

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Irina Tanuwidjaja

**ANALIZA PROMOTORSKE REGIJE EKSPRESIJSKOG VEKTORA ZA
BIOSINTEZU LIPAZE U BAKTERIJI *Streptomyces coelicolor***

Zagreb, 2012

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković, pod voditeljstvom dr.sc. Dušice Vujaklije, više znanstvene suradnice i naslovne izvanredne profesorice te neposrednim voditeljstvom dr. sc. Ane Bielen, više asistentice i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2012.

POPIS KRATICA

APS	amonijev persulfat
cDNA	komplementarna DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
CRM	bogati medij za regeneraciju (engl. <i>complete regeneration medium</i>)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
mRNA	glasnička RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
MCS	višestruko mjesto za kloniranje (engl. <i>multiple cloning site</i>)
MQ	Milli-Q
MS	manitol soja
Ni-Nta	nosač s imobiliziranim ionima nikla
pb	parovi baza
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	polietilen glikol
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
SDS	natrijev dodecil sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	denaturirajuća elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu (engl. <i>SDS-polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
TAE	Tris-acetat EDTA
TEMED	tetrametiletilen diamin
TES	N-Tris(hidroksimetil)metil-2-aminoetan sulfonska kiselina
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
TSB	triptikaza soja bujon (engl. <i>tryptic soy broth</i>)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Općenito o bakterijama roda <i>Streptomyces</i>	1
1.2. GDS(L) porodica lipolitičkih enzima.....	3
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA	5
3. MATERIJALI I METODE	6
3.1. Materijali.....	6
3.1.1. Osnovne kemikalije.....	6
3.1.2. Kompleti.....	6
3.1.3. Enzimi.....	7
3.1.4. Antibiotici.....	7
3.1.5. Biljezi i boje.....	7
3.1.6. Puferske otopine.....	8
3.1.7. Oligonukleotidne početnice.....	9
3.1.8. Bakterijski sojevi.....	9
3.1.9. Plazmidi.....	10
3.1.10. Hranjive podloge.....	11
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Utvrđivanje ekspresije gena <i>sc2l</i> u bakteriji <i>Streptomyces coelicolor</i>	13
3.2.1.1. Reverzna transkripcija.....	13
3.2.1.2. Lančana reakcija polimerazom (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> – PCR) s cDNA kao kalupom.....	13
3.2.2. Priprema konstrukta pANT849peSc2L.....	14
3.2.2.1. Enzimatska razgradnja DNA.....	14
3.2.2.2. Pročišćavanje molekula DNA iz agaroznog gela.....	15
3.2.2.3. Ligacija fragmenata molekula DNA.....	15
3.2.2.4. Transformacija protoplasta streptomiceta.....	15
3.2.2.5. PCR na kolonijama streptomiceta („colony PCR“).....	15
3.2.2.6. Pročišćavanje plazmidne DNA.....	16
3.2.3. Uzgoj transformanata <i>Streptomyces coelicolor</i> na krutoj hranjivoj podlozi MS.....	17
3.2.4. Praćenje rasta odabranih transformanata <i>Streptomyces coelicolor</i> na krutim TSB podlogama različite pH vrijednosti.....	17
3.2.5. Određivanje lipolitičke aktivnosti transformanata <i>Streptomyces coelicolor</i> na krutim hranjivim podlogama.....	17
3.2.6. Dobivanje lipaze Sc2L iz bakterije <i>Streptomyces coelicolor</i>	18
3.2.6.1. Biosinteza lipaze Sc2L u bakteriji <i>Streptomyces coelicolor</i>	18
3.2.6.2. Pročišćavanje lipaze Sc2L.....	18
3.2.6.3. Elektroforetska analiza proteina.....	19
3.2.7. Sekvenciranje i analiza dobivenih sekvenci.....	20
3.2.7.1. Umnožavanje promotorske regije vektora pANT849 i pANT849pe.....	20
3.2.7.2. Priprema konstrukata pANT849pGEM i pANT849pepGEM.....	21
3.2.7.3. Sekvenciranje promotorske regije pANT849pGEM i pANT849pepGEM.....	22
3.2.7.4. Analiza nukleotidnih nizova promotorske regije pANT849pGEM i pANT849pepGEM.....	23
4. REZULTATI	24
4.1. Ekspresija gena <i>sc2l</i> u bakteriji <i>Streptomyces coelicolor</i>	24
4.2. Kloniranje gena <i>sc2l</i>	25

4.3.	Rast odabranih transformanata bakterije <i>Streptomyces coelicolor</i> na krutim TSB podlogama različite pH vrijednosti	27
4.4.	Ispitivanje lipolitičke aktivnosti bakterije <i>Streptomyces coelicolor</i> na krutim hranjivim podlogama	28
4.5.	Pročišćavanje lipaze Sc2L	29
4.6.	Analiza promotorske regije pANT849 i pANT849pe	30
4.6.1.	Umnožavanje promotorske regije vektora pANT849pe i pANT849 lančanom reakcijom polimeraze	31
4.6.2.	Sekvenciranje promotorske regije vektora pANT849 i pANT849pe	32
5.	RASPRAVA	35
6.	ZAKLJUČCI	38
7.	ZAHVALE	39
8.	POPIS LITERATURE	40
9.	SAŽETAK	43
10.	SUMMARY	44

1. UVOD

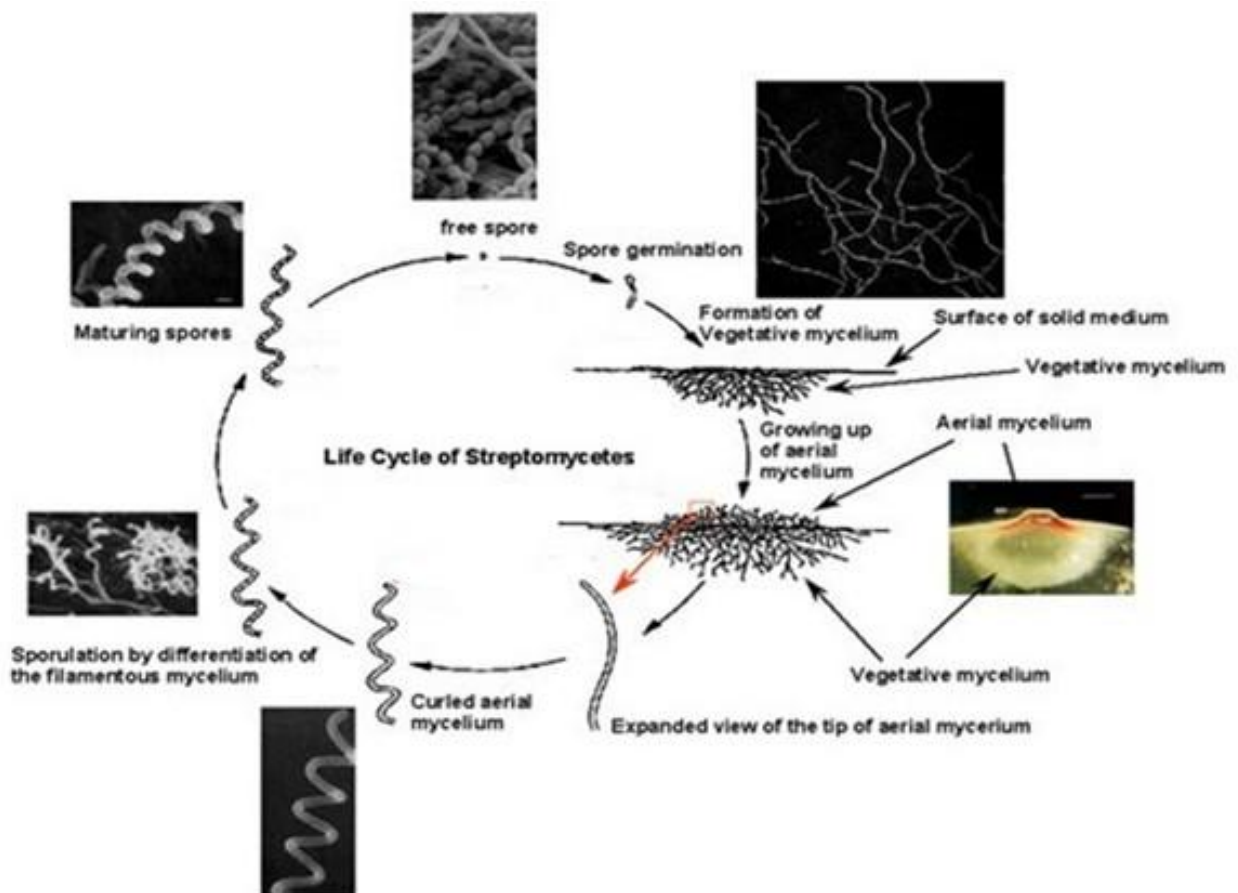
1.1. Općenito o bakterijama roda *Streptomyces*

Do danas je poznato više stotina vrsta Gram-pozitivnih bakterija koje spadaju u rod *Streptomyces* unutar porodice *Streptomycetaceae*. Navedena porodica s brojnim drugim porodicama čini morfološki i biološki vrlo heterogeni razred *Actinobacteria*. Iako spadaju u prokariotske organizme, po mnogo čemu nalikuju na eukariote – posjeduju jedan od najvećih bakterijskih genoma i linearni kromosom, rastu u obliku višestaničnog, diferenciranog, razgranatog i filamentoznog micelija te prolaze kroz složeni životni ciklus.

Genom streptomiceta čine linearni kromosom s visokim GC sadržajem (70 do 72%) te kružni i linearni plazmidi (Schrenpf, 2008). Najviše je proučavana bakterija *Streptomyces coelicolor* A3(2) koji posjeduje jedan linearni kromosom veličine 8,66 Mpb, s centralno smještenim ishodištem za replikaciju (*oriC*) i terminalnim obrnuto ponavljanim sekvencama (TIR, engl. *terminal inverted repeats*), stabiliziranim kovalentno vezanim proteinima na slobodnim 5' krajevima. Za streptomicete je karakteristično da oko pola kromosoma čini konzervirani središnji dio gdje je smještena većina esencijalnih gena, poput gena koji sudjeluju u staničnoj diobi, replikaciji DNA, transkripciji, translaciji, biosintezi proteina i dr., dok su krajevi manje konzervirani i podložni opsežnim delecijama i amplifikacijama koje ne utječu na vijabilnost streptomiceta. Na krajevima kromosoma, najčešće su smješteni neesencijalni geni koji sudjeluju u sintezi sekundarnih metabolita i hidrolitičkih enzima. Nakon sekvenciranja genoma bakterije *S. coelicolor* na genomu je pronađeno 7825 potencijalnih gena. Od toga 12,3% gena uključeno je u regulaciju i stanični odgovor na različite stresore, 7,8% u transport šećera, aminokiselina, peptida, metala i drugih iona, te 10,5% potencijalnih gena kodira hidrolitičke enzime poput proteaza, peptidaza, hitinaza, celulaza, endoglukanaza, amilaza i drugih (Bentley i sur., 2002).

Tijekom životnog ciklusa streptomiceti prolaze kroz nekoliko razvojnih stadija. U nepovoljnim uvjetima bakterije roda *Streptomyces* formiraju metabolički neaktivne spore koje obično sadrže jednu kopiju kromosoma. Ovijene su posebnom vanjskom ovojnicom koja im omogućava preživljavanje u ekstremnim okolišnim uvjetima. Kada dospiju u povoljne uvjete (npr. prisutnost hranjivih tvari) spore počinju klijati i nastaju nepokretne, razgranate, neseptirane hife koje sadrže brojne, jednoliko raspoređene kopije kromosoma. Na čvrstom mediju urastaju u podlogu i tvore vegetativni (supstratni) micelij, dok u tekućem mediju agregiraju u pelete. Po iscrpljivanju hranjivih tvari započinje rast zračnog micelija.

Istovremeno, s rastom zračnog micelija streptomiceti prelaze s primarnog na sekundarni metabolizam i započinju sintezu sekundarnih metabolita (npr. pigmenti, antibiotici i hlapljivi spojevi) i hidrolitičkih enzima. Također, dolazi do litičke razgradnje vegetativnog micelija, a produkti razgradnje koriste se za izgradnju zračnog micelija (Chater, 2006). S vremenom, dolazi do pregradnje odnosno stvaranja septi u vršnim dijelovima zračnih hifa i formiranja spora s jednom kopijom kromosoma. Spore sadrže skladišne tvari poput glikogena i trehaloze koje služe kao hranjive tvari u ranoj fazi sporulacije (Schrempf, 2008). Životni ciklus streptomiceta prikazan je na Slici 1-1.



Slika 1-1 Životni ciklus streptomiceta (preuzeto s home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/strepto-E.html)

Iako su streptomiceti široko rasprostranjeni u prirodi, najviše ih nalazimo u tlu i sedimentima gdje primarno žive kao saprofiti. Na brojnost i vrste streptomiceta u tlu utječu sadržaj organske tvari i fizikalne karakteristike tla. Većina streptomiceta raste pri neutralnim

do blago alkalnim pH vrijednostima. Smatra se da optimalno rastu u pH rasponu od 6,5 do 8,0 (Locci, 1989). Kako je tlo vrlo složen i promjenjiv ekosustav, streptomiceti su razvili brojne adaptivne mehanizme u koje spadaju sposobnost formiranja spora, razgranati sustav hifa koji prožima tlo, te sinteza brojnih sekundarnih metabolita poput antibiotika, po kojima su najpoznatiji. Sekundarni metaboliti nisu nužni za preživljavanje i obično se sintetiziraju pri ulasku u stadij mirovanja ili razmnožavanja i uvjetima stresa (Demain i Fang, 2000). Uz njih streptomiceti proizvode brojne izvanstanične hidrolitičke enzime koji im omogućavaju korištenje različitih supstrata i transportne proteine za apsorpciju brojnih tvari. Budući da proizvode enzime kao što su celulaze, lignocelulaze, hitinaze, proteaze, pomoću kojih razgrađuju brojne makromolekule prisutne u prirodi, streptomiceti su ključni mikroorganizmi u kruženju ugljika, odnosno formiranju humusa u tlu (Schrempf, 2008). Iz analiza genoma vidi se da bi streptomiceti mogli biti značajan izvor lipolitičkih enzima, a time i GDS(L) hidrolaza.

1.2. GDS(L) porodica lipolitičkih enzima

Na temelju analize aminokiselinskih sekvenci i nekih osnovnih bioloških svojstava, bakterijski lipolitički enzimi mogu se svrstati u osam porodica (I – VIII) gdje porodica II obuhvaća GDS(L) enzime (Arpigny i Jaeger, 1999). Navedena porodica dobila je ime prema motivu Gly-Asp-Ser-(Leu). U nju spadaju serinske hidrolaze s aktivnim serinskim mjestom smještenim bliže N-treminalnom kraju polipeptidnog lanca u odnosu na ostale lipolitičke enzime (Bielen, 2011). Akoh i suradnici (2004) pokazali su da aktivno serinsko mjesto GDS(L) hidrolaza mijenja konformaciju prilikom vezanja supstrata, što omogućava vezanje različitih supstrata. Većina GDS(L) hidrolaza su lipaze i esteraze. Lipaze kataliziraju hidrolizu triacilglicerola s C-lancima dužim od 10 atoma ugljika. Supstrati na koje djeluju netopivi su u vodi. Esteraze hidroliziraju supstrate koji imaju C-lance kraće od 10 C-atoma i topivi su u vodi (Bielen, 2011).

Do danas su izvršena istraživanja na svega nekoliko lipaza iz streptomiceta, iako su analize sekvencioniranih streptomicetnih genoma pokazale da ove bakterije imaju veliki potencijal za sintezu lipolitičkih enzima. Genetički i biokemijski najbolje je karakterizirana lipaza SrL iz bakterije *Streptomyces rimosus* (Q93MW7) (Bielen, 2011). Lipaza SrL izolirana iz supernatanta kulture *S. rimosus* R6-554W monomerni je bazični protein koji pokazuje najveći afinitet prema srednje dugim masnim kiselinama s 8 do 12 C-atoma u lancu. S

obzirom da hidrolizira triacilglicerol triolein svrstava se u prave lipaze. Relativno je termostabilna i pokazuje najveću aktivnost pri temperaturama od 50°C do 60°C. Stabilna je pri širokom rasponu pH vrijednosti (pH 4,0 – 10,0), a najveću aktivnost pokazuje u rasponu pH 9,0 – 10,0. Stabilna je u organskim otapalima, neovisna o kofaktorima i djeluje na brojne supstrate (Abramić i sur., 1999).

Analizom genoma bakterije *S. coelicolor* A3(2) otkrivena su još dva gena za hipotetske proteine koji pokazuju 66%, odnosno 33% homolognost s genom *srL* bakterije *S. rimosus* te se smatra da posjeduje hidrolitičku aktivnost (Vujaklija i sur., 2002).

Jedan od gore navedenih hipotetskih proteina je lipaza Sc1L (SCO1725). Izolirana je iz supstrate kulture *S. coelicolor* A3(2). Posjeduje (aril)esteraznu i pravu lipolitičku aktivnost. Za razliku od prethodno opisane lipaze SrL najveći afinitet pokazuje prema *p*-nitrofenil- i naftil esterima masnih kiselina s 12 do 16 C-atoma u lancu. Također, pokazuje aktivnost prema različitim prirodnim uljima, osobito uljima s višim sadržajem linoleinske (C18:2 *cis*) i oleinske (C18:1 *cis*) kiselina. Po fizikalnim svojstvima slična je lipazi SrL, odnosno relativno je termostabilna i optimalnu aktivnost pokazuje pri 55°C, te je stabilna pri širokom rasponu pH 4,0 do 9,5, s maksimalnom aktivnošću pri pH 8,0. Neosjetljiva je na većinu serinskih inhibitora s iznimkom 3,4-dikloroizokumarina (Bielen i sur., 2009).

Drugi hipotetski protein je lipaza Sc2L (SCO7513) i također ima estersku i pravu lipolitičku aktivnost. Najveći afinitet pokazuje prema srednje dugim masnim kiselinama s 10 do 12 C-atoma u lancu, te prema dugolančanim masnim kiselinama s 16 do 18 C-atoma u lancu. Najveću aktivnost pokazuje pri temperaturama od 45°C do 55°C i pri pH vrijednostima između 8,5 i 9,0. Pri pH nižim od 8,0 aktivnost se vrlo brzo gubi. Također, vrlo brzo gubi stabilnost pri pH vrijednostima višim od 6,5 (Côté i Shareck, 2008).

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U Laboratoriju za molekularnu genetiku Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu intenzivno su se proučavale dvije lipaze (Sc1L i Sc2L) iz bakterije *S. coelicolor*. Tehnikama genetičkog inženjerstva, oba gena su klonirana u ekspresijske vektore za heterolognu ekspresiju u bakteriji *E. coli* i homolognu ekspresiju u *S. coelicolor*. Dok je heterologna ekspresija lipaze Sc1L omogućila dovoljnu sintezu i biokemijsku karakterizaciju, dosad proučavani sustavi za heterolognu i homolognu ekspresiju lipaze Sc2L davali su male količine željenog enzima (Marić, 2009). Tijekom ovog istraživanja nastojalo se razviti sustave za homolognu ekspresiju lipaze Sc2L putem kojih bi se dobivale veće količine enzima nego u prirodnom sustavu.

Specifični ciljevi istraživanja:

1. Provesti analizu ekspresije gena *sc2l* tijekom različitih faza rasta bakterije *S. coelicolor*
2. Klonirati gen *sc2l* u ekspresijske vektore pANT849 i pANT849pe
3. Utvrditi utjecaj vektora pANT849 i pANT849pe na prekomjernu homolognu biosintezu enzima Sc2L u bakteriji *S. coelicolor*
4. Analizirati promotorske regije vektora pANT849 i pANT849pe

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Osnovne kemikalije

- agar (Difco Laboratories)
- agarozna (Sigma Aldrich)
- amonij acetat (Kemika)
- etanol (Kemika)
- fenol kloroform (Sigma Aldrich)
- glicerol (Kemika)
- glukoza (Kemika)
- 2-propanol (Kemika)
- kalij acetat (Kemika)
- kalijev klorid (Kemika)
- kloridna kiselina (Kemika)
- magnezijev heksahidrat (Kemika)
- magnezijev sulfat heptahidrat (Kemika)
- natrijev hidroksid (Kemika)
- natrijev klorid (Kemika)

3.1.2. Kompleti

- za reverznu transkripciju korišten je komplet „High Capacity Reverse Transcription Kit Protocols“ (Applied Biosystems)
- za izolaciju plazmida korišten je komplet „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (Qiagen)
- za izolaciju DNA molekula iz agaroznog gela korišten je komplet „Mega-spin™ Agarose Gel Extraction Kit“ (iNtron Biotechnology)

3.1.3. Enzimi

- Multi Scribe™ Reverse Transcriptase s pripadajućim puferom (Applied Biosystems)
- LA Taq DNA polimeraza s pripadajućim puferom (TAKARA BIO INC.)
- ReadyMix™ Taq (Sigma)
- T4 DNA ligaza s pripadajućim puferom (Promega)
- restrikcijske endonukleaze s pripadajućim puferima: *EcoRI*, *HindIII* (Fast Digest, Fermentas)

3.1.4. Antibiotici

- ampicilin (Sigma) (koncentracija matične otopine 100 mg/ml)
- tiostrepton (Sigma) (koncentracija matične otopine 50 mg/ml)

3.1.5. Biljezi i boje

Biljezi:

- MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready to use (Fermentas)
- Precision Plus Protein™ Unstained Standards (BioRad)

Boje:

- etidij bromid (koncentracija matične otopine 10 mg/ml)
- boja za nanošenje uzoraka na agarozne gelove (0,25% bromfenol plavog, 0,25% ksilencijanola FF i 30 % glicerola u vodi)
- boja za proteine, 4 puta koncentrirana (8% SDS, 400 mM DTT, 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 40 % glicerol, 0,4 % bromfenol plavo)
- Coomassie briljant plavo (Sigma)

3.1.6. Puferske otopine

- Bradfordov reagens (Brozović, 2007)
- pufer 0 (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0)
- pufer 250 (pufer 0 + 250 mM imidazol)
- pufer za SDS-PAGE (10 puta koncentriran: 30,3 g/l *Trizma base* (Sigma), 144 g/l glicin, 10g/l SDS)
- pufer za odbojavanje poliakrilamidnih gelova (10 % ledena octena kiselina, 10% 2-propanol)
- T pufer + PEG (Vujaklija et Bielen, 2007)
- TAE (50 puta koncentriran: 242 g/l *Trizma base* (Sigma), 5,71% ledene octene kiseline, 10% 0,5 M EDTA)
- TE pufer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM natrij EDTA pH 8,0)
- TES pufer (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM natrij EDTA pH 8,0, 0,3 M saharoza)

3.1.7. Oligonukleotidne početnice

Oligonukleotidne početnice korištene u izradi ovog rada navedene su u Tablici 3-1.

Tablica 3-1 Oligonukleotidne početnice i njihova namjena.

Početnica	Nukleotidni slijed 5'-3'	Namjena
FANT	CGGTTGCCATCATCACAACGGCCG	Potvrđivanje prisutnosti inserta u vektorima pANT849 i pANT849pe
RANT	CGTCGGAGCCGCTGTTCCAGGGC	Potvrđivanje prisutnosti inserta u vektorima pANT849 i pANT849pe
Sc2-F-inseq	CCTGGTCACGCTCACCATCGGC	Reakcija PCR na cDNA izoliranoj iz streptomiceta
Hind-Sc2-2N	CCCCAAGCTTTCAGTCCAGGCCGAGGACGT	Reakcija PCR na cDNA izoliranoj iz streptomiceta
Sc2-R-inseq	AGCAGCGCCTCCTTGAGCGCGG	Potvrđivanje prisutnosti inserta u vektorima pANT849 i pANT849pe
superF	GCTGCGTGCTCAACGAGG	Određivanje primarne strukture promotorske regije u vektorima pANT849 i pANT849pe
superR	CCAGGGTCGGAGTGGCC	Određivanje primarne strukture promotorske regije u vektorima pANT849 i pANT849pe
T7f	TAATACGACTCACTATAGGG	Potvrđivanje prisutnosti inserta u vektorima pANT849 i pANT849pe

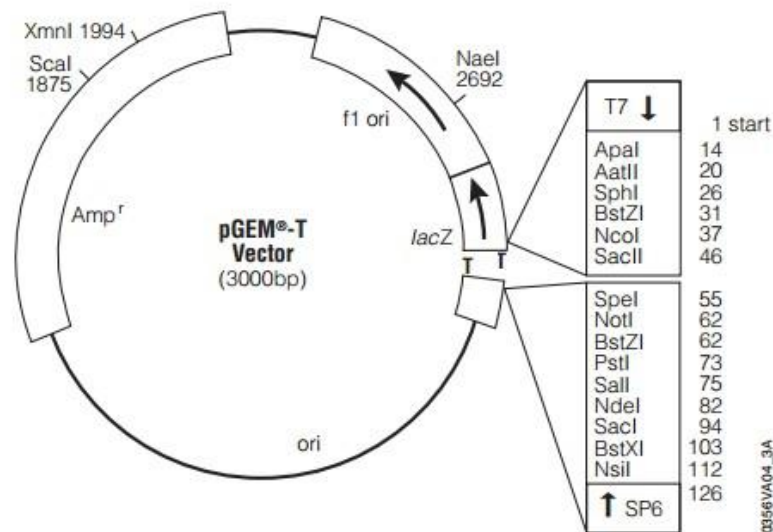
3.1.8. Bakterijski sojevi

- *E.coli* XL1-Blue^f genotipa: *supE44 hsdR17 recA1 end A1 gyrA46 thi relA1 lac F'* [*proAB*⁺ *lacI*^q *lacZΔM15 Tn10(tet^r)*]
- *Streptomyces coelicolor* A3(2)

3.1.9. Plazmidi

Plazmidi korišteni u ovom radu bili su:

1. pGEMSc2L (Marić, 2009) je vektor pGEM-T koji unutar višestrukog mjesta za kloniranje sadrži gen *sc2l* sa šest kodona za histidine na 3' kraju. U ovom radu, pGEMSc2L je korišten za dobivanje inserta u konstrukt pANT849peSc2L.
2. pANT849pe (LMG, neobjavljeni rezultati) je vektor veličine 5343 pb kod kojeg je primijećena pojačana ekspresija različitih kloniranih proteina. U ovom radu, pANT849pe je korišten za dobivanje konstrukata pANT849peSc2L i pANT849pepGEM.
3. pANT849peSc2L (vidi Sliku 4-3) je konstrukt veličine 6251 pb konstruiran tijekom ovog istraživanja kako bi se utvrdilo utječu li vektori pANT849 i pANT849pe na prekomjernu homolognu ekspresiju lipaze Sc2L.
4. pANT849Sc2L (6251 pb, Marić, 2009) je vektor pANT849 koji unutar višestrukog mjesta za kloniranje sadrži gen *sc2l* sa šest kodona za histidine na 3' kraju. U ovom radu, pANTSc2L je korišten za usporedbu količine biosintetizirane lipaze Sc2L u odnosu na vektor pANT849peSc2L.
5. Plazmid pGEM-T (Slika 3-1, Promega) je velik 3000 pb. Sadrži gen za rezistenciju na ampicilin (*Amp^r*) i gen za enzim β -galaktozidazu (*lacZ*). Višestruko mjesto za kloniranje (engl. *multiple cloning site*, MCS) smješteno je između promotora za T7 RNA polimerazu i SP6 RNA polimerazu. Uz vlastito izvorište replikacije, sadrži i izvorište replikacije bakteriofaga f1 što mu omogućuje sintezu jednolančane DNA. U ovom radu, pGEM-T je korišten za pripremu konstrukata pANT849pGEM i pANT849pepGEM.



Slika 3-1 Mapa plazmida pGEM[®] - T (Promega) (preuzeto iz pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems – Technical Manual, Promega).

6. pANT849 je vektor veličine 5343 pb. Sadrži *snp* lokus porijeklom iz bakterije *Streptomyces* sp. soj C5, gdje je gen *snpA* zamijenjen višestrukim mjestom kloniranja (*SphI* – *MluI*), te gen za rezistenciju na tiostrepton (*Thio^r*) (DeSanti i Strohl, 2003). U ovom radu, vektor pANT849 korišten je za pripremu konstrukta pANT849pGEM.
7. pANT849pGEM i pANT849pepGEM (vidi Sliku 4-9a)) su vektori veliki 8343 pb i konstruirani su tijekom ovog istraživanja kako bi se navedeni konstrukti mogli replicirati u bakteriji *E.coli* XL1-Blue^r u dostatnoj količini za sekvenciranje promotorske regije vektora pANT849 i pANT849pe. Navedeni vektori su bifunkcionalni, odnosno posjeduju ishodište replikacije za streptomicete i bakteriju *E. coli* što im omogućava replikaciju u oba organizma.

3.1.10. Hranjive podloge

Tekući ili kruti TSB (triptikaza soja bujon, engl. *tryptic soy broth*) osnovna je podloga za uzgoj streptomiceta koju proizvodi tvrtka Difco Laboratories i priprema se prema uputama proizvođača. Krutoj podlozi dodaje se i 15 g/l agara (*bacto agar*). Za praćenje rasta odabranih transformanata *S. coelicolor* na krutim TSB podlogama različite pH vrijednosti, podlogama se dodaje 6 M NaOH ili koncentrirana kloridna kiselina kao što je opisano u odjeljku 3.2.4., dok se za određivanje lipolitičke aktivnosti transformanata bakterije *S. coelicolor* osnovnoj

hranjivoj podlozi TSB dodaju određeni supstrati kao što je opisano u odjeljku 3.2.5. Za regeneraciju bakterija *S. coelicolor* nakon transformacije korištene su krute R5 ploče (Vujaklija i Bielen, 2007). Tekuća podloga CRM služila je za uzgoj dostatne biomase bakterije *S. coelicolor* za pročišćavanje plazmidne DNA ili preduzgoj za nacjepljivanje u veći volumen hranjivog medija, a tekuća podloga GR₂d za biosintezu lipaze (Bielen i sur., 2009). Kruta MS podloga koristila se za sporulaciju bakterije *S. coelicolor* (Kieser i sur., 2000). Prema potrebi svim navedenim podlogama, s izuzetkom krutih podloga R5, dodaje se tiostrepton radne koncentracije 25 µg/ml.

Tekuća podloga LB (10 g/l tripton (*bacto tryptone*, Difco Laboratories), 5 g/l kvašćev ekstrakt (*bacto yeast extract*, Difco Laboratories), 5 g/l NaCl) korištena je za uzgoj bakterije *E. coli* dostatne biomase za pročišćavanje plazmidne DNA. U podlogu LB koja se koristila za odabir transformiranih bakterija *E. coli* dodaje se i ampicilin radne koncentracije 100 µg/ml. Za regeneraciju bakterije *E. coli* nakon kemijske transformacije koristila se tekuća hranjiva podloga SOC (20 g/l tripton (*bacto tryptone*, Difco Laboratories), 5 g/l kvašćev ekstrakt (*bacto yeast extract*, Difco Laboratories), 10 mM natrijev klorid, 2,5 mM kalijev klorid, 10 mM magnezijev heksahidrat, 10 mM magnezijev sulfat heptahidrat, 20 mM glukoza).

3.2. Metode

3.2.1. Utvrđivanje ekspresije gena *sc2l* u bakteriji *Streptomyces coelicolor*

3.2.1.1. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija omogućava prevođenje mRNA (glasnička RNA, engl. *messenger RNA*, dalje u tekstu koristi se engleski akronim mRNA) u cDNA (komplementarna DNA, engl. *complementary DNA*, dalje u tekstu koristi se engleski akronim cDNA), gdje mRNA služi kao kalup za sintezu cDNA.

Reakcijska smjesa za reverznu transkripciju rađena je na ledu u ukupnom volumenu od 10 µl i sadržavala je 2 µl 10 puta koncentriranog RT pufera, 0,8 µl 25 puta koncentrirane dNTP smjese (100mM), 2 µl 10 puta koncentriranih različitih RT počentica, 1 µl Multi Scribe™ reverzne transkriptaze, 1 µl inhibitora RNaze i 3,2 µl vode. Tako pripremljena reakcijska smjesa dodaje se uzorcima mRNA izolirane iz *S. coelicolor* u različitim fazama životnog ciklusa (pri kraju eksponencionalne faze – mRNA prikupljena 16 sati od početka uzgoja, stacionarna faza – mRNA prikupljena 40 sati od početka uzgoja i kasna stacionarna faza – mRNA prikupljena 88 sati od početka uzgoja), volumena 10 µl, koji su prethodno podvrgnuti početnoj denaturaciji pri 75°C u trajanju od 5 minuta. Reakcijska smjesa za reverznu transkripciju kojoj je dodano 10 µl MQ služila je kao negativna kontrola. Reakcija je provedena u PCR uređaju „Progene“ (Techne) pri uvjetima koji su kreirani prema uputama proizvođača: 1 min / 25°C, 120 min / 37°C, 5 sek / 85°C.

3.2.1.2. Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction* – PCR) s cDNA kao kalupom

cDNA dobivena reverznom transkripcijom, koristi se kao kalup za umnožavanje dijela gena *sc2l*. Za reakciju umnožavanja korištene su početnice Sc2-F-inseq i Hind Sc2-2N (Slika 4-1). Smjese za PCR reakciju konačnog volumena 25 µl rađene su na ledu i sadrže 2 µl kalupa cDNA, 1 µl svake početnice radne koncentracije 0,8 µM, 12,5 µl ReadyMix™ Taq i 8,5 µl MQ. PCR smjesa kojoj je dodano 2 µl genomske DNA bakterije *S. coelicolor* služila je kao pozitivna kontrola, dok je PCR smjesa kojoj je dodano 2 µl negativne kontrole dobivene

reverznom transkripcijom korištena kao negativna kontrola. Reakcija je provedena u PCR uređaju „Progene“ (Techne) pri uvjetima koji su navedeni u Tablici 3-2.

Tablica 3-2 Dijelovi lančane reakcije polimerazom.

Dijelovi PCR reakcije	Temperatura/°C	Trajanje
Počtna denaturacija	95	5 min
35 ciklusa		
Denaturacija lanaca	94	45 sek
Vežanje početnica za kalup	63	30 sek
Sinteza komplementarnih lanaca	72	1 min
Završno produživanje lanaca	72	3 min

3.2.2. Priprema konstrukta pANT849peSc2L

Priprema konstrukata provedena je u nekoliko koraka (enzimatska razgradnja DNA, pročišćavanje molekula DNA iz agaroznog gela, ligacija fragmenata molekula DNA, transformacija bakterijskih stanica i PCR na bakterijskim kolonijama) koji će detaljnije biti opisani u nastavku teksta. Nakon dobivanja željenih transformanata pristupilo se pročišćavanju plazmidne DNA potrebne za daljnje analize.

3.2.2.1. Enzimatska razgradnja DNA

Insert odnosno gen za lipazu Sc2L i vektor pANT849pe izdvojeni su iz konstrukata pripremljenih u prijašnjim istraživanjima Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, pomoću restrikcijskih endonukleaza. Restrikcijske endonukleaze su enzimi koji specifično cijepaju dvolančanu molekulu DNA na određenim palindromskim slijedovima i pritom ostavljaju ljepljive ili tupe 5' ili 3' krajeve. U ovom radu, za enzimatsku razgradnju inserta i vektora, korišteni su enzimi *EcoRI* (5' G↓AATTC 3') i *HindIII* (5' A↓AGCTT 3') koji ostavljaju ljepljive 5' krajeve i pripadajući komercijalni puferi. Restrikcija je provedena u uvjetima koje preporuča proizvođač.

3.2.2.2. Pročišćavanje molekula DNA iz agaroznog gela

Molekule DNA pročišćene su iz agaroznog gela pomoću „Mega – Spin™ Agarose Extraction Kit“ (iNtron Biotechnology) prema uputama proizvođača. Navedeni kit omogućava brzo i učinkovito pročišćavanje fragmenata DNA veličine 100 pb do 20 kb iz standardnih TAE ili TBE agaroznih gelova i agaroznih gelova niske točke taljenja.

3.2.2.3. Ligacija fragmenata molekula DNA

Vrsta enzima DNA ligaze koja se koristi ovisi o tipu krajeva fragmenata molekula DNA koji se žele spojiti. Navedeni enzim katalizira stvaranje fosfodieterske veze između 3' hidroksilne skupine jednog fragmenta i 5' fosfatne skupine drugog fragmenta.

Sve ligacijske smjese pripremljene u ukupnom volumenu od 15 µl, s tri puta većim molarnim udjelom inserta u odnosu na vektor sadrže 50 do 100 ng vektora i 150 do 300 ng inserta, T4 DNA ligazu i pripadajući pufer. Reakcijska smjesa inkubira se preko noći pri 16°C.

3.2.2.4. Transformacija protoplasta streptomiceta

Streptomiceti su transformirani metodom transformacije protoplasta (Vujaklija i Bielen, 2007). Do transformacije 50 µl protoplasta *S. coelicolor* ligacijskom smjesom volumena 7 µl dolazi u prisutnosti 200 µl smjese T pufera i PEG-a. Čitava smjesa nježno se razmaže na dvije krute R5 podloge za regeneraciju protoplasta i inkubira 24 sata pri 30°C. U trenutku kada se na podlogama uoči rast mladog micelija (podloge u Petrijevim zdjelicama postanu mutne), R5 ploče prelijevaju se s 1,5 ml sterilne destilirane vode s tiostreptomom radne koncentracije 25 µg/ml. Ploče se inkubiraju nekoliko dana pri 30°C, dok ne izbiju rekombinantne kolonije.

3.2.2.5. PCR na kolonijama streptomiceta („colony PCR“)

Metodom PCR na kolonijama *S. coelicolor* provjerava se ugradnja gena za lipazu Sc2L u vektor pANT849pe. PCR smjesa sadrži po 1 µl svake početnice konačne koncentracije 0,8 µM, 12,5 µl ReadyMix™ Taq, 1,5 µl DMSO i 9 µl MQ. Za dokazivanje ugradnje gena za lipazu Sc2L u vektor pANT849pe koriste se početnice FANT i Sc2-R-inseq. Malo micelija

izravno se unosi u reakcijsku smjesu i služi kao kalup za umnožavanje specifičnog dijela DNA konstrukta. PCR smjesa bez DNA kalupa korištena je kao negativna kontrola. Reakcija je provedena u PCR uređaju „Progene“ (Techne) pri uvjetima koji su navedeni su u Tablici 3-3.

Tablica 3-3 Dijelovi lančane reakcije polimerazom.

Dijelovi PCR reakcije	Temperatura/°C	Trajanje
Početna denaturacija	95	10 min
30 ciklusa		
Denaturacija lanaca	94	45 sek
Vežanje početnica za kalup	66	30 sek
Sinteza komplementarnih lanaca	72	1 min
Završno produživanje lanaca	72	3 min

3.2.2.6. Pročišćavanje plazmidne DNA

Nekoliko transformanata bakterije *S. coelicolor* s konstruktom pANT849peSc2, naciepljeni su u tekući medij CRM s tiostreptonom kako bi se uzgojila dostatna količina biomase za pročišćavanje plazmidne DNA. 3 ml kulture precjepljeno je u 12 ml tekućeg medija TSB s tiostreptonom i inkubirano dva dana pri 30°C uz mješanje. Plazmidna DNA je iz bakterije *S. coelicolor* pročišćena metodom alkalne lize i taloženjem kalijevim acetatom (Kieser i sur, 2000). Iz 10 alikvota volumena 500 µl centrifugiranjem tijekom 15 minuta na 13000 rpm prikupljena je biomasa. Bakterijske stanice resuspendirane su u 500 µl TES pufera. Potom su dodani lizozim i RNaza A u konačnim koncentracijama 2 mg/ml, odnosno 300 µg/ml i smjesa je inkubirana 30 minuta pri 37°C. Nakon toga je dodano 250 µl otopine NaOH / 2%SDS, smjesa se vorteksira i u otvorenim tubicama vraća na inkubaciju u trajanju od 15 minuta pri 70°C. Nakon što su uzorci ohlađeni na temperaturu nižu od 37°C, dodano im je 80 µl kiselog fenol kloroforma. Nakon 15 minutnog centrifugiranja pri 13000 rpm supernatant je prikupljen u novu tubicu u koju je prethodno dodano 50 µl nepuferiranog 3M kalij acetata. Uzorku je dodano 450 µl izopropanola. Centrifugiranjem 10 minuta na 13000 rpm uklonjena je sva tekućina. Nakon otapanja taloga u 150 µl TE pufera dodano je 150 µl 5M amonij acetata. Ponovnim centrifugiranjem prikupljen je supernatant, kojem je dodano 660 µl 96% etanola. Potom je centrifugiranjem uklonjena sva tekućina. Preostali talog je ispran s 1 ml hladnog 70% etanola, nakon čega se centrifugiranjem tijekom 10 minuta pri

13000 rpm i centrifugiranjem u vakuumu uklonio suvišak tekućine. Pročišćena plazmidna DNA otopljena je u 25 µl pufera za eluaciju iz kompleta „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (Qiagen).

3.2.3. Uzgoj transformanata *Streptomyces coelicolor* na krutoj hranjivoj podlozi MS

Odabrani transformanti bakterije *S. coelicolor* s konstruktom pANT849peSc2 odnosno pANT849Sc2, kao i divlji tip bakterije *S. coelicolor*, uzgojeni su u tekućem mediju TSB sa ili bez tiostreptona tijekom dva dana pri 30°C uz miješanje, kako bi se proizvela dostatna biomasa. Biomasa se dobro ručno homogenizira i razmaže na krutu podlogu MS za sporulaciju streptomiceta. MS ploče potom su inkubirane pri 30°C 10 dana, dok streptomiceti nisu sporulirali.

