

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.278>

<https://orcid.org/0000-0002-7738-0369>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Aliona
AVIŽINIENĖ

Bakteriofago vB_EcoS_NBD2 kilmės nanovamzdelių pritaikymas baltyminių fragmentų eksponavimui

DAKTARO DISERTACIJA

Technologijos mokslai,
Chemijos inžinerija (T 005)

VILNIUS 2022

Disertacija paruošta 2016-2020 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos institute.

Mokslinius tyrimus parėmė Lietuvos mokslo taryba.

Mokslinė vadovė:

dr. Rasa Petraitytė-Burneikienė (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – T 005).

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.278>

<https://orcid.org/0000-0002-7738-0369>

VILNIUS UNIVERSITY

Aliona
AVIŽINIENĖ

The application of bacteriophage
vB_EcoS_NBD2 derived nanotubes
for the presentation of protein
fragments

DOCTORAL DISSERTATION

Technological sciences,
Chemical engineering (T 005)

VILNIUS 2022

This dissertation was prepared between 2016 and 2020 at Institute of Biotechnology, Life Sciences Centre of Vilnius University.

The research was partially supported by Research Council of Lithuania.

Academic supervisor:

dr. Rasa Petraitytė-Burneikienė (Vilnius University, Technological Sciences, Chemical Engineering – T 005).

TURINYS

SANTRUMPOS.....	8
ĮVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. Bendra bakteriofagų charakteristika.....	13
1.1.1. Bakteriofagų nesusitraukiančių ir lanksčių ataugų susirinkimo mechanizmas	16
1.1.2. Bakteriofagų ataugos vamzdelio struktūra	18
1.1.3. Bakteriofagas vB_EcoS_NBD2	23
1.2. Virusinės nanostruktūros.....	24
1.3. Virusinių nanostruktūrų modifikavimas genų inžinerijos ir cheminės konjugacijos metodais.....	27
1.3.1. Chimerinių ir mozaikinių nanostruktūrų kūrimas genų inžinerijos metodu	29
1.3.2. Nanostruktūrų modifikavimas cheminės konjugacijos metodu.....	32
1.4. Virusinių nanovamzdelių ypatybės	34
1.5. Virusinių nanostruktūrų pritaikymo galimybės.....	38
1.5.1. Virusinių nanostruktūrų imunogeniškumas ir jų pritaikymas vakcinų kūrimui.....	39
1.5.2. Virusinių nanostruktūrų pritaikymo galimybės vėžio gydymui	45
1.5.3. Virusinių nanostruktūrų pritaikymas genų terapijoje	47
1.5.4. Virusinių nanostruktūrų pritaikymas vaizdinimo tikslams.....	47
1.5.5. Nanostruktūrų pritaikymas elektronikoje	48
1.6. Rekombinantinių baltymų sintezės sistemos.....	49
1.6.1. Bakterijų sintezės sistema.....	49
1.6.2. Mielių sintezės sistema.....	50
1.6.3. Bakulovirusų-vabzdžių sintezės sistema	51
1.6.4. Augalų sintezės sistema.....	51
1.6.5. Beląstelinė sintezės sistema.....	52
1.7. Oportunistinė bakterija <i>Acinetobacter baumannii</i> ir prieš ją kuriamų vakcinų svarba.....	52
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	57
2.1. Medžiagos	57
2.1.1. Oligonukleotidų ir oligopeptidus koduojančios DNR sekos	57
2.1.2. Bakterijų ir mielių kamienai.....	58
2.1.3. Programinė įranga ir internetiniai įrankiai	58
2.2. Tyrimų metodai.....	60
2.2.1. Mielių raiškos vektorių konstravimas	60
2.2.2. Polimerazinė grandininė reakcija.....	60
2.2.3. DNR elektroforezė	61
2.2.4. DNR fragmentų gryninimas	61

2.2.5.	Plazmidinės DNR gryninimas	61
2.2.6.	Imlųjų <i>E. coli</i> ląstelių paruošimas ir transformacija.....	62
2.2.7.	Imlųjų <i>S. cerevisiae</i> ląstelių paruošimas ir transformacija.....	63
2.2.8.	<i>S. cerevisiae</i> auginimas ir heterologinių baltymų sintezės indukcija.....	65
2.2.9.	Mielių ląstelių mechaninis ardymas	65
2.2.10.	Tikslinių baltymų gryninimas iš mielių ląstelių	66
2.2.11.	Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis (NDS-PAGE) ir poliakrilamidinio gelio dažymas.....	68
2.2.12.	Tikslinių baltymų sintezės efektyvumo mielėse, jų koncentracijos ir baltymo gp39 gryninimo išeišos nustatymas.....	69
2.2.13.	Baltymų dializė.....	70
2.2.14.	Mielių ląstelių fluorescencinė analizė	71
2.2.15.	Virusinių nanostruktūrų stebėjimas elektroniniu mikroskopu	72
2.2.16.	Imunoblotas	72
2.2.17.	Netiesioginė imunofermentinė analizė (IFA)	73
2.2.18.	Pelių imunizacija	74
2.2.19.	Antikūnų titro nustatymas ir statistinė analizė	75
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	77
3.1.	Rekombinantinio baltymo gp39 sintezė bei jo formuojamų nanostruktūrų charakterizavimas.....	77
3.1.1.	Mielių raiškos vektoriaus konstravimas	77
3.1.2.	Baltymo gp39 sintezė mielėse ir gryninimas natyviomis sąlygomis.....	78
3.1.3.	Baltymo gp39 formuojamų nanostruktūrų analizė	80
3.2.	Baltymo gp39 formuojamų nanovamzdelių imunogeniškumo tyrimas.....	82
3.3.	Baltymo gp39 ir jo formuojamų nanovamzdelių stabilumo tyrimai	86
3.4.	Baltymo gp39 bioinformatinė analizė	93
3.5.	gp39 N ir C galo aminorūgščių bei prijungto 6x-His peptido įtakos savaiminiam susirinkimui į nanovamzdelius tyrimai.....	96
3.5.1.	Mielių raiškos vektorių konstravimas.....	96
3.5.2.	Baltymo gp39 variantų sintezė mielėse ir gebėjimo formuoti nanovamzdelius nustatymas	98
3.6.	Prie gp39 C galo prijungto 6x-His peptido lokalizacijos nustatymas nanovamzdelyje.....	101
3.7.	Baltymų gp39m ir gp39m_J sintezės mielėse efektyvumo ir jų gebėjimo susirinkti į nanostruktūras tyrimas	103
3.7.1.	Vektorių, koduojančių gp39m ir gp39m_J baltymus, konstravimas.....	103
3.7.2.	Baltymų gp39m ir gp39m_J sintezės efektyvumo mielėse ir savaiminio susirinkimo į nanostruktūras tyrimai	105

3.8. Chimerinių baltymų sintezės efektyvumo mielėse ir savaiminio susirinkimo tyrimas	107
3.8.1. Mielių raiškos vektorių konstravimas.....	107
3.8.2. Teorinis peptidų ir baltymų fizikinių ir cheminių savybių įvertinimas	108
3.8.3. Chimerinių baltymų su prijungtais modeliniais peptidais ir eGFP baltymu sintezės efektyvumo mielėse bei gebėjimo susirinkti į nanostruktūras nustatymas	111
3.8.4. Prijungtų modelinių peptidų 6x-His, Api-m4, HNTV170-181 ir baltymo eGFP įtakos chimerinių baltymų savybėms aptarimas....	116
3.9. Chimerinių baltymų su prijungtu eGFP erdvinio susilankstymo tyrimas.....	118
3.10. Nanovamzdelių su prijungtais <i>Acinetobacter baumannii</i> baltymų Blp1 ir OmpA fragmentais analizė.....	120
3.10.1. Blp1 ir OmpA baltyminių fragmentų pasirinkimas, jų charakterizavimas ir mielių raiškos vektorių konstravimas	121
3.10.2. Chimerinių baltymų su Blp1 ir OmpA fragmentais sintezė mielėse bei savaiminio susirinkimo į nanostruktūras nustatymas	124
3.10.3. Baltymų Blp1 ir OmpA fragmentų, prijungtų prie gp39, poveikio chimerinių baltymų savybėms aptarimas	127
3.11. Nanovamzdelių toleruojamų baltyminių fragmentų savybių apibendrinimas	128
APIBENDRINIMAS.....	130
IŠVADOS.....	131
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS.....	132
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	135
CURRICULUM VITAE	163
PADĖKA.....	165
UŽRAŠAMS	166

SANTRUMPOS

Santrumpa	Paaikškinimas
6x-His	Šešios histidino aminorūgštys;
Api-m4	Bičių <i>Apis mellifera</i> alergeno komponentas;
AR	aminorūgštis, -ys;
Blp1	Į BAP panašus baltymas 1 (angl. <i>BAP-like protein 1</i>);
BTI	Biotechnologijos institutas;
eGFP	Sustiprinto signalo žaliai fluorescuojantis baltymas (angl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>);
EGIS	Eukariotų genų inžinerijos skyrius;
gp39	Bakteriofago vB_EcoS_NBD2 g39 koduojamas ataugos vamzdelio baltymas;
GRAVY	Baltymo/peptido hidropatiškumo indeksas (angl. <i>grand average of hydropathy</i>);
HNTV	<i>Hantaan</i> virusas;
IgG	Imunoglobulinas G;
MAk	Monokloniniai antikūnai;
NBD2	Bakteriofagas vB_EcoS_NBD2;
NDS-PAGE	Elektroforezė poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis su NDS;
OmpA	Bakterijos išorinės membranos baltymas A (angl. <i>outer membrane protein A</i>);
PAA	Poliakrilamidas;
PAk	Polikloniniai antikūnai;
PBS	Fosfatinis buferinis tirpalas;
pI	Baltymo/peptido izoelektrinis taškas (angl. <i>isoelectric point</i>);
RE	Restrikcijos endonukleazė;
TEM	Transmisinė elektroninė mikroskopija;
VPD	Į virusus panašios dalelės (angl. <i>virus-like particles</i>);
VU GMC	Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centras.

ĮVADAS

Savaime susirenkančios virusinės nanostruktūros pasižymi dydžių ir formų įvairove bei gali būti modifikuojamos prijungiant baltymų fragmentus ar baltymus, taip suteikiant joms naujų funkcinių savybių. Virusinės nanostruktūros tapo svarbiu įrankiu įvairiose mokslo srityse bei gali būti pritaikytos elektros įrenginių, efektyvesnių ląstelių-taikinių vaizdinimo, terapinių medžiagų gabenimo įrankių bei saugių ir efektyvių vakcinų kūrimui.

Kuriant vakcinas prieš virusus ir bakterijas, taip pat vėžio ir lėtinių ligų gydymui, neretai susiduriama su pavienių baltymų ir peptidų, prieš kuriuos norima sukelti imuninį atsaką, mažu imunogeniškumu. Baltymų ir peptidų imunogeniškumą galima sustiprinti įvairiais būdais, tačiau vienas efektyviausių – virusinių nanostruktūrų panaudojimas. Šios nanostruktūros yra morfologiškai panašios į virusus ir labai imunogeniškos – jas sudarantys baltymai tvarkingai pasikartoja struktūros paviršiuje, todėl efektyviai sukelia humoralinį ir ląstelinį imuninį atsaką. Dėl šios priežasties, ir ant virusinių nanostruktūrų eksponuojami baltyminiai fragmentai tampa labiau imunogeniški. Tokios modifikuotos virusinės nanostruktūros jau yra naudojamos vakcinų kūrimui. Viena jų – licencijuota vakcina prieš maliariją Mosquirix™, kurią sudaro hepatito B viruso paviršinio baltymo HBsAg suformuota į virusus panaši dalelė, eksponuojanti prie jos prijungtus *Plasmodium falciparum* peptidus (Hawkes, 2015).

Nėra universalios virusinės nanostruktūros, kuri galėtų būti naudojama visiems biotechnologijos tikslams. Ta pati virusinė nanostruktūra neturėtų būti naudojama kaip nešiklis baltyminių fragmentų eksponavimui kuriant skirtingas vakcinas. Žmogaus organizme susidaręs išankstinis imuninis atsakas prieš virusinę nanostruktūrą formuojančius baltymus gali susilpninti pačios nanostruktūros arba ant jos eksponuojamų baltyminių fragmentų imunogeniškumą, o tai gali lemti sumažėjusį vakcinės efektyvumą (McCluskie *et al.*, 2016; Mok ir Chan, 2020). Be to, virusinių nanostruktūrų modifikavimas prie nanostruktūras formuojančių baltymų prijungiant baltyminius fragmentus skirtingai paveikia chimerinių baltymų erdvinį susilankstymą, gebėjimą formuoti nanostruktūras ir jų stabilumą (Peabody *et al.*, 2009; B. Zhang *et al.*, 2021). Nors virusinės nanostruktūros vis labiau tyrinėjamos nustatant jų pritaikymo galimybes biotechnologijoje ir medicinoje, tačiau, remiantis 2021 m. rugsėjo mėnesio duomenimis, yra atliekami tik 145 klinikiniai tyrimai pritaikant virusines nanostruktūras vakcinų kūrimui (<https://clinicaltrials.gov/>). Dėl šių priežasčių, naujų virusinių nanostruktūrų paieška, jų savybių ir stabilumo charakterizavimas bei galimybių prijungti baltyminius fragmentus įvertinimas, kaip ir šių baltyminių

fragmentų prijungimo tolerancijos savybių nustatymas, yra labai svarbūs nanostruktūrų biotechnologiniam pritaikymui ir vakcinų kūrimui.

2017 metais Lietuvoje buvo identifikuotas *Drexlerviridae* šeimai priklausantis bakteriofago vB_EcoS_NBD2 (NBD2) (Kalinienė *et al.*, 2017). *Escherichia coli* bakterijose susintetintas bakteriofago NBD2 ataugos vamzdelio baltymas gp39 formavo ilgus ir lanksčius nanovamzdelius (Šimoliūnas, 2017), tačiau nei jie, nei jų galimas pritaikymas biotechnologijoje toliau tiriama nebuvo. Kadangi virusinės nanostruktūros yra perspektyvi saugių vakcinų alternatyva, o vamzdelio formos struktūrų, eksponuojančių baltyminius fragmentus, nėra daug, todėl šiame darbe buvo charakterizuoti baltymo gp39 formuojami nanovamzdeliai įvertinant jų pritaikymą baltyminių fragmentų eksponavimui. Tam, kad nanovamzdeliai nebūtų užteršti endotoksinais, o ateityje juos pritaikant eukariotinės kilmės baltymų eksponavimui, kurie galėtų įgyti reikiamą erdvinį susilankstymą ir būtų modifikuojami potransliacinės modifikacijos metu, buvo pasirinkta *S. cerevisiae* mielių raiškos sistema.

Darbo tikslas

Ištirti bakteriofago vB_EcoS_NBD2 baltymo gp39 formuojamų nanovamzdelių pritaikymo galimybes baltyminių fragmentų eksponavimui ir vakcinų kūrimui.

Darbo uždaviniai

1. *S. cerevisiae* mielių raiškos sistemoje susintetinti bakteriofago NBD2 baltymą gp39 ir įvertinti jo gebėjimą formuoti nanovamzdelius.
2. Ištirti baltymo gp39 formuojamų nanovamzdelių imunogeniškumą pelėse ir stabilumą veikiant įvairiems aplinkos veiksniams.
3. Nustatyti gp39 N ir C galuose esančių aminorūgščių svarbą savaiminiam susirinkimui į nanovamzdelius.
4. Nustatyti prie gp39 N arba C galo prijungtų baltyminių fragmentų poveikį chimerinių baltymų savaiminiam susirinkimui į nanovamzdelius.
5. Įvertinti gp39 formuojamų nanovamzdelių pritaikymo galimybes eksponuoti *Acinetobacter baumannii* bakterijos paviršiaus baltymų fragmentus.

Dalis tyrimų buvo atlikta vykdant Lietuvos Mokslo Tarybos (LMT) finansuojamą studentų mokslinę praktiką: 09.3.3-LMT-K-712-15-0080 „NBD2 bakteriofago uodegėlės vamzdelio savitvarkių struktūrų polimerizacijos tyrimai“ (vadovė dr. Rasa Petraitytė-Burneikienė).

2019 metais buvo gauta LMT finansuojama doktoranto stipendija už akademinis pasiekimus.

Darbo aktualumas ir mokslinis naujumas

Atsirandant naujiems virusams, plintant jų atmainoms, kylant epidemijoms ir pandemijoms bei didėjant atsparumą antibiotikams įgaunančių bakterijų skaičiui, auga poreikis kurti efektyvias ir saugias vakcinas, o tam gali būti naudojamos virusinės nanostruktūros.

NBD2 bakteriofago ataugos vamzdelio baltymas gp39, kuris savaime susirinko į ilgus (kai kurie buvo 3,95 μm ilgio) ir lanksčius nanovamzdelius, buvo pirmą kartą susintetintas *Saccharomyces cerevisiae* mielėse. Iki šiol fagų ataugos vamzdelio baltymo savaiminis susirinkimas į nanostruktūras buvo gana ribotai tiriamas (Arnaud *et al.*, 2017; Dunn, 1996; Langlois *et al.*, 2015; Leonard *et al.*, 1973; Xu *et al.*, 2013), todėl mielėse suformuoti baltymo gp39 nanovamzdeliai ir nustatytos gp39 savaiminiam susirinkimui svarbios dalys suteikė naujų žinių apie bakteriofagų ataugos vamzdelio baltymo savybes ir apie jų pritaikymą nanostruktūrų kūrimui.

Buvo nustatyta, kad baltymas gp39 ir jo formuojami nanovamzdeliai yra stabilūs įvairiose aplinkos sąlygose. Neigiamo poveikio nanovamzdelių stabilumui neturėjo kaitinimas, šaldymas, skaldymas tripsino proteaze, denatūravimas karbamidu bei inkubavimas tirpaluose, kurių pH kito nuo 3,2 iki 9,6. Šie rezultatai rodo, kad dėl tokio savo stabilumo gp39 formuojami nanovamzdeliai galėtų būti naudojami įvairiems biotechnologijos tikslams – ląstelių vaizdinimui, geriamų vakcinų kūrimui ar tikslinių medžiagų gabenimui į ląsteles (Asor *et al.*, 2020; Serradell *et al.*, 2019).

Buvo pademonstruota, kad *S. cerevisiae* mielėse susintetinto baltymo gp39 formuojami nanovamzdeliai yra imunogeniški: pelėms sukėlė humoralinį imuninį atsaką net ir nenaudojant adjuvantų. Taip pat baltymo gp39 formuojami nanovamzdeliai buvo pirmą kartą pritaikyti prijungtų baltyminių fragmentų eksponavimui. Buvo įvertintas prie gp39 C galo prijungtų modelinių peptidų ir žaliai fluorescuojančio baltymo eGFP fizikinių ir cheminių savybių poveikis chimerinių baltymų gebėjimui formuoti nanovamzdelius. Atliktas tyrimas yra svarbus pritaikant gp39 formuojamus nanovamzdelius, ar net kitas virusines nanostruktūras, baltyminių fragmentų eksponavimui. Juo labiau kad baltyminių fragmentų eksponavimas ant fagu

paviršiaus ir ant fagų ataugos vamzdelio baltymo formuojamų nanostruktūrų iki šiol nebuvo detaliai tirtas, nes ataugą turintys bakteriofagai buvo labiau tyrinėjami analizuojant jų sandarą (Dunn, 1995, 1996; Gupta *et al.*, 2003; Maruyama *et al.*, 1994; Pavoni *et al.*, 2013). Šiame darbe nustatytos baltyminių fragmentų savybės leis sėkmingiau pasirinkti baltymo dalis, kurių prijungimas prie gp39 mažiausiai paveiktų chimerinių baltymų gebėjimą formuoti nanostruktūras.

Šiame darbe buvo pirmą kartą pademonstruota, kad bakteriofago NBD2 baltymo gp39 formuojami nanovamzdeliai yra tinkami bakterijos *Acinetobacter baumannii* išorinės membranos baltymo OmpA fragmentų eksponavimui. Nors *A. baumannii* yra daugeliui antibiotikų atspari, viena pavojingiausių oportunistinių bakterijų, tačiau prieš ją dar nėra sukurtos vakcinos (Willyard, 2017; World Health Organization, 2017). Bakterijos paviršiuje esančios konservatyvaus baltymo OmpA dalys galėtų būti puikus vakcinos kandidatas prieš skirtingus *A. baumannii* bakterijos izoliatus (Badmasti *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2012), o mielėse susintetinti nanovamzdeliai yra potencialus įrankis imuninio atsako sužadinimui prieš ant jų eksponuojamą baltymo OmpA fragmentą.

Ginamieji teiginiai

1. *S. cerevisiae* mielėse susintetintas bakteriofago vB_EcoS_NBD2 baltymas gp39 gali savaime susirinkti į nanovamzdelius.
2. Baltymo gp39 formuojami nanovamzdeliai yra imunogeniški pelėse ir išlieka stabilūs juos kaitinant, šaldant, skaldant tripsinu, denatūruojant karbamidu bei inkubuojant skirtingas pH reikšmes turinčiuose buferiniuose tirpaluose.
3. Baltymo gp39 gebėjimui formuoti nanovamzdelius yra svarbios N ir C galuose esančios aminorūgštys.
4. Prie gp39 N galo prijungti baltyminiai fragmentai sutrikdo savaiminį susirinkimą į nanovamzdelius, tačiau nanovamzdeliai gali būti formuojami jei prie gp39 C galo yra prijungiami neilgi, hidrofiliški, chimerinių baltymų krūvio žymiai nekeičiantys ir β klosčių neformuojantys baltyminiai fragmentai.
5. Baltymo gp39 formuojami nanovamzdeliai yra tinkami *A. baumannii* bakterijos išorinės membranos baltymo OmpA fragmentų eksponavimui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Bendra bakteriofagų charakteristika

Bakteriofagai (sutrumpintai fagai) yra bakterijas infekuojantys virusai. Manoma, kad jų skaičius Žemėje gali siekti net 10^{31} , o tai yra apie 10 kartų daugiau nei jų infekuojamų ląstelių-šeimininkų – bakterijų skaičius (Hendrix, 2003; Mushegian, 2020). Fagų atradimo datos yra kelios: šiuos virusus nepriklausomai atrado 1915 m. Didžiosios Britanijos patologas F. Twortas (Frederick Twort) bei 1917 m. Pastero institute dirbęs mikrobiologas F. d'Herelis (Félix d'Hérelle) (Ackermann, 2011; D'Hérelle, 1917). Šiuo metu NCBI duomenų bazėje patalpinta virš 163 tūkstančių virusų genomų, iš kurių 11400 priklauso bakteriofagams (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, duomenys tikrinti 2021 03 21). Fagai, turintys ataugas, prijungtas prie kapsidės su supakuotu dvigrandininiu DNR (dgDNR) genomu, priklauso *Caudovirales* būriui (lot. *Cauda* reiškia *į uodegą panašių struktūrą* – ataugą) ir sudaro ~ 85 % identifikuotų bakteriofagų (Dion *et al.*, 2020).

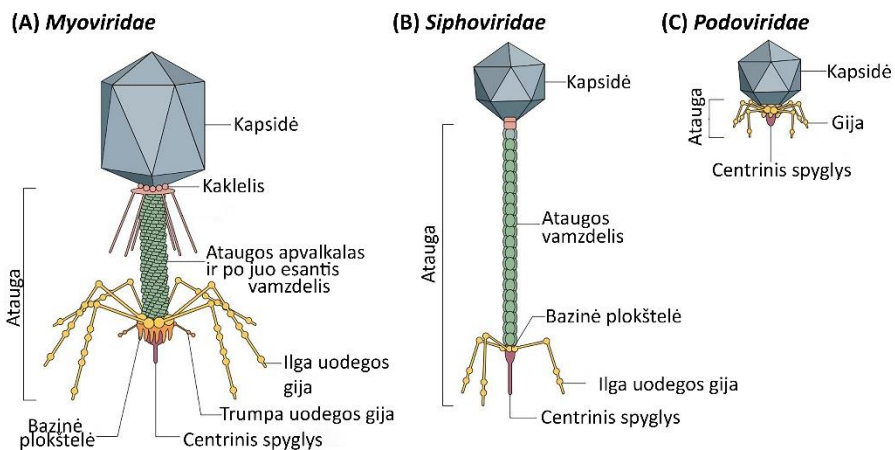
Fagai pasižymi milžiniška įvairove, pasireiškiančia morfologiniais skirtumais (filamentinės, ikosaedrinės, kompleksinės (sudėtingos) ir pleomorfinės struktūros), genomo dydžiu, ataugų sandara (lankstumu, ataugos susitraukimo galimybe), ataugų ilgiais (Ackermann, 2009; Dion *et al.*, 2020; Krupovic *et al.*, 2011). Daugumos bakteriofagų genomą sudaro dgDNR, tačiau taip pat gali būti aptinkama viengrandininė DNR (vgDNR), vgRNR ar dgRNR. Fago genomą gaubia baltyminė kapsidė, apsauganti nuo neigiamų aplinkos veiksnių, o kai kurių fagų kapsides papildomai gali gaubti iš ląstelės-šeimininkės membraninių organelių arba iš plazminės membranos susidaręs lipidinis sluoksnis (Lorizate ir Kräusslich, 2011; Lyytinen *et al.*, 2019).

Ilgą laiką *Caudovirales* būrį sudarė trys šeimos: *Myoviridae* (miovirusai), *Siphoviridae* (sifovirusai) ir *Podoviridae* (podovirusai), tačiau tobulėjant metagenominei ir bioinformatinei analizei, didėjo identifikuotų virusų skaičius ir keitėsi jų taksonomija (Adriaenssens *et al.*, 2018). Atrasti nauji miovirusai, sifovirusai ir podovirusai arba bakteriofagai, anksčiau priklausę *Myoviridae*, *Siphoviridae* ir *Podoviridae* šeimoms, tapo naujai sukurtų šeimų atstovais. Remiantis Tarptautinio virusų taksonomijos komiteto (ICTV) 2021 m. kovo mėn. duomenimis, *Caudovirales* būrį sudaro 9 šeimos: *Ackermanviridae*, *Autographiviridae*, *Chaseviridae*, *Demerecviridae*, *Drexelvriidae*, *Helleliridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>). *Drexelvriidae* šeimą sudaro į T1 fagą panašūs virusai, kurie anksčiau priklausė *Siphoviridae* šeimai ir tik 2019 m. buvo priskirti *Drexelvriidae* šeimai (Adriaenssens, 2020). Literatūros

apžvalgoje plačiau bus aptariamoms trys dominuojančios ir geriausiai iširtos fagų šeimos – *Myoviridae*, *Siphoviridae* ir *Podoviridae*, daugiau dėmesio bus skiriama ataugų struktūroms (1 pav.).

Caudovirales fagų genomą sudaro linijinė dgDNR, apgaubta ikosaedrine arba išilgai ataugos ašies ištesa kapside ir prie jos besijungiančia spiralinės simetrijos atauga (Krupovic *et al.*, 2011). Sifovirusų ir miovirusų ataugos distaliniame gale aptinkama bazinė plokštelė su prie jos prisitvirtinusiomis, ląstelių-šeimininkų atpažinimui skirtomis fibrilinėmis struktūromis (gijomis). Šios struktūros yra skirstomos į trumpąsias ir ilgąsias ataugos gijas, o centrinė ataugos gija vadinama spygliu (Campbell *et al.*, 2020; Nobrega *et al.*, 2018). Paprastai gijų galuose yra išsidėstę su ląstelių-šeimininkų paviršiuje esančiais receptoriais sąveikaujantys RBP (angl. *receptor binding protein*), kurie iš esmės ir lemia fagų specifiškumą bakterijoms (Goulet *et al.*, 2020; Spinelli *et al.*, 2006; Zivanovic *et al.*, 2014).

Bakteriofagų ataugos pasižymi ypatingai didele įvairove (Campbell *et al.*, 2020; Nobrega *et al.*, 2018). *Myoviridae* šeimą sudaro fagai su susitraukiančiomis, nelanksčiomis ataugomis, kurių didžiąją dalį sudaro susitraukiantis apvalkalas ir po juo esantis vamzdelis. Tipinis miovirusų pavyzdys yra modeliniu virusu tapęs T4 bakteriofagas, kurio ataugos apvalkalo susitraukimo mechanizmas buvo tapęs detaliam tyrinėjimu objektu (Aksyuk *et al.*, 2009; Leiman ir Shneider, 2012; Taylor *et al.*, 2016). *Siphoviridae* fagai pasižymi nesusitraukiančiomis, tačiau lanksčiomis ataugomis. Modelinis sifovirusas – bakteriofagas lambda, tapęs molekulinės biologijos ir virusologijos dogma (Pell *et al.*, 2009a; Rajagopala *et al.*, 2011). *Podoviridae* šeimos virusams būdingos itin trumpos, nesusitraukiančios ataugos. Podovirusai bazinės plokštelės neturi, todėl šoninės gijos ir centrinis spyglys tvirtinasi tiesiogiai prie ataugos (Cuervo *et al.*, 2013). *Podoviridae* šeimai priklauso fagai T7, P22, φ28 ir daugelis kitų (Fokine ir Rossmann, 2014) (1 pav.).



1 pav. Myoviridae, Siphoviridae ir Podoviridae šeimoms priklausančių bakteriofagų schematinis pavaizdavimas. (A) Miovirusai turi nelanksčias ataugas, kurių didžiąją dalį sudaro susitraukiantis apvalkalas ir po juo esantis vamzdelis. **(B)** Sifovirusų ataugos lanksčios, nesusitraukiančios, didžiąją dalį sudaro ataugos vamzdelio baltymas. Miovirusų ir sifovirusų ataugų gale yra bazinė plokštelė, prie kurios prisitvirtina gijos ir spygliai. **(C)** Podovirusų ataugos trumpos, be bazinės plokštelės, todėl centrinė ataugos gija arba spyglys tiesiogiai tvirtinasi prie ataugos galo. Pagal Nobrega *et al.* (2018).

Nepaisant ataugų turinčių fagų dydžio ir formos skirtumų, kapsidės ir ataugos struktūriniai baltymai pasižymi panašiu erdvinio susilankstymu ir susirinkimo mechanizmu. Struktūrinių ataugos baltymų sandara bei erdvinis susilankstymas yra panašūs tarp ataugų bakteriofagų bei tarp bakterijoms būdingų į fagų ataugas panašių struktūrų kaip *Pseudomonas aeruginosa* VI tipo sekrecinės sistemos (T6SS) (Park *et al.*, 2018), *P. aeruginosa* R-tipo bei F-tipo piocinų (Ge *et al.*, 2015; Nakayama *et al.*, 2000), *Photorhabdus asymbiotica* ekstraląstelinės susitraukiančios injekcinės sistemos (angl. *extracellular contractile injection system*) (Jiang *et al.*, 2019). Toks struktūrinių ataugos baltymų erdvinis susilankstymas bei formuojamų struktūrų panašumas nurodo bendrą jų protėvį (Pell *et al.*, 2009a, 2009b; Veessler ir Cambillau, 2011).

Siphoviridae ir *Myoviridae* bakteriofagų kapsidės ir ataugos susirenka nepriklausomai viena nuo kitos – ataugos, ir prie jų prijungtas galiuko kompleksas, bei kapsidės su supakuota DNR, sąveikaudamos tarpusavyje suformuoja fagą. Šias struktūras tarpusavyje sujungia terminatorinis baltymas TrP (angl. *terminator protein*) (Auzat *et al.*, 2014; Cardarelli *et al.*, 2010; Linares *et al.*, 2020). Šis konservatyvus baltymas aptinkamas ataugas turinčiuose bakteriofaguose bei bakterijų į fagų ataugas panašiose ekstraląstelinėse sistemose atlieka tą pačią funkciją – užbaigia ataugos

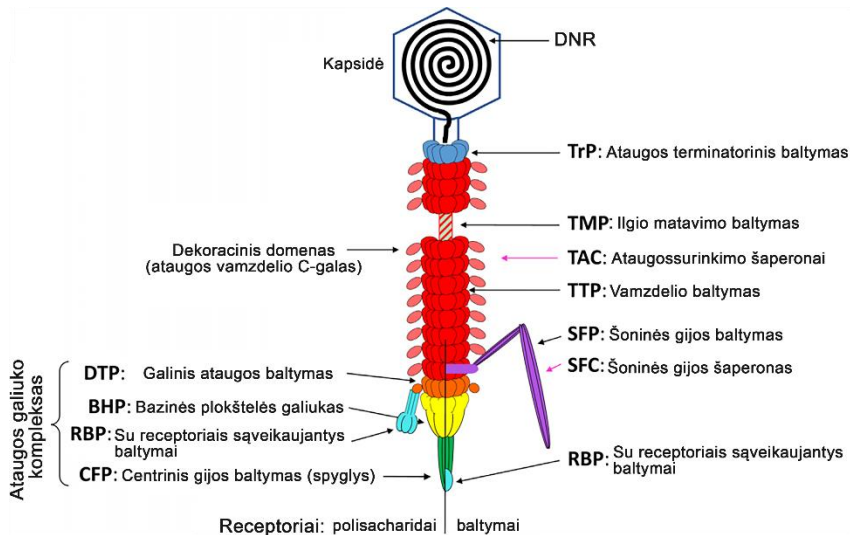
vamzdelio ir ataugos apvalkalo susirinkimą (Davidson *et al.*, 2012; Fokine *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2018). Miovirusų ir sifovirusų ataugos jungia kapsidę su ataugos galiuko kompleksu ir, įvykus prisijungimui su ląstelės-šeimininkės receptoriais (angliavandeniais, baltymais), manoma, jis perduoda signalą DNR išsvirkštimui iš kapsidės į ląstelės citoplazmą. Ataugos tampa kanalu, per kurį keliauja genetinė medžiaga. Miovirusų (vienas iš išsamiausiai tirtų fagų yra T4) ir sifovirusų (modelinis fagas lambda) ataugos detaliai tyrinėjamos nuo 1975 m. analizuojant jų susirinkimo procesą, struktūrą, bakterijų atpažinimą ir prasiskverbimo į bakterijos citoplazmą mechanizmus (Campbell *et al.*, 2020; Katsura, 1990, 1981; Kikuchi ir King, 1975).

Nors T4 fago nelanksti, tačiau susitraukianti atauga buvo išanalizuota krioelektroninės mikroskopijos metodu (Taylor *et al.*, 2016), tačiau detalūs tyrimai su lanksčiomis bakteriofagų ataugomis buvo beveik neįmanomi. Tik 2017 m. krioelektroniniu mikroskopu pavyko detaliai išanalizuoti bakteriofago T5 lanksčią ataugą (Arnaud *et al.*, 2017), o 2020 m. buvo atlikta dar detalesnė krioelektroninės mikroskopijos analizė dirbant su bakteriofagu lambda (Campbell *et al.*, 2020).

1.1.1. Bakteriofagų nesusitraukiančių ir lanksčių ataugų susirinkimo mechanizmas

Fagai, priklausantys *Demereviridae*, *Drexelviriidae* bei *Siphoviridae* šeimoms turi lanksčias bei nesusitraukiančias ataugas. Nors ataugos susirinkimo mechanizmas detaliai aprašytas analizuojant *Siphoviridae* šeimai priklausančią fagą lambda, tačiau šis griežtai kontroliuojamas daugiapakopis procesas yra konservatyvus tarp ataugų turinčių fagų (Davidson *et al.*, 2012; Linares *et al.*, 2020). Ataugos susirinkimas prasideda nuo ataugos galiuko komplekso TTC (angl. *tail tip complex*) susiformavimo (2 pav.). Galiuko kompleksą, esantį ataugos apačioje, sudaro labiausiai varijuojantys fagų baltymai, formuojantys centrinės ir šonines gijas, bazinę plokštelę. Pastarąją sudaro heksamerinis galinis ataugos baltymas DTP (angl. *distal tail protein*) bei trimerinis bazinės plokštelės baltymas BHP (angl. *baseplate hub protein*). Nepaisant didelio susidomėjimo fagų ataugomis, molekuliniai mechanizmai, aprašantys sąveiką su ląstelės receptoriais, plazminių membranų pradūrimą ir signalo perdavimą, inicijuojantį DNR paleidimą iš fago galvutės per ataugą į ląstelės citoplazmą, lieka iki galo neištirti (Goulet *et al.*, 2020). Ataugos galiuką sudarantys baltymai sąveikauja su ląstelės-šeimininkės paviršiumi, todėl priklausomai nuo fago infekuojamų ląstelių-šeimininkų membranos sudėties (Gram-teigiamos ar Gram-neigiamos) bei atpažįstamų

polisacharidinių ir/arba baltyminių receptorių, skiriasi ataugos galiuko sandara. Bakteriofagams atpažįstant ląstelės-šeimininkės paviršiuje esančius polisacharidus, ataugos šoninių gijų galuose aptinkami RBP (2 pav.). Tuo tarpu fagai, atpažįstant ant bakterijos paviršiaus esantį baltyminių receptorių, RBP aptinkamas ant centrinės gijos galiuko arba spyglio (Goulet *et al.*, 2020; Nobrega *et al.*, 2018; Sadovskaya *et al.*, 2017).



2 pav. Sifovirusų ataugos sandara. Kapsidėje supakuotas fago DNR genomas infekcijos metu keliauja per ataugos vamzdelį į ląstelės-šeimininkės citoplazmą. Ataugos vamzdelio baltymas, formuodamas heksamerinius arba neįprastus trimerinius diskus, susirenka aplink ataugos ilgio matavimo baltymą. Fagų šoninės gijos arba centrinė ataugos gija (spyglys) struktūrų galuose turi išsidėsčiusius RBP. Jų išsidėstymas priklauso nuo fago atpažįtamų receptorių ant ląstelės-šeimininkės paviršiaus kilmės (polisacharidai ar baltymai). Fago šaperonai pavaizduoti rožinėmis rodyklėmis. Pagal Linares *et al.* (2020).

Susiformavus ataugos galiuko kompleksui, prie jo jungiasi ilgio matavimo baltymas TMP (angl. *tail measure protein*), aplink kurį, formuojant heksamerinius, arba fagų T5 bei phiCbK atveju, trimerinius diskus, susirenka ataugos vamzdelio baltymas TTP (Katsura ir Hendrix, 1984; Leonard *et al.*, 1973; Zivanovic *et al.*, 2014). Ataugos vamzdelio baltymai yra stabilizuojami fago koduojamų šaperonų, kurie manoma, yra svarbūs taisyklingam ataugos susirinkimui įvykti (Jun Xu *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2013). Fago lambda šaperonai – gpG ir gpGT, sąveikaudami su ataugos vamzdelio baltymu gpV, atlieka gpV konformacinius pokyčius, inicijuojančius ataugos vamzdelio susirinkimo procesą (Jun Xu *et al.*, 2014). Galiausiai, ataugos susirinkimas nutraukiamas kai paskutinis heksamerinis diskas pasiekia ataugos ilgio

matavimo baltymo TMP galą. Tuomet prisijungia heksamerinis terminatorinis baltymas TrP, sustabdantis gpV susirinkimo procesą ir sujungiantis susiformavusią ataugą su fago kapside (2 pav.) (Davidson *et al.*, 2012; Pell *et al.*, 2009b).

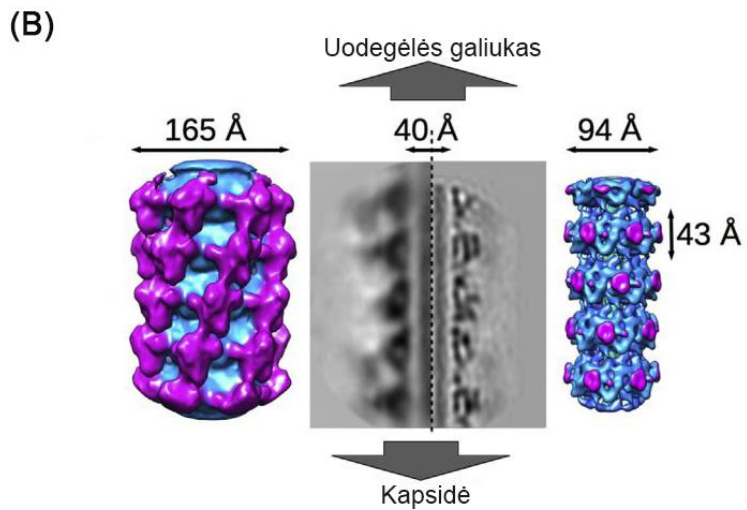
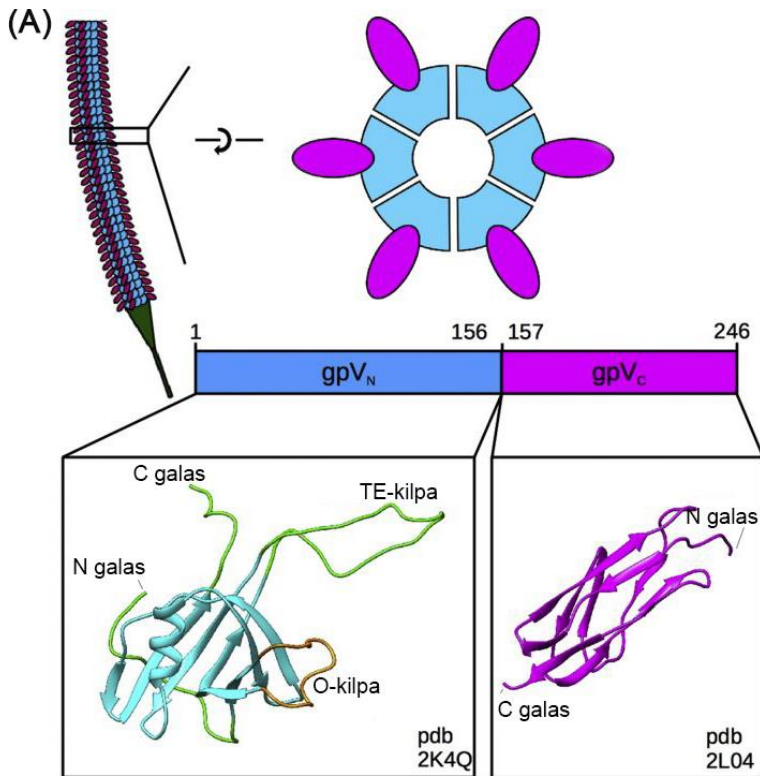
1.1.2. Bakteriofagų ataugos vamzdelio struktūra

Tipinė fagų, turinčių lanksčias ir nesusitraukiančias ataugas, šeima yra *Siphoviridae*, o modelinis sifovirusas – fagas lambda. Šis fagas turi 135 nm ilgio ataugą, sudarytą iš 32 vienas ant kito susijungusių heksamerinių diskų, formuojamų ataugos vamzdelio baltymo gpV (3 pav.). Baltymas gpV susirenka aplink ataugos ilgio matavimo baltymą gpH (angl. *tape measure protein*), kuris reguliuoja heksamerinių diskų polimerizacijos procesą (Davidson *et al.*, 2012; Katsura ir Hendrix, 1984; Mahony *et al.*, 2016). Krioelektroninės mikroskopijos metodu buvo nustatytas fago lambda baltymo gpV (246 AR ilgio) erdvinis modelis (3 pav. A). Baltymą gpV sudaro du struktūriškai ir funkciškai skirtingi domenai. N galo domeną (1-156 AR) sudaro septynios β klostės, viena α spiralė ir dvi kilpos. O kilpa (angl. *outer loop*), esanti 24-38 AR regione, aptinkama ne visuose homologiniuose baltymuose, todėl jos funkcija lieka neaiški. Tuo tarpu TE kilpa (angl. *tail extended-loop*), esanti 50-78 AR regione, atlieka ypač svarbų vaidmenį ataugos stabilizavime – ji sąveikauja su greta esančiu vamzdelio heksameriniu disku (3 pav. A, 4 pav. B) (Campbell *et al.*, 2020). Bakteriofago lambda gpV C galo domeną (157-246 AR regionas) sudaro į imunoglobulinus (Ig) panašūs baltymai, priklausantys Big2 šeimai (Fraser, 2006; Katsura, 1981). Šie domenai dažnai aptinkami ant *Caudovirales* būriui priklausančių fagų paviršiaus. Sifovirusuose šie baltymų domenai yra aptinkami ant kapsidžių, ataugų ir gijų, o miovirusuose – ant kapsidžių ir bazinę plokštelę sudarančių baltymų (Fokine *et al.*, 2011; Pell *et al.*, 2010). Manoma, kad į Ig-panašūs baltymų domenai gali nespecifiškai sąveikauti su bakterijų ląstelės paviršiuje esančiais komponentais ir taip padidinti fagų virulentiškumą. Tačiau ne visi fagai turi į Ig-panašius baltymų domenų, o kituose faguose šie domenai yra aptinkami skirtingu santykiu dėl vykstančio atviro skaitymo rėmelio poslinkio (angl. *ribosomal frameshift*) (Auzat *et al.*, 2008; Fraser *et al.*, 2006; Linares *et al.*, 2020; Pell *et al.*, 2010). Fago lambda mutantai, turintys pašalintą gpV C galo domeną, pasižymi sumažėjusiu biologiniu aktyvumu, todėl ši baltymo dalis yra svarbi viruso funkcionalumui (Katsura, 1981; Pell *et al.*, 2010).

Krioelektroninės mikroskopijos metodu buvo nustatytas fago lambda ataugos modelis (3 pav. B). Ataugos vamzdelio skersmuo yra 165 Å, o vidinė

ertmė 40 Å dydžio. Joje telpa ilgio matavimo baltymas TMP bei infekcijos metu išleidžiama fago DNR. Heksamerinių gpV baltymo diskų rotacija yra 17,5°, o heksamerinis diskas sudaro 43 Å. Baltymo gpV C galo į Ig-panašus domenas yra aptinkamas heksamerinio disko išoriniame paviršiuje, o gpV N galo domenas atsiduria ataugos vidinėje dalyje. Analizuojat fagus lambda ir fagų laisvas ataugas po DNR įšvirkštimo, buvo nustatytas į Ig-panašaus domeno erdvinio susilankstymo pokytis. Nors turimi duomenys yra nepakankami baltymo ar mechanizmo identifikavimui, lemiančiam signalo perdavimą DNR įšvirkštimui iš fago kapsidės į infekuojamos bakterijos citoplazmą, tačiau tai leido daryti prielaidą, kad DNR įšvirkštimas pro ataugos vamzdelį gali turėti įtakos gpV C galo domeno konformacijai (Campbell *et al.*, 2020).

Formuojantis fago lambda ataugai, vyksta gpV N galo konformacinis pokytis, kurio metu β klostės persitvarko ir heksameriniame diske suformuoja nenutrūkstanti, iš β klosčių sudaryta, į statinę panašų motyvą (angl. *beta barrel-like motif*) (4 pav. A). Toks konformacinis pokytis būdingas bakteriofagų lambda ir SPP1 ataugoms, todėl panašu, kad jis reikalingas jų stabilumui palaikyti (Campbell *et al.*, 2020; Langlois *et al.*, 2015). Kiti konformaciniai pokyčiai, vykstantys fago lambda ataugos susirinkimo metu, yra gpV N galo sąveika su kitu gpV monomeru, TE kilpos fiksavimas tarp greta esančių heksamerinių diskų bei gpV C galo nukreipimas į išorinę ataugos dalį (Campbell *et al.*, 2020).

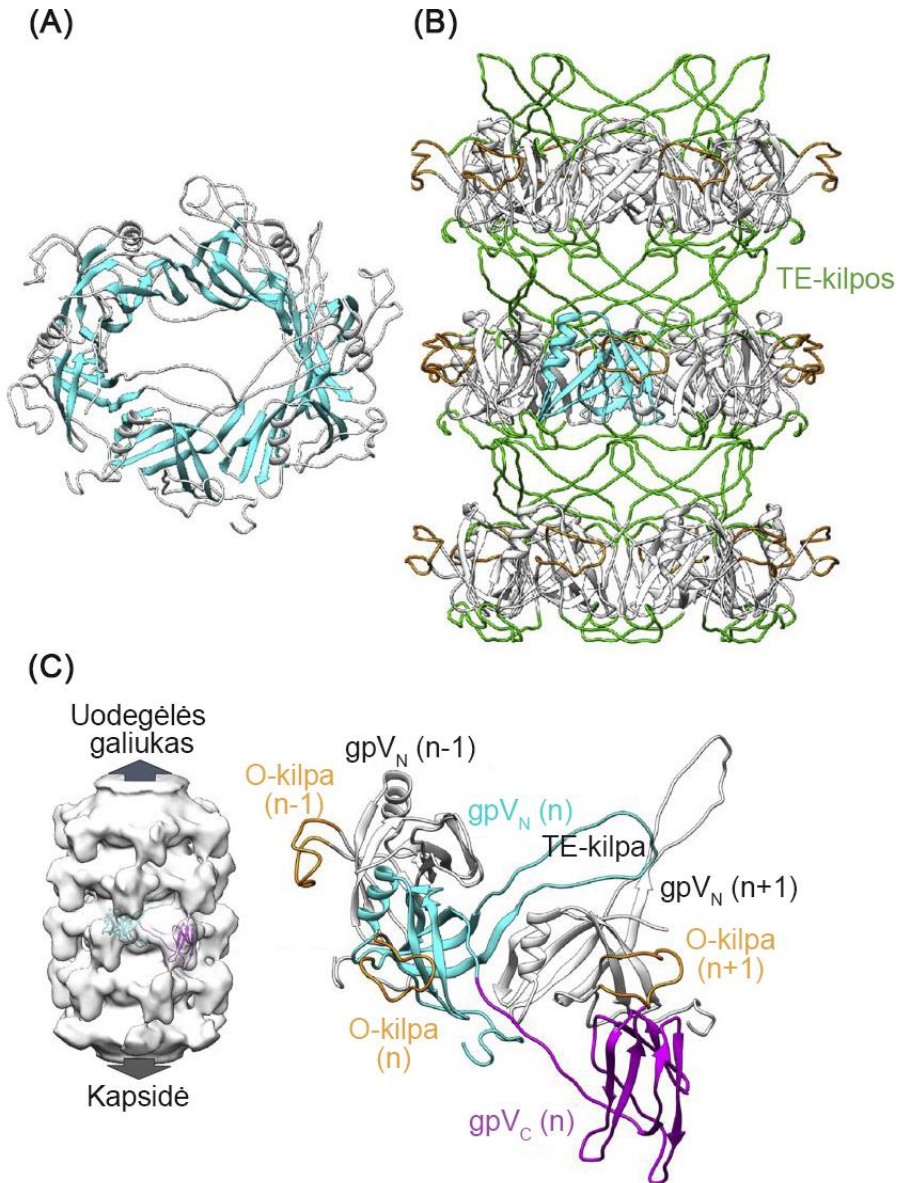


3 pav. Schematinis gpV domenų pavaizdavimas ir fago lambda ataugos struktūros modelis. (A) Schematinis gpV erdvinis susilankstymas ir jį sudarantys domenai. Paveikslėlio viršutiniame kairiajame kampe schematiškai pavaizduotas ataugos vamzdelis, sudarytas iš vienas ant kito susijungusių heksamerinių diskų. Paveikslėlio viršuje pavaizduotas heksamerinis diskas iš viršaus. Baltymo gpV N galo domeną (gpV_N) sudarančios 1-156 AR pavaizduotos žydra spalva, gpV C galo domeną (gpV_C) sudarančios 157-246 AR pavaizduotos rožine spalva. Apačioje

pateiktas krioelektroninės mikroskopijos metodu nustatytas gpV erdvinis modelis. gpV_N domeną (PDB ID: 2K4Q) sudaro septynios β klostės, α spiralė, O kilpa ir TE kilpa. gpV_C (PDB ID: 2L04) sudaro į Ig-panašus domenas. (B) Fago lambda ataugos modelis. Kairėje paveikslėlio dalyje pateiktas ataugos išorinio paviršiaus schematinis pavaizdavimas; rožine spalva pavaizduotas gpV_C domenas. Vidurinėje paveikslėlio dalyje pateiktas skersinis ataugos vamzdelio pjūvis, kurio kairėje pusėje sufokusuotas gpV_C domenas, o dešinėje pusėje – gpV_N domenas. Dešinėje paveikslėlio dalyje pateiktas ataugos vidinę struktūrą formuojančio gpV_N domeno erdvinis modelis (žydra spalva). Pagal Campbell *et al.* (2020).

Atskirus heksamerinius diskus tarpusavyje jungia gpV N galas ir jame esanti TE kilpa (4 pav. B). Ši kilpa, dėka elektrostatinės sąveikos, atlieka esminį vaidmenį ataugos vamzdelio susirinkime ir greta esančių diskų sujungime. TE kilpa yra nukreipiama į ataugos galiuko komplekso pusę ir sąveikauja su gretimo heksamerinio disko dvejomis gpV N galo struktūromis. Papildomai TE kilpa sąveikauja su to paties heksamerinio disko greta esančiais gpV baltymais palaikant ataugos vamzdelio struktūrą (4 pav.) (Campbell *et al.*, 2020; Linares *et al.*, 2020). Šaperonų gpG ir gpGT, ataugos galiuko komplekso bei ilgio matavimo baltymo gpH buvimas yra svarbus fago lambda vamzdelio baltymo gpV konformaciniams pokyčiams įvykdyti bei susirinkimui inicijuoti (Katsura ir Tsugita, 1977; Xu *et al.*, 2014, 2013).

Negausus gpV jungimasis su greta esančiais diskais paaiškina sifovirusų ataugų lankstumą, kadangi miovirusų, T6SS, piocinų ir ekstraląstelių susitraukiančių injekcinių sistemų nelanksčias ataugas formuojantys diskai tarpusavyje jungiami dalyvaujant daugiau kilpų, taip užpildant tarpdiskinius tarpus ir sumažinant ataugų lankstumą (Arnaud *et al.*, 2017; Ge *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017).

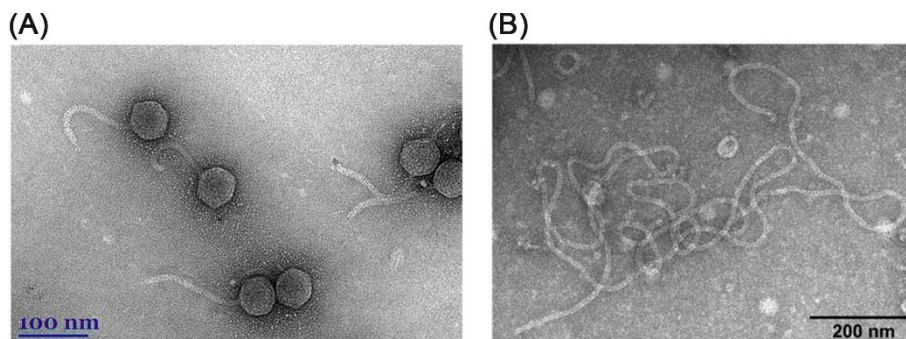


4 pav. Bakteriofago lambda ataugos vamzdelio baltymo gpV modelis. (A) Baltymo gpV formuojamo heksamerinio disko modelis. gpV N galo domenas suformuoja nenutrūkstantį β klosčių formuojamą į statinę panašų motyvą. (B) Ataugos vamzdelio struktūros modelis iš šono. TE kilpos (žalia spalva) sujungia greta esančius diskus ir padidina ataugos stabilumą. Heksameriniame diske esantis gpV monomeras pavaizduotas žydra spalva. (C) Baltymo gpV sąveikų su greta esančių baltymų gpV (n - 1) bei (n + 1) N galais modelis. Pagal Campbell *et al.* (2020).

1.1.3. Bakteriofagas vB_EcoS_NBD2

Fagas vB_EcoS_NBD2 (toliau NBD2) yra *Escherichia coli* bakterijas infekuojantis virusas. 2017 metais identifikuotas fagas NBD2 buvo išskirtas iš Alytuje esančios braškių plantacijos dirvožemio. Fago 65 nm skersmens kapsidė pakuoja dgDNR genomą, o ataugos yra lanksčios, nesusitraukiančios, ~ 170 nm ilgio ir ~ 12 nm skersmens (5 pav. A). Nors ataugos bazinė plokštelė su šoninėmis gijomis transmisinės elektroninės mikroskopijos metodu (TEM) nebuvo stebimos, tačiau genomo bioinformatinės analizės ir/arba proteominės analizės metu identifikuoti šias struktūras koduojantys genai. Iš viso identifikuota 16 struktūrinius baltymus koduojančių genų (Kaliniene *et al.*, 2017). Iš pradžių bakteriofagas NBD2 priklausė *Siphoviridae* šeimai, tačiau šiuo metu yra priskiriamas *Drexlerviridae* šeimai (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>, duomenys tikrinti 2021 03 30).

Nustatyta, kad gp39 yra fago NBD2 ataugos vamzdelio baltymas, sudarantis didžiąją ataugos dalį virione, todėl buvo susidomėta šio baltymo pritaikymu nanostruktūrų kūrimo. 2017 m. buvo pademonstruota, kad *E. coli* bakterijose susintetintas baltymas gp39 savaime susirinko į tvarkingus, iki 3 μm ilgio ir ~ 12 nm pločio lanksčius nanovamzdelius (5 pav. B) (Šimoliūnas, 2017).



5 pav. NBD2 viriono ir baltymo gp39 formuojamų nanovamzdelių *E. coli* bakterijose TEM nuotraukos. (A) Bakteriofago NBD2 virionai. (B) Bakterijose susintetinto baltymo gp39 formuojamų nanovamzdelių TEM nuotrauka. Pagal Kaliniene *et al.* (2017) ir Šimoliūnas (2017).

Fago NBD2 baltymo gp39 formuojami nanovamzdeliai yra įdomus tyrimo objektas, kadangi gp39 formuoja nanostruktūras net ir nesant kitų fago baltymų. Remiantis literatūros duomenimis, bakteriofagų ataugos susirinkimas yra griežtai kontroliuojamas daugiapakopis procesas (žr. literatūros apžvalgą 1.1.1. skyrelį), tačiau literatūroje aprašytos skirtingos

fagų ataugos vamzdelio baltymų savaiminio susirinkimo savybės: fago lambda baltymas gpV, be kitų fago baltymų, negali savaime susirinkti į nanostruktūras ir tirpale egzistuoja monomerinėje-dimerinėje būsenoje (Katsura ir Tsugita, 1977; Xu *et al.*, 2014), o fago SPP1 vamzdelio baltymas gp17.1 gali savaime susirinkti į nanostruktūras. Šis baltymas per 3-10 dienų, sprendžiant iš pateiktų TEM nuotraukų, suformuoja heterogeniško ilgio (iki 500 nm) nanovamzdelius (Langlois *et al.*, 2015). Fago NBD2 baltymo gp39 formuojami nanovamzdeliai gali turėti ne tik biotechnologinį pritaikymą, tačiau jie gali būti naudingi analizuojant bakteriofagų ataugos vamzdelio baltymo savaiminio susirinkimo procesą, kuris, panašu, nėra iki galo iširtas.

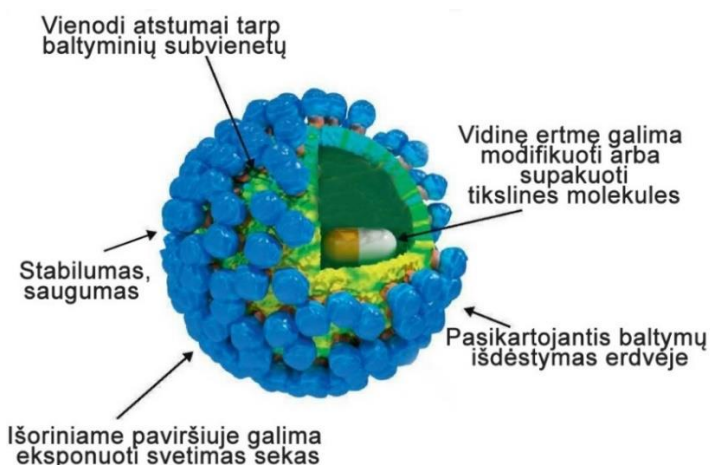
1.2. Virusinės nanostruktūros

Virusai yra obligatoriniai viduląsteliniai parazitai, evoliucionavę infekuoti ląsteles, replikuotis, supakuoti savo genomą į susirinkusios struktūros vidų ir palikti ląsteles pumpuravimosi būdu arba jas lizuojant (Lwoff ir Tournier, 1966). Kadangi virusų infekuojamos ląstelės gali būti veikiamos įvairių aplinkos veiksnių – ultravioletinių spindulių, aukštos temperatūros ar skirtingų pH reikšmių, virusai evoliucionavo ir dauguma jų išlaiko savo struktūrą veikiant nepalankioms aplinkos sąlygoms (Chin *et al.*, 2020; Prigent *et al.*, 2005; Riekkel *et al.*, 2018; Tuladhar *et al.*, 2012). Pirmojo viruso atradimo datos yra dvi: 1892 m. D. Ivanovskis nustatė, kad egzistuoja filtruojamos dalelės, kurios skiriasi nuo bakterijų ir praėjusios filtrus, gali infekuoti augalus (Iwanowski, 1892), o 1898 m. M. W. Beijerinckas iš augalų išskyrė tabako mozaikos virusą (angl. *tobacco mosaic virus*, TMV) ir įvedė „viruso“ sąvoką (Beijerinck, 1898). Šie mokslininkai pradėjo virusologijos erą, davusią pradžią fundamentalių biologinių procesų išaiškinimui ir virusų bei virusinių nanostruktūrų pritaikymui įvairiose mokslo srityse (Chung *et al.*, 2020).

Kai kurių virusų vieno arba kelių skirtingų baltymų subvienetai, sąveikaudami tarpusavyje, gali savaime susirinkti į virusines nanostruktūras (McManus *et al.*, 2016). Virusinės nanostruktūros yra platus terminas, apibūdinantis virusų baltymų suformuotas erdvines struktūras, neturinčias viruso genomo. Virusinės nanostruktūros, patekusios į organizmą, nesireplikuoja, nesukelia infekcijų, todėl yra saugios (Chackerian, 2007; Wen ir Steinmetz, 2016). Virusinėms nanostruktūroms yra priskiriamos į virusus panašios dalelės (VPD). Pagrindinis skirtumas tarp virusinių nanostruktūrų ir VPD – pastarosios pasižymi viruso, iš kurio yra susiformavusios, morfologinėmis savybėmis; tuo tarpu virusinės nanostruktūros nuo viruso gali skirtis savo dydžiu ar forma (Atabekov *et al.*, 2011; Carignan *et al.*, 2015;

Gedvilaite *et al.*, 2006; Langlois *et al.*, 2015). Augalus ir bakterijas infekuojantys virusai (pavyzdžiui, TMV, M13) nesireplikuoja žinduolių ląstelėse, todėl yra saugūs ir taip pat gali būti pritaikomi biotechnologijoje bei medicinoje (Lee *et al.*, 2012; Nam *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2013).

Virusinės nanostruktūros yra panašios į infektyvius virusus: pasižymi tvarkingu, pasikartojančiu struktūrinio baltymo/baltymų išsidėstymu erdvėje, vienodais tarpais tarp baltymų bei yra virusinės kilmės. Virusinės nanostruktūros turi vidinę ertmę ir išorinį paviršių, todėl jas galima modifikuoti supakuojant tikslias medžiagas arba eksponuojant baltyminius fragmentus ar net pilno ilgio baltymus ir taip padidinant virusinių nanostruktūrų pritaikymo galimybes įvairiose mokslo srityse (6 pav.) (Crisci *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2018; Rong *et al.*, 2011).

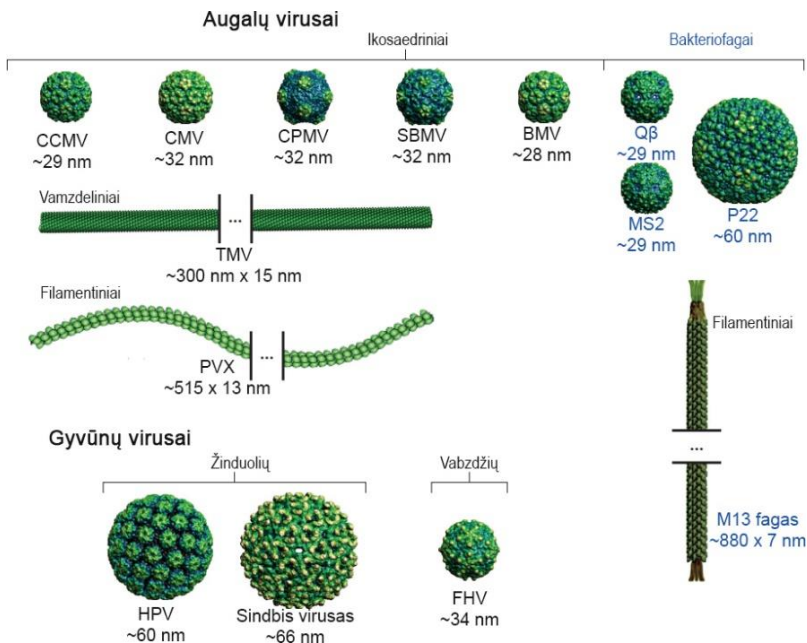


6 pav. Virusinės nanostruktūros schematinis pavaizdavimas. Struktūros gali būti įvairių formų ir dydžių, paveikslėlyje pateiktas ikosaedrinės simetrijos viruso schematinis modelis. Pagal Crisci *et al.* (2013).

Literatūroje aprašyta didelė įvairovė virusinių nanostruktūrų, kurios tarpusavyje skiriasi struktūros sudėtingumu (vienas arba keli struktūriniai baltymai, lipidinio apvalkalo buvimas), dydžiu (nuo keliasdešimties nanometrų iki kelių mikrometrų), forma (ikosaedrai, lankstūs filamentai ar nelankstūs vamzdeliai) ar raiškos sistemų panaudojimu virusinių nanostruktūrų gavimui (bakterijos, mielės, žinduolių bei vabzdžių ląstelės, augalai ar *in vitro* sistema) (7 pav.) (Roldão *et al.*, 2017).

Virusinės nanostruktūras galima suskirstyti remiantis jų struktūros sudėtingumu ir lipidinio apvalkalo buvimu. Paprasčiausias jų sudaro vienas struktūrinis baltymas, savaime susirenkantis į tvarkingas erdvinės struktūras

be lipidinio apvalkalo. Kai kurių virusų kapsidės yra sudarytos iš kelių struktūrinių baltymų, tačiau virusinių nanostruktūrų formavimasis gali būti pasiektas sintetinant tik vieną iš jų. Detaliai charakterizuotos virusinės nanostruktūros priklauso žmogaus papiloma virusui, poliomos virusams, hepatito B ir E virusams, parvovirusams (Chisari *et al.*, 1989; Meng, 2010; Sasnauskas *et al.*, 2002; Tamošiunas *et al.*, 2013; Walboomers *et al.*, 1999). Sudėtingesnės sandaros virusines nanostruktūras sudaro keli baltymai, formuojantys nanostruktūras be lipidinio apvalkalo – poliovirusai, reovirusai (Joklik, 1981; Wimmer *et al.*, 1993). Lipidiniu apvalkalu padengtoms virusinėms nanostruktūroms reikalinga tinkama rekombinantinių baltymų raiškos sistema, kurioje susiformavusi nanostruktūra galėtų pasidengti ląstelės-šeimininkės membrana. Tokios virusinės nanostruktūros priklauso gripo virusui A, retrovirusams, Ebola virusui (Kurg *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Pushko ir Tretyakova, 2020). Į virusinių nanostruktūrų lipidinį dvisluosknį gali būti įterpti membraniniai ir transmembraniniai baltymai, eksponuojami viruso glikobaltymai, svarbūs ląstelių-taikinių atpažinimui ir jo tropizmui. Lipidinį apvalkalą turinčių virusinių nanostruktūrų sintezė vykdoma žinduolių ir vabzdžių ląstelėse, tačiau tobulėjant technologiniams procesams, tokias nanostruktūras galima susintetinti naudojant sąlyginai paprastesnę ir pigesnę augalų raiškos sistemą (Chen ir Lai, 2013).



7 pav. Virusų schematinis pavaizdavimas. Iksaedriniai augalų virusai: CCMV – Kininės pupuolės cholorozinių dėmelių virusas (angl. *cowpea chlorotic mottle virus*), CMV – Agurkų mozaikos virusas (angl. *cucumber mosaic virus*), CPMV –

Kininės pupuolės mozaikos virusas (angl. *cowpea mosaic virus*), SBMV – Pietinių pupelių mozaikos virusas (angl. *southern bean mosaic virus*), BMV – Dirsės mozaikos virusas (angl. *brome mosaic virus*). Vamzdelinės formos augalų virusai: TMV – Tabako mozaikos virusas (angl. *tobacco mosaic virus*), PXV – Bulvių virusas X (angl. *potato virus X*) bei bakterijų *E. coli* virusas M13. Ikosaedriniai bakteriofagai: Q β ; MS2; P22. Gyvūnų virusai: HPV – Žmogaus papilomos virusas (angl. *human papillomavirus*), Sindbis virusas, vabzdžius infekuojantis FHV (angl. *flock house virus*). Pagal Koudelka (2015).

TMV struktūrinio kapsidės baltymo susirinkimas į vamzdelio formos struktūras yra tapęs molekulinės biologijos dogma (Thomas, 2007). 300 nm ilgio ir 18 nm skersmens TMV virusą sudaro 2130 identišku kapsidės baltymų. Baltyminiai subvienetai, susirinkdami aplink viruso RNR genomą, formuoja spiralinės simetrijos virusinę kapsidę *in vivo* ir *in vitro* sistemose (Butler, 1999; Saunders ir Lomonosoff, 2017). Negana to, keičiant tirpalų joninę jėgą, pH ir temperatūrą, galima reguliuoti TMV kapsidės baltymų susirinkimo į nanostruktūras savybes: jie gali egzistuoti monomerinėje-dimerinėje būsenoje arba gali susirinkti formuojant skirtingos morfologijos nanostruktūras – tarpusavyje susijungusius diskus (angl. *stacked disks*), 54 nm skersmens sferines nanodaleles ar įprastos morfologijos vamzdelius (Atabekov *et al.*, 2011; Bruckman *et al.*, 2014; Kegel ir Van Der Schoot, 2006). Kontroluojamos kai kurių virusinių baltymų savaiminio susirinkimo ir nanostruktūrų morfologinės savybės padidina virusinių nanostruktūrų pritaikymo galimybes mokslo srityse, kur nanostruktūros forma yra svarbi jų funkcionalumui.

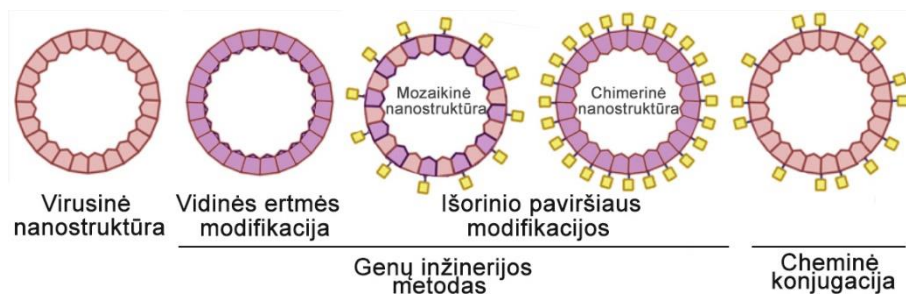
Dauguma aprašytų VPD yra ikosaedrinės formos, kilusios iš augalų, gyvūnų ir bakterijų virusų. Ikosaedrinis VPD skersmuo varijuoja nuo 18 nm iki 200 nm (Mohsen *et al.*, 2018). Tuo tarpu literatūroje aprašytų vamzdelinės formos nanostruktūrų įvairovė mažesnė nei ikosaedrinis VPD, kadangi daugiausia tyrimų atliekama su charakterizuotais augalų virusais TMV, PVX ar bakteriofagu M13. Vamzdelinės formos virusinės struktūros skiriasi savo ilgiu nuo 300 nm iki > 2 μ m, todėl gali būti puiki platforma biomedicininiam pritaikymui ar elektronikos įrenginių kūrimui (Carignan *et al.*, 2015; Nam *et al.*, 2006; Šimoliūnas *et al.*, 2019; Smith *et al.*, 2006; Steinmetz *et al.*, 2010).

1.3. Virusinių nanostruktūrų modifikavimas genų inžinerijos ir cheminės konjugacijos metodais

Virusinės nanostruktūras formuojantys virusiniai baltymai dažniausiai tvarkingai išsidėsto erdvėje. Norint padidinti virusinių nanostruktūrų pritaikymo galimybes, tvarkingas baltymų išsidėstymas erdvėje leidžia

tikslingai ant nanostruktūros paviršiaus eksponuoti genų inžinerijos ar cheminės konjugacijos būdu įterptus peptidus ar baltymus, o kai kurios nanostruktūros gali būti modifikuojamos prie jų prijungiant netgi kelis skirtingus baltyminius fragmentus (Uhde *et al.*, 2005). Genų inžinerijos būdu galima gauti pilnai dekoruotas chimerines¹ nanostruktūras, sudarytas iš struktūrą formuojančio baltymo ir prie jo prijungto baltyminio fragmento. Tačiau šis metodas dažniausiai neigiamai paveikia baltymų gebėjimą susirinkti į virusinės nanostruktūras ir jų morfologiją. Tada gali būti kuriamos mozaikinės² virusinės nanostruktūros, prijungtus peptidus eksponuojančios tik ant dalies struktūrą formuojančių baltymų (8 pav.) (Brown *et al.*, 2009; Röder *et al.*, 2017; Urakami *et al.*, 2017).

Cheminės konjugacijos metodu yra modifikuojamos jau susirinkusios virusinės nanostruktūros prie jų prijungiant baltyminius fragmentus ar pilno ilgio baltymus, todėl virusinių nanostruktūrų morfologija dažniausiai nėra sutrikdoma (Pomwised *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2006). Tačiau cheminės konjugacijos metodas yra nekontroliuojamas ir, priklausomai nuo virusinės nanostruktūros baltymų aminorūgščių (AR) sudėties ir nuo baltymų erdvinės struktūros, cheminės konjugacijos efektyvumas varijuoja nuo 10 % iki 90 % (procentas parodo modifikuotų, virusinę nanostruktūrą sudarančių baltymų dalį) (Cantin *et al.*, 2011; Steinmetz *et al.*, 2010).



8 pav. Virusinių nanostruktūrų modifikacijų schema. Rusva spalva pavaizduoti nemodifikuoti, nanostruktūrą sudarantys baltymai. Violetine spalva parodyti genų inžinerijos būdu modifikuoti (chimeriniai) baltymai, į struktūros vidinę ertmę ar išorinį paviršių eksponuojantys baltyminius fragmentus. Paveikslėlis modifikuotas pagal Donaldson *et al.* (2015).

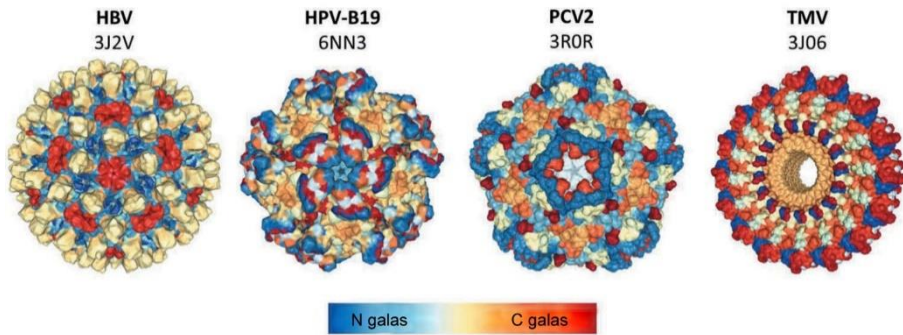
¹Chimera – graikų mitologinė būtybė, sudaryta iš kelių skirtingų gyvūnų kūno dalių. Chimerines nanostruktūras sudaro struktūrą formuojantis baltymas ir prie jo prijungtas baltyminis fragmentas.

²Mozaikinė nanostruktūra – iš kelių skirtingų baltymų sudaryta nanostruktūra. Tai gali būti nemodifikuotas baltymas ir chimerinis baltymas arba keli modifikuoti baltymai, formuojantys vieną struktūrą.

1.3.1. Chimerinių ir mozaikinių nanostruktūrų kūrimas genų inžinerijos metodu

Virusai ir juos sudarantys baltymai skiriasi dydžiu, AR sudėtimi, hidrofiliškumu, struktūrų paviršiaus krūviu, baltymų erdviu susilankstymu bei tarpusavio sąveikomis, todėl nėra universalios virusinių nanostruktūrų modifikavimo strategijos, kuri nesutrikdytų baltymų erdvinio susilankstymo ar savaiminio susirinkimo į nanostruktūras (9 pav.). Tam, kad sukurti chimerines nanostruktūras, ant kiekvieno struktūrą formuojančio baltymo eksponuojančias prijungtus peptidus ar baltymus, yra atliekamos genetinės modifikacijos – prie virusinę nanostruktūrą formuojančio baltymo geno sekos yra prijungiama arba įterpiama baltymo fragmentą koduojanti geno seka (10 pav.). Peptidų ar baltymų eksponavimui ant chimerinės nanostruktūros išorinio paviršiaus, yra pasirenkamos į struktūros išorę nukreiptos struktūrą formuojančio baltymo dalys (Gedvilaite *et al.*, 2000; Pattinson *et al.*, 2019; Rioux *et al.*, 2012), o norint peptidus ar baltymus eksponuoti virusinės nanostruktūros vidinėje erdmėje, yra modifikuojamos į struktūros vidų nukreiptos baltymų dalys.

Peptidai arba baltymai dažniausiai yra prijungiami prie virusinę nanostruktūrą formuojančio baltymo N ir/arba C galo bei įterpiami į kilpas (Carignan *et al.*, 2015; Kalnciema *et al.*, 2011; Rioux *et al.*, 2012). Antrines struktūras formuojančios baltymo dalys – α spirālės, β klostės, dažniausiai yra neliečiamos, nes peptido ar baltymo įterpimas gali sutrikdyti virusinę nanostruktūrą formuojančio baltymo erdvinį susilankstymą ir neigiamai paveikti savaiminio susirinkimo procesą. Netgi nustačius į nanostruktūros išorę eksponuojamas baltymo dalis, peptidų prijungimas prie šių dalių gali turėti neigiamos įtakos baltymų erdviniam susilankstymui ir gebėjimui formuoti nanostruktūras (Lei *et al.*, 2020; Shukla *et al.*, 2014). Kadangi kai kurios kilpos gali sąveikauti su greta esančiais baltymais ir stabilizuoti virusines nanostruktūras, genetinės modifikacijos šiose dalyse sutrikdytų baltymų tarpusavio sąveikas. Tam, kad chimeriniai baltymai neprarastų gebėjimo formuoti nanostruktūras, yra svarbu nesutrikdyti struktūrinio baltymo erdvinio susilankstymo bei nepažeisti sąveikų tarp greta esančių struktūrą formuojančių baltymų. Chimerinių virusinių nanostruktūrų gavimui yra svarbios ne tik vietos, į kurias įterpiami ar prijungiami baltyminiai fragmentai, bet ir peptido/baltymo fizikinės ir cheminės savybės (Chen *et al.*, 2021; Karpenko *et al.*, 2000; Porta *et al.*, 2003; Rioux *et al.*, 2012; Uhde *et al.*, 2005).



9 pav. Virusų erdviniai modeliai. Šie modeliai pademonstruoja virusus ir virusines nanostruktūras formuojančių baltymų erdvinio susilankstymo skirtumus. Baltymų N galas pavaizduotas mėlyna spalva, o C galas – raudona spalva. HBV – hepatito B virusas, HPV-B19 – žmogaus parvovirusas B19, PCV2 – kiaulių cirko virusas 2, TMV – tabako mozaikos virusas (pateiktas skersinis vamzdelinės struktūros pjūvis). PDB identifikaciniai numeriai pateikti virš virusų erdvinių modelių. Pagal Lei *et al.*, 2020.

Virusinių nanostruktūrų detalesnis charakterizavimas gali būti atliktas pašalinant virusines nanostruktūras formuojančių baltymų N ir/arba C galo dalis. Tai leidžia identifikuoti savaiminiam susirinkimui svarbias baltymų dalis, kadangi AR pašalinimas gali sutrikdyti baltymo gebėjimą formuoti nanostruktūrą, neturėti tam įtakos arba, retesniais atvejais, gali lemti netgi efektyvesnę baltymo sintezę ar ilgesnių baltyminių fragmentų prijungimą nesutrikdant savaiminio susirinkimo (Hassani-Mehraban *et al.*, 2015; Lico *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2007).

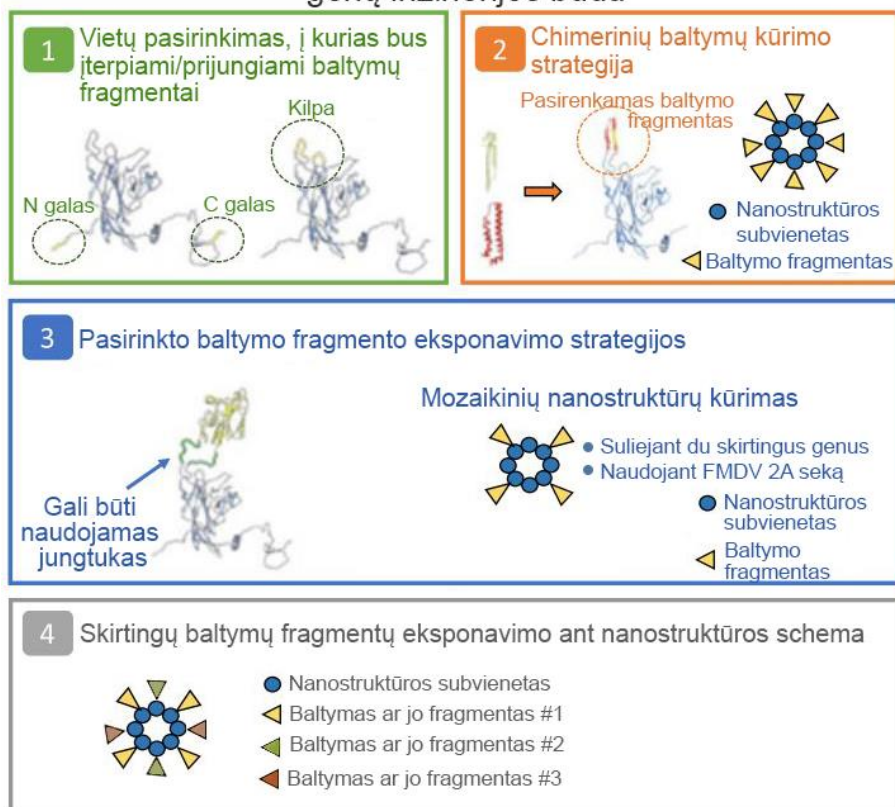
Genų inžinerijos būdu kuriant chimerines nanostruktūras, kiekviena jų turi būti detalai ištyrinėta ir nustatyta optimaliausia baltymo dalis, į kurią gali būti įterpti/prijungti baltyminiai fragmentai nesutrikdant struktūrą formuojančio baltymo savaiminio susirinkimo. Nors egzistuoja kompiuteriniai algoritmai, įvertinantys galimas struktūrą formuojančių baltymų modifikacijas prijungiant baltyminius fragmentus bei chimerinių baltymų erdvinį susilankstymą, tačiau tokių algoritmų sudarymas užtrunka daug laiko ir jo pritaikymas dažnai apsiriboja tiriant homologinių virusų baltymus (Lua *et al.*, 2014; Mobini *et al.*, 2020).

Kai kurios virusinės nanostruktūros negali eksponuoti didesnių nei 30 AR ilgio baltyminių fragmentų, nes, nepriklausomai nuo fragmento įterpimo/prijungimo vietos prie virusinio baltymo, bet kokios modifikacijos gali neigiamai paveikti baltymų erdvinį susilankstymą ir gebėjimą formuoti nanostruktūras. Baltymų erdvinį susilankstymą gali pagerinti iš serino ir glicino AR sudarytų jungtukinių peptidų panaudojimas. Jie, erdviškai atskirdami virusinę nanostruktūrą formuojantį baltymą nuo prie jo prijungto

baltyminio fragmento, pagerina baltymų erdvinį susilankstymą, o tai gali lemti efektyvesnį baltymų savaiminį susirinkimą į nanostruktūras (10 pav.) (Hu *et al.*, 2004; Kalnciema *et al.*, 2011; Peabody *et al.*, 2009; Urakami *et al.*, 2017; Zvirbliene *et al.*, 2006).

Tam, kad sumažinti baltyminio fragmento neigiamą poveikį virusinę nanostruktūrą formuojančio baltymo erdviniam susilankstymui, gali būti sintetamos mozaikinės virusinės nanostruktūros. Jas sudaro nemodifikuoti, virusinę nanostruktūrą formuojantys baltymai ir modifikuoti virusinę nanostruktūrą formuojantys baltymai, prie kurių yra prijungti peptidai arba svetimi baltymai (10 pav.). Mozaikinių nanostruktūrų gavimui, heterologinėje baltymų raiškos sistemoje gali būti sintetinami du atskiri baltymai – virusinę nanostruktūrą formuojantis nemodifikuotas baltymas bei modifikuotas baltymas, turintis prijungtą peptidą ar baltymą. Raiškos sistemoje susintetinti du skirtingi baltymai, jungdamiesi tarpusavyje, gali suformuoti mozaikinę nanostruktūrą (10 pav.) (Brown *et al.*, 2009). Tačiau ši strategija yra nekontroliuojama – nemodifikuotų nanostruktūrą formuojančių baltymų ir modifikuotų baltymų su baltyminiais fragmentais santykis gali skirtis nuo 1:3 iki 1:10 (Shukla *et al.*, 2014).

Chimerinių ir mozaikinių virusinių nanostruktūrų kūrimas genų inžinerijos būdu



10 pav. Chimerinių ir mozaikinių nanostruktūrų kūrimo schemas genų inžinerijos būdu. (1) Priklausomai nuo to, ar norima baltyminių fragmentą eksponuoti struktūros išorėje ar nukreipti į vidinę ertmę, yra nustatomos virusinės nanostruktūros į išorę ar į vidų nukreiptos baltymų dalys. Dažniausiai pasirenkamas nanostruktūras formuojančių baltymų N ir/arba C galas bei kilpos. (2) Kuriami chimeriniai baltymai, kuriuose kiekvienas nanostruktūrą formuojantis baltymas eksponuoja baltyminių fragmentą. (3) Jeigu baltyminiai fragmentai neigiamai paveikia nanostruktūrą formuojančio baltymo erdvinį susilankstymą ir savaiminį susirinkimą, gali būti naudojamas jungtukinis peptidas arba kuriamos mozaikinės nanostruktūros, kuriose baltyminiai fragmentai eksponuojami mažesniu dažniu. (4) Nanostruktūros gali eksponuoti kelis skirtingus baltyminius fragmentus. Paveikslėlis modifikuotas pagal Hume *et al.* (2019).

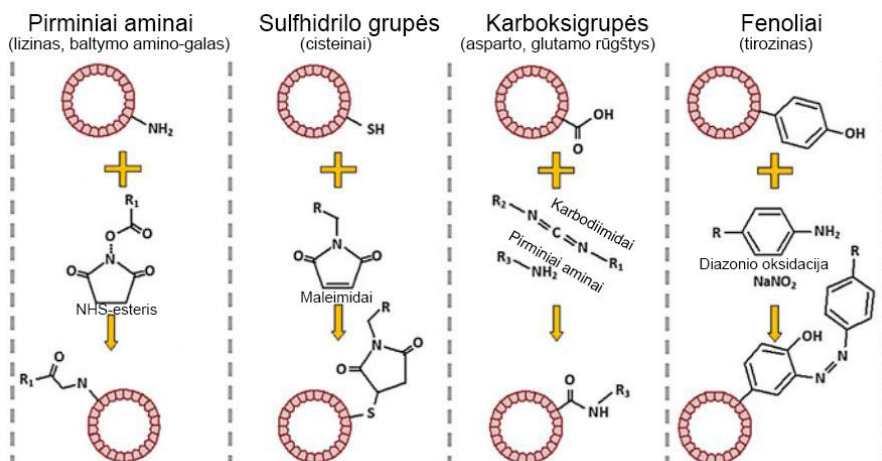
1.3.2. Nanostruktūrų modifikavimas cheminės konjugacijos metodu

Cheminės konjugacijos metodu modifikuojamos jau susirinkusios virusinės nanostruktūros prie jų prijungiant peptidus ar baltymus. Dažniausiai

vykdomas lizino šoninės aminogrupės ir baltymų N galo acilinimas, cisteino sulfhidrilo grupės alkilimas, asparto bei glutamo rūgšties karboksigrupės modifikavimas prijungiant aminos ar tirozino fenolio hidroksigrupės nukleofilinimo reakcijos (11 pav.) (Smith *et al.*, 2013; Strable ir Finn, 2009). 2002 metais aprašyta pirmoji chemiškai konjuguota nanostruktūra: CPMV kapsidę sudaro 120 baltymų (pseudo T = 3 ikosaedrinės simetrijos), kurie į paviršių eksponuoja lizino AR reaktyvias aminogrupes. Naudojant N-hidroksisukcinimido esterį (NHS-esterį) arba izotiocionatą, prie CPMV struktūros paviršiaus buvo prijungta 240 fluoresceino molekulių (Wang *et al.*, 2002). Šis eksperimentas davė pradžią platesnėms virusinių nanostruktūrų pritaikymo galimybėms, kurios bus detaliau aptartos 1.5. skyrelyje.

Cheminėms reakcijoms gali būti naudojami heterobifunkciniai reagentai (angl. *heterobifunctional crosslinkers*), sujungiantys atskirus baltymus ir veikiantys kaip erdviniai atskyrikliai tarp jų. Pavyzdžiui, sulfo-SMCC reagentas, viename gale sudarytas iš NHS-esterio (N-hidroksisukcinimidas) ir kitame gale iš maleimido, sujungia virusinės nanostruktūros paviršiuje esančias lizino aminogrupes su įterpiamo baltymo cisteino sulfhidrilo grupėmis suformuojant 8,3 Å tarpą tarp jų (Jiang *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 2004).

Cheminės konjugacijos efektyvumas gali būti pagerintas kai genų inžinerijos būdu yra modifikuojamas virusinę nanostruktūrą formuojantis baltymas į jį įterpiant papildomas AR, kurių šoninės grupės bus modifikuojamos cheminės konjugacijos metodu (Smith *et al.*, 2006; Steinmetz *et al.*, 2010). Kadangi nanostruktūros skiriasi dydžiu, jas formuojančių baltymų skaičiumi, baltymus sudarančiomis AR bei į išorę eksponuojamomis AR šoninėmis grupėmis, todėl kiekvienai virusinei nanostruktūrai reikia standartizuoti cheminės konjugacijos reakcijos sąlygas. Standartizavimas atliekamas keičiant virusinę nanostruktūrą formuojančių baltymų ir prijungiamų svetimų baltymų molinį santykį, reakcijos laiką ar temperatūrą (Mallajosyula *et al.*, 2014; Steinmetz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2002).



11 pav. Nanostruktūrų modifikavimo strategijos cheminės konjugacijos metodu. Pirminiai aminai, esantys lizino AR bei baltymų N galuose, cisteino sulfhidrilo grupės, asparto bei glutamo rūgščių karboksigrupės, tirozino aromatinis žiedai gali būti chemiškai konjuguojami prijungiant NHS-esterius, maleimidus, karbodiimidus, diazonius ar kitus reagentus. Pagal Donaldson *et al.* (2015).

1.4. Virusinių nanovamzdelių ypatybės

Kuriant nanostruktūras biomedicininiam pritaikymui – ląstelių-taikinių vaizdinimui, terapinių medžiagų gabenimui, svarbu atsižvelgti į struktūrų dydžio, formos ir paviršiaus savybes, kadangi jos lemia nanostruktūrų patekimo į ląsteles-taikinius greitį ir efektyvumą, sąveikos su receptoriais skaičių, efektorinių ląstelių aktyvinimą bei skirtingą struktūrų pašalinimo iš organizmo greitį (Geng *et al.*, 2007; Gratton *et al.*, 2008; Shukla *et al.*, 2015, 2012; Singh *et al.*, 2007). Kadangi ląstelės yra 10-100 kartų didesnės už nanostruktūras, didesnį ilgio ir skersmens santykį turintys nanovamzdeliai sąveikauja su didesniu ląstelės paviršiuje esančių receptorių skaičiumi. Ant nanovamzdelių prijungti peptidai ar baltymai yra eksponuojami išilgai struktūros, tuo tarpu ant ikosaedrinė VPD prijungti baltyminiai fragmentai yra eksponuojami visomis kryptimis, dėl to yra sumažinamas sąveikos su ląstelės receptoriais efektyvumas (Kolhar *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2014).

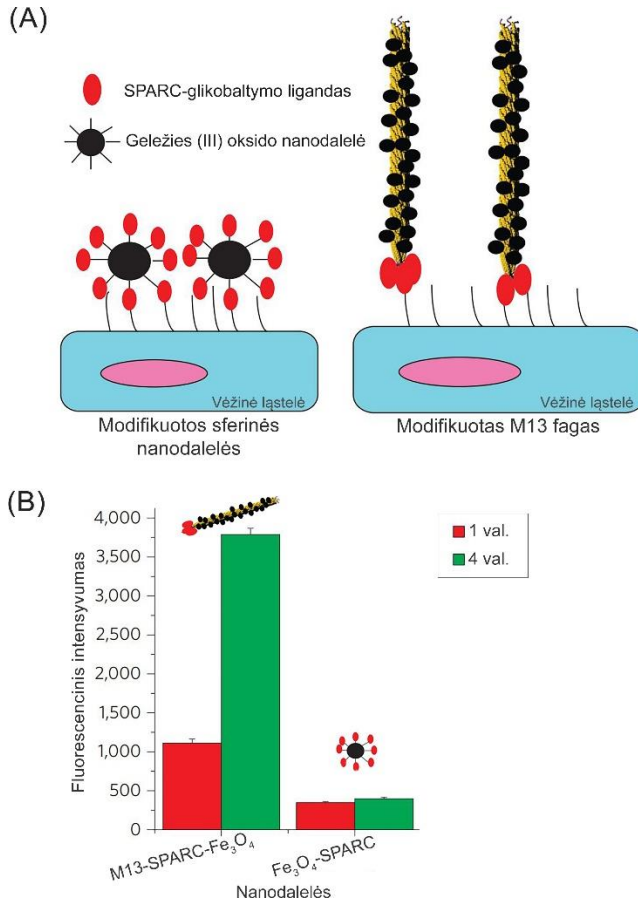
Lyginant su ikosaedrinėmis VPD, vamzdelinės formos nanostruktūros pasižymi keletu pranašumų. Nanovamzdelius sudaro iki keliasdešimties kartų didesnis struktūrinių baltymų skaičius, o didesnis nanovamzdelių paviršiaus plotas lemia daugiau akceptorinių vietų, skirtų baltyminių fragmentų eksponavimui ar medžiagų prijungimui. Tai yra didelis privalumas kuriant biologinės kilmės nešiklį biotechnologiniam pritaikymui (12 pav.) (Barua *et*

al., 2013; Ghosh *et al.*, 2012). Tikslinių molekulių sukonzentravimas ant vieno nanovamzdelio lemia efektyvesnę ląstelės-taikinių vaizdinimą gaunant aukštesnės skiriamosios gebos nuotraukas (12 pav. B). Pavyzdžiui, 300 nm ilgio ir 18 nm skersmens TMV, sudarytas iš 2130 identiškų kapsidės baltymų, gali būti chemiškai konjuguotas prie išorinio paviršiaus prijungiant 2100 rodamino dažo molekulių bei supakuojant ~ 650 dažo molekulių į struktūros vidinę ertmę (Schlick *et al.*, 2005). Tuo tarpu prie 30 nm skersmens ikosaedrinės CPMV struktūros galima prijungti tik 240 rodamino dažo molekulių (Wang *et al.*, 2002). Be to, nanovamzdeliai pasižymi anizotropine³ forma ir monodispersiniu dydžiu. Dėl šių savybių ant analizuojamo paviršiaus galima kryptingai išdėstyti vamzdelinės formos struktūras suformuojant ilgas fibriles ir pritaikant jas naujos kartos ličio jonų baterijų kūrimui (Nam *et al.*, 2006; Pomerantseva *et al.*, 2013).

Mokslinių tyrimų, lyginančių vamzdelinių ir ikosaedrinų nanostruktūrų imunogeniškumą tarpusavyje, nėra daug, tačiau yra duomenų, kad nanostruktūrų dydžio ir formos lemiamas nevienodas paplitimas po organizmą ir struktūrų pašalinimo iš organizmo greitis gali turėti įtakos imuninio atsako sužadimui (Irvine *et al.*, 2013). Wei su kolegomis (2014) pademonstravo estriolio haptenuis⁴ chemiškai konjuguotų vamzdelinio TMV ir ikosaedrinio CPMV formos įtaką humoralinio imuninio atsako sužadimui. Pasirodo, vamzdelio formos TMV sukėlė net ~ 11,4 kartų stipresnę humoralinį imuninį atsaką ir didesnę estriolio molekulei specifinių antikūnų kiekį nei ikosaedrinis CPMV. Naudojant gyvūnų modelius ir atliekant imunizacijos eksperimentus nustatyta, kad didžioji vamzdelio formos struktūrų dalis (TMV, PVX) ilgiau cirkuliuoja kraujyje bei kaupiasi blužnyje (Shukla *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013), o ikosaedrinės formos nanostruktūros (CCMV, CPMV ir net sferinės TMV nanodalelės, gautos aukšta temperatūra paveikus TMV vamzdelius), labiau koncentruojasi kepenyse ir greičiau pašalinama iš kraujotakos sistemos (Bruckman *et al.*, 2014; Kaiser, 2007; Singh *et al.*, 2007).

³Anizotropija (gr. *anisos* – nelygus + gr. *tropos* – kryptis, savybė) – medžiagų fizikinių savybių (mechaninių, šiluminių, elektrinių, magnetinių, optinių) kitimas priklausomai nuo analizuojamos krypties.

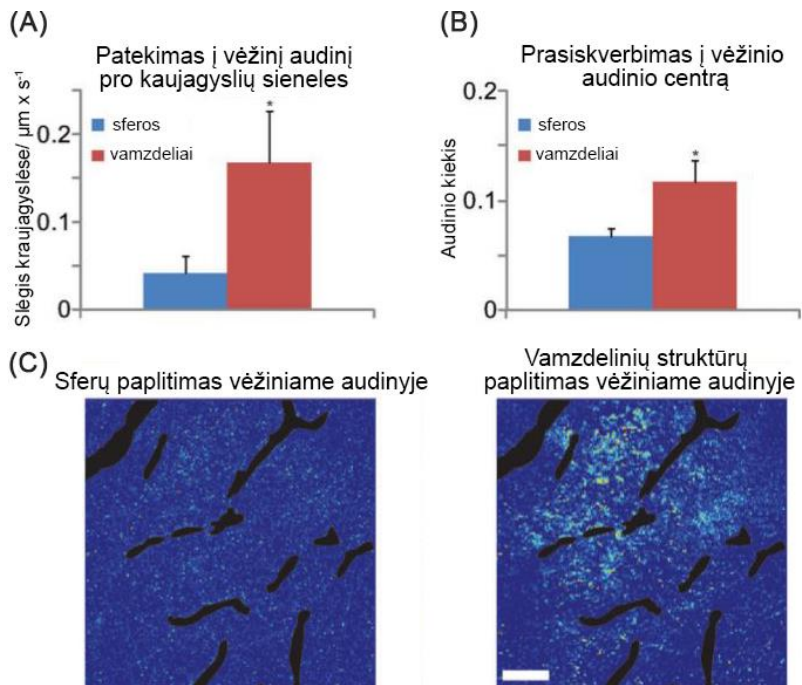
⁴Haptenas – neimunogeniškos mažos molekulinės masės molekulės, kurios tampa imunogeniškos jas sujungus su baltyminiu nešikliu ar stabilizuojančia molekule.



12 pav. Vėžinių ląstelių vaizdinimo tikslumo priklausomybės nuo struktūrų formos įvertinimas. (A) Schematinis modifikuotų struktūrų pavaizdavimas. Kairėje: geležies (III) oksido sferinės nanodalelės, padengtos vėžinėms ląstelėms būdingo SPARC glikobaltymo ligandais. Dešinėje: filamentinis M13 fagas, padengtas geležies (III) oksido nanodalelėmis ir eksponuojantis SPARC glikobaltymo ligandus. (B) Fluorescencinio intensyvumo naudojant modifikuotas sferines geležies (III) oksido nanodaleles ir filamentinį M13 fagą įvertinimas. Modifikuoto M13 fago fluorescencinis intensyvumas po 1 ir po 4 valandų inkubavimo su vėžinėmis ląstelėmis buvo atitinkamai 3 ir 11 kartų didesnis nei sferinių nanodalelių. Pagal Ghosh (2012).

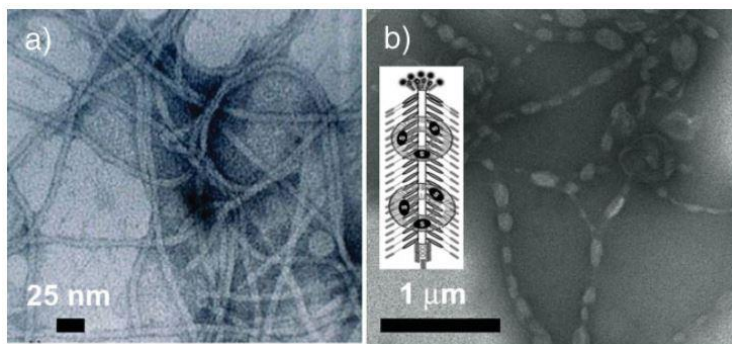
Virusinės nanostruktūros gali patekti į ląsteles, todėl jos gali būti pritaikytos vėžio gydymui. Pasyvus nanostruktūrų patekimas į vėžinius audinius (angl. *enhanced permeability and retention effect*) yra aiškinamas vėžiniam audiniui būdinga mikroaplinka – susiformavusių kraujagyslių padidėjusiu pralaidumu ir neefektyvia limfos cirkuliacija. Ikosaedrinės formos nanostruktūros dažniausiai aptinkamos kraujagyslių centrinėje dalyje, o vamzdelio formos struktūros, dėl savo pailgos formos yra veikiamos

hidrodinaminės jėgos ir labiau koncentruojasi prie kraujagyslių kraštų (Toy *et al.*, 2014). Šios savybės leidžia vamzdelinėms struktūroms efektyviau prisijungti prie pažeistą audinį supančių kraujagyslių endotelio receptorių bei efektyviau patekti į vėžinio audinio ląsteles (angl. *tumor homing*) (13 pav.) (Chauhan *et al.*, 2011; Geng *et al.*, 2007; Shukla *et al.*, 2012, 2015).



13 pav. Sintetinių sferinių nanodalelių ir nanovamzdelių *in vivo* paplitimo vėžiniame audinyje įvertinimas. (A) Struktūrų prasiskverbimo efektyvumo pro kraujagyslių endotelį į vėžinį audinį tyrimas. Nanovamzdeliai 4,1 karto efektyviau prasiskverbė pro kraujagyslių endotelį nei sferinės nanodalelės. (B) Struktūrų koncentravimosi vėžiniame audinyje efektyvumo tyrimas. Nanovamzdeliai 1,7 karto efektyviau prasiskverbė į vėžinius audinius nei sferinės nanodalelės. (C) Struktūrų paplitimo vėžiniame audinyje fluorescencinės nuotraukos. Kraujagyslės pavaizduotos juoda spalva. Nuotraukų mastelis 100 nm. Pagal Chauhan *et al.* (2011).

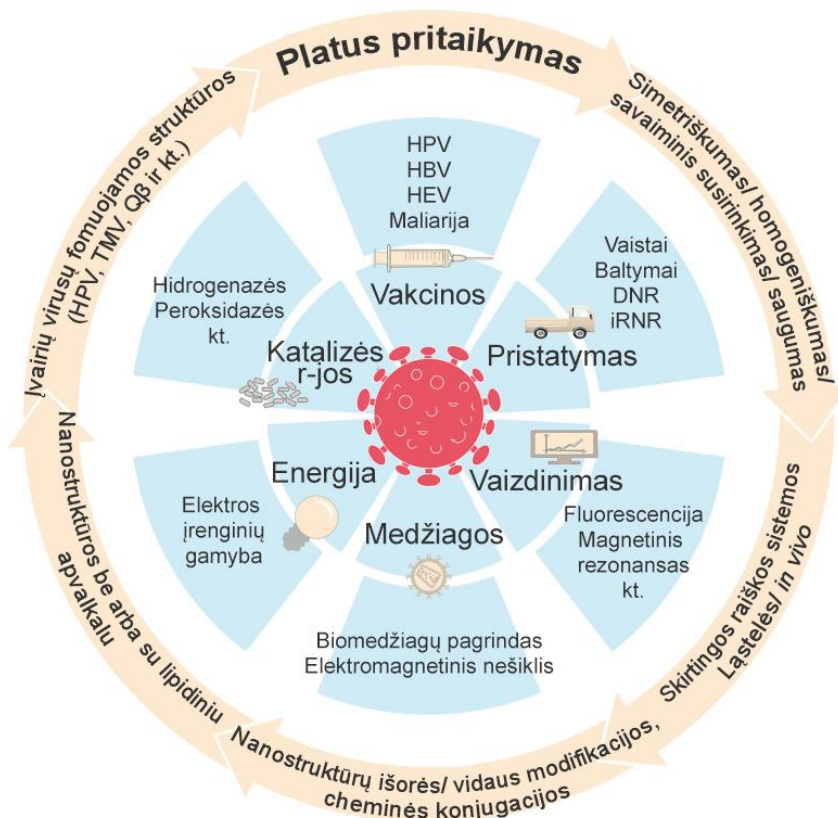
Filamentinis M13 fagas taip pat turi pranašumų prieš ikosaedrinės VPD, nes pailgas nanovamzdelis gali būti padengtas liposomomis sukcentruojant didesnę terapinių medžiagų kiekį vėžio gydymui, o nanostruktūros paviršius gali būti dekoruojamas vėžinėms ląstelėms specifiniais ligandais. Kadangi nanovamzdeliai specifiškai patenka į vėžinius audinius, tokiu būdu yra padidinamas supakuotos terapinės medžiagos efektyvumas ir sumažinamas gydymo šalutinis poveikis sveikiems audiniams (14 pav.) (Ngweniform *et al.*, 2009).



14 pav. Filamentinio M13 fago ir jo padengimo liposomomis TEM nuotraukos. (A) Nemodifikuoto M13 fago nuotrauka. (B) Liposomomis padengto M13 fago TEM nuotrauka. Kadangi liposomos yra sferinės, jos padengia nanovamzdelius netolygiai. Kairėje schematiškai pavaizduota M13 fago modifikacijos schema, kurioje juodai pažymėtos liposomoje esančios vėžio gydymui skirtos terapinės medžiagos. Pagal Ngweniform *et al.* (2009).

1.5. Virusinių nanostruktūrų pritaikymo galimybės

Susidomėjimas biologinės kilmės nanostruktūromis yra milžiniškas dėl jų itin plačių pritaikymo galimybių: į virusinių nanostruktūrų vidinę ertmę galima supakuoti terapines medžiagas, nukleorūgštis, baltymus, fluorescencinius dažus ar magnetines nanodaleles, o genų inžinerijos ir cheminės konjugacijos metodai leidžia modifikuoti virusinės nanostruktūros baltyminių fragmentų eksponavimui ant struktūros paviršiaus arba nukreipiant juos į struktūros vidinę ertmę. Toks toksiškų ar aplinkos veiksniams jautrių junginių supakavimas virusinės nanostruktūros vidinėje ertmėje apsaugo juos nuo nespecifinių sąveikų *in vivo* bei sumažina nanostruktūroje supakuotos medžiagos pašalinį poveikį sveikoms ląstelėms. Virusinės nanostruktūros naudojamos vakcinų kūrimui, gali būti naudojamos terapiniams tikslams medžiagų, aktyvių fermentų arba fluorescencinių žymenų pakavimui ir ląstelių-taikinių vaizdinimui, struktūrų paviršiaus modifikacijoms ar ligandų, specifiskai nukreipiančių nanostruktūras į pasirinktą ląstelę-taikinį prijungimui, virusinės nanostruktūros gali būti pritaikytos biokatalizės reakcijoms ar net naujos kartos energijos šaltinių kūrimui (15 pav.) (Comas-Garcia *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2013). Kadangi virusinių nanostruktūrų pritaikymas įvairiose mokslo srityse sparčiai auga, todėl didėja poreikis naujų nanostruktūrų kūrimui, kurios atitiktų technologinius iššūkius ir reikalavimus: efektyviau pakuotų tikslines medžiagas į vidinę virusinių nanostruktūrų ertmę ar specifiskiau sąveikautų su tikslinėmis ląstelėmis, todėl yra kuriamos ir charakterizuojamos naujos virusinės nanostruktūros.



15 pav. Virusinių nanostruktūrų pritaikymo įvairiose mokslo srityse schematinis pavaizdavimas. Nanostruktūros gali būti pritaikytos vakcinų kūrimui, tikslių medžiagų supakavimui ir pristatymui, ląstelių vaizdinimui, medžiagų kūrimui, elektronikos įrenginių kūrimui bei katalizės reakcijų vykdymui. HPV – žmogaus papilomos virusas, HBV – hepatito B virusas, HEV – hepatito E virusas, TMV – tabako mozaikos virusas. Pagal Ding *et al.* (2018) ir Wu *et al.* (2012).

1.5.1. Virusinių nanostruktūrų imunogeniškumas ir jų pritaikymas vakcinų kūrimui

Susidomėjimas virusinių nanostruktūrų pritaikymu vakcinų kūrimui sparčiai išaugo, kadangi pasaulį sukausto viena paskui kitą atsirandančios virusų sukeltos epidemijos ir pandemijos: 2002-2003 m. SARS-CoV sukelta sunkaus ūmaus kvėpavimo respiracinio sindromo pandemija (angl. *Severe acute respiratory syndrome*, SARS), 2012 m. MERS-CoV viduriniuose Rytuose sukelta kvėpavimo respiracinio sindromo epidemija (angl. *Middle East respiratory syndrome*, MERS), 2013-2016 m. Ebola viruso, 2015-2016 m. Zika viruso protrūkiai bei sezoniniai gripo viruso A protrūkiai. Galiausiai, 2019 m. Uhane, Kinijoje, atsiradęs ir po visą pasaulį

žaibiškai išplitęs SARS-CoV-2 sukėlė iki šiol besitęsiančią pandemiją (Fauci ir Morens, 2016; Horby, 2018; Ksiazek *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2016; Tu *et al.*, 2020; Webby ir Webster, 2003; Zaki *et al.*, 2012). Remiantis 2021 m. rugsėjo mėnesio Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, 17 iš 185 priešklinikinių tyrimų ir 5 iš 117 klinikinių tyrimų testuoja virusinių nanostruktūrų pritaikymą vakcinų kūrimui prieš 2019 m. pandemiją sukėlusį SARS-CoV-2 virusą (WHO, 2021).

Vakcinos yra kuriamos imuninio atsako sužadinimui prieš virusus, bakterijas ar profilaktiniais bei terapiniais tikslais gydant vėžinius susirgimus ar lėtines ligas, tokias kaip kokaino ar nikotino priklausomybė, Alzheimerio liga (Bernstein *et al.*, 2015; Dorn *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2013; Maurer *et al.*, 2005; Qiao *et al.*, 2020). Egzistuoja keletas pagrindinių vakcinų kūrimo strategijų, paremtų gyvais susilpnintais virusais, chemiškai inaktyvuotais virusais, subvienetų vakcinomis, mRNR technologija, virusinėmis nanostruktūromis imuninio atsako sukėlimui prieš tėvinius virusus arba modifikuotomis virusinėmis nanostruktūromis, eskonuojančiomis baltymų fragmentus, prieš kuriuos norima sukelti imuninį atsaką (Garland *et al.*, 2007; Hawkes, 2015; Jackson *et al.*, 2020; Krammer, 2020).

Daugumą licencijuotų vakcinų sudaro inaktyvuoti arba susilpninti virusai. Nors tokios vakcinos yra efektyvios, tačiau nėra saugios, nes susilpnintas virusas gali tapti virulentiškas arba vakcinos paruošimo metu gali būti įvykdytas nepilnas viruso cheminis inaktyvinimas (Herrera-Rodriguez *et al.*, 2019; Kenney *et al.*, 2011). Tuo tarpu vakcinos, paremtos virusinėmis nanostruktūromis, yra laikomos saugiomis ir efektyviomis, nes virusinės nanostruktūros išlaiko infektyvaus viruso morfologines savybes – viruso baltymai suformuoja erdvines nanostruktūras, kuriose baltymai tvarkingai, organizuoti ir pasikartojančiai išsidėsto erdvėje, suformuodami identiškus tarpus tarp struktūrą sudarančių baltymų. Virusinės nanostruktūros, patekusios į organizmą, nesireplikuoja ir negali sukelti virusinių infekcijų (Balke ir Zeltins, 2019; Fuenmayor *et al.*, 2017).

PSO patvirtino mielėse ir bakterijose susintetintų VPD pagrindu sukurtas vakcinas žmonių skiepijimui prieš onkogeninį papilomos virusą, hepatito B virusą, maliariją bei Kinijoje žmonių skiepijimui prieš hepatito E virusą (Agnandji *et al.*, 2015; Garland *et al.*, 2007; Rebedea *et al.*, 2006; Stevens *et al.*, 1987; Wheeler *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012). Susidomėjimas virusinėmis nanostruktūromis vakcinų kūrimui yra didelis, nes, remiantis 2021 m. rugsėjo mėnesio duomenimis, yra vykdomi 145 klinikiniai tyrimai, paremti virusinėmis nanostruktūromis ir ateityje dalis jų gali būti pritaikytos licencijuotų vakcinų kūrimui (1 lentelė) (Qian *et al.*, 2020; <https://clinicaltrials.gov/>).

Kadangi dauguma pavienių baltymų, prieš kuriuos norima sukelti imuninį atsaką, yra mažai imunogeniški, o pavieniai peptidai gali būti visai neimunogeniški, todėl jie gali būti prijungti genų inžinerijos ar cheminės konjugacijos metodais prie virusinės nanostruktūros paviršiaus taip padidinant jų imunogeniškumą (Carignan *et al.*, 2015; Govasli *et al.*, 2019; Hawkes, 2015; Kündig *et al.*, 2006; Peabody *et al.*, 2008). Pavyzdžiui, hepatito B viruso paviršiaus antigenas HBsAg (angl. *hepatitis B surface antigen*) savaime susirenka į ikosaedrinę VPD, kurios naudojamos žmonių vakcinavimui prieš hepatito B virusą (komerciškai prieinamos vakcinos Engerix-B[®], Recombivax HB/ H-B-Vax[®]II ir kitos) (1 lentelė) (Lacson *et al.*, 2005; Stevens *et al.*, 1987). Tas pats HBsAg baltymas gali būti modifikuojamas prie jo prijungiant baltymų fragmentus, prieš kuriuos norima sukelti imuninį atsaką. Licencijuotą Mosquirix[™] vakciną sudaro baltymo HBsAg formuojamos VPD, ant kurių yra eksponuojami *Plasmodium falciparum* peptidai (Hawkes, 2015). Kitas virusinių nanostruktūrų pritaikymo vakcinų kūrimui pavyzdys – gripo viruso A hemagliutinino (HA) baltymo suliejimas su TMV kapsidės baltymais. Modifikuota TMV nanostruktūra, eksponuojanti HA baltymą, pelėms sukėlė nuo T ląstelių priklausomą humoralinį imuninį atsaką, pasireiškiantį HA baltymui specifinių IgG antikūnų sinteze, ir peles apsaugantį nuo viruso infekcijos jau po pirmos imunizacijos (Mallajosyula *et al.*, 2014).

1 lentelė. VPD pagrindu sukurtos licencijuotos ir klinikiniuose tyrimuose testuojamos vakcinos.

Vakcina	Raiškos sistema	VPD formuojantis baltymas	Stadija	Šaltinis
Recombivax HB/ H-B-Vax[®]II Merck & Co., JAV	<i>S. cerevisiae</i>	HBsAg	Licencijuota	Stevens <i>et al.</i> , 1987
Engerix-B[®] (GlaxoSmithKline, Belgija)	<i>S. cerevisiae</i>	HBsAg	Licencijuota	Lacson <i>et al.</i> , 2005
Keturvalentė Gardasil[®] (Merck & Co., JAV)	<i>S. cerevisiae</i>	HPV6/-11/-16/-18 kapsidės L1 baltymas	Licencijuota	Garland <i>et al.</i> , 2007
Divalentė Cervarix[®] (GlaxoSmithKline, JAV)	Vabzdžių ląstelės	HPV16/-18 kapsidės L1 baltymas	Licencijuota	Wheeler, 2009
Divalentė Cecolin[®] (Innovax, Kinija)	<i>E. coli</i>	HPV16/-18 kapsidės L1 baltymas	Licencijuota	Qiao <i>et al.</i> , 2020

Lentelės tęsinys kitame puslapyje

Hecolin® (Innovax, Kinija)	<i>E. coli</i>	HEV kapsidės baltymo E2 domenas	Licencijuota	Wu <i>et al.</i> , 2012
Mosquirix™ (GlaxoSmithKline, Belgija)	<i>S. cerevisiae</i>	HBsAg formuojamos VPD, sulietos su <i>P. falciparum</i> RTS epitopu	Licencijuota	Hawkes, 2015
Keturvalentė gripo vakcina NanoFlu (Novavax, JAV)	Vabzdžių ląstelės	Gripo viruso rekombinantinis HA baltymas	Fazė 3	Portnoff, 2020
Trivalentė P2-VP8 (Valterio Reedo tyrimų institutas, JAV)	<i>E. coli</i>	Rotaviruso kapsidės baltymas VP8	Fazė 1/2	Lei <i>et al.</i> , 2020
Dvivalentė GI.1/ GI.4 vakcina (Takeda farmacinė kompanija, Japonija)	Vabzdžių ląstelės	Noroviruso kapsidės baltymas VP1	Fazė 2b	Leroux-Roels <i>et al.</i> , 2018
RSV F (Novavax, JAV)	Vabzdžių ląstelės	RSV F baltymas	Fazė 3	Fries <i>et al.</i> , 2017
SARS-CoV2 (Medicago, Kanada)	Augalų ląstelės	SARS-CoV-2 S baltymas	Fazė 2/3	Medicago, 2021

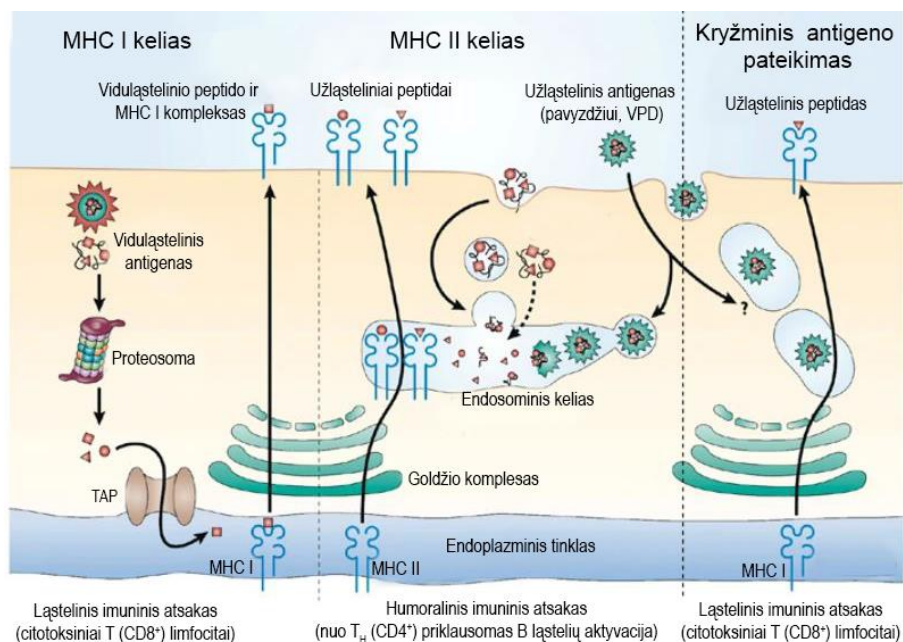
HBsAg – hepatito B viruso paviršiaus baltymas; HPV – žmogaus papilomos virusas; HEV – hepatito E virusas; RSV – respiracinis sincitinis virusas; HA – gripo viruso hemagliutinino baltymas. Remiantis 2021 metų rugsėjo mėnesio duomenimis (<https://clinicaltrials.gov/>).

Norint suprasti virusinių nanostruktūrų sukeliama imuninio atsako kelius ir nanostruktūrų pritaikymo galimybes vakcinų kūrime, reikia susipažinti su imuninio atsako pagrindiniais komponentais. Dendritinės ląstelės (DL) yra profesionalios antigenų pateikiančios ląstelės, tačiau antigenus fagocituoti ir sukelti imuninį atsaką taip pat gali makrofagai ir B ląstelės. Nors egzistuoja alternatyvūs ląstelių sužadinimo keliai, daugybė kostimuliacinių veiksnių ir citokinių, toliau dėmesys bus skiriamas DL, T ir B ląstelių funkcijoms aptarti.

DL atpažįsta svetimus antigenus, fagocituoja, vykdo jų degradaciją endosomose veikiant proteazėms ir, priklausomai nuo antigeno kilmės – viduląstelinis ar užląstelinis, ant savo paviršiaus komplekse su MHC I arba MHC II molekulėmis pateikia trumpus peptidus (8-25 AR) citotoksinėms T (CD8⁺) ląstelėms (CTL) arba T (CD4⁺) ląstelėms pagalbininkėms (T_H) (16 pav.). T ląstelės, sąveikaudamos su antigenais, esančiais kompleksuose su MHC I arba MHC II, tampa efektorinėmis ląstelėmis (Wieczorek *et al.*, 2017). Priklausomai nuo antigeno pateikimo ant MHC molekulių klasės, gali būti sužadinamas ląstelinis arba humoralinis imuninis atsakas. Endogeninės arba viduląstelinės kilmės antigenai (pavyzdžiui, vėžinių ląstelių ar virusais

infekuotų ląstelių sintetinami pakitę ar organizmui nebūdingi antigenai) dažniausiai pateikiami ant MHC I komplekso sužadinant ląstelinį imuninį atsaką, pasireiškiantį CTL veikimu. Egzogeniniai arba užląsteliniai antigenai (dažniausiai virusai ar bakterijos) pateikiami ant MHC II molekulių sužadinant humoralinį imuninį atsaką, pasireiškiantį B ląstelių aktyvacija ir peptidui specifinių antikūnų sinteze (Neefjes *et al.*, 2011). Alternatyvus ląstelinio imuninio atsako sužadinimas vyksta kai DL egzogeninės kilmės antigenus (pavyzdžiui, virusus), kurie turėtų būti pateikiami ant MHC II klasės molekulių, kryžmiškai pateikia kompleksuose su MHC I molekulėmis aktyvuojant ląstelinį imuninį atsaką (16 pav.) (Burgdorf *et al.*, 2008; Heath ir Carbone, 2001).

Humoralinis imuninis atsakas, pasireiškiantis B ląstelių proliferacija į plazmines ląsteles, sekretuojančias antigenui specifinius antikūnus, gali būti nuo T-ląstelių priklausomas ir nuo T-ląstelių nepriklausomas. Nuo T-ląstelių priklausomas B ląstelių aktyvinimas vyksta kai T_H ($CD4^+$) ląstelės, sąveikaudamos su peptidais, esančiais kompleksuose su MHC II molekulėmis ant APL ląstelių paviršiaus, tampa efektorinėmis ląstelėmis ir geba aktyvinti B ląsteles sąveikaujant T-ląstelių receptoriams (TCR) su B-ląstelių receptoriais (BCR) kartu su kostimuliaciniais signalais (sąveikos tarp CD40 ir CD40L) (Allman *et al.*, 2019; Jegerlehner *et al.*, 2002). Aktyvintos B ląstelės proliferuoja ir diferencijuojasi į antikūnus gaminančias plazmines ląsteles bei į atminties ląsteles. Šio atsako metu vyksta B ląstelių imunoglobulino geno F_C sunkiosios grandinės klasių perjungimas ir sekretuojami aukšto afiniškumo IgG antikūnai (Eisen, 2014). Nuo T-ląstelių nepriklausoma B ląstelių aktyvacija pasireiškia dėka pasikartojančios virusinių nanostruktūrų paviršiaus struktūros, kuri į paviršių eksponuoja peptidus 5-10 nm atstumais. Tokie peptidai aktyvina B ląsteles kryžmiškai sąveikaudami su jų paviršiuje esančiais BCR (Bachmann *et al.*, 1995; Dintzis *et al.*, 1976; Jegerlehner *et al.*, 2002). Šio atsako metu klasių perjungimas dažniausiai nevyksta ir yra sintetinami žemo afiniškumo IgM antikūnai (Bachmann ir Zinkernagel, 1996). Galiausiai, B ląstelės gali veikti atpažįstant užląstelinius antigenus, juos apdorojant ir pateikiant ant MHC II komplekso. Tokį antigeną atpažįstančios T_H ($CD4^+$) ląstelės aktyvuojasi ir diferencijuoja į efektorines ląsteles, sukeliančias humoralinį imuninį atsaką (Adler *et al.*, 2017).



Nature Reviews | Immunology

16 pav. Antigenų pateikimo ant dendritinių ląstelių MHC I ir MHC II molekulių mechanizmų schemos. Peptidų pateikimo ant MHC I kelias: viduląsteliniai antigenai yra fagocituojami DL, suskaldomi proteosomose ir dalyvaujant transporteriniam baltymui TAP, yra pernešami iš citoplazmos į endoplazminį tinklą. Šie peptidai jungiasi su DL MHC I molekulėmis ir aktyvina ląstelinį imuninį atsaką, pasireiškiantį citotoksinių T ($CD8^+$) ląstelių veikimu. Peptidų pateikimo ant MHC II kelias: DL atpažinus užląstelinius antigenus, jie fagocituojami ir degraduojami endosomose. Suskaldyti peptidai pateikiami ant DL MHC II klasės molekulių, aktyvinamas nuo T ($CD4^+$) ląstelių priklausomas humoralinis imuninis atsakas. Kryžminis antigeno pateikimo kelias: DL užląstelinės kilmės antigenus fagocituoja, suskaldoma proteosomose ir kryžmiškai pateikia komplekse su MHC I molekulėmis aktyvinant ląstelinį imuninį atsaką. Pagal Villadangos ir Schnorrer (2007).

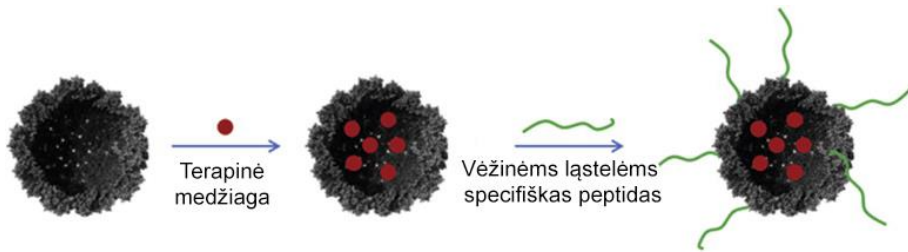
Dauguma klinikiniuose tyrimuose testuojamų virusinių nanostruktūrų yra skirtos vakcinų kūrimui nuo vėžio, tačiau, išskyrus vakcinas nuo žmogaus papilomos viruso (Gardasil[®], Cervarix[®], Cecolin[®] ir kitos) (Garland *et al.*, 2007; Qiao *et al.*, 2020; Wheeler *et al.*, 2009), PSO dar nepatvirtino nė vienos terapinės vakcinos nuo vėžio. Universalios virusinės nanostruktūros, kuri galėtų būti pritaikyta įvairių vakcinų kūrimui, nėra, nes imuninis atsakas priklauso ne tik nuo baltyminio fragmento, eksponuojamo ant virusinės nanostruktūros, bet ir nuo pačios nanostruktūros imunogeniškumo (Cai *et al.*, 2019). Viena virusinė nanostruktūra neturėtų būti naudojama kaip universalus nešiklis baltyminių fragmentų eksponavimui kuriant skirtingas vakcinas, nes

žmogaus organizme susidaręs išankstinis imuninis atsakas gali atpažinti virusinę nanostruktūrą, o tai gali sumažinti pačios nanostruktūros arba ant jos eksponuojamo baltyminio fragmento imunogeniškumą (Jegerlehner *et al.*, 2010; McCluskie *et al.*, 2016; Mok ir Chan, 2020).

1.5.2. Virusinių nanostruktūrų pritaikymo galimybės vėžio gydymui

Tradicinės vaistų molekulės pasklinda po visą organizmą ir nespecifiškai paveikia sveikas ląsteles. Dėl to reikia naudoti didesnes vaistų dozes, kurios dar labiau sustiprina pašalinį poveikį organizmui ir pablogina gyvenimo kokybę. Ypatingai didelis dėmesys skiriamas vėžio gydymui, kadangi chemoterapija pažeidžia viso organizmo ląsteles. Virusinių nanostruktūrų natūrali savybė patekti į vėžinius audinius daro jas patraukliomis vėžio gydymui: nanostruktūros gali būti pritaikytos tikslingam terapinių medžiagų gabenimui į ląsteles-taikinius modifikuojant nanostruktūrų išorinį paviršių ir vidinę ertmę (17 pav.). Nanostruktūros, terapines medžiagas supakuodamos į vidinę ertmę arba eksponuodamos ant savo paviršiaus, sukongcentruoja jas į vieną vietą, todėl reikia mažesnių vaisto dozių efektyviam gydymui pasiekti (Ashley *et al.*, 2011; Comas-Garcia *et al.*, 2020).

Terapiniams tikslams naudojamų nanostruktūrų natūralios savybės paverčiamos funkcionalumu: (a) nanostruktūros supakuoja tikslines medžiagas, adjuvantus, nukleorūgštis į struktūros vidinę ertmę, taip išvengiant medžiagų pasklidimo po organizmą, nespecifinių sąveikų ar medžiagos suskaldymo; (b) vykdant struktūrų paviršines modifikacijas, prijungiami ligandai ar signalinės molekulės, užtikrinančios specifines sąveikas su tikslinėmis ląstelėmis ir žymiai sumažinančios terapinės medžiagos sukeltą pašalinį poveikį; (c) kai kurios virusinės nanostruktūros pasižymi virusui, iš kurio yra kilusios, būdingu tropizmu, todėl nereikalauja papildomų modifikacijų ir gali savaime patekti į tikslines ląsteles (Chao *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2010; Hu ir Steinmetz, 2020; Röder *et al.*, 2017; Steinmetz *et al.*, 2010; Tagit *et al.*, 2017). Lyginant su tradiciškai naudojamomis medžiagomis – lipidinėmis dalelėmis, katijoniniais polimerais bei katijoniniais polipeptidais, virusinės nanostruktūros yra stabilesnės, yra netoksiškos ir greitai pašalinamos iš organizmo (Ashley *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2020; Smith *et al.*, 2015).



17 pav. Virusinių nanostruktūrų pritaikymo vėžio gydymui schema. Į nanostruktūros vidinę ertmę yra supakuojamos terapinės medžiagos, o ant struktūros išorinio paviršiaus yra eksponuojami vėžinėms ląstelėms specifiniai ligandai. Tokios modifikuotos nanostruktūros, patekusios į vėžines ląsteles, nugabena terapines medžiagas. Pagal Ma *et al.* (2012).

Virusinių nanostruktūrų natūrali savybė prasiskverbti į vėžinius audinius padidina jų efektyvumą vėžio gydyme. Pavyzdžiui, *E. coli* bakterijose susintetintas struktūrinis HBV kapsidės baltymas HBcAg, sulietas su RGD peptidu, sąveikaujančiu su vėžinėmis ląstelėmis, savaime susirenka į ikosaedrinę struktūrą. Keičiant tirpalo pH, į šių nanostruktūrų vidinę ertmę galima supakuoti doksorubiciną⁵ (DOX) ir taip gauti iš išorės ir iš vidaus modifikuotas nanostruktūras. Buvo pademonstruota, kad ksenografiniame pelės modelyje su žmogaus glioblastomos ląstelėmis, intraveniškai suleistos modifikuotos HBcAg baltymo formuojamos nanostruktūros po 24 val. koncentravosi vėžiniame audinyje, o po 12 dienų sumažino vėžinių ląstelių augimą net 90,7 % (Shan *et al.*, 2018).

Kai kurios virusinės nanostruktūros, priklausomai nuo jas sudarančių struktūrinių baltymų savybių, gali būti modifikuojamos prijungiant netgi keturias skirtingas funkcines grupes ar molekules. PhMV VPD supakavo gadolinį (Gd^{3+}) magnetiniam rezonansui atlikti kartu su fluorescenciniu dažų Cy5.5 ląstelių-taikinių vaizdinimui, tuo pat metu VPD išorinis paviršius buvo modifikuotas prijungiant peptidus, sąveikaujančius su prostatos vėžinėmis ląstelėmis. Tam, kad stabilizuoti VPD, išorinis struktūros paviršius buvo padengtas PEG molekulėmis. Tokiu būdu pademonstruotos plačios VPD pritaikymo galimybės kuriant efektyvius vaistus nuo vėžio ir tuo pat metu magnetinio rezonanso būdu arba fluorescencinės analizės būdu stebėti modifikuotų struktūrų paplitimo po organizmą dinamiką (Hu *et al.*, 2019).

⁵Doksorubicinas (DOX) – chemoterapinis vaistas, naudojamas vėžio gydymui.

1.5.3. Virusinių nanostruktūrų pritaikymas genų terapijoje

Į virusinių nanostruktūrų vidinę ertmę supakuota DNR, mRNR, siRNR gali būti specifiskai nugabenama į ląsteles-taikinius. Į ląstelę patekusi virusinė nanostruktūra yra suardoma lizosomose, o jos vidinėje ertmėje supakuota medžiaga išleidžiama į ląstelės vidų. Ligų gydymo atveju, panaudojant modifikuotas virusines nanostruktūras, galima būtų nuslopinti specifinių baltymų sintezę arba funkciškai pakeisti pažeistas genų sekas (Biddlecome *et al.*, 2019; Comas-Garcia *et al.*, 2020).

Į virusinių nanostruktūrų vidinę ertmę supakuoti genai pelių modeliuose yra nugabenami į tikslines ląsteles, kuriose stebima šių genų raiška (Chao *et al.*, 2018). Žmogaus poliomos viruso JC (angl. *human polyomavirus JC* arba *human polyomavirus 2*) formuojama VPD gali būti pritaikyta sisteminės autoimuninės ligos gydymui (angl. *systemic lupus erythematosus*). Į nanostruktūros vidinę ertmę supakuojama siRNR, veikdama RNR interferencijos mechanizmu, pelių modelyje nuslopina citokino IL-10 sintezę ir palengvina ligos simptomus (Chou *et al.*, 2010). Panašiu principu veikia MS2 bakteriofagas, į struktūros vidinę ertmę supakavęs siRNR ir konjuguotas su žmogaus transferinu, žmogaus vėžinėse ląstelėse nuslopina *bcl* onkogeno sintezę (Galaway ir Stockley, 2013). Nors dar nėra patvirtintos genų terapijos, paremtos virusinėmis nanostruktūromis, tačiau mokslininkų susidomėjimas biologinės kilmės struktūrų potencialu šioje srityje yra didelis.

1.5.4. Virusinių nanostruktūrų pritaikymas vaizdinimo tikslams

Ląstelinių ir molekulinų mechanizmų vizualizavimas atliekamas optiniu vaizdinimu, kompiuterine tomografija, magnetinio rezonanso vaizdinimu ar pozicine emisine tomografija. Vaizdinimo kokybė priklauso nuo naudojamos medžiagos, jos sužadinimo būdo, medžiagos kiekio bei nuo foninio triukšmo. Virusinės nanostruktūros yra tinkamos vaizdinimui atlikti *in vitro* ir *in vivo*, kadangi jos sukonzentruoja fluorescencinio dažo molekules arba magnetines nanodaleles supakuodamos jas į struktūros vidinę ertmę arba eksponuodamos ant paviršiaus. Be to, vaizdinimui skirtų medžiagų sukonzentravimas į vieną vietą dažniausiai lemia aukštesnės skiriamosios gebos vaizdinimo kokybę lyginant su pavienėmis, ant nanostruktūrų nekonjuguotomis medžiagomis (González-Domínguez *et al.*, 2020; Herbert *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018).

Atliekant vaizdinimą *in vivo*, šviesa turi prasiskverbti giliai pro audinius, todėl įprastos vaizdinimo strategijos gali nepasiteisinti. Didelį susidomėjimą

sukėlė Yi ir kolegų (2012) tyrimas, kuriame genų inžinerijos būdu modifikuota 880 nm ilgio M13 nanostruktūra buvo padengta fluorescencine medžiaga ir ligandais, sąveikaujančiais su prostatos vėžinėmis ląstelėmis. Panaudojus infraraudoniesiems spinduliams artimą bangos ilgį (angl. *near-infrared*, NIR) $\lambda = 950\text{-}1400$ nm, šviesos spindulys prasiskverbė 2,5 cm į audinius gaunant aukštos skiriamosios gebos nuotraukas be pašalinio audinių autofluorescencinio signalo. Tai leido mokslininkams atlikti ankstyvą vėžio diagnozę, tikslingai nustatyti vėžines ląsteles bei vėžinio audinio dydį (Yi *et al.*, 2012).

Virusinės nanostruktūros gali būti pritaikytos magnetiniam rezonansui atlikti dėl jų gebėjimo sukongcentruoti šimtus ar net tūkstančius kontrastinės medžiagos molekulių ir specifiskai patekti į ląsteles-taikinius. Filamentinis M13 fagas gali būti padengtas geležies (III) oksido nanodalelėmis ir vėžinėms ląstelėms specifiniais ligandais. Taip gaunamos struktūros, specifiskai sąveikaujančios su tikslinėmis ląstelėmis ir magnetinio rezonanso metu puikiai kontrastuojančios su aplinkiniais audiniais (Ghosh *et al.*, 2012). Magnetiniam rezonansui atlikti naudojamos kontrastinės medžiagos (pavyzdžiui, gadolinis (Gd^{3+})) gali būti toksiškos organizmui ir kauptis organuose sukeldamos įvairius susirgimus, todėl virusinės nanostruktūros gali supakuoti kontrastines medžiagas į struktūros vidinę ertmę ir sumažinti sisteminį toksiškumą (Chung *et al.*, 2020; Rogosnitzky ir Branch, 2016).

1.5.5. Nanostruktūrų pritaikymas elektronikoje

Nuo 1999 m. vamzdelinės formos virusai ir jų formuojamos virusinės nanostruktūros pradėtos naudoti kaip biologinės medžiagos elektronikos detalių kūrime. Pirmą kartą panaudojus biologinės kilmės nanostruktūras – vamzdelinės formos TMV, buvo pademonstruota, kad biologinės kilmės nanostruktūros turi kontroliuojamos simetrijos paviršių prie kurio, cheminės konjugacijos metodu, galima prijungti neorganinius junginius ir taip sukurti kristalizuotas nanovielas (Fan *et al.*, 2013; Shenton *et al.*, 1999). Nėgana to, virusai ir jų formuojamos nanostruktūros yra stabilios veikiant įvairiems aplinkos veiksniams (Kalnciema *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2012; Šimoliūnas *et al.*, 2019), todėl šių savybių visuma dar labiau padidina nanostruktūrų pritaikymo galimybes.

Nanovamzdeliai, dėka ilgio ir skersmens santykio bei dėl anizotropinių savybių, gali būti naudojami kuriant naujos kartos elektronikos įrenginius ir magnetinėmis savybėmis pasižyminčias medžiagas. Svarbūs atradimai atlikti sukuriant hibridines bio-neorganines TMV ir M13 nanostruktūras jas

padengiant metalais ar puslaidininkiais (Knez *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2004). Tokios nanostruktūros geba susijungti tarpusavyje formuojant ilgą nanovielas. Metalizuotos nanostruktūros geba savyje sukaupti elektros krūvį ir perduoti elektros įtampą greta esančioms nanostruktūroms (Mao *et al.*, 2004; Tseng *et al.*, 2006). Tai yra naudinga kuriant mažesnes ir talpesnes ličio jonų baterijas, energijos šaltinius atminties kortelėms ar mikrosensoriams (Lee *et al.*, 2018; Nam *et al.*, 2006; Pomerantseva *et al.*, 2013).

1.6. Rekombinantinių baltymų sintezės sistemos

Rekombinantiniai baltymai gali būti sintetinami bakterijų, mielių, vabzdžių, augalų raiškos sistemose, žinduolių ląstelėse ar *in vitro* sistemoje, o bendras rekombinantinių baltymų raiškos sistemų skaičius viršija 170 (Donaldson *et al.*, 2015; Zeltins, 2016). Nors dauguma virusinių nanostruktūrų gali būti susintetintos įvairiose raiškos sistemose, tačiau baltymų potransliacinės modifikacijos kaip fosforilinimas, glikozilinimas, tikslinių baltymų erdvinis susilankstymas gali skirtis tarp atskirų raiškos sistemų, o tai gali turėti įtakos nanostruktūrų imunogeniškumui bei ant nanostruktūrų eksponuojamų baltyminių fragmentų erdviniam susilankstymui ir jų funkciniam aktyvumui (Fuenmayor *et al.*, 2017; Rosano ir Ceccarelli, 2014; Zeltins, 2013). Kiekviena raiškos sistema turi privalumų bei trūkumų, todėl rekombinantinio baltymo sintezei pasirinkta raiškos sistema turi atitikti keliamus reikalavimus: jeigu reikia, atlikti potransliacines baltymų modifikacijas, neturėti toksinų ar greitai ir pigiai susintetinti didelį kiekį tikslinio baltymo.

1.6.1. Bakterijų sintezės sistema

E. coli yra pagrindinė rekombinantinių baltymų raiškos sistema, kurią naudojant susintetinta virš 30 % biomedicinoje naudojamų rekombinantinių baltymų (Overton, 2014; Sanchez-Garcia *et al.*, 2016). Pigos mitybinės terpės, greitas ląstelių dalijimosi laikas (kas ~ 20 min.), paprastos tikslinių baltymų sintezės sąlygos ir didelis tikslinių baltymų sintezės efektyvumas (nuo 20 % iki 50 % visų baltymų kiekio) yra pagrindiniai bakterijų raiškos sistemos privalumai (Choi *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2017; Qing *et al.*, 2004; Sezonov *et al.*, 2007). Kita vertus, tiksliniai baltymai dažnai formuoja netirpius kūnelius, todėl jų gamyba tampa sudėtingesnė, o kartais, neįmanoma (Jürgen *et al.*, 2010). Eukariotams būdingų potransliacinių modifikacijų nebuvimas apriboja bakterijų raiškos sistemos panaudojimą sintetinant sudėtingus, eukariotinės kilmės rekombinantinius baltymus. Tokie baltymai,

susintetinti bakterijų raiškos sistemoje, gali netaisyklingai susilankstyti, prarasti funkcinį aktyvumą arba būti mažiau imunogeniški (Baneyx ir Mujacic, 2004; Lai ir Middelberg, 2002). Bakterijose susintetinti rekombinantiniai baltymai yra užteršti endotoksinais (lipopolisacharidais), todėl rekombinantinius baltymus pritaikant biomedicinoje, gryninimo procesas ir endotoksinų pašalinimas gali būti sudėtingas, o ne iki galo nuo endotoksinų išgryninti rekombinantiniai baltymai žmonėms gali sukelti septinį šoką ar net paralyžių (Adamik *et al.*, 2015; Magalhães *et al.*, 2007).

1.6.2. Mielių sintezės sistema

Mielės yra eukariotiniai mikroorganizmai, atliekantys eukariotams būdingas potransliacines baltymų modifikacijas (Vieira Gomes *et al.*, 2018). Mielių raiškos sistemose, dažniausiai naudojant *S. cerevisiae*, *Pichia pastoris* bei *Hansenula polymorpha* mieles, yra susintetintos virusinės nanostruktūros, kilusios iš daugiau nei 30 skirtingų virusų (Baghban *et al.*, 2019). Mielės *S. cerevisiae* yra laikomos saugiomis ir tinkamomis farmacijai skirtų rekombinantinių baltymų sintezei bei vakcinų kūrimui (angl. *generally regarded as safe, GRAS*) (Luna *et al.*, 2013; Petrosky *et al.*, 2015; Roohvand *et al.*, 2017). *S. cerevisiae* mielėse susintetinta apytiksliai penktadalis komercinių žmonėms skirtų produktų, tokių kaip insulinas, albuminai, rekombinantiniai hormonai, gliukagonai bei vakcinos prieš hepatito B virusą, žmogaus papildomos virusą (Çelik ir Çalik, 2012; Garland *et al.*, 2007; Stevens *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 2017). Dirbti su mielėmis yra paprasta dėl nesudėtingų genetinių manipuliacijų, greito mielių ląstelių dalijimosi laiko, nebrangios mitybinių terpių sudėties, auginimo galimybės fermentatoriuose užauginant didelį biomasės kiekį (Brodsky ir Skach, 2011; Liu *et al.*, 2016; Slavov ir Botstein, 2011). Nors ši raiškos sistema yra pranašesnė prieš prokariotus dėl gebėjimo sintetinti eukariotinės kilmės baltymus, tačiau mielės dažnai hiperglikozilina baltymus, o tai gali turėti neigiamos įtakos baltymų funkciniam aktyvumui (Lehle *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2016). Kita vertus, genų inžinerijos būdu sukūrus humanizuotą *Pichia pastoris* mielių kamieną, atliekantį žmonėms būdingą baltymų glikozilinimą, hiperglikozilinimo problema buvo išspręsta ir šio kamieno mielės turi platesnes pritaikymo galimybes sintetinant rekombinantinius baltymus (Hamilton *et al.*, 2006).

1.6.3. Bakulovirusų-vabzdžių sintezės sistema

Rekombinantiniai baltymai gali būti sintetinami bakulovirusų-vabzdžių raiškos sistemoje. Kadangi bakulovirusai yra vabzdžius užkrečiantys patogenai, ši natūrali savybė yra pritaikyta rekombinantinių baltymų sintezei atlikti – augalo ląstelės infekuojamos vienu ar keliais bakulovirusais, sintetinančiais vieną arba kelis skirtingus tikslinius baltymus (Berger *et al.*, 2004). Patobulinus šią raiškos sistemą, genų inžinerijos būdu modifikuoti bakulovirusai mažesniu efektyvumu lizuoja bakterijų ląsteles, todėl išvengiama nepageidaujamos rekombinantinių baltymų degradacijos (Ho *et al.*, 2004). Šios sistemos privalumai yra keli – galimybė kultivuoti didelės talpos fermentatoriuose bei bakterinių endotoksinų išvengimas (Ikonomou *et al.*, 2003), o pagrindinis trūkumas – tikslinių baltymų užteršimas bakulovirusų produktais, kuriuos, taikant rutininius gryninimo metodus, ne visada pavyksta pašalinti (Hervas-Stubbs *et al.*, 2007). Cervarix[®] vakcina prieš HPV buvo pirmasis vabzdžių raiškos sistemoje susintetintas, Amerikos maisto ir vaistų administracijos (FDA) ir Europos sveikatos agentūros patvirtintas produktas žmonėms, o nuo to laiko vabzdžių raiškos sistemoje sintetinama vis daugiau rekombinantinių, terapiniams tikslams skirtų baltymų (Wheeler *et al.*, 2009; Yee *et al.*, 2018).

1.6.4. Augalų sintezės sistema

Augalų raiškos sistema yra pasirenkama kai norima pigiai susintetinti tikslinius baltymus, neužterštus bakteriniais endotoksinais ar žmonių patogenais, prionais (Sabalza *et al.*, 2014). Baltymų sintezės sąlygas, lyginant su kitomis raiškos sistemomis, augaluose yra sudėtingiausia kontroliuoti, kadangi tai yra sąlyginai nauja raiškos sistema (Ding *et al.*, 2018; Habibi *et al.*, 2017; Yamamoto *et al.*, 2018). Dažniausiai rekombinantinių baltymų sintezė vykdoma *Nicotiana benthamiana* tabako lapuose integruojant DNR sekas į augalo chromosomas arba naudojant virusinius vektorius su baltymus koduojančiomis genų sekomis. Transgeninio augalo gavimas ir tikslinių baltymų sintezė gali užtrukti 8-12 savaičių, todėl tai yra didelis šios sistemos trūkumas (Chauhan ir Opeña, 2013). Augalai atlieka potransliacines baltymų modifikacijas, reikalingas baltymų funkciniam aktyvumui atlikti (Sabalza *et al.*, 2014). Valgomose augalo dalyse susintetinti rekombinantiniai baltymai bei vakcinos galėtų būti suvartojamos tiesiai per augalo lapus, todėl tai ypač palengvina farmacijai skirtų produktų gavimą ir registravimą (Lee *et al.*, 2018). Galiausiai, augaluose galima susintetinti lipidinių apvalkalų padengtas

virusines nanostruktūras, todėl ši raiškos sistema yra universali ir gali būti pritaikyta vakcinoms skirtų baltymų sintezei (Landry *et al.*, 2010).

1.6.5. Beląstelinė sintezės sistema

Beląstelinė raiškos sistema (*in vitro*) imituoja ląstelės vidinius procesus kontroliuojamoje *in vitro* aplinkoje. Dažniausiai šią sistemą sudaro *E. coli*, mielių, vėžinių ir vabzdžių ląstelių, triušių retikulocitų arba kviečių gemalų kilmės transkripciją ir translaciją vykdančios baltymai ir būtini kofaktoriai, ATP molekulės, aminorūgštys (Endo ir Sawasaki, 2006; Sun *et al.*, 2013). Beląstelinė raiškos sistema sukurta ląstelėms toksiškų tikslinių baltymų sintezei vykdyti ar nenatūralių AR įterpimui (Worst *et al.*, 2015; Zimmerman *et al.*, 2014). Šios sistemos tūris gali būti didinamas (angl. *scalable*), todėl ganėtinai paprastai galima gauti didelius tikslinių baltymų kiekius, o susintetinti baltymai nėra užteršti toksiniais (Arumugam *et al.*, 2014; Dopp ir Reuel, 2018).

1.7. Oportunistinė bakterija *Acinetobacter baumannii* ir prieš ją kuriamų vakcinų svarba

A. baumannii yra oportunistinis⁶ patogenas, plintantis gydymo įstaigose ir ligoniams su nusilpusia imunine sistema sukeliantis chirurginių žaizdų infekcijas, šlapimo takų infekcijas, pneumoniją, sepsį, meningitą ar mirtį. Priklausomai nuo bakterijos padermės, nuo paciento sveikatos būklės bei nuo gydymo metu naudotų antibiotikų, *A. baumannii* sukelta infekcija gali būti mirtina iki 56,2 % užsikrėtimo atvejų (Papadimitriou-Olivgeris *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2019). Be to, SARS-CoV-2 viruso sukelta pandemija ir padidėjęs sunkios sveikatos būklės pacientų, kuriems atliekama dirbtinė plaučių ventiliacija, skaičius intensyvios priežiūros skyriuje yra išaugęs. Šie pacientai rizikuoja užsikrėsti *A. baumannii* bakterijomis, kurios dar labiau komplikuoja sudėtingą gydymo procesą (Chen *et al.*, 2020; Lai *et al.*, 2020; Rawson *et al.*, 2020). Remiantis 2013 m. duomenimis, pasaulyje per metus apie 1 mln. klinikose slaugomų pacientų buvo infekuoti *A. baumannii* bakterijomis, pusė jų užsikrėtė daugeliui antibiotikų atsparios (angl. *multidrug-resistant*) *A. baumannii* bakterijos padermėmis (Spellberg ir Rex, 2013). Ištyrus biologinius mėginius, išskirtus iš Lietuvos ligoninėse intensyvios priežiūros

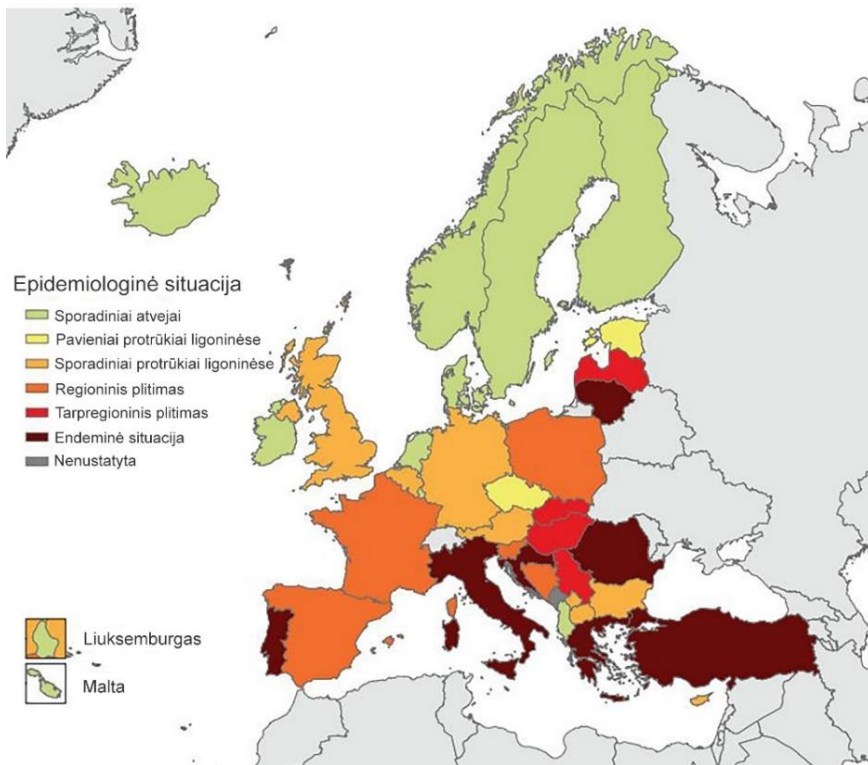
⁶Oportunistiniai patogenai yra mikroorganizmai, neinfekuojantys sveikų žmonių, tačiau sukeliantys sunkiai gydomas infekcijas žmonėms su nusilpusia imunine sistema.

skyriuose slaugomų pacientų, taip pat buvo aptiktos karbapenemui⁷ atsparios *A. baumannii* bakterijos padermės (Povilonis *et al.*, 2013).

2017 metais PSO karbapenemo antibiotikams atsparią *A. baumannii* oportunistinę bakteriją priskyrė kaip labiausiai keliančią pavojų žmogaus sveikatai (Willyard, 2017; World Health Organization, 2017). *A. baumannii* bakterijos lengvai įgyja atsparumo genus antibiotikams, todėl blogėjanti epidemiologinė situacija kelia nerimą. Klinikose paplitę *A. baumannii* izoliatai paprastai būna atsparūs trijų-penkių skirtingų klasių antibiotikams, tačiau taip pat plinta atsparumas kolistino antibiotikams, kurie yra įvardijami kaip „paskutinio pasirinkimo“ antibiotikais (angl. *the last resort antibiotic*) (Al-Kadmy *et al.*, 2020; Asif *et al.*, 2018). 2019 m. gruodžio mėnesį buvo paskelbta karbapenemui atsparių *A. baumannii* bakterijų epidemiologinė situacija 37 Europos šalyse. Tyrimas parodė, kad nuo 2013 m. *A. baumannii* vis labiau plinta gydymo įstaigose – septyniose Europos valstybėse, tarp jų ir Lietuvoje, nustatyta šios bakterijos sukelta endeminė situacija (18 pav.) (Lötsch *et al.*, 2020). *A. baumannii* gydymas antibiotikais turi būti pakeistas alternatyviais gydymo būdais, vienas jų galėtų būti vakcinavimas, tačiau vakcina prieš *A. baumannii* dar nėra sukurta.

A. baumannii formuoja bioplėveles, todėl bakterijos, apgaubtos storu polisacharidiniu sluoksniu, tampa atsparesnės detergentams bei antibiotikams (Monem *et al.*, 2020). Dalis prieš *A. baumannii* bakterijos baltymus susidariusių monokloninių antikūnų yra neveiksmingi, nes neatpažįsta bakterijos dėl baltymų „paslėpimo“ po polisacharidiniu sluoksniu (Gellings *et al.*, 2020; Wang-Lin *et al.*, 2017). Nepaisant kapsulės polisacharidinio sluoksnio, kai kurių membraninių baltymų dalys yra nukreiptos į bakterijos išorę, todėl šie baltymai yra pagrindiniai taikiniai efektyvių vaistų ir vakcinų kūrimui. Kuriant vakcinas prieš *A. baumannii* bakteriją, dažniausiai siekiama sukelti imuninį atsaką prieš bioplėveles formuojančius baltymus Omp (angl. *outer membrane protein*), BAP (angl. *biofilm-associated protein*) bei Blp1 (angl. *BAP-like protein 1*) (Fattahian *et al.*, 2011; Gellings *et al.*, 2020; Skerniškytė *et al.*, 2019a).

⁷Karbapenemai yra plataus veikimo β-laktamo grupės antibiotikai, naudojami prieš Gram-neigiamas ir Gram-teigiamas bakterijas.

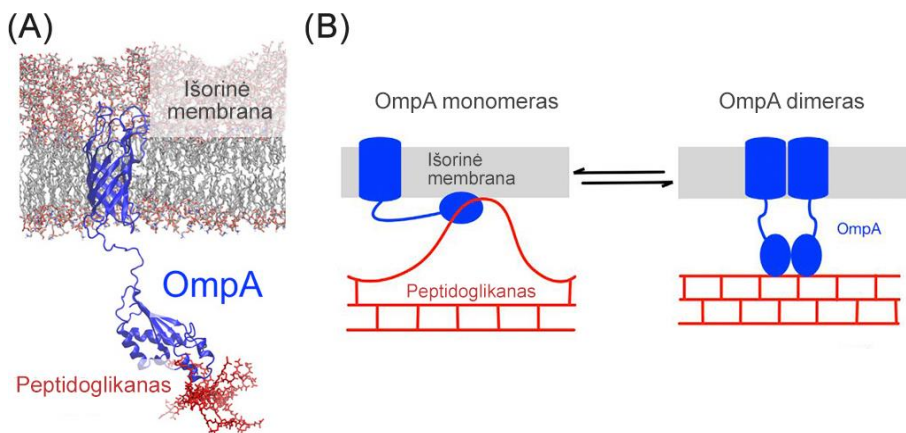


18 pav. Karbapenemui atsparių *A. baumannii* bakterijų paplitimas Europoje. Endeminė situacija paskelbta Lietuvoje, Italijoje, Turkijoje, Portugalijoje, Kroatijoje, Graikijoje ir Rumunijoje (šalys pavaizduotos tamsiai raudona spalva). Pagal Lötsch *et al.*, 2020.

A. baumannii membraninis baltymas OmpA yra vienas pagrindinių virulentiškumo veiksnių, reguliuojantis bakterijų adheziją, patogeniškumą bei bioplėvelių formavimąsi (Sánchez-Encinales *et al.*, 2017; Skerniškytė *et al.*, 2019b, 2021; Smani *et al.*, 2014). Membraniniai baltymai OmpA perveria Gram-neigiamų bakterijų išorinę membraną ir sąveikaujant su peptidoglikano sluoksniu, formuoja poras, per kurias pasyvaus transporto būdu mažos hidrofiliškos molekulės gali nespecifiškai patekti į ląstelę (19 pav. A) (Iyer *et al.*, 2018; Samsudin *et al.*, 2016). Manoma, kad monomerinis OmpA, sąveikaudamas su peptidoglikanu, gali jį fiziškai priartinti prie išorinės bakterijos membranos. Nors dimerizuotoje būsenoje OmpA taip pat sąveikauja su peptidoglikanu, tačiau ši sąveika nelemia peptidoglikano pokyčių priartinant jį prie išorinės membranos (19 pav. B). Toks OmpA baltymo gebėjimas pereiti į monomerinę arba dimerinę būsenas gali būti siejamas su Gram-neigiamų bakterijų peptidoglikano ir ląstelės sienelės

tarpusavio sąveikų reguliavimu palaikant ląstelės sienelės struktūrą (Jahangiri *et al.*, 2017; Samsudin *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2011).

A. baumannii baltymą OmpA sudaro aštuonios β klostės, keturios į bakterijos išorę eksponuojamos ilgos kilpos, trys į periplazminę ertmę nukreiptos trumpos kilpos bei C galo domenai, sąveikaujantis su peptidoglikanu (19 pav.) (Park *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2007). Kadangi OmpA baltymas aptinkamas dideliais kiekiais bakterijų išorinėse membranose (Badmasti *et al.*, 2015) bei tarp skirtingų *A. baumannii* padermių yra ganėtinai konservatyvus (variacija apie ~ 11 %) (Luo *et al.*, 2012), šis baltymas yra puikus kandidatas vakcinų kūrimui.



19 pav. Baltymo OmpA lokalizacijos *A. baumannii* išorinėje membranoje schematinis pavaizdavimas ir sąveikų su peptidoglikanu schemas. (A) Baltymo OmpA erdvinis modelis. OmpA išorinėje bakterijos membranoje formuoja poriną, o periplazminėje ertmėje sąveikauja su peptidoglikano sluoksniu. **(B)** Galimi monomerinio ir dimerinio OmpA baltymų sąveikų su peptidoglikanu modeliai. Pagal Samsudin *et al.* (2016).

Adhezinai dalyvauja *A. baumannii* bakterijos bioplėvelių susidaryme. Vienas jų – didelės molekulinės masės (nuo ~330 kDa iki ~ 854 kDa), į bakterijos paviršių nukreiptas BAP baltymas (De Gregorio *et al.*, 2015; Loehfelm *et al.*, 2008). Nors šis baltymas aptinkamas tarp Gram-neigiamų ir Gram-teigiamų bakterijų, tačiau jo struktūra išlieka ganėtinai konservatyvi – jį sudaro N ir C galų domenai, o centrinę dalį formuoja nuo 3 iki 50 pasikartojančių bakterinių į imunoglobulinus panašių domenų (angl. *bacterial immunoglobulin-like domains*, Big) (Bodelon *et al.*, 2013). Kadangi BAP baltymas yra vienas didžiausių bakterijos baltymų ir kai kuriuose bakterijų izoliatuose aptinkami sutrumpinti BAP baltymų variantai, šis baltymas nėra tinkamas kandidatas eksponavimui ant virusinių nanostruktūrų kuriant

vakciną prieš *A. baumannii*. Tam gali būti pasirenkamas mažesnės molekulinės masės, taip pat į bakterijos paviršių nukreiptas baltymas Blp1. Šis baltymas, kaip ir OmpA bei BAP, formuoja bioplėveles bei lemia adheziją su žmogaus epitelio ląstelėmis. Blp1 yra struktūriškai panašus į BAP baltymus – jį sudaro N ir C galai, kuriuos atskiria bakteriniai į imunoglobulinus panašūs domenai (De Gregorio *et al.*, 2015). Pademonstruota, kad Blp1 711 AR dydžio C galo domenai aktyvios ir pasyvios imunizacijos metu sukelia imuninę atsaką ir peles apsaugo nuo bakterinės infekcijos (Skerniškytė *et al.*, 2019a).

Vakcinų kūrimą prieš *A. baumannii* apsunkina storas polisacharidinis sluoksnis, padengiantis oportunistinės bakterijos paviršių ir „paslepantis“ jos išorinius baltymus (Wang-Lin *et al.*, 2017). Dėl to, dideliais kiekiais aptinkamo konservatyvaus membraninio baltymo OmpA į išorę nukreiptos kilpos bei imunogeniškos išorinio baltymo Blp1 dalys yra potencialūs taikiniai vakcinų kūrimui prieš daugeliui antibiotikų atsparius *A. baumannii* bakterijų izoliatus (Badmasti *et al.*, 2015; Skerniškytė *et al.*, 2019a).

Apibendrinant šiame darbe apžvelgtus literatūrinius duomenis, yra daug žinoma apie fagų ataugos susiformavimo procesą ir jo reguliaciją, tačiau ataugos vamzdelio baltymų savaiminis susirinkimas į virusines nanostruktūras yra nepakankamai ištirtas. Nors virusinės nanostruktūros gali būti įvairių formų ir dydžių, tačiau daugiausia charakterizuotų nanostruktūrų yra ikosaedrinės simetrijos iki 100 nm skersmens, mažiau dėmesio skiriant vamzdelio formos nanostruktūroms ir jų įvairovei. Kadangi kiekviena virusinė nanostruktūra gali skirtingai toleruoti prie jos prijungtus baltyminius fragmentus, tai rodo, kad nėra universalios virusinės nanostruktūros, kuri galėtų būti pritaikyta įvairiose mokslo srityse. Dėl to yra poreikis kurti naujas virusines nanostruktūras, jas charakterizuoti, ištirti baltymų tarpusavio sąveikas, savaiminio susirinkimo procesą bei pademonstruoti nanostruktūrų pritaikymą biotechnologijoje ar medicinoje. Sparčiai plintant antibiotikams atsparioms bakterijoms, virusams ir jų sukeltoms epidemijoms bei pandemijoms, auga poreikis kurti efektyvias ir saugias vakcinas, o tam gali būti naudojamos virusinės nanostruktūros.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Oligonukleotidų ir oligopeptidus koduojančios DNR sekos

2 lentelė. Šiame darbe naudoti oligonukleotidai bei jų charakteristikos.

Oligonukleotido pavadinimas	Oligonukleotido seka (5'-3')	Įvedama RE atpažinimo seka
PYK5	TATTCATTCTTTTTCATCCTTTGG	-
PGK3	TCCTTACCTTCCAATAATCCAAC	-
gp39_F	TG <u>TCT</u> AGAACAAATG <u>TCT</u> TCTCTTCCAAATGGTTC	XbaI
gp39_Δ10_F	TG <u>TCT</u> AGAACAAATGATCGAGCGCACCCGCGC	XbaI
gp39_Δ24_F	TG <u>TCT</u> AGAACAAATGATCTCCAACGCAGAGAATCCG	XbaI
gp39_R	AG <u>TCT</u> AGAA <u>TTA</u> GTCAACTTCGCCCTGC	XbaI
gp39beSTOP_R	AG <u>TCT</u> AGAGTCAACTTCGCCCTGCATGTG	XbaI
gp39_Δ12_R	AG <u>TCT</u> AGAA <u>TTA</u> GTCCAGGGAGATTGTCCAGGATG	XbaI
gp39_Δ24_R	AG <u>TCT</u> AGAA <u>TTA</u> CATTACCGTGTTCGGCACGTC	XbaI
gp39m_R	AGACTAGT <u>TTA</u> GGATCCCCCGGGCCATGGGTCAAC TTCGCCCTGC	NcoI; SmaI; BamHI; BcuI
GGGGS_F	<u>CCATGGGGCGGAGGTGGATCTGGCGGAGGTGGATC</u> <u>GGGCGGAGGTGGATCACCCGGGGGATCC</u>	NcoI; SmaI; BamHI
GGGGS_R	<u>GGATCCCCCGGGTGATCCACCTCCGCCCGATCCAC</u> <u>CTCCGCCAGATCCACCTCCGCCCATGG</u>	NcoI; SmaI; BamHI
6His_F	<u>GGGCATCATCACCATCACCACG</u>	SmaI; BamHI
6His_R	<u>GATCCGTGGTGATGGTGATGATGCC</u>	SmaI; BamHI
HNTV170_F	AGCCCGGGGTATCCGGAACCAAACATCTTTAC GTGTCTTGGGATCCAC	SmaI; BamHI
HNTV181_R	GTGGATCCCAAGGACACGTAAGATGTTTTGGTTT CCGGATACCCCGGGCT	SmaI; BamHI
Api-m4_F	AGCCCGGGGTATTGGTGCTGTTTTG	SmaI
Api-m4_R	GTGGATCCCTGTTGTCTCTTTCTCTTAATC	BamHI
eGFP_F	AGCCCGGGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	SmaI
eGFP_R	GTGGATCCCTTGACAGCTCGTCCATG	BamHI
Blp163_F	AGCCCGGGGATTCGTTTTTGGAAAGTGGTC	SmaI
Blp91_F	AGCCCGGGAATGGACATGACACGGTGTTAG	SmaI
Blp55_F	AGCCCGGGAGCGCATTAGCTAAATTTATTACTG	SmaI
Blp_R	GTGGATCCAACAATAATTTGCTGGTTGTTTAG	BamHI
Omp28_F	AGCCCGGGGTTACACTTTCCAAGACTC	SmaI
Omp28_R	GTGGATCCTAAATCGTCTTGTAAATCAGGTCCG	BamHI
Omp14_F	GGGAAAGGTGATGTAGACGGTCTTGCAGCTGGCGC TGAATACAAGG	SmaI
Omp14_R	<u>GATCCCTTGTATTTCAGCGCCAGCTGCAAGACCGTC</u> <u>TACATCACCTTTCCC</u>	BamHI

Pabrauktos oligonukleotidų įvedamos RE atpažinimo sekos, žaliai pažymėti start kodonai, raudonai – stop kodonai. „F“ – tiesioginis pradmūo (angl. *forward*), „R“ –

atvirkštinis pradmuo (angl. *reverse*). Oligonukleotidai buvo susintetinti Metabion International AG (Planeg, Vokietija) arba Invitrogen (Glasgow, Jungtinė Karalystė).

Baltymus bei peptidus koduojančios DNR sekos:

Bakteriofago NBD2 baltymą koduojančio geno 39 seka (Genbank Nr. NC_031050) buvo gauta iš VU GMC BChI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus kolegų. *Hantaan* viruso Fojnica genotipo nukleokapsidės (N) baltymo peptidą (170-181 AR regionas) koduojanti DNR seka buvo pagausinta PGR metodu naudojant plazmidę pFX7_N-6His_HNTV (Razanskiene *et al.*, 2004) kaip matricą. Žaliai fluorescuojantį baltymą eGFP (angl. *enhanced green fluorescent protein*) (Gedvilaite *et al.*, 2006) bei bičių *Apis mellifera* alergeno Api-m4 komponentą (nepublikuoti duomenys, GenBank Nr. X02007) koduojančios DNR sekos buvo pagausintos naudojant eGFP bei Api-m4 koduojančias plazmides kaip matricas. Bakterijų *A. baumannii* baltymus Blp1 ir OmpA koduojančios DNR sekos (Skerniškytė *et al.*, 2019a, 2019b) buvo pagausintos PGR metodu naudojant bakterijų *A. baumannii* lizate esančią genominę DNR kaip matricą.

2.1.2. Bakterijų ir mielių kamienai

Plazmidžių konstravimui ir jų padauginimui buvo naudoti *E. coli* DH5 α F-*gyrA96* (NaIr) *recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* (rk⁻mk⁺) *glnV44 deoR* Δ (*lacZYA-argF*)*U169* [ϕ 80d Δ (*lacZ*)*M15*] arba *E. coli* GM119⁻ (F- *dam-3 dcm-6 lacY1 galK2 galT22 tonA31 tsx-78 supE44 mtl-1*(*thi-1*)) kamienai.

Tikslinių baltymų sintezei buvo naudotas *S. cerevisiae* mielių AH22-214 kamienas (*MATa leu2-3 leu2-112 his4-519 can1 [KIL-o]*) (ATCCTM 38626).

Bakterijų bei mielių kamienai priklauso VU GMC BTI EGIS kolekcijai.

2.1.3. Programinė įranga ir internetiniai įrankiai

3 lentelė. Šiame darbe naudotos programinės įrangos bei internetiniai įrankiai.

Programinė įranga/ internetinis įrankis	Pritaikymas
Adobe Photoshop CC v2017.1.1	Programinė įranga paveikslėlių vizualizavimui, schemų kūrimui
ExPASy ProtParam https://web.expasy.org/protparam/	Internetinis įrankis baltymų hidropatiškumo indeksų (GRAVY) nustatymui

<p>HHpred https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred (Zimmermann <i>et al.</i>, 2018)</p>	<p>Internetinis įrankis baltymų erdviųjų modelių nustatymui ir homologiųjų baltymų paieškai</p>
<p>ImageJ (Schneider <i>et al.</i>, 2012)</p>	<p>Programinė įranga baltymų sintezės efektyvumo skaičiavimui bei išgrynintų baltymų koncentracijos nustatymui PAA gelyje</p>
<p>I-TASSER http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/ (Zhang, 2008)</p>	<p>Internetinis įrankis baltymų erdvinės struktūros modelio nustatymui</p>
<p>MEGA v7.0.26 (Kumar <i>et al.</i>, 2016)</p>	<p>Programinė įranga DNR ir aminorūgščių sekų analizei bei filogenetinio medžio braižymui</p>
<p>MS Excel 2013</p>	<p>Programinė įranga statistinės analizės skaičiavimui</p>
<p>Origin Pro 8.0 (May ir Stevenson, 2009)</p>	<p>Programinė įranga statistinės analizės skaičiavimui, duomenų apdorojimui bei vaizdavimui</p>
<p>Peptide Hydrophobicity/ Hydrophilicity Analysis https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity_hydrophilicity.php</p>	<p>Internetinis įrankis peptidus ar baltymus sudarančių AR hidrofobinių ir hidrofilinių savybių nustatymui</p>
<p>Protein Calculator v3.4 http://protcalc.sourceforge.net/</p>	<p>Internetinis įrankis baltymų izoelektrinio taško (pI) ir baltymų krūvio nustatymui</p>
<p>Protein Information Resource (PIR) https://proteininformationresource.org/</p>	<p>Internetinis įrankis teorinės baltymų molekulinės masės nustatymui</p>
<p>RCSB Protein Data Bank (PDB) https://www.rcsb.org/</p>	<p>Duomenų bazė baltymų erdviųjų struktūrų analizei</p>
<p>UCSF Chimera v1.12 (Pettersen <i>et al.</i>, 2004)</p>	<p>Programinė įranga baltymų erdviųjų modelių vizualizavimui</p>
<p>UniPro Ugene v36.0 (Okonechnikov <i>et al.</i>, 2012), SnapGene 5.2.3. (GLS Biotech, https://www.snapgene.com/)</p>	<p>Programinės įrangos plazmidžių konstravimui ir jų analizei</p>

2.2. Tyrimų metodai

2.2.1. Mielių raiškos vektorių konstravimas

Buvo naudoti pFX7, PFX7_N-His ir pFX7_C-His mielių raiškos vektoriai (VU GMC BTI EGIS kolekcija) (Razanskiene *et al.*, 2004; Sasnauskas *et al.*, 1999). Įterpus geno seką į vektorius pFX7_N-His ir pFX7_C-His, prie sekos 5' arba 3' galo prijungiama šešias histidino AR (6x-His) koduojanti seka.

Darbai su DNR buvo atliekami remiantis klasikiniais genų inžinerijos ir molekulinės biologijos metodais (Sambrook ir Russel, 2001). Plazmidinė DNR buvo išskiriama iš *E. coli* ląstelių šarminės lizės metodu (žr. 2.2.5. skyrelį) (Engbrecht *et al.*, 2003) arba naudojant plazmidinės DNR skyrimo rinkinį „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“, remiantis „Thermo Fisher Scientific Baltics“ (Vilnius, Lietuva) gamintojo rekomendacijomis.

Polimerazės grandininėms reakcijoms buvo naudojamos *Taq* bei Phusion High Fidelity DNR polimerazės bei su jais pateikti buferiniai tirpalai. DNR hidrolizei restrikcijos endonukleazėmis (RE) buvo naudojami 10× buferiniai tirpalai (B⁺, G⁺, O⁺, R⁺, Tango) arba 10× FastDigest buferinis tirpalas. DNR 5'-galinių fosfatų pašalinimui buvo naudojama FastAP (1 U/μl) šarminė fosfatazė bei 10× FastAP buferinis tirpalas. DNR ligavimo reakcijoms buvo naudojama T4 DNR ligazė (5 U/μl) bei gamintojo pateiktas buferinis tirpalas. Fermentinėms reakcijoms naudoti tirpalai buvo pagaminti „Thermo Fisher Scientific Baltics“ (Vilnius, Lietuva), protokolai buvo atliekami remiantis gamintojo rekomendacijomis.

DNR mėginių koncentracijos buvo nustatomos spektrofotometru NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Vilmingtonas, MA, JAV), DNR nukleotidų sekos buvo tikrinamos VU GMC Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre.

2.2.2. Polimerazinė grandininė reakcija

Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) buvo atliekama DNR fragmentų pagausinimui naudojant plazmidinę DNR arba bakterijų *A. baumannii* lizate esančią genominę DNR kaip matricą.

PGR reakcijoms buvo naudojami „Thermo Fisher Scientific Baltics“ buferiniai tirpalai, dNTP mišinys, *Taq* arba Phusion High Fidelity DNR polimerazė pagal gamintojo rekomendacijas. Pradmenų prilydimo temperatūros buvo apskaičiuotos internetiniu įrankiu „New England BioLabs Tm Calculator“ (<https://tmcalculator.neb.com/>). DNR sekų pagausinimas buvo vykdomas „Eppendorf Mastercycler“ termocikleryje (Eppendorf,

Hamburgas, Vokietija). Reakcijoms naudoti oligonukleotidai pateikti 2 lentelėje.

2.2.3. DNR elektroforezė

Į 1-2 % agarozės gelį su 0,1-0,2 µg/ml etidžio bromidu, buvo užnešami DNR mėginiai, sumaišyti su 6× DNR dažu. Agarozės geliai buvo panardinami į TAE buferinį tirpalą, elektroforezė vykdoma palaikant 10 V/cm įtampą, o fragmentai vizualizuojami transiliumatoriaus „Herolab E.A.S.Y. 442 K“ (Herolab GmbH, Laborgeraete, Vokietija) ultravioletinėje šviesoje.

Naudoti reagentai:

Agarozė, 50× TAE buferinis tirpalas, 6× DNR dažas, DNR molekulinės masės standartas „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific Baltics), etidžio bromidas (Sigma Aldrich, Hamburgas, Vokietija).

Naudoti tirpalai:

Agarozė: 1-2 % agarozės TAE buferiniame tirpale.

Etidžio bromido tirpalas: 10 mg/ml etidžio bromido tirpalo.

2.2.4. DNR fragmentų gryninimas

DNR fragmentai buvo išpjaunami iš agarozės gelių ir gryninami naudojant komercinį rinkinį „GeneJET™ Gel Extraction Kit“. DNR fragmentai iš PGR mišinio buvo gryninami naudojant rinkinį „GeneJET™ PCR Purification Kit“. Abu rinkiniai buvo gauti iš „Thermo Fisher Scientific Baltics“, gryninimas atliktas remiantis gamintojo rekomendacijomis.

2.2.5. Plazmidinės DNR gryninimas

E. coli bakterijų GM119⁺ kamieno ląstelės buvo naudojamos mielių raiškos vektorių pFX7, pFX7_N-His bei pFX7_C-His padauginimui, o *E. coli* bakterijų DH5α kamieno ląstelės buvo naudojamos darbo metu sukonstruotų mielių raiškos vektorių padauginimui. Vektoriumi transformuotų *E. coli* bakterijų naktinė kultūra buvo auginama 3-5 ml LB mitybinėje terpėje su ampicilinu (50 µg/ml) 16-18 val. 37 °C temperatūroje purtant (180-220 rpm). Po to ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant 10 min. 3000 aps./min. greičiu „Eppendorf Centrifuge 5810R“ centrifuga (Eppendorf, Hamburgas, Vokietija). Toliau plazmidinė DNR buvo gryninama dviem būdais: komerciniu rinkiniu arba šarminės lizės metodu.

Plazmidinę DNR gryninant komerciniu rinkiniu, buvo naudojamas „GeneJET Plasmid DNA Purification Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics), o procedūros buvo atliekamos remiantis gamintojo rekomendacijomis.

Išgrynintų plazmidinių DNR koncentracija buvo matuojama „NanoDrop 2000/2000c“ spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific).

Plazmidinę DNR gryninant šarminės lizės metodu, plazmide transformuotos ir po auginimo LB terpėje surinktos bakterijų ląstelės buvo suspenduojamos 200 µl TE buferiniame tirpale ir perkeliamos į 1,5 ml mėgintuvėlį. Pridėjus 200 µl NaOH-NDS tirpalo, ląstelės buvo lizuojamos kelis kartus švelniai vartant mėgintuvėlį. Pridėjus 300 µl NaOAc (pH 4,8) tirpalo, mėgintuvėlis buvo švelniai vartomas dar 5-10 kartų. Mėginiai buvo inkubuojami 5 min. -20 °C temperatūroje ir centrifuguojami 3 min. 13200 aps./min. (Eppendorf Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburgas, Vokietija). Viršutinė vandeninga frakcija buvo perkeliama į naują 1,5 ml mėgintuvėlį. Pridėjus 700 µl izopropanolio, mėginys buvo intensyviai maišomas 0,5-1 min. Po 10 min. inkubavimo -20 °C temperatūroje, mėginys buvo centrifuguojamas 5 min. 13200 aps./min (Eppendorf Centrifuge 5415D). Nuosėdos buvo užpilamos 500 µl -20 °C temperatūros 70 % etanolio ir intensyviai maišomos apie 0,5-1 min. Mėginį nucentrifugavus tomis pačiomis sąlygomis, skystis buvo nusiurbiamas, o nuosėdos džiovinamos atidengiant mėgintuvėlį kad išgaruotų etanolis. DNR buvo tirpinama 50 µl distiliuoto vandens su 1 µg RNaze A (5 U), inkubuojama 15-30 min. 37 °C temperatūroje. Išskirta plazmidinė DNR buvo laikoma -20 °C temperatūroje.

Naudoti reagentai:

Ampicilinas (Carl Roth, Karlsruhe, Vokietija), LB (Luria Bertani) mitybinė terpė, Tris-HCl, 2-propanolis, RNazė A (Thermo Fisher Scientific Baltics), natrio šarmas (Standard, Liublinas, Lenkija), EDTA, natrio acetatas, natrio hidroksidas (Sigma Aldrich), natrio dodecilsulfatas (NDS) (Carl Roth, Karlsruhe, Vokietija), 96 % etanolis (Honeywell, Šarlotė, NC, JAV).

Naudotos bakterijų mitybinės terpės ir tirpalai:

LB bakterijų mitybinė terpė (pH 7): 25 g/l LB mitybinės terpės mišinio. Autoklavuojama 1 atm. slėgyje 20 min.

TE: 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM EDTA.

EDTA: 0,5 M EDTA (pH 8).

NaOH-NDS tirpalas: 1 % NDS, 0,2 M NaOH.

NaOAc (pH 4,8): 3 M natrio acetatas (pH 4,8), laikomas 4 °C temperatūroje.

Etanolis: ruošiamas 70 % (*t.t.*) etanolis, laikomas -20 °C.

RNazės A tirpalas: 10 mg/ml jaučio kasos ribonukleazės A tirpalas.

2.2.6. Imliųjų *E. coli* ląstelių paruošimas ir transformacija

E. coli bakterijos buvo užsėjamos į 25 ml LB terpės ir auginamos apie 16-20 val. 37 °C temperatūroje purtant (180-220 rpm). Naktinė ląstelių kultūra

buvo perkeliama į 500 ml LB terpę 2 L kolboje ir auginama iki optinio tankio (OT) 0,6-0,7 ($\lambda = 600$ nm). Ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant 10 min. 2000 aps./min. greičiu (Beckman J-6B centrifuga, JS-5.2 rotorius, Beckman, Brea, CA, JAV) 4 °C temperatūroje ir plaunamos 25 ml 4 °C temperatūros CaCl₂ tirpalu. Ląstelės buvo centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis, suspenduojamos 25 ml 4 °C temperatūros CaCl₂ tirpale. Ląstelės buvo laikomos 16-20 val. 4 °C temperatūroje. Kitą dieną ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant 10 min. 3000 aps./min. 4 °C temperatūroje (Eppendorf Centrifuge 5810R) ir švelniai suspenduojamos 5 ml 4 °C temperatūros CaCl₂ su gliceroliu tirpale. Paruoštos imliosios *E. coli* ląstelės transformacijai buvo naudojamos iš karto arba saugomos -70°C temperatūroje.

Transformacijai buvo imama 50-100 μ l paruoštų imliųjų *E. coli* ląstelių mėginio, pridedama 20 μ l ligavimo mišinio (DNR koncentracija 50-100 ng/ μ l) arba 50-200 ng plazmidinės DNR ir inkubuojama 30 min. ledo vonioje. Buvo atliekamas ląstelių temperatūrinis šokas inkubuojant 1,5 min. 42 °C termobloke arba vandens vonioje ir perkeliant 1,5 min. į ledų vonią. Bakterijų ląstelių ir DNR mišinys buvo skiedžiamas 0,5 ml kambario temperatūros LB terpe be ampicilino ir inkubuojamas 30 min. 37 °C temperatūroje. Po to ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant 2 min. 2500 aps./min. greičiu (Eppendorf Centrifuge 5415D) ir išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu (50 μ g/ml). Transformuotos bakterijų ląstelės buvo auginamos 16-18 val. 37 °C termostate.

Naudoti reagentai:

Glicerolis (Thermo Fisher Scientific Baltics). Kalcio chloridas buvo perkamas iš dviejų tiekėjų: „AppliChem“ (Darmstadas, Vokietija) ir „Sigma Aldrich“ (Hamburgas, Vokietija).

Naudotos bakterijų mitybinės terpės ir tirpalai:

LB bakterijų mitybinė terpė (pH 7) (žr. 2.2.5. skyrelį, 62 p.).

CaCl₂ tirpalas: 100 mM CaCl₂ tirpalas, laikomas 4 °C temperatūroje.

CaCl₂ su gliceroliu tirpalas: 100 mM CaCl₂ tirpalas sumaišomas su gliceroliu santykiu 4:1 (*m./t.*), laikomas 4 °C temperatūroje.

Buvo naudojami sterilūs tirpalai, autoklavuoti 1 atm. slėgyje 20 min.

2.2.7. Imliųjų *S. cerevisiae* ląstelių paruošimas ir transformacija

S. cerevisiae mielių AH22-214 kamieno ląstelės buvo užsėjamos į 3-5 ml YEPD terpės ir auginamos 16-18 val. 30 °C temperatūroje purtant (180-220 rpm). 300 μ l naktinės mielių kultūros buvo praskiedžiama 10 kartų ta pačia mitybine terpe be antibiotiko ir auginama apie 2 val. 30 °C temperatūroje purtant. Ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant 5 min. 3000 aps./min.

greičiu (Eppendorf Centrifuge 5810R), praplaunamos 1-3 ml TE buferiniu tirpalu ir dar kartą surenkamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis. Ląstelės buvo suspenduojamos 3 ml TE-LiAc tirpale ir inkubuojamos 1 val. 30 °C temperatūroje purtant. Paruoštos imliosios *S. cerevisiae* mielių ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis ir suspenduojamos 400 µl TE-LiAc tirpale.

Transformacijai buvo imama 80-100 µl imliųjų *S. cerevisiae* ląstelių mėginio, pridedama apie 1 µg plazmidinės DNR bei 10 % (*t./t.*) etanolio ir inkubuojama 20 min. 30 °C termostate. Pridėjus dvigubą tūrį 50 % TE-PEG, mielių ląstelių ir DNR mišiniai buvo inkubuojami 1 val. 30 °C termostate. Po to ląstelėms buvo atliekamas temperatūrinis šokas inkubuojant 20 min. 42 °C termobloke arba vandens vonioje. Ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant 3 min. 5000 aps./min. (Eppendorf Centrifuge 5415D), praplaunamos 1 ml TE tirpalu ir dar kartą centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Suspendavus ląsteles 0,5 ml YEPD mitybinėje terpėje, jos buvo inkubuojamos per naktį 30 °C termostate. Kitą dieną ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant 3 min. 5000 aps./min. (Eppendorf Centrifuge 5415D) ir išsėjamos ant agarizuotos YEPD terpės su formaldehidu (0,4 µl/ml). Transformuotos mielių ląstelės buvo auginamos dvi paras 30 °C termostate. Ląstelių kolonijos buvo persėjamos ant agarizuotos YEPD terpės su formaldehidu (0,6 µl/ml) ir auginamos dar dvi paras 30 °C termostate.

Naudoti reagentai:

Mielių ekstraktas, sojų peptonas (AppliChem), galaktozė (VWR Chemicals BDH, Londonas, JK), agaras (Thermo Fisher Scientific Baltics), ličio acetatas (Sigma Aldrich), polietilenglikolis 4000 (PEG 4000) (Serva, Heidelbergas, Vokietija), 96 % etanolis (Honeywell), 37 % formaldehido tirpalas (Amresco, Solonas, OH, JAV). D-gliukozė (dekstrozė) buvo perkama iš dviejų tiekėjų: „ChemPur“ (Piekary Slaskie, Lenkija) ir „Thermo Fisher Scientific“.

Naudotos mielių mitybinės terpės ir tirpalai:

YEPD (angl. yeast extract, peptone, dextrose) mielių auginimo terpė: 1 % mielių ekstrakto, 2 % dekstrozės/gliukozės, 2 % peptono. Agarizuotos YEPD terpės paruošimui pridedama 1,5-2 % agaro.

Indukcinė mielių terpė YEP-Gal (2× YEP su galaktoze): 2 % mielių ekstrakto, 4 % peptono, 6 % galaktozės. Terpės buvo autoklavuojamos 0,8 atm. slėgyje 30 min.

TE: (žr. 2.2.5. skyrelį, 62 p.).

TE-LiAc: 0,1 M CH₃COOLi ištirpinamas TE buferiniame tirpale.

TE-PEG: 50 % (*m./t.*) PEG 4000 ištirpinamas TE buferiniame tirpale.

Buvo naudojami sterilūs tirpalai, autoklavuoti 1 atm. slėgyje 20 min.

2.2.8. *S. cerevisiae* auginimas ir heterologinių baltymų sintezės indukcija

Raiškos vektoriumi transformuotos mielių ląstelės buvo užsėjamos į skystą YEPD terpę su formaldehidu (0,3 µl/ml) ir auginamos 16-24 val. 30 °C temperatūroje purtant (180-220 rpm). Heterologinių baltymų sintezė buvo indukuojama pridėjus tokį patį tūrį YEP-Gal indukcinės terpės (galutinė galaktozės koncentracija buvo 3 %) su formaldehidu (0,3 µl/ml). Mielės buvo auginamos 20-24 val. 30 °C temperatūroje purtant. Metodika sudaryta pagal (Sasnauskas *et al.*, 1999).

Naudotos mielių mitybinės terpės:

YEPD mielių auginimo terpė ir indukcinė mielių terpė YEP-Gal (2× YEP su galaktoze) (žr. 2.2.7. skyrelį, 64 p.).

2.2.9. Mielių ląstelių mechaninis ardymas

Po heterologinių baltymų sintezės indukcijos, mielių ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant 10 min. 3000 aps./min. greičiu (Beckman J-6B centrifuga, JS-5.2 rotorius). Ląsteles praplovus distiliuotu vandeniu, jos buvo išpilstomos į 50 ml mėgintuvėlius (taip, kad mėgintuvėlyje būtų apie 3-5 g mielių biomasės) ir surenkamos centrifuguojant 5 min. 3000 aps./min. greičiu (Eppendorf Centrifuge 5810R). Pasverta drėgna mielių biomasė tą pačią dieną buvo ardoma mechaniniu būdu arba saugoma -20 °C temperatūroje.

Mielių ląstelių mechaninis ardymas ir darbai su mielių baltymais buvo atliekami ledo vonioje naudojant 4 °C temperatūros buferinius tirpalus. Drėgna mielių biomasė buvo mechaniškai ardoma naudojant stiklo rutuliukus ir buferinį ardymo tirpalą (DB450 + Arg, 2 mM PMSF) santykiu 1:1:2. Mielių ląstelės buvo ardomos intensyviai purtant purtykle (30 sek. purtymo ir 30 sek. šaldymo lede, šį ciklą kartojant bent 10 kartų). Gauti „grubūs“ lizatai (juos sudarė mielių ląstelių nuolaužos, stiklo rutuliukai, mielių baltymai) buvo centrifuguojami 5 min. 3000 aps./min. greičiu (Eppendorf Centrifuge 5810R) atskiriant mielių baltymus nuo stiklo rutuliukų ir ląstelių nuolaužų. Surinktas nuskaidrintas mielių lizatas buvo centrifuguojamas 40 min. 12000 aps./min. (10000 g.) 4 °C temperatūroje (Beckman Avanti J-26 XPI, JA-20 rotorius, Beckman GmbH). Po mėginių centrifugavimo, buvo surenkamas supernatantas, o baltymų nuosėdos tirpinamos 1-3 ml ardymo buferiniame tirpale.

Surinkto nuskaidrinto lizato, supernatanto ir nuosėdų mėginių baltymų koncentracija buvo matuojama „NanoDrop 2000/2000c“ (Thermo Fisher Scientific) spektrofotometru ($\lambda = 280$ nm). Baltymų mėginiai buvo skiedžiami iki 10 mg/ml koncentracijos, pridėdama 2× baltymų dažo. Mėginiai buvo kaitinami 10 min. 100 °C temperatūroje ir frakcionuojami PAA gelyje denatūruojančiomis sąlygomis.

Naudoti reagentai, medžiagos:

0,5 mm stiklo rutuliukai (Carl Roth), Tris-HCl, 2-propanolis (Thermo Fisher Scientific Baltics), TritonX-100, bromofenolio mėlis (Merck, Darmstadas, Vokietija), merkaptoetanolis, fenilmetilsulfonil fluoridas (PMSF) (Sigma Aldrich), L-Argininas (AppliChem), NDS (Carl Roth), 0,2 μ m porėtumo filtras (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Vokietija). Kalcio chloridas buvo perkamas iš „AppliChem“ ir „Sigma Aldrich“, natrio chloridas buvo perkamas iš „Merck“ ir „ChemPur“.

Naudoti buferiniai tirpalai:

Buferinis mielių ardymo tirpalas: DB450 + Arg (pH 7,2), 2 mM PMSF.

DB450 + Arg: 10 mM Tris-HCl (pH 7,2), 450 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,01 % TritonX-100, 0,25 M L-Arg. Buferinis tirpalas buvo filtruojamas per 0,2 μ m porėtumo filtrą.

10× PMSF tirpalas: 20 mM PMSF izopropanolyje, laikomas -20 °C temperatūroje.

2× baltymų dažas: 0,1 M Tris-HCl (pH 6,8), 4 % NDS (*m.t.*), 0,1 % bromfenolio mėlio, 20 % (*t.t.*) glicerolio. Prieš naudojimą įdėta 10 % merkaptoetanolio.

2.2.10. Tikslinių baltymų gryninimas iš mielių ląstelių

Suardytų mielių ląstelių lizatų, supernatantų ir nuosėdų mėginiai (žr. 2.2.9. skyrelį) buvo analizuojami PAA gelyje. Jeigu tikslinio baltymo didesnis kiekis buvo aptinkamas supernatante, o ne nuosėdose, tada gryninimo etapai buvo atliekami su supernatante buvusiais baltymais ir atvirkščiai, jeigu tikslinis baltymas koncentravosi nuosėdose, o ne supernatante, toliau gryninimo etapai buvo atliekami su nuosėdose buvusiais baltymais. Visi tiksliniai baltymai buvo gryninami per 30-40 % sacharozės tirpalų gradientą (protokolą (A)), jeigu tikslinių baltymų grynumas būdavo nepakankamas, jie buvo papildomai gryninami per 30-60 % sacharozės tirpalų gradientą (protokolą (B)):

(A) tikslinių baltymų gryninimas per 30-40 % sacharozės tirpalų gradientą. Sacharozė buvo tirpinama DB150 buferiniame tirpale (*m.t.*). Paruošti sacharozės tirpalai į ultracentrifuginį mėgintuvėlį buvo supilami tankio mažėjimo tvarka (4 lentelė). Mielių supernatanto arba nuosėdų mėginys,

kuriame buvo aptinkamas didžiausias tikslinio baltymo kiekis, buvo lėtai užpilamas ant 30 % sacharozės tirpalo viršaus. Ultracentrifuginis mėgintuvėlis iki viršaus buvo užpildomas DB450 + Arg buferiniu tirpalu ir centrifuguojamas 2-3 val. 37000 aps./min. greičiu 4 °C temperatūroje (Beckman K80 arba K90 centrifugoje, 70.1 Ti arba 60 Ti rotoriuje, Beckman GmbH). Iškart po ultracentrifugavimo, tirpalas buvo nusiurbiamas, o baltymų nuosėdos buvo lėtai tirpinamos PBS tirpale ir analizuojamos PAA gelyje.

(B) tikslinių baltymų gryninimas per 30-60 % sacharozės tirpalų gradientą. Sacharozė buvo tirpinama DB150 + Arg buferiniame tirpale (*m./t.*). Paruošti tirpalai į ultracentrifuginį mėgintuvėlį buvo supilami tankio mažėjimo tvarka (4 lentelė). Baltymų mėginys, gautas (A) etape, buvo lėtai užpilamas ant 30 % sacharozės tirpalo viršaus. Ultracentrifuginis mėgintuvėlis iki viršaus buvo užpildomas DB150 + Arg buferiniu tirpalu ir centrifuguojamas 16-24 val. 37000 aps./min. greičiu 4 °C temperatūroje (Beckman K80 arba K90 centrifugoje, Beckman GmbH). Tada po 1 ml nuo 40 % sacharozės ribos buvo lėtai renkamos atskiros frakcijos. Frakcijų mėginiai buvo sumaišomi su 2x baltymų dažu, kaitinami 10 min. 100 °C temperatūroje ir analizuojami PAA gelyje. Frakcijos, kuriose buvo stebima daugiausia tikslinio baltymo be priemaišinių baltymų, buvo apjungiamos. Metodika sudaryta remiantis (Gedvilaite *et al.*, 2000) bei ją modifikuojant.

4 lentelė. Tikslinių baltymų gryninimui naudotų sacharozės tirpalų suvestinė.

	Sacharozės tirpalų koncentracijos	Gryninimas per 30-40 % tirpalų gradientą, ml	Gryninimas per 30-60 % tirpalų gradientą, ml
Tirpalų pylimo tvarka ↑	30 %	4	2
	40 %	10	1,5
	45 %	–	1,5
	50 %	–	1,5
	55 %	–	1,5
	60 %	–	1,5

Naudoti reagentai, medžiagos:

Tris-HCl, sacharozė, 2-propanolis (Thermo Fisher Scientific Baltics), TritonX-100, natrio dihidrofosfatas (Merck), L-Argininas (AppliChem), NDS, di-natrio hidrofosfatas (Carl Roth), 0,2 μm porėtumo filtras (Sartorius Stedim Biotech GmbH). Kalcio chloridas buvo perkamas iš „AppliChem“ ir „Sigma Aldrich“, natrio chloridas buvo perkamas iš „Merck“ ir „ChemPur“.

Naudoti buferiniai tirpalai:

Buferinis mielių ardymo tirpalas: DB450 + Arg (pH 7,2), 2 mM PMSF.

DB450 + Arg (žr. 2.2.9. skyrelį, 66 p.).

10× PMSF tirpalas (žr. 2.2.9. skyrelį, 66 p.).

DB150: 10 mM Tris-HCl (pH 7,2), 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,01 % TritonX-100.

DB150 + Arg: 10 mM Tris-HCl (pH 7,2), 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,01 % TritonX-100, 0,25 M L-Arg.

Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS): 0,08 M Na₂HPO₄, 0,025 M NaH₂PO₄, 0,1 M NaCl (pH 7,5).

Sacharozės tirpalai: 30-60 % sacharozės tirpalai (*m./t.*) gaminami DB150 arba DB150 + Arg buferiniame tirpale, laikomi 4 °C temperatūroje.

Visi tirpalai, išskyrus 10× PMSF, buvo filtruojami per 0,2 μm porėtumo filtrą.

2× baltymų dažas (žr. 2.2.9. skyrelį, 66 p.).

2.2.11. Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis (NDS-PAGE) ir poliakrilamidinio gelio dažymas

Ruošiant poliakrilamidinį gelį (PAA), 14 % skirstomojo gelio tirpalas (5 lentelė) buvo supilamas tarp stiklinės ir aliumininės tarpinių, įstatytų į gelių užpylimo formą „Hoefer™ Dual Gel Caster“ (Amersham Biosciences, JK). Skirstomajam gelio sluoksniui sustingus (po ~ 30-40 min.), paruoštas 3,2 % koncentruojančio gelio tirpalas (5 lentelė) buvo užpilamas ant sustingusios gelio dalies. Į gelio formelę buvo įstatoma baltymų mėginiais suleisti skirta tarpinė. Po 30-40 min., gelis būdavo sustingęs ir galėjo būti naudojamas baltymų elektroforezei atlikti arba laikomas 4 °C temperatūroje kelias dienas.

5 lentelė. PAA gelio paruošimo protokolas.

14 % skirstomasis sluoksnis		Tūris, reikalingas vienam PAA geliui
30 % akrilamido/bisakrilamido tirpalas		3 ml
Tris-HCl/NDS pH 8,8		1,67 ml
H ₂ O		1,68 ml
10 % APS		64,3 μl
TEMED		6,4 μl
3,2 % koncentruojantis sluoksnis		
30 % akrilamido/bisakrilamido tirpalas		0,24 ml
Tris-HCl/NDS pH 6,8		0,46 ml
H ₂ O		1,12 ml
10 % APS		9,2 μl
TEMED		1,84 μl

Baltymų mėginiai buvo maišomi su 2× mėginių dažu (turinčiu 10 % merkaptioetanolio) ir kaitinami 10 min. 100 °C temperatūroje. Paruošti baltymų mėginiai buvo užnešami į PAA gelio takelius. Elektroforezė buvo atliekama Rothiphorese® SDS-PAGE buferiniame tirpale vertikalios elektroforezės aparate, esant 150-190 V įtampai. Po elektroforezės, PAA gelis

5-10 min. buvo inkubuojamas fiksavimo buferiniame tirpale ir dažomas *Coomassie* briliantinio mėlio dažymo tirpalu švelniai purtant. Nudažytas PAA gelis buvo plaunamas 5 % acto rūgšties tirpalu švelniai purtant kelias valandas arba per naktį.

Naudoti reagentai:

Tris-HCl, glicinas, baltymų molekulinės masės standartai „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (SM26616, SM26634), „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“ (SM26610, SM26614) (Thermo Fisher Scientific Baltics), NDS, 30 % (29:1) Rotiphorese® akrilamido/bisakrilamido tirpalas, 10× Rothiphorese® SDS-PAGE buferinis tirpalas, amonio persulfatas (APS), N, N, N', N'-tetrametilendiaminas (TEMED) (Carl Roth), 96 % etanolis (Honeywell), acto rūgštis (ChemPur), *Coomassie* Brilliant Blue R-250 (Sigma Aldrich).

Naudoti tirpalai:

Tris-HCl/NDS (pH 8,8): 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4 % (*m./t.*) NDS.

Tris-HCl/NDS (pH 6,8): 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 % (*m./t.*) NDS.

Amonio persulfato tirpalas (APS): 10 % amonio persulfato tirpalas vandenyje.

2× baltymų dažas (žr. 2.2.9. skyrelį, 66 p.).

Gelių fiksavimo tirpalas: 50 % (*t./t.*) etanolio, 10 % (*t./t.*) acto rūgšties tirpalas.

Coomassie briliantinio mėlio dažymo tirpalas: 50 % (*t./t.*) etanolio, 0,07 % (*t./t.*) *Coomassie* Brilliant Blue R-250, 10 % (*t./t.*) acto rūgšties.

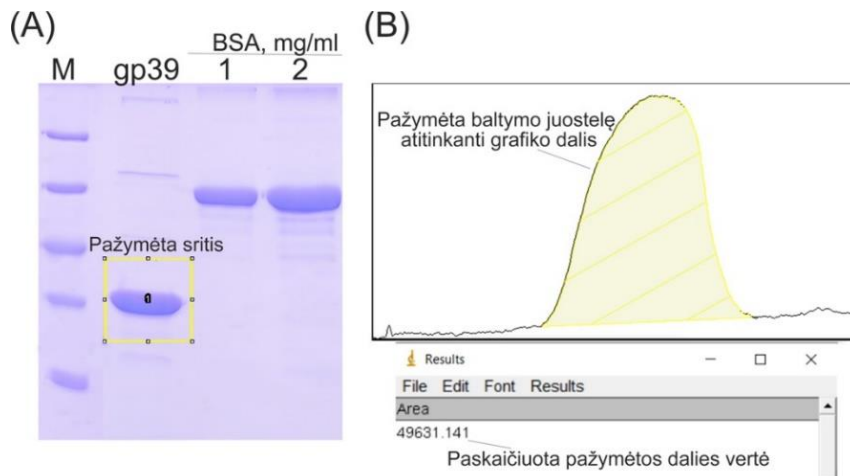
Gelių plovimo tirpalas: 5 % (*t./t.*) acto rūgšties.

2.2.12. Tikslinių baltymų sintezės efektyvumo mielėse, jų koncentracijos ir baltymo gp39 gryninimo išeigos nustatymas

Mielių lizate esančių tikslinių baltymų kiekis, jų sintezės efektyvumas bei išgrynintų baltymų koncentracija buvo nustatomi analizuojant PAA gelių nuotraukas. Naudojant „ImageJ“ programinę įrangą (Schneider *et al.*, 2012), PAA gelio nuotraukoje buvo pažymimas vienas tikslinis baltymas arba visi viename PAA gelio takelyje išfrakcionuoti baltymai. Nuotraukos pažymėtoje srityje buvo analizuojamas baltymo juostelių dydis ir intensyvumas, kuris buvo paverčiamas skaitine verte. Mielių lizate esančio tikslinio baltymo sintezės efektyvumas buvo skaičiuojamas tikslinio baltymo skaitinę vertę padalinant iš visų mielių lizate esančių baltymų skaitinės vertės ir padauginant iš 100, t., y., buvo apskaičiuojamas susintetinto tikslinio baltymo kiekio procentas nuo bendro ląstelės baltymų kiekio. Tam buvo naudojama formulė:

$$[(\text{tikslinio baltymo skaitinė vertė} / \text{mielių lizato visų baltymų skaitinė vertė}) \times 100 \%]$$

Išgrynintų baltymų koncentracija PAA geliuose buvo nustatoma matuojant išgrynintų baltymų juostelių skaitines vertes ir lyginant jas su žinomos molekulinės masės jaučio serumo albumino (angl. *bovine serum albumin*, BSA) (Thermo Fisher Scientific) baltyminių juostelių skaitinėmis vertėmis (20 pav.).



20 pav. Baltymo gp39 koncentracijos nustatymo tyrimas. (A) gp39 ir jaučio serumo albumino baltymų PAA gelio nuotrauka. M – baltymų molekulinės masės standartas „Page Ruler™ Unstained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific Baltics). Baltymo gp39 juostelė pažymėta geltonu kvadratu. BSA – jaučio serumo albumino baltymai (1 mg/ml ir 2 mg/ml). (B) Pažymėtos gp39 juostelės intensyvumo skaičiavimo tyrimas. Pažymėjus grafiko dalį, atitinkančią baltymą gp39 (grafike pažymėta geltona spalva), „ImageJ“ programa paskaičiavo pažymėtos dalies skaitinę vertę (parodyta paveikslėlio apačioje). Baltymo gp39 skaitinę vertę palyginus su tokiu pačiu principu nustatytais BSA baltymų skaitinėmis vertėmis, buvo paskaičiuota gp39 koncentracija.

Baltymo gp39 gryninimo išeiga buvo išreiškiama baltymo kiekiu (mg), gautu suardžius 1 g drėgnos mielių biomasės. Gryninimo išeiga buvo apskaičiuojama nustatant gryninimo metu gauto gp39 kiekį (mg) ir pasveriant eksperimentui naudotų mielių, sintetinančių gp39, biomasės kiekį (g). Tam buvo naudojama formulė:

$$\frac{\text{išgryninto gp39 kiekis (mg)}}{\text{mielių biomasės kiekio (g)}}$$

2.2.13. Baltymų dializė

Išgrynintų baltymų mėginiai buvo supilami į celiuliozinę dializės maišelį ir įmerkiami į 4 °C temperatūros PBS buferinį tirpalą. Priklausomai nuo baltymų

mėginio tūrio, dializė buvo atliekama 200 ml arba 2 L PBS buferinio tirpalo tūryje lėtai maišant magnetine maišykle 4 °C temperatūroje. Dializė buvo vykdoma apie 20-24 val., kas 2-5 val. keičiant PBS buferinį tirpalą (iš viso 3-4 buferinio tirpalo pakeitimai).

Atliekant gp39 ir jo formuojamų nanovamzdelių stabilumo tyrimą, 100 µl baltyminio mėginio (1 mg/ml koncentracijos) buvo dializuojama 200 ml 6 M guanidino hidrochlorido (GuHCl) tirpale. Dializė buvo vykdoma 1 val. lėtai maišant magnetine maišykle 4 °C temperatūroje. Baltymo gp39 renatūracija buvo atlikta dializuojant ~80 µl baltyminio mėginio (1 mg/ml koncentracijos) 200 ml PBS buferiniame tirpale 20 val. lėtai maišant magnetine maišykle 4 °C temperatūroje.

Naudoti reagentai, medžiagos:

Guanidino hidrochloridas (Sigma Aldrich), celiuliozinė dializės membrana (14 kDa pralaidumo) (Carl Roth), natrio dihidrofosfatas (Merck), di-natrio hidrofosfatas (Carl Roth), natrio chloridas buvo perkamas iš „Merck“ ir „ChemPur“.

Naudoti buferiniai tirpalai:

GuHCl tirpalas: 6 M guanidino hidrochloridas, laikomas kambario temperatūroje.

PBS buferinis tirpalas (žr. 2.2.10. skyrelį, 68 p.).

2.2.14. Mielių ląstelių fluorescencinė analizė

3ml YEPD mitybinėje terpėje buvo auginamos mielės, sintetinančios baltymą gp39 ir chimerinius gp39m_eGFP bei gp39m_J_eGFP. Po ląstelių indukcijos galaktoze (žr. 2.2.8. skyrelį), mielių ląstelės buvo skiedžiamos iki OD=2. Ant objekcinio stikliuko buvo užnešama po 10 µl mielių ląstelių mėginio, mikroskopavimui ląstelės nebuvo fiksuojamos.

Ląstelių morfologija buvo stebėta šviesaus lauko mikroskopijos būdu (nuotraukų išlaikymas 3 ms), mikroskopu Olympus AX70, naudojant 60× aliejaus imersijos objektyvą UPlanFl, kurio NA 1,25. Baltymo eGFP fluorescencija buvo registruota naudojant filtrų kubą WIBA ($\lambda_{ex} = 460-490$ nm; $\lambda_{em} = 515-550$ nm). Mikroskopavimo nuotraukos registruotos CCD kamera ORCA (Hamamatsu, Japonija), nuotraukų išlaikymas 45-85 ms. Mikroskopavimą atliko dr. A. Sasnauskienė (VU GMC Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra).

Naudotos mielių mitybinės terpės:

YEPD mielių auginimo terpė ir indukcinė mielių terpė YEP-Gal (2× YEP su galaktoze) (žr. 2.2.7. skyrelį, 64 p.).

2.2.15. Virusinių nanostruktūrų stebėjimas elektroniniu mikroskopu

4 μ l baltymo mėginio (~1 mg/ml koncentracijos) buvo užnešama ant mikroskopavimo tinklelio. Po kelių minučių inkubavimo, mikroskopavimo tinklelis buvo nusausinamas su filtriniu popieriumi ir praplaunamas užlašinus 4 μ l distiliuoto vandens. Su filtriniu popieriumi nusausinus tinklelį, mėginys kelias minutes buvo dažomas užlašinus 4 μ l 2 % uranilacetato tirpalo. Mikroskopavimas buvo atliekamas stebint „Morgagni-268(D)“ elektroniniu mikroskopu (FEI, Eindhovenas, Olandija).

Naudoti reagentai, medžiagos:

Mikroskopavimo tinklelis „AGS162-4 Formvar/Carbon 400 Mesh Copper“ (Agar Scientific, Stanstedas, JK), 2 % uranilacetato tirpalas (Reachim, Maskva, Rusija).

2.2.16. Imunoblotas

Baltymai iš PAA gelio buvo pernešami ant PVDF membranos pusiau šlapio pernešimo metodu. PAA gelis, vatmano lapeliai bei 96 % etanoliu aktyvinta PVDF membrana ~5 min. buvo mirkomi PTB buferiniame tirpale. Ant baltymų pernešimo prietaiso buvo dedamas vatmano lapelis, ant viršaus PVDF membrana, ant jos PAA gelis ir vėl vatmano lapelis. Baltymų pernešimas ant membranos buvo vykdomas 40 min. esant 20 V įtampai. Po baltymų pernešimo, PVDF membrana 1 val. buvo inkubuojama 1 \times ROTI[®]Block blokavimo tirpale ir 3 kartus praplaunama TBS-T tirpalu švelniai maišant. Membrana buvo inkubuojama su pirminiais antikūnais:

(A) anti-gp39 polikloniniais antikūnais (PAk) (paruošė I. Dalgėdienė, VU GMC BTI ILBS). Antikūnai buvo skiedžiami iki 2 μ g/ml TBS-T buferiniame tirpale.

(B) anti-His monokloniniais antikūnais MAk (Invitrogen, Karlsbadas, CA, JAV). Antikūnai buvo skiedžiami 1:5000 TBS-T buferiniame tirpale, pagal gamintojo rekomendacijas.

Membrana su pirminiais antikūnais buvo inkubuojama per naktį švelniai purtant kambario temperatūroje. Po inkubavimo, membrana 3 kartus buvo praplaunama TBS-T tirpalu ir 2 val. kambario temperatūroje inkubuojama su anti-pelės IgG HRP antikūnais, konjuguotais su krienų peroksidaze (1:3000 TBS-T buferiniame tirpale). Po to membrana 2 kartus buvo plaunama TBS-T tirpalu, o trečią kartą praplaunama su TBS tirpalu. Po praplovimo membrana buvo ryškinama užpylus chlornaftolio ryškinimo tirpalo, o reakcija buvo stabdoma membraną įmerkiant į vandenį.

Taškiniam imunoblotui atlikti, 2 μ g išgrynintų rekombinantinių baltymų

arba 20 µg mielių, transformuotų „tuščiu“ raiškos vektoriumi, lizato buvo užlašinama ant 96 % etanolio aktyvintos PVDF membranos. Mėginiams išdžiūvus, PVDF membrana buvo blokuojama ir inkubuojama su antikūnais laikantis standartinio imunobloto protokolo.

Naudoti reagentai, medžiagos:

0,45 µm polivinilideno difluorido membrana (PVDF) (GE Healthcare Life Science, Freiburgas, Vokietija), 35 % vandenilio peroksidas (Arcos Organics, Gelis (Geel), Belgija), 10× ROTI®Block tirpalas (Carl Roth), 4-chloro-1-naftolis, NaCl (Sigma Aldrich), Tris, glicinas (Thermo Fisher Scientific Baltics), 96 % etanolis (Honeywell), Tween-20 (AppliChem).

Naudoti buferiniai tirpalai:

Baltymų pemešimo buferinis tirpalas PTB (angl. *protein transfer buffer*): 25 mM Tris, 192 mM glicino, 20 % etanolio, laikomas 4 °C temperatūroje.

Membranos blokavimo tirpalas: 1× ROTI®Block tirpalas.

TBS buferinis tirpalas: 20 mM Tris, 137 mM NaCl (pH 7,6).

TBS-T buferinis tirpalas: TBS tirpalas su 0,1 % Tween-20 (*t./t.*).

Membranos ryškinimo tirpalas: prieš pat naudojimą buvo sumaišomi 2 ml „A“ ir 10 ml „B“ tirpalai:

Tirpalas A: 30 mg 4-chlor-1-naftolio ištirpinta 10 ml etanolio, laikomas -20 °C temperatūroje;

Tirpalas B: 30 µl 30 % H₂O₂ ištirpinta 10 ml TBS buferiniame tirpale.

2.2.17. Netiesioginė imunofermentinė analizė (IFA)

Į 96-šulinėlių skaidrios plokščiadugnės plokštelės šulinėlius (Nerbe Plus GmbH, Winsenas, Vokietija) buvo pilama po 100 µl 2 µg/ml koncentracijos rekombinantinio baltymo, skiesto karbonatiniame buferiniame tirpale. Plokštelės buvo inkubuojamos per naktį 4 °C temperatūroje. Kitą dieną plokštelės 3 kartus buvo praplaunamos PBS-T tirpalu. Nusausinus plokšteles ir į šulinėlius įpylus po 200 µl blokavimo tirpalo, plokštelės buvo inkubuojamos 1 val. kambario temperatūroje. Šulinėlius 3 kartus praplovus PBS-T buferiniu tirpalu, buvo įpilama po 100 µl pirminių antikūnų:

(A) baltymu gp39 imunizuotų pelių kraujo serumo. Serumo mėginiai buvo titruojami skiedžiant du kartus mėginių buferiniame tirpale pradedant nuo 1:200 skiedimo;

(B) anti-gp39 PAK (VU GMC BTI ILBS). Antikūnai buvo skiedžiami iki 2 µg/ml mėginių buferiniame tirpale;

(C) anti-His MAK (Invitrogen). Antikūnai buvo skiedžiami 1:5000 mėginių buferiniame tirpale, pagal gamintojo rekomendacijas.

Plokštelės su pirminiais antikūnais buvo inkubuojamos 1 val. 37 °C termostate. Po inkubacijos, šulinėliai buvo praplaunami 5 kartus PBS-T buferiniu tirpalu. Po to į kiekvieną šulinėlį buvo įpilama po 100 µl 1:5000 skiestų ožkos anti-pelės IgG HRP antikūnų (BioRad, Herkules, CA, JAV). Plokštelės buvo inkubuojamos 1 val. 37 °C termostate ir plaunamos 5 kartus PBS-T buferiniu tirpalu. Reakcijos buvo vykdomos į šulinėlius įpylus po 100 µl TMB substrato (Clinical Science Products) ir inkubuojamos 2-5 min. kol atsirasdavo intensyvi mėlyna spalva. Reakcija buvo stabdoma į šulinėlius įpylus po 100 µl 10 % H₂SO₄ tirpalo. Reakcijų OT buvo įvertinami spektrofotometru „Multiskan EX plate reader“ (Franklinas, TN, JAV) esant 450 nm bangos ilgiui ir 620 nm koreguojančiam spinduliui, o rezultatai analizuojami „MS Excel 2013“ arba „Origin Pro 8.0“ programine įranga.

Naudoti reagentai, medžiagos:

Natrio karbonatas (Reachim, Rusija), BSA (Sigma Aldrich), sieros rūgštis (Fluka, Buchsas, Šveicarija), 10× ROTI®Block tirpalas (Carl Roth), Tween-20 (AppliChem), natrio dihidrofosfatas (Merck), di-natrio hidrofosfatas (Carl Roth), natrio chloridas buvo perkamas iš „Merck“ ir „ChemPur“.

Naudoti buferiniai tirpalai:

Karbonatinis buferinis tirpalas: 0,05 M Na₂CO₃ (pH 9,6), laikomas 4 °C temperatūroje.

IFA blokavimo tirpalas: 1× ROTI®Block tirpalas.

Plovimo buferinis tirpalas PBS-T: PBS (pH 7,5) (žr. 2.2.10. skyrelį, 68 p.), 0,1 % Tween-20.

Mėginių tirpalas: PBS (pH 7,5) (žr. 2.2.10. skyrelį, 68 p.), 0,1 % Tween-20, 1 % BSA.

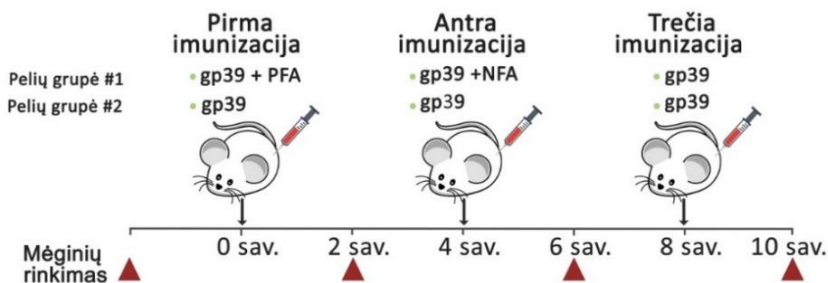
Reakcijų su TMB stabdymo tirpalas: 10 % H₂SO₄ tirpalas.

2.2.18. Pelių imunizacija

9 savaičių BALB/c patelės buvo suskirstytos į dvi grupes po 5 peles (n = 10). Pirmoji pelių grupė buvo imunizuojama natyviomis sąlygomis išgrynintu baltymu gp39 su Freundo adjuvantu: 3 kartus 4 savaičių intervalais į poodį buvo suleidžiama 50 µg baltymo gp39, ištirpinto 100 µl steriliame PBS buferiniame tirpale ir sumaišyto su 100 µl pilnu Freundu adjuvantu (PFA). Antrai pelių imunizacijai buvo suleidžiama 50 µg baltymo gp39, ištirpinto 100 µl steriliame PBS buferiniame tirpale, sumaišyto su 100 µl nepilno Freundu adjuvantu (NFA). Trečios pelių imunizacijos metu adjuvantas nebuvo naudojamas: pelės buvo imunizuojamos tik baltymu gp39. Antroji pelių grupė buvo imunizuojama natyviomis sąlygomis išgrynintu baltymu

gp39 be adjuvanto: 3 kartus 4 savaitių intervalais į poodį buvo suleidžiama 50 µg baltymo gp39, ištirpinto 100 µl steriliame PBS buferiniame tirpale. Pelių kraujo mėginiai buvo renkami prieš imunizaciją bei praėjus 2 savaitėms po kiekvienos imunizacijos (21 pav.).

BALB/c patelės buvo veisiamos ir auginamos VU GMC BChI Biologinių modelių skyriaus vivariume. Leidimas dirbti su pelėmis buvo gautas iš Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos (leidimo Nr. G2-117, suteiktas 2019-06-11). Imunizacijas bei kraujo mėginių ir serumo iš jų išskyrimą atliko I. Dalgėdienė (VU GMC BTI Imunologijos ir ląstelės biologijos skyrius (ILBS)), turinti VU Gamtos mokslų fakulteto išduodą pažymėjimą, suteikiantį teisę dirbti su laboratoriniais gyvūnais Lietuvos Respublikoje.



21 pav. Pelių imunizacijos schema. Pelės buvo imunizuojamos į poodį suleidžiant baltymo gp39 su Freundo adjuvantu arba be adjuvanto 3 kartus 4 savaitių intervalais. Kraujo mėginiai buvo renkami prieš imunizaciją bei praėjus 2 savaitėms po kiekvienos imunizacijos. PFA – pilnas Freundo adjuvantas, NFA – nepilnas Freundo adjuvantas.

Naudoti reagentai, medžiagos:

Freundo adjuvantas (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, JAV), natrio dihidrofosfatas (Merck), di-natrio hidrofosfatas (Carl Roth), natrio chloridas buvo perkamas iš „Merck“ ir „ChemPur“.

Naudotas buferinis tirpalas:

PBS buferinis tirpalas: (žr. 2.2.10. skyrelį, 68 p.).

2.2.19. Antikūnų titro nustatymas ir statistinė analizė

Atliekant netiesioginę IFA, baltymu gp39 imunizuotų pelių kraujo serumai buvo inkubuojami su gp39 arba žiurkėno poliomos viruso kapsidės baltymu VP1 (Sasnauskas *et al.*, 1999). Baltymui gp39 specifinių antikūnų titru buvo laikomas didžiausias imunizuotų pelių serumo skiedimas, kuriame OT reikšmė tarp gp39 specifinių IgG antikūnų ir baltymo gp39 buvo tris kartus didesnė nei serumų sąveikos su nespecifiniu baltymu (VP1) OT reikšmių

vidurkio ir trijų standartinių nuokrypių sumos ($\bar{x} + 3 \text{ SN}$). Antikūnų titru buvo laikomas pelių serumo skiedimas kai OT vertė viršijo 0,2 ($\text{OT} \geq 0,2$) (Malm *et al.*, 2014).

Antikūnų titro duomenų pasiskirstymo normalumas buvo nustatomas *Shapiro-Wilk* testu. Kadangi analizuojamos imtys buvo mažos ($n = 5$), tik po pirmos pelių imunizacijos baltymu gp39 bei po antros imunizacijos baltymu gp39 su NFA antikūnų titro duomenys atitiko normalųjį skirstinį ($p > 0,14$ ir $p > 0,20$, atitinkamai), o kitose pelių grupėse antikūnų titro duomenys nebuvo pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį ($p < 0,05$), todėl statistinė analizė buvo atlikta naudojant neparametrinius testus. Antikūnų titrų skirtumai tarp atskirų pelių grupių (imunizuotos gp39 be arba su adjuvantu) buvo lyginami naudojant *Mann-Whitney U* testą, o poriniai antikūnų titro skirtumai pelių grupės viduje buvo nustatomi naudojant *Wilcoxon Signed Rank* testą. Statistinė analizė buvo atlikta naudojant statistinės analizės programą „OriginPro 8.0“ ir „MS Excel 2013“ programą. Naudotas reikšmingumo lygmuo $\alpha = 0,05$.

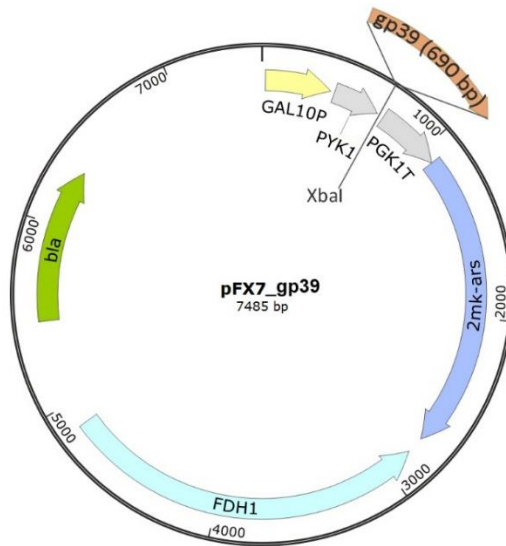
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Darbo metu buvo tiriamos bakteriofago NBD2 baltymo gp39 formuojamų nanovamzdelių pritaikymo galimybės kuriant nešiklių baltyminių fragmentų eksponavimui. Gauti darbo rezultatai buvo suskirstyti į dvi dalis: pirmojoje dalyje detaliai charakterizuotos gp39 formuojamų nanovamzdelių morfologinės savybės, nustatytos gp39 savaiminiam susirinkimui svarbios dalys, nanovamzdelių stabilumas bei imunogeniškumas. Antrojoje darbo dalyje nustatytos baltymo gp39 vietos, toleruojančios peptidų prijungimą. Atlikta bioinformatinė analizė ir eksperimentiniai duomenys leido susieti prie gp39 C galo prijungtų baltyminių fragmentų savybes su jų įtaka chimerinių baltymų sintezės efektyvumui mielėse ir savaiminiam susirinkimui į nanostruktūras.

3.1. Rekombinantinio baltymo gp39 sintezė bei jo formuojamų nanostruktūrų charakterizavimas

3.1.1. Mielių raiškos vektoriaus konstravimas

Baltymo gp39 sintezei *S. cerevisiae* mielėse, buvo konstruojamas mielių raiškos vektorius. PGR metodu, naudojant PET plazmidę, koduojančią baltymą gp39, kaip matricą (Šimoliūnas, 2017), pradmenimis gp39_F ir gp39_R, buvo pagausinta baltymą gp39 koduojanti DNR seka, prie kurios 3' ir 5' galo buvo prijungtos XbaI RE atpažinimo sekos (2 lentelė). Į pFX7 vektorių, tarp GAL10-PYK1 promotoriaus ir PGK1 terminatoriaus sekų, buvo įterpta XbaI RE hidrolizuota gp39 geno seka (22 pav.). Sukonstruotame mielių raiškos vektoriuje pFX7_gp39, gp39 geno sekoskaita buvo atlikta VU GMC BTI Sekvenavimo centre, o gautos sekos išanalizuotos „MEGA v7.0.26“ programine įranga.



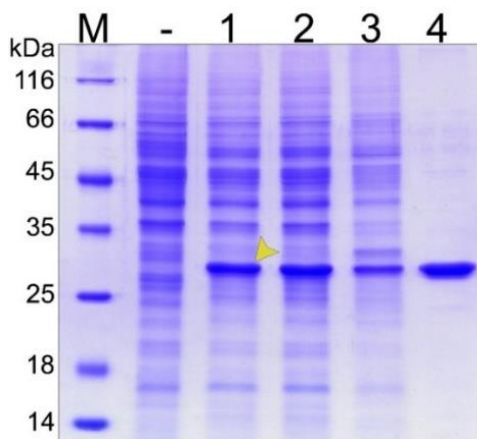
22 pav. pFX7_gp39 mielių raiškos vektoriaus, koduojančio baltymą gp39, schema. Vektorius turi GAL10P promotorių (geltona spalva), indukuojamą galaktoze, ir *PYK1* geno, koduojančio *S. cerevisiae* piruvatkinazę, promotoriaus fragmentą (pilka spalva). Transkripcijos terminatorių PGK1T (pilka spalva) sudaro fosfogliceratkinazės *PGK1* genas. Vektorius turi dvi DNR replikacijos pradžios sekas: 2mk-ars (mėlyna spalva) – mielių 2 μ plazmidės ARS ir bakterijų ORI DNR sekos. Vektoriaus atrankos žymenys: FDH1 (žydra spalva) – mielių *Candida maltosa* formaldehido dehidrogenazės genas *FDH1*, suteikiantis mielių ląstelių atsparumą formaldehidui, bei *bla* genas (žalia spalva) – β -laktamazę koduojantis genas, bakterijoms suteikiantis atsparumą ampicilinui (Sasnauskas *et al.*, 1992, 1999). gp39 – baltymą gp39 koduojanti geno seka (690 bp).

3.1.2. Baltymo gp39 sintezė mielėse ir gryninimas natyviomis sąlygomis

Raiškos vektoriumi pFX7_gp39 transformavus *S. cerevisiae* mielių AH22-214 kamieno ląsteles, baltymo gp39 sintezė indukuota į terpę pridėjus galaktozės. Surinkta mielių biomasė buvo suardyta mechaniniu būdu, o mielių lizate esantys baltymai buvo išfrakcionuoti PAA gelyje. Vektoriumi pFX7_gp39 transformuotų mielių lizato mėginyje buvo aptikta baltymą gp39 atitinkanti ~28 kDa dydžio baltymo juostelė, kurios nebuvo mielių, transformuotų „tuščiu“ pFX7 vektoriumi, lizate (23 pav.). Baltymo gp39 sintezės efektyvumas mielių lizato mėginyje buvo nustatomas „ImageJ“ programine įranga analizuojant PAA gelio nuotrauką (žr. skyrelį 2.2.11). Remiantis trijų nepriklausomų eksperimentų duomenimis, *S. cerevisiae* mielėse baltymas gp39 sudarė net ~27 % visų ląstelėje sintetinamų baltymų kiekio. Tai rodo, kad baltymas gp39 buvo sintetinamas efektyviai, nes dažniausiai mielėse sintetinami rekombinantiniai baltymai sudaro iki 18 %

visų mielių ląstelės baltymų kiekio (Boga *et al.*, 1997; Buckholz ir Gleeson, 1991; Slibinskas *et al.*, 2004).

Kadangi virusų struktūriniai baltymai gali formuoti virusines nanostruktūras, *S. cerevisiae* mielėse susintetintas baltymas gp39 buvo gryninamas natyviomis sąlygomis. Baltymo gp39 tirpumas buvo įvertintas mielių lizatą centrifuguojant. Po baltymų centrifugavimo gauti supernatanto ir nuosėdų mėginiai buvo analizuojami NDS-PAGE. Didžioji baltymo gp39 dalis buvo tirpi ir aptinkama supernatanto mėginyje, todėl toliau buvo dirbama su supernatante esančiais baltymais (23 pav., 2 takelis). Supernatanto mėginys buvo užnešamas ant 30-40 % sacharozės tirpalų gradiento ir ultracentrifuguojamas. Po centrifugavimo, nuosėdos buvo suspenduojamos PBS buferiniame tirpale ir analizuojamos NDS-PAGE. Pasirodė, kad ultracentrifuginio mėgintuvėlio dugne susikoncentravo baltymas gp39, kurio grynumas buvo ~85-90 % (23 pav., 4 takelis). Trijų nepriklausomų eksperimentų duomenimis, baltymo gp39 išėiga iš 1 g drėgnos mielių biomasės buvo $0,85 \pm 0,33$ mg. Tai rodo, kad baltymo gp39 gryninimas natyviomis sąlygomis galėtų būti dar optimizuojamas, nes efektyviai sintetinamų rekombinantinių baltymų išėigos turėtų būti didesnės (Geymonat *et al.*, 2007; Slibinskas *et al.*, 2004). Juo labiau kad lygiagrečiai atlikus *E. coli* bakterijose susintetinto baltymo gp39 gryninimą, kuris sudarė ~ 33 % visų bakterijų baltymų kiekio, iš 1 g drėgnos bakterijų biomasės buvo gauta ~ 3,4 kartus daugiau baltymo gp39 (Špakova *et al.*, 2019).



23 pav. *S. cerevisiae* mielėse susintetinto baltymo gp39 sintezės analizė PAA gelyje. M – baltymų molekulinės masės standartas „Page Ruler™ Unstained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific Baltics); „-“ žymi mielių, transformuotų „tuščiu“ pFX7 vektoriumi, lizatą; toliau pateikiamas mielių, transformuotų pFX7_gp39 vektoriumi, 1 – lizatas (gp39 pažymėtas geltona rodykle), 2 – supernatantas, 3 – nuosėdos. 4 – išgrynintas gp39.

3.1.3. Baltymo gp39 formuojamų nanostruktūrų analizė

Nors *Caudovirales* būriui priklausančių bakteriofagų ataugos susirinkimas yra griežtai kontroliuojamas procesas (Davidson *et al.*, 2012; Linares *et al.*, 2020), tačiau kai kurių bakteriofagų ataugos vamzdelio baltymai gali savaime susirinkti į įvairaus ilgio nanovamzdelius (Arnaud *et al.*, 2017; Langlois *et al.*, 2015; Leonard *et al.*, 1973). Kadangi *E. coli* bakterijose susintetintas bakteriofago NBD2 baltymas gp39 savo natyvioje būsenoje savaime susirinko suformuodamas nanovamzdelius (Šimoliūnas, 2017; Špakova *et al.*, 2019), todėl buvo tikimasi, kad ir *S. cerevisiae* mielėse susintetintas baltymas gp39 taip pat formuos panašias struktūras.

Natyviomis sąlygomis išgrynintas baltymo gp39 mėginys buvo užlašinamas ant mikroskopavimo tinkliuko, dažomas 2 % uranilacetato tirpalu ir analizuojamas TEM. Mikroskopavimo metu buvo stebimi baltymo gp39 formuojami ypatingai lankstūs ir ilgi nanovamzdeliai, susiformavę mielių ląstelėse net ir nesant kitų fago baltymų (24 pav.). *S. cerevisiae* mielėse susintetinto baltymo gp39 formuojamų nanovamzdelių paviršius buvo tvarkingas, nesimatė nei paviršinių įtrūkimų, nei kitų netolygumų (24 pav. A).

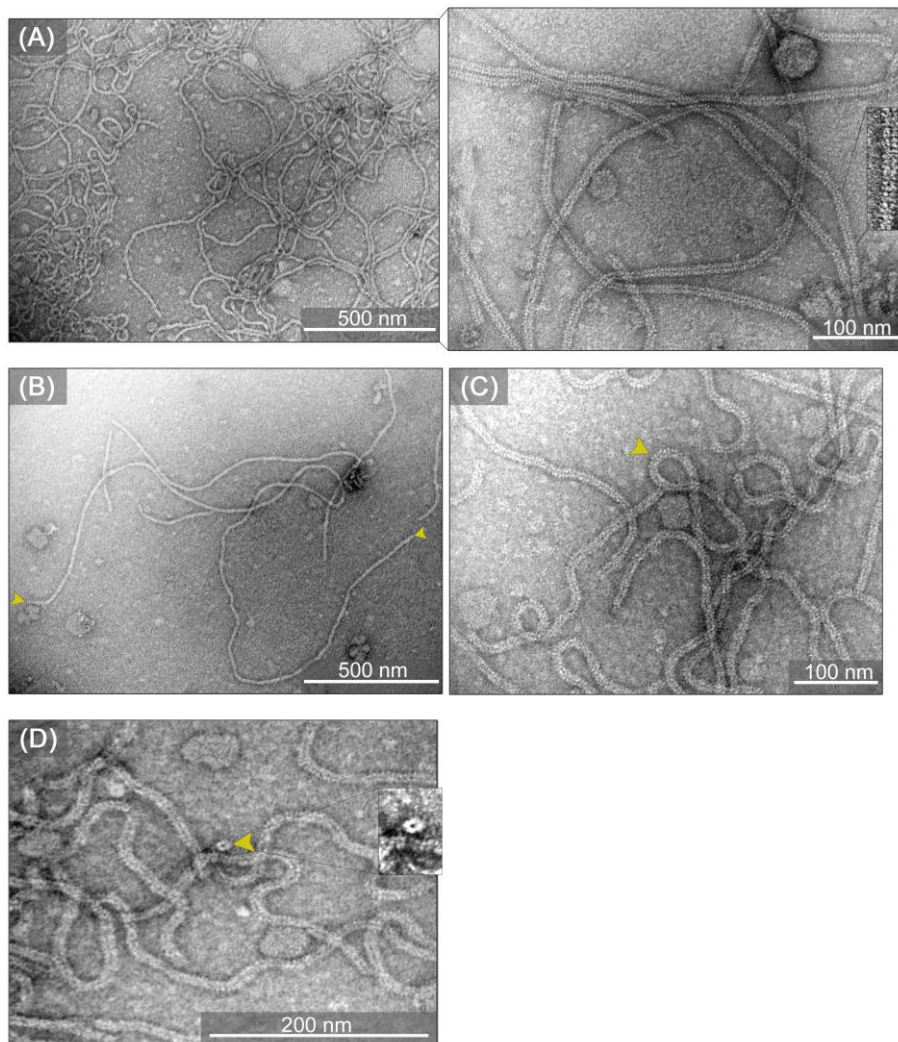
Nors susintetintų nanovamzdelių skersmuo atitiko bakteriofago NBD2 ataugos skersmenį (~ 12 nm) (Kalinienė *et al.*, 2017), tačiau jų ilgis buvo įvairus. Daugiausia stebėtų struktūrų buvo 0,5-1,3 μm ilgio, tačiau buvo stebimi ir pavieniai 0,1 μm ar > 3,95 μm ilgio nanovamzdeliai⁸ (24 pav. B). Bakteriofago vamzdelio baltymo suformuota struktūra buvo 3,95 μm ilgio, kuri yra net 23 kartus ilgesnė už NBD2 bakteriofago ataugą. Kadangi virusinių nanostruktūrų pritaikymas biotechnologijoje dažnai priklauso nuo jų formos ir dydžio, ilgi nanovamzdeliai yra pranašesni už ikosaedrinės VPD kai norima į nanostruktūros vidinę ertmę supakuoti daugiau tikslių medžiagų arba ant struktūros paviršiaus eksponuoti didesnę baltyminių fragmentų kiekį.

Identiškos baltymo gp39 tarpusavio sąveikos bet kurioje nanovamzdelio vietoje lėmė įvairaus ilgio nanovamzdelių susiformavimą ir spontaniškus vieno nanovamzdelio abiejų galų tarpusavio susijungimus sudarant uždaras žiedines struktūras (24 pav. C). Tai rodo, kad gp39 savaiminis susirinkimas buvo nekontroliuojamas, nes mielėse buvo sintetintas gp39 be kitų fago reguliacinių baltymų. Kadangi fagų ataugos ilgio matavimo baltymas ir terminatorinis baltymas yra svarbūs ataugų susirinkimui ir jų ilgio reguliacijai

⁸Ilgiausios rekombinantinių ir chimerinių baltymų formuojami nanovamzdeliai bus aprašomi su „>“ simboliu, nes nanostruktūrų lankstumas ir jų persipynimas tarpusavyje apsunkino jų ilgio matavimą, todėl ilgiausios struktūros galėjo būti nenustatytos.

(Davidson *et al.*, 2012; Mahony *et al.*, 2016; Pell *et al.*, 2009b), remiantis teorinėmis žiniomis, gp39 formuojamų nanovamzdelių ilgį galima būtų suvienodinti mielėse sintetinant gp39 kartu su NBD2 fago ilgio matavimo baltymu gp42 (Kalinienė *et al.*, 2017). Jeigu prie gp39 formuojamų nanovamzdelių galo būtų prijungtas fagų ataugos vamzdelio terminatorinis baltymas, žiedinės uždarnos struktūros galimai nebūtų formuojamos, nes terminatorinis baltymas neleistų tarpusavyje sąveikauti abiem tos pačios struktūros galams.

Baltymas gp39 formavo ~12 nm skersmens diskus (24 pav. D). Tokie diskai, jungdamiesi savo plokštumomis, sudaro baltymo gp39 formuojamus nanovamzdelius. Bakteriofagų lanksčios ir nesusitraukiančios ataugos, išskyrus fagus T5 ir phiCbK, yra sudarytos iš vienas ant kito susijungusių heksamerinės simetrijos žiedinių diskų (Bebeacua *et al.*, 2013; Pell *et al.*, 2009a; Zinke *et al.*, 2020). Tačiau lanksčius, stabilius ir nevienodo ilgio nanovamzdelius yra sudėtinga išanalizuoti krioelektroninės mikroskopijos metodu, todėl fago NBD2 nanovamzdelį formuojančio disko simetrija, disko pasisukimo laipsnis bei tarpas tarp greta esančių diskų šiame darbe nebuvo nustatomi.

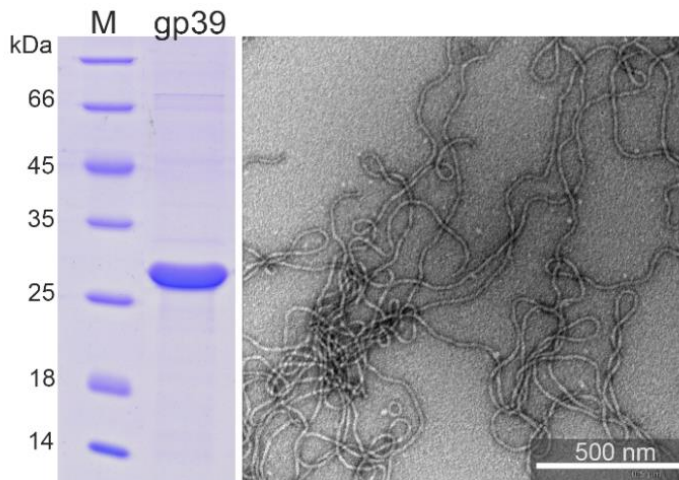


24 pav. *S. cerevisiae* mielėse susintetinto baltymo gp39 formuojamų nanostruktūrų TEM nuotraukos. (A) Nanovamzdelių nuotraukos. Paveikslėlio kairėje pateikta 56 tūkstančius kartų padidinta mėginio nuotrauka. Dešinėje esančios nuotraukos fragmente pateiktas 180 tūkstančių kartų padidintas nanovamzdelio segmentas. (B) 3,95 μm ilgio baltymo gp39 formuojamo nanovamzdelio nuotrauka. Geltonos rodyklės žymi vienos nanostruktūros abu galus. (C) Nanovamzdelio abiejų galų tarpusavio susijungimo, suformuojant uždarą žiedą, nuotrauka. Uždaras žiedas parodytas geltona rodykle. (D) ~12 nm skersmens gp39 formuojamo disko nuotrauka. Nuotraukos fragmente pateiktas 180 tūkstančių kartų padidintas diskas.

3.2. Baltymo gp39 formuojamų nanovamzdelių imunogeniškumo tyrimas

Kadangi nanovamzdeliai potencialiai gali būti pritaikyti vakcinų kūrimui ir antikūnų gamybai, buvo įvertintas gp39 formuojamų nanovamzdelių

imunogeniškumas. Pelių imunizacijai buvo naudotas natyviomis sąlygomis išgrynintas gp39, kuris TEM analizės metu formavo ilgus, tvarkingus ir lanksčius nanovamzdelius (25 pav.). Natyviomis sąlygomis išgrynintas gp39 buvo saugomas -20 °C temperatūroje PBS buferiniame tirpale su 50 % glicerolio, todėl prieš kiekvieną pelių imunizaciją glicerolis buvo pašalinamas baltymą gp39 dializuojant PBS buferiniame tirpale. Baltymo gp39 stabilumas buvo įvertinamas NDS-PAGE, o nanovamzdelių morfologija buvo analizuojama TEM.



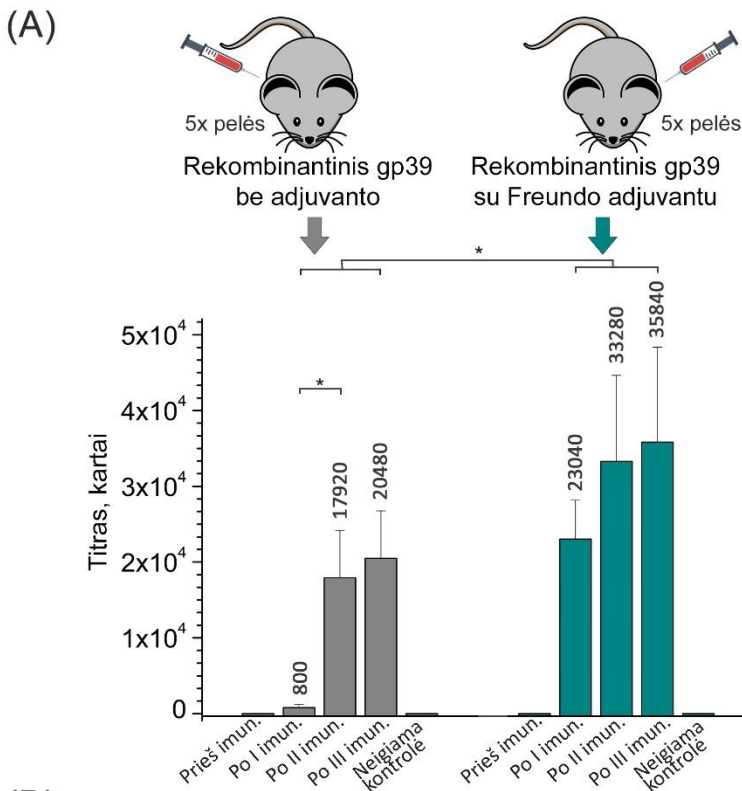
25 pav. Natyviomis sąlygomis išgryninto baltymo gp39 PAA gelio ir nanovamzdelių TEM nuotraukos. M – baltymų molekulinės masės standartas „Page Ruler™ Unstained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific Baltics).

Dvi grupės pelių (grupėje po 5 peles, $n = 5$) 3 kartus 4 savaičių intervalais buvo imunizuotos po oda suleidžiant baltymą gp39 be adjuvanto arba baltymą gp39 su Freundo adjuvantu. Praėjus 2 savaitėms po kiekvienos imunizacijos, buvo renkami kraujo serumų mėginiai (pelių imunizacijos eksperimentą bei kraujo serumų rinkimą atliko I. Dalgėdienė, VU GMC BTI ILBS). Baltymo gp39 formuojamų nanovamzdelių imunogeniškumas buvo įvertinamas IFA metodu nustatant pelių kraujo serumuose esančių baltymui gp39 specifinių IgG antikūnų titrus (26 pav.).

Tiriant baltymu gp39 imunizuotų pelių kraujo serumus, pirmiausia buvo nustatomas adjuvanto poveikis nanovamzdelių imunogeniškumui (26 pav.). Po pirmos pelių imunizacijos su gp39 ir pilnu Freundo adjuvantu (PFA), pelių kraujo serumuose baltymui gp39 specifinių IgG antikūnų titras 1:23040 buvo statistiškai patikimai didesnis nei pelių, imunizuotų gp39 be adjuvanto, kur titras buvo 1:800 ($p = 0,009$, 26 pav.). Po antros imunizacijos, naudojant gp39 su nepilnu Freundu adjuvantu (NFA), baltymui gp39 specifinių antikūnų titro

vidurkis padidėjo nuo 1:23040 iki 1:33280, tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,34$). Pelių grupėje, antrą kartą imunizuotoje gp39 be adjuvanto, antikūnų titro vidurkis statistiškai reikšmingai padidėjo nuo 1:800 iki 1:17920 ($p = 0,046$). Pelių grupėje, kurioje buvo naudotas adjuvantas, po trečios imunizacijos baltymui gp39 specifinių antikūnų titro vidurkis padidėjo nuo 1:33280 iki 1:35840, bet šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas ($p = 1,0$). Taip pat ir pelių grupėje, imunizuotoje gp39 be adjuvanto, baltymui gp39 specifinių antikūnų titro vidurkis padidėjimas nuo 1:17920 iki 1:20480 nebuvo statistiškai reikšmingas ($p = 1,0$). Nespecifinių sąveikų nustatymui buvo naudotas žiurkėno poliomos viruso baltymas VP1 (Sasnauskas *et al.*, 1999) (26 pav. A). Gauti rezultatai rodo, kad nanovamzdeliai yra imunogeniški ir pelėms sukelia humoralinio imuninio atsako prieš baltymą gp39 susidarymą: gaminami didelio afiniškumo baltymui gp39 specifiniai IgG antikūnai.

Freundo adjuvantas padidino gp39 imunogeniškumą, todėl skirtumas tarp pelių, imunizuotų gp39 be adjuvanto ir pelių, imunizuotų gp39 su adjuvantu, buvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,001$, 26 pav.). Kita vertus, abiejose pelių grupėse po trečios imunizacijos, baltymui gp39 specifinių IgG antikūnų titrų padidėjimas buvo statistiškai nereikšmingas lyginant su titrais, gautais po antros imunizacijos (26 pav.). Tai rodo, kad peles imunizuojant baltymo gp39 formuojamais nanovamzdeliais, pakanka dviejų imunizacijos ciklų didžiausiam humoraliniam imuniniam atsakui susidaryti. Tai gali būti šių nanovamzdelių pranašumas prieš licencijuotas, virusinėmis nanostruktūromis paremtas vakcinas, kurių gamintojai rekomenduoja tris vakcinas dozes efektyviam imuniniam atsakui suformuoti prieš hepatito B virusą ar žmogaus papilomos virusą (FDA, 2019; Merck, 2021a, 2021b).



(B)

	Palyginimas	p reikšmė	Reikšmingumas	Naudotas testas
Pelių grupės viduje	I ir II imunizacijos: gp39	0,04676	< 0,05	Wilcoxon Signed Rank
	II ir III imunizacijos: gp39	1,00	> 0,05	
	I ir II imunizacijos: gp39 su adj.	0,3458	> 0,05	
	II ir III imunizacijos: gp39 su adj.	1,00	> 0,05	
Tarp atskirų pelių grupių	I imunizacija: gp39 vs gp39 su adj.	0,009237	< 0,05	Mann-Whitney U
	II imunizacija: gp39 vs gp39 su adj.	0,1461	> 0,05	
	III imunizacija: gp39 vs gp39 su adj.	0,07528	> 0,05	
Bendras įvertinimas tarp atskirų pelių grupių	I,II,III imunizacijos gp39 vs gp39 su adj.	0,001012	< 0,05	

26 pav. Nanovamzdelių imunogeniškumo nustatymo tyrimas. (A) Baltymu gp39 formuojamų nanovamzdelių imunogeniškumo nustatymas IFA metodu. Dvi pelių grupės (grupėje $n = 5$) buvo imunizuotos gp39 be adjuvanto arba su Freundo adjuvantu. Virš histogramų pateikti penkių pelių baltymui gp39 specifinių IgG antikūnų titrų vidurkiai. Neigiamai kontrolei buvo naudotas žiurkėno poliomos viruso baltymas VP1. „*“ rodo statistiškai reikšmingus skirtumus pelių grupės viduje ir tarp pelių grupių ($p < 0,05$). Diagramose apibendrinti trijų nepriklausomų eksperimentų duomenys. (B) Baltymui gp39 specifinių antikūnų titro įvertinimo statistinės analizės duomenys. Antikūnų titrai buvo lyginami analizuojant pelių grupės viduje (Wilcoxon Signed Rank testas) ir tarp atskirų pelių grupių, imunizuotų baltymu gp39 be adjuvanto ir gp39 su adjuvantu (Mann-Whitney U testas). Statistiškai reikšmingi skirtumai buvo laikomi kai $p < 0,05$.

3.3. Baltymo gp39 ir jo formuojamų nanovamzdelių stabilumo tyrimai

Kadangi *S. cerevisiae* mielėse susintetintas baltymas gp39 susirinko į nanovamzdelius, buvo nuspręsta įvertinti gp39 ir jo formuojamų nanovamzdelių stabilumą veikiant įvairiems fiziniams ir cheminiams veiksniams. Tam natyviomis sąlygomis išgrynintas gp39 buvo 8 mėn. inkubuojamas PBS tirpale 4 °C temperatūroje, liofilinamas, šaldomas -20 °C temperatūroje, kaitinamas 100 °C temperatūroje, septynias dienas inkubuojamas 6 M karbamido tirpale ar skirtingos sudėties buferiniuose tirpaluose, kurių pH kito nuo 3,2 iki 9,6, skaldomas tripsino proteaze ir denatūruojamas inkubuojant 6 M guanidino hidroklorido (GuHCl) tirpale.

Kadangi išgryninti rekombinantiniai baltymai gali būti naudojami įvairiems tikslams, kai jie ilgą laiką inkubuojami skirtingos sudėties tirpaluose, liofilizuojami ir net saugomi iki dešimties metų, todėl išgryninto baltymo gp39 ir jo formuojamų nanovamzdelių stabilumas buvo tiriamas po 8 mėn. gp39 mėginio inkubacijos PBS buferiniame tirpale 4 °C temperatūroje. Pasirodė, kad ilgalaikis inkubavimas PBS tirpale 4 °C temperatūroje neturėjo neigiamos įtakos gp39 ir jo formuojamų struktūrų stabilumui – PAA gelyje neatsirado mažesnės už ~28 kDa molekulinės masės fragmentų, kurie reikštų baltymo gp39 degradavimo produktus, o TEM analizė patvirtino, kad nanovamzdeliai atrodė nepakitę (27 pav. A). Liofilizacija taip pat neturėjo neigiamos įtakos baltymo gp39 stabilumui ir jo formuojamiems nanovamzdeliams (27 pav. B).

Mielių biomasė su susintetintu rekombinantiniu baltymu gali būti saugoma iki baltymo gryninimo ją užšaldant -20 °C temperatūroje, todėl yra galimybė, kad šaldymo metu susidarę ledo kristalai gali pažeisti tiek mielių ląsteles, tiek ir jose esančias virusines nanostruktūras. Mielių biomasės užšaldymo įtaka baltymo gp39 stabilumui ir nanovamzdelių morfologijai buvo tiriama lygiagrečiai ardant baltymą gp39 sintetinančią ir du mėnesius -20 °C temperatūroje šaldytą bei nešaldytą mielių biomasę. Abiejų mielių biomasių lizatuose esantis baltymas gp39 buvo gryninamas natyviomis sąlygomis. Išanalizavus išgrynintų baltymų gp39 mėginius PAA gelyje, pasirodė, kad iš abiejų: nešaldytos ir užšaldytos mielių biomasių, baltymas gp39 buvo išgrynintas panašiu efektyvumu be aptinkamų jo degradavimo produktų. Mielių biomasės užšaldymas taip pat neturėjo neigiamos įtakos nanovamzdelių morfologijai (27 pav. C).

Aukštoje temperatūroje inkubuojami baltymai dažnai denatūruojasi, o tai gali neigiamai paveikti virusinių nanostruktūrų morfologiją ar lemti jų „subyrėjimą“. Tam, kad nustatyti nanovamzdelių stabilumą ekstremaliose sąlygose, natyviomis sąlygomis išgrynintas baltymo gp39 mėginys buvo

inkubuojamas 30 min. 100 °C temperatūroje. Po šios inkubacijos, mėgintuvėlio dugne susidarė baltos spalvos baltymų nuosėdos. Ištyrus šias nuosėdas PAA gelyje, baltymo gp39 degradavimo produktų nebuvo aptikta, tačiau nanovamzdeliai buvo linkę agreguoti. Pasirodė, kad kaitinimas niekaip nepaveikė nanovamzdelių ilgio, tačiau struktūrų skersmuo padidėjo nuo ~12 nm iki 19-22 nm (27 pav. D). Mėgintuvėlio dugne stebėta baltymų agregacija ir nanovamzdelių skersmens padidėjimas greičiausiai buvo baltymų denatūracijos pasekmė.

Kai kuriems virusiniams baltymams įgijus jiems nebūdingą krūvį, gali sumažėti nanostruktūrų formavimosi efektyvumas arba jų stabilumas, taip pat gali pasikeisti virusinių nanostruktūrų morfologija (Hashemi *et al.*, 2021; Jin Xu *et al.*, 2014). Kadangi baltymai yra sudaryti iš teigiamą ir neigiamą krūvį turinčių AR, tirpalo pH lemia baltymų krūvio pokyčius. Dėl to, virusinių nanostruktūrų stabilumo įvertinimas yra svarbus jų biotechnologiniam pritaikymui kur jos būtų inkubuojamos aukštą arba žemą pH turinčiuose tirpaluose. Pavyzdžiui, gabenant tikslines medžiagas ląstelių-taikinių vaizdinimui ar kuriant geriamas vakcinas (Asor *et al.*, 2020; Serradell *et al.*, 2019). Tam, kad nustatyti buferinių tirpalų pH reikšmes, kuriose inkubuojamas baltymas gp39 ir jo formuojami nanovamzdeliai išlieka stabilūs, išgrynintas gp39 buvo išpilstomas į 5 mėgintuvėlius ir dializuojamas buferiniuose tirpaluose su skirtingomis pH reikšmėmis (tirpalų pH 3,2-9,6): citratiniame, acetatiniame, fosfatiniame, Tris ir karbonatiniame (6 lentelė). Dializė buvo vykdoma 7 dienas 4 °C temperatūroje, o po to buvo įvertinamas poveikis gp39 nanovamzdelių stabilumui. PAA gelių nuotraukose galima matyti, kad po inkubavimo pH 3,2 bei pH 4,7 buferiniuose tirpaluose atsirado mažesnės už ~ 28 kDa molekulinės masės baltymų fragmentų, reiškiančių dalinės gp39 degradacijos produktus (6 lentelė; 27 pav. E). Nors baltymo gp39 inkubacija pH 3,2-9,6 buferiniuose tirpaluose nanovamzdelių morfologijos nepaveikė, tačiau parodė, kad siekiant išvengti degradacijos ilgalaikio saugojimo metu, baltymą gp39 geriau inkubuoti fosfatiniame (pH 7,6), Tris (pH 8,7) ar karbonatiniame (pH 9,6) tirpaluose.

6 lentelė. Baltymo gp39 ir jo formuojamų nanovamzdelių stabilumo įvairios sudėties buferiniuose tirpaluose apibendrinimas.

Bufolinių tirpalų sudėtis	pH	Baltymo gp39 degradavimo produktai	Poveikis nanovamzdelių morfologijai
50 mM natrio citratas, 2 mM EDTA	3,2	Nežymus, fragmentų <28 kDa buvo ~10 %	Nėra
50 mM natrio acetatas, 2 mM EDTA	4,7	Nežymus, fragmentų <28 kDa buvo ~2-5 %	Nėra
PBS, 2 mM EDTA	7,6	Nėra	Nėra
50 mM Tris, 2 mM EDTA	8,7	Nėra	Nėra
50 mM NaHCO ₃ , 2 mM EDTA, 200 mM NaCl	9,6	Nėra	Nėra

Tripsino proteazė hidrolizuoja peptidinius ryšius, kuriuos sudaro lizino bei arginino karboksigrupės. Tripsinas yra naudojamas baltymų suskaldymui atliekant masių spektrometriją ar nustatant virusinės nanostruktūros paviršiuje eksponuojamas lizino aminogrupes, kurios gali būti modifikuojamos cheminės konjugacijos būdu (Chih *et al.*, 2011; Huynh *et al.*, 2009). Tripsino proteazės poveikis gp39 ir jo formuojamų nanovamzdelių stabilumui buvo tiriamas kartu su eksperimento kontrolei pasirinktu žiurkėno poliomos viruso kapsidės baltymu VP1, kuris formuoja ikosaedrinę VPD (Sasnauskas *et al.*, 1999). Abu baltymai buvo 6 val. inkubuojami 37 °C termostate su tripsino proteaze santykiu 20:1. Baltymų gp39 ir VP1 stabilumas buvo įvertintas atlikus NDS-PAGE. Po baltymo gp39 inkubavimo su tripsino proteaze, PAA gelyje šalia ~28 kDa baltymo juostelės papildomai atsirado neryški ~22 kDa juostelė. Tripsino proteazė labiau paveikė baltymo VP1 stabilumą, nes šalia ~43 kDa dydžio baltymo juostelės, kurios intensyvumas sumažėjo, atsirado gana ryški ~37 kDa juosta ir daug neryškių mažesnės molekulinės masės baltymų juostelių. Tripsino proteaze paveiktų baltymo gp39 mėginių analizė TEM parodė, kad nanovamzdelių morfologija nepakito ir nesiskyrė nuo tipinių, gp39 formuojamų struktūrų, o žiurkėno poliomos viruso baltymas VP1, nors ir buvo suskaldytas tripsino proteazės, tačiau taip pat formavo ikosaedrinę VPD (27 pav. F). Tai leidžia daryti prielaidą, kad tripsino proteazė skaldė gp39 ir VP1 formuojamų nanostruktūrų į išorę nukreiptas baltymų dalis, todėl nanostruktūros nebuvo suardytos.

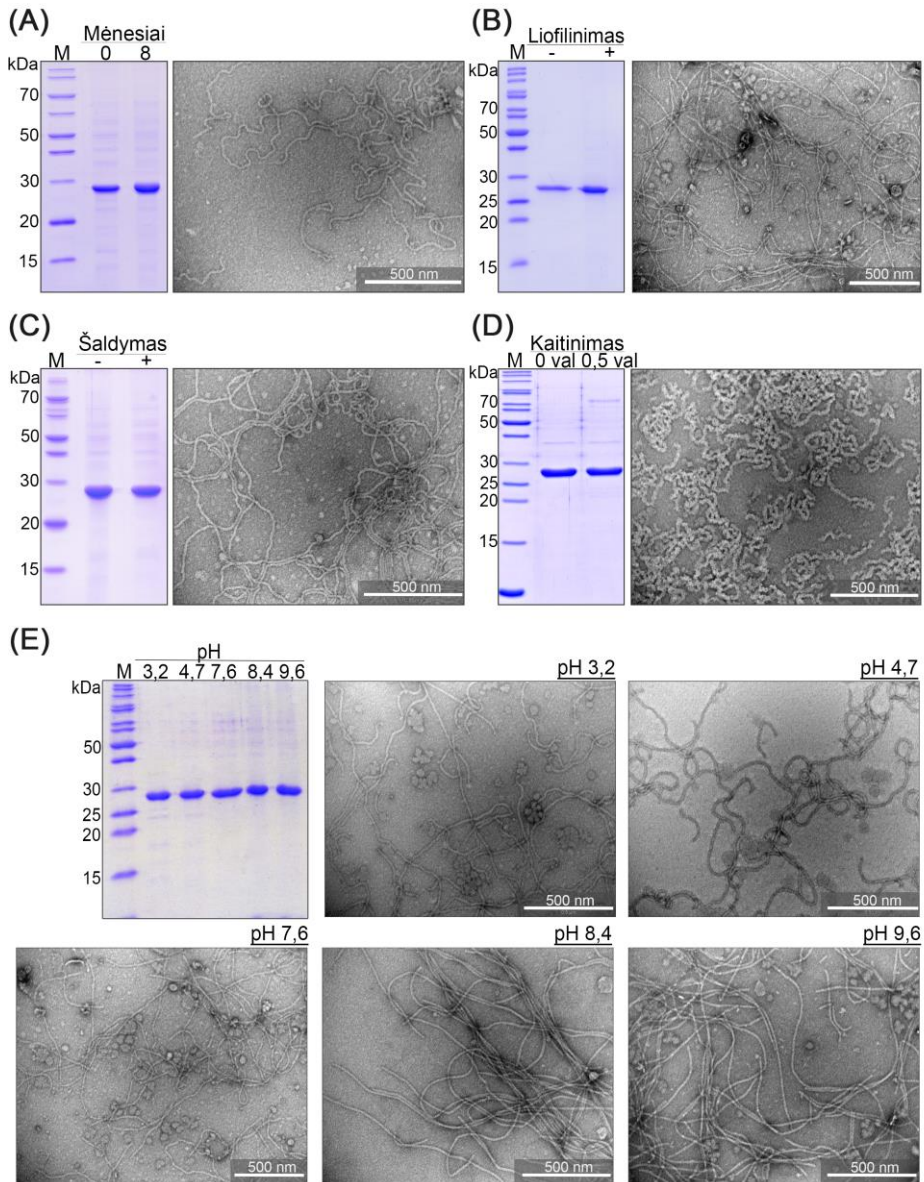
Kone plačiausiai naudojamas baltymų stabilumo įvertinimas yra jų atsparumas denatūrantams. Karbamidas yra baltymų denatūrantas, suardantis nekovalentines jungtis, todėl gali būti naudojamas baltymų erdvinio susilankstymo ir stabilumo tyrimuose, taip pat bakterijų netirpiuose

kūneliuose (angl. *inclusion bodies*) esančių rekombinantinių baltymų denatūravimui (Biggar *et al.*, 2012; Esmaili *et al.*, 2018). Nors karbamido detalus veikimo principas nėra nustatytas, manoma, kad jis „išvynioja“ hidrofobines baltymų dalis suardydamas vandenilines jungtis. Kitas galimas karbamido veikimo mechanizmas susijęs su jo sąveikos su krūvį turinčių AR šoninėmis grupėmis įtakotais baltymo erdvinės struktūros pokyčiais ar denatūracija (Caballero-Herrera *et al.*, 2005).

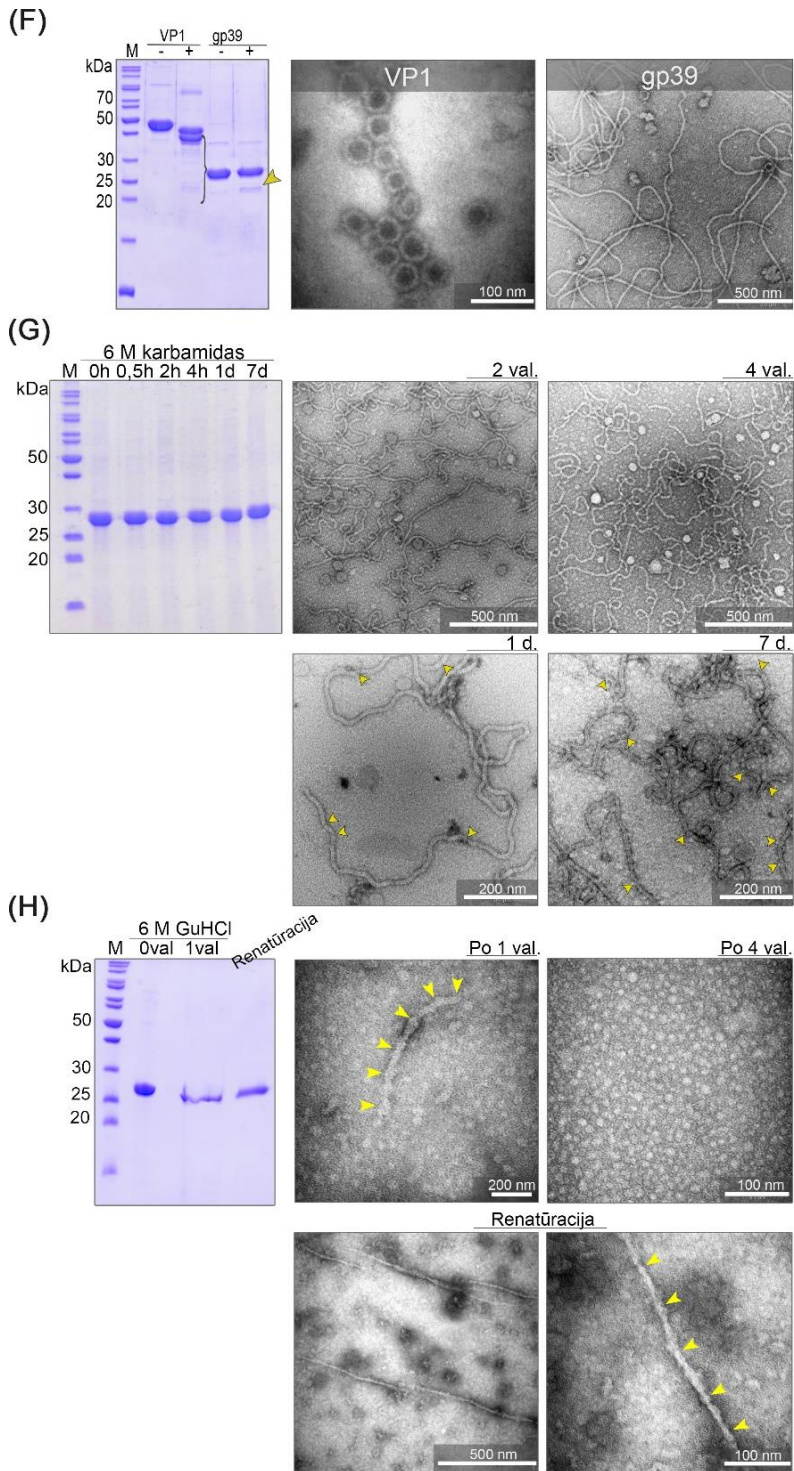
Nors gp39 inkubavimas 6 M karbamido tirpale neturėjo įtakos baltymo stabilumui, bet paveikė nanovamzdelių morfologiją (27 pav. G). Po 2 val. ir 4 val. inkubavimo karbamido tirpale, nanovamzdeliai atrodė nepakitę, tačiau po vienos dienos nanovamzdelių paviršiuje atsirado nedidelių įtrūkimų. Po 7 dienų mėginio inkubavimo karbamido tirpale, nanostruktūrų paviršiuje įtrūkimų padaugėjo, tačiau jie nepakeitė nanostruktūrų ilgio ar skersmens (27 pav. G).

Kitas baltymų denatūrantas yra GuHCl tirpalas. Nors baltymų inkubavimas nedidelės koncentracijos GuHCl tirpale padidina hidrofobinių baltymų tirpumą, tačiau 3-6 M koncentracijos GuHCl tirpalai denatūruoja baltymus suardant jų erdvinį susilankstymą. Kadangi po denatūravimo kai kurie renatūruoti baltymai gali susirinkti į virusines nanostruktūras, o pakartotinai susirinkusios struktūros gali turėti kiek kitokią morfologiją (Le *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2021; Y. Zhang *et al.*, 2021), todėl buvo tiriamas GuHCl poveikis gp39 formuojamiems nanovamzdeliams ir įvertinamas renatūruotų baltymų gebėjimas susirinkti į struktūras.

Po 1 val. baltyminio mėginio inkubavimo 6 M GuHCl tirpale, buvo stebimi baltyminiai agregatai ir pavienės iki 500 nm ilgio struktūros. Jų paviršius buvo netolygus, skersmuo varijavo nuo 10 nm iki 20 nm, o struktūrų galai neturėjo aiškių kontūrų (27 pav. H). Tai rodo, kad mikroskopavimo metu buvo stebimas nanovamzdelių „byrėjimas“ juos denatūruojant GuHCl tirpalu. Jau po 4 val. inkubavimo GuHCl tirpale, mikroskopavimo tinklelyje nanostruktūrų nebuvo aptikta. Tam, kad nustatyti ar denatūruotas baltymas gp39 po GuHCl pašalinimo formuoja erdvines struktūras, buvo atlikta baltyminio mėginio dializė PBS tirpale. Nuo dializės pradžios praėjus 20 val., renatūruotas gp39 formavo pavienius nanovamzdelius – jie buvo nelankstūs, nevienodo ilgio (nuo 100 nm iki 1 μ m) bei skersmens (nuo 9 nm iki 25 nm) (27 pav. H). Tai rodo, kad renatūruotas baltymas gp39 galėjo neteisingai susilankstyti, todėl struktūros buvo formuojamos neefektyviai ir jos morfologiškai skyrėsi nuo nemonifikuoto gp39 formuojamų nanovamzdelių.



Paveikslėlio tęsinys kitame puslapyje



27 pav. Baltymo gp39 ir jo formuojamų nanovamzdelių stabilumo tyrimai PAA geliuose ir TEM nuotraukose. (A) 8 mėnesių inkubavimo 4 °C temperatūroje

poveikis gp39 ir nanovamzdelių stabilumui; **(B)** liofilizacijos poveikis; **(C)** mielių biomasės šaldymo -20 °C temperatūroje poveikis baltymo grynimui, jo stabilumui bei nanovamzdelių morfologijai; **(D)** 30 min. kaitinimo 100 °C temperatūroje poveikis; **(E)** septynių dienų inkubavimo skirtingos sudėties (pH 3,2-9,6) buferiniuose tirpaluose stabilumo tyrimas. Takeliai žymi tirpalų pH reikšmes. **(F)** Baltymų gp39 ir VP1 inkubacijos su tripsino proteaze tyrimas. VP1 – žiurkėno poliomos viruso kapsidės baltymas; laužtinis skliaustas žymi po tripsinolizės atsiradusius baltymų fragmentus. „-“ žymi baltymų mėginius prieš tripsinolizę, „+“ – mėginius po tripsinolizės. Po gp39 inkubacijos su tripsino proteaze, šalia ~28 kDa baltymo juostos papildomai atsiradusi ~22 kDa molekulinės masės baltymo juostelė pažymėta geltona rodykle. **(G)** Septynių dienų inkubavimo 6 M karbamido tirpale poveikis gp39 ir jo formuojamų nanovamzdelių stabilumui. Virš takelių pažymėta mėginio inkubavimo trukmė 6 M karbamido tirpale. Paviršiniai struktūrų įtrūkimai, atsiradę po vienos ir septynių dienų inkubavimo karbamido tirpale, TEM nuotraukoje pažymėti geltonomis rodyklėmis. **(H)** Baltymo gp39 ir jo formuojamų nanovamzdelių denatūravimas 6 M GuHCl tirpale ir jo renatūravimas. Geltonomis rodyklėmis pažymėtos nanostruktūros po 1 val. inkubavimo 6 M GuHCl tirpale, po 4 val. inkubavimo nanostruktūrų neaptikta. Apačioje pateiktos nanovamzdelių nuotraukos po mėginio renatūracijos. M – baltymų molekulinės masės standartas „Page Ruler™ Unstained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific Baltics). Baltymo gp39 dydis ~28 kDa.

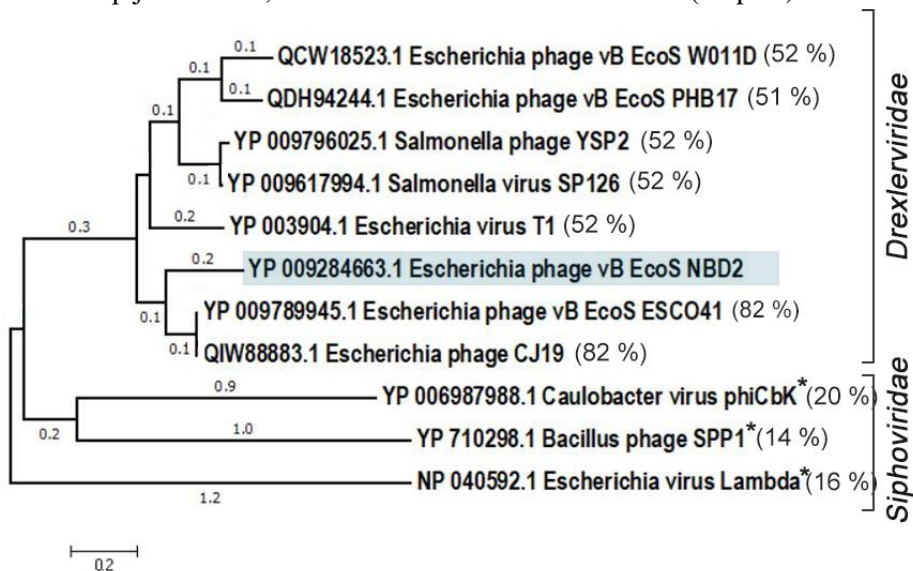
Nors nanovamzdelių inkubavimas 6 M GuHCl tirpale suardė struktūras, o renatūruotas baltymas gp39 prarado gebėjimą susirinkti į tipinius nanovamzdelius, tačiau tokios aplinkos sąlygos kaip 8 mėn. inkubavimas PBS tirpale, liofilizacija, kaitinimas, šaldymas, inkubavimas su tripsino proteaze arba skirtingos sudėties buferiniuose tirpaluose (pH 3,2-9,6) bei 6 M karbamido tirpale neturėjo arba turėjo nežymų poveikį gp39 stabilumui ir jo formuojamų nanovamzdelių morfologijai. Baltymo gp39 formuojamų nanovamzdelių stabilumas įvairiose aplinkos sąlygose yra panašus į daugelio virusų ir virusinių nanostruktūrų stabilumus (Jepson ir March, 2004; Kalnciema *et al.*, 2011; Leung *et al.*, 2017). Šių nanovamzdelių stabilumą galėjo įtakoti kompaktiškos baltymų tarpusavio sąveikos, nes pavienių fagų ataugos vamzdelio baltymų stabilumas yra mažesnis (Arnaud *et al.*, 2017; Campbell *et al.*, 2020; Langlois *et al.*, 2015).

Kadangi biotechnologijoje pritaikomos virusinės nanostruktūros gali būti veikiamos joms nepalankiomis aplinkos sąlygomis, todėl gp39 formuojami stabilūs nanovamzdeliai galėtų būti pritaikyti įvairiose srityse kur biologines struktūras veikia neigiami aplinkos veiksniai. Pavyzdžiui, terapinių medžiagų nugabenimui į ląsteles (Yang *et al.*, 2020), elektronikos įrenginių gamybai (Tseng *et al.*, 2006), ląstelių vaizdinimui (Niehl *et al.*, 2016), katalizės

reakcijų vykdymui (Wi *et al.*, 2020) ar geriamų vakcinų kūrimui (Serradell *et al.*, 2019).

3.4. Baltymo gp39 bioinformatinė analizė

Atlikus artimiausių baltymo gp39 homologų bioinformatinę analizę, buvo nustatyti fago NBD2 ataugos vamzdelio baltymo gp39 homologiniai ryšiai su kitų fagų vamzdelio baltymais. Pasirodė, kad gp39 artimiausi homologai yra *Drexlerviridae* šeimai priklausančių fagų vB_Eco_ESCO41 ir CJ19 ataugos vamzdelio baltymai (AR sekų identiškumas tarp šių baltymų buvo 82 %). Baltymo gp39 AR sekų identiškumas su kitų fagų vamzdelio baltymais siekė arba buvo mažesnis už 52 % (28 pav.). Deja, remiantis 2021 m. rugsėjo mėn. duomenimis, artimiausi gp39 homologiniai baltymai yra mažai tirti, todėl jų detalūs erdvinių struktūrų modeliai nėra nustatyti. Tuo tarpu AR sekų identiškumas tarp NBD2 gp39 ir detaliai ištirtų sifovirusų vamzdelio baltymų, kurių erdvinių struktūrų modeliai buvo nustatyti kristalografines mikroskopijos metodu, siekė arba buvo mažesnis už 20 % (28 pav.).



28 pav. Filogenetinė NBD2 fago vamzdelio baltymo gp39 homologinio ryšio su kitų fagų vamzdelio baltymais diagrama. Analizė buvo atlikta su *Siphoviridae* ir *Drexlerviridae* šeimoms priklausančių fagų ataugos vamzdelio baltymais. Diagramoje pateikti 7 fagai, su kuriais AR sekų identiškumas tarp gp39 ir fagų vamzdelio baltymų buvo > 50 %. Žvaigždutėmis pažymėti sifovirusai phiCbK, SPP1 ir lambda, kurių vamzdelio baltymų erdvinių struktūrų modeliai buvo nustatyti kristalografines mikroskopijos metodu. Filogenetinis medis buvo sudarytas artimiausių grupių apjungimo būdu (angl. *neighbor-joining*). Mastelis parodo

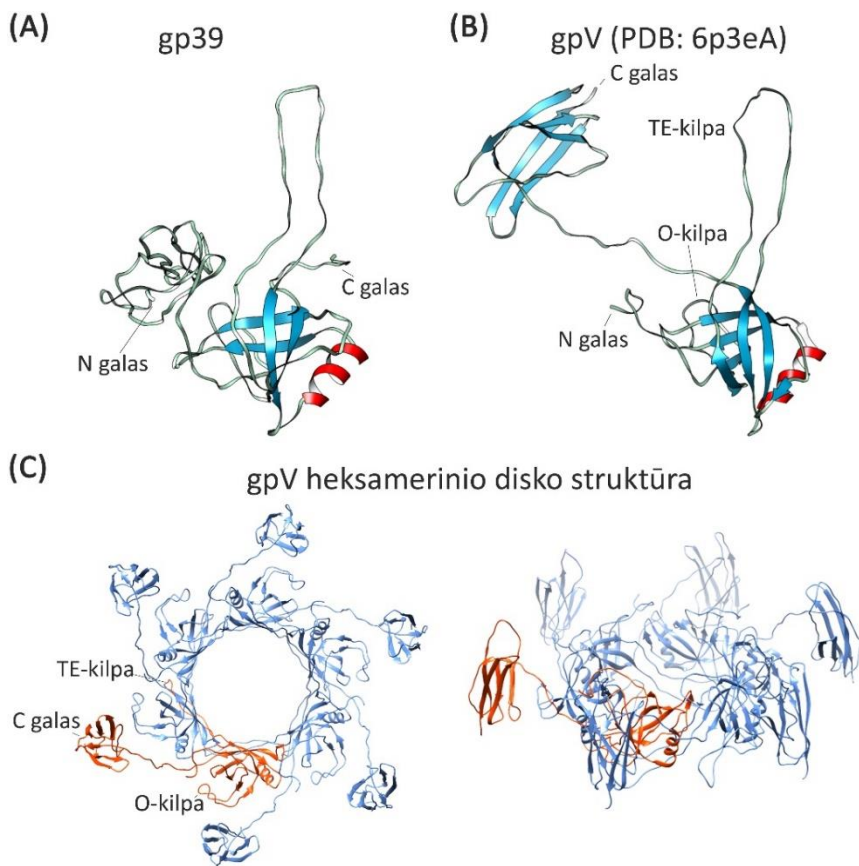
pakeistų AR skaičių, tenkanti vienai pozicijai. Filogenetinė analizė atlikta „Mega v7.0.26“ programine įranga (Kumar *et al.*, 2016).

Baltymo gp39 tretinės struktūros analogai buvo nustatyti naudojant „HHpred“ internetinį įrankį. Baltymo gp39 struktūriniu analogu buvo parinkta fago lambda vamzdelio baltymo gpV N galo 1-155 AR dalis (PDB ID: 2K4Q). Lyginant gp39 ir gpV AR sekas tarpusavyje, baltymo gp39 erdvinis susilankstymas 101-219 AR dalyje atitiko baltymo gpV susilankstymą 37-155 AR dalyje net 99,6 % (įvertis 2,8e-14). Nepaisant nustatyto baltymų gp39 ir gpV erdvinių struktūrų panašumo analizuojamoje 118 AR ilgio dalyje, šiuos baltymus sudarančių AR identiškumas yra tik 19 %.

Baltymo gp39 erdvinės struktūros modelis buvo sumodeliuotas naudojant „I-TASSER“ internetinį įrankį (Zhang, 2008). Sumodeliuoto gp39 erdvinės struktūros modelis buvo lyginamas su PBD esančiais baltymų erdviniais modeliais. Palyginimas parodė, kad fago lambda vamzdelio pilno ilgio baltymas gpV (PDB ID: 6P3E) arba baltymo gpV N galas (PDB ID: 2K4Q) buvo pateikti kaip labiausiai tikėtini gp39 struktūriniai analogai. Lyginant baltymų erdvinės struktūros modelius tarpusavyje, gp39 ir pilno ilgio baltymo gpV (PDB ID: 6P3E) modelių panašumas buvo įvertintas Tm-įverčiu 0,59, o lyginant baltymo gp39 erdvinės struktūros modelį su baltymo gpV N galo (PDB ID: 2K4Q) modeliu, Tm-įvertis buvo 0,44 (galimame intervale (0;1]). Šie rezultatai parodė kad gp39 ir gpV erdvinių struktūrų modelių panašumas nebuvo atsitiktinis (Zhang ir Skolnick, 2004) (29 pav. A, B).

Lyginant sumodeliuoto gp39 ir nustatytos struktūros gpV baltymų erdvinius modelius, gp39 modelyje buvo matomos baltymo gpV N galo domenui būdingos struktūros – keturios β klostės, viena α spirālė bei TE kilpa, tačiau gp39 C gale nebuvo nustatytas Ig-tipo baltymų šeimai būdingas erdvinis susilankstymas. Toks neatitikimas yra galimas, nes į Ig-panašus domeną būdingas ne visiems *Caudovirales* būriui priklausantiems bakteriofagams (Fraser *et al.*, 2006; Linares *et al.*, 2020; Pell *et al.*, 2010).

Neatlikus krioelektroninės mikroskopijos analizės, tikslaus baltymo gp39 erdvinės struktūros modelio bei nanovamzdelių morfologinių savybių nustatyti nepavyks. Tačiau detaliam išanalizuotam gpV formuojamo heksamerinio disko organizacija yra galima gp39 formuojamiems diskams. Campbell su kolegomis nustatė, kad ataugos vamzdelio baltymo gpV monomeras jungiasi su penkiaais gpV baltymais ir suformuoja heksamerinius diskus. Tokie diskai tarpusavyje jungiasi savo plokštumomis ir suformuoja lanksčias sifovirusų ataugas. Susirinkimo metu gpV N gale esančios septynios β klostės ir viena α spirālė atsiduria heksamerinio baltymo viduje, o TE kilpa sąveikauja su greta esančiais diskais (29 pav. C) (Campbell *et al.*, 2020).



29 pav. Baltymų gp39 ir gpV erdviųjų struktūrų modelių nuotrauka. (A) Baltymo gp39 erdvinės struktūros modelio nuotrauka. Žalsva spalva pavaizduota baltymo polipeptidinė grandinė, mėlyna spalva – 4 β klostės, raudona spalva – α spiralė. Gp39 erdvinės struktūros modelis buvo nustatytas naudojant „I-TASSER“ internetinį įrankį. (B) Baltymo gpV erdvinės struktūros modelio nuotrauka. gpV modelis buvo atsisiųstas iš PDB (PDB ID: 6P3E). N galo domeną sudaro 7 β klostės, α spiralė, TE kilpa, O kilpa, o C galo domeną priklauso Ig-tipo baltymų šeimai (pagal Campbell *et al.* (2020)). (C) Baltymo gpV formuojamo heksamerinio disko erdvinės struktūros modelio nuotrauka (modelis atsisiųstas iš PDB (PDB ID: 6P3E)). Baltymų erdvinis susilankstymas pateiktas iš viršaus ir iš šono. Heksamerinį diską formuojantis gpV monomeras pavaizduotas oranžine spalva. Baltymų gp39 ir gpV erdvinės struktūros modeliai buvo vizualizuoti „USCF Chimera v1.12“ programine įranga (Pettersen *et al.*, 2004; Zhang, 2008).

Nors baltymus gp39 ir gpV sudarančių AR identiškumas tik 19 %, tačiau fagų ataugos vamzdelio, ataugos apvalkalo baltymai bei prokariotų į fagų ataugas panašios struktūros (tokios kaip T6SS, R- ir F-tipo piocinai) turi panašų erdvinį susilankstymą net ir esant nedideliui AR sekų identiškumui (Aksyuk *et al.*, 2009; Ge *et al.*, 2015; Pell *et al.*, 2009a; Zheng *et al.*, 2017).

Nustatytas gp39 ir gpV erdvinės struktūros modelių panašumas yra svarbus baltymo gp39 formuojamų nanovamzdelių pritaikymui kuriant nešiklių baltyminių fragmentų eksponavimui. Peptidų ar baltymų prijungimui prie nanostruktūrą formuojančio baltymo dažniausiai yra pasirenkamos baltymo kilpos ar kiti regionai, nukreipti į nanostruktūros išorę ir neformuojantys β klosčių bei α spiralių. Kadangi gp39 ir gpV buvo nustatyti kaip struktūriniai analogai ir žinant, kad gpV TE kilpa yra svarbi sąveikai su kitais gpV baltymais, šiame darbe nebuvo bandoma baltyminių fragmentų įterpimui panaudoti baltymo gp39 kilpos.

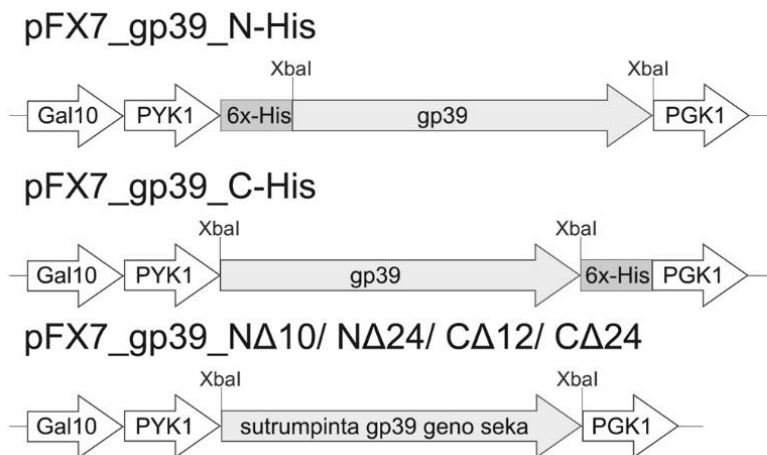
3.5. gp39 N ir C galo aminorūgščių bei prijungto 6x-His peptido įtakos savaiminiam susirinkimui į nanovamzdelius tyrimai

3.5.1. Mielių raiškos vektorių konstravimas

Baltymų gp39_N Δ 10, gp39_N Δ 24, gp39_C Δ 12, gp39_C Δ 24 sintezei *S. cerevisiae* mielėse, buvo konstruojami mielių raiškos vektoriai. Baltymo gp39 variantus su pašalintomis N arba C galo AR koduojančios DNR sekos buvo pagausintos PGR metodu naudojant vektorių pFX7_gp39 kaip matricą ir pradmenis, pateiktus 2 ir 7 lentelėse. Šie pradmenys prie pagausintų DNR sekų 5' ir 3' galo prijungė XbaI RE atpažinimo sekas. Į vektorių pFX7 įterpus XbaI RE hidrolizuotas baltymo gp39 variantus su pašalintomis N arba C galo AR koduojančias sekas, buvo sukonstruoti mielių raiškos vektoriai pFX7_gp39_N Δ 10, pFX7_gp39_N Δ 24, pFX7_gp39_C Δ 12 bei pFX7_gp39_C Δ 24 (30 pav.).

Papildomi mielių raiškos vektoriai buvo konstruojami 6 histidino AR peptido (6x-His) prijungimui prie baltymo gp39 N arba C galo. Tam baltymą gp39 koduojanti DNR seka buvo pagausinta PGR metodu naudojant vektorių pFX7_gp39 kaip matricą. Baltymą gp39 koduojančios DNR sekos įterpimui į vektorių pFX7_N-His, PGR metu buvo naudojami gp39_F ir gp39_R pradmenys, kurie prie gp39 DNR sekos 5' ir 3' galo prijungė XbaI RE atpažinimo sekas. 6x-His peptido prijungimui prie gp39 C galo, PGR metu buvo naudojami gp39_F ir gp39beSTOP_R pradmenys, kurie prie baltymą gp39 koduojančios DNR sekos 5' galo prijungė XbaI RE atpažinimo seką, o nuo 3' galo pašalino „stop“ kodoną (TAA) ir prijungė XbaI RE atpažinimo seką (naudoti oligonukleotidai pateikti 2 ir 7 lentelėse). XbaI RE hidrolizuotas genų sekas įterpus į mielių raiškos vektorius pFX7_N-His ir pFX7_C-His, buvo sukonstruoti vektoriai pFX7_gp39_N-His ir pFX7_gp39_C-His (30 pav.). Į vektorius įterptų genų sekoskaita buvo atlikta VU GMC BTI

Sekvenavimo centre, o gautos sekos išanalizuotos „MEGA v7.0.26“ programine įranga.



30 pav. Mielių raiškos vektorių, koduojančių baltymo gp39 variantus, konstravimo schemas. Mielių raiškos vektorių pFX7_gp39_N-His ir pFX7_gp39_C-His gavimui, į pFX7_N-His bei pFX7_C-His vektorius, tarp promotoriaus Gal10-PYK1 ir terminatoriaus PGK1, buvo įterptos baltymą gp39 koduojančios DNR sekos. Mielių raiškos vektorių pFX7_gp39_NΔ10, pFX7_gp39_NΔ24, pFX7_gp39_CΔ12 bei pFX7_gp39_CΔ24 gavimui, į pFX7 vektorių, tarp promotoriaus ir terminatoriaus sekų, buvo įterptos baltymus gp39_NΔ10, gp39_NΔ24, gp39_CΔ12, gp39_CΔ24 koduojančios DNR sekos. XbaI RE atpažinimo sekos buvo prijungtos prie genų 5' ir 3' galų.

7 lentelė. Mielių raiškos vektorių, koduojančių baltymą gp39 ir baltymo gp39 variantus, apibūdinimas.

Baltymai	DNR sekos pagausinimui naudoti oligonukleotidai	Konstravimui naudoti vektoriai	Sukonstruotų vektorių pavadinimai
Pilno ilgio gp39	gp39_F ir gp39_R	pFX7	pFX7_gp39
gp39_NΔ10	gp39_NΔ10_F ir gp39_R	pFX7	pFX7_gp39_NΔ10
gp39_NΔ24	gp39_NΔ24_F ir gp39_R	pFX7	pFX7_gp39_NΔ24
gp39_N-His	gp39_F ir gp39_R	pFX7_N-His	pFX7_gp39_N-His
gp39_CΔ12	gp39_F ir gp39_CΔ12_R	pFX7	pFX7_gp39_CΔ12
gp39_CΔ24	gp39_F ir gp39_CΔ24_R	pFX7	pFX7_gp39_CΔ24
gp39_C-His	gp39_F ir gp39beSTOP_R	pFX7_C-His	pFX7_gp39_C-His

„Δ“ rodo N arba C galo AR deleciją, o skaičius nurodo pašalintų AR kieki.

3.5.2. Baltymo gp39 variantų sintezė mielėse ir gebėjimo formuoti nanovamzdelius nustatymas

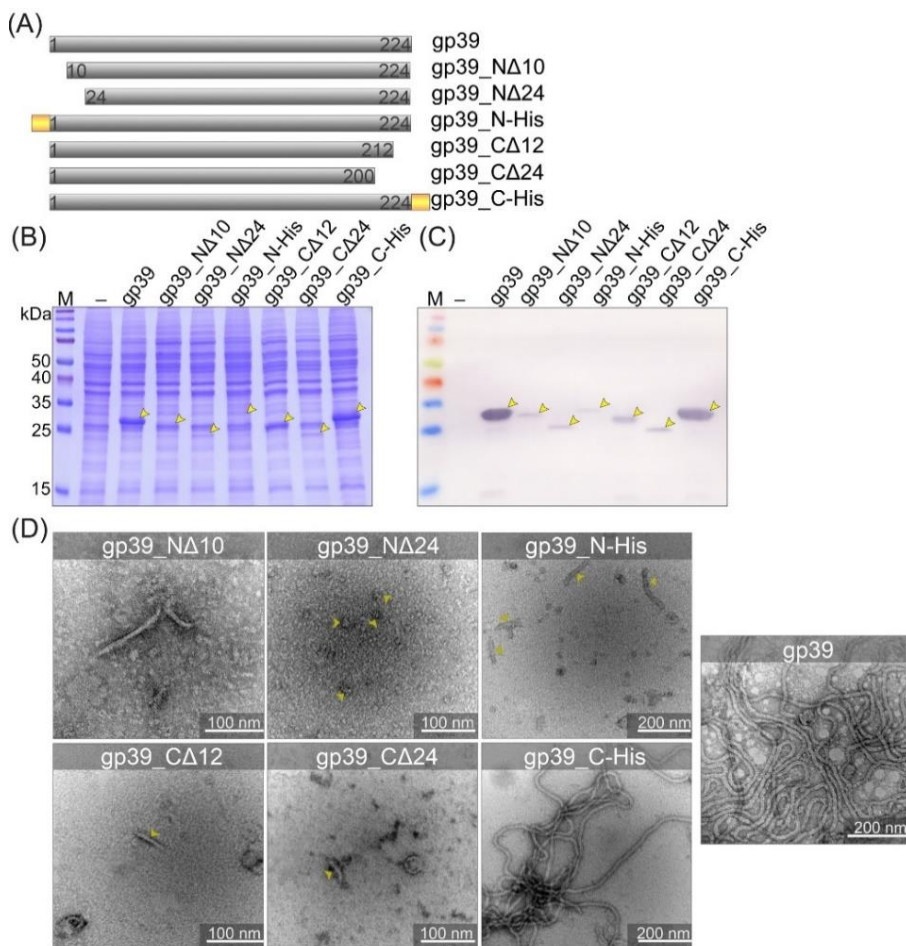
Remiantis 3.4. skyrelyje sumodeliuotu gp39 erdvinės struktūros modeliu, gp39 N galo 1-83 AR bei C galo 209-224 AR neformuoja β klosčių ir α spiralių, kurios galėtų būti svarbios baltymo gp39 savaiminiam susirinkimui. Tam, kad nustatyti gp39 N ir C galuose esančių AR svarbą sintezės efektyvumui mielėse ir gebėjimą formuoti nanovamzdelius, *S. cerevisiae* mielės buvo transformuotos mielių raiškos vektoriais pFX7_gp39_N Δ 10, pFX7_gp39_N Δ 24, pFX7_gp39_C Δ 12 bei pFX7_gp39_C Δ 24, koduojančiais baltymo gp39 variantus su pašalintomis N arba C galo 10 arba 24 AR. Tam, kad nustatyti prie gp39 N arba C galo prijungto 6x-His peptido įtaką baltymų gp39_N-His ir gp39_C-His sintezei mielėse ir jų gebėjimui formuoti nanostruktūras, mielės buvo transformuotos vektoriais pFX7_gp39_N-His ir pFX7_gp39_C-His. Mielėse susintetintų baltymų gp39_N Δ 10, gp39_N Δ 24, gp39_C Δ 12, gp39_C Δ 24 bei gp39_N-His, gp39_C-His sintezės efektyvumas buvo nustatytas NDS-PAGE ir imunoblotuose, o gebėjimas formuoti nanostruktūras buvo įvertintas mikroskopavimo būdu (31 pav.).

Trijų nepriklausomų eksperimentų duomenimis, baltymo gp39 variantai buvo sintetinami skirtingu efektyvumu. Jei baltymas gp39, susintetintas mielių ląstelėse, sudarė ~27 % bendro ląstelės baltymų kiekio, tai 10 AR arba 24 AR pašalinimas nuo gp39 N ar C galo drastiškai sumažino sutrumpintų gp39 baltymų sintezės efektyvumą. Baltymų gp39_N Δ 10, gp39_N Δ 24 bei gp39_C Δ 24 sintezė buvo neefektyvi – jie sudarė nuo ~2 % iki ~8 % visų ląstelės baltymų kiekio. Baltymo gp39_C Δ 12 sintezė buvo šiek tiek efektyvesnė, nes gp39_C Δ 12 sudarė ~15 % bendro ląstelės baltymų kiekio (31 pav. B, C). 6x-His peptido prijungimas prie gp39 N arba C galo taip pat lėmė nevienodą baltymų sintezę mielėse. Nors baltymas gp39_N-His buvo sintetinamas neefektyviai (~2 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio), tačiau 6x-His peptido prijungimas prie gp39 C galo neigiamos įtakos baltymo gp39_C-His sintezės efektyvumui neturėjo: jis buvo sintetinamas panašiu efektyvumu kaip nemodifikuotas gp39 (31 pav. B, C).

Mikroskopuojant išgrynintus baltymų gp39_N Δ 10, gp39_N Δ 24, gp39_C Δ 12 ir gp39_C Δ 24 mėginius pasirodė, kad AR pašalinimas nuo gp39 N ar C galo ypač neigiamai paveikė šių baltymų gebėjimą formuoti nanostruktūras: mėginiuose buvo aptinkamos tik trumpos iki 0,2 μ m ilgio pavienės struktūros arba nestruktūriniai baltymų agregatai (31 pav. D, 8 lentelė). Tai rodo, kad gp39 N ir C galo AR yra svarbios šio baltymo gebėjimui formuoti nanovamzdelius ir jų sintezės efektyvumui mielėse, todėl

toliau su šiais sutrumpintais gp39_N Δ 10, gp39_N Δ 24, gp39_C Δ 12, gp39_C Δ 24 baltymais dirbama nebuvo.

6x-His peptido įtaka gp39 gebėjimui savaime susirinkti į nanovamzdelius priklausė nuo jo prijungimo vietos. Prie gp39 N galo prijungtas 6x-His peptidas turėjo neigiamos įtakos gp39_N-His savaiminiam susirinkimui, kadangi mikroskopavimo metu buvo aptinkamos daugiausia iki 0,1 μ m ilgio bei pavienės iki 0,58 μ m ilgio nanostruktūros. Priešingai, gp39 C galas yra tinkamas modifikacijoms: prijungtas 6x-His peptidas neturėjo neigiamo poveikio gp39_C-His formuojamų nanostruktūrų morfologijai: buvo stebimi tvarkingi, ilgi ir lankstūs nanovamzdeliai, kurie nesiskyrė nuo nemonifikuoto gp39 formuojamų nanovamzdelių (31 pav. D, 8 lentelė).



31 pav. Baltymo gp39 variantų schemas, jų sintezės efektyvumo mielėse ir savaiminio susirinkimo į nanostruktūras tyrimas. (A) Baltymo gp39 variantų schemas. Simbolis „ Δ “ rodo N arba C gale esančių AR deleciją, o skaičius nurodo

pašalintų AR kiekį. Baltymas gp39 ir jo variantai pavaizduoti pilkais stačiakampiais, o 6x-His peptidas – geltonu kvadratu. **(B)** *S. cerevisiae* mielėse susintetintų baltymų sintezės analizė PAA gelyje bei **(C)** jų nustatymas imunobloto metodu naudojant anti-gp39 PAK (paruošti I. Dalgėdienės, VU BTI ILBS). M – baltymų molekulinės masės standartas „Page Ruler™ Unstained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific Baltics); „-“ žymi mielių, transformuotų „tuščiu“ raiškos vektoriumi pFX7, lizatą; kituose takeliuose išfrakcionuoti mielių, sintetinančių baltymo gp39 variantus, lizatai. **(D)** Baltymo gp39 variantų formuojamų nanostruktūrų TEM nuotraukos.

8 lentelė. Baltymo gp39 ir jo variantų formuojamų struktūrų morfologinių savybių aprašymas.

Baltymo variantai	Nanostruktūrų morfologija
Natyvus gp39	Tvarkingi, lankstūs nanovamzdeliai. Ilgiausia struktūra >3,95 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis 0,5-1,3 μm. Skersmuo 12-14 nm.
gp39_NΔ10	Sutrikdytas baltymo savaiminis susirinkimas. Ilgiausia struktūra 0,2 μm ilgio. Skersmuo 9-18 nm.
gp39_NΔ24	Į nanovamzdelius nesusirenka.
gp39_CΔ12	Sutrikdytas baltymo savaiminis susirinkimas. Ilgiausia struktūra 0,2 μm ilgio. Skersmuo 13-21 nm.
gp39_CΔ24	Sutrikdytas baltymo savaiminis susirinkimas. Ilgiausia struktūra 0,1 μm ilgio. Skersmuo 9-16 nm.
gp39_N-His	Sutrikdytas baltymo savaiminis susirinkimas. Ilgiausia struktūra 0,58 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis iki 0,1 μm. Skersmuo 12-14 nm.
gp39_C-His	Tvarkingi, lankstūs nanovamzdeliai. Ilgiausia struktūra >2,2 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis 0,5-1,3 μm. Skersmuo 12-14 nm.

Geltona spalva pažymėti rekombinantiniai baltymai, savime susirenkantys į ilgus ir lanksčius nanovamzdelius.

Baltymo gp39 N arba C galo AR pašalinimas parodė, kad šios baltymo dalys yra svarbios gp39 savaiminiam susirinkimui į nanovamzdelius. Remiantis moksliniais tyrimais, AR pašalinimas iš virusinę nanostruktūrą formuojančio baltymo gali būti dvejopas – vienu atveju, tai gali neigiamai paveikti sutrumpintų baltymų susirinkimą į tvarkingas nanostruktūras (Kalnciema *et al.*, 2011), o kitu atveju, tai leidžia vietoje pašalintų AR prijungti ilgesnius baltyminius fragmentus nesutrikdant baltymų gebėjimo formuoti nanostruktūras (Hassani-Mehraban *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2007). Nors gp39 N ar C galo AR pašalinimas neigiamai paveikė baltymo gebėjimą formuoti nanovamzdelius, tačiau 6x-His peptido prijungimas prie gp39 C galo neturėjo neigiamos įtakos baltymų sintezės efektyvumui mielėse ir

susirinkimui į nanostruktūras. Tuo baltymas gp39 skyrėsi nuo homologinio fago lambda baltymo gpV. Baltymo gpV N galas taip pat buvo svarbus susirinkimui, tačiau 80 AR pašalinimas iš gpV C galo neturėjo neigiamo poveikio baltymo susirinkimui į ataugas, o pašalintos gpV C galo AR galėjo būti pakeistos prijungiant baltyminius fragmentus, eksponuojamus ant fago ataugų (Dunn, 1995; Katsura, 1981; Maruyama *et al.*, 1994). C galo modifikacijų skirtingas poveikis baltymų gp39 ir gpV susirinkimui gali būti paaiškintas jų C galo ypatumais: gpV C gale turi į Ig-panašų, į ataugos išorę eksponuojamą baltymo domeną (Campbell *et al.*, 2020), o gp39, panašu, šio dekoracinio domeno neturi (žr. 3.4. skyrelį).

Kadangi prie gp39 C galo prijungtas 6x-His peptidas neturėjo neigiamos įtakos nanovamzdelių susiformavimui, toliau buvo tiriamos gp39 C galo panaudojimo kaip potencialios vietos baltyminių fragmentų prijungimui bei jų eksponavimui ant nanovamzdelių galimybės.

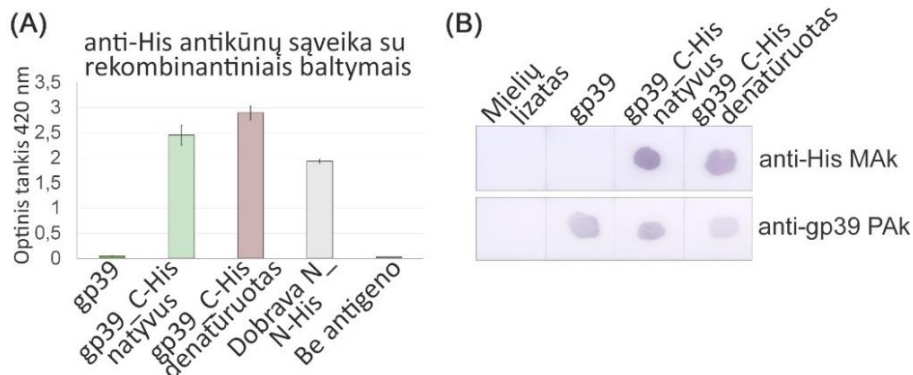
3.6. Prie gp39 C galo prijungto 6x-His peptido lokalizacijos nustatymas nanovamzdelyje

Virusinės nanostruktūros turi du paviršius ant kurių gali būti eksponuojami prijungti baltyminiai fragmentai: išorinis paviršius arba vidinė erdmė. Prie gp39 C galo prijungto 6x-His peptido lokalizacijos nustatymui nanovamzdelyje, mielėse buvo susintetintas baltymas gp39_C-His. Dalis natyviomis sąlygomis išgryninto baltymo gp39_C-His buvo denatūruojama tris dienas inkubuojant 8 M GuHCl buferiniame tirpale. Baltymo gp39_C-His denatūracija buvo patvirtinta TEM analizės metu neaptikus nanovamzdelių (duomenys nepateikti). Natyviomis sąlygomis išgryninti baltymai gp39 ir gp39_C-His bei denatūruotas baltymas gp39_C-His buvo analizuojami netiesioginės imunofermentinės analizės (IFA) bei taškinio imunobloto metodais (32 pav.).

Netiesioginės IFA metodu su anti-His monokloniniais antikūnais (MAk) natyvus ir denatūruotas baltymas gp39_C-His sąveikavo panašiu efektyvumu (32 pav. A). *S. cerevisiae* mielėse susintetintas ir giminingumo (afininės) chromatografijos būdu denatūruojančiomis sąlygomis išgrynintas Dobrava viruso N baltymas, turintis prie N galo prijungtą 6x-His peptidą (Dobrava N_N-His), buvo naudotas kaip kontrolė (Razanskiene *et al.*, 2004) sąveikai su anti-His MAk tirti. IFA metodo specifiskumą patvirtino sąveikos nebuvimas tarp nmodifikuoto baltymo gp39 ir anti-His MAk (32 pav. A).

Sąveika tarp anti-His MAk ir natyviomis sąlygomis išgrynintų baltymų gp39, gp39_C-His bei denatūruoto baltymo gp39_C-His buvo tiriami taškinio imunobloto metodu. Gauti duomenys atitiko IFA rezultatus – natyvus ir

denatūruotas gp39_C-His sąveikavo su anti-His MAK. Taškinio imunobloto metodo specifiškumą patvirtino sąveikos nebuvimas tarp baltymo gp39 su anti-His MAK bei tarp lizato baltymų su anti-His MAK bei anti-gp39 PAK (32 pav. B).



32 pav. 6x-His peptido lokalizacijos nustatymo nanovamzdelyje tyrimas.

(A) Natyvių ir denatūruotų rekombinantinių baltymų sąveikos su anti-His MAK nustatymas IFA metodu bei (B) sąveikos su anti-His MAK ir anti-gp39 PAK nustatymas taškinio imunobloto metodu. Išryškėję „taškai“ rodo sąveiką tarp membranoje imobilizuoto baltymo ir tiriamų antikūnų.

Prie virusinių nanostruktūrų prijungti peptidai ar baltymai gali būti eksponuojami ant struktūros paviršiaus arba nukreipti į vidinę ertmę (Belval *et al.*, 2016; Kovacs *et al.*, 2007). Norint pritaikyti gp39 formuojamus nanovamzdelius kaip nešiklį prijungtų peptidų ar baltymų eksponavimui, buvo būtina išsiaiškinti prie gp39 C galo prijungto 6x-His peptido lokalizaciją nanostruktūroje. Kadangi natyvus baltymas gp39_C-His formavo nanovamzdelius, kuriose 6x-His peptidas galėjo būti „paslepiamas“ struktūros viduje, o denatūruotas baltymas gp39_C-His nanovamzdelių neformavo, todėl imunologiniais metodais buvo analizuojama prie natyvaus ir denatūruoto gp39 C galo prijungto 6x-His peptido sąveika su anti-His MAK. Pasirodė, kad su anti-His MAK panašiu efektyvumu reagoavo tiek natyvus, tiek denatūruotas gp39_C-His baltymai, todėl galima daryti prielaidą, kad prie gp39 C galo prijungtas 6x-His peptidas yra eksponuojamas ant nanovamzdelių paviršiaus. Jeigu 6x-His peptidas būtų „paslepiamas“ nanovamzdelio vidinėje ertmėje, IFA metodu tirtos sąveikos intensyvumas tarp natyvaus gp39_C-His ir anti-His MAK būtų kur kas silpnesnis nei sąveika tarp denatūruoto gp39_C-His ir anti-His MAK.

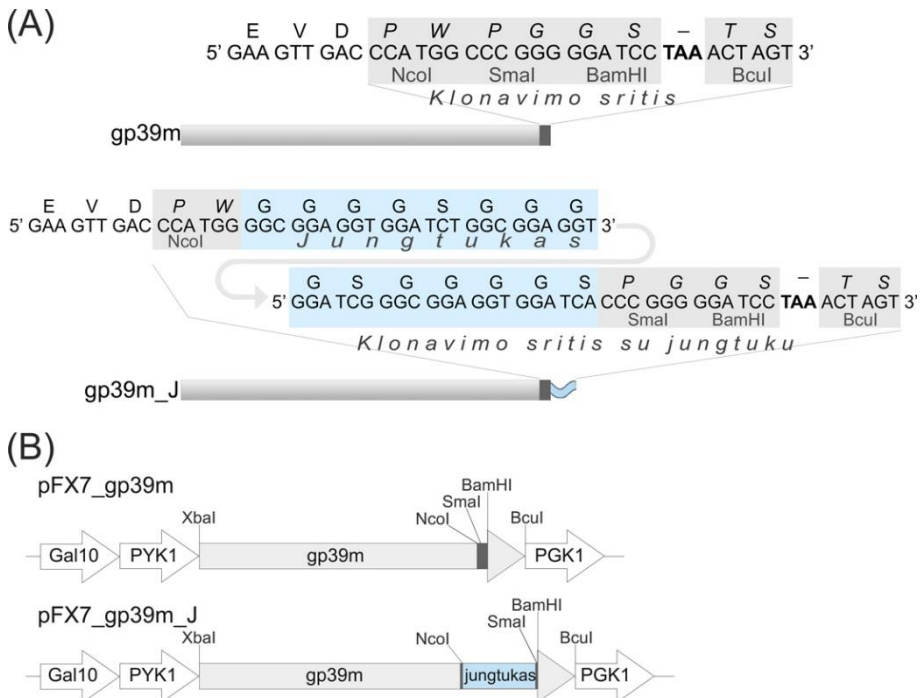
3.7. Baltymų gp39m ir gp39m_J sintezės mielėse efektyvumo ir jų gebėjimo susirinkti į nanostruktūras tyrimas

3.7.1. Vektorių, koduojančių gp39m ir gp39m_J baltymus, konstravimas

Buvo konstruojamas mielių raiškos vektorius, kuriame prie baltymą gp39 koduojančios geno sekos 3' galo būtų prijungta klonavimo sritis, sudaryta iš NcoI, SmaI ir BamHI RE atpažinimo sekų. Pirmiausia, PGR metodu, naudojant pFX7_gp39 vektorių kaip matricą ir pradmenis gp39_F ir gp39m_R (2 lentelė), buvo pagausintas gp39 geno fragmentas, prie kurio 3' galo buvo prijungta klonavimo sritis. Modifikuotas geno fragmentas buvo pavadintas gp39m ir po hidrolizacijos XbaI ir BcuI RE, buvo įterptas į vektorių pFX7. Sukonstruotas mielių raiškos vektorius, koduojantis baltymą gp39m, buvo pavadintas pFX7_gp39m, (33 pav., 9 lentelė).

Papildomai buvo sukonstruotas dar vienas mielių raiškos vektorius, kuriame į vektoriaus pFX7_gp39m klonavimo sritį buvo įterpta 15 AR ilgio jungtukinį peptidą koduojanti seka. Jungtukinį peptidą koduojantys oligonukleotidiniai pradmenys buvo susintetinti chemiškai (Invitrogen) ir hibridizuoti (2 lentelė). Prie oligomerų 3' galo buvo prijungta NcoI RE atpažinimo seka, o prie 5' galo buvo prijungtos SmaI ir BamHI RE atpažinimo sekos. Į NcoI ir BamHI RE linearizuotą vektorių pFX7_gp39m buvo įterpta tomis pačiomis RE hidrolizuota jungtukinį peptidą koduojanti DNR seka. Sukonstruotas mielių raiškos vektorius pFX7_gp39m_J⁹ kodavo baltymą gp39m su C gale prijungtu jungtukiniu peptidu (33 pav., 9 lentelė). Į vektorius pFX7_gp39m ir pFX7_gp39m_J įterptų genų sekoskaita buvo atlikta VU GMC BTI Sekvenavimo centre, o gautos sekos išanalizuotos „MEGA v7.0.26“ programine įranga.

⁹Jungtukinis peptidas arba jungtukinį peptidą koduojanti DNR seka baltymų ir plazmidžių pavadinimuose bus žymimi „J“ raide.



33 pav. Klonavimo sričių bei baltymus gp39m ir gp39m_J koduojančių sekų schemas. (A) Prie gp39 sekos 3' galo prijungtų klonavimo sričių schemas. Baltymą gp39 koduojanti DNR seka pavaizduota šviesiai pilku stačiakampiu, o klonavimo sritį sudaranti seka – tamsiai pilku stačiakampiu. Jungtuką koduojanti seka pavaizduota žydra bangele. gp39m klonavimo sritį sudaro NcoI, SmaI ir BamHI RE atpažinimo sekos, o gp39m_J klonavimo sritį sudaro NcoI, SmaI ir BamHI RE atpažinimo sekos ir įterpta jungtukinį peptidą koduojanti seka. **(B)** Baltymus gp39m ir gp39m_J koduojančių DNR sekų schemas. Gal10-PYK1 – promotorius, PGK1 – terminatorius. Jungtuką koduojanti seka pavaizduota žydrų stačiakampiu, klonavimo sritys pažymėtos tamsiai pilkais stačiakampiais.

9 lentelė. Mielių raiškos vektorių, koduojančių baltymus gp39m ir gp39m_J, aprašymas.

Baltymai	DNR sekos pagausinimui naudoti oligonukleotidai	Konstravimui naudoti raiškos vektoriai	Sukonstruotų vektorių pavadinimai
gp39m	gp39_F ir gp39m_R	pFX7	pFX7_gp39m
gp39m_J	GGGGS_F ir GGGGS_R	pFX7_gp39m	pFX7_gp39m_J

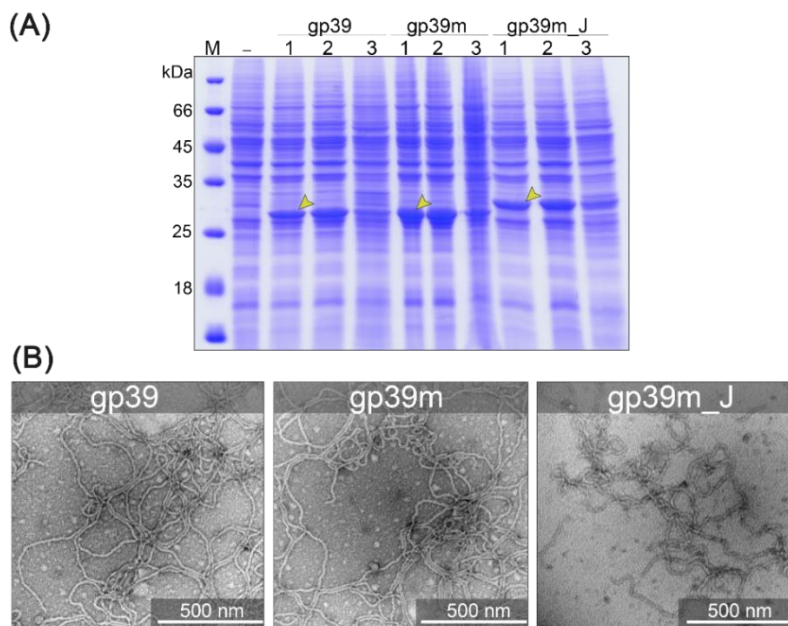
Abu sukonstruoti mielių raiškos vektoriai skirti chimerinių baltymų, sudarytų iš gp39m ir prie jo C galo prijungtų baltyminių fragmentų, sintezei mielėse. Kadangi neaišku kaip prie nanovamzdelius formuojančio baltymo gp39 prijungiamos AR paveiks baltymų erdvinį susilankstymą, gebėjimą

susirinkti į nanostruktūras ir jų morfologiją, todėl buvo sukonstruoti du vektoriai. Jų skirtumas tas, kad pFX7_gp39m bus naudojamas chimerinių baltymų su tiesiogiai prie gp39 C galo prijungtais baltyminių fragmentais sintezei, o pFX7_gp39m_J – chimerinių baltymų, kuriuose baltyminiai fragmentai prie gp39 C galo bus prijungti per jungtukinį peptidą, sintezei. Jungtukinį peptidą sudaro 15 AR pasikartojančių glicino ir serino AR [GGGS]_{3x}, todėl, remiantis kitų autorių tyrimais (Pavoni *et al.*, 2013; Urakami *et al.*, 2017), jungtukinis peptidas turėtų sumažinti prijungiamų baltyminių fragmentų poveikį gp39m erdviniam susilankstymui ir turėti mažesnę neigiamą įtaką chimerinių baltymų susirinkimui į nanostruktūras.

3.7.2. Baltymų gp39m ir gp39m_J sintezės efektyvumo mielėse ir savaiminio susirinkimo į nanostruktūras tyrimai

S. cerevisiae mielių AH22-214 kamieno ląstelės buvo transformuotos raiškos vektoriais pFX7_gp39, pFX7_gp39m ir gp39m_J. Mielėms susintetinus baltymus gp39, gp39m ir gp39m_J, mielių ląstelės buvo surenkamos ir ardamos mechaniniu būdu. Tikslinių baltymų sintezės efektyvumas mielių ląstelėse buvo įvertintas NDS-PAGE analizuojant mielių lizato mėginius (34 pav. A). Dviejų nepriklausomų eksperimentų duomenimis, *S. cerevisiae* mielėse baltymai gp39, gp39m ir gp39m_J buvo sintetinami panašiu efektyvumu. Be to, atlikus mielių lizato mėginių centrifugavimą, didžioji baltymų gp39m ir gp39m_J dalis buvo aptinkama mielių supernatante, todėl šie baltymai pasižymėjo panašiomis tirpumo savybėmis kaip nmodifikuotas baltymas gp39 (34 pav.).

Išgrynintų baltymų gp39, gp39m ir gp39m_J mėginių analizė TEM parodė, kad baltymai gp39m ir gp39m_J formavo nanovamzdelius, panašius į nmodifikuoto gp39 formuojamas nanostruktūras: jie buvo ilgi, lankstūs, jų paviršius buvo tvarkingas ir neturėjo įtrūkimų (34 pav. B; 10 lentelė).



34 pav. Baltymų gp39, gp39m ir gp39m_J sintezės efektyvumo mielėse bei savaiminio susirinkimo tyrimas. (A) Mielėse susintetintų rekombinantinių baltymų sintezės analizė PAA gelyje. M – baltymų molekulinės masės standartas „Page Ruler™ Unstained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific Baltics); „-“ žymi mielių, transformuotų „tuščiu“ raiškos vektoriumi pFX7, lizata; toliau pateikiami mielių, sintetinančių rekombinantinius baltymus, 1 – lizatai (rekombinantiniai baltymai pažymėti geltonomis rodyklėmis), 2 – supernatantai, 3 – nuosėdos. (B) Baltymų gp39, gp39m ir gp39m_J formuojamų nanovamzdelių TEM nuotraukos.

10 lentelė. Baltymų gp39m ir gp39m_J formuojamų nanovamzdelių esminės charakteristikos.

Baltymų variantai	Nanovamzdelių morfologija
gp39m	Tvarkingi, lankstūs nanovamzdeliai. Ilgiausia struktūra >2,2 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis 0,5-1,3 μm. Skersmuo 12-14 nm.
gp39m_J	Tvarkingi, lankstūs nanovamzdeliai. Ilgiausia struktūra >2,2 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis 0,5-1,1 μm. Skersmuo 12-14 nm.

Nors mielių raiškos vektoriuose pFX7_39m ir pFX7_39m_J dėl klonavimo srities arba klonavimo srities su jungtukinį peptidą koduojančia DNR seka prijungimo prie gp39 koduojančios sekos 3' galo, prie baltymo gp39 buvo prijungtos papildomos 6 AR (PWPGGS) arba 21 AR (PW[GGGGS]_{3x}PGGS), tačiau tai neturėjo neigiamos įtakos baltymų gp39m ir gp39m_J sintezės efektyvumui mielėse ir jų gebėjimui susirinkti į nanovamzdelius. Todėl mielių

raiškos vektoriai pFX7_39m ir pFX7_39m_J toliau buvo naudojami baltymų fragmentus koduojančių DNR sekų įterpimui ir chimerinių baltymų sintezei mielėse.

3.8. Chimerinių baltymų sintezės efektyvumo mielėse ir savaiminio susirinkimo tyrimas

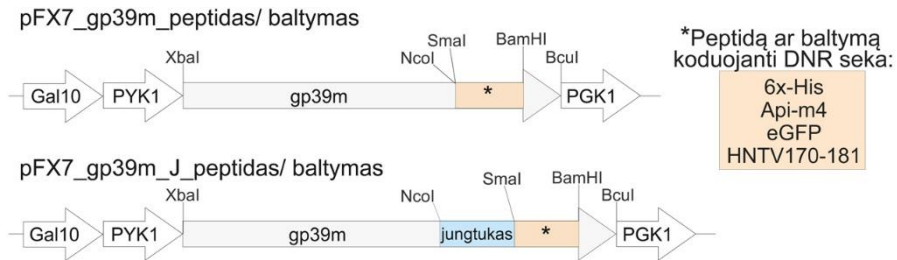
Nėra universalios virusinės nanostruktūros, kuri galėtų eksponuoti visus prie jos prijungiamus baltyminius fragmentus. Kadangi virusinės nanostruktūros tarpusavyje skiriasi jas formuojančių baltymų skaičiumi, jų fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis (Chen *et al.*, 2021; Hassani-Mehraban *et al.*, 2015; Porta *et al.*, 2003), todėl reikėjo nustatyti baltyminių fragmentų prijungimo prie gp39 C galo įtaką chimerinių baltymų sintezės efektyvumui ir gebėjimui formuoti nanostruktūras. Baltymo gp39 formuojamų nanovamzdelių pritaikymas kuriant baltyminių fragmentų nešiklį buvo tiriamas pasirinkus skirtingomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis pasižyminčius modelinius peptidus 6x-His, Api-m4, HNTV170-181 bei baltymą eGFP.

3.8.1. Mielių raiškos vektorių konstravimas

Vektoriai, koduojantys chimerinius baltymus, buvo konstruojami į mielių raiškos vektoriaus pFX7_gp39m ir pFX7_gp39m_J baltymą gp39 koduojančios sekos 3' gale esančią klonavimo sritį įterpiant 6x-His peptidą, bičių *Apis mellifera* alergeno komponentą Api-m4, *Hantaan* viruso N baltymo peptidą, esantį tarp 170-181 AR regiono (HNTV170-181), bei žaliai fluorescuojantį baltymą (eGFP) koduojančias sekas.

6x-His peptidą koduojantys oligonukleotidiniai pradmenys buvo susintetinti chemiškai (Invitrogen) ir hibridizuoti. Api-m4, HNTV170-181 peptidus bei eGFP baltymą koduojantys DNR fragmentai buvo pagausinti PGR metodu naudojant Api-m4 alergena, *Hantaan* viruso N baltymą ir eGFP baltymą koduojančias plazmidės kaip matricas (nepublikuoti duomenys; Gedvilaite *et al.*, 2006; Razanskiene *et al.*, 2004). Prie hibridizuotų oligomerų arba prie PGR metodu pagausintų DNR fragmentų 3' galo buvo įterpta SmaI RE atpažinimo seka, o prie šių fragmentų 5' galo buvo įterpta BamHI RE atpažinimo seka (2 lentelė). Dėl to SmaI ir BamHI RE hidrolizuoti DNR fragmentai buvo įterpti į tomis pačiomis RE hidrolizuotus vektorius pFX7_gp39m ir pFX7_gp39m_J. Iš viso buvo sukonstruoti 8 mielių raiškos vektoriai (11 lentelė), iš kurių 4 vektoriai kodavo chimerinius baltymus be jungtukinio peptido (gp39m_His, gp39m_Api-m4, gp39m_eGFP,

gp39m_HNTV¹⁰), o kiti 4 vektoriai kodavo chimerinius baltymus su jungtukiniu peptidu (gp39m_J_His, gp39m_J_Api-m4, gp39m_J_eGFP, gp39m_J_HNTV) (35 pav.). Sukonstruotų mielių raiškos vektorių sekoskaita buvo atlikta VU GMC BTI Sekvenavimo centre, o gautos sekos išanalizuotos „MEGA v7.0.26“ programine įranga.



35 pav. Chimerinius baltymus koduojančių sekų schemas. Prie gp39m ir gp39m_J DNR sekų 3' galo buvo įterptos 6x-His, Api-m4, HNTV170-181 peptidus ar eGFP baltymą koduojančios DNR sekos (pažymėtos oranžiniu stačiakampiu). Jungtukinį peptidą koduojanti seka pavaizduota žydrų stačiakampiu. Gal10-PYK1 – pFX7 vektoriaus promotorius, PGK1 – terminatorius.

11 lentelė. Mielių raiškos vektorių, koduojančių chimerinius baltymus, aprašymas.

Baltymai	DNR sekos pagausinimui naudoti oligonukleotidai	Konstravimui naudoti raiškos vektoriai	Sukonstruotų vektorių pavadinimai
gp39m_Api-m4 gp39m_J_Api-m4	Api-m4_F Api-m4_R		pFX7_gp39m_Api-m4 pFX7_gp39m_J_Api-m4
gp39m_eGFP gp39m_J_eGFP	eGFP_F eGFP_R	pFX7_gp39m pFX7_gp39m_J	pFX7_gp39m_eGFP pFX7_gp39m_J_eGFP
gp39m_His gp39m_J_His	6His_F 6His_R		pFX7_gp39m_His pFX7_gp39m_J_His
gp39m_HNTV gp39m_J_HNTV	HNTV170_F HNTV181_R		pFX7_gp39m_HNTV pFX7_gp39m_J_HNTV

3.8.2. Teorinis peptidų ir baltymų fizikinių ir cheminių savybių įvertinimas

Tam, kad būtų galima susieti baltyminių fragmentų savybes su jų įtaka chimerinių baltymų sintezės efektyvumui mielėse bei susirinkimui į

¹⁰HNTV170-181 peptidas arba šį peptidą koduojanti DNR seka baltymų ir plazmidžių pavadinimuose bus žymimi HNTV.

nanovamzdelius, buvo atlikta bioinformatinė analizė. Jos metu nustatytos peptidų 6x-His, Api-m4, HNTV170-181 ir baltymų eGFP bei gp39 teorinės hidrofiliinės ir hidrofobinės savybės, izoelektriniai taškai (pI), įvertinta peptidų ir baltymo prijungimo prie gp39 įtaka chimerinių baltymų krūvio pokyčiui. Kadangi prie gp39 C galo buvo nuspręsta prijungti modelinį eGFP baltymą, buvo atlikta gp39 ir eGFP baltymų erdvinių struktūrų vizualizacija.

Nemodifikuotą baltymą gp39 sudaro 224 AR, o 6 AR ilgio 6x-His peptidas buvo trumpiausias iš pasirinktų sekų. Dvigubai už jį ilgesnis buvo 12 AR ilgio HNTV170-181 peptidas, o Api-m4 peptidą sudaro 26 AR Ilgiausią pasirinktą seką sudarė 238 AR ilgio baltymas eGFP, kuris sudarė 106,2 % nemodifikuoto gp39 ilgio (12 lentelė).

Peptidų ir baltymų teorinės hidrofiliinės ir hidrofobinės savybės buvo nustatytos internetiniu įrankiu „ExPASy ProtParam“, remiantis Kyte ir Doolittle (1982) pasiūlytomis hidropatiškumo indekso reikšmėmis (GRAVY)¹¹. Baltymą gp39 sudaro 40,6 % hidrofobinių AR, o GRAVY indeksas -0,16. Vienintelį 6x-His peptidą sudaro išimtinai hidrofiliinės AR, kurių GRAVY indeksas -3,2. Labiau hidrofobiškas buvo baltymas eGFP, sudarytas iš 37 % hidrofobinių AR ir turintis GRAVY indeksą -0,48. Dar hidrofobiškesnis buvo HNTV170-181 peptidas, sudarytas iš 42 % hidrofobinių AR ir turintis GRAVY indeksą -0,28. Api-m4 peptidą sudarančių hidrofobinių AR skaičius buvo didžiausias – jį sudaro 50 % hidrofobinių AR, kurio GRAVY indeksas 0,27 (12 lentelė).

Baltymų ir baltyminių fragmentų teorinis pI¹² buvo nustatytas internetiniu įrankiu „Protein Calculator v3.4“. Peptidų ir baltymų teorinės pI reikšmės kito nuo 4,88 iki 12,06. Nuo baltymo gp39 teorinės pI reikšmės (4,88) beveik nesiskyrė baltymo eGFP pI reikšmė (5,95). Didžiausias pI reikšmes turėjo peptidai HNTV170-181 (pI 10,28) ir Api-m4 (pI 12,06), o tai yra ~1,8 ir ~2 kartus didesnės reikšmės nei baltymo gp39 (12 lentelė). Chimerinių baltymų teorinės pI ir krūvio reikšmės buvo paskaičiuotos tirpalo pH esant 7,5 ir jos priklausė nuo prijungtų baltyminių fragmentų ilgio ir juos sudarančių AR sekos. 6x-His peptido prijungimas prie gp39m ir gp39m_J turėjo mažiausią įtaką chimerinių gp39m_His ir gp39m_J_His teorinio pI ir krūvio pokyčiui – pI vietoje 4,88 tapo 5,3, o krūvis vietoje -8 tapo -7,8. Nors

¹¹Hidropatiškumo indeksas (GRAVY) (reikšmės (-4,5; 4,5)) parodo peptido ar baltymo hidrofiliines/hidrofobines savybes. Kuo indeksas neigiamesnis, tuo daugiau hidrofiliinių AR sudaro seką ir atvirkščiai, kuo indeksas teigiamesnis, tuo daugiau hidrofobinių AR sudaro seką.

¹²Izoelektrinio taško reikšmė nurodo pH vertę, kuriai esant tiriamas baltymas neturi elektrinio krūvio. Jeigu tirpalo pH < pI, baltymas turės teigiamą krūvį, o esant tirpalo pH > pI reikšmei, baltymas turės neigiamą krūvį.

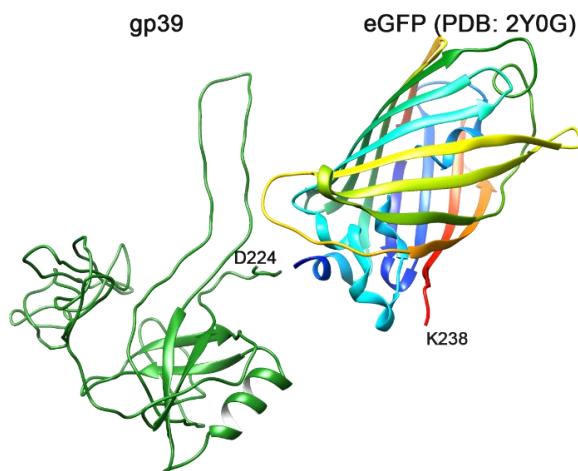
HNTV170-181 peptido prijungimas prie gp39m ir gp39m_J chimerinių gp39m_HNTV ir gp39m_J_HNTV pI reikšmės beveik nepakeitė (pI vietoje 4,88 tapo 5,3), tačiau baltymų krūvis vietoje -8 sumažėjo iki -5,3. Api-m4 peptido prijungimas prie gp39m ir gp39m_J dar labiau pakeitė chimerinių gp39m_Api-m4 ir gp39m_J_Api-m4 krūvio reikšmės (vietoje -8 tapo -3,4), tačiau beveik nepakeitė pI reikšmių (pI vietoje 4,88 tapo 5,5). Nors eGFP prijungimas prie gp39m ir gp39m_J labiausiai pakeitė chimerinių baltymų gp39m_eGFP ir gp39m_J_eGFP krūvį (krūvis vietoje -8 tapo -15,8), tačiau pI reikšmės beveik nepasikeitė (pI vietoje 4,88 tapo 5,32) (12 lentelė).

12 lentelė. Baltymų ir peptidų esminės charakteristikos.

Baltymo/ peptido pavadinimas	AR seka	AR skaičius	GRAVY indeksas, hidrofobinių AR skaičius (%)	pI vertė	Chimerinio baltymo pI/ krūvis
gp39	NCBI: YP_009284663	224	-0,16 (40,6)	4,88	-/ -8
Api-m4	GIGAVLKVLTTGLPA LISWIKRKRQQ	26	0,27 (50)	12,06	5,5/ -3,4
eGFP	VSKGEELFTGVVPIL VELDGDVNGHKFSVS GEGEGDATYGKLTILK FICTTGKLPVWPPTL VTTLTYGVQCFSRYP DHMKQHDFFKSAMPE GYVQERTIFFKDDGN YKTRAEVKFEGDTLV NRIELKGIDFKEDGN ILGHKLEYNYNSHNV YIMADKQKNGIKVNF KIRHNIEDGSVQLAD HYQQNTPIGDGPVLL PDNHYLSTQSALSKD PNEKRDHMLLEFVT AAGITLGMDELYK	238	-0,48 (37)	5,95	5,32/ -15,8
6x-His	HHHHHH	6	-3,2 (0)	7,75	5,57/ -7,8
HNTV170 -181	GIRKPKHLYVSL	12	-0,28 (42)	10,28	5,3/ -5,3

Kuo GRAVY indeksas neigiamesnis, tuo daugiau hidrofiliųjų AR sudaro seką ir *vice versa*. Chimerinius baltymus sudarė gp39 ir prie jo prijungti peptidai 6x-His, Api-m4, HNTV170-181 arba baltymas eGFP.

Baltymo gp39 ir prie jo C galo prijungiamo eGFP erdvinių modelių struktūrų vizualizavimui buvo naudotas 3.4. skyrelyje nustatytas gp39 erdvinės struktūros modelis, o eGFP erdvinės struktūros modelis buvo atsisiųstas iš PDB (PDB: 2Y0G). Dviejų baltymų erdvinių struktūrų modeliai buvo sugretinti ir vizualizuoti naudojant „Chimera v1.12“ programinę įrangą. Palyginus gp39 ir eGFP erdvinės struktūros modelius tarpusavyje, eGFP formavo kompaktišką, tačiau iš 11 β klosčių sudarytą statinės struktūrą (36 pav.). Iš daug β klosčių sudaryti baltyminiai fragmentai dažniausiai neigiamai paveikia virusinių nanostruktūrų formavimąsi (Brown *et al.*, 2009; Frieze *et al.*, 2016; Karpenko *et al.*, 2000), todėl teorinė analizė rodo, kad prie gp39 prijungtas eGFP baltymas gali trukdyti gp39 erdviniam susilakstymui, o tai gali neigiamai paveikti chimerinio baltymo gp39m_eGFP gebėjimą formuoti nanovamzdelius.



36 pav. Baltymo gp39 ir prie jo C galo sugretinto baltymo eGFP erdvinių struktūrų modelių nuotrauka. Baltymo gp39 erdvinės struktūros modelis pavaizduotas žalia spalva, paveikslėlyje pavaizduota paskutinė gp39 C galą sudaranti AR (D224). Baltymas eGFP formuoja iš β klosčių sudarytą statinės struktūrą. eGFP modelis buvo atsisiųstas iš PDB (PDB: 2Y0G). Baltymų erdvinės struktūros modelių vizualizavimas atliktas „UCSF Chimera v1.12“ (Pettersen *et al.*, 2004; Zhang, 2008).

3.8.3. Chimerinių baltymų su prijungtais modeliniais peptidais ir eGFP baltymu sintezės efektyvumo mielėse bei gebėjimo susirinkti į nanostruktūras nustatymas

Nors baltymai gp39m ir gp39m_J su C gale papildomai prijungtomis 6 AR arba 21 AR bei 3.5.2 skyrelyje charakterizuotas baltymas gp39_C-His pagal sintezės efektyvumą mielėse ir gebėjimą susirinkti į nanovamzdelius

tarpusavyje beveik nesiskyrė, reikėjo iširti kaip šias savybes paveiks papildomų peptidų 6x-His, Api-m4, HNTV170-181 ir baltymo eGFP prijungimas. Tam *S. cerevisiae* mielių AH22-214 kamieno ląstelės buvo transformuotos mielių raiškos vektoriais, koduojančiais 8 chimerinius baltymus – 4 chimeriniai baltymai buvo be jungtukinio peptido: gp39m_His, gp39m_Api-m4, gp39m_eGFP ir gp39m_HNTV, o kiti 4 chimeriniai baltymai buvo su jungtukuiniu peptidu: gp39m_J_His, gp39m_J_Api-m4, gp39m_J_eGFP ir gp39m_J_HNTV. Chimerinių baltymų sintezės efektyvumas mielių ląstelėse buvo įvertintas NDS-PAGE bei imunoblotuose (37 pav. A, B).

Dviejų nepriklausomų eksperimentų duomenimis, *S. cerevisiae* mielėse chimerinių baltymų sintezės efektyvumas buvo nevienodas ir, priklausomai nuo prijungto baltyminio fragmento, sudarė nuo ~2 % iki ~35 % visų ląstelės baltymų kiekio. 6x-His peptido prijungimas prie gp39m_His ar gp39m_J C galo beveik nepaveikė chimerinių gp39m_His ir gp39m_J_His sintezės mielėse efektyvumo, jie sudarė ~32-35 % bendro ląstelės baltymų kiekio, panašiai kaip nemodifikuotas gp39. Tuo tarpu Api-m4, eGFP ir HNTV170-181 prijungimas prie gp39m, nepriklausomai nuo jungtukinio peptido buvimo, neigiamai paveikė chimerinių baltymų sintezės efektyvumą. Mielėse sintetinami chimeriniai gp39m_eGFP ir gp39m_J_eGFP sudarė ~8-12 % bendro ląstelės baltymų kiekio, o chimeriniai gp39m_HNTV ir gp39m_J_HNTV sudarė tik ~6-8 % bendro ląstelės baltymų kiekio. Labiausiai chimerinių baltymų sintezę mielėse sumažino Api-m4 peptido prijungimas, nes gp39m_Api-m4 ir gp39m_J_Api-m4 sudarė tik kelis procentus mielių baltymų kiekio lizatų mėginiuose (37 pav. A, B).

Atliktas rekombinantinių ir chimerinių baltymų sintezės efektyvumo tyrimas mielėse yra svarbus tolimesniam gp39 formuojamų nanovamzdelių pritaikymui. Pavyzdžiui, atsižvelgus į chimerinių baltymų sintezės efektyvumą, gali reikėti mažesnio mielių, sintetinančių baltymą gp39, jo variantus gp39m, gp39m_J bei baltymus gp39 su prijungtais 6x-His peptidais (gp39_C-His, gp39m_His ir gp39m_J_His) biomasės kiekio nei mielių, sintetinančių chimerinius gp39 variantus su prijungtais Api-m4, HNTV170-181 peptidais ar eGFP baltymu. Tai yra svarbu, nes dažniausiai efektyviai sintetinami tiksliniai baltymai lemia pigesnes baltymų gamybos sąnaudas – jie yra išgryninami didesniais kiekiais, jiems gauti reikia mažesnio ląstelių mitybinės terpės ir ląstelių biomasės kiekio (Slibinskas *et al.*, 2004). Kita vertus, moksliniuose tyrimuose chimerinių baltymų sintezės efektyvumai bei gryninimo išeigos nėra detalios aptariamoms, nes daugiau dėmesio yra skiriama virusinių baltymų susirinkimui į nanostruktūras, jų modifikavimui prijungiant baltyminius fragmentus bei susiformavusių nanostruktūrų

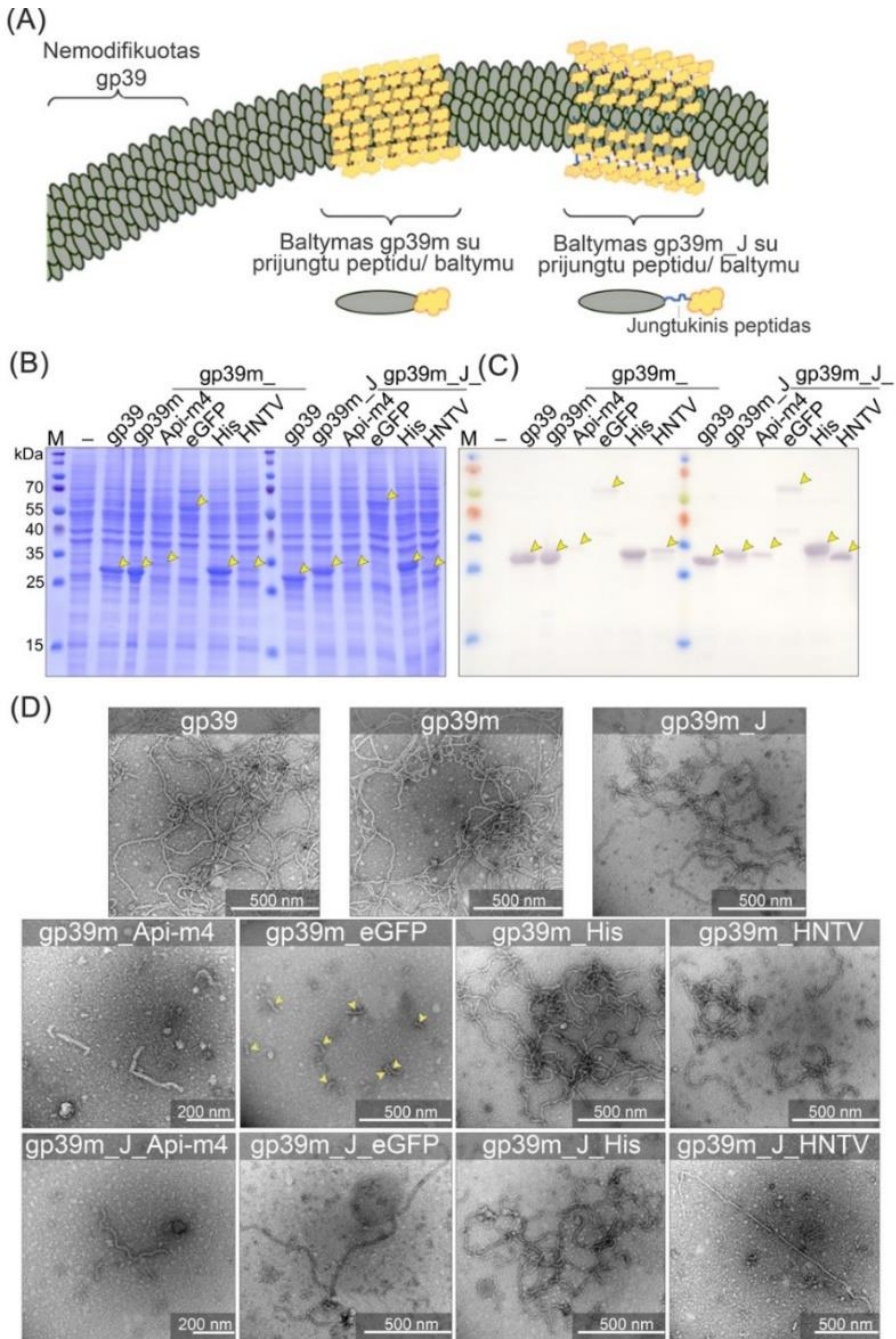
morfologiniams pokyčiams aprašyti (Carignan *et al.*, 2015; Langlois *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018).

Visų išgrynintų chimerinių baltymų mėginiai buvo stebimi TEM tam, kad įvertinti prijungtų 6x-His, Api-m4 ir HNTV170-181 peptidų bei eGFP baltymo įtaką chimerinių baltymų savaiminiam susirinkimui į nanostruktūras (37 pav. C, 13 lentelė). TEM analizė parodė, kad tirti chimeriniai baltymai nevienodai efektyviai formavo nanostruktūras, kurios pasižymėjo skirtinga morfologija. Nepriklausomai nuo jungtukinio peptido buvimo, chimeriniai gp39m_His ir gp39m_J_His formavo ilgus, tvarkingus ir lanksčius nanovamzdelius, kurie beveik nesiskyrė nuo gp39 ir gp39_C-His formuojamų nanostruktūrų. Tai rodo, kad 6x-His peptido prijungimas prie gp39 baltymo C galo be papildomų (gp39_C-His) ar su papildomomis 6 AR (gp39m_His) ar 21 AR (gp39m_J_His) buvo gerai toleruojamas ir nepaveikė prijungto 6x-His peptido eksponavimo ant nanovamzdelių.

Ne visi prie gp39 formuojamų nanovamzdelių prijungti baltyminiai fragmentai buvo gerai toleruojami. HNTV170-181 ir eGFP prijungimas prie gp39m ir gp39m_J neigiamai paveikė chimerinių baltymų gebėjimą formuoti nanostruktūras ir šio poveikio stiprumas priklausė nuo jungtukinio peptido buvimo. Kai HNTV170-181 peptidas buvo prijungtas prie gp39m be jungtukinio peptido, chimerinis baltymas gp39m_J_HNTV formavo ilgesnius nanovamzdelius negu chimerinis gp39m_J_HNTV, kuriame HNTV170-181 peptidas buvo prijungtas per jungtukinį peptidą. Priešingai, jungtukinio peptido panaudojimas chimeriniame gp39m_J_eGFP lėmė ilgesnių nanovamzdelių susiformavimą negu buvo stebima analizuojant chimerinį gp39m_eGFP, kuriame eGFP buvo prijungtas prie gp39m be jungtukinio peptido. Tuo tarpu Api-m4 peptido prijungimas prie gp39m ir gp39m_J, nepriklausomai nuo jungtukinio peptido buvimo, paveikė tiek chimerinių baltymų savaiminį susirinkimą – jie formavo daugiausia tik iki 0,1 μm ilgio nanostruktūras, tiek nanostruktūrų morfologiją. Taigi, chimeriniai baltymai gp39m_Api-m4 ir gp39m_J_Api-m4 pasižymėjo ne tik labai neefektyvia sinteze mielėse, bet ir sutrikdytu gebėjimu susirinkti į nanostruktūras.

Modelinių peptidų ir eGFP baltymo prijungimas gali keisti nanovamzdelių skersmenį. Baltymo eGFP prijungimas prie gp39m ir gp39m_J C galo padidino chimerinių baltymų formuojamų nanovamzdelių skersmenį nuo 12-14 nm iki 14-20 nm. Toks nanostruktūrų skersmens padidėjimas yra tikėtinas (Smith *et al.*, 2006), nes prie ~28 kDa dydžio gp39m ir gp39m_J prijungtas eGFP baltymas yra didelis (26,9 kDa dydžio) ir pastebimas elektroniniu mikroskopu. Priešingai, 6x-His, HNTV170-181 bei Api-m4 peptidų prijungimas prie gp39m ir gp39m_J C galo, chimerinių baltymų formuojamų nanovamzdelių skersmeniui jokios įtakos nepadarė: jis liko

12-14 nm (37 pav. C, 13 lentelė). Panašu, kad šie peptidai buvo per maži, kad turėtų įtakos nanostruktūrų skersmens pokyčiui.



37 pav. Chimerinių baltymų su prijungtais peptidais ar eGFP baltymu schemas, jų sintezės efektyvumo mielėse bei gebėjimo susirinkti į nanostruktūras tyrimas. (A) Prie gp39m ir gp39m_J prijungiamų peptidų ar baltymų eksponavimo ant

nanostruktūros schema. Kairėje pavaizduota nanostruktūra, kurią formuoja nemodifikuotas gp39; centrinėje paveikslėlio dalyje – nanostruktūra, kurią formuoja chimeriniai baltymai be jungtukinio peptido; dešinėje – nanostruktūrą formuojantys chimeriniai baltymai, kuriuose baltyminiai fragmentai prie gp39m prijungti per jungtuką. Baltymai gp39, gp39m ir gp39m_J pavaizduoti pilka spalva, o prijungiami baltyminiai fragmentai – geltona spalva, jungtukas pavaizduotas mėlyna bangele. Paveikslėlis modifikuotas pagal Lee *et al.* (2016). **(B)** Mielėse susintetintų chimerinių baltymų sintezės analizė PAA gelyje bei **(C)** jų nustatymas imunobloto metodu su anti-gp39 PAK. M – baltymų molekulinės masės standartas „Page Ruler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific Baltics); „-“ žymi mielių, transformuotų pFX7 raiškos vektoriumi, lizatą; toliau pateikiami mielių, sintetinančių tikslinius baltymus, lizatai. **(D)** Rekombinantinių ir chimerinių baltymų formuojamų nanovamzdelių TEM nuotraukos.

13 lentelė. Chimerinių baltymų formuojamų nanostruktūrų esminės charakteristikos.

Baltymų variantai	Nanostruktūrų morfologija
gp39m_Api-m4	Sutrikdytas chimerinio baltymo savaiminis susirinkimas. Ilgiausia struktūra 0,4 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis iki 0,1 μm. Skersmuo 12-14 nm.
gp39m_J_Api-m4	Sutrikdytas chimerinio baltymo savaiminis susirinkimas. Ilgiausia struktūra 0,6 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis iki 0,1 μm. Skersmuo 12-14 nm.
gp39m_eGFP	Sutrikdytas chimerinio baltymo savaiminis susirinkimas. Ilgiausia struktūra 0,56 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis iki 0,15 μm. Skersmuo 14-20 nm.
gp39m_J_eGFP	Sutrikdytas chimerinio baltymo savaiminis susirinkimas. Ilgiausia struktūra 1,5 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis iki 0,25 μm. Skersmuo 14-20 nm.
gp39m_His	Tvarkingi, lankstūs nanovamzdeliai. Ilgiausia struktūra >2,2 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis 0,5-1,3 μm. Skersmuo 12-14 nm.
gp39m_J_His	Tvarkingi, lankstūs nanovamzdeliai. Ilgiausia struktūra >2,3 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis 0,5-1,3 μm. Skersmuo 12-14 nm.
gp39m_HNTV	Sutrikdytas chimerinio baltymo savaiminis susirinkimas. Ilgiausia struktūra 1,5 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis 0,2-0,6 μm. Skersmuo 12-14 nm.
gp39m_J_HNTV	Sutrikdytas chimerinio baltymo savaiminis susirinkimas. Ilgiausia struktūra 0,75 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis iki 0,3 μm. Skersmuo 12-14 nm.

Chimeriniai baltymai, formuojantys nanovamzdelius, būdingus nemodifikuotam baltymui gp39, pažymėti geltona spalva. Lentelėje apibendrinti dviejų nepriklausomų eksperimentų duomenys.

3.8.4. Prijungtų modeliųjų peptidų 6x-His, Api-m4, HNTV170-181 ir baltymo eGFP įtakos chimerinių baltymų savybėms aptarimas

Prie gp39m ir gp39m_J buvo prijungiami nuo 6 iki 238 AR ilgio modeliniai peptidai ir eGFP baltymas tam, kad nustatyti kokio dydžio fragmentus galima būtų eksponuoti ant gp39 formuojamų nanovamzdelių. Vis dėlto, tik 6 AR ilgio 6x-His peptido prijungimas neturėjo įtakos chimerinių baltymų gp39m_His ir gp39m_J_His savybėms: jie buvo sintetiniai panašiu efektyvumu kaip nemodifikuotas gp39 ir formavo tvarkingus, ilgus ir lanksčius nanovamzdelius, kurie buvo panašūs į nemodifikuoto gp39 formuojamus nanovamzdelius. Ilgesnių peptidų Api-m4, HNTV170-181 ir baltymo eGFP prijungimas prie gp39m ir gp39m_J neigiamai paveikė chimerinių baltymų savybes, kurios taip pat priklausė nuo jungtukinio peptido buvimo. Kai 12 AR ilgio HNTV170-181 peptidas buvo prijungtas prie gp39m be jungtukinio peptido, chimerinis gp39m_HNTV formavo ilgesnius nanovamzdelius negu chimerinis gp39m_J_HNTV, kuriame HNTV170-181 peptidas buvo prijungtas per 15 AR ilgio jungtukinį peptidą, bet jų sintezė mielėse buvo efektyvesnė, kai HNTV170-181 peptidas buvo prijungtas per jungtukinį peptidą. Tuo tarpu chimerinis gp39m_J_eGFP, kuriame 238 AR ilgio eGFP baltymas prie gp39m_J C galo buvo prijungtas per jungtukinį peptidą, formavo ilgesnius nanovamzdelius nei chimerinis gp39m_eGFP, kuriame nebuvo jungtukinio peptido. Taigi, chimerinių baltymų sintezės efektyvumas mielėse ir jų savaiminis susirinkimas į nanostruktūras nepriklausė vien tik nuo įterptos sekos ilgio, juo labiau kad didžiausią neigiamą įtaką turėjo 26 AR ilgio Api-m4 peptido prijungimas prie gp39m ir gp39m_J.

Gerai toleruojamas 6x-His peptidas buvo vienintelė seka, kurią sudarė visos hidrofiliinės AR, vidutiniškai toleruojamame HNTV170-181 peptide hidrofobinių AR buvo panašiai kaip baltyme gp39 – 40 %, o blogiausiai toleruojamą Api-m4 peptidą sