



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jan OTONIČAR

**BIOTEHNOLOŠKA UPORABA BAKTERIJSKIH  
MIKRORAZDELKOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jan OTONIČAR

**BIOTEHNOLOŠKA UPORABA BAKTERIJSKIH MIKRORAZDELKOV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF BACTERIAL  
MICROCOMPARTMENTS**

B. SC. THESIS  
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2019

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programa prve stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Mateja Butalo.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Matej BUTALA  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Tanja KUNEJ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum predavitve: 21.8.2019

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 579.6:601.2:602.6:579.8(043.2)
- KG proteinski organeli, *Salmonella enterica*, bakterijski mikrorazdelki, izolacija proteinov
- AV OTONIČAR, Jan
- SA BUTALA, Matej (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
- LI 2019
- IN BIOTEHNOLOŠKA UPORABA BAKTERIJSKIH MIKRORAZDELKOV
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VI, 21 str., 5 pregl., 5 sl., 41 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Bakterijski mikrorazdelki so proteinski organeli, ki se samo-sestavijo in vključujejo encime, ki izvajajo specifične metabolne procese. Bakterija *Salmonella enterica* nosi zapis za ene večjih mikrorazdelkov, ki so zapisani na operonu *Pdu* in so udeleženi pri razgradnji 1,2-propandiola. Mikrorazdelek *Pdu* gradijo podenote *Pdu A, B, B', J, K, N, T, U*, ki se najprej samo-sestavijo v homoheksamere oziroma homopentamere, šele nato lahko postanejo gradniki organela. V mikrorazdelek se ponavadi tekom njegove izgradnje vključijo encimi, ki nosijo kratke peptidne značke, s katerimi interagirajo s podenotami organela. Če katero izmed teh peptidnih sekvenc združimo s poljubnim proteinom, lahko dosežemo njegovo pakiranje v mikrorazdelek. Prav zaradi te možnosti so mikrorazdelki biotehnološko zanimivi. Ob zapakiranju encimov določene metabolne poti, lahko dosežemo večjo produktivnost za tarčni produkt, npr. za etanol, ali pa zapakiramo encime metabolne poti, kjer so vmesni intermedijati toksični za celico. Zaradi selektivne prepustnosti so mikrorazdelki primerni tudi za sintezo toksičnih proteinov, saj ti ob zapakiranju v organel, ne morejo prosto prehajati po celici. Zavoljo razvoja metode za analizo interakcij protein-DNA smo v laboratoriju v kapside *Pdu* uspeli zapakirati transkripcijski faktor *Lacl*, ki je imel na amino-terminalnem koncu kratko peptidno sekvenco proteina *PduD* in na karboksi-terminalnem koncu izboljšani fluorescenčni protein (EGFP). Zasnova eksperimenta omogoča, da celotne mikrorazdelke izoliramo z afinitetno kromatografijo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 579.6:601.2:602.6:579.8(043.2)
- CX protein organelles, *Salmonella enterica*, bacterial microcompartments, protein isolation
- AU OTONIČAR, Jan
- AA BUTALA, Matej (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2019
- TI BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF BACTERIAL MICROCOMPARTMENTS
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 21 p., 5 tab., 5 fig., 41 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Bacterial microcompartments are protein organelles involved in various processes in cells. One of the largest microcompartments are found in *Salmonella enterica*, which are synthesized from the *Pdu* operon and are involved in 1,2-propanediol metabolism. This microcompartment is composed of subunits: Pdu A, B, B', J, K, N, T, U, which first self-assemble into homohexamers or homopentamers and then assemble into microcompartment. There are several enzymes that are selectively encapsulated in microcompartments via their special peptide carried by the enzyme. This microcompartment packaging sequences can be linked to the protein of interest to direct it into the microcompartment. Due to this property microcompartments have a potential to be exploited as reactors in biotechnology. Researchers encapsulated enzymes from a certain metabolic pathway to obtain larger yield for a target metabolite or they showed that enzymes can be encapsulated, which intermediates or end products are toxic. As similarly to the lipid membrane, also the Pdu protein cages are selective for certain type of metabolites, this precludes that the toxic metabolites are preserved inside the compartments and do not harm the producing cell. In the process of development of the novel method to elucidate nucleoprotein complexes we in this study encapsulated into the Pdu microcompartment a transcription factor LacI, which is fused to short peptide sequence of protein PduD, directing the protein into the compartment, and to enhanced green fluorescent protein (EGFP) at the amino- or the carboxy- terminus, respectively. The experimental setup enabled us to isolate the microcompartments by the affinity chromatography from *E. coli* cells.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
KAZALO SLIK.....	VI
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.2 NAMEN DELA.....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>2</b>
2.1 VRSTE MIKRORAZDELKOV .....	2
<b>2.1.1 Karboksisomi</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1.2 Mikrorazdelki Pdu</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1.3 Mikrorazdelki Eut</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.4 Druge vrste mikrorazdelkov</b> .....	<b>3</b>
2.2 PODENOTE MIKRORAZDELKOV PDU .....	4
2.3 STRUKTURA MIKRORAZDELKOV PDU .....	6
2.4 BIOTEHNOLOŠKE APLIKACIJE .....	7
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>8</b>
3.1 MATERIALI .....	8
<b>3.1.1 Kemikalije in raztopine</b> .....	<b>8</b>
<b>3.1.2 Raztopine in pufri</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1.3 Plazmidi</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1.4 Laboratorijska oprema</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1.5 Bakterijski sevi</b> .....	<b>10</b>
3.2 METODE .....	10
<b>3.2.1 Transformacija celic</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2.2 Izolacija mikrorazdelkov</b> .....	<b>11</b>
3.2.2.2 Afinitetna izolacija mikrorazdelkov .....	12
3.2.2.3 Obarjanje proteinov s TCA .....	12
<b>3.2.3 Epifluorescenčna mikroskopija</b> .....	<b>12</b>
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>13</b>
4.1 SPROŽITEV SINTEZE BAKTERIJSKIH MIKRORAZDELKOV .....	13

4.2 IZOLACIJA BAKTERIJSKIH MIKRORAZDELKOV .....	13
4.3 EPIFLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA .....	14
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>16</b>
5.1 SINTEZA BAKTERIJSKIH MIKRORAZDELKOV .....	17
5.2 OB IZOLACIJI OSTANEJO MIKRORAZDELKI PDU INTAKTNI.....	17
5.3 ZAPAKIRANJE POLJUBLNEGA PROTEINA V MIKRORAZDELKU .....	17
<b>6 VIRI.....</b>	<b>18</b>

#### KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Uporabljene kemikalije in raztopine .....	8
Preglednica 2: Uporabljene raztopine in pufri .....	9
Preglednica 3: Uporabljeni plazmidi.....	9
Preglednica 4: Uporabljena laboratorijska oprema .....	9
Preglednica 5: Uporabljeni bakterijski sevi .....	10

#### KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Shematski prikaz gradbe mikrorazdelka Pdu in metabolne reakcije, ki potekajo v notranjosti.....	5
Slika 2: Mapa plazmida pACBSR_pdu_LacIEGFP.....	11
Slika 3: Ločba vzorcev pridobljenih tekom izolacije mikrorazdelkov z 12 % NaDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo.....	14
Slika 4: Fluorescenčna mikroskopija celic z vstavljenim plazmidom pACBSR-DL1 .....	15
Slika 5: Fluorescenčna mikroskopija celic z vstavljenim plazmidom pACBSR_pdu_LacIEGFP.....	16

## 1 UVOD

Evkariontske in prokariontske celice se razlikujejo v mnogih lastnostih. Ena izmed teh je kompartmentalizacija. Evkariontska celica vsebuje organele, prokarionti pa le redko specifične procese lokacijsko ločijo od procesov, ki se odvijajo v citoplazmi (Aussignargues in sod., 2015). Bakterije v ta namen sintetizirajo mikrorazdelke, organele v katerih se nahajajo določeni encimi, zaradi katerih potekajo nekatere metabolne reakcije ločeno od procesov v citosolu. Med temi organeli, zgrajenih iz proteinov, so najbolj znani karboksisomi, ki jih sintetizirajo pri cianobakterije, v katerih se nahajata encima karbonska anhidraza in Rubisco. Zapakiranje encimov v karboksisomih izboljša fiksacijo CO<sub>2</sub> iz zraka, saj je tako CO<sub>2</sub> bolj skoncentriran in hitreje dostopa do encima (Rae in sod., 2013). Proteinskih organelov pa ne sintetizirajo samo kemoavtotrofne bakterije, ampak tudi heterotrofne. Na podlagi podobnosti sekvenc so ugotovili, da tudi slednje v citoplazmi vsebujejo večje, zaprte strukture, le da so udeležene v katabolizmu. Te strukture so udeležene v razgradnji 1,2-propandiola ali pa etanolamina (Kerfeld in sod., 2018). Izmed naštetih mikrorazdelkov so posebej zanimivi organeli za razgradnjo 1,2-propandiola, saj so veliki tudi do 100 nm in v njih lahko enkapsuliramo poljubne proteine.

Gene za razgradnjo 1,2-propandiola so odkrili pri bakteriji *Salmonella typhimurium* in omogočajo rast bakterije, ko raste v aerobnih pogojih in je edini vir ogljika 1,2-propandiol. Pri sami razgradnji ima zelo pomembno vlogo tudi kobalamin, ki je kofaktor propandiol dehidratazi – encimu, ki propandiol pretvori v propionaldehid (Jeter, 1990). Prav razgradnja propandiola omogoči *de novo* sintezo B<sub>12</sub> vitamina pri bakteriji *S. enterica*. Operon *Pdu* vsebuje 23 genov, po funkciji pa jih lahko delimo na: encime, ki direktno sodelujejo pri metabolizmu, encimi, ki skrbijo za reaktivacijo diol dehidrataze, proteine, ki sodelujejo pri transportu metabolitov, regulatorni proteini in pa gradniki mikrorazdelkov. Na podlagi podobnosti sekvenc s karboksisomi, so v operonu *Pdu* kot gradnike mikrorazdelkov prepoznali gene *PduA*, *PduB*, *PduJ*, *PduK*, *PduN*, *PduU* in *PduT*. Pomembno je odkritje, da za izgradnjo mikrorazdelkov *Pdu* potrebujemo le produkte omenjenih 7 genov operona (Bobik in sod., 1999; Parsons in sod., 2008). Glavna vloga mikrorazdelkov je obvarovanje ostalih komponent celice pred toksičnim propionaldehidom, ki je intermediat pri razgradnji 1,2-propandiola (Sampson in Bobik, 2008). Da pa lahko določen del metabolne poti poteka v organelu, se morajo tudi encimi udeleženi v razgradnji propandiola nahajati v mikrorazdelkih. Enkapsulacijo encimov v mikrorazdelke omogočajo specifične aminokislinske sekvence na amino-terminalnem koncu encimov. Prav to odkritje predstavlja velik potencial za biotehnološke aplikacije, saj lahko s pomočjo teh sekvenc dosežemo *in vivo* zapakiranje poljubnih proteinov (Fan in sod., 2012).



## 1.2 NAMEN DELA

V sklopu izdelave metode za enkapsulacijo poljubnega nukleoproteinskega kompleksa v mikrorazdelek, smo želeli pripraviti mikrorazdelek z vključenim izbranim transkripcijskim faktorjem. Obenem je bil namen našega dela priprava takšnih mikrorazdelkov, ki jih lahko enostavno izoliramo iz bakterij z afinitetno kromatografijo.

## 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Dodatek značke »twin-strep-tag« na N-terminalni konec glavnega proteina mikrorazdelka *Pdu*, nam omogoči izolacijo teh kompartmentov z afinitetno kromatografijo.
- Z epifluorescenčno mikroskopijo dokazati, da se D<sup>1-18</sup>-LacI-EGFP nahaja v bakteriji v mikrorazdelku.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 VRSTE MIKRORAZDELKOV

#### 2.1.1 Karboksisomi

Najbolj znani in prvi odkriti bakterijski mikrorazdelki so karboksisomi. Odkrili so jih pri cianobakterijah, udeleženi pa so pri fiksaciji CO<sub>2</sub>. Karboksisomi vsebujejo encim Rubisco, ki katalizira karboksilacijo ribuloze-1,5-bifosfata. Poleg Rubisca je v karboksisomih še karbonska anhidraza, ki pretvarja citosolni HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> v CO<sub>2</sub>. Ta pretvorba je pomembna, saj Rubisco za svojo aktivnost potrebuje CO<sub>2</sub>. S tem, ko je CO<sub>2</sub> zapakiran v mikrorazdelku, je njegova koncentracija okrog aktivnega mesta Rubisca višja, zato je tudi učinkovitost fiksacije ogljika višja. S sekvenciranjem genomov  $\alpha$ -cianobakterij so ugotovili, da vsebujejo karboksisome, ki se očitno razlikujejo od tistih, ki so v  $\beta$ -cianobakterijah (Badger in Price, 2003). Tako  $\alpha$ -karboksisomi, ki jih producirajo  $\alpha$ -cianobakterije, kot tudi  $\beta$ -karboksisomi imajo premer med 100 in 160 nm. Podenote, ki gradijo karboksisome se med vrstama nekoliko razlikujejo, kot tudi tip encima Rubisco. V  $\alpha$ -karboksisomih najdemo Rubisco IA, v  $\beta$ -karboksisomih pa Rubisco IB (Cai in sod., 2015).

#### 2.1.2 Mikrorazdelki Pdu

Medtem ko so karboksisomi udeleženi pri anabolizmu, so ostale vrste mikrorazdelkov udeležene v katabolnih procesih. Med njimi so najbolj znani mikrorazdelki Pdu, ki sodelujejo pri razgradnji 1,2-propandiola. Ta nastaja ob razgradnji ramnoze in fukoze, za njegovo razgradnjo pa je obvezna prisotnost koencima B<sub>12</sub>. Geni *Pdu* so pomembni za rast bakterij na tkiva gostitelja in za virulenco (Conner in sod., 1998; Bobik in sod., 1999). Za *Salmonella enterica*, pri kateri so odkrili mikrorazdelke Pdu je značilno, da je prav rast na propandiolu glavni razlog za *de novo* sintezo koencima B<sub>12</sub>. Razgradnja 1,2-propandiola se začne z njegovo pretvorbo v propionaldehid, pri čemer sodeluje od adenozilcobalamina odvisna diol dehidrataza. Propionaldehid je za celico toksičen in ravno proteinski organi predstavljajo

zaščito pred tem intermedijem za ostale citoplazemske strukture. V mikrorazdelku poteče še pretvorba propionaldehida v propionsko kislino in propanol s pomočjo od CoA–odvisne aldehyd dehidrogenaze, fosfotransacilaze, propionat kinaze in alkohol dehidrogenaze. Pri razgradnji 1,2-propandiola nastaja ATP, metaboliti, ki nastajajo pa se lahko vključujejo v centralni metabolizem celice (Bobik in sod., 1999). Premer mikrorazdelkov Pdu je lahko tudi med 100 in 150 nm in so največji predstavniki metabolosomov (Havemann in Bobik, 2003).

### 2.1.3 Mikrorazdelki Eut

Bakterija *Salmonella enterica* vsebuje še drugo vrsto mikrorazdelkov, to so mikrorazdelki Eut. Udeleženi so v razgradnji etanolamina. Ta je pri sevih *S. enterica* lahko edini vir ogljika in dušika v aerobnih in anaerobnih pogojih. Razgradnja etanolamina poteka v dveh korakih. V prvem koraku etanolamin amonij-liaza v prisotnosti koencima B<sub>12</sub> pretvori substrat v amonijak in acetaldehyd. V drugem koraku pa je acetaldehyd pretvorjen v acetyl – CoA s pomočjo oksireduktaze odvisne od NAD. Glavna naloga proteinskih organelov Eut je zmanjševanje izhlapevanja acetaldehida in s tem izboljšanje učinkovitosti rasti na etanolaminu, hkrati pa kot v primeru mikrorazdelkov Pdu preprečujejo, da bi bil acetaldehyd izpostavljen drugim molekulam v citosolu (Penrod in Roth, 2006). Podobnost med obema omenjenima vrstama metabolosomov pa je tudi velikost, saj imajo mikrorazdelki Eut prav tako premer okrog 100 nm in vplivajo na infektivnost patogenih sevov bakterije (Dadswell in sod., 2019; Tanaka in sod., 2010). Sestavljeni so iz štirih glavnih podenot in dodatne podenote, ki je prisotna v kapsidi v občutno manjšem številu (Tanaka in sod., 2010).

### 2.1.4 Druge vrste mikrorazdelkov

S pomočjo bioinformatike je bilo v zadnjem času odkritih še več vrst mikrorazdelkov, ki pa so glede na zgoraj opisane slabo karakterizirani. Mikrorazdelki Grp so po funkciji zelo podobni mikrorazdelkom Pdu. Obe vrsti sodelujeta v razgradnji propandiola. Glavna razlika med obema vrstama je v začetni encimski reakciji v metabolosomu, in sicer v mikrorazdelkih Grp poteče pretvorba 1,2-propandiola s pomočjo propandiol dehidrataze in pa aktivaze, ni pa potrebna prisotnost koencima B<sub>12</sub> kot je to pri mikrorazdelkih Pdu. Struktura mikrorazdelkov Grp še ni opisana (Jorda in sod., 2013).

Za rast planktomicet na ramnozi ali fukozi v aerobnih pogojih so pomembni mikrorazdelki Pv, saj sodelujejo pri razgradnji omenjenih monosaharidov. V mikrorazdelkih Pv poteka razgradnja laktoaldehida na 1,2-propandiol in laktat (Erbilgin in sod., 2014).

Pred kratkim so Ravcheev in sod. (2019) s pomočjo primerjave genomov odkrili gene za tvorbo dveh novih vrst mikrorazdelkov. Ena izmed teh dveh vrst naj bi bila udeležena v razgradnji ksantina v anaerobnih pogojih, druga pa v metabolizmu 1-amino-2-propanola oziroma 1-amino-2-propanona. Slednja je še posebno zanimiva, saj naj bi v mikrorazdelki Aut potekali tako katabolni kot tudi anabolni procesi, kar bi bil prvi znan mikrorazdelek s tako lastnostjo.

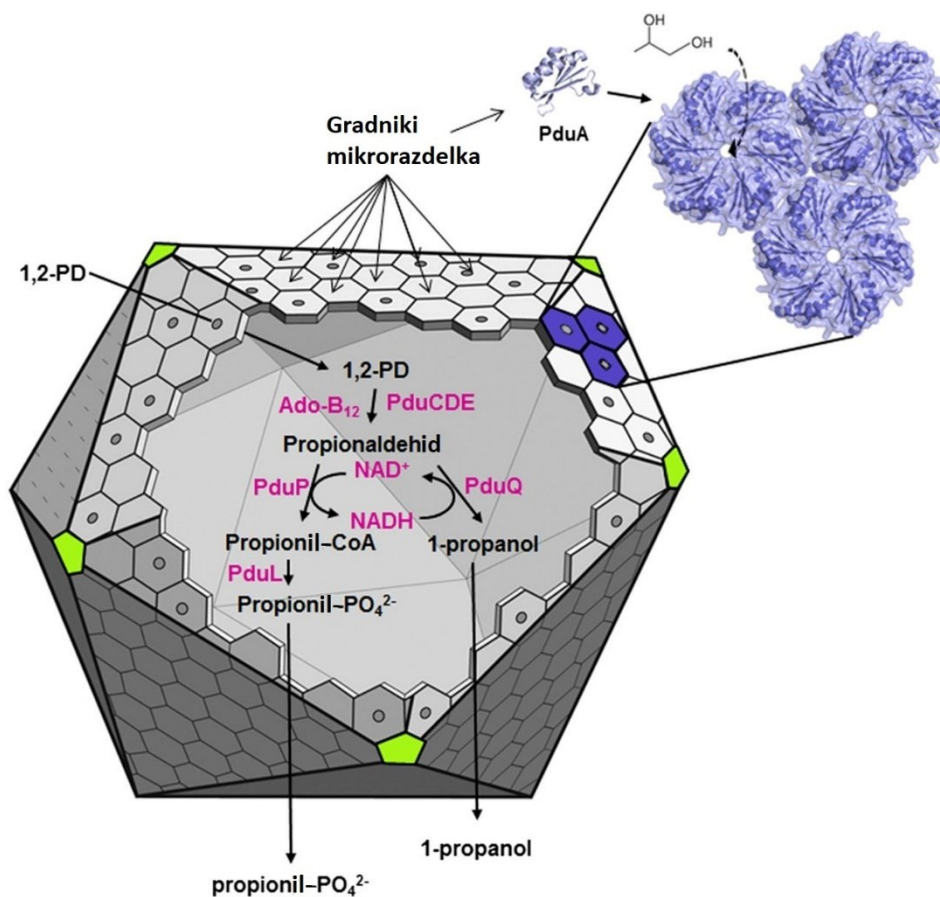
## 2.2 PODENOTE MIKRORAZDELKOV PDU

Kljub temu, da se različne vrste mikrorazdelkov razlikujejo med sabo po funkciji, pa je njihova zgradba podobna. Večina proteinov, ki grade te proteinske organele spadajo v proteinsko družino, ki vsebujejo domeno -BMC (ang. »bacterial microcompartment«). V največji meri so v mikrorazdelkih prisotni BMC-H. Gre za proteine velikih okrog 100 aminokislinskih ostankov, v celici pa se povežejo v homoheksamere in šele v taki obliki, se lahko vgradijo v steno mikrorazdelka. Posamezni heksameri se zaradi vodikovih vezi med seboj tesno prilegajo in s tem tvorijo ploskve mikrorazdelkov. Navadno ima vsak heksamer na sredini tudi poro, skozi katero je omogočen prehod metabolitov (Tanaka in sod., 2009; Dryden in sod., 2009). S pomočjo 3D strukture so določili, da je premer pore heksamera PduA okrog 10 Å, njena notranjost pa je polarna, kar naj bi omogočalo selektiven prehod 1,2-propandiola v organel in hkrati preprečevalo izstop manj polarnega in škodljivega propionaldehida. Spreminjanje aminokislinskih ostankov v notranjosti pore lahko močno spremeni njene lastnosti. Podobno strukturo kot protein PduA naj bi imel tudi protein PduJ, še ena podenota, ki gradi mikrorazdelek Pdu (Crowley in sod., 2010). Nekoliko bolj se od omenjenih podenot razlikuje PduU, ki sicer prav tako tvori heksamere, vendar so ti heksameri sodeč po 3D strukturi brez očitne centralne pore. Predvideva pa se, da se ta pora v določenih pogojih lahko odpre. Ta naj bi bila dovolj velika, da bi omogočala prehod tudi nekaterih večjih molekul, kot so nukleotidi, nikotinamid adenin dinukleotidi, molekule, ki vsebujejo CoA, derivati koencima B<sub>12</sub> (Crowley in sod., 2008; Bobik, 2006; Chen in sod., 1994).

Drugo večjo skupino podenot mikrorazdelkov predstavljajo proteini BMC-T. Gre za proteine, ki se povezujejo v homotrimere in se v taki obliki vgradijo v steno proteinskega organela, vendar pa nastali trimeri spominjajo na heksamere, zato so poznani tudi kot psevdohexameri. V mikrorazdelkih Pdu je med to skupino BMC najbolj zastopan protein PduB, ki je med vsemi podenotami Pdu največja. V mikrorazdelku je v dveh oblikah, in sicer kot protein PduB in PduB'. Med seboj se razlikujeta za 5 kDa. Razlog za to je prisotnost dveh začetnih mest za translacijo. Ravno dodatnih 38 aminokislin na N- terminalnem koncu PduB glede na PduB' je ključnih za pravilno obliko mikrorazdelkov, saj naj bi imel ta del pomemben vpliv na ukrivljanje proteinske stene (Parsons in sod., 2008). Zanimivo lastnost ima tudi protein PduT, ki prav tako spada v skupino BMC-T. V pori trimera PduT je namreč prisotna železovo – žveplova skupina, ki naj bi bila udeležena v prenosu elektronov čez stene mikrorazdelkov. Prav prenos elektronov naj bi bil ključen za regeneracijo redoks potenciala zapakiranih kofaktorjev. Alternativna ideja pripisuje PduT funkcijo prenosa železovo – žveplove skupine v notranjost mikrorazdelkov. Ustrezno aminokislinsko zaporedje za vezavo železovo – žveplove skupine so našli še pri enem izmed gradnikov mikrorazdelka, pri proteinu PduK, ki sicer spada v skupino BMC-H, vendar te lastnosti še niso potrdili (Crowley in sod., 2010).

V najmanjši meri so v mikrorazdelkih zastopani proteini iz skupine BMC-P. Gre za podenote, ki pred vgraditvijo v steno mikrorazdelkov tvorijo homopentamere. Ti so izjemno pomembni

za samo obliko mikrorazdelkov, saj predstavljajo njihova ogljišča (Slika 1) (Cheng in sod., 2011). V primeru mikrorazdelkov Pdu je to PduN, ki je nujen za tvorbo ustrezno zaprtih struktur, v izoliranih mikrorazdelkih pa pri NaDS poliakrilamidni gelski elektroforezi ni bil zaznan, saj se predvideva, da je v proteinskih stenah prisoten v zelo nizkih koncentracijah (Parsons in sod., 2010).



Slika 1: Shematski prikaz gradnje mikrorazdelka Pdu in metabolne reakcije, ki potekajo v notranjosti. Ogljišča kapsid, prikazana z zeleno barvo, predstavljajo homopentamer proteina PduN (Chowdhury in sod., 2015).

## 2.3 STRUKTURA MIKRORAZDELKOV PDU

Mikrorazdelki Pdu so ob prisotnosti vseh podenot, ki gradijo njihovo steno, sestavijo v rahlo nesimetrični ikozaeder. Posamezen organel je sestavljen iz več tisočih proteinov. Za sestavitev mikrorazdelka so nujne podenote PduA, PduB, PduJ, PduK in PduN, medtem ko prisotnost proteinov PduT in PduU ni obvezna. Delecije posameznih podenot nujnih za sestavo razdelka povzročijo nastajanje nepravilnih struktur v celici. Za pravilno obliko mikrorazdelkov sta pomembna tudi ustrezna koncentracija podenot in pa ustrezni vrstni red prepisa genov, ki kodirajo podenote. Kakršnakoli odstopanja pripeljejo v celici do nastajanja različnih struktur; od večjih okroglih agregatov, do struktur v obliki vrtnice. Zanimive strukture nastanejo ob prekomernem izražanju proteina PduA, in sicer dolgi tanki filamenti (Parsons in sod., 2008, 2010). Ob rahli spremembi na C-terminalnem koncu podenote PduA, se poveča njegova topnost, kar vodi do učinkovitejšega nastajanja filamentov PduA. Končni rezultat v celici so nekaj  $\mu\text{m}$  dolgi tubuli, s premerom okrog 20 nm (Lee in sod., 2018).

Kot je bilo že omenjeno, v razgradnji 1,2–propandiola sodeluje več encimov. Da lahko določen del katabolizma poteče v mikrorazdelku, se morajo encimi nahajati v njegovi notranjosti. Pore mikrorazdelka so premajhne za prehod proteinov, kar pomeni, da morajo biti encimi v notranjost organela usmerjeni že tekom njegovega sestavljanja. Signal za ustrezno pakiranje so najprej zaznali pri proteinu PduP (propionaldehid dehidrogenaza). Ključnih je prvih 18 aminokislinskih ostankov N-terminalnega konca PduP, ki tvorijo alfa vijačnico. Slednja vijačnica PduP interagira s PduA, PduJ in PduK (Fan in sod., 2010; Lawrence in sod., 2014). Podobno N-terminalno sekvenco so našli tudi pri PduD, ki je ena izmed podenot diol dehidrataze. Tudi pri PduD je za ustrezno enkapsulacijo ključnih začetnih 18 aminokislinskih ostankov proteina. Znanje o pakiranju encimov v mikrorazdelek, omogoči številne uporabe v biotehnologiji. Če združimo omenjeno N-terminalno sekvenco PduP ali PduD s poljubnim proteinom, lahko dosežemo njegovo zapakiranje (Fan in Bobik, 2011).

