais išpilstyta terpė autoklavuojama 20 min. + 0,5 atm (112 °C). 1 M MgSO<sub>4</sub> bei 1 M CaCl<sub>2</sub> tirpalai autoklavuojami identiškomis sąlygomis, tačiau atskirai. Į išpilstytus mM9 tūrius atitinkami šių tirpalų tūriai supilami tik ataušę iki kambario temperatūros (Atlas, 2004).

## 2.4 Metodai

### 2.4.1 Kultūros grynumo patikrinimas

*G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> kultūros grynumas patikrintas mikrobiologinio klonavimo būdu. Klonuota ant maitinamojo agarų terpės kultivuojant 24 val., esant 60 °C temperatūrai, aerobinėmis sąlygomis. Grynumas vertintas vizualiai analizuojant kolonijų morfologiją.

Naudotų *E. coli* kamienų grynumas vertintas 24 val. kultivavus ant LB-Ag., be antibiotikų, auginus esant 37 °C temperatūrai, aerobinėmis sąlygomis. Grynumas vertintas vizualiai.

### 2.4.2 Suminės RNR preparatų iš *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> išskyrimas

*G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> kamienas po keliakartinio kultūros grynumo testavimo kultivuotas skystoje mM9 (naudota 100 mL terpės 250 mL tūrio kolboje), aeruojant 180 rpm. Kultivuota pH 6,5; 50 mM Mes-NaOH esant 60 °C. Inokuluota 5 %. Kultivuojant kas dvi valandas vykdyta kultūros augimo dinamikos kontrolė.

Siekiant nustatyti U32.002 peptidazės geno transkripcijos faktą bei transkripcijos dinamiką kamieno kultūros augimo fazių atžvilgiu, 2, 4, 6 bei 7 kultūros kultivavimo valandą aseptiškai buvo imama po 1 mL kultūros. Vėliau ląstelės nucentrifuguotos 14800 rpm, 10 min, esant 4 °C. Surinktos konkrečios augimo fazės ląstelės lizuotos, atsižvelgiant į suminės RNR valymo rinkinio rekomendacijas. Taikytas lizavimo tirpalas: pH 8; 10 mM TRIS-HCl; 1 mM EDTA + 0,4 mg/mL lizocimo. Vėlesnės suminės RNR išskyrimo procedūros vykdytos pagal gamintojo rekomendacijas, naudotas rinkinys: GenJET<sup>TM</sup> RNA Purification Kit. Kiekvienam kultūros augimo tarpsniui vykdyti du nepriklausomi RNR preparatų išskyrimai. Pastarieji nepriklausomi tiek laiko, tiek ir *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> kultivavimo mM9 terpėje atžvilgiais.

Pažymėtina, jog RNR skyrimo metu buvo ypač atidžiai vykdoma galimo užteršimo RNazėmis prevencija. Papildomai - iškart po suminės RNR išskyrimo gauti preparatai veikti RiboLock™ RNase Inhibitor RNazių inhibitoriumi, taikant gamintojo rekomenduojamą koncentraciją.

Po suminės RNR išskyrimo bei prevencinės RNazių inhibicijos vykdytas galimų DNR priemaišų šalinimas. Nepageidautinos, galimos DNR priemaišos šalintos vykdam jį suskaidymą DNase I, RNase-free (procesas vykdytas pagal gamintojo rekomendacijas). DNR priemaišų šalinimo efektyvumo kontrolė vykdyta lyginant bendrą nukleorūgščių koncentraciją prieš bei po veikimo DNaze. Koncentracijos matuotos spektrometriškai (spektrometras „Ultrospec 5300“, Amersham) ties 260 nm, laikant, jog 1 OT atitinka 50 mg/mL nukleorūgščių (Sambrook *et al.*, 1989). Spektrometriškai įvertinti nukleorūgščių koncentraciją taip pat buvo būtina tinkamo santykio su DNase I ir RiboLock parinkimui.

Iš konkrečių kultūros augimo fazių išskirtos suminės RNR galimos degradacijos laipsnis įvertintas, taikant horizontaliąją 1 % agarozės elektroforezę (Sambrook *et al.*, 1989). Gelis ruoštas, 1 % (svoris/tūris) agarozės ir etidžio bromido (galutinė koncentracija gelyje - 10 µg/mL) tirpinant 1x TAE buferyje. Pavyzdžiai į šulinėlius buvo įnešami, atitinkama proporcija sumaišius su 2x RNA Loading Dye. Naudotas RiboRuler™ High Range RNA Ladder molekulių masių žymuo. Pasibaigus elektroforezei, RNR analizuota apšvietus UV.

Paruošti suminės RNR preparatai saugoti -20 °C.

### 2.4.3 kDNR sintezė

Išskirti suminės RNR preparatai naudoti atvirkštinės transkripcijos reakcijai. Remiantis gamintojo rekomendacijomis, taikytas rinkinys RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit. kDNR sintezei nuo RNR pasitelktas nespecifinis universalusis pradmuo (Random Hexamer Primer) iš minėto rinkinio. Sintezės produktai analizuoti taikant horizontaliąją 1 % agarozės elektroforezę. Naudotas GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder molekulių masių žymuo. Atvirkštinės transkripcijos rinkinio taikymo metu gauti preparatai naudoti kaip matrica PGR reakcijoms.

### 2.4.4 U32.002 kolagenolizinės peptidazės transkripcijos analizė

Kiekvienas atvirkštinės transkripcijos reakcijos produktų preparatas testuotas taikant penkis skirtingus pradmenis, visomis įmanomomis kombinacijomis:

**GEOL-F (24 nt)** 5'-CGGGCCAACGCTGACAACTTTACG-3';

**GEOL-R (26 nt)** 5'-GAACCTTGACGATTTGCAGCGGATGG-3';

**LITCOL-F (28 nt)** 5'-GGTCGGATCC\*CCATGCTTTTAAAAAATG-3';  
**LITCOL-R (27 nt)** 5'-TTTGCGGCCGC\*\*TTAATTCTCCTTTCTC-3';  
**LITCOL-45Sal (28 nt)** 5'-GCTCCGTCGAC\*\*\*GATGGTCTTTATCGGAG-3'.

(Kuisienė, nepublikuoti rezultatai)

Pradmenys sukonstruoti pagal *Geobacillus kaustophilus* HTA426 U32.002 geno seką (EMBL-CDS Nr. BAD76834). Į pradmenų sekas įvesti restrikcijos endonukleazių *Bam*HI (\*), *Not*I (\*\*) ir *Sal*I (\*\*\*) taikiniai. Pradmenų konstravimui naudota programa PrimerSelect (LaserGene 7.1). Pradmenys sintetinti Metabion, (Vokietija). PGR mišinys (50 µL): 10x Taq Buffer su amonio sulfatu; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM kiekvieno dNTP; 0,25 µM kiekvieno pradmens; 1,25 U rekombinantinės *Taq* DNR polimerazės; 10 ng kDNR.

PGR sąlygos: pradinė denatūracija - 95 °C, 2 min.; galutinė elongacija - 72 °C, 7 min. 30 ciklų: denatūracija - 95 °C, 1 min.; lydymas - 60 °C, 2 min.; elongacija - 72 °C, 3 min. Naudotas aparatas MasterCycler, „Eppendorf“.

Siekiant objektyviai įsitikinti, ar gauti PGR produktai buvo sintetinami tik matricos, susintetintos vykdant atvirkštinę transkripciją, o ne galimų DNR priemaišų, kiekvienam suminės RNR mėginiui vykdyta kontrolė. Atitinkamas, atvirkštinės transkripcijos reakcijai taikyto, suminio RNR preparato tūris buvo taikytas PGR reakcijai (sąlygos žr. aukščiau), vėlgi su visomis galimomis pradmenų kombinacijomis.

Bandyminių bei kontrolinių PGR reakcijų produktai analizuoti, taikant horizontaliąją 1 % agarozės elektroforezę, naudotas GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

#### 2.4.5 U32.002 geno pagausinimas bei nuskaitymas

*G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> genomine DNR buvo išskirta iš kamieno kultūros, kuri po grynumo patikrinimo (žr. 2.4.1) buvo auginama Petri lėkštelėse 14 val. ant maitinamojo agaro, esant 60 °C temperatūrai. Genominės DNR išskyrimui naudotas Genomic DNA Purification Kit. DNR buvo išskirta ir vėliau saugota pagal rinkinio gamintojo instrukcijas.

Išskirta DNR analizuota, pasitelkiant elektroforezės horizontaliame agarozės gelyje metodą (žr. 2.4.2). Naudotas GeneRuler 1 kb DNA Ladder žymuo.

Kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno sekos (su bei be signalinės/pro sekos) pagausinimui nuo išskirtos genominės DNR vykdyta PGR. Pagausinimas vykdytas analogiškai 2.4.4 metode pateiktai eigai, papildant reakcijos mišinį 10 % (tūris/tūris) DMSO. U32.002 geno be potencialios signalinės/pro sekos pagausinimui naudota rekombinantinė *Pfu* DNR polimerazė. PGR naudota 10

ng bakterijų genominės DNR, taikyti specifiniai pradmenys: visai geno sekai - LITCOL-F ir LITCOL-R, geno sekai be signalinės/pro sekos - LITCOL-45Sal ir LITCOL-R.

Po analizės elektroforezės agaroziniame gelyje PGR produktai išvalyti, naudojant ekstrakcijos iš gelio metodą. Valymui buvo naudotas Silica Bead DNA Gel Extraction Kit. PGR produkto valymas ir saugojimas vykdytas pagal rinkinio gamintojo nurodymus.

Išvalytas PGR produktas - U32.002 geno seka (su bei be signalinės/pro sekos), pakartotinėmis PGR pagausinta iki sekvenavimui bei klonavimui tinkamos koncentracijos. Ji nustatyta pasitelkiant agarozės elektroforezę, panaudojant MassRuler™ DNA Ladder Mix žymenį.

Sekvenavimas atliktas VU Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre (Vilnius, Lietuva).

#### **2.4.6 Kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno sekos analizė**

U32.002 kolagenolizinės peptidazės geno sekos apdorojimui bei analizei naudotos kompiuterinės programos - ChromasLite 2.01, MEGA 4.02, bei LaserGene 7.1 programų paketas. Lygintų sekų šaltinis - MEROPS (9.4 redakcija) peptidazių duomenų bazė. Be to, nustatyta tiriamo kamieno U32.002 geno sekos panašumas su NCBI esančiomis sekomis, naudojant BLAST.

#### **2.4.7 Kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno klonavimas į daugiakopijinius vektorius**

U32.002 geno seka po valymo iš agarozinio gelio liguota į daugiakopijinį vektorių pTZ57R/T ir atlikta transformacija į *E. coli* DH5 $\alpha$ , panaudojant InsTAclone™ PCR Cloning Kit rinkinį. U32.002 geno seka be potencialios signalinės/pro sekos po valymo liguota į, taip pat daugiakopijinį, vektorių pJET1.2. Vėliau įvykdyta transformacija į *E. coli* DH5 $\alpha$ , panaudojant CloneJET™ PCR Cloning Kit rinkinį.

Abiem atvejais po transformacijos kultivuota 24 val., 37 °C ant LB-Ag. + 1 mg/mL ampicilino. Klonai atrinkti taikant kolonijų PGR (žr. 2.4.4) metodą. Diskretiškos, nemelsvos kolonijos pasirinktos atsitiktinai. Atrinktos kolonijos papildomai analizuotos taikant restrikcinę analizę. Kolonijų PGR metodu atrinktų kolonijų plazmidės išvalytos su GeneJET™ Plasmid Miniprep rinkiniu, praskiestos iki darbinės koncentracijos dH<sub>2</sub>O, koncentraciją nustatant spektrofotometriškai (žr. 2.4.2). Restrikcijos mišinį taip pat sudarė 2  $\mu$ L 10x restrikcijos buferio; 1  $\mu$ L *Bam*HI arba 1  $\mu$ L *Not*I; arba 1  $\mu$ L *Sal*I + dH<sub>2</sub>O iki 20  $\mu$ L. Inkubuota 3 val. 37 °C. Po restrikcijos mišinys išsodintas chloroformu, vykdytas DNR išsodinimas etilo alkoholiu su natrio acetatu. Po išsodinimo vykdytas tirpdyimas dH<sub>2</sub>O bei restrikcijos rezultatų analizė agaroziniame gelyje (žr. 2.4.2).

Po restrikcijos rezultatų analizės atrinkti potencialiai tinkami klonai kultivuoti LB + 1 mg/mL ampicilino, 37 °C, 250 rpm, 4 val., plazmidės išvalytos, minėtu rinkiniu žr. aukščiau. Spektrofotometriškai įvertinus plazmidžių koncentraciją, atliktas skiedimas iki sekvenavimui tinkamos koncentracijos.

Sekvenavimo rezultatai analizuoti 2.4.6 nurodytomis bioinformatinės analizės programomis.

#### **2.4.8 Kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno klonavimas į ekspresijos vektorių pET28c(+)**

Atrinkti pTZ57R/T ir pJET1.2 konstruktai transformuoti į *E. coli* DH5 $\alpha$ , taikant elektroporaciją (2000 mV, 5 ms), naudotas elektroporatorius, „Eppendorf“. Po transformacijos kultivuota 24 val., 37 °C ant LB-Ag. + 1 mg/mL ampicilino. Diskrečios kolonijos naudotos inokuliuoti į neagarizuotą LB + 1 mg/mL ampicilino. Po 14 val. kultivavimo esant 37 °C, ląstelės nucentrifuguotos 7000 rpm, 10 min., esant 4 °C. Plazmidės valytos, restrikcija vykdyta kaip nurodyta 2.4.7.

Po restrikcijos rezultatų analizės agaroziniame gelyje vykdytas U32.002 geno sekos (su ir be signalinės/pro sekos) ligavimas (naudojant Rapid DNA ligation kit rinkinį) į ekspresijos plazmidę pET28c(+) (*Invitrogen*, JAV). Ligavimui taikytas santykis: 100 su 400 mg, atitinkamai U32.002 geno sekų su linearizuotu vektoriumi (linearizacija vykdyta kaip nurodyta 2.4.7).

Ligavimo produktai transformuoti į *E. coli* BL21 (DE3) taikant elektroporaciją (žr. aukščiau). Po transformacijos kultivuota 24 val., 37 °C ant LB-Ag. + 1 mg/mL kanamicino. Diskrečios kolonijos analizuotos, taikant kolonijų PGR, restrikcinę bei sekų palyginimo analizes. Minėtų metodų vykdymo algoritmai atitinka 2.4.6; 2.4.7 aprašus.

#### **2.4.9 Kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno ekspresijos indukcija bei ekspresijos kamieno baltyminio preparato išskyrimas**

Atlikus transformaciją (žr. 2.4.8) vykdyta inokuliacija į LB + 1 mg/mL kanamicino. Kultivuota 37 °C, 250 rpm. iki kultūra pasieks ~0,6 OT<sub>600</sub>. Ši kultūra naudota inokuliuojimui - 5 %. Po inokuliuojimo, vėlgi kultivuota analogiškais sąlygomis iki ~0,6 OT<sub>600</sub>. Pasiekus šį optinį tankį, vykdyta indukcija IPTG iki galutinės 1 mM koncentracijos.

Po kultūros kultivavimo 4 val. indukuojant, *E. coli* BL21 (DE3) nucentrifuguotos 14800 rpm, 7 min., esant 4 °C, resuspenduotos TE buferyje (pH 8,0). Vykdyta ląstelių lizė, taikant lizocimą (galutinė koncentracija - 0,25 mg/mL). Lizės mišinys inkubuotas 1 val., esant 37 °C. Po inkubavimo nucentrifuguota 14800 rpm, 10 min., esant 4 °C.



Gauti ląstelių lizatai bei lizavimo mišinių nuosėdos analizuoti, pasitelkiant natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezę (NDS-PAGE), žr. 2.4.10.

#### 2.4.10 Baltymų elektroforezė

(jei nenurodyta kitaip, pagal Rosenberg, 2005)

##### Tirpalai:

- Akrilamido ir N,N - metilenbisakrilamido tirpalas: Akrilamidas 29,2 % (svoris/tūris); N,N - metilenbisakrilamidas 0,8 % (svoris/tūris); dH<sub>2</sub>O iki 100 mL. Laikytas tamsoje, esant 4°C temperatūrai.
- Skiriančiojo gelio buferis: 1 M TRIS-HCl (TRIS 121,2 g; dH<sub>2</sub>O iki 1000 mL), pH 8.8/23 °C.
- Koncentruojančio gelio buferis: 1M TRIS-HCl (TRIS 121,2 g; dH<sub>2</sub>O iki 1000 mL), pH 6,8/23 °C.
- 10 % (svoris/tūris) APS, ruoštas prieš naudojimą.
- 10 % (svoris/tūris) NDS.
- 5x TRIS-Glicininis buferis: TRIS 5,1 g; Glicinas 72 g; NDS 5 g; dH<sub>2</sub>O iki 1000 mL.
- 4x Baltymų paruošimo buferis: Sacharozė 4 g; 2-merkaptioetanolis/dH<sub>2</sub>O 2,0 mL; NDS 0,8 g; 1 M TRIS-HCl (TRIS 121,2 g; dH<sub>2</sub>O iki 1000 mL), pH 6,8/23 °C 2,5 mL; Bromfenolio mėlynasis-V 0,1 % (svoris/tūris).

##### Geliai ir metodo algoritmas

Baltymų preparato frakcionavimui naudota vienakryptė, stačioji, nutrūkstama NDS-PAGE. Naudotas vertikaliosios elektroforezės aparatas ASG - 250, „C. B. S. Scientific Co.“

Surinkus ir patikrinus aparato gardelės sandarumą, ji užpildoma 12 % poliakrilamidiniu - skiriančiuoju geliu (sudėtis žr. 2 lentelę) tiek, kad viršuje liktų 2-3 cm. Tuomet ant nesustingusio skiriančiojo gelio užpilami 2 mL 2-izopropanolio. Gelis paliekamas kambario temperatūroje, kol sustings. Po to 2-izopropanolis pašalinamas ir, praplovus dH<sub>2</sub>O, ant skiriančiojo gelio pilamas 3 % poliakrilamidinis - koncentruojantis gelis (žr. 2 lentelę). Į jį įstatytos šukos. Koncentruojančiam geliui sustingus, šukos ištraukiamos, suformuojant elektroforezės leidimo šulinėlius.

Paruošta gardelė įstatoma į elektroforezės aparatą. Jis užpildomas praskiestu TRIS-Glicininio buferiu, o šulinėliai praplaunami minėtu buferiu.

Baltymų pavyzdžiai prieš įnešimą į šulinėlius sumaišomi su baltymų paruošimo buferiu. Tiek redukuojant (2-merkaptioetanolio paruošimo buferyje), tiek tik temperatūra denatūruojant baltymų

pavyzdžius, prieš pat įnešimą ~3 min. vykdoma jų inkubacija ~98 °C vandens vonelėje. Naudojamas molekulinų masių žymuo - PageRuler™ Unstained Protein Ladder. Į šulinėlį jo leista 10 µL, o paruošto baltymų pavyzdžio tirpalo - 40 µL.

Į šulinėlius įnešus pavyzdžius ir molekulinų masių žymenį elektroforezės aparatas jungiamas prie nuolatinės srovės šaltinio - esant kambario temperatūrai, vykdoma elektroforezė. Proceso pradžioje elektros srovė yra 20 mA, pavyzdžiams įėjus į skiriantįjį gelį - 25 mA. Srovės stipris parinktas atsižvelgiant į gelių storį - 0,75 cm.

## 2 lentelė. Skiriančio ir koncentruojančio gelių sudėtys

(iš Rosenberg, 2005)

| Reagentų tirpalai                                    | 12 % skiriantis gelis, mL | 3 % koncentruojantis gelis, mL |
|--|---------------------------|--------------------------------|
| dH <sub>2</sub> O                                    | 14                        | 10,2                           |
| Akrilamido ir<br>N,N - metilenbisakrilamido tirpalas | 16                        | 2,55                           |
| 1M TRIS-HCl, pH 8,8/23°C                             | 10                        | -                              |
| 1M TRIS-HCl, pH 6,8/23°C                             | -                         | 1,875                          |
| NDS (10 %)   | 0,4                       | 0,15                           |
| APS (10 %)   |                           |                                |
| TEMED  | 0,016                     | 0,015                          |

Gelis dažytas PageBlue™ Protein Staining Solution, pagal gamintojo rekomendacijas. Atplovus gelis praplautas dH<sub>2</sub>O, o elektroforezės rezultatai fiksuoti fotografuojant.

### 2.4.11 U32.002 kolagenolizinės peptidazės ekspresijos sąlygų optimizavimas

(pagal Ducka *et al.*, 2009)

Optimizuoti ekspresijos parametrai:

- kultivavimo temperatūra - 20 (tik U32.002 geno be signalinės/pro sekos atžvilgiu), 25, 30, 37 °C;
- kultūros optinis tankis indukavimo momentu - 0,6; 0,9 OT<sub>600</sub>;
- kultivavimo trukmė indukavus - 4, 20 val.;
- IPTG koncentracija indukavimui - 0,1; 0,5; 1 mM.

Optimizuojant ląstelių lizė vykdyta kaip nurodyta 2.4.9 - visuomet į TE/8 pH. Bendra tiksulinio baltymo koncentracija vertinta, pritaikius NDS-PAGE (žr. 2.4.10). Testuoti visi optimizuoti

pasirinktų parametru variantai. Optimizacija vykdyta tiek klonavus U32.002 geną su, tiek be signalizės/pro sekos.

#### **2.4.12 Baltymų koncentracijos matavimas Bradford'o metodu**

(pagal Bradford, 1976, papildant iš Zor ir Selinger, 1996)

Metodas pagrįstas mėlynos spalvos kompleksų susidarymu Kumasi G-250 dažo molekulei, nekovalentinėmis jungtimis, sąveikaujant su tiriamų baltymų polipeptidinių grandinių ar. baziniais ir aromatiniais radikalais. Kompleksų susidarymui, kaip funkcijai nuo baltymų koncentracijos, būdinga tiesinė priklausomybė.

Esant kambario temperatūrai, konkretus baltymų mėginio tūris sumaišytas su dvigubu Bradford'o reagento tūriu. Švelniai supurčius, po ~2 min. spektrofotometriškai matuota sugertis, esant  $\lambda=595$  nm. Sugerties pokytis apskaičiuotas lyginant su kontroliniu tirpalu. Kontrolinis tirpalas ruoštas kaip ir bandinys, tik naudotas ne mėginio tirpalas, o dH<sub>2</sub>O. Baltymų koncentracija apskaičiuota pagal kalibracinę lygtį.

Ruošiant Bradford'o reagentą, 5 mg Kumasi G-250, esant kambario temperatūrai, ištirpinti 2,5 mL 96 % (tūris/tūris) rektifikuoto etilo alkoholio, vėliau įpilta 5 mL 80 % (tūris/tūris) ortofosforo rūgšties ir sumaišius reagentas praskiestas dH<sub>2</sub>O iki 50 mL. Tuomet reagentas 24 val. laikytas esant 4 °C temperatūrai, po to du kartus filtruotas. Paruoštas reagentas nuolat laikytas tamsiame inde, esant 4 °C, tik prieš matavimą leidžiant įšilti iki kambario temperatūros.

Kiekvieną kart pagaminus Bradford'o reagentą, sudaryta kalibracinė kreivė. Naudoti tikslios, žinomos koncentracijos (ne mažiau penkių skirtingų, iš intervalo 0,001-0,01 mg/mL), kambario temperatūros albumino tirpalai dH<sub>2</sub>O.

#### **2.4.13 Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> jonų įtaka U32.002 kolagenolizinės peptidazės struktūriniam termostabilumui**

Struktūrinis termostabilumas testuotas taikant temperatūras: 37; 40; 50; 60; 70; 80; 95 °C (visais atvejais inkubuota 1 val.). Ekspresijos kamieno ląstelių lizė (žr. 2.4.9) buvo vykdyta naudojant buferius: TE/pH 8; 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4 su 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4 su 1 mM ZnCl<sub>2</sub> ir 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4 su 1 mM ZnCl<sub>2</sub> + 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Pažymėtina, jog privedant naudotų buferių pH buvo atsižvelgta į visas testuotas temperatūras. Po lizės buvo matuojama baltymų koncentracija Bradford'o metodu (žr. 2.4.12). Baltymų koncentracija, skiedžiant atitinkamu buferiu, suvienodinta visų mėginių atžvilgiu. Visų buferių variantų baltyminiai preparatai inkubuoti nurodytą laiko tarpą, esant nurodytoms temperatūroms. Inkubuojant purtymas netaikytas, o

baltyminio preparato tūris siekė 200 µL. Po inkubacijos preparatas centrifuguotas 7 min. 14800 rpm. Vėliau atliktas rezultatų vizualizavimas taikant NDS-PAGE (žr. 2.4.10).

#### 2.4.14 Baltymų zimografija

(jei nenurodyta kitaip, pagal Rosenberg, 2005)

##### Tirpalai:

- Skalavimo buferis: TRIS 6,06 g; 2,5 % (tūris/tūris) Triton X-100; dH<sub>2</sub>O iki 1000 mL. Privesta HCl iki pH 7,4, esant 23 °C.
- Substratinis buferis: NaCl 4,67 g; CaCl<sub>2</sub> 0,44 g; ZnCl<sub>2</sub> 0,54 mg; NaN<sub>3</sub> 0,08 g; Brij 35 0,02 g; TRIS 2,424 g; dH<sub>2</sub>O iki 400 mL. Privesta HCl iki pH 7,4, esant 50 °C.
- I tipo kolageno tirpalas: tirpus I tipo kolagenas iš žiurkės uodegos 16 val. tirpdytas 10 mM acto rūgštyje, esant 4 °C. Gautas pirminis tirpalas filtruotas, taikant 0,22 nm filtrą „Millipore“, vėliau dializuotas prieš dH<sub>2</sub>O; pH ~6,2 (tūrių santykis atitinkamai 1:5000 mL), esant 4 °C. Naudota dializės membrana Spectra/Por 6-8 kDa (*Spectrum Laboratories*, JAV) (Kawase *et al.*, 2010). Po dializės ištirpusio I tipo kolageno koncentracija nustatyta Bredford'o metodu, žr. 2.4.12.

##### Metodo algoritmas

Baltymų zimografija daugeliu aspektų tapati 2.4.10 metodui, todėl pažymėti tik metodų algoritmų skirtumai.

Zimografijai naudotas modifikuotos sudėties 12 % skiriantysis gelis. Kolagenolizinio aktyvumo įvertinimui įprastos sudėties (žr. 2 lentelę) gelis buvo papildomas I tipo kolageno tirpalu iki 0,5 mg/mL galutinės šio baltymo koncentracijos (Gogly *et al.*, 1998), atitinkamu tūriu mažinant dH<sub>2</sub>O tūrį. Ruošiant skiriančius gelius želatinolizinio, albuminolizinio, kazeinolizinio, elastinolizinio bei keratinolizinio aktyvumų įvertinimui, jų sudėtis buvo papildoma minėtais baltymais iki galutinės 0,5 % (svoris/tūris) koncentracijos (Kim *et al.*, 2007<sup>b</sup>). Zimografijai taikytas Prestained Protein Molecular Weight Marker molekulinį masių žymuo.

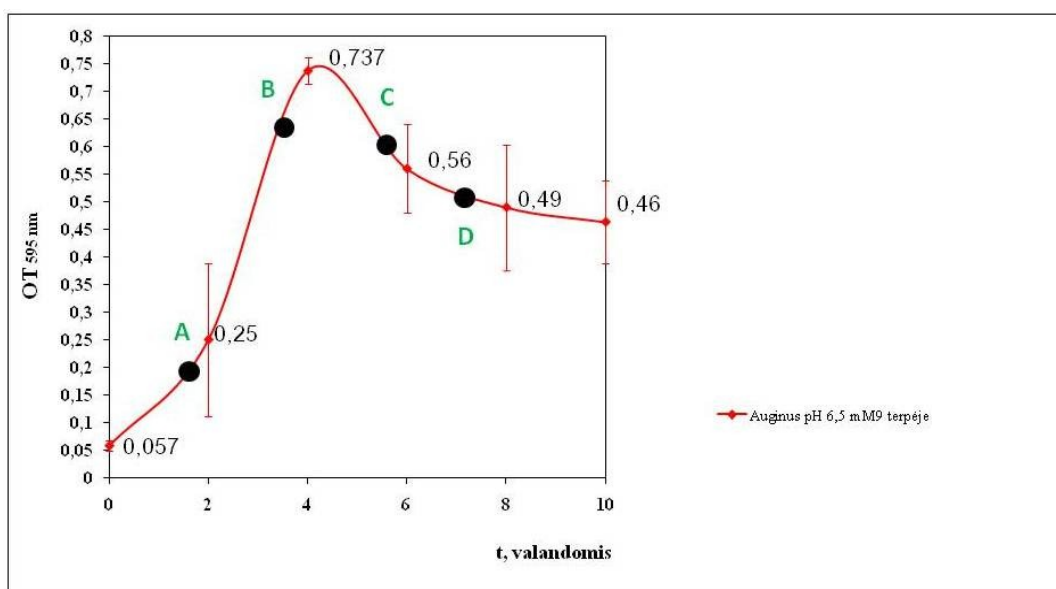
Po elektroforezės zimograma, esant kambario temperatūrai, ne mažiau dviejų kartų po 30 min., purtant, plauta skalavimo buferiu, po to palikta 20 val. inkubuotis substratiniame buferyje, esant 50 °C temperatūrai.

Gelis dažytas PageBlue™ Protein Staining Solution, pagal gamintojo rekomendacijas. Atplovus vykdyta rezultatų fiksacija fotografuojant.

### 3. REZULTATAI

#### 3.1 Suminės RNR preparatų išskyrimas bei jų stabilumo įvertinimas

Siekiant įrodyti, jog U32.002 kolagenolizinės peptidazės iš *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> genas transkribuojamas, bei išanalizuoti transkripcijos priklausomybę nuo kultūros augimo dinamikos, buvo pasirinkti keturi (žr. 4 pav.) skirtingi kultūros augimo etapų momentai. Pirmasis: A - iš kultūros eksponentinio augimo fazės pradžios, B - besibaigiančios eksponentinio augimo fazės, C ir D - ląstelių žūties fazės. Iš ląstelių, buvusių kiekviename minėtame kultūros augimo momente, išskirta suminė RNR. Atlikus visas suminės RNR preparatų ruošimo stadijas, kiekviename preparate buvo įvertinta galutinė RNR koncentracija (3 lentelė), o RNR degradacijos laipsnis analizuotas, pasitelkiant agarozės elektroforezę (žr. 5 pav.).