3.2.4. Praćenje rasta odabranih transformanata *Streptomyces coelicolor* na krutim TSB podlogama različite pH vrijednosti

Pripremljene su TSB podloge sa sljedećim pH vrijednostima: 4,0, 5,5, 7,0, 8,5, 10,0 i 11,5. Navedene pH vrijednosti namještene su dodavanjem 6M NaOH ili koncentrirane kloridne kiseline prije dodavanja agara i autoklaviranja. Nakon autoklaviranja, indikatorskim papirićima ponovno je provjerena pH vrijednost podloge i gdje je potrebno, namještena dodavanjem gore navedenih reagensa. Prije izlivanja u Petrijeve zdjelice podlogama se, prema potrebi dodao tiostrepton u radnoj koncentraciji od 25 µg/ml.

S ploča MS na kojima su uzgojeni i sporulirali streptomiceti, kao što je opisano u odjeljku 3.2.3., prikupljene su spore. Na ploče je nanešeno oko 2 ml 10% sterilnog glicerola. Spore su nježno sastrugane s ploča i resuspendirane u 10 % glicerolu. Na krute TSB podloge različitih pH vrijednosti nacjepljene su razrijeđene spore tako da su na pločama narasle pojedinačne kolonije. Ploče su inkubirane pri 30°C nekoliko dana.

3.2.5. Određivanje lipolitičke aktivnosti transformanata *Streptomyces coelicolor* na krutim hranjivim podlogama

U TSB, osnovnu podlogu za uzgoj streptomiceta, dodani su određeni supstrati, 300 µl žutanjka na 300 ml podloge te maslinovo ulje (Sigma) i trikaprilin (Sigma) u konačnoj

koncentraciji od 1% u podlozi, kako bi se istražilo postoji li prekomjerna ekspresija i aktivnost lipaze Sc2L kod streptomiceta transformiranih konstruktima pANT849peSc2 i pANT849Sc2. Nakon autoklaviranja i hlađenja TSB tekućeg medija, odabrani supstrati emulgirani su u podlozi pomoću ultrazvuka. Pritom je korišten uređaj Ultrasonic Processor, Cole Palmer. Podloga sa supstratima tretirana je ultrazvukom snage ~ 20 W tijekom 2 min putem ultrazvučne sonde promjera 6 mm koja je prethodno spaljena u etanolu i površinski uronjena u podlogu. Prema potrebi, podlogama je dodan tiostrepton u radnoj koncentraciji od 25 µg/ml. Tako pripremljena podloga izlivena je u Petrijeve zdjelice.

Diskovi sa sporama nacijepljeni su na prethodno pripremljene krute podloge TSB s odabranim supstratima. Ploče su inkubirane pri 30°C. Iduća dva dana pratila se pojava bistre zone oko kolonija, što je dokaz lipolitičke aktivnosti.

3.2.6. Dobivanje lipaze Sc2L iz bakterije *Streptomyces coelicolor*

Kako bi se utvrdilo postoje li razlike u količini lipaze Sc2L koju proizvode transformanti koji nose konstrukt pANT849peSc2L odnosno pANT849Sc2L, potvrđeni transformanti 5 dana su uzgajani u tekućem mediju GR₂d. Tijekom uzgoja kulture *S. coelicolor* luče lipazu Sc2L u hranjivu tekuću podlogu.

3.2.6.1. Biosinteza lipaze Sc2L u bakteriji *Streptomyces coelicolor*

Što više biomase precijepljeno je s krute podloge TSB u tekući medij CRM i dobro ručno homogenizirano prije nacijepljivanja u 15 ml tekućeg medija CRM. Kultura je inkubirana tijekom 2 dana pri 30°C uz miješanje. 4 ml kulture *S. coelicolor* koji nosi konstrukt pANT849peSc2L odnosno *S. coelicolor* s konstruktom pANT849Sc2 nacijepljeno je u 400 ml tekućeg medija GR₂d u tikvici volumena od 2l. Kulture se uzgajaju 5 dana pri 30°C i 250 rpm.

3.2.6.2. Pročišćavanje lipaze Sc2L

Svi koraci pročišćavanja lipaze Sc2L, osim afinitetne kromatografije na nosaču s imobiliziranim metalom koja je provedena na sobnoj temperaturi, provedeni su na +4°C. Uzgoj bakterija *S. coelicolor* zaustavljen je peti dan. Izrasli micelij uklonjen je

centrifugiranjem tijekom 25 minuta pri 4000 g. Prikupljenom supernatantu s izvanstaničnim proteinima polako je dodavan amonijev sulfat u prahu, uz stalno miješanje na magnetskoj mješalici sve dok se nije postigla koncentracija od 80% odnosno 516g/l, kako bi se proteini istaložili. Smjesa je ostavljena preko noći na +4°C, bez miješanja. Istaloženi proteini prikupljeni su centrifugiranjem pri 4000 g tijekom 25 minuta i otopljeni u minimalnom volumenu 10 mM Tris-HCl pufera pH 7,5. Prikupljeni proteini stavljeni su u crijevo za dijalizu (MWCO 12000 Da, Sigma) i dijalizirani tijekom 4,5 sata u 10 mM Tris-HCl puferu pH 7,5.

S obzirom da je lipaza Sc2L obilježena nizom od šest histidinskih ostataka moguće ju je pročistiti afinitetnom kromatografijom na nosaču s imobiliziranim ionima nikla (Ni-Nta agaroz, Qiagen). Puferi koji su korišteni u pročišćavanju navedeni su u odjeljku 3.1.6. 500 µl Ni-Nta agaroze nanese se u kolonu koja je potom ekvilibrirana s 10 volumena pufera 0. Prije propuštanja kroz kolonu uzorku je dodano 5 ml pufera 0, te se dva puta propustio kroz kolonu. Kolona je oprana puferom 0 kako bi se uklonili nespecifično vezani proteini. Kako bi se pratila prisutnost proteina u uzorku, tijekom ispiranja po 5 µl uzorka pomiješalo se s 20 µl Bradfordovog reagensa u kapljici. S ispiranjem kolone nastavljalo se sve dok je bila vidljiva promjena crvene boje Bradfordovog reagensa u plavu, što je ukazivalo na prisutnost nespecifično vezanih proteina u uzorku. Lipaza Sc2L obilježena histidinskim ostacima eluirana je puferom 250 koji sadrži imidazol. Između imidazola i imidazolnih prstenova histidinskih ostataka dolazi do kompeticije u vezanju za ione nikla. S obzirom da je koncentracija imidazola u suvišku, imidazol istiskuje lipazu Sc2L s iona nikla. U prikupljenim frakcijama od 1,0 ml provjerena je količina proteina pomoću Bradfordovog reagensa kako je gore opisano.

3.2.6.3. Elektroforetska analiza proteina

Uzorci kojima je dodana Boja za proteine zagrijavani su 5 minuta pri 95°C što dovodi do denaturacije i oblaganja proteina SDS-om. Proteini dobivaju pozitivan naboj, što im omogućava gibanje u električnom polju. Pokretljivost molekule proteina i put koji prođe u električnom polju obrnuto je proporcionalna logaritmu njene mase. Denaturirajuća elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) provedena je na Mini-Protean III aparaturi (BioRad) pri sobnoj temperaturi. Poliakrilamidni gel sastojao se od gela za sabijanje koji sadrži 12% akrilamid:bisakrilamid u omjeru 29:1, 125 mM Tris-HCl pH 8,8,

0,1% SDS, 0,05% APS i 0,1% TEMED, te gela za razdvajanje koji sadrži 12% akrilamid:bisakrilamid u omjeru 29:1, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% APS i 0,1% TEMED. Proteinske vrpce na gelu obojane su bojom Coomassie briljant plavo, dok je suvišak boje s gela uklonjen puferom za odbojavanje.

3.2.7. Sekvenciranje i analiza dobivenih sekvenci

3.2.7.1. Umnožavanje promotorske regije vektora pANT849 i pANT849pe

Kako bi se utvrdilo postoje li razlike u promotorskim regijama osmišljene su specifične početnice, superF i superR prema nukleotidnom slijedu dijela gena *lysR* odnosno dijela gena *sc2l* bakterije *S. coelicolor*. Navedene početnice korištene su za umnožavanje promotorske regije vektora pANT849 i pANT849pe. PCR smjesa sadržavala je 12,5 µl 2 puta koncentriranog EmeraldAmp®PCR master Mix koji sadrži LA *Taq* polimerazu s pripadajućim puferom, po 1 µl navedenih početnica radne koncentracije 0,4 µM, 0,5 µl vektora pANT849 odnosno pANT849pe i 11 µl. Napravljeno je 7 kontrolnih reakcija. Sadržavale su 12,5 µl 2 puta koncentriranog EmeraldAmp®PCR master Mix s LA *Taq* polimerazom i pripadajućim puferom, po 1 µl početnica radne koncentracije 0,4 µM, 0,5 µl vektora pANT849, pANT849pe ili MQ (kombinacija korištenih početnica i DNA kalupa navedena je u Tablici 3-4) i MQ do ukupnog volumena smjese od 25 µl.

Tablica 3-4 Kombinacija početnica i DNA kalupa u kontrolanim reakcijama

Negativna kontrola	DNA kalup	Kombinacija početnica
1	pANT849pe	superF superR
2	pANT849pe	superF
3	pANT849pe	superR
4	pANT849	superF superR
5	pANT849	superF
6	pANT849	superR
7	MQ	superF superR

Reakcije su provedene u PCR uređaju „Progene“ (Techne) pri uvjetima navedenim u Tablici 3-5.

Tablica 3-5 Dijelovi lančane reakcije polimerazom.

Dijelovi PCR reakcije	Temperatura/°C	Trajanje
Početna denaturacija	95	5 min
28 ciklusa		
Denaturacija lanaca	98	10 sek
Vežanje početnica za kalup	60	30 sek
Sinteza komplementarnih lanaca	72	35 sek
Završno produživanje lanaca	72	3 min

3.2.7.2. Priprema konstrukata pANT849pGEM i pANT849pepGEM

S obzirom da postoje problemi s izolacijom kvalitetne i dostatne količine plazmidne DNA iz bakterije *S. coelicolor* za sekvenciranje, pripremljeni su konstrukti pANT849pGEM i pANT849pepGEM. Radi se o bifunkcionalnim vektorima koji posjeduju izvorišta replikacije specifična za bakterije *S. coelicolor* i *E. coli*. Izvorište replikacije za bakteriju *E. coli* omogućava replikaciju navedenih konstrukata u *E. coli* u količinama dostatnim za sekvenciranje.

Osnovni koraci kloniranja pANT849 odnosno pANT849pe isti su kao i kod kloniranja gena *sc2l*. Koraci koji su isti za oba kloniranja opisani su u odjeljcima 3.2.2.1., 3.2.2.2. i 3.2.2.3. U nastavku rada detaljnije će se opisati koraci koji se razlikuju od kloniranja opisanog u odjeljku 3.2.2.

Bakterijske stanice *E. coli* transformirane su kemijskom metodom transformacije. Kemijski kompetentnim stanicama XL1-Blue^f volumena 50 µl dodaje se 5 µl ligacijske smjese (vektor pANT849pGEM odnosno pANT849pepGEM). Dobivena smjesa lagano se promiješa i inkubira na ledu 30 minuta. Smjesa je inkubirana pri 42°C kroz 20 sekundi. Slijedi inkubacija na ledu kroz 2 minute. Nakon transformacije bakterijske stanice su se regenerirale sat vremena u 950 µl prethodno zagrijane tekuće hranjive podloge SOC na 37°C uz miješanje. Bakterijske stanice razmazuju se na selektivne krute podloge LB s ampicilinom radne koncentracije 100 µg/ml.

PCR-om na kolonijama *E. coli* XL1-Blue^f dokazuje se ugradnja pANT849pe i pANT849 u pGEM-T. PCR smjesa sadrži po 1 µl svake početnice konačne koncentracije 0,8 µM, 12,5 µl ReadyMixTM Taq, 1,5 µl DMSO i 9 µl MQ. Za dokazivanje ugradnje pANT849pe odnosno pANT849 u pGEM-T korištene su početnice FANT i T7f. Kao kalup za

umnožavanje DNA koristio se izravno unešen komadić bakterijske kolonije. PCR smjesa bez dodatka komadića kolonije predstavljala je negativnu kontrolu. Reakcija je provedena u PCR uređaju „Progene“ (Techne) pri uvjetima navedenim u Tablici 3-6.

Tablica 3-6 Dijelovi lančane reakcije polimerazom.

Dijelovi PCR reakcije	Temperatura/°C	Trajanje
Početna denaturacija	95	10 min
30 ciklusa		
Denaturacija lanaca	94	45 sek
Vežanje početnica za kalup	53	30 sek
Sinteza komplementarnih lanaca	72	30 sek
Završno produživanje lanaca	72	3 min

Nekoliko transformanata *E. coli* XL1-Blue^r koji nose konstrukt pANT849pepGEM, odnosno pANT849pGEM nacjepljeni su u tekući medij LB s ampicilinom i inkubirani pri 37°C preko noći, uz miješanje. Plazmidne molekule DNA pročišćene su pomoću kompleta „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) prema uputama proizvođača.

3.2.7.3. Sekvenciranje promotorske regije pANT849pGEM i pANT849pepGEM

Za sekvenciranje promotorske regije u pANT849pGEM i pANT849pepGEM pripremljene su četiri smjese volumena 14 µl. Sve smjese sadržavale su 5 µl plazmidne DNA i 8 µl MQ. Međusobno su se razlikovale po dodanim početnicama. Smjesama za sekvenciranje promotorske regije konstrukta pANT849pGEM dodan je 1 µl 3,2 pmol/µl početnice superF, odnosno T7f. Ista vrsta, volumen i koncentracija početnica dodana je i smjesama za sekvenciranje promotorske regije konstrukta pANT849pepGEM.

Sekvenciranje odnosno određivanje primarne strukture promotorske regije konstrukata pANT849pGEM i pANT849pepGEM provedeno je u DNA servisu Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu. Korišten je komplet „ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystem), četverokapilarni „ABI 3100 DNA sekvenator“ (Applied Biosystem). Za analizu nukleotidnog slijeda koristio se računalni program „ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyser“ (Applied Biosystem).

3.2.7.4. Analiza nukleotidnih nizova promotorske regije pANT849pGEM i pANT849pepGEM

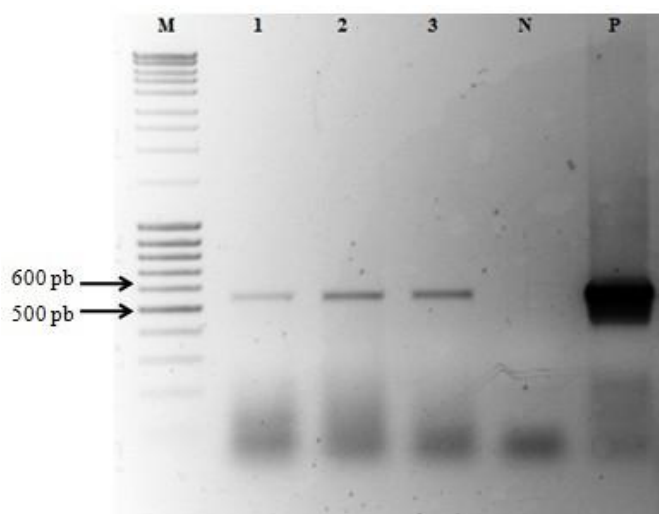
Analiza i sravnjenje nukleotidnih nizova promotorske regije konstrukata pANT849pGEM i pANT849pepGEM provedene su pomoću bioinformatičkih programa BioEdit v.7.0.9.0. i ClustalW koji je dostupan na stranicama European Bioinformatics Institute, EBI, <http://www.ebi.ac.uk/>.

4. REZULTATI

4.1. Ekspresija gena *sc2l* u bakteriji *Streptomyces coelicolor*

Jedna od glavnih karakteristika streptomiceta je njihova sposobnost lučenja brojnih hidrolitičkih enzima. Tijekom ovog istraživanja jedan od zadanih ciljeva bio je istražiti ekspresiju gena *sc2l* u bakteriji *S. coelicolor* tijekom različitih faza rasta.

U ranijim pokusima bakterija *S. coelicolor* uzgajana je na krutoj hranjivoj podlozi CRM kroz 5 dana pri 30°C. Uzorci su uzeti nakon 16 sati (odgovara kraju eksponencijalne faze), 40 sati (odgovara stacionarnoj fazi) i 88 sati (odgovara kasnoj stacionarnoj fazi), te je iz njih pročišćena mRNA (Laboratorij za molekularnu genetiku Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, neobjavljeni rezultati). Kako bi se tijekom ovog istraživanja utvrdilo da li se i u kojim fazama eksprimira gen *sc2l*, načinjena je reverzna transkripcija na uzorcima mRNA. Tako dobivena cDNA korištena je kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom. Za pozitivnu kontrolu kao kalup korištena je genomna DNA *S. coelicolor* A3(2). Rezultat umnožavanja cDNA prikazan je na Slici 4-1.



Slika 4-1 Potvrđivanje ekspresije gena *sc2l* u bakteriji *S. coelicolor*. (M) Molekularni biljeg Mass RulerDNA™ Ladder Mix (Fermentas), (1) PCR produkt dobiven umnožavanjem cDNA koja odgovara mRNA prikupljenoj nakon 16 sati, (2) PCR produkt dobiven umnožavanjem cDNA koja odgovara mRNA prikupljenoj nakon 40 sati, (3) PCR produkt dobiven umnožavanjem cDNA koja odgovara mRNA prikupljenoj nakon 88 sati, (N – negativna kontrola) negativna kontrola reverzne transkripcije, (P – pozitivna kontrola) genomna DNA bakterije *S. coelicolor*. Elektroforeza u 1% agaroznom gelu.

Vidljivo je da se gen *sc2l* eksprimira u prirodnom domaćinu u svim ispitivanim fazama, odnosno u kasnim fazama životnog ciklusa, i to najviše tijekom stacionarne faze.

4.2. Kloniranje gena *sc2l*

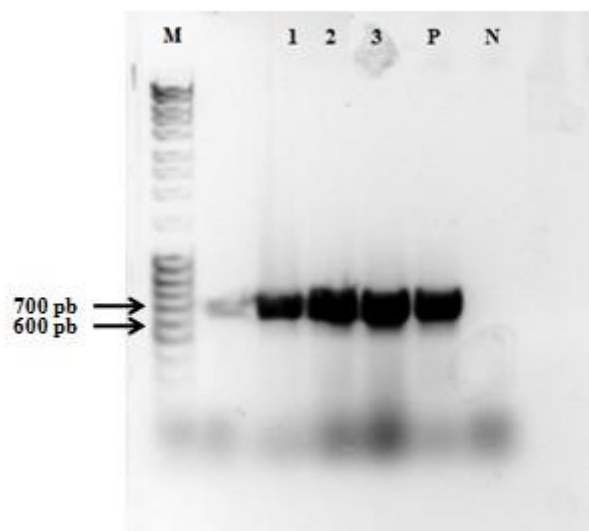
U ranijim pokusima Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu načinjen je konstrukt pANT849Sc2L kod kojeg je uočena vrlo mala ekspresija gena *sc2l* (Marić, 2009). Također, uočen je derivat vektora pANT849 koji je pokazivao povećanu ekspresiju i označen kao pANT849pe (LMG, neobjavljeni rezultati). Stoga je gen *sc2l* kloniran u pANT849pe, te su uspoređeni konstrukti pANT849Sc2L i pANT849peSc2L.

Insert odnosno gen za lipazu Sc2L izdvojen je iz ranije pripremljenog konstrukta pGEMSc2L (Marić, 2009), a vektor pANT849pe iz ranije pripremljenog konstrukta pANT849peSrL (LMG, neobjavljeni rezultati) pomoću restrikcijskih endonukleaza *EcoRI* i *HindIII*. Analizom na 1% agaroznom gelu utvrđeni su fragmenti odgovarajuće veličine: insert velik 921 pb i vektor velik 5330 pb. Željeni produkti izrezani su i pročišćeni iz gela. Gen *sc2l* ligiran je u vektor pANT849pe.

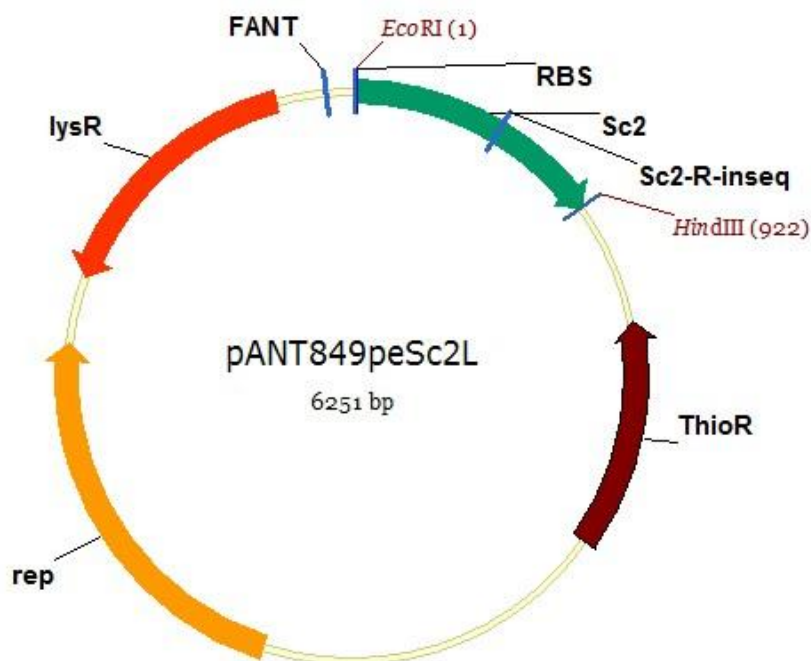
Tako dobivenom ligacijskom smjesom transformirani su protoplasti *S. coelicolor* A3(2). Nakon tri dana inkubacije pri 30°C na krutoj podlozi R5 narasle su kolonije transformanata. Ovisno o starosti, lučile su crveni odnosno plavi pigment u podlogu. PCR reakcijom na kolonijama streptomiceta (opisano u odjeljku 3.2.2.5.) ispitana je ugradnja gena za lipazu Sc2L u vektor pANT849pe. U reakciji su korištene početnice FANT i Sc2-R-inseq pri čemu je dobiven produkt odgovarajuće veličine - 634 pb. Od tri ispitane kolonije, sve su sadržavale željeni insert (Slika 4-2), odnosno konstrukt prikazan na Slici 4-3.

Usporedno, bakterija *S. coelicolor* transformirana je konstruktom pANT849Sc2L.

Nekoliko transformanata koji su sadržavali konstrukt pANT849peSc2L odnosno pANT849Sc2L precijepljeni su na krutu podlogu TSB s tiostreptonom kako bi se uzgojila veća biomasa za daljnje analize, odnosno u tekući medij CRM kako bi se uzgojila dostatna biomasa za pročišćavanje plazmidne DNA.



Slika 4-2 Potvrđivanje prisustva gena *sc2l* u bakterijskim kolonijama lančanom reakcijom polimerazom. (M) Molekularni biljeg MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas), (1,2 i 3) PCR produkti gdje su kao kalup u PCR reakciji korištene kolonije transformanata, (P - pozitivna kontrola) pANT849Sc2L, (N - negativna kontrola) MQ. Elektroforeza u 1% agaroznom gelu.



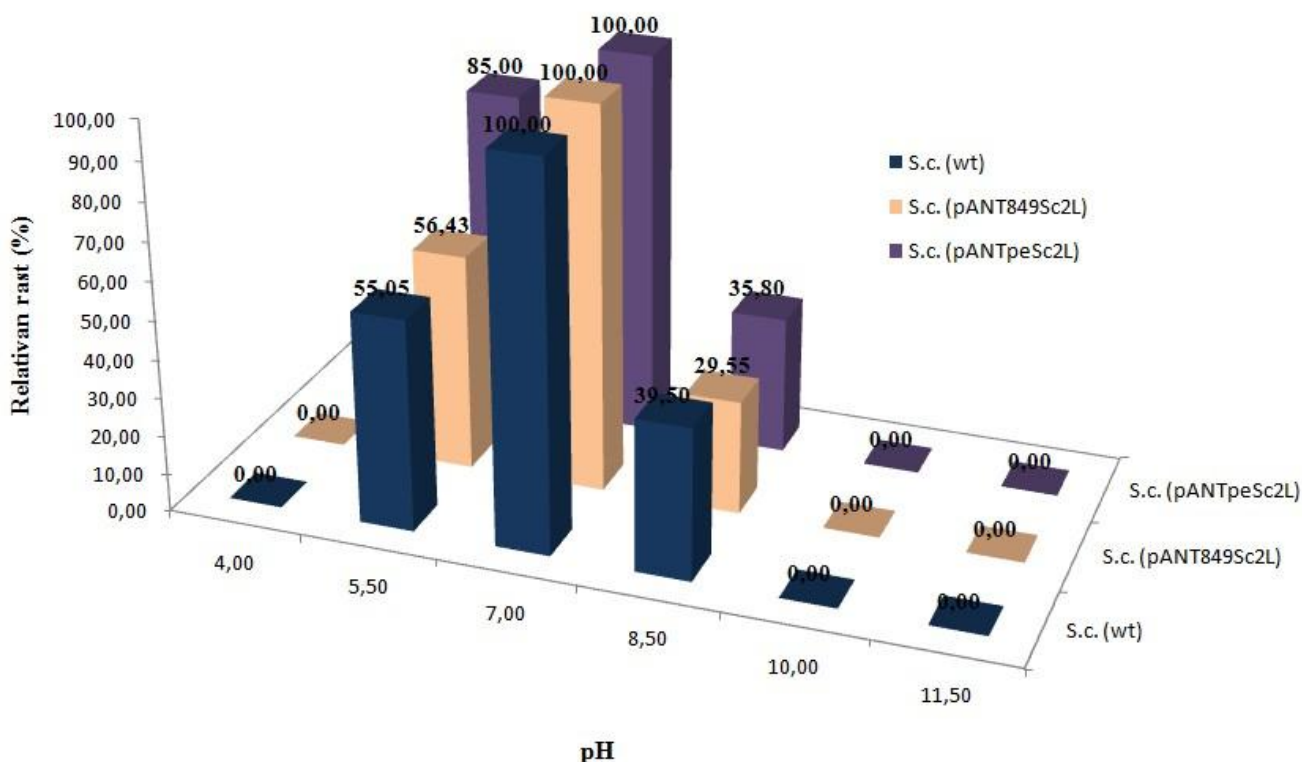
Slika 4-3 Konstrukt pANT849peSc2L.

4.3. Rast odabranih transformanata bakterije *Streptomyces coelicolor* na krutim TSB podlogama različite pH vrijednosti

Prijašnjim istraživanjima pokazano je da je lipaza Sc2L stabilna pri niskim pH vrijednostima (do pH 6,0) iznad koje njezina stabilnost naglo pada (Côté i Shareck, 2008) i da streptomiceti optimalno rastu pri pH 6,5-8,0 (Locci, 1989). Također, u ovom radu je pokazano da se lipaza Sc2L eksprimira tijekom cijele stacionarne faze životnog ciklusa bakterije *S. coelicolor* uzgajane na krutoj podlozi CRM (odjeljak 4.1.). Stoga je istraženo kako bakterija *S. coelicolor* raste pri različitim pH vrijednostima podloge.

Na krute hranjive podloge TSB različite pH vrijednosti uz dodatak antibiotika tiostreptona tamo gdje je to potrebno, naciepljene su spore divljeg tipa bakterije *S. coelicolor* i transformanata bakterije *S. coelicolor* s konstruktima pANT849Sc2L i pANT849peSc2L kao što je opisano u odjeljku 3.2.4.

Pokazano je da i divlji tip bakterije *S. coelicolor* i transformanti bakterije *S. coelicolor* s konstruktima pANT849Sc2L i pANTpeSc2L rastu u rasponu pH vrijednosti koji se kreće od 5,5 do 8,5, dok pri pH vrijednostima 4,0, 10,0 i 11,5 uopće nisu narasli (Slika 4-4).



Slika 4-4 Rast bakterija *S. coelicolor* sa ili bez konstrukta koji sadrže gen za lipazu Sc2L. Broj kolonija na pločama s pH 7,0 uzet je kao 100 %, a ostale vrijednosti su prikazane u odnosu na tu vrijednost.

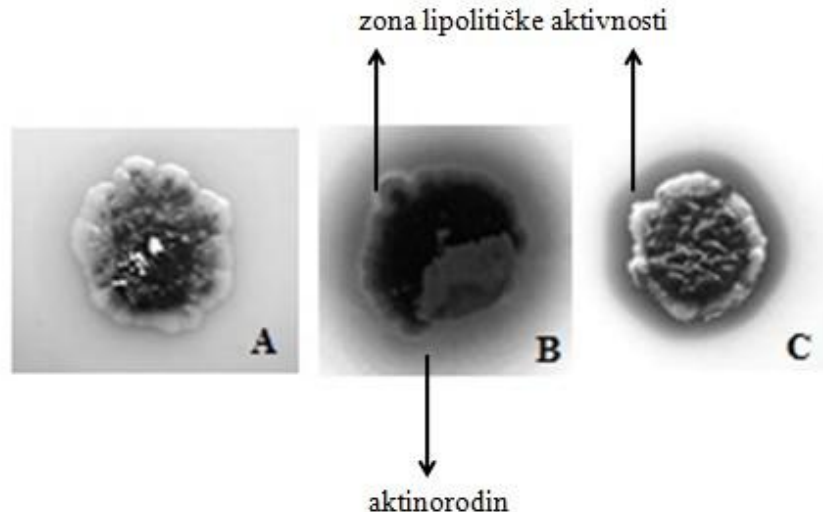
Sve bakterije *S. coelicolor* najbolje su rasle pri pH 7,0, a najlošije pri pH 8,5. Pri pH 5,5 najbolje su rasli transformanti bakterije *S. coelicolor* s konstruktom pANT849peSc2L (85% u odnosu na kontrolu tj. u odnosu na isti transformant uzgajan na krutoj hranjivoj podlozi TSB pH 7,0).

4.4. Ispitivanje lipolitičke aktivnosti bakterije *Streptomyces coelicolor* na krutim hranjivim podlogama

Transformanti bakterije *S. coelicolor* koji nose konstrukt pANT849Sc2L, pANT849peSc2L i divlji tip bakterije *S. coelicolor* precijepljeni su na krute hranjive podloge TSB u koje su dodani odgovarajući supstrati kako je opisano u odjeljku 3.2.5. Lipolitička aktivnost detektira se u obliku pojave bistrih zona oko kolonija.

U preliminarnim pokusima isprobane su hranjive podloge s tri različita supstrata, maslinovim uljem, žutanjkom i trikaprilinom. Kao optimalan supstrat izabran je trikaprilin zato što na maslinovom ulju nijedna bakterija *S. coelicolor* nije pokazala lipolitičku aktivnost, dok su na žutanjku velike, bistre, lipolitičke zone nastale i oko divljeg tipa bakterije *S. coelicolor*, što ukazuje na nespecifičnu fosfolipolitičku aktivnost.

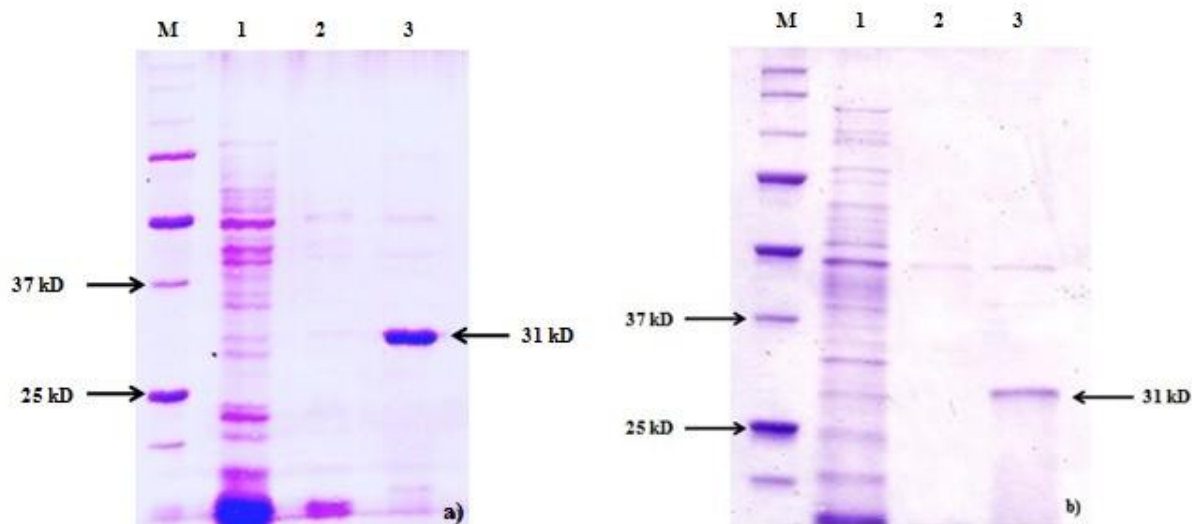
Uzimajući u obzir da je lipaza Sc2L stabilna pri pH vrijednostima do 6,0 (Côté i Shareck, 2008), transformanti koji nose konstrukt pANT849Sc2L odnosno pANT849peSc2L i divlji tip bakterije *S. coelicolor* nacijepljeni su na hranjivu podlogu TSB s trikaprilinom pH vrijednosti 6,0. Nakon dva dana pri 30°C bistre lipolitičke zone bile su vidljive oko transformanta koji nosi konstrukt pANT849peSc2L. Lipolitička zona oko transformanta s konstruktom pANT849Sc2L jedva je vidljiva, a divlji tip bakterije *S. coelicolor* uopće ne pokazuje lipolitičku aktivnost (Slika 4-5).



Slika 4-5 Kolonije streptomiceta na krutoj hranjivoj TSB podlozi pH 6,0 s trikaprilinom. (A) Divlji tip bakterije *S. coelicolor*, (B) transformant bakterije *S. coelicolor* s konstruktom pANT849Sc2L i (C) transformant bakterije *S. coelicolor* s konstruktom pANT849peSc2L.

4.5. Pročišćavanje lipaze Sc2L

Kako bi se utvrdilo postoje li razlike u količini enzima koju proizvode transformanti s konstruktom pANT849Sc2L u odnosu na transformante pANT849peSc2L, navedeni transformanti precijepljeni su s krute podloge TSB u 15 ml tekućeg medija CRB te inkubirani dva dana pri 30°C uz miješanje. 4 ml kulture *S. coelicolor* s konstruktom pANT849peSc2L naciepljeno je u 400 ml podloge GR₂d u tikvici volumena 2 l. Kulture su uzgajane u Gr₂d podlozi 5 dana pri 30°C uz miješanje. S obzirom da transformanti bakterije *S. coelicolor* luče lipazu Sc2L u tekuću Gr₂d podlogu, supernatant je izdvojen od biomase koja sadrži micelij, izvanstanični proteini istaloženi su dodatkom amonijevog sulfata u prahu do koncentracije od 80%, te dijalizirani tijekom 4,5 sati u 10 mM Tris-HCl puferu pH 7,5. Pomoću afinitetne kromatografije na nosaču s imobiliziranim ionima nikla provedenoj pri sobnoj temperaturi pročišćena je lipaza Sc2L obilježena nizom od 6 histidinskih ostataka. Eluiranjem lipaze Sc2L koju je lučio transformant bakterije *S. coelicolor* s konstruktom pANT849peSc2L dobiven je uzorak u kojem su se nalazile tri proteinske vrpce. Najizraženija vrpca molekularne mase oko 31 kD odgovara lipazi Sc2L (Slika 4-6a)). Vidljivo je da je navedena lipaza Sc2L uspješno pročišćena u velikoj količini.



Slika 4-6 a) Pročišćavanje lipaze Sc2L obilježene sa šest histidinskih ostataka iz bakterije *S. coelicolor* s konstruktom pANT849peSc2L. (M) Molekularni standard Precision Plus ProteinTM Unstained Standards (BioRad), (1) uzorak nakon dijalize, (2) uzorak dobiven ispiranjem kolone puferom 0, (3) uzorak nakon Ni-Nta kromatografije. **b)** Pročišćavanje lipaze Sc2L obilježene sa šest histidinskih ostataka iz bakterije *S. coelicolor* s konstruktom pANT849Sc2L. (M) Molekularni standard Precision Plus ProteinTM Unstained Standards (BioRad), (1) uzorak nakon dijalize, (2) uzorak dobiven ispiranjem kolone puferom 0, (3) uzorak nakon Ni-Nta kromatografije. SDS-PAGE u 12% gelu obojenom bojom Coomassie briljantno plavo.

Na isti način kao i transformant s konstruktom pANT849peSc2L, uzgojena je kultura *S. coelicolor* s konstruktom pANT849Sc2L i pročišćena lipaza Sc2L. Eluiranjem lipaze Sc2L koju je lučio transformant bakterije *S.coelicolor* s konstruktom pANT849Sc2L dobiven je uzorak u kojem su se nalazile 2 proteinske vrpce. Najizraženija vrpca molekularne mase oko 31 kD odgovara lipazi Sc2L (Slika 4-6b).

Vidljivo je da transformanti bakterije *S. coelicolor* s konstruktom pANT849peSc2L sintetiziraju znatno veće količine lipaze Sc2L.

4.6. Analiza promotorske regije pANT849 i pANT849pe

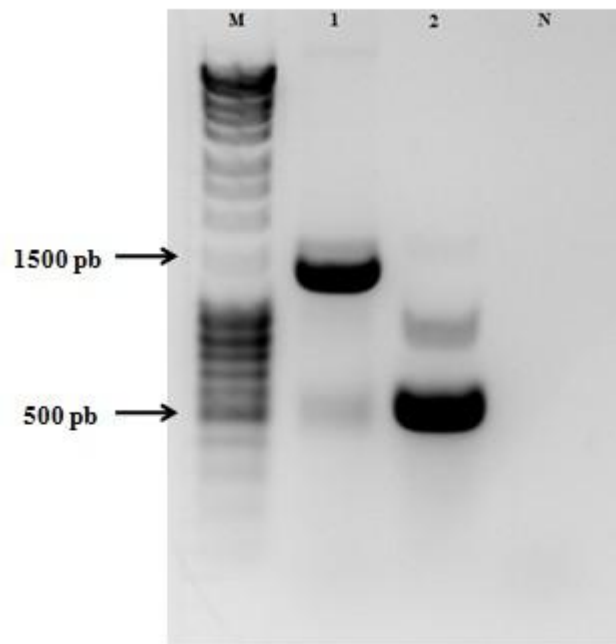
U ranijim istraživanjima primijećena je pojačana ekspresija različitih proteina kloniranih u vektor pANT849pe (LMG, neobjavljeni rezultati). Nadalje, ovdje je pokazano da transformanti koji sadrže konstrukt pANT849peSc2L pokazuju veću zonu na krutim hranjivim podlogama s trikaprilinom (odjeljak 4.4.) i biosintetiziraju veću količinu lipaze Sc2L (odjeljak 4.5.) u odnosu na transformante s pANT849Sc2L. Stoga je postavljena

hipoteza da je kod pANT849pe došlo do promjene u promotorskoj regiji koja uzrokuje povećanu ekspresiju kloniranih gena.

To je ispitano (i) umnožavanjem promotorske regije vektora pANT849 i pANT849pe, i (ii) kloniranjem navedenih vektora u pGEM-T i sekvenciranjem promotorske regije u pANT849pGEM te pANT849pepGEM konstruktima.

4.6.1. Umnožavanje promotorske regije vektora pANT849pe i pANT849 lančanom reakcijom polimeraze

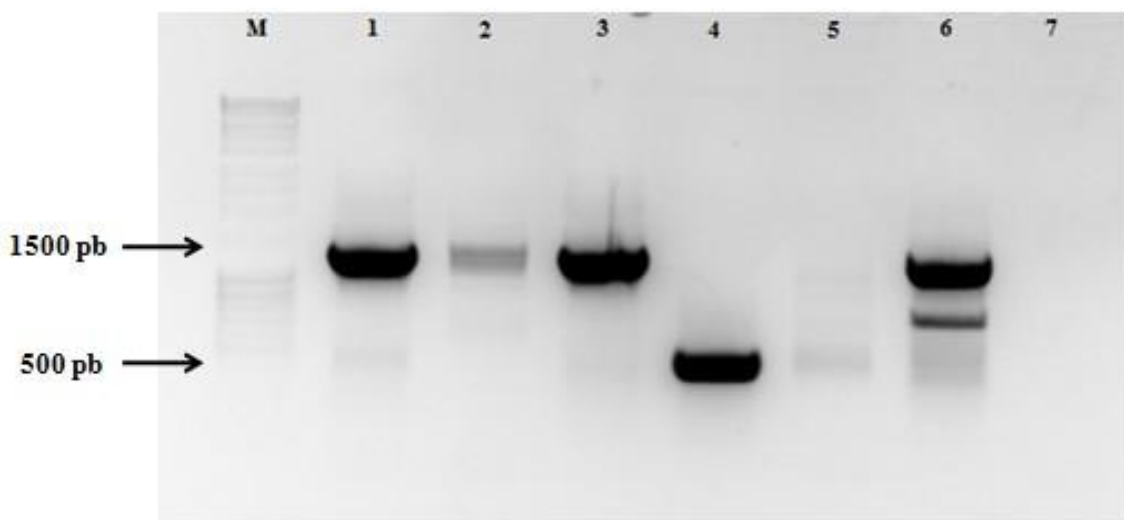
Specifičnim početnicama superF i superR umnožena je promotorska regija vektora pANT849 i pANT849pe (opisano u odjeljku 3.2.7.1.). Umnožavanjem promotorske regije pANT849 dobiven je fragment očekivane veličine (514 pb), dok je umnožavanjem promotorske regije pANT849pe dobiven neočekivano veliki fragment veličine oko 1400 pb (Slika 4-7).



Slika 4-7 Umnožavanje promotorske regije vektora pANT489pe i pANT849 lančanom reakcijom polimerazom. (M) Molekularni biljeg MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas), (1) PCR produkt gdje je kao kalup u PCR reakciji korišten pANT849pe, (2) PCR produkt gdje je kao kalup u PCR reakciji korišten pANT849, (N - negativna kontrola) MQ. Elektroforeza u 1% agaroznom gelu.

U kontrolnim reakcijama umnožavanjem promotorske regije vektora pANT849 specifičnim početnicama superF i superR ponovno je dobiven fragment očekivane veličine

(514 pb), a početnicom superR fragmenti veličine oko 1400 pb i u značajno manjoj koncentraciji fragment od oko 700 pb, dok kod početnice superF nije došlo do specifičnog umnožavanja (Slika 4-8). Kod umnožavanja promotorske regije vektora pANT849pe specifičnim početnicama superF i superR odnosno početnicom superR dobiven je fragment neočekivane veličine (oko 1400 pb), a početnicom superF vrlo mala koncentracija fragmenta veličine 1400 pb (Slika 4-8).



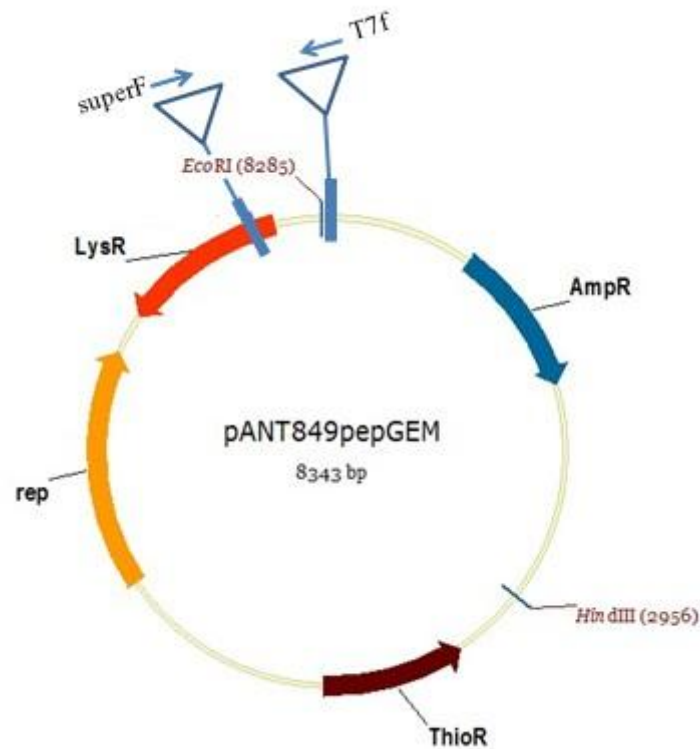
Slika 4-8 Kontrolne reakcije umnožavanja promotorske regije vektora pANT489pe i pANT849 lančanom reakcijom polimerazom. (M) Molekularni biljeg MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas), (1) PCR produkt gdje je kao kalup u PCR reakciji korišten pANT849pe, te početnice superF i superR, (2) PCR produkt gdje je kao kalup u PCR reakciji korišten pANT849pe te početnica superF, (3) PCR produkt gdje je kao kalup u PCR reakciji korišten pANT849pe te početnica superR, (4) PCR produkt gdje je kao kalup u PCR reakciji korišten pANT849 te početnice superF i superR, (5) PCR produkt gdje je kao kalup u PCR reakciji korišten pANT849 te početnica superF, (6) PCR produkt gdje je kao kalup u PCR reakciji korišten pANT849 te početnica superR, (7) MQ s početnicama superF i superR. Elektroforeza u 1% agaroznom gelu.

4.6.2. Sekvenciranje promotorske regije vektora pANT849 i pANT849pe

Kako bi se izbjegli problemi kod sekvenciranja korištenjem plazmidne DNA izolirane iz bakterije *S. coelicolor*, pristupilo se kloniranju vektora pANT849 i pANT849pe u pGEM-T. Postupak kloniranja opisan je u odjeljku 3.2.7.2. PCR na kolonijama *E. coli* XL1-Blue^r gdje je kao kalup služio mali komadić kolonije i korištene su početnice FANT i T7f dokazano je da je došlo do ugradnje pANT849 i pANT849pe u pGEM-T. Konstrukti pANT849pGEM i pANT849pepGEM prikazani su na Slici 4-9 a)).

Nekoliko potvrđenih transformanata bakterije *E. coli* XL1-Blue^f s konstruktom pANT849pepGEM nacijepljeni su u tekući LB medij s ampicilinom i inkubirani pri 37°C preko noći uz miješanje kako bi se uzgojila dostatna biomasa za pročišćavanje plazmidne DNA. Pročišćenim plazmidnim konstruktima određena je primarna struktura promotorske regije (kao što je opisano u odjeljku 3.2.7.3.) koja je bila ista kod oba ispitana konstrukta. Dobiveni nukleotidni slijed uspoređen je s očekivanom promotorskom regijom vektora pANT (DeSanti i Strohl, 2003, Slika 4-9 b)). Uočena je promjena 2 nukleotida AT → G (Slika 4-9 b), u crvenom kvadratu) koja se nalazi 48 nukleotida uzvodno od AUG kodona, te 89 nukleotida nizvodno od početka transkripcije gena *lysR*.

a)



b)

```

ovaj rad      TGGCGGAGACGTCCATGTGCAGGGTGGGTTCTGCCAGTGCCGGCGGAGCCGGCGCAGCC 60
DeSanti      TGGCGGAGACGTCCATGTGCAGGGTGGGTTCTGCCAGTGCCGGCGGAGCCGGCGCAGCC 60
*****

ovaj rad      AGCCCGCCAGGGCCCGGCTGGCCGTGGAGCCGACGCGCAGCTGGCGTCCGCCGACGGCGG 120
DeSanti      AGCCCGCCAGGGCCCGGCTGGCCGTGGAGCCGACGCGCAGCTGGCGTCCGCCGACGGCGG 120
*****

ovaj rad      CGGCGCGGGCCTCGCTGACGAGGGAGCGCAATTCGGCCACCAGGGGGCGGGCAGCACTGA 180
DeSanti      CGGCGCGGGCCTCGCTGACGAGGGAGCGCAATTCGGCCACCAGGGGGCGGGCAGCACTGA 180
*****

ovaj rad      GCACCAGCCGCCCCAGCGGTGTGGGGCGGCAGCCGGTGCGGGCCGGACGAACAGGGCAC 240
DeSanti      GCACCAGCCGCCCCAGCGGTGTGGGGCGGCAGCCGGTGCGGGCCGGACGAACAGGGCAC 240
*****

ovaj rad      CGCCCAGCTCGTGTTCGATGCGCCGCA4GCTGCGTGCTCAACGAGGGCTGTGTCTACTCCCA 300
DeSanti      CGCCCAGCTCGTGTTCGATGCGCCGCA4GCTGCGTGCTCAACGAGGGCTGTGTCTACTCCCA 300
*****

ovaj rad      GTTGGCGTGCCGCGCGGTGCAGGCTGCCGGTGTTCGGCGATGGCGCACAGCGCCCTGAGGT 360
DeSanti      GTTGGCGTGCCGCGCGGTGCAGGCTGCCGGTGTTCGGCGATGGCGCACAGCGCCCTGAGGT 360
*****

ovaj rad      GCCTGACCTCAAGCTC4CAT4GTCTGGGAGGGTAAGGCGGAAGTTCAGCTTTCACCAGACA 420
DeSanti      GCCTGACCTCAAGCTC4CAT4GTCTGGGAGGGTAAGGCGGAAGTTCAGCTTTCACCAGACA 420
*****

ovaj rad      TACAAAG4GGCGACCGATCAGGACCATCGGGCCTTCACGGCGCGAGGGCTCGGCCGGAT 479
DeSanti      TACAA4ATGGCGACCGATCAGGACCATCGGGCCTTCACGGCGCGAGGGCTCGGCCGGAT 480
*****

ovaj rad      CGGGAGGGGCCCGCCGGGGCCGCCGGGCAGGGCG4GGCAGGTGGGACG4BAGGGGGAT 539
DeSanti      CGGGAGGGGCCCGCCGGGGCCGCCGGGCAGGGCG4GGCAGGTGGGACG4BAGGGGGAT 540
*****

ovaj rad      AGGG-35CGGCC-35TATCGGCGGTTGCCATCATCACAACGGCCGTACGGGCACGGCACTCACG 599
DeSanti      AGGG-35CGGCC-35TATCGGCGGTTGCCATCATCACAACGGCCGTACGGGCACGGCACTCACG 600
*****

ovaj rad      ATGTCTGACTCATCCCCCACCTCG-35AGGAGT-10CATCGATGCGCATGC-10GAATTC 651
DeSanti      ATGTCTGACTCATCCCCCACCTCG-35AGGAGT-10CATCGATGCGCATGC-10GAATTC 652
*****

```

Slika 4-9 a) Plazmid pANT849pepGEM. **b)** Poravnanje nukleotidnog slijeda promotorske regije vektora pANT849 odnosno pANT849pe (ovaj rad) i očekivanog nukleotidnog slijeda (DeSanti i Strohl, 2003). Crne strelice – početak transkripcije. Zeleni kvadrat – promotor prekomjerno eksprimiranog gena. Plavi kvadrati – promotor gena *lysR*. Crveni kvadrat – uočena mutacije. Plava strelica – početak kodirajuće regije gena *lysR*. Ljubičasta strelica – početak kodirajuće regije prekomjerno eksprimiranog gena. Žuto – mjesto gdje priliježe početnica superF. Plavo – AUG kodon. Zeleno – *EcoRI* restrikcijsko mjesto

5. RASPRAVA

Dosadašnja istraživanja pokazala su da su bakterije izuzetno dobar izvor biotehnoški važnih hidrolitičkih enzima. Široku primjenu imaju lipolitički enzimi, a za sada su najpoznatiji producenti ovih enzima bile bakterije iz rodova *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Burkholderia* (Gupta, 2004). Novija istraživanja pokazala su da i zemljišne saprofitne bakterije na svojim genomima kodiraju za izuzetno veliki broj ovih enzima (Bentley i sur., 2002). Najviše su izučavane lipaze koje spadaju u GDS(L) porodicu (Abramić i sur., 1999; Vujaklija i sur., 2002; Bielen i sur., 2009). Predstavnici ove skupine su izuzetno interesantni zbog svojih biokemijskih karakteristika (Akoh, 2004) i zato se intenzivno istražuju.

Do danas je sekvencirano preko 1700 bakterijskih genoma, a njihova analiza i metode genetičkog inženjerstva omogućavaju kloniranje i kontroliranu sintezu hidrolitičkih enzima u različitim bakterijskim sustavima. Ukoliko je prekomjerna ekspresija određenih proteina/enzima u bakteriji domaćinu otežana, koriste se drugi mikroorganizmi za ekspresiju, od kojih je još uvijek najzastupljenija bakterija *E. coli*.

Postojeći sustavi za homolognu ekspresiju streptomicetnih lipaza, osobito lipaze Sc2L davali su izuzetno male količine proteina, pa je i njegova biokemijska karakterizacija bila otežana (Marić, 2009). Stoga su tijekom posljednjih nekoliko godina ova istraživanja usmjerena u razvijanje učinkovitog sustava za homolognu odnosno heterolognu ekspresiju *sc2l* gena. Cilj ovog rada bio je utvrditi zašto derivat ekspresijskog vektora pANT849 omogućuje biosintezu veće količine lipaza izoliranih iz bakterija *S. coelicolor* i *S. rimosus* i može li se primjenom ovog vektora dobiti povećana sinteza enzima Sc2L u homolognom sustavu.

Kako je i prikazano u rezultatima, prvi korak ove studije bio je analiza ekspresije nativnog gena *sc2l* na kromosomu bakterije *S. coelicolor*. Iz Slike 4-1 vidljivo je da se gen *sc2l* najviše eksprimira u stacionarnoj fazi životnog ciklusa, što bi moglo ukazati da je ovaj hidrolitički enzim za bakteriju važniji u kasnijim razvojnim fazama, kada streptomiceti počinju stvarati spore i sintetiziraju sekundarne metabolite. S obzirom na kasniju fazu ekspresije i na broj otkrivenih gena koji kodiraju za GDS(L) lipaze na kromosomu, može se zaključiti da navedena lipaza nije esencijalna za preživljavanje streptomiceta, ali u određenim uvjetima pruža im prednost.

Tijekom prijašnjih istraživanja u Laboratoriju za molekularnu genetiku Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, izoliran je derivat vektora pANT849 koji je pokazivao povećanu ekspresiju, a nazvan je pANT849pe. Kako bi se istražilo utječe li vektor pANT849pe na

prekomjernu homolognu ekspresiju enzima Sc2L u bakteriji *S. coelicolor* gen *sc2l* kloniran je u navedeni vektor. Uspješnost kloniranja dokazana je metodom PCR kako je opisano u odjeljku 3.2.2.5. i prikazana na Slici 4-2. Učinkovitost ekspresije tijekom svih eksperimenata uspoređivana je s izvorišnim konstruktom pANT849Sc2L.

Prema literaturnim podacima ovaj enzim je stabilan pri niskim pH vrijednostima (do pH 6,0) (Côté i Shareck, 2008), što je zanimljivo jer se za streptomicete zna da najbolje rastu pri pH 6,5 do 8,0 (Locci, 1989). Zato se ispitalo bi li povećana sinteza ovog enzima u bakteriji *S. coelicolor* pružala prednost u rastu pri niskim pH vrijednostima. Iz rezultata je vidljivo da je transformant bakterije *S. coelicolor* s konstruktom pANT849peSc2L najbolje narasao pri pH 5,5 (Slika 4-4). Dobiveni rezultat pokazuje da sojevi s povećanom količinom lipaze Sc2L bolje rastu u odnosu na kontrolne sojeve. Kako bi se potvrdio ovaj rezultat te načinila moguća korelacija između poboljšanog rasta pri nižim pH vrijednostima i sinteze lipaze, trebalo bi eksperiment ponoviti uz više kontrolnih ploča rasta kako bi se izbjegla greška u broju kolonija kao posljedice nejednolikog naciepljivanja. Uz navedeno, trebalo bi uzeti u obzir i do sada objavljene rezultate. Naime, druga istraživanja pokazala su da na rast streptomiceta na hranjivim podlogama s različitim pH vrijednostima ne utječe toliko sama pH vrijednost podloge, već sadržaj hranjivih tvari, pa tako hranjive podloge bogate organskom tvari omogućavaju rast streptomiceta u širokom rasponu pH vrijednosti (Kontro i sur., 2005). Stoga, ovi eksperimenti trebali bi se nadopuniti ispitivanjem rasta navedenih transformanata bakterije *S. coelicolor* na različitim krutim podlogama i tekućim medijima da bi se dobio siguran zaključak.

Trikaprilin je izabran kao optimalni supstrat za ispitivanje lipolitičke aktivnosti enzima Sc2L jer na maslinovom ulju bakterije *S. coelicolor* nisu pokazale lipolitičku aktivnost, a na žutanjku su se razvile velike, bistre, lipolitičke zone oko divljeg tipa *S. coelicolor*, što ukazuje na nespecifičnu fosfolipolitičku aktivnost (nije prikazano). Također, uzimajući u obzir činjenicu da je lipaza Sc2L stabilna pri pH 6,0, pH vrijednost podloge podešena je na tu vrijednost. Rezultati su pokazali da transformant s konstruktom pANTpeSc2L pokazuje najveću lipolitičku aktivnost, što je bilo u skladu s očekivanim. Zanimljivo je da povećana sinteza enzima Sc2L interferira s proizvodnjom sekundarnog metabolita, aktinorodinom (Slika 4-5). Transformant bakterije *S. coelicolor* s konstruktom pANT849Sc2L oko kojeg se razvila vrlo mala lipolitička zona, proizvodio je više antibiotika (aktinorodin), što je prikazano na Slici 4-5. Ovo bi moglo ukazivati da enzim Sc2L u povećanoj koncentraciji suprimira neki biosintetski put, ali zasad je teško diskutirati specifičnost tog djelovanja. Zabilježena aktivnost enzima Sc2L pri pH 6,0 u prekomjernoj ekspresiji izuzetno je zanimljiva s obzirom da je u

suprotnosti s istraživanjima koje su proveli Côté i Shareck (2008). Navedeni autori su s pročišćenim Sc2L enzimima pokazali da enzim gubi aktivnost pri pH vrijednostima nižim od 8,5.

Gornji rezultati u skladu su s dokazanom povećanom sintezom enzima Sc2L pročišćenim nakon uzgoja transformanta s konstruktom pANT849Sc2L, odnosno pANT849peSc2L iz tekuće GR₂d podloge (Slika 4-6a) i b)).

S obzirom da je u prijašnjim istraživanjima primijećena pojačana ekspresija različitih proteina kloniranih u vektor pANT849pe (Vujaklija, neobjavljeni rezultati) te da je u ovom istraživanju pokazano da transformanti s konstruktom pANT849peSc2L pokazuju veću zonu na krutim hranjivim podlogama s trikaprilinom (odjeljak 4.4.) i biosintetiziraju veću količinu Sc2L lipaze (odjeljak 4.5.) u odnosu na transformante s pANT849Sc2L pretpostavljeno je, da je došlo do promjene u promotorskoj regiji koja uzrokuje povećanu ekspresiju kloniranih gena. U prilog modifikacije vektora govori činjenica da su umnožavanjem promotorske regije vektora pANT849 i pANT849pe dobiveni fragmenti različite veličine (Slika 4-7). Iako ovi rezultati govore u prilog modifikacije, oni ne ukazuju specifično na kojem mjestu na vektoru se ta modifikacija dogodila.

Promotorska regija vektora pANT849 i pANT849pe detaljno je analizirana, umnožena i sekvencirana pomoću bifunkcionalnih vektora pANT849pGEM i pANT849pepGEM koji su konstruirani kako je opisano u odjeljku 3.2.7.2. Suprotno početnoj hipotezi da je pojačana ekspresija nastala zbog mutacije promotorske regije, primarna struktura promotorskih regija bila je ista u oba konstrukta (Slika 4-9 b)). Uspoređivanjem dobivenog nukleotidnog slijeda s promotorskom regijom pANT vektora prema literaturi (DeSanti i Strohl, 2003, Slika 4-9b)), uočena je promjena 2 nukleotida (AT→G). Kao što je obilježeno na Slici 4-9 b) promjena se nalazi 48 nukleotida uzvodno od AUG kodona, a 89 nukleotida nizvodno od početka transkripcije gena *lysR*.

Zaključno, iako dobivena prekomjerna ekspresija lipaze, ukazuje da je došlo do promjene na vektoru pANT849, dosadašnji rezultati su pokazali da te promjene nisu odraz mutacije(a) vezane uz analiziranu promotorsku regiju. Prekomjerna ekspresija mogla bi biti uzrokovana mutacijom koja se nalazi izvan analizirane promotorske regije ili mutacijom u izvorištu replikacije koja dovodi do povećanog broja kopija plazmida.

6. ZAKLJUČCI

- Analiza glasničke RNA pokazala je da se gen *sc2l* na kromosomu bakterije *S. coelicolor* najviše eksprimira tijekom stacionarne faze rasta
- Gen *sc2l* uspješno je kloniran u ekspresijski vektor za streptomicete, pANT849pe i transformiran u bakteriju *S. coelicolor*
- Lipolitička aktivnost soja *S. coelicolor* s konstruktom pANT849peSc2L bila je znatno veća u odnosu na soj *S. coelicolor* transformiran s pANT849Sc2L
- Transformanti bakterije *S. coelicolor* s konstruktom pANT849peSc2L sintetiziraju veće količine lipaze Sc2L u odnosu na transformante s konstruktom pANT849Sc2L
- Analiza promotorske regije vektora pANT849pe pomoću PCR metode nije moguća kombinacijom početnica superF i superR
- Učinkovita analiza promotorskih regija provedena je na bifunkcionalnim vektorima pANT849pGEM i pANT849pepGEM
- Primarna struktura promotorskih regija ista je kod pANT849 i pANT894pe
- Usporednom dobivene sekvence promotorske regije s promotorskom regijom vektora pANT (DeSanti i Strohl, 2003), uočena je promjena dva nukleotida (AT→G), promjena se nalazi 48 nukleotida uzvodno od AUG kodona, a 89 nukleotida nizvodno od početka transkripcije *lysR* gena

7. ZAHVALE

Najljepše se zahvaljujem mentorici dr. sc. Dušici Vujakliji što mi je pružila priliku za sticanjem neprocjenjivog iskustva kroz rad u istraživačkom laboratoriju, na vremenu i svim savjetima, a najviše na pitanjima koja su me stalno poticala na traženje odgovora.

Neizmjerne se zahvaljujem mentorici dr. sc. Ani Bielen na svemu što me naučila, iskustvima koja mi je prenijela, moralnoj podršci i neizmjernom strpljenju u trenucima kada bi ga svi ostali odavno izgubili.

Puno hvala dipl. ing. Želimiri Filić što je uvijek imala vremena za mene i moja pitanja, pa i ona najbanalnija.

Hvala dipl. ing. Tini Paradžik na svim savjetima i strpljenju.

Zahvaljujem se svim članovima Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta „Ruđer Bošković“ na pomoći i strpljenju.

8. POPIS LITERATURE

Abramić M, Leščić I, Korica T, Vitale LJ, Saenger W, Pigac J (1999) Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*

Akoh CC, Lee GC, Liaw YC, Huang TH, Shaw JF (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research* 43: 534-552

Arpigny JL, Jaeger KE (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *The Biochemical Journal* 343: 177-183

Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141-147

Bielen A (2010) Molekularna i funkcionalna karakterizacija GDS(L) lipaza iz bakterija *Streptomyces rimosus* i *Streptomyces coelicolor*. Doktorska dizertacija. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet

Bielen A, Četković H, Long PF, Schwab H, Abramić M, Vujaklija D (2009) The SGNH-hydrolase of *Streptomyces coelicolor* has (aryl)esterase and a true lipase activity. *Biochimie* 91:390-400

Brozović A (2007) Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu 11.1.1. U: Ambriović Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Četković H, Herak Bosnar M, Hranilović D, Katušić Hećimović S, Meštrović Radan N, Mihaljević S, Slade N, Vujaklija D (ur.) Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 555-557

Chater KF (2006) Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol. Sci.* 361 (1469): 761-768

Côté A, Shareck F (2008) Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Enzyme and Microbial Technology* 42:381-388

Demain A, Fang A (2000) The Natural Functions of Secondary Metabolites. U: Fichter A (ur.) History of Modern Biotechnology, Berlin, Springer, 2-39

DeSanti CL, Strohl WR (2003) Characterization of the *Streptomyces* sp. Strain C5 *snp* Locus and Development of *snp*-Derived Expression Vectors. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1647-1654

Gupta R, Gupta N, Rathi P (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:763-781

Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA (2000) Practical *Streptomyces* Genetics. *The John Innes Foundation*, Norwich

Kontro M, Lignell U, Hirvonen MR, Nevalainen A (2005) pH effects on 10 *Streptomyces* spp. growth and sporulation depend on nutrients *Letters in Applied Microbiology* 41

Locci R (1989) Streptomycetes and related genera. U: Williams S T, Sharpe, M E, Holt L G (ur.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.4. Baltimore MD: Williams&Wilkins*, 2451-2505

Marić M (2009) Kloniranje i ekspresija gena za SGNH-hidrolazu iz bakterije *Streptomyces coelicolor* u heterolognom sustavu. Diplomski rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet

Schrempf H (2008) Streptomycetaceae: Life Style, Genome, Metabolism and Habitats. U: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). *John Wiley & Sons, Ltd: Chichester*

Vujaklija D, Schröder W, Abramić M, Zou P, Leščić I, Franke P, Pigac J (2002) A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene. *Arch Microbiol* 178: 124-130

Vujaklija D, Bielen A (2007) Transformacija protoplasta 16.2.1.2. U: Ambriović Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Četković H, Herak Bosnar M, Hranilović D, Katušić Hećimović S, Meštović Radan N, Mihaljević S, Slade N, Vujaklija D (ur.) Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 926-928

9. SAŽETAK

Irina Tanuwidjaja

ANALIZA PROMOTORSKE REGIJE EKSPRESIJSKOG VEKTORA ZA BIOSINTEZU LIPAZE U BAKTERIJI *Streptomyces coelicolor*

Analiza sekvenciranih streptomicetnih genoma pokazala je da streptomiceti imaju veliki potencijal za biosintezu hidrolitičkih enzima među kojima se nalaze i brojni predstavnici GDS(L) porodice. Zbog široke supstratne specifičnosti i strukturnih karakteristika ova skupina enzima izuzetno je interesantna za temeljna i primjenjena istraživanja. Tijekom ove studije pokazano je da se nativni gen na kromosomu bakterije *S. coelicolor* koji kodira za GDS(L) lipazu (Sc2L) najviše eksprimira tijekom stacionarne faze rasta. Gen *sc2l* uspješno je kloniran u derivat ekspresijskog vektora pANT849. Transformanti bakterije *S. coelicolor* s konstruktom pANT849Sc2L pokazali su znatno veću lipolitičku aktivnost na krutim podlogama sa supstratom, u odnosu na soj transformiran izvorišnim konstruktom pANT849Sc2L. Također su iz navedenih transformanata pročišćeni enzimi i u skladu s prijašnjim rezultatima prinos lipaze je bio znatno veći kod transformanata s konstruktom pANT849peSc2L. Zato je provedena analiza promotorskih regija navedenih plazmidnih konstrukata koja je pokazala da nema razlike u primarnom nukleotidnom slijedu. U analiziranoj regiji uočene su dvije promjene u nukleotidnom slijedu, mutacija i delecija koje se nalaze 89 nukleotida nizvodno od početka transkripcije *lysR* gena i 48 uzvodno od AUG kodona, u odnosu na ishodišni vektor pANT849. Rezultati ove analize pokazali su da pronađene mutacije nisu uzrok prekomjerne ekspresije pANT849pe.

Ključne riječi: GDS(L) lipaza - Sc2L, *Streptomyces coelicolor*, pANT - ekspresijski vektori, promotor

10. SUMMARY

Irina Tanuwidjaja

AN ANALYSIS OF EXPRESSION VECTOR PROMOTOR FOR LIPASE BIOSYNTHESIS IN *Streptomyces coelicolor*

An analysis of sequenced genomes of streptomyces reveals their considerable potential in hydrolitical enzymes biosynthesis, amongst which numerous members of GDS(L) family can be found. They are of particular interest to basic and applied studies because of their broad substrate specificity and structural characteristics. This study showed that the maximum expression of native gene encoding GDS(L) lipase (Sc2L) on *S. coelicolor* chromosome, occurs during the stationary growth phase. *sc2l* gene was successfully cloned into a derivative of pANT849 expression vector. An analysis of *S. coelicolor* transformed with pANT849Sc2L showed significantly higher lipolytic activity on solid media when compared to the strain transformed with the original pANT849Sc2L construct. A significantly higher yield of enzymes purified from the previously mentioned bacteria transformed with pANT849peSc2L was in agreement with previous results. A subsequent analysis of those constructs promotor regions showed no difference in the primary nucleotide sequence. A mutation and deletion, the two observed changes in the nucleotide sequence, were located 89 nucleotides downstream of the gene *lysR* transcription start and 48 nucleotides upstream of the AUG codon when compared to the original pANT849 vector. The results of this study confirmed that found mutations were not the cause of the pANT849 overexpression.

Key words: GDS(L) lipase – Sc2L, *Streptomyces coelicolor*, pANT – expression vectors, promotor