Jakobson in sod. (2015) so enkapsulacijo poljubnih proteinov v mikrorazdelke poskušali doseči še na drug način; s sekvencami, ki niso del nativnega operona *Pdu*. Tako so odkrili, da nekatere sekvence iz operonov *Eut* in *Grp* prav tako omogočajo enkapsulacijo proteinov v mikrorazdelek Pdu. Enkapsulacijo omogoča prvih 20 aminokislinskih ostankov podenote EutC, prvih 20 aminokislinskih ostankov podenote EutE in pa N-terminalna sekvenca aldehid dehidrogenaze, encima operona *Grp*. Vse tri omenjene signalne sekvence tekmujejo s signalnima sekvencama PduD in PduP za pakiranje v notranjost mikrorazdelka, zato lahko z dodajanjem različnih signalnih sekvenc k poljubnim proteinom, dosežemo različno razmerje proteinov v mikrorazdelku. Na podlagi odkritij, da pride do interakcij med signalnimi peptidi potrebnimi za enkapsulacijo in podenotami mikrorazdelka prek značilnega hidrofobnega motiva, so Jakobson in sod. (2017) razvili *de novo* signalne sekvence. Do novih signalnih peptidov so prišli s pomočjo racionalnega načrtovanja in pa s pregledovanjem manjših knjižnic peptidov. Nove sekvence ne ponujajo le novih biotehnoloških aplikacij, ampak tudi pojasnijo, kakšne lastnosti mora imeti aminokislinska sekvenca, da služi kot signal za

enkapsulacijo v mikrorazdelku. Bolj kot samo zaporedje aminokislinskih ostankov je pomembna sekundarna struktura peptida, torej alfa vijačnica, saj naj bi pakiranje v mikrorazdelku potekalo na principu interakcije alfa vijačnica signalnega peptida – alfa vijačnica gradnika mikrorazdelka.

## 2.4 BIOTEHNOLOŠKE APLIKACIJE

Dokaza, da lahko tudi v bakteriji *E. coli* poteče sinteza »praznih« mikrorazdelkov Pdu in da je mogoče z ustreznimi signalnimi peptidi doseči enkapsulacijo poljubnih proteinov, sta omogočila razvoj številnih biotehnoških aplikacij (Parsons in sod., 2010). Največ aplikacij je bilo usmerjenih v izboljševanje produkcije manjših molekul. Z enkapsulacijo piruvat dekarboksilaze in alkohol dehidrogenaze v mikrorazdelku Pdu so Lawrence in sod. (2014) signifikatno povečali proizvodnjo etanola v *E. coli*. Pakiranje obeh encimov so dosegli z združenjem posameznih encimov s prvimi osemnajstimi aminokislinskimi ostanki PduP oziroma PduD. Ob ustrezni izolaciji mikrorazdelkov je moč ohraniti zapakirane encime v aktivni obliki, tako da po koncu izolacije dobimo nekakšne nanobioreaktorje, ki tudi *in vitro* proizvajajo etanol. Za izboljšanje produkcije etanola so Lee in sod. (2018) uporabili tubule, ki nastajajo ob izražanju le modificirane verzije PduA. Enkapsulacijo piruvat dekarboksilaze in alkohol dehidrogenaze so dosegli z dodanimi sintezniimi peptidi, ki s PduA tvorijo obvite vijačnice (angl., »coiled coil«) in niso lastni proteinom operona *Pdu*. Oba encima sta tudi v tem primeru ujeta v omejenem prostoru in sta v bližini, zaradi česar je nestabilen intermediat acetaldehid učinkoviteje pretvorjen v etanol. Izboljšano proizvodnjo etanola zaradi enkapsulacije piruvat dekarboksilaze in alkohol dehidrogenaze v mikrorazdelku Pdu so Huber in sod. (2017) dosegli tudi v industrijsko pomembni bakteriji *Corynebacterium glutamicum*. To je tudi dokaz, da se lahko »prazni« mikrorazdelki Pdu sintetizirajo tudi v gram pozitivnih bakterijah. Mikrorazdelke Pdu pa so popolnoma za drugačen namen uporabili Liang in sod. (2017), ki so v bakteriji *E. coli* z enkapsulacijo polifosfat kinaze namreč dosegli stabilno sintezo polifosfatov, kar ima lahko velik potencial v biološkem odstranjevanju fosfatov iz odpadnih voda. V citosolu *E. coli* so stabilne koncentracije polifosfatov uravnavane s polifosfat kinazami in eksopolifosfatazami. Z zapakiranjem v mikrorazdelku Pdu ločimo polifosfat kinazo od eksopolifosfataz, ki so v citosolu, kar omogoča konstantno akumulacijo fosfatov iz okolja in stabilno sintezo polifosfatov znotraj mikrorazdelkov.

Zaradi zelo učinkovitega pakiranja proteinov označenih z ustreznimi signalnimi peptidi, so mikrorazdelki Pdu primerni za izražanje toksičnih proteinov. Yung in sod. (2017) so to dokazali z izražanjem gena za toksični lizni protein E, ki v *E. coli* inhibira sintezo celične stene s tem, ko inhibira delovanje translokaze *MraY* (Bernhardt in sod., 2000). Z dodano aminokislinsko sekvenco PduP<sup>1-18</sup> k liznemu proteinu E so ob prisotnosti mikrorazdelkov uspeli doseči največjo zabeleženo produkcijo tega proteina. Razlog za to niso le mikrorazdelki, ampak tudi dodani N-terminalni peptid, ki je znižal aktivnost toksičnega proteina. Vseeno ta dosežek prikazuje še eno izmed mnogih mogočih aplikacij.

V nalogi smo želeli dokazati, da lahko v mikrorazdelek Pdu usmerimo transkripcijski faktor. Nadalje, pripraviti smo želeli protokol za afinitetno izolacijo intaktnih kapsid iz bakterij. Oboje nam omogoča razvoj metode za enkapsulacijo in analizo nukleoproteinskih kompleksov.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Kemikalije in raztopine

Preglednica 1: Uporabljene kemikalije in raztopine

Kemikalija	Proizvajalec
1,4-ditiotreitol (DTT)	Fluka, Francija
Agar	Formedium, VB
Aceton, Etanol (96 %, 100 %)	Carlo Erba, Italija
Proteazni inhibitor (cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail)	Roche, Švica
Natrijev dodecil sulfat (NaDS)	Roth, Nemčija
TCA	Merck, Nemčija
Kloramfenikol, Tris (Trizma® base), NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X), NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20X), PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, SimplyBlue™ SafeStain	Sigma, ZDA Thermo Fisher Scientific, ZDA
Strep-Tactin®XT Superflow® high capacity 50 % suspension	IBA – Lifesciences, Nemčija
BPER	Thermo Fisher Scientific, ZDA
Lizocim	Merck, Nemčija
Benzonaza	Sigma, ZDA
Rnaza A	Thermo Fisher Scientific, ZDA
Avidin	IBA – Lifesciences, Nemčija
Poli-L-lizin	Sigma, ZDA
D-glukoza	Merck, Nemčija
L-arabinoza	Merck, Nemčija

### 3.1.2 Raztopine in pufri

Preglednica 2: Uporabljene raztopine in pufri

Pufer	Sestava
Pufer za spiranje	100 mM Tris-Hcl pH 8.0, 150 mM NaCl
Pufer za elucijo	100 mM Tris-Hcl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM biotin
Minimalno gojišče (M9)	10 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> , 105 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 45 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 4.69 g 3-Natrijev citrat dihidrat

### 3.1.3 Plazmidi

Preglednica 3: Uporabljeni plazmidi

Ime plazmida	Vir
pACBSR_pdu_LacIEGFP	Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
pACBSR-DL1	Butala in sod., 2009

### 3.1.4 Laboratorijska oprema

Preglednica 4: Uporabljena laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Aparatura za slikanje gelov G:BOX	Syngene, VB
Avtoklav	Kambič, Slovenija
aparatura za NaDS-PAGE	Bio-Rad, ZDA
Centrifuga 3-30 KS	Sigma, Nemčija
Centrifuga 5415 R	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga 5418	Eppendorf, Nemčija
Magnetno mešalo RCT basic	IKA, Kitajska
pH-meter SevenMulti™	Mettler Toledo, Švica
Tehtnica L420 S	Sartorius, Nemčija
Tehtnica MC210P	Sartorius, Nemčija
Rotacijski stresalnik The Belly Dancer/hybridization water bath	Stovall life sciences Inc., ZDA
Mikrovalovna pečica Gorenje	Gorenje, Slovenija
Fluorescenčni mikroskop Axioskop (Opton)	Zeiss, Nemčija
Objektno in krovno steklo	Sigma, ZDA



### 3.1.5 Bakterijski sevi

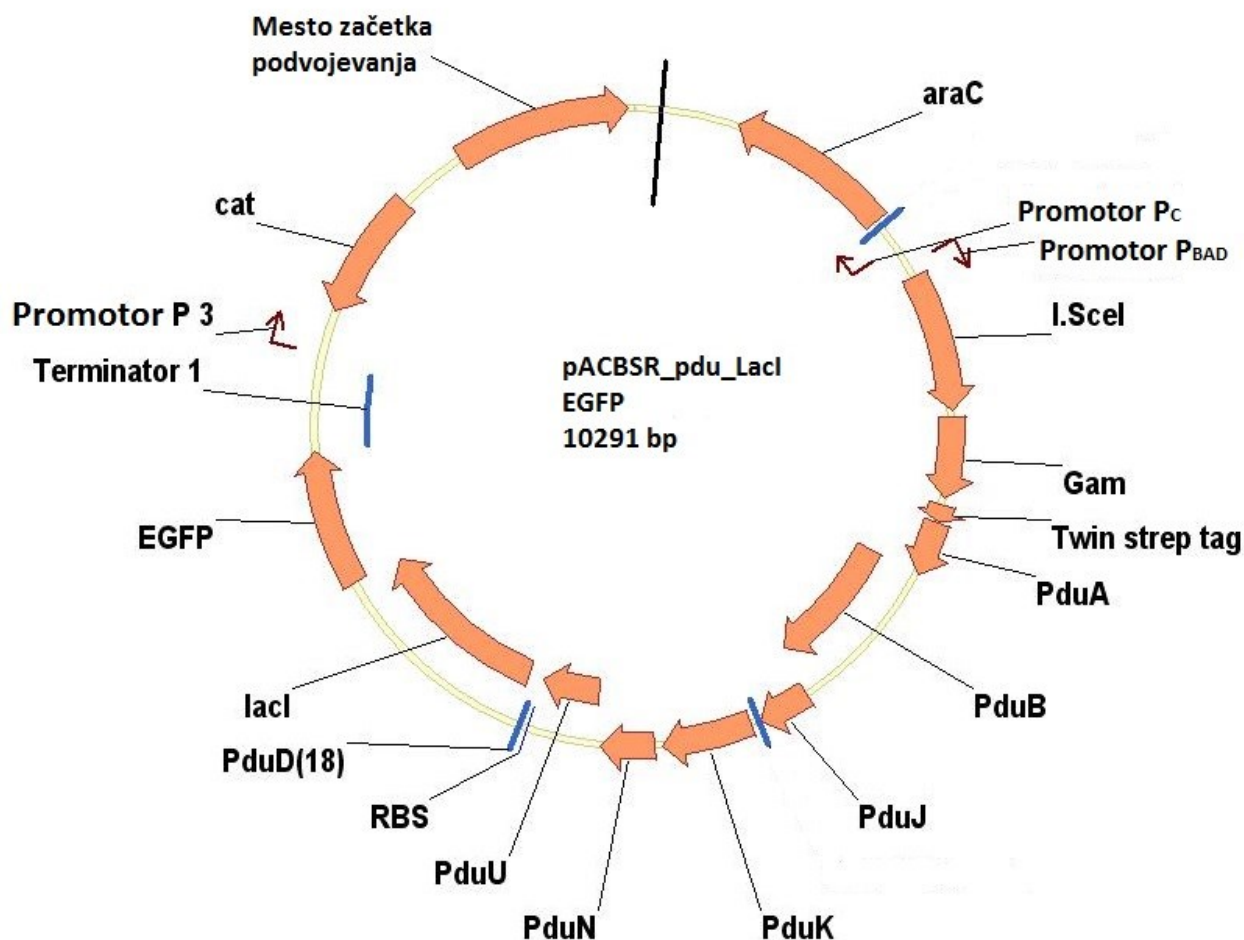
Preglednica 5: Uporabljeni bakterijski sevi

Sev	Opis/genotip	Vir
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>F</i> – <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 <math>\phi</math>80dlacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK –mK +), <math>\lambda</math>–</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>E. coli</i> BW25113	<i>F</i> –, <i>DE(araD-araB)567, lacZ4787(del)::rrnB-3, LAM-1, rph-1, DE(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	Coli Genetics Stock Center

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Transformacija celic

Ker se geni, ki kodirajo proteine za sestavo mikrorazdelkov nahajajo na plazmidu, smo najprej s transformacijo plazmid pACBSR\_pdu\_LacIEGFP (Slika 2) vnesli v kemično kompetentne celice *E. coli* BW25113. K 50  $\mu$ L že pripravljenih kompetentnih celic BW25113 smo dodali 1  $\mu$ L plazmida in mešanico inkubirali na ledu 30 min. Nato smo izvedli temperaturni šok tako, da smo transformacijsko mešanico postavili v vodno kopel ogreto na 42 °C za 1 min in 15 s. Po dveh minutah ohlajanja na ledu smo mešanici dodali 400  $\mu$ L sterilnega tekočega gojišča LB in celice stresali pri 37 °C in 180 rpm 45 min. Nagojene celice smo potem centrifugirali pri 5000 g, 5 min. Supernatant smo odlili, bakterijsko usedlino resuspendirali v 100  $\mu$ L tekočega gojišča LB, jo razmazali na trdna gojišča M9 z dodanim kloramfenikolom (25  $\mu$ g/mL), 0,2 % glukozo in 0,04 % Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ter jih inkubirali na 37 °C preko noči. Sev BW25113 ni odporen proti kloramfenikolu, plazmid pACBSR\_pdu\_LacIEGFP pa ima gen za odpornost proti temu antibiotiku. Na trdnem gojišču s kloramfenikolom lahko posledično selekcioniramo transformante.



Slika 2: Mapa plazmida pACBSR\_pdu\_LacI-EGFP. Pod kontrolo promotorja P<sub>BAD</sub> so kvasna restriktaza I-SceI, protein Gam, komponente mikrorazdelka Pdu - Streptag-PduA, PduB, PduJ, PduK, PduN, PduU ter transkripcijski faktor PduD<sup>1-18</sup>-LacI-EGFP. Gen *cat* označuje determinanto odpornosti proti antibiotiku kloramfenikolu.

### 3.2.2 Izolacija mikrorazdelkov

#### 3.2.2.1 Sinteza bakterijskih mikrorazdelkov

Izbrano transformanto smo s sterilnim zobtrebcem precepili v 10 mL gojišča M9 z dodatkom kloramfenikola (25 µg/mL), 0,2 % glukoze in 0,04 % Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ter celice inkubirali preko noči s stresanjem na 37 °C in 180 rpm. Vseh 10 mL smo nato prenesli v 500 mL gojišča M9 z dodanim kloramfenikolom (25 µg/mL), 0,2 % glukozo in 0,04 % Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ter celice gojili s stresanjem na 37 °C in 180 rpm do optične gostote 0,8 pri valovni dolžini 600 nm. Sintezo mikrorazdelkov smo sprožili z dodatkom 0,4 % araboze ter celice še 1 uro gojili s stresanjem pri 37 °C in 180 rpm. Nato smo celotno bakterijsko kulturo centrifugirali 15 min pri 8000 g. Supernatant smo po centrifugiranju zavrgli, usedlino pa shranili pri -20 °C.

### 3.2.2.2 Afinitetna izolacija mikrorazdelkov

Najprej smo pripravili mešanico za lizo celic, tako da smo zmešali blagi detergent za izolacijo proteinov iz celic, B-PER (4 mL/g celic), lizocim (0,1 mg/mL), benzonazo (5 U/mL), RNazo A (20 µg/mL) in proteazne inhibitorje (1 tableta/10 mL mešanice) ter s to mešanico resuspendirali celično usedlino in nato celotno mešanico inkubirali 15 min pri sobni temperaturi. S centrifugiranjem celične suspenzije pri 15000 g, 4 °C za 5 min, smo ločili vodotopne proteine od membran in ostalih nečistoč.

Za afinitetno izolacijo mikrorazdelkov smo 1 mL suspenzije Strep-Tactin®XT Superflow® high capacity 50 % suspension (500 µL agaroznih kroglic) nanesli na gravitacijsko kolono. Kroglice smo sprali z 2 mL pufra za spiranje, nato pa na kolono nanesli celični lizat ter upočasnili pretok. Z dodatkom 2,5 mL pufra za spiranje smo sprali s kroglic proteine, ki so se na kroglice vezali s šibkimi interakcijami. Vezane proteine smo s kolone odstranili z dodatkom 1,5 mL pufra za elucijo, ki vsebuje 50 mM biotin.

### 3.2.2.3 Obarvanje proteinov s TCA

Ker so eluirani proteini zaradi komponent elucijskega pufra zelo slabo potovali v električnem polju, smo jih pred nanosom na gelsko elektroforezo oborili s TCA. Na 1 mL vzorca smo dodali 312 µL 100 % TCA in potem inkubirali vzorce 10 min na ledu. Da bi ločili supernatant od oborine, smo vzorce centrifugirali 12 min pri 16000 g in 4 °C. Supernatant smo odstranili, pelet pa sprali z ledeno hladnim acetonom. Vzorce smo zopet inkubirali na ledu 10 min in ponovili centrifugiranje pri 16000 g, 4 °C za 12 min. Supernatant smo zavrgli, pelet pa ponovno sprali z acetonom in ponovili centrifugiranje. Zopet smo odstranili celoten supernatant, epice s peleti pa pustili z odprtimi pokrovi na sobni temperaturi, tako da je ves aceton izhlapel.

### 3.2.2.4 Preverjanje ustreznosti velikosti proteinov z NaDS - poliakrilamidno gelsko elektroforezo

NaDS je detergent, ki se nespecifično veže na proteine in jih tako denaturira. Proteinske vzorce smo pripravili tako, da smo pelet dobljen po obarvanju resuspendirali v 10 µL dH<sub>2</sub>O, 10 µL nanašalnega pufra »NuPAGE™ LDS Sample Buffer« in 100 mM DTT. Vzorce smo nato inkubirali 5 min pri 100°C in na koncu celoten volumen nanesli v jamice gela. Za proteinski standard smo uporabili lestvico »PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa«.

Elektroforeza je potekala 35 min pri stalni napetosti 200 V. Gel smo potem ločili od plastike in ga trikrat po 5 min spirali s stresanjem v 100 mL dH<sub>2</sub>O. Gel smo nato barvali z barvilom »SimplyBlue™ SafeStain« po navodilih proizvajalca. Na koncu smo s spiranjem gela v dH<sub>2</sub>O odstranili odvečno barvilo v gelu, tako da so ostali obarvani le proteini.

## 3.2.3 Epifluorescenčna mikroskopija

Z epifluorescenčno mikroskopijo lahko opazujemo preparate, ki vsebujejo molekule, ki fluorescirajo. V našem primeru je to EGFP, ki je spojen z LacI. Za pripravo preparata smo najprej eno ezo celic seva BW25113 z vstavljenim plazmidom pACBSR\_pdu\_LacIEGFP ali

pACBSR-DL1\_LacIEGFP odvzetih iz trdnega gojišča LB z ustreznim antibiotikom resuspendirali v 1 mL gojišča M9 z dodatkom 0,4% arabinoze in 0,04%  $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$  ter celice inkubirali s stresanjem 1 uro pri 37 °C in 180 rpm. Celično kulturo smo nato centrifugirali pri 5000 g, 5 min. 500  $\mu$ L supernatanta smo odstranili, v preostalem gojišču pa resuspendirali celično usedlino.

Da bi bakterijske celice fiksirali, smo objektno steklo premazali z 10  $\mu$ L poli-L-lizina in počakali, da se posuši. Nato smo na objektno steklo nanесли še 5  $\mu$ L resuspendiranih celic in jih prekrili s krovnim steklom. Za opazovanje fluorescence EGFP, smo preparate obsevali z valovno dolžino 488 nm in uporabili filter, ki prepušča svetlobo 508 nm. Slike so bile zajete pri 400x povečavi.

## 4 REZULTATI

### 4.1 SPROŽITEV SINTEZE BAKTERIJSKIH MIKORAZDELKOV

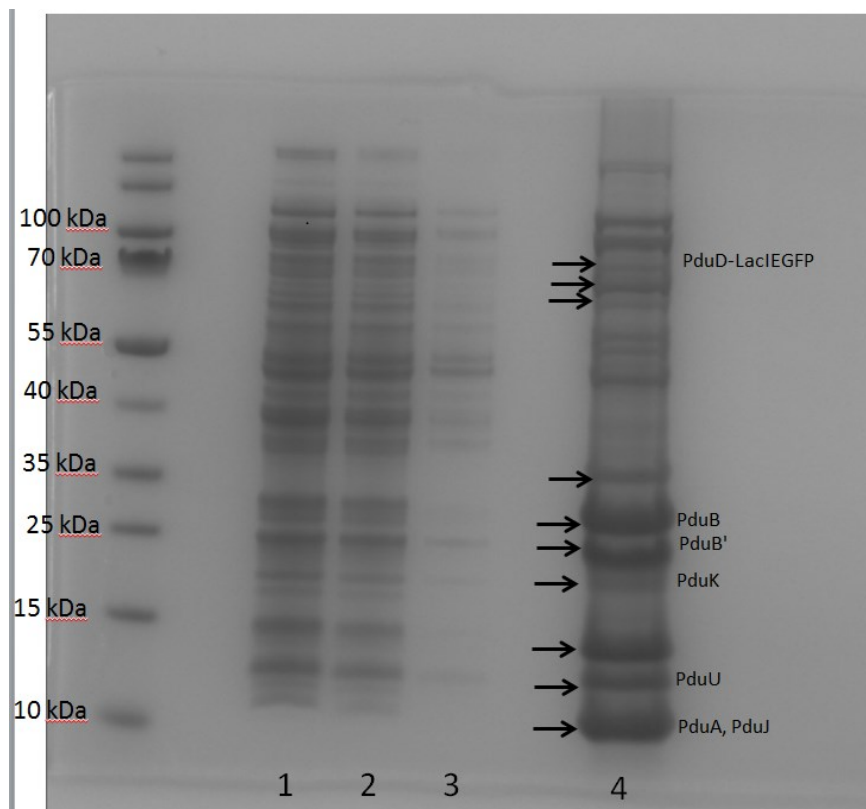
Kulturi bakterij *E. coli* BW25113 pACBSR\_pdu\_LacIEGFP gojeni v minimalnem mediju z glukozo smo v eksponentni fazi rasti dodali 0,4 % L-arabinozo in tako sprožili prepis genov za podenote mikrorazdelkov ter samo-sestavljanje mikrorazdelkov. Poleg tega, hkrati sprožimo tudi sintezo skljojpljenega proteina PduD<sup>1-18</sup>-LacI-EGFP, ki se zaradi dodane signalnega zaporedja PduD usmeri v mikrorazdelek.

### 4.2 IZOLACIJA BAKTERIJSKIH MIKORAZDELKOV

Pripravili smo protokol za izolacijo mikrorazdelkov, ki temelji na lizi produkcijskih celic z blagimi detergenti in afinitetno izolacijo z značko »twin-strep-tag« označenih mikrorazdelkov (protokol opisan v poglavju Metode). Po afinitetni izolaciji smo na poliakrilamidni gel nanесли štiri različne vzorce, in sicer proteine, ki se niso vezali na stacionarno fazo (agarozne kroglice prevlečene s »strep-tactinom XT«), proteini, ki so se sprali s kolone po prvem spiranju, proteini, ki so se sprali s kolone po drugem spiranju in pa končna elucija. Vse vzorce smo pred nanosom oborili s TCA. S tem smo skoncentrirali proteine pred nanosom na gel, z obarjanjem pa smo se znebili tudi težav s komponentami pufra, ki so vplivale na potovanje vzorcev v električnem polju.

S prvimi tremi vzorci smo preverjali, če se tarčni proteini sploh vežejo na kolono, oziroma če se vežejo na kolono z dovolj močnimi interakcijami. V eluciji smo pričakovali profil lis, kot je opisan v literaturi. Želeli pa smo izolirati tudi PduD<sup>1-18</sup>-LacI-EGFP, ki naj bi bil zapakiran v mikrorazdelku.

Iz poliakrilamidnega gela je pri eluciji razvidna najmočnejša lisa, ki predstavlja protein molekulske mase kot je PduA, ko je s »Twin-strep-tagom«. Na gelu so v vzorcu elucije vidne lise, ki ustrezajo velikostim proteinov PduB, PduB', PduK in PduU. Označene lise smo izrezali iz gela in jih poslali na analizo z masnim spektrometrom Orbitrap, ki so jo za nas opravili na Univerzi v Birminghamu, Anglija. Potrdili smo prisotnost PduD<sup>1-18</sup>-LacI-EGFP ter prisotnost ostalih proteinov mikrorazdelka, kot je tudi označeno na gelu.



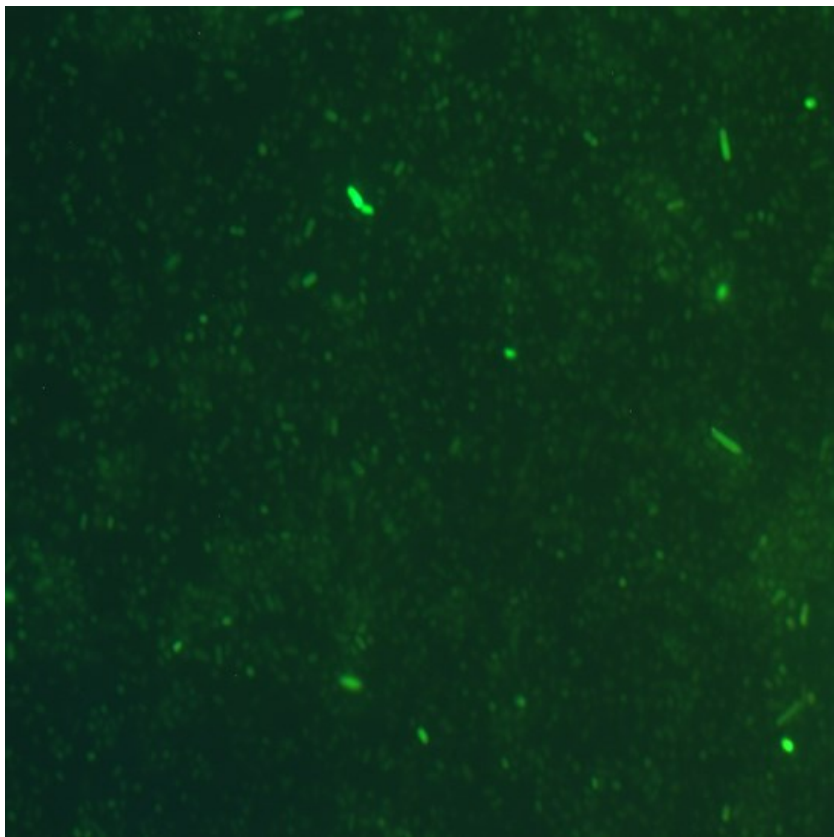
Slika 3: Ločba vzorcev pridobljenih tekom izolacije mikrorazdelkov z 12 % NaDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo. 1 – Proteini, ki se niso vezali na stacionarno fazo; 2 – Proteini, ki so se sprali s kolone po prvem spiranju; 3 – Proteini, ki so se sprali s kolone po drugem spiranju; 4 – Elucija proteinov s stacionarne faze. S puščicami so označene lise, ki so bile izrezane iz gela in poslane na analizo z masno spektrometrijo.

### 4.3 EPIFLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA

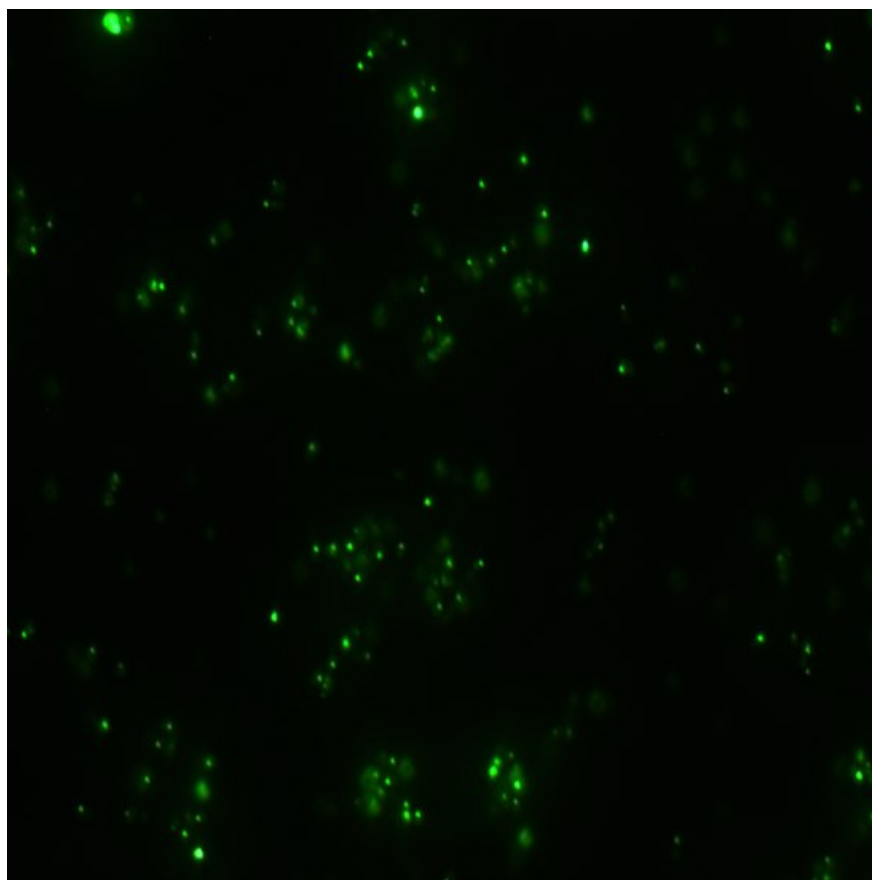
Analizirali smo prisotnost mikrorazdelkov pakiranih s PduD<sup>1-18</sup>-LacI-EGFP v sevu BW25113. Kot kontrolni eksperiment smo pripravili tudi sev s plazmidom pACBSR-DL1\_LacIEGFP, ki ima zapis le za protein LacI-EGFP, ne nosi pa genov za sintezo podenot mikrorazdelka.

Na slikah 4-5 se vidi razlika v razporeditvi signala fluorescenčnega proteina po citoplazmi bakterije. Pri kontrolnih bakterijah fluorescira celotna citoplazma celice, medtem ko v primeru, da bakterije sintetizirajo tudi mikrorazdelke Pdu vidimo točkovni signal EGFP. Slednje potrjuje lokalizacijo PduD<sup>1-18</sup>-LacI-EGFP v mikrorazdelku. Obe sliki sta bili narejeni pri 400x povečavi.

Zaradi različne intenzitete fluorescence med vzorcema je tudi ozadje različno, saj je čas osvetlitve odvisen od tega, koliko signala dobi kamera. Pri kontroli je bilo očitno manj signala, zato je tudi ozadje nekoliko bolj zeleno. Zaključimo lahko, da smo uvedli enostaven postopek izolacije mikrorazdelkov ter pripravili protokol, s katerim lahko lokaliziramo transkripcijski faktor v mikrorazdelek.



Slika 4: Fluorescenčna mikroskopija celic z vstavljenim plazmidom pACBSR-DL1\_LacIEGFP pri 400x povečavi. PduD<sup>1-18</sup>-LacI-EGFP se nahaja po celotni citoplazmi.



Slika 5: Fluorescenčna mikroskopija celic z vstavljenim plazmidom pACBSR\_pdu\_LacIEGFP pri 400x povečavi. Fluorescenca EGFP je lokalizirana v posamezne točke v mikrorazdelkih.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Prisotnost celičnih organelov je ena najpomembnejših evlucijskih pridobitev evkariontskih celic. Do nedavnega je veljalo, da je ena izmed značilnosti prokariontskih celic prav odsotnost celičnih organelov, a izkazalo se je, da je to prepričanje napačno. Danes je znano, da ima kar 17% vseh posekveniranih bakterijskih genomov zapise za tvorbo mikrorazdelkov (Jorda in sod., 2013). Ti so za razliko od evkariontskih organelov sestavljeni izključno iz proteinov, udeleženi pa so v metabolizmu celice. Kompartimentalizacija metabolizma prinaša organizmu prednost, saj so tako encimi skoncentrirani na enem mestu, zaradi česar je produkcija določenega produkta učinkovitejša, encimi so zavarovani pred različnimi agensi iz citosola, ki bi jih lahko inhibirali, hkrati pa organeli preprečujejo prosto difuzijo toksičnih intermediatov, ki bi lahko negativno vplivali na ostale dele celice. Zaradi vseh teh razlogov so mikrorazdelki zaželeni tudi iz biotehnološkega vidika (Frank in sod., 2013).

## 5.1 SINTEZA BAKTERIJSKIH MIKRORAZDELKOV

Geni potrebni za sintezo mikrorazdelkov so bili preklonirani v vektor pACBSR-DL1. Ta vektor že vsebuje gena za kvasno meganukleazo I-SceI in Gam protein, ki pa v tem diplomskem delu nista bila obravnavana (Butala in sod., 2009). Naknadno je bil v vektor dodan še gen za  $pduD^{1-18}$ -LacI-EGFP. Vsi omenjeni geni so pod kontrolo promotorja  $P_{BAD}$ . Za sprožitev prepisa genov je potrebna prisotnost L-arabinoze in pa nizka visoka koncentracija cAMP, zato smo v eksponentni fazi bakterijski kulturi, ki je rastla v minimalnem gojišču dodali L-arabinozo (Guzman in sod., 1995).

## 5.2 OB IZOLACIJI OSTANEJO MIKRORAZDELKI PDU INTAKTNI

Da bi dosegli enostavnejšo in učinkovitejšo izolacijo mikrorazdelkov, smo uporabili gen za podenoto PduA, kateri smo na N-terminalni konec dodali zapis za »Twin-strep-tag«. Ta zapis omogoča afinitetno izolacijo s pomočjo »Strep-tactin« agaroznih kroglic (Schmidt in sod., 2013). Za dodatek »Twin-strep-taga« smo izbrali PduA, ker je njegov N – terminal obrnjen v zunanost mikrorazdelka in ker je bilo že dokazano, da se lahko mikrorazdelki ustrezno sestavljajo tudi, če je PduA spojen s fluorescenčnim proteinom mCherry (Crowley in sod., 2010; Parsons in sod., 2010). Uspešno izolacijo mikrorazdelkov smo potrdili s primerjavo rezultatov NaDS poliakrilamidne gelske elektroforeze z rezultati opisanimi v literaturi. Dejstvo, da na gelu vidimo vse podenote Pdu razen PduN, nam potrди, da smo izolirali celotne mikrorazdelke in ne zgolj afinitetno označene podenote PduA. Poleg tega na gelu vidimo liso ustrezne velikosti in smo z masno spektrometrijo tudi potrdili prisotnost proteina  $PduD^{1-18}$ -LacI-EGFP, torej proteina, ki se v celici zapakira v mikrorazdelkih. Obe ugotovitvi kažeta na to, da prek PduA izoliramo iz bakterij intaktne mikrorazdelke.

## 5.3 ZAPAKIRANJE POLJUBLNEGA PROTEINA V MIKRORAZDELKU

Z dodatkom prvih 18 aminokislinskih ostankov proteina PduD na N-terminalni konec represorja LacI, lahko dosežemo njegovo učinkovito zapakiranje v mikrorazdelku. To smo dokazali z epifluorescenčno mikroskopijo, saj smo modificiran LacI spojili s fluorescenčnim proteinom EGFP. Za opazovanje fluorescence EGFP smo preparat obsevali s svetlobo valovne dolžine 488 nm. EGFP pri obsevanju s to valovno dolžino oddaja močno zeleno svetlobo. V primeru, ko je bil v celicah izražen LacIEGFP brez prisotnosti mikrorazdelkov, lahko vidimo, da signal EGFP zaznamo po celotni citoplazmi. Ko pa so bili v celicah tvorjeni tudi mikrorazdelki, smo opazili, da EGFP sveti v posameznih točkah, kar nakazuje na lokalizacijo  $PduD^{1-18}$ -LacI-EGFP v omejenem prostoru. S tem smo uspešno realizirali zastavljena cilja te naloge.