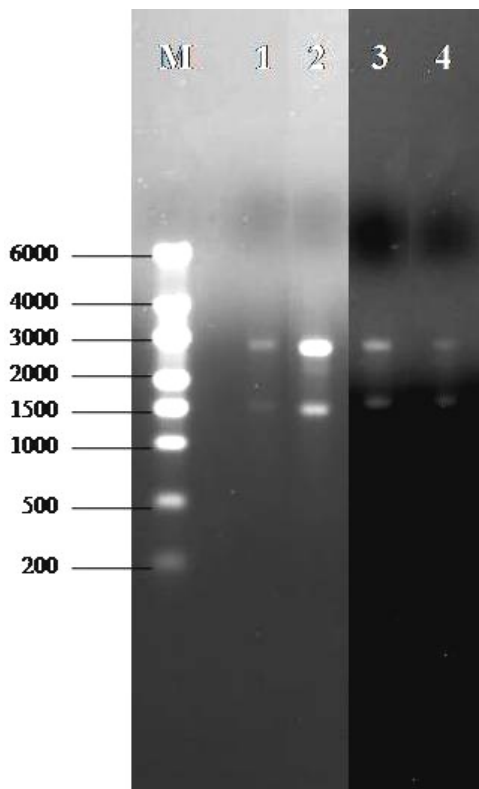
**4 pav.** Suminės RNR preparatų išskyrimui pasirinktų *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> kultūros augimo momentų (A; B; C; D) išsidėstymas kultūros augimo kreivėje, taikant optimalius kultivavimo parametrus.

Visų išskirtų suminės RNR preparatų galutinės koncentracijos matavimo rezultatai parodė, jog pavyko paruošti koncentruotus preparatus. I bei II išskyrimo rezultatai, juos lyginant tarpusavyje, skyrėsi nežymiai. Stebimas nukleorūgščių (matuojant bendrai RNR ir DNR koncentracijas) koncentracijos sumažėjimas, lyginant koncentracijas prieš bei po veikimo DNaze I. Tiesioginę priklausomybę tarp kultūros OT ir išskirtos galutinės RNR (po veikimo DNaze I) koncentracijos demonstruoja pirmieji trys suminei RNR išskirti pasirinkti kultūros augimo momentai - A; B ir C. Kultūros kultivavimo atžvilgiu vėlyviausias momentas D šios priklausomybės nedemonstruoja.

**3 lentelė.** Ruošiamų suminės RNR preparatų nukleorūgščių koncentracijos kitimas

| Kultūros augimo momentas | Kultūros OT <sub>600 nm</sub> |            | Pirminė nukleorūgščių koncentracija (mg/mL) |            | Galutinė RNR koncentracija (mg/mL) |            |
|--------------------------|-------------------------------|------------|---|------------|------------------------------------|------------|
|                          | I skyrimo                     | II skyrimo | I skyrimo                                   | II skyrimo | I skyrimo                          | II skyrimo |
| A (2 val.)               | 0,218                         | 0,194      | 40,75                                       | 37,38      | 23,12                              | 19,5       |
| B (4 val.)               | 0,632                         | 0,615      | 61,81                                       | 41,77      | 38,75                              | 36,3       |
| C (6 val.)               | 0,603                         | 0,594      | 37,58                                       | 31,28      | 21                                 | 23,19      |
| D (7 val.)               | 0,520                         | 0,531      | 64,79                                       | 36,41      | 32,75                              | 24,5       |

Išskirtų suminės RNR preparatų degradacijos vertinimo gelyje (žr. 5 pav.), kiekvieno preparato elektroforetiniame profilyje išsiskiria dviejų skirtingų molekulių masių RNR - 23 S (ties 3000 bp fragmentu) bei 16 S (ties - 1500 bp) rRNR. Visų išskirtų preparatų elektroforetiniai profiliai tapatūs - abiejų tipų rRNR stebimos kaip diskrečios zonos, šleifo pavidalo juostų ar kitokių molekulių masių RNR nėra. Tarpusavyje lyginant tiek I, tiek ir II skyrimo preparatų profilius, išsiskiria suminės RNR preparato, išskirto iš 4 kultūros kultivavimo valandos (B preparatas), I ir II skyrimo profiliai. Šiuo atveju stebimos didesnės ir intensyviau išreikštos 23 S ir 16 S rRNR zonos.

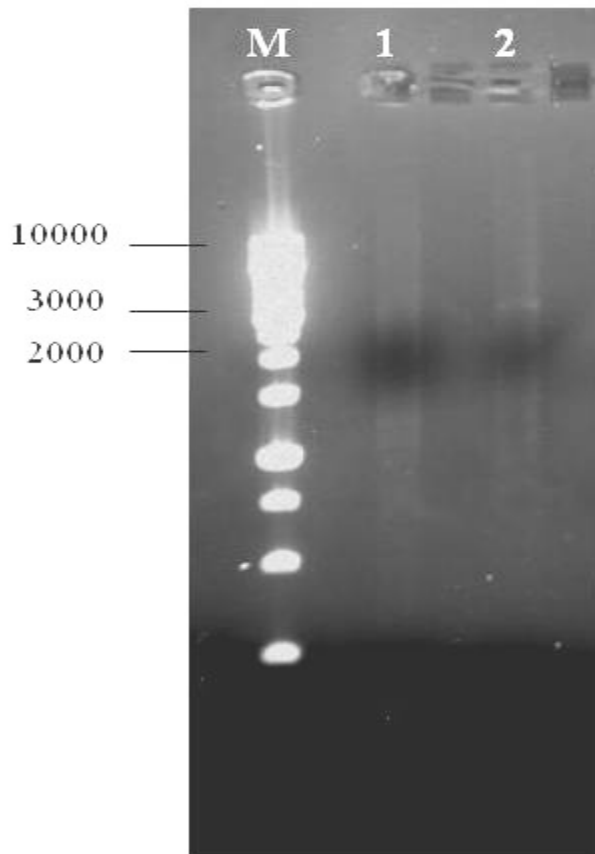


**5 pav.** Suminės RNR preparatų (II skyrimas) degradacijos laipsnio vertinimas, taikant agarozės elektroforezę.

M. - RiboRuler™ High Range RNA Ladder (fragmentų molekulinės masės vertė pateikiama bp); 1. Suminės RNR preparatas išskirtas po 2 kultivavimo valandų (A preparatas); 2. Suminės RNR preparatas išskirtas po 4 kultivavimo valandų (B preparatas); 3. Suminės RNR preparatas išskirtas po 6 kultivavimo valandų (C preparatas); 4. Suminės RNR preparatas išskirtas po 7 kultivavimo valandų (D preparatas).

### 3.2 kDNR sintezė panaudojant atvirkštinę transkriptazę

Siekiant įvertinti kDNR sintezės efektyvumą taikant atvirkštinę transkripciją, kiekvienas kDNR preparatas analizuotas, taikant agarozės elektroforezę. Visų testuotų preparatų elektroforetiniai profiliai buvo tapatūs - stebėtas šleifas, besidriekiantis plačiame molekulinės masės diapazone. Pastarąjį rezultatą iliustruoja 6 pav.

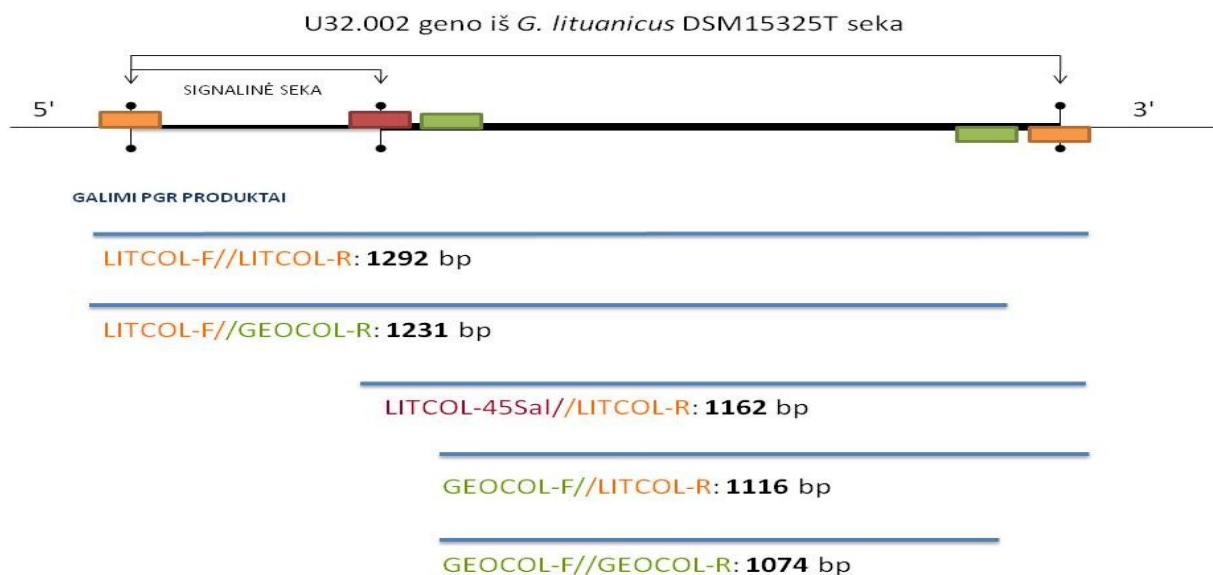


**6 pav.** kDNR sintezės efektyvumo įvertinimas, taikant agarozės elektroforezę.

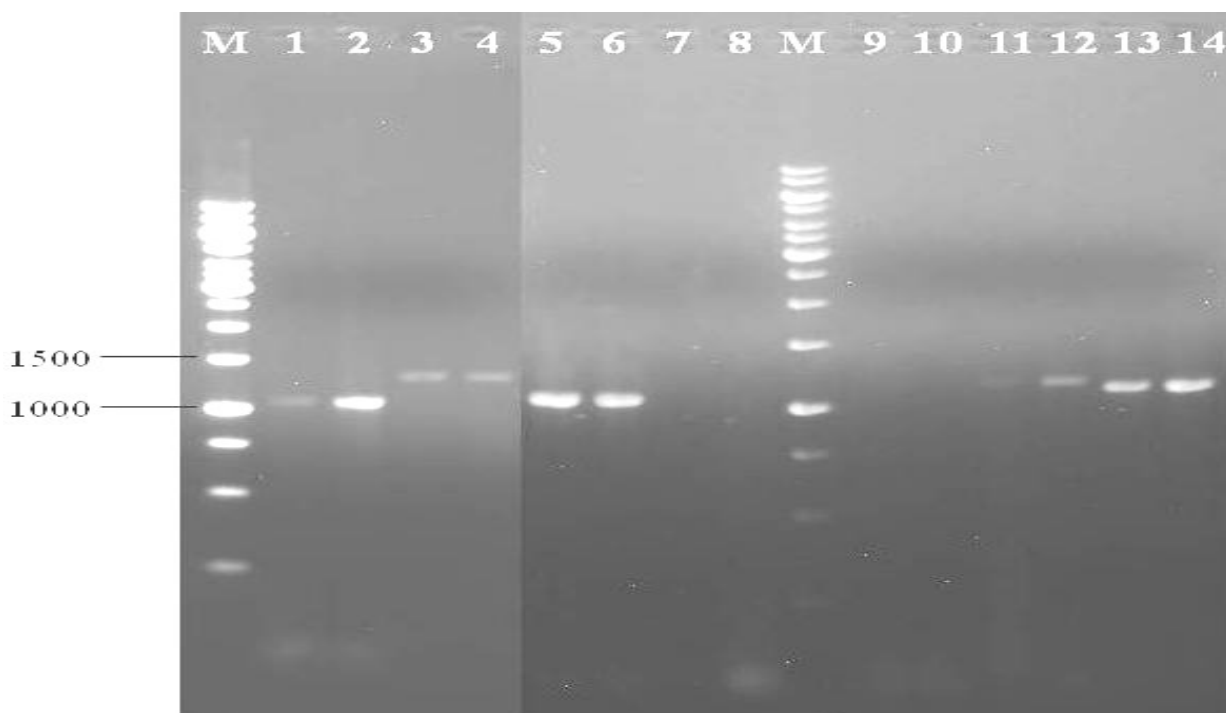
M. - GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (fragmentų molekulinės masės vertė pateikiama bp); 1. kDNR preparatas - matrica suminė RNR preparatas išskirtas po 2 kultivavimo valandų (A preparatas, II skyrimas); 2. kDNR preparatas - matrica suminė RNR preparatas išskirtas po 4 kultivavimo valandų (B preparatas, II skyrimas).

### 3.3 U32.002 kolagenolizinės peptidazės transkripcijos priklausomybė nuo kultūros augimo fazės

U32.002 kolagenolizinės peptidazės transkripcijos priklausomybė nuo kultūros augimo fazės vertinta vykdant PGR su specifiskų konkrečiam U32.002 geno fragmentui pradmenų poromis. Kaip matrica PGR buvo taikomi paruošti kDNR preparatai, gauti vykdant atvirkštinę transkripciją nuo suminių RNR preparatų, gautų dviejų nepriklausomų ruošimų metu. Visi PGR metu naudotų pradmenų porų variantai, jų apribojamo PGR produkto ilgiai bei schematinė lokalizacija U32.002 geno sekos atžvilgiu pateikti 7 pav. Vykdytų PGR reakcijų rezultatai pateikti 8 pav.



**7 pav.** U32.002 geno transkripcijos analizei naudotų pradmenų porų variantai, galimų PGR produktų dydžiai bei jų schematinė lokalizacija geno sekos atžvilgiu.



**8 pav.** U32.002 kolagenolizinės peptidazės transkripcijos analizei skirtų PGR produktų agarozės elektroforezė.

M. - GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (fragmentų molekulinės masės vertė pateikiama bp); 1. Pradmenys GEOL-F/R, matrica - kDNR preparatas - gautas naudojant suminės RNR preparatą, išskirtą po 2 kultivavimo valandų (A preparatas, II skyrimas); 2. GEOL-F/R, B preparatas, II skyrimas; 3. LITCOL-F/R, A preparatas, II skyrimas; 4. LITCOL-F/R, B preparatas, II skyrimas; 5. GEOL-F/R, C preparatas, II skyrimas; 6. GEOL-F/R, D preparatas, II skyrimas; 7. LITCOL-F/R, C preparatas, II skyrimas; 8. LITCOL-F/R, D preparatas, II skyrimas; 9. LITCOL-F/GEOL-R, C preparatas, II skyrimas; 10. LITCOL-F/GEOL-R, D preparatas, II skyrimas; 11. LITCOL-45Sal/R, C preparatas, II skyrimas; 12. LITCOL-45Sal/R, D preparatas, II skyrimas; 13. GEOL-F/LITCOL-R, C preparatas, II skyrimas; 14. GEOL-F/LITCOL-R, D preparatas, II skyrimas.



Atlikus PGR produktų vizualizavimą, nustatyta, jog numatytų molekulinė masių produktai gauti taikant visus pradmenis visais įmanomais variantais tuo atveju, kai matrica naudota kDNR preparatai gauti, panaudojant suminės RNR preparatus, išskirtus po 2 bei 4 kultivavimo valandų (atitinkamai A ir B preparatai), žr. 8 pav. 1 - 4 takeliai. Pažymėtina, jog PGR produktai, taikant LITCOL-45Sal ir LITCOL-R pradmenų porą A bei B preparatų atžvilgiu, 8 pav. nepateikti. Tuo atveju kai matrica buvo kDNR preparatai gauti panaudojant suminės RNR preparatus, išskirtus po 6 bei 7 kultivavimo valandų (atitinkamai C ir D preparatai), gauti numatytos molekulinės masės produktai, kuomet naudotos pradmenų poros GEOCOL-F ir GEOCOL-R (8 pav. 5 ir 6 takeliai), LITCOL-45Sal ir LITCOL-R (8 pav. 11 ir 12 takeliai); GEOCOL-F ir LITCOL-R (8 pav. 13 ir 14 takeliai), bet negauti taikant LITCOL-F ir LITCOL-R (8 pav. 7 ir 8 takeliai), LITCOL-F ir GEOCOL-R (8 pav. 9 ir 10 takeliai). U32.002 transkripcijos analizei skirtų PGR rezultatai, tarpusavyje lyginant gautus naudojant kDNR preparatus, paruoštus nuo suminių RNR preparatų I ir II, pastarųjų išskyrimo visiškai sutapo.

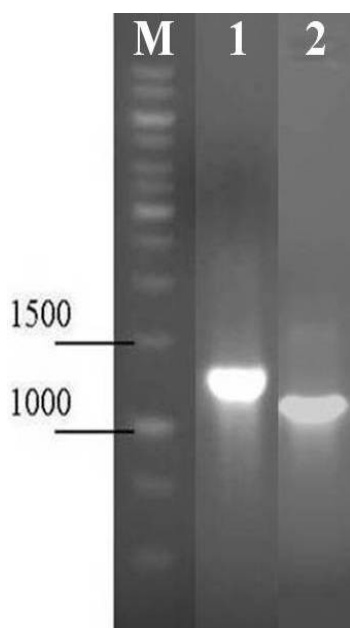
Kaip minėta transkripcijos analizės metodiniame apraše (2.4.4), atliekant šią analizę, vykdytos kontrolinės reakcijos. Kiekvienai konkrečiai kDNR preparato atžvilgiu vykdomai PGR reakcijai taikyta neigiama kontrolinė PGR. Kontrolinių reakcijų rezultatai buvo vizualizuoti, atliekant elektroforezę agaroziniame gelyje. Nė vienoje jų nebuvo gauta PGR produkto.

### **3.4 Kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno sekos nuskaitymas bei analizė**

U32.002 geno nustatymui ir pagausinimui *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> atlikta LITCOL-PGR, taikant LITCOL-F ir LITCOL-R (apimama visa geno seka) bei LITCOL-45Sal ir LITCOL-R (apimamas geno fragmentas be signalinės/pro sekos) pradmenų poras. Vėliau vizualizavus gautus rezultatus, taikant agarozinio gelio elektroforezę (žr. 9 pav.), nustatyta, jog gauti LITCOL-PGR produktai tiksliai atitinka numatytus produktų dydžius - visai geno sekai ~1292 bp bei ~1162 bp geno sekos fragmentui be signalinės/pro sekos.

LITCOL-PGR produktų sekoskaitos rezultatai patvirtino, jog gauti pastarieji - U32.002 geno sekos, atitinkamai su ir be signalinės/pro sekos. Visgi geno seka skiriasi nuo *G. kaustophilus* HTA426 U32.002 geno sekos. Palyginus išskirti septyni nukleotidų skirtumai: *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> 324 pozicijoje sutinkamas citozinas, o *G. kaustophilus* HTA426 sekoje - timinas; 405 pozicijoje guaninas - citozinas; 711 pozicijoje citozinas - timinas; 742 pozicijoje citozinas - timinas; 1004 pozicijoje timinas - guaninas; 1016 pozicijoje guaninas - adeninas; 1200 pozicijoje adeninas - guaninas. Minėti skirtumai tik dviem atvejais lemia ar. skirtumus tarp lyginamų seku: *G. lituanicus*

DSM 15325<sup>T</sup> 335 pozicijoje sutinkamas leucinas, o *G. kaustophilus* HTA426 sekoje - argininas, 339 ar. sekos pozicijoje sutinkamas argininas - histidinas.



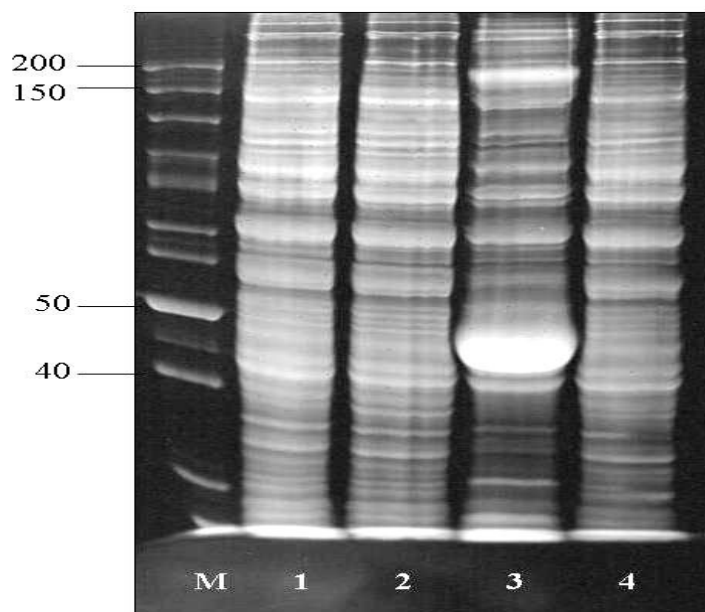
**9 pav.** LITCOL-PGR rezultatai.

M. - GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (fragmentų molekulinės masės vertė pateikiama bp); 1. LITCOL-PGR produktas taikant LITCOL-F ir LITCOL-R pradmenų porą; 2. LITCOL-PGR produktas taikant LITCOL-45Sal ir LITCOL-R pradmenų porą.

### 3.5 Kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno ekspresijos įvertinimas

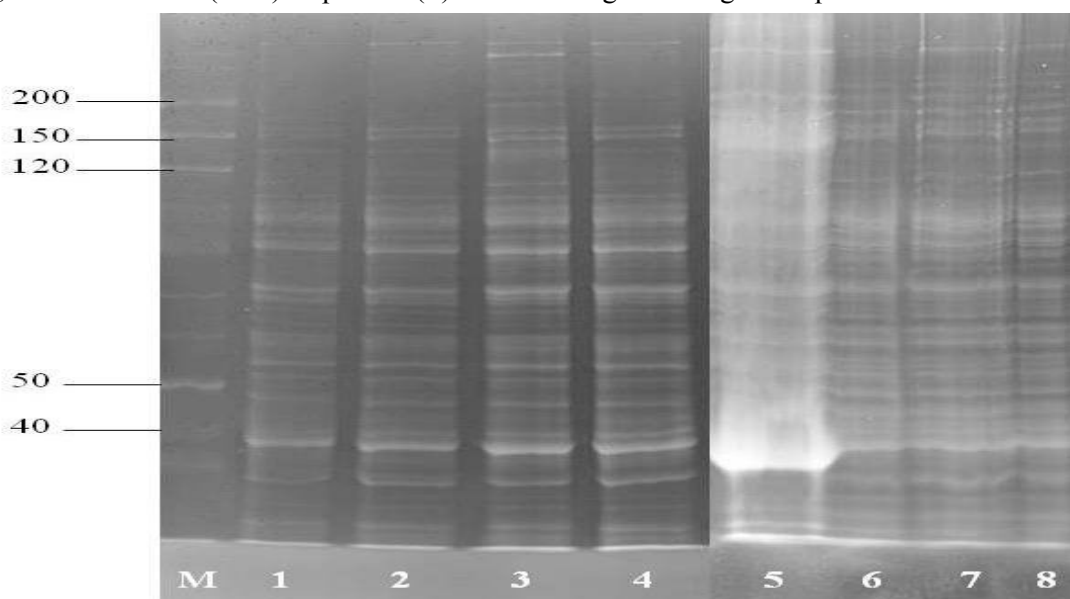
Atlikus U32.002 geno su bei be signalinės/pro sekos iš *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> klonavimą į daugiakopijinius vektorius atitinkamai į pTZ57R/T ir pJET1.2, taikant kamieną *E. coli* DH5α, o vėliau į ekspresijos vektorių pET28c(+), taikant kamieną *E. coli* BL21 (DE3), buvo būtina įsitikinti, ar sėkmingai vyksta ekspresijos indukcija IPTG. Ekspresijos faktams nustatyti taikytas rezultatų vizualizavimas NDS-PAGE (žr. 10 ir 11 pav.) bei baltymų masių spektrometrija, atlikta VU Biochemijos instituto Proteomikos centre (Vilnius, Lietuva).

Gauti pET28c(+) konstrukto su visa U32.002 kolagenolizinės peptidazės geno seka indukcijos rezultatai rodo, jog tirpiosios viduląstelių baltymų frakcijos elektroforetiniai profiliai, lyginant tris kontrolinius (10 pav. 1; 2; 4 takeliai) ir profilį, atspindintį *E. coli* BL21 (DE3) po indukcijos IPTG transliuotus baltymus (10 pav. 3 takelis), nesutampa. Akivaizdūs du nesutapimai dėl indukcijos IPTG - gausiai sintetinas baltymas tarp 40 ir 50 kDa ir baltymas tarp 150 ir 200 kDa. Nors duomenys nepateikti, bet svarbu pažymėti, jog pET28c(+) konstrukto su visa U32.002 geno seka atžvilgiu buvo analizuoti ir netirpūs *E. coli* BL21 viduląsteliniai baltymai, bet jokio elektroforetinių profilių skirtumo neužfiksuota.



**10 pav.** U32.002 peptidazės genu su signaline/pro seka ekspresijos įvertinimo rezultatų vizualizavimas taikant NDS-PAGE\*.

M. - PageRuler™ Unstained Protein Ladder (fragmentų molekulinės masės pateikiamos kDa); 1. *E. coli* BL 21 (DE3) su pET28c(+) su U32.002 genu su signaline/pro seka, neindukavus IPTG; 2. *E. coli* BL 21 (DE3) be pET28c(+); 3. *E. coli* BL 21 (DE3) su pET28c(+) su U32.002 genu su signaline/pro seka, indukavus IPTG; 4. *E. coli* BL 21 (DE3) su pET28c(+) be U32.002 geno su signaline/pro seka.



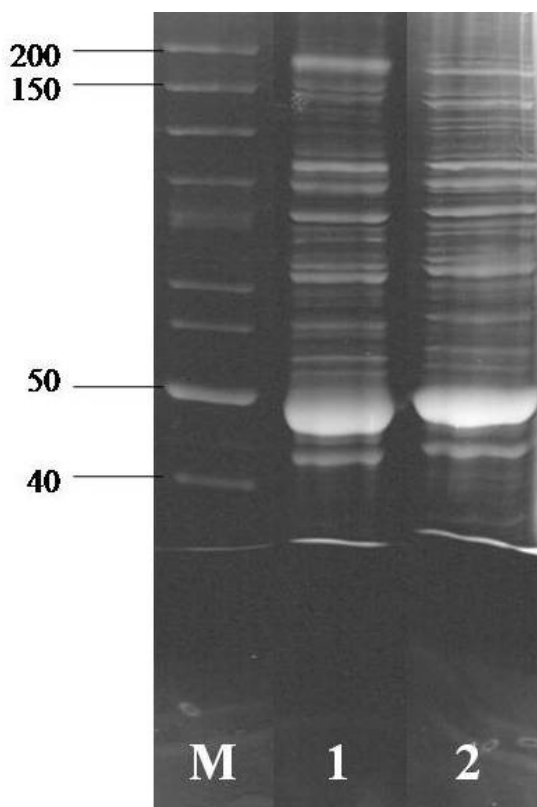
**11 pav.** U32.002 peptidazės geno fragmento be signalinės/pro sekos ekspresijos įvertinimo rezultatų vizualizavimas taikant NDS-PAGE\*.

M. - PageRuler™ Unstained Protein Ladder (fragmentų molekulinės masės pateikiamos kDa). 1. *E. coli* BL 21 (DE3) su pET28c(+) su U32.002 genu be signalinės/pro sekos, neindukavus IPTG; 2. *E. coli* BL 21 (DE3) be pET28c(+); 3. *E. coli* BL 21 (DE3) su pET28c(+) su U32.002 genu be signalinės/pro sekos, indukavus IPTG; 4. *E. coli* BL 21 (DE3) su pET28c(+) be U32.002 geno fragmento; 5. *E. coli* BL 21 (DE3) su pET28c(+) su U32.002 genu be signalinės/pro sekos, indukavus IPTG, preparato nuosėdos; 6. *E. coli* BL 21 (DE3) su pET28c(+) su U32.002 genu be signalinės sekos/pro, neindukavus IPTG, preparato nuosėdos; 7. *E. coli* BL 21 (DE3) su pET28c(+) be U32.002 geno, preparato nuosėdos; 8. *E. coli* BL 21 (DE3) be pET28c(+), preparato nuosėdos.

\* Pateikiamas fotografijos neigatyvo vaizdas

Vizualizavus (žr. 11 pav.) pET28c(+) konstrukto su U32.002 geno fragmentu be signalinės/pro sekos indukcijos IPTG efektyvumo tyrimo rezultatus, nustatyta, jog nuo kontrolinių bandinių elektroforetinių profilių (11 pav. 1; 2; 4; 6; 7; 8 takeliai) skiriasi tik netirpią, po indukcijos sintetinamų baltymų frakciją atspindintis profilis (žr. 11 pav. 5 takelis). Šis profilis nuo kontrolinių išsiskyrė gausiai sintetinamu baltymu tarp 40 ir 50 kDa bei mažu kiekiu tarp 150 ir 200 kDa. Pažymėtina, jog 10 pav. 3 takelio elektroforetinis profilis, atspindintis *E. coli* BL21 (DE3) po indukcijos sintetinamus tirpius viduląstelinis baltymus, nuo kontrolinių profilių visiškai nesiskyrė.

Tuo atveju, kai NDS-PAGE vizualizuojant U32.002 peptidazės geno ekspresijos įvertinimo rezultatus taikytas 4x baltymų ruošimos buferis su 2-merkaptioetanoliu (detali buferio sudėtis žr. 2.4.10), baltyminė zona tarp 150 ir 200 kDa buvo beveik visiškai nepastebima (žr. 12 pav.). Šis rezultatas tapo akivaizdžiu tarpusavyje palyginus U32.002 peptidazės baltyminio preparato elektroforetinius profilius, kurių vieno gavimui taikytas 4x baltymų ruošimo buferis be 2-merkaptioetanolio (12 pav. 1 takelis), kito - su šiuo reduktoriumi (žr. 12 pav. 2 takelis). Redukcija neturėjo jokios pastebimos įtakos baltymui tarp 40 ir 50 kDa.



**12 pav.** Redukcijos įtaka U32.002 peptidazės preparatui, rezultataus vizualizuojant NDS-PAGE\*.

M. - PageRuler™ Unstained Protein Ladder (fragmentų molekulinės masės pateikiamos kDa); 1. U32.002 baltyminio preparato elektroforetinis profilis gautas neveikus 2-merkaptioetanoliu; 2. U32.002 baltyminio preparato elektroforetinis profilis gautas veikus 2-merkaptioetanoliu.

Siekiant objektyviai nustatyti, ar akivaizdžius elektroforetinių profilių skirtumus, tarpusavyje lyginant kontrolinius bei po indukcijos, lemia tikslinio baltymo ekspresija, naudota MALDI-TOF/TOF tandeminė MS/MS. Iš NDS-PAGE gelių (naudojus 4x baltymų ruošimo buferį be

\* Pateikiamas fotografijos negatyvo vaizdas

redukcijos) buvo išpjauti tik po ekspresijos indukcijos sintetiniai baltymai tarp 40 ir 50 kDa bei tarp 150 ir 200 kDa. Užsakytai baltymų masių spektrometrijai taikytas standartinis protokolas, baltymų identifikavimui - Mascot algoritmas.

Labai aukštu (virš 95%) baltymų identifikavimo patikimumu visuose tirtuose NDS-PAGE gelių fragmentuose nustatytas vienintelis baltymas - U32.002 peptidazė.

### **3.6 U32.002 kolagenolizinės peptidazės su bei be signalinės/pro sekos ekspresijos optimizavimas**

Ekspresuojamo tikslinio baltymo kiekio priklausomybė nuo konkretaus optimizuojamų parametų derinio vertinta, lyginant elektroforetinius profilius NDS-PAGE geliuose. Nustatyta, jog didžiausia tikslinio baltymo su signaline seka išėiga pasiekama *E. coli* BL21 (DE3) kultivuojant LB, indukavus 0,5 mM IPTG ir auginus 4 val. 37°C, indukciją atliekant kultūrai pasiekus 0,6 OT<sub>600</sub>.

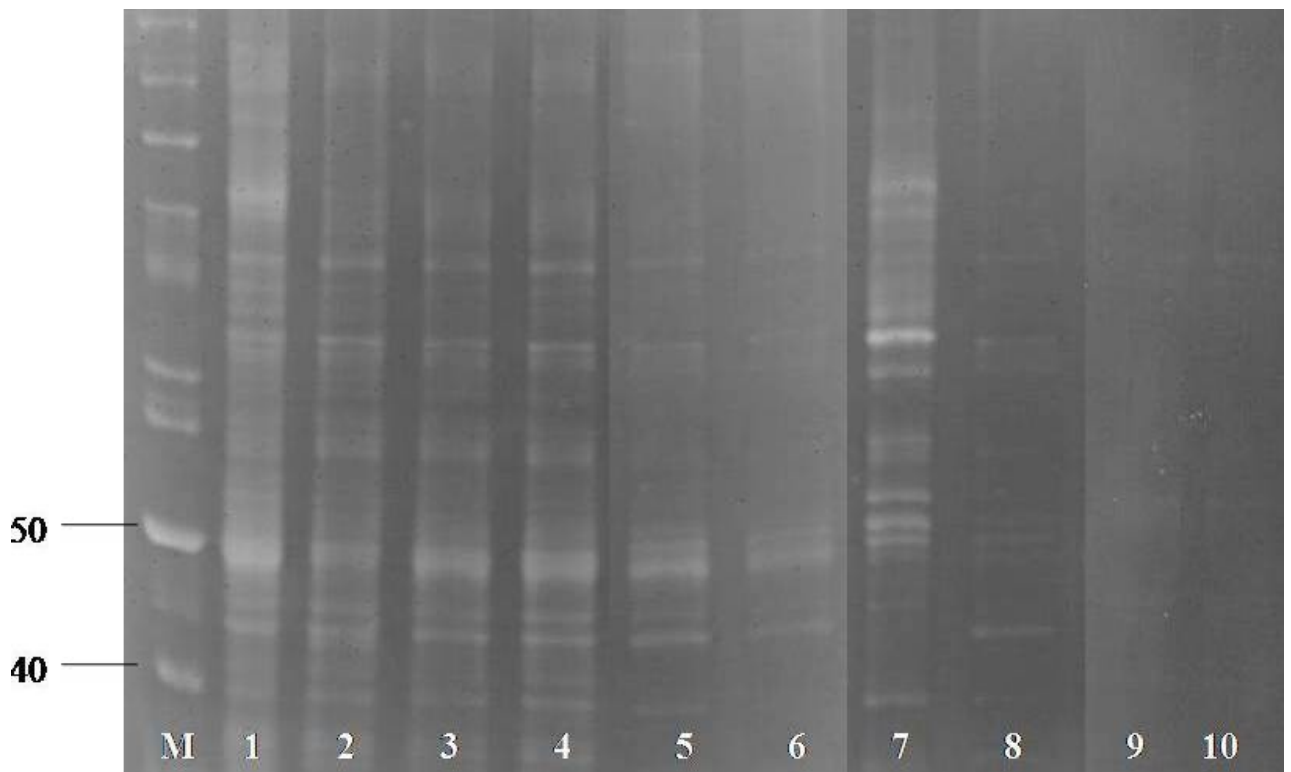
Kaip matoma 11 pav., tikslinio baltymo be signalinės sekos indukcija vyksta efektyviai, tačiau tikslinio baltymo nematyti tirpioje viduląstelių baltymų frakcijoje. Šiuo atveju optimizavimas vykdytas, siekiant gauti maksimalią baltymo išėigą tirpioje frakcijoje. Nustatyta, jog *E. coli* BL21 (DE3) kultivavimo temperatūros mažinimas nedidino tikslinio baltymo be signalinės sekos tirpumo, tuo tarpu bendrą baltymo išėigą mažino. Alternatyvių LB kultivavimo terpių, praturtintų angliavandeniais (Terrific Broth) taikymas tikslinio baltymo tirpumo taip pat nedidino.

Taigi didžiausia tikslinio baltymo be signalinės/pro sekos išėiga pasiekta, *E. coli* BL21 (DE3) kultivuojant LB, indukavus 0,5 mM IPTG ir auginus 4 val. 37 °C, indukciją atliekant kultūrai pasiekus 0,6 OT<sub>600</sub>.

### **3.7 Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> jonų įtaka U32.002 kolagenolizinės peptidazės struktūriniam termostabilumui**

U32.002 struktūrinio termostabilumo analize siekta nustatyti, kokiam temperatūrų intervalui esant, šis baltymas geba palaikyti molekulės struktūrinį vientisumą - nedematūruoti. Pasirinkta analizės schema taip pat suteikė galimybę nustatyti, ar Ca<sup>2+</sup> bei Zn<sup>2+</sup> jonai, veikdami atskirai/kartu, gali turėti įtakos U32.002 peptidazės struktūriniam termostabilumui.

Termostabilumas vertintas po analizės rezultatų vizualizavimo NDS-PAGE (naudotas 4x baltymų ruošimo buferis su 2-merkaptioetanoliu). Laikyta, jog U32.002 dematūraciją dėl poveikio konkrečia temperatūra atspindi šio baltymo koncentracijos sumažėjimas konkrečiame elektroforetiniame profilyje (žr. 13 pav.).



**13 pav.** U32.002 peptidazės struktūrinio termostabilumo priklausomybė nuo inkubavimo temperatūros ir buferio sudėties\*.

M. - PageRuler™ Unstained Protein Ladder (fragmentų molekulinės masės pateikiamos kDa); 1. U32.002 preparatą inkubavus 55 °C, preparato buferis TE/pH 8; 2. 55 °C, 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4 su 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 3. 55 °C, 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4 su 1 mM ZnCl<sub>2</sub>; 4. 55 °C, 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4 su 1 mM ZnCl<sub>2</sub> + 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 5. 70 °C, 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4 su 1 mM ZnCl<sub>2</sub>; 6. 70 °C, 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4 su 1 mM ZnCl<sub>2</sub> + 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 7. 60 °C, TE/pH 8; 8. 60 °C, 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4 su 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 9. 80 °C, 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4 su 1 mM ZnCl<sub>2</sub>; 10. 80 °C, 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4 su 1 mM ZnCl<sub>2</sub> + 1 mM CaCl<sub>2</sub>.

Struktūrinio termostabilumo analizė vykdyta U32.002 peptidazės su signaline/pro seka atžvilgiu. Kaip minėta 2.4.13, termostabilumo nustatymui tiesiogiai naudoti *E. coli* BL21 (DE3) lizatai. Pastarieji ruošti vykdant ląstelių lizę į konkrečios sudėties buferį. Histidino afiniškumo inkaras nuo U32.002 peptidazės polipeptido N-galo nebuvo šalintas.

Įvykdžius analizę, nustatyta, jog U32.002 kolagenolizinės peptidazės koncentracija, vizualiai vertinant stebimą elektroforetiniuose profiliuose, išlieka pastovi, esant 37 - 70 °C temperatūros diapazonui, buferiuose - 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4 su 1 mM ZnCl<sub>2</sub> ir 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4 su 1 mM ZnCl<sub>2</sub> + 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Esant daugiau nei 70 °C, koncentracija krenta žemiau vizualiai užfiksuojamo lygio (13 pav. 9 ir 10 takeliai). Buferiuose TE/pH 8 ir 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4 su 1 mM CaCl<sub>2</sub> U32.002 peptidazės koncentracija buvo pastovi, esant 37 - 55 °C temperatūros intervalui. Viršijus 55 °C temperatūrą, koncentracija taip pat sumažėja žemiau vizualiai užfiksuojamo lygio (13 pav. 7 ir 8 takeliai).

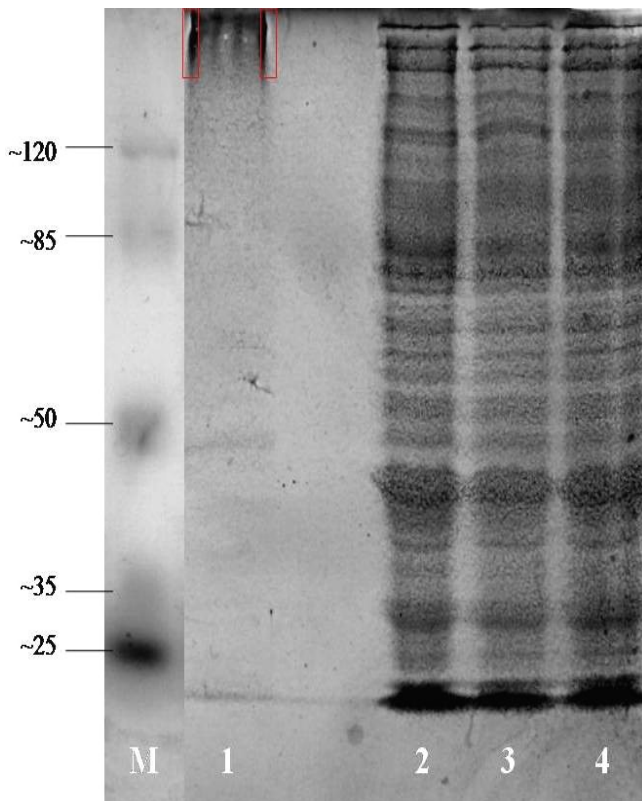
\* Pateikiamas fotografijos negatyvo vaizdas

### 3.8 U32.002 peptidazės ekspresuotos *E. coli* BL21 (DE3) katalizinio aktyvumo įvertinimas

Vertinimu siekta įsitikinti, ar ekspresijos sistemoje transliuotas baltymas su signaline/pro seka įgyja pakankamai natyvią konformaciją, galinčią užtikrinti katalizinio potencialo raišką. Visos iki šiol biochemiškai charakterizuotos U32 peptidazės - kolagenolizinės, todėl pirminiam U32.002 peptidazės su signaline/pro seka iš *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> katalizinio potencialo raiškos nustatymui pasirinktas kolagenolizinio aktyvumo įvertinimas.

Katalizinis aktyvumas įvertintas nuo tikslinio baltymo polipeptido N-galo nepašalinus histidino inkaro. Aktyvumo nustatymui taikytas *E. coli* BL21 (DE3) nevalytas baltyminis preparatas, gautas ląsteles lizuojant į buferį 50 mM TRIS-HCl/pH 7,4, esant 50 °C temperatūrai (detalesniam žr. 2.4.9). Kontroliniai preparatai ruošti analogiškai. Svarbu pažymėti, jog U32.002 peptidazės bei kontrolinių baltyminių mėginių įnešimui į zimograminius gelius naudotas 4x baltymų ruošimo buferis be 2-merkaptoetanolio. Po sumaišymo su minėtu buferiu, prieš įnešant į gelius, mėginiai nekaitinti.

Taikant kolageno (0,5 mg/mL) zimografiją, įvertintas U32.002 kolagenolizinės peptidazės proteolizinis aktyvumas prieš natyvų I tipo fibrilinį kolageną (žr. 14 pav.). Zimograminio gelio nuotraukoje U32.002 peptidazės mėginio zimografinio profilio šonuose virš ~120 kDa (14 pav. 1 takelis) stebimos kolagenolizinį aktyvumą įrodančios nenusidažę zonos (pažymėta raudonai). Kolagenolizinis aktyvumas nebuvo identifikuotas ties ~50 kDa. Išanalizavus kontrolinių mėginių (14 pav. 2; 3; 4 takeliai) zimografinius profilius, kolagenolizinis aktyvumas nenustatytas.



**14 pav.** U32.002 kolagenolizinio aktyvumo identifikavimas taikant natyvaus I tipo kolageno (0,5 mg/mL) zimografiją.

M. - Prestained Protein Molecular Weight Marker (fragmentų molekulinės masės pateikiamos kDa); 1. U32.002 peptidazės preparatas iš *E. coli* BL21 (DE3) lizato (kolagenolizinį aktyvumą atspindinčios zonos pažymėtos raudonai); 2. Baltyminis preparatas iš *E. coli* BL 21 (DE3) su pET28c(+) be U32.002 geno sekos; 3. Baltyminis preparatas iš *E. coli* BL 21 (DE3) su pET28c(+) su U32.002 genu, neindukavus IPTG; 4. Baltyminis preparatas iš *E. coli* BL 21 (DE3) be pET28c(+).

Siekiant visiško objektyvumo, U32.002 preparato zimografinio profilio sritis, kurios šonuose detektuotas kolagenolinis aktyvumas, buvo išpjauta. Gautas zimograminio gelio fragmentas analizuotas taikant masių spektrometriją (detaliau žr. 3.5). Vienintelis baltymas, identifikuotas (patikimumas daugiau nei 99 %) analizuotame zimograminio gelio fragmente - U32.002 peptidazė.

Identifikavus U32.002 peptidazės pirminį substratinį specifiškumą - nustačius kolagenolizinį aktyvumą - substratinio specifiškumo analizės schema papildyta. Taikant baltymų zimografiją (žr. 2.4.14), siekta nustatyti, ar U32.002 peptidazė geba skaidyti želatiną, albuminą, kazeiną, elastiną ir keratiną. Katalizinis aktyvumas prieš minėtus baltymus vertintas vizualiai analizuojant zimograminius gelius, kurių sudėtis buvo papildyta išvardytais baltymais iki 0,5 % (svoris/tūris) galutinės koncentracijos.

Gauti rezultatai pademonstravo, jog U32.002 peptidazė nesugeba hidrolizuoti želatinos, albumino, kazeino, elastino bei keratino, nes visų minėtų baltymų zimogramose nebuvo identifikuotos hidrolizės zonos. Pažymėtina, jog, kaip ir vertinant kolagenolizinį aktyvumą, vykdant minėtų baltymų proteolizės U32.002 peptidaze įvertinimą, taikytas kontrolinių rinkinys. Nei viename iš kontrolinių mėginių nebuvo nustatyta proteolizinio aktyvumo visų testuotų baltyminių substratų atžvilgiu.



## 4. REZULTATŲ APTARIMAS

---

Kolagenolizinių peptidazių analizė, prasidėjusi nuo patogenų kolagenazių charakterizavimo, nėra nauja enzimologijos tyrimų sritis. Minėto specifiskumo peptidazės tiriamos daugiau nei šeši dešimtmečiai. Nepatogeninių bakterijų kolagenazės tiriamos du pastaruosius dešimtmečius. Chronologiškai termofilinių bakterijų kolagenazių tyrimai - jauniausia kolagenolizinių peptidazių tyrimo atšaka. Iki šiol charakterizuotos tik pavienės termofilų kolagenolizinės peptidazės, bet net fragmentiški termofilinių kolagenazių tyrimai demonstruoja biotechnologiniu bei terapiniu požiūriu vertingas savybes (Watanabe, 2004).

*Geobacillus* genties kamienų kolagenazės nėra tirtos. Atliekant bakalaурinį darbą („Daliniai *Geobacillus lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> ir *Geobacillus vulcani* 22 kolagenolizinių fermentų tyrimai“, 2009), *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> buvo atrinktas kaip kamienas, gebantis intensyviai skaidyti temperatūra destabilizuotą I tipo kolageną, esant temperatūrų intervalui nuo 60 iki 80 °C.

Nors *Geobacillus* kamienų, kurių nuskaityta viso genomo seka, skaičius intensyviai auga, bioinformatinės analizės metodais nuspėjamų kolagenolizinių peptidazių įvairovė šios genties kamienuose nedidėja (Rawlings *et al.*, 2010). Iki šiol U32 šeimos kolagenolizinės peptidazės išlieka vieninteliais kandidatais, siekiant paaiškinti *Geobacillus* genties kamienų gebėjimą hidrolizuoti kolageną. U32 šeima išskirta dar 1991 metais, analizuojant patogenų kolagenazių įvairovę (Takahashi *et al.*, 1991), tačiau iki šiol - tai viena mažiausiai charakterizuotų gyvosios gamtos peptidazių šeimų.

*G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> genomo seka nėra nuskaityta, bet bakalaурinio darbo metu, atlikus kokybinę GEOCOL-PGR analizę, buvo įrodyta, jog šio kamieno genomui būdingas U32 genas. Geno nuskaitymas leido šį geną priskirti antrajam šeimos pogrupiui - U32.002 (*Helicobacter*-tipo). U32 peptidazės geno buvimą *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> genome buvo galima numatyti, atsižvelgiant į tai, jog visuose *Geobacillus* kamienuose, kurių genomai nuskaityti, šios šeimos peptidazių genai identifikuoti. Tuo tarpu U32 peptidazių šeimos geno transkripcijos faktą *in vivo* buvo būtina įrodyti. U32 peptidazės geno transkripcijos faktas nėra įrodytas ne tik *Geobacillus* genties kamienuose, bet ir nė vienoje kitoje termofilų gentyje.

Pasirinkta *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> U32.002 kolagenolizinės peptidazės transkripcijos analizės schema įgalino identifikuoti transkripciją esminėse kultūros augimo fazėse - eksponentinio augimo (fazės pradiniam etape bei fazei baigiantis) bei žūties (žr. 4 pav.). Analizei buvo tikslingai pasirinkta sintetinė mitybinė terpė (mM9), kurios sudėtis eliminavo galimo peptidazių induktoriaus buvimo galimybę.

Transkripcijos analizės eiga apėmė tris etapus. Pirmojo etapo metu iš pasirinktų kultūros augimo fazių momentų buvo sėkmingai išskirta suminė RNR. Sėkmingo suminės RNR preparatų išskyrimo faktą patvirtino dviejų nepriklausomų tyrimų rezultatai. Spektrometrinis RNR koncentracijos matavimas po ruošiamo preparato veikimo DNaze I leidžia teigti, jog RNR kiekis buvo pakankamas tolesniems analizės etapams (žr. 3 lentelė). Nukleorūgščių koncentracijos mažėjimas po veikimo DNaze I įrodo, jog buvo sėkmingai pašalintos DNR priemaišos, galėjusios iškreipti transkripcijos analizės rezultatus. Pakankama galutinė RNR koncentracija leidžia teigti, jog suminių RNR preparatų išskyrimo metu vykdyta tinkama preparatų užteršimo RNazėmis prevencija (RNazių veikimo inhibavimas - RiboLock™ RNase Inhibitor RNazių inhibitoriumi, dH<sub>2</sub>O veikto DEPC naudojimas ir kt. priemonės.). Ši apibendrinimą taip pat pagrindžia išskirtų suminės RNR preparatų degradacijos laipsnio įvertinimas, taikant agarozės elektroforetinį vizualizavimą (žr. 5 pav.). 23 S ir 16 S rRNR (RNR tipai, kurių koncentracija ląstelėje didžiausia) zonos buvo visiškai diskrečios be degradacijos faktą atspindinčių šleifų. Kaip ir tikėtasi, nustatyta tiesioginė priklausomybė tarp kultūros OT ir galutinės RNR koncentracijos. Šią priklausomybę pademonstravo visi suminės RNR preparatai, išskyrus preparatą, kurio ruošimui naudotos ląstelės buvusios jau pažengusioje žūties fazėje. Tiesioginė priklausomybė tarp OT ir išskirtos RNR koncentracijos paaiškinama elementariu ląstelių skaičiaus skirtumu. Padidėjusią suminės RNR koncentraciją žūties fazėje gali lemti *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> ląstelių pasiruošimo sporuliacijai procesas. Proceso iniciacijos metu ląstelės transkribuoja didelę indukuojamų genų įvairovę (Yudkin ir Clarkson, 2005). Kaip ir tikėtasi, galutinės RNR koncentracijos skirtumai atsispindėjo agarozės elektroforetiniame gelyje (pvz., lyginant 5 pav. 2 takelį su 3).

Antrasis transkripcijos analizės etapas - kDNR sintezė, matrica naudojant suminius RNR preparatus, buvo sėkmingas. Vizualizuoti atvirkštinės transkripcijos produktai stebėti kaip šleifo pavidalo zonos, žr. 6 pav.

Trečiasis transkripcijos analizės etapas - kokybinių PGR atlikimas bei analizė leido įrodyti U32.002 kolagenolizinės peptidazės iš *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> transkripcijos faktą. Pastaroji išvada grindžiama PGR reakcijų produktų analize (žr. 8 pav.). Visos U32.002 geno sekos transkriptas identifikuotas *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> kultūros eksponentinės augimo fazės metu. Teiginį įrodo PGR produktai, gauti taikant LITCOL-F ir LITCOL-R pradmenų porą, kaip matricą naudojant kDNR preparatus, kurių ruošimui naudoti suminės RNR preparatai, išskirti iš kultūros eksponentinės fazės pradinio etapo bei šiai fazei besibaigiant. GEOCOL-F ir GEOCOL-R, taip pat taikyti minėtų kDNR preparatų analizei, patvirtino U32.002 transkripcijos faktą. Viso U32.002 geno sekos ilgio fragmentas nebuvo identifikuotas (8 pav. 7 ir 8 takeliai) kDNR mėginiuose, kurių ruošimui taikyti suminės RNR preparatai, išskirti iš ląstelių, buvusių žūties fazėje - atitinkamai

produktas, taikant LITCOL-F ir LITCOL-R pradmenų porą, nebuvo gautas, tačiau U32.002 geno transkripto fragmentas šiuose preparatuose buvo identifikuotas taikant GEOCOL-F ir GEOCOL-R porą.

Taikant papildomo specifiškumo pradmenį LITCOL-45Sal porose su LITCOL-R ir GEOCOL-R nustatyta, jog kultūros žūties fazėse sutinkamas U32.002 peptidazės geno transkriptas - trumpesnis nei viso ilgio U32.002 geno seka, bet ne trumpesnis nei geno fragmentas be signalinės/pro sekos. Bioinformatinė U32.002 geno sekos analizė leidžia atmesti prielaidą, jog U32.002 geno sekoje gali egzistuoti alternatyvi transkripcijos sekos pradžia tarp geno pradžios ir signalinės/pro sekos pabaigos. Apibendrinant galima teigti, jog U32.002 *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> transkribuoja U32.002 peptidazės geną eksponentinės augimo fazės metu. Ląstelių žūties fazėje sutinkami tik pradėti degraduoti U32.002 geno transkriptai. Transkripcijos analizei pasirinktos terpės, skirtos *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> kultivavimui, sudėtis leidžia teigti, jog U32.002 peptidazės genas transkribuojamas konstitutyviai.

Pateiktus transkripcijos rezultatus pagrindžia tiek I, tiek II suminių RNR mėginių išskyrimo rezultatai. Tikslingi U32 peptidazių šeimos transkripcijos dimanikos tyrimai nėra vykdyti. U32 šeimos peptidazių genų transkripcija identifikuota, tiriant bendrus kelių patogenų genčių kamienų (pvz. *Staphylococcus*) transkriptomus (Bore *et al.*, 2007). Daugelio mezofilinių bakterijų kolagenolizinių peptidazių transkripcija - indukuojamas procesas (Kawase *et al.*, 2004), bet taip pat aprašytos kolagenazės, kurių genai transkribuojami konstitutyviai (Adigüzel *et al.*, 2008). Kolagenazių genų transkripcijos iniciacijos valdymas tiesiogiai susijęs su konkrečios bakterijos užimama ekoniša.

Išvada, jog U32.002 genas transkribuojamas tik eksponentinio kultūros augimo fazės metu leidžia susiaurinti potencialių šios kolagenazės funkcijų *in vivo* spektrą. Visgi funkcijos *in vivo* identifikavimui būtini detalesni tyrimai.

*Geobacillus* genties kamienai, tarp jų ir *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup>, gali būti sutinkami gana įvairiose ekologinėse bendrijose, tarp jų ir tose, kuriose kolageno grupės baltymai nėra prieinami kaip potencialūs anglies ir/ar energijos šaltiniai (Caccamo *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2007). Šis teiginys bei identifikuota konstitutyvi U32.002 geno transkripcija augimo atžvilgiu intensyviausioje kultūros augimo fazėje leidžia suformuluoti prielaidą, jog U32.002 peptidazė gali lemti didesnę funkcijų *in vivo* spektrą nei tiesioginio kolageno grupės baltymų įsisavinimo užtikrinimą. Tik dviejų U32 šeimos peptidazių lokalizacija ląstelės kompartmentų atžvilgiu objektyviai identifikuota. Nustatyta, jog HP0169 (U32.002 pogrupis) iš *H. pylori* (Kavermann *et al.*, 2003) ir yegQ (U32.003) iš *S. enterica* (Zhao, 2002) - sekretuojami fermentai. Remiantis prielaida, jog U32.002 iš *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> taip pat sekretuojama, galima papildoma funkcija *in vivo* laikyti U32.002

veikimą, proteolizuojant ląstelės sekretuojamus ir/ar su ląstelės voko formavimu susijusių baltymų proteolizę. Potencialiais U32.002 kolagenolizės substratais šiuo atveju galėtų būti *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> baltymai, kurių struktūrai būdingi domenai yra panašios į kolagenus molekulinės organizacijos. Pastarųjų metų šių baltymų įvairovės tyrimai leido nustatyti, jog jų kolageno struktūrai tapačių domenų lydymosi temperatūra viršija 60 °C (Persikov *et al.*, 2005). Deja, *Geobacillus* gentyje šie baltymai dar nėra identifikuoti bei tikslingai charakterizuoti.

Įsitikinus, jog U32.002 genas iš *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> - transkribuojamas, atliktas šio geno su bei be signalinės/pro sekos pagausinimas bei klonavimas. Į naudotus vektorius klonuotų U32.002 sekų nuskaitymas įrodė, jog LITCOL-F ir LITCOL-R, taip pat LITCOL-45Sal, sukonstruoti pagal *G. kaustophilus* HTA426 U32.002 geno seką, buvo tinkami U32.002 kolagenolizinės peptidazės pagausinimui. U32.002 kolagenolizinės peptidazės visos geno sekos bioinformatinė analizė parodė, jog minėto geno koduojama seka nuo *G. kaustophilus* HTA426 U32.002 peptidazės sekos skyrėsi tik dviem ar. *G. kaustophilus* HTA426 335 pozicijoje sutinkamas argininas, o *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> - leucinas, 339 pozicijoje atitinkamai histidinas - argininas. Nuskaičius visą *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> U32.002 kolagenolizinės peptidazės geno seką, atlikta bioinformatinė analizė identifikavo vienintelį U32 konsensus regioną, kuriuo remiantis geno seka priskiriama šiai peptidazių šeimai.

Atlikus U32.002 kolagenolizinės peptidazės klonavimą į ekspresijos vektorių pET28c(+), įvykdyta ekspresijos efektyvumo įvertinimo analizė. Nustatyta, jog U32.002 peptidazės su bei be signalinės/pro sekos indukcija IPTG vyksta sėkmingai. Tuo atveju, kuomet *E. coli* BL21 (DE3) ekspresuoja visą U32.002 geno seką, ekspresuotas baltymas išlieka tirpioje citoplazminėje frakcijoje (žr. 10 pav.). Šiuo atveju, tikslinis baltymas neaptinkamas viduląstelinės baltymų frakcijos nuosėdose bei *E. coli* BL21 (DE3) nėra sekretuojamas. Tuo atveju, kuomet *E. coli* BL21 (DE3) po indukcijos IPTG sintetina U32.002 geno fragmentą be potencialios signalinės/pro sekos, tikslinis baltymas aptinkamas viduląstelinių baltymų netirpioje frakcijoje (žr. 11 pav.), neaptinkamas tirpioje bei nėra sekretuojamas.

Abiem atvejais - tiek ekspresuojant su, tiek be signalinės/pro sekos, U32.002 peptidazė geba oligomerizuotis, susidarant homodimerui. Oligomerizacija vyksta per disulfidinius tiltelius. Pastarąjį teiginį įrodė reduktorių įtakos dimerui analizė (žr. 12 pav.). Joninių ryšių įtaką dimero formavimui leidžia atmesti NDS naudojimas, atliekant PAGE. Išsamiausiai biochemiškai charakterizuota U32 šeimos peptidazė - PrtC baltymas, aprašytas, nedetalizuojant dimerinės saveikos ryšių tipo, kaip aktyvus homodimeras (Kato *et al.*, 1992). Todėl ir U32.002 peptidazės iš *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> oligomerizacijos laipsnį galima laikyti homodimeru. Pastarojo homodimero molekulinės masės (gelyje stebima tarp 150 ir 200 kDa) neatitikimą teorinei (~100

kDa), lyginant šio potencialaus dimero zoną su NDS-PAGE taikytu baltymų molekulinė masių žymeniu, galima paaiškinti tuo, jog, sudarydami dimerą, U32.002 monomerai dalį savųjų molekulių paviršiaus izoliuoja, ribodami NDS prisijungimą. Minėtas reiškinys sąlygoja nelineinį molekulinės masės atžvilgiu U32.002 dimero migravimą, veikiant elektros srovės laukui, nepilnu dimero monomerų linearizavimu prisijungiant NDS. Dimerizacijos laipsnio analizė vykdyta, netaikant redukcijos bei į NDS-PAGE gelį įnešamo U32.002 mėginio nekaitinus.

Siekiant optimizuoti sąnaudas, būtinas U32.002 preparato ruošimui, atlikta šio baltymo ekspresijos su bei be signalinės/pro sekos parametrų optimizacija. Optimizuojant U32.002 geno sekos fragmento be signalinės/pro sekos ekspresiją, taip pat siekta nustatyti, ar atrinktas parametrų derinys (sumažinta *E. coli* BL21 (DE3) kultivavimo, indukuojant ekspresiją, temperatūra) gali lemti šio tikslinio baltymo tirpumo padidėjimą. Ekspresijos optimizavimas buvo sėkmingas tik U32.002 sekos su signaline/pro seka atžvilgiu. Nustatyta, jog IPTG koncentracijos naudojamos indukcijai sumažinimas perpus iki 0,5 mM, nemažina tikslinio baltymo ekspresijos išeigos. U32.002 peptidazės be signalinės/pro sekos optimizacijos metu nepavyko atrinkti ekspresijos parametrų derinio, didinančio šio tikslinio baltymo išeigą į tirpią citoplazminių baltymų frakciją.

U32.002 signalinė/pro seka identifikuota, pritaikius bioinformatinės analizės rezultatus. Be detalių biocheminių tyrimų neatmestina prielaida, jog signalinės/pro sekos regiono ribos neteisingai numatytos ar šis regionas nebūdingas U32.002 peptidazei (peptidazė sekretuojama nuo signalinės sekos nepriklausomu mechanizmu), šiuo atveju sintetinamas U32.002 konstruktas - neįgyja natyvios konformacijos bei krenta į nuosėdas.

Analizuojant U32.002 baltymo su signaline seka struktūrinį termostabilumą, nustatyta, jog U32.002 peptidazė aplinkoje be divalentių metalo jonų nėra termostabili - TE buferyje denatūruoja, temperatūrai viršijus 55 °C. Tuo tarpu optimali temperatūra *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> augimui siekia 60 °C (Kuisienė *et al.*, 2004). Kaip ir tikėtasi, metalų jonai didina peptidazės struktūrinį termostabilumą, tačiau ne visi - tik Zn<sup>2+</sup> jonas. Neatmestinos dvi galimybės: arba šio metalo jonas tiesiogiai stabilizuoja peptidazės su signaline/pro seka struktūrą, arba slopina katalizinį aktyvumą. Pastaruoju atveju mažinama baltymo su signaline seka autoproteolizė, esant aukštesnei nei 55 °C temperatūrai. Aprašytos kolagenazės, kurioms būdinga autoproteolizė, vykstanti esant tiek aukštomis (Williams ir Murray, 1994), tiek labai žemoms temperatūroms (Rouy *et al.*, 2005). Analizei taikyta 1 mM Zn<sup>2+</sup> tipiniu atveju lemia metalopeptidazių (tarp kolagenazių dažniausiai sutinkamo katalizinio tipo) katalizinio aktyvumo, įskaitant autoproteolizę, inhibiciją (Wart, 2004). Įrodyta, jog Ca<sup>2+</sup> didina U32 šeimos kolagenazių katalizinį aktyvumą (Kato *et al.*, 1992), taigi šio metalo buvimas gali didinti autodegradaciją, bet, kaip nustatyta, neturi/arba turi nežymų poveikį tiriamo baltymo struktūriniam termostabilumui.

Apibendrinant galima teigti, kad atlikta  $\text{Ca}^{2+}$  ir  $\text{Zn}^{2+}$  jonų įtakos struktūriniam termostabilumui leido nustatyti, jog U32.002 peptidazė iš *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> nestabili, esant temperatūros diapazonui, optimaliam šio kamieno augimui, tuo atveju, kuomet peptidazės aplinkoje nesutinkami  $\text{Zn}^{2+}$  jonai.

Identifikavus, jog U32.002 peptidazė sėkmingai ekspresuojama *E. coli* BL21 (DE3) bei po ekspresijos šioje bakterijoje gali sudaryti natyvią homodimero formos konformaciją, buvo svarbu įsitikinti, ar po indukcijos ekspresuotas baltymas geba demonstruoti katalizinį aktyvumą. Iki šiol charakterizuotų U32 peptidazių pirminis substratinis specifiškumas įvardijamas kaip gebėjimas skaidyti natyvius fibrilinių kolagenus (I, II ir III tipai) (Kato *et al.*, 1992; Kavermann *et al.*, 2003 ir kt.). Remiantis šiais duomenimis, pirminei U32.002 peptidazės aktyvumo analizei taikyta natyvaus I tipo kolageno (0,5 mg/mL) zimografija.

Kolageno zimografijos metodo algoritmas buvo sudarytas, atidžiai atsižvelgiant į sąlygas (Gogly *et al.*, 1998; Kawase *et al.*, 2010), kurios neleistų I tipo kolagenui iš žiurkės uodegos denatūruoti virstant želatina. Taikytas substratinis buferis (Rosenberg, 2005) su NaCl (17 mM),  $\text{CaCl}_2$  (10 mM) bei  $\text{ZnCl}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ) įgalino nustatyti kolagenolizinį aktyvumą nespecifinėmis sąlygomis, o kadangi kolageno zimografijai nė viename metodo etape netaikyti reduktoriai, U32.002 galėjo formuoti homodimerus. Šio specifiškumo testavimui taikyta inkubavimo temperatūra (50 °C) pasirinkta, atsižvelgus į U32.002 struktūrinio termostabilumo įvertinimo rezultatus.

Gauti U32.002 peptidazės su signaline/pro seka kolageno zimografijos rezultatai - identifikuotas kolagenolizinis aktyvumas - leidžia teigti, jog *E. coli* BL21 (DE3) ekspresuotas fermentas įgyja pakankamai natyvią konformaciją, užtikrinančią kolagenolizinio specifiškumo raišką. Kolageno zimograminio gelio (14 pav.) analizė leidžia teigti, jog U32.002 peptidazė geba demonstruoti proteolizinį potencialą tik esant dimerizuotai būklei. U32.002 elektroforetiniame profilyje kolagenolizės zonos detektuotos tik virš ~120 kDa. U32.002 monomeras nesugebėjo skaidyti kolageno - kolagenolizės zonos neidentifikuotos ties 50 kDa. Iki šiol biochemiškai charakterizuotų U32 šeimos peptidazių kolagenolizinio aktyvumo nustatymui kolageno zimografija nebuvo taikyta.

Charakterizuotos U32 peptidazės demonstruoja neabejotiną, tačiau „vangu“ kolagenolizinį aktyvumą (Aoki *et al.*, 1993). Šį apibendrinimą atitinka ir U32.002 iš *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> kolagenolizinio aktyvumo įvertinimas - virš ~120 kDa detektuotos kolagenolizės zonos nėra intensyviai išreikštos.

Detektuotas kolagenolizinio aktyvumo faktas, atsižvelgus į aktyvumo analizės sąlygas, taip pat leidžia teigti, jog U32.002 iš *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> nėra būdingas prisijungimo prie kolageno domenai, kurio veikimui būtinas joninių ryšių sudarymas su kolageno natyvia superspirale.

Jungimosi prie kolageno domenas būdingas daugeliui charakterizuotų kolagenazių, tačiau identišką funkciją užtikrinantys domenai, skirtingose kolagenazėse skiriasi tiek struktūra, tiek veikimo mechanizmu (Lee *et al.*, 2005). Tuo atveju, kuomet kolageno atpažinimo domeno veikimui būtinas joninių ryšių formavimas, aplinkoje esant  $\text{Na}^+$  jonų domenas nesugeba „atpažinti“ kolageno (Itoi *et al.*, 2006). Tikslingai nustatyti, ar U32 peptidazės struktūroje egzistuoja jungimosi prie kolageno domenai, bandyta tik kartą, bet U32.003 pogrupio peptidazėje iš *S. mutans* šis domenai nebuvo nustatytas (Han *et al.*, 2006). Visgi kolagenolizinis aktyvumas buvo identifikuotas, kas leidžia suformuluoti prielaidą, jog U32.002 būdingas savitas kolageno atpažinimo bei jungimosi prie substrato mechanizmas.

Svarbu pažymėti, jog U32.002 kolagenolizinio aktyvumo vertinimas atliktas nuo ekspresuotos peptidazės nepašalinus histidino afiniškumo inkaro, lokalizuoto polipeptido N-gale. Kaip demonstruoja gauti rezultatai, papildoma nenatūrali ar. seka leidžia formuotis homodimerams bei skaidyti natyvų I tipo kolageną. Visgi rezultatų lyginimas tarp kolagenolizinio aktyvumo intensyvumo, taikant U32.002 preparatą su afiniškumo inkaro bei be jo, leis detaliam nustatyti, ar ši nenatūrali sritis gali turėti įtakos katalizinio potencialo raiškos parametrui.

Atlikta U32.002 peptidazės substratinio specifiškumo analizė leidžia teigti, jog U32.002 universaliomis inkubavimo sąlygomis nesugeba hidrolizuoti želatinos, albumino, kazeino, elastino bei keratino. Substratinio specifiškumo įvertinimas buvo vykdomas be inkubavimo parametrų atrinkimo ir optimizavimo, kas galėjo įtakoti gautus rezultatus - proteolizinio aktyvumo raiškai prieš konkretų testavimui naudotą substratą detektuoti nebuvo palankių sąlygų. Atsižvelgiant į akcentuotą teiginį, visgi galima teigti, jog U32.002 - labai specifinė peptidazė. Kazeinolizinis aktyvumas analizuotas tik PrtC (U32.001 pogrupis) peptidazės atžvilgiu - jis nebuvo nustatytas (Otogoto ir Kuramitsu, 1993). Ši peptidazė taip pat nesugebėjo hidrolizuoti želatinos (Kato *et al.*, 1992). Tuo tarpu PrtC ortologas, sukeliantis kačių periodontitą želatiną hidrolizuoja (Norris ir Love, 2000). Albuminolizinio, elastinolizinio bei keratinolizinio aktyvumų testavimas iki šiol nebuvo taikytas U32 peptidazių šeimos atstovų atžvilgiu.

Analizuojant U32.002 substratinį specifiškumą, buvo svarbu nustatyti, ar ši peptidazė geba proteolizuoti kitus fibrilinius baltymus nei kolageną. Neidentifikavus elastinolizinio bei keratinolizinio aktyvumų, taip pat pagrindžiama prielaida, jog U32.002 - kolageno hidrolizei specifinė peptidazė. Daugelis išsamiai aprašytų kolagenazių, net jei pasižymi plačiu substratų proteolizės spektru, nesugeba proteolizuoti kitų nei kolagenas fibrilinės struktūros baltymų (Suzuki *et al.*, 2006).

## IŠVADOS

---

1. Vienakopijinis *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> U32.002 peptidazės genas konstitutyviai transkribuojamas eksponentinės augimo fazės metu, kamieną auginant mM9, esant pH 6,5 (50 mM MES-NaOH), o temperatūrai - 60 °C. Vėlesnėse augimo fazėse transkripcija nevyksta, aptinkamas nebaigtas degraduoti U32.002 geno transkriptas.
2. Naudojant ekspresijos kamieną *E. coli* BL21 (DE3) į pET28c(+), pavyko klonuoti U32.002 geną su bei be signalinės/pro sekos. Pirmuoju atveju tikslinis baltymas išlieka tirpioje citoplazminėje frakcijoje bei geba įgyti natyvią konformaciją, antruoju - iškrenta į nuosėdas.
3. U32.002 peptidazės su signaline/pro seka struktūrinį termostabilumą didina Zn<sup>2+</sup> jonai.
4. Maksimali tikslinio baltymo su bei be signalinės/pro sekos išeiga pasiekama, *E. coli* BL21 (DE3) kultivuojant LB, indukuojant 0,5 mM IPTG ir auginant 4 val. 37 °C, indukciją atliekant kultūrai pasiekus 0,6 OT<sub>600</sub>.
5. U32.002 peptidazės su signaline/pro seka formuojamas homodimeras geba proteolizuoti natyvų I tipo kolageną, esant 50 °C, pH 7,4 (50 mM TRIS-HCl).



VILNIUS UNIVERSITY  
FACULTY OF NATURAL SCIENCES  
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Andrius Jasilionis

**TRANSCRIPTION ANALYSIS AND CLONING OF U32.002 COLLAGENOLYTIC  
PEPTIDASE FROM *Geobacillus lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup>**

Master thesis

SUMMARY

Collagens are one of the most important proteins including their functions and biotechnological application. The biotechnological application of collagens wouldn't be possible without the process of collagenolysis which is catalysed by collagenolytic peptidases. The aim of this work was to perform transcriptional analysis of U32.002 (*Helicobacter*-type) collagenolytic peptidase gene and its cloning as well as basic analysis.

The analysis of U32.002 peptidase gene transcription was performed after the extraction of total RNA from *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> cells that were in two different stages of growth. Reverse transcription assays were performed after total RNA extraction. After the process of reverse transcription samples of cDNA were used for the diagnostic PGR that was carried out by using five different primers. This gene was cloned with and without putative signal/pro sequence in order to produce the preparation of U32.002 peptidase. Full sequence of U32.002 peptidase gene was cloned into pTZ57R/T and then into the expression vector pET28c(+). U32.002 gene without putative signal/pro sequence was cloned into pJET1.2, and then into pET28c(+). SDS-PAGE and MALDI-TOF analyses were performed in order to determine the fact of expression in *E. coli* BL21 (DE3). Full scale expression optimisation was performed, as well. The influence of calcium and zinc ions to the structural stability of U32.002 peptidase with putative signal/pro sequence was analysed. The collagenolytic activity of U32.002 peptidase was analysed by using zymography of native collagen, type I.

The U32.002 peptidase of *G. lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> is transcribed constitutively during the exponential phase of growth, whereas only fragments of U32.002 gene transcript are observed in the later growth phases.

It is evident that zinc ions increase structural thermostability of U32.002.

The homodimer of U32.002 peptidase with putative signal/pro sequence was able to digest native type I collagen at 50 °C; pH 7,4.

## **PADĖKOS**

---

Norėčiau padėkoti magistrinio darbo vadovei dr. Nomedai Kuisienei už jos nuolatinį rūpestį, kompetentingus patarimus bei pamokymus, kurie neleido pasiklysti gausių mikrobiologijos ir biotechnologijos mokslų žinių tankmėse.

Taip pat norėčiau pareikšti nuoširdžią padėką Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros dėstytojui - prof. dr. (HP) Donaldui J. Čitavičiui už vertingus patarimus.

Be to, dėkoju Lietuvos mokslo tarybai, skyrusiai „Studentų mokslinės praktikos“ stipendiją (2010 02 01 - 2010 05 31 (sutarties nr. SMPS/10P-024/SMT10P-061) ir 2010 06 28 - 2010 08 27 (sutarties nr. SMPS/10-026/SP10-056)).

## **DALYVAVIMAS KONFERENCIJOSE**

---

Darbas pristatytas konferencijoje: „Studentų moksliniai darbai 2008 - 2010 m.“, Vilnius, 2010 05 14 - 15 d. (pranešimas žodžiu). Vykdytų tyrimų metu gauti rezultatai paskelbti konferencijos ataskaitiniame straipsnių rinkinyje:

Jasilionis A., Kuisienė N. Termostabilios *Geobacillus lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup> kolagenolizinės peptidazės U32.002 geno klonavimas. Konferencijos medžiaga: Studentų moksliniai darbai 2008 - 2010 m.; 2010 gegužės 14 - 15 d.; Vilnius, Lietuva. Vilnius: Petro ofsetas; 2010.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

---

1. Adigüzel A. C., Bitlisli B. O., Yasa I., Eriksen N. T. Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic, and keratinolytic proteases in peptide-limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool. *J Appl Microbiol.* 2008; 144: 1-9.
2. Ayad S., Boot-Handford R. P., Humphries M. J., Kadler K. E., Shuttleworth C. A. The extracellular matrix. Factsbook. 2 ed. London-San Diego: Academic Press; 1998: 43-123.
3. Aoki T., Kuroki T., Otake S., Meyer T. F. Molecular cloning of *Porphyromonas gingivalis* collagenase gene. *J Dent Res.* 1993; 72 Suppl.1: S 151.
4. Atlas R. M. Handbook of microbiological media. 3 ed. Boca-Raton-London-New-York-Washington: CRS Press; 2004: 951.
5. Beikler T., Ehmke B., Wittstock M., Schmidt H., Karch H., Flemmig T. F. Serum antibody reactivity against recombinant PrtC of *Porphyromonas gingivalis* following periodontal therapy. *J Periodontal Res.* 2003; 38: 276-81.
6. Birk D. E., Bruckner P. Collagen suprastructures. *Top Curr Chem.* 2005; 247: 185-205.
7. Bode W. A helping hand for collagenases: the haemopexin - like domain. *Structure.* 1995; 3: 527-30.
8. Bode W., Fernandez-Catalan C., Tschesche H., Grams F., Nagase H., Markos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 55: 639-52.
9. Bodinka A., Schmidt H., Henkel B., Flemmig T. F., Klaiber B., Karch H. Polymerase chain reaction for the identification of *Porphyromonas gingivalis* collagenase genes. *Oral Microbiol Immunol.* 1994; 9: 161-5.
10. Bore E., Langsrud S., Langsrud Ø., Rode T. M., Holck A., Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. *Microbiology.* 2007; 153: 2289-303.
11. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
12. Brett D. W. Clostridial collagenase in wound repair. In: Dürre P. ed. Handbook on *Clostridia*. Boca Raton: Taylor and Francis; 2005: 815-76.
13. Brodsky B., Persikov A. V. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem.* 2005; 70: 301-39.
14. Caccamo D., Gugliandolo C., Stackebrandt E. *Bacillus vulcani* sp. nov., a novel thermophilic species isolated from a shallow marine hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Micr.* 2000; 50: 2002-12.

15. Canty E. G., Kadler K. E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci.* 2005; 118: 1341-53.
16. Carlson S. A., McCuddin Z. P., Wu M. T. SlyA regulates the collagenase - mediated cytopathic phenotype in multiresistant *Salmonella*. *Microb Pathogenesis.* 2005; 38: 181-7.
17. Carlson S. A., Meyerholz D. K., Stabel T. J., Jones B. D. Secretion of a putative cytotoxin in multiple antibiotic resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104. *Microb Pathogenesis.* 2001; 31: 201-4.
18. Carson V. Cloning and analysis of putative collagenases of the U32 family in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococci). [Master thesis] Tampa: University of South Florida; 2006: 1-60.
19. Chu M.-L., Prockop D. J. Collagen: gene structure. In: Royce P. M., Steinmann B. eds. Connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic, and medical aspects. New-York: Wiley-Liss. Inc.; 2002: 223-48.
20. Chung L., Dinakarpanian D., Yoshida N., Lauer-Fields J. L., Fields G. B., Visse R., Nagase H. Collagenase unwinds triple - helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *EMBO J.* 2004; 23: 3020-30.
21. Dioszegi M., Cannon P., Wart van H. E. Vertebrate collagenases. *Method Enzymol.* 1995; 248: 413-31.
22. Ducka P., Eckhard U., Schönauer E., Kofler S., Gottschalk G., Brandstetter H., Nüss D. A universal strategy for high - yield production of soluble and functional clostridial collagenase in *E. coli*. *Appl Microbiol Biot.* 2009; 83: 1055-65.
23. Engel J., Bächinger H. P. Structure, stability and folding of the collagen triple helix. *Top Curr Chem.* 2005; 247: 7-33.
24. Feng L., Wang W., Chen J., Ren Y., Zhao G., Gao C., Tang Y., Liu X., Han W., Peng X., Liu R., Wang L. Genome and proteome of long - chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from deep - subsurface oil reservoir. *P Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 5602-7.
25. Fricke W. F., Wright M. S., Lindell A. H., Harkins D. M., Baker-Austin C., Ravel J., Stepanauskas R. Insights into the environmental resistance gene pool from the genome sequence of the multidrug - resistant environmental isolate *Escherichia coli* SMS-3-5. *J Bacteriol.* 2008; 190: 6779-94.
26. Gogly B., Groult N., Hornebeck W., Godeau G., Pellat B. Collagen Zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. *Anal Biochem.* 1998; 255: 211-6.

27. Guo Y., Nguyen K.-A., Potempa J. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontol 2000*. 2010; 54: 15-44.
28. Han H., Taki T., Kondo H., Hiroto I., Aoki T. Pathogenic potential of a collagenase gene from *Aeromonas veronii*. *Can J Microbiol*. 2008; 54: 1-10.
29. Han T. K., Zhang C., Dao M. L. Identification and characterization of collagen binding - activity in *Streptococcus mutans* wall-associated protein: a possible implication in dental root caries and endocarditis. *Biochem Bioph Res Co*. 2006; 343: 787-92.
30. Harrington D. J. Bacterial collagenases and collagen - degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infect Immun*. 1996; 64: 1885-91.
31. Häse C. C., Finkelstein R. A. Bacterial extracellular zinc - containing metalloproteases. *Microbiol Rev*. 1993; 57: 823-37.
32. Houle M. A., Grenier D., Plamondon P., Nakayama K. The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due Arg-gingipain. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 221: 181-5.
33. Hulmes D. J. S. Collagen diversity, synthesis and assembly. In: Fratzl P. ed. Collagen structure and mechanics. New-York: Springer; 2008: 15-41.
34. Ioannides M. Detection, cloning and analysis of a U32 collagenase in *Streptococcus mutans* GS-5. [Master thesis] Tampa: University of South Florida; 2004: 1-57.
35. Itoi Y., Horinaka M., Tsujimoto Y., Matsui H., Watanabe K. Characteristic features in the structure and collagen - binding ability of a thermophilic collagenolytic protease from the thermophile *Geobacillus collagenovorans* MO-1. *J Bacteriol*. 2006; 188: 6572-9.
36. Yudkin D., Clarkson J. Differential gene expression in genetically identical sister cells: the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 2005; 56: 578-89.
37. Kadler K. E., Baldock C., Bella J., Boot-Handford R. P. Collagens at a glance. *J Cell Sci*. 2007; 120: 1955-8.
38. Kadler K. E., Holmes D. F., Trotter J. A., Chapman J. A. Collagen fibril formation. *Biochem. J*. 1996; 316: 1-11.
39. Kato T., Takahashi N., Kuramitsu H. K. Sequence analysis and characterization of the *Porphyromonas gingivalis* *prtC* gene, which expresses a novel collagenase activity. *J Bacteriol*. 1992; 174: 3889-95.
40. Kavermann H., Burns B. P., Angermüller K., Odenbreit S., Fischer W., Melchers K., Haas R. Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J Exp Med*. 2003; 197: 813-22.

41. Kawasaki A., Nakano H., Hosokawa A., Nakatsu T., Kato H., Watanabe K. 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-A. *J Biol Chem.* 2010; 285: 34972-80.
42. Kawase N., Kishi J., Nakamura N., Nayakawa T. Collagenolytic activity in sonic extracts of *Tannerella forsythia*. *Arch Oral Biol.* 2010; 55: 545-9.
43. Kawase T., Miyoshi S., Sultan Z., Shinoda S. Regulation system for protease production in *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 240: 55-9.
44. Kim M., Hamilton S. E., Guddat L. W., Overall C. M. Plant collagenase: unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1770: 1627-35.<sup>a</sup>
45. Kim M., Kang S.-M., Jeon H.-J., Shin S.-H. Production of *Vibrio vulnificus* metalloprotease VvpE begins during the early growth phase: usefulness of gelatin - zymography. *J Microbiol Meth.* 2007; 70: 96-102.<sup>b</sup>
46. Koide T., Nagata K. Collagen biosynthesis. *Top Curr Chem.* 2005; 247: 85-114.
47. Kuisienė N., Raugalas J., Chitavichius D. *Geobacillus lituanicus* sp. nov. *Int J Syst Evol Micr.* 2004; 54: 1991-5.
48. Lee J.-H., Ahn S.-H., Lee E.-M., Jeong S.-H., Kim Y.-O., Lee S.-J., Kong I.-S. The FAXWXXT motif in the carboxyl terminus of *Vibrio mimicus* metalloprotease is involved in binding to collagen. *FEBS Lett.* 2005; 579: 2507-13.
49. Leejeerajumnean A., Ames J. M., Owens J. D. Effect of ammonia on the growth of *Bacillus* species and some other bacteria. *Lett Appl Microbiol.* 2000; 30: 385-9.
50. McCormick R. J. Extracellular modifications to muscle collagen: implications for meat quality. *Poultry Sci.* 1999; 78: 785-91.
51. Miyake R., Shigeri Y., Tatsu Y., Yumoto N., Umekawa M., Tsujimoto Y., Matsui H., Watanabe K. Two thimet oligopeptidase-like Pz peptidases produced by a collagen - degrading thermophile, *Geobacillus collagenovorans* MO-1. *J Bacteriol.* 2005; 187: 4140-8.
52. Muona A. Type XV collagen.- *Acta Universitatis Oulensis. Medica.* 2001; 662:15-55.
53. Murphy G., Reynolds J. J. Extracellular matrix degradation In: Royce P. M., Steinmann B. eds. Connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic, and medical aspects. New-York: Wiley-Liss. Inc.; 2002: 343-84.
54. Nagase H., Woessner J. F. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999; 274: 21491-4.
55. Norris J. M., Love D. N. The association of two recombinant proteinases of a feline strain of *Porphyromonas gingivalis* with periodontal disease in cats. *Vet Microbiol.* 2000; 71: 69-80.

56. Odell L. J., Baumgartner J. C., Xia T., David L. L. Survey for collagenase gene *prtC* in *Porphyromonas gingivalis* and *Porphyromonas endodontalis* isolated from endodontic infections. *J Endodont.* 1999; 25: 555-8.
57. Okamoto M., Yonejima Y., Tsujimoto Y., Suzuki Y., Watanabe K. A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. strain MO-1. *Appl Microbiol Biot.* 2001; 57: 103-8.
58. Ootogoto J., Kuramitsu H. K. Isolation and characterization of the *Porphyromonas gingivalis* *prtT* gene, coding for protease activity. *Infect Immun.* 1993; 61: 117-23.
59. Palosaari H. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their specific tissue inhibitors (TIMPs) in mature human odontoblasts and pulp tissue.- *Acta Universitatis Ouluensis. Medica.* 2003; 739: 26-44.
60. Persikov A. V., Ramshaw J. A. M., Brodsky B. Prediction of collagen stability from amino acid sequence. *J Biol Chem.* 2005; 280: 19343-9.
61. Perumal S., Antipova O., Orgel J. P. R. O. Collagen fibril architecture, domain organization, and triple - helical conformation govern its proteolysis. *P Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 2824-9.
62. Potempa J., Pavloff N., Travis J. *Porphyromonas gingivalis*: a proteinase/gene accounting audit. *Trends Microbiol.* 1995; 3: 430-4.
63. Rawlings N. D., Barrett A. J., Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: 227-33.
64. Ricard-Blum S., Ruggiero F., Rest van der M. The collagen superfamily. *Top Curr Chem.* 2005; 247: 35-84.
65. Rosenberg I. M. Protein analysis and purification. Benchtop techniques. 2 ed. Boston: Birkhäuser; 2004: 63-117.
66. Rouy D., Ernens I., Jeanty C., Wagner D. R. Plasma storage at -80 °C does not protect matrix metalloprotease-9 from degradation. *Anal Biochem.* 2005; 338: 294-8.
67. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor.-New-York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989: 85-89.
68. Shoulders M. D., Raines R. T. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78: 1-30.
69. Slots J., Flynn M. J., Li G. Polymerase chain reaction analysis of the *Porphyromonas gingivalis* collagenase gene.- *Clin Infect Dis.* 1995; 20 Suppl. 2: S 167-8.
70. Stricklin G. P., Hibbs M. S. Biochemistry and physiology of mammalian collagenases. In: Nimni M. E. ed. Collagen. Volume I: Biochemistry. Boca Raton: CRS press. Inc.; 1988: 187-212.



71. Suzuki Y., Tsujimoto Y., Matsui H., Watanabe K. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *J Biosci Bioeng.* 2006; 102: 73-81.
  72. Takahashi N., Kato T., Kuramitsu H. K. Isolation and preliminary characterization of the *Porphyromonas gingivalis prtC* gene expressing collagenase activity. *FEMS Microbiol Lett.* 1991; 84: 135-38.
  73. Tsuruoka N., Nakayama T., Ashida M., Hemmi H., Nakao M., Minakata H., Oyama H., Oda K., Nishino T. Collagenolytic serine - carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: purification, characterization, gene cloning, and heterologous expression. *Appl Environ Microb.* 2003; 69: 162-9.
  74. Wart van H. E. Clostridial collagenases. In: Barrett A. J., Rawlings N. D., Woessner J. F. eds. Handbook of proteolytic enzymes 2 ed. London: Elsevier; 2004: 416-9.
  75. Watanabe K. Collagenolytic proteases from bacteria. *Appl Microbiol Biot.* 2004; 63: 520-6.
  76. Williams D. H., Murray E. J., Specific amino acid substitution in human collagenase cause decreased autoproteolysis and reveal a requirement for a second zinc atom for catalytic activity. *FEBS Lett.* 1994; 354: 267-70.
  77. Wittstock M., Schmidt H., Flemmig T. F., Karch H. Heterogeneity of the *prtC* gene of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15: 33-9.
  78. Woessner J. F. The matrix metalloproteinases family. In: Parks W. C., Mecham R. P. eds. Matrix metalloproteinases. London: Academic Press; 1998: 1-13.
  79. Wu Y., Chen L., Yan J., Zhuang C., Gu Z. Effect of *Porphyromonas gingivalis* PrtC on cytokine expression in ECV 304 endothelial cells and its level in subgingival plaques from patients with chronic periodontitis. *Acta Pharmacol Sin.* 2007; 28: 1015-23.
  80. Wu M. T., Carlson S. A., Meyerholz D. K. 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 Thyphimurium phagetype DT104. *Microb Pathogenesis.* 2002; 33: 279-87.
  81. Zhao H., Li X., Johnson D. E., Mobley H. L. T. Identification of protease and *rpoN*-associated genes of uropathogenic *Proteus mirabilis* by negative selection in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Microbiology.* 1999; 145: 185-95.
  82. Zhao Y. Virulence factors of *Salmonella enterica* seroval Enteritidis. [Dissertation] Utrecht: Universiteit Utrecht; 2002: 47-58.
  83. Zor T., Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem.* 1996; 236: 302-8.
-