## 6 VIRI

- Aussignargues C., Paasch B. C., Gonzalez-Esquer R., Erbilgin O., Kerfeld C. A. 2015. Bacterial microcompartment assembly: The key role of encapsulation peptides. *Communicative and Integrative Biology*, 8, 3, doi: 10.1080/19420889.2015.1039755: 10 str.
- Badger M. R., Price G. D. 2003. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: Molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany*, 54, 383: 609–622
- Bernhardt T.G., Roof W.D., Young R. 2000. Genetic evidence that the bacteriophage phi X174 lysis protein inhibits cell wall synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 8: 4297-4302
- Bobik T. A. 2006. Polyhedral organelles compartmenting bacterial metabolic processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 5: 515-525
- Bobik T. A., Havemann G. D., Busch R. J., Williams D. S., Aldrich H. C. 1999. The propanediol utilization (pdu) operon of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2 includes genes necessary for formation of polyhedral organelles involved in coenzyme B12-dependent 1,2-propanediol degradation. *Journal of Bacteriology*, 181, 19: 5967–5975
- Butala M., Busby S. J., Lee D. J. 2009. DNA sampling: A method for probing protein binding at specific loci on bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research*, 37, 5, doi: 10.1093/nar/gkp043: 6 str.
- Cai F., Dou Z., Bernstein S., Leverenz R., Williams E., Heinhorst S., Shively J., Cannon G.C., Kerfeld C. 2015. Advances in understanding carboxysome assembly in *Prochlorococcus* and *Synechococcus* implicate CsoS2 as a critical component. *Life*, 5, 2: 1141-1171
- Chen P., Andersson D.I., Roth J.R. 1994. The control region of the pdu/cob regulon in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 176, 17: 5474-5482
- Cheng S., Sinha S., Fan C., Liu Y., Bobik T. A. 2011. Genetic analysis of the protein shell of the microcompartments involved in coenzyme B12-dependent 1,2-propanediol degradation by *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 193, 6: 1385–1392
- Chowdhury C., Chun S., Pang A., Sawaya M. R., Sinha S., Yeates T. O., Bobik T. A. 2015. Selective molecular transport through the protein shell of a bacterial microcompartment organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 10: 2990–2995
- Conner C. P., Heithoff D. M., Julio S. M., Sinsheimer R. L., Mahan M. J. 1998. Differential patterns of acquired virulence genes distinguish *Salmonella* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 8: 4641–4645
- Crowley C. S., Cascio D., Sawaya M. R., Kopstein J. S., Bobik T. A., Yeates T. O. 2010. Structural insight into the mechanisms of transport across the *Salmonella enterica* Pdu microcompartment shell. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 48: 37838–37846
- Crowley C. S., Sawaya M. R., Bobik T. A., Yeates T. O. 2008. Structure of the PduU shell protein from the Pdu microcompartment of *Salmonella*. *Structure*, 16, 9: 1324–1332
- Dadswell K., Creagh S., Mccullagh E., Liang M., Brown I. R., Warren M. J., McNally A., MacSharry J., Prentice M. B. 2019. Bacterial microcompartment-mediated ethanolamine

- metabolism in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 87, 8, doi: 10.1128/IAI.00211-19: 17 str.
- Dryden K.A., Crowley C.S., Tanaka S., Yeates T.O. Yeager, M. 2009. Two-dimensional crystals of carboxysome shell proteins recapitulate the hexagonal packing of three-dimensional crystals. *Protein Science*, 18, 12: 2629–2635
- Erbilgin O., McDonald K. L., Kerfeld C. A. 2014. Characterization of a planctomycetal organelle: A novel bacterial microcompartment for the aerobic degradation of plant saccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 7: 2193–2205
- Fan C., Cheng S., Liu Y., Escobar C. M., Crowley C. S., Jefferson R. E., Yeates T.O., Bobik T. A. 2010. Short N-terminal sequences package proteins into bacterial microcompartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 16: 7509–7514
- Fan C., Cheng S., Sinha S., Bobik T. A. 2012. Interactions between the termini of lumen enzymes and shell proteins mediate enzyme encapsulation into bacterial microcompartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 37: 14995–15000
- Fan C., Bobik T. A. 2011. The n-terminal region of the medium subunit (pduD) packages adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase (pduCde) into the pdu microcompartment. *Journal of Bacteriology*, 193, 20: 5623–5628
- Frank S., Lawrence A. D., Prentice M. B., Warren M. J. 2013. Bacterial microcompartments moving into a synthetic biological world. *Journal of Biotechnology*, 163, 2: 273–279
- Guzman L. M., Belin D., Carson M. J., Beckwith J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P(BAD) promoter. *Journal of Bacteriology*, 177, 14: 4121–4130
- Havemann G. D., Bobik T. A. 2003. Protein structures forming the shell of primitive bacterial organelles involved in coenzyme B<sub>12</sub>-dependent degradation of 1,2-propanediol in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Journal of Bacteriology*, 185, 17: 5086–5095
- Huber I., Palmer D. J., Ludwig K. N., Brown I. R., Warren M. J., Frunzke J. 2017. Construction of recombinant Pdu metabolosome shells for small molecule production in *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synthetic Biology*, 6, 11: 2145–2156
- Jakobson C. M., Kim E. Y., Slininger M. F., Chien A., Tullman-Ercek D. 2015. Localization of proteins to the 1,2-propanediol utilization microcompartment by non-native signal sequences is mediated by a common hydrophobic motif. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 40: 24519–24533
- Jakobson C. M., Slininger Lee M. F., Tullman-Ercek D. 2017. De novo design of signal sequences to localize cargo to the 1,2-propanediol utilization microcompartment. *Protein Science*, 26, 5: 1086–1092
- Jeter R. 1990. Cobalamin-dependent 1,2-propanediol utilization by *Salmonella typhimurium*. *Journal of General Microbiology*, 136, 5: 887-896
- Jorda J., Lopez D., Wheatley N. M., Yeates T. O. 2013. Using comparative genomics to uncover new kinds of protein-based metabolic organelles in bacteria. *Protein Science*, 22, 2: 179–195

- Kerfeld C.A., Aussignargues C., Zarzycki J., Cai F., Sutter M. 2018. Bacterial microcompartments. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 5: 277-290
- Lawrence A. D., Frank S., Newnham S., Lee M. J., Brown I. R., Xue W. F., Rowe M.L., Mulvihill D.P., Prentice M.B., Howard M.J., Warren M. J. 2014. Solution structure of a bacterial microcompartment targeting peptide and its application in the construction of an ethanol bioreactor. *ACS Synthetic Biology*, 3, 7: 454–465
- Lee M. J., Mantell J., Hodgson L., Alibhai D., Fletcher J. M., Brown I. R., Frank S., Xue W.F., Verkade P., Woolfson D. N., Warren M. J. 2018. Engineered synthetic scaffolds for organizing proteins within the bacterial cytoplasm. *Nature Chemical Biology*, 14, 2: 142–147
- Liang M., Frank S., Lünsdorf H., Warren M. J., Prentice M. B. 2017. Bacterial microcompartment-directed polyphosphate kinase promotes stable polyphosphate accumulation in *E. coli*. *Biotechnology Journal*, 12, 3, doi: 10.1002/biot.201600415: 27 str.
- Parsons J. B., Dinesh S. D., Deery E., Leech H. K., Brindley A. A., Heldt D., Frank S., Smales C.M., Lünsdorf H., Rambach A., Gass M.H., Bleloch A., McClean K.J., Munro A.W., Rigby S.E., Warren M.J., Prentice M. B. 2008. Biochemical and structural insights into bacterial organelle form and biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 21: 14366–14375
- Parsons J. B., Frank S., Bhella D., Liang M., Prentice M. B., Mulvihill D. P., Warren M. J. 2010. Synthesis of empty bacterial microcompartments, directed organelle protein incorporation, and evidence of filament-associated organelle movement. *Molecular Cell*, 38, 2: 305–315
- Penrod J. T., Roth J. R. 2006. Conserving a volatile metabolite: a role for carboxysome-like organelles in *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 188, 8: 2865–2874
- Rae B. D., Long B. M., Badger M. R., Price G. D. 2013. Functions, compositions, and evolution of the two types of carboxysomes: Polyhedral microcompartments that facilitate CO<sub>2</sub> fixation in Cyanobacteria and some Proteobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 3: 357–379
- Ravcheev D. A., Moussu L., Smajic S., Thiele I. 2019. Comparative genomic analysis reveals novel microcompartment-associated metabolic pathways in the human gut microbiome. *Frontiers in Genetics*, 10, 636, doi: 10.3389/FGENE.2019.00636: 15 str.
- Sampson E. M., Bobik T. A. 2008. Microcompartments for B<sub>12</sub>-dependent 1,2-propanediol degradation provide protection from DNA and cellular damage by a reactive metabolic intermediate. *Journal of Bacteriology*, 190, 8: 2966–2971
- Schmidt T. G. M., Batz L., Bonet L., Carl U., Holzapfel G., Kiem K., Matulewicz K., Niermeier D., Schuchardt I., Stanar K. 2013. Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein Expression and Purification*, 92, 1: 54–61
- Tanaka S., Sawaya M.R., Phillips M., Yeates T.O. 2009. Insights from multiple structures of the shell proteins from the  $\beta$ -carboxysome. *Protein Science*, 18, 1: 108–120
- Tanaka S., Sawaya M. R., Yeates T. O. 2010. Structure and mechanisms of a protein-based organelle in *Escherichia coli*. *Science*, 327, 5961: 81-84

Yung M. C., Bourguet F. A., Carpenter T. S., Coleman M. A. 2017. Re-directing bacterial microcompartment systems to enhance recombinant expression of lysis protein E from bacteriophage  $\phi$ X174 in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 16, 1, doi: 10.1186/s12934-017-0685-x: 17 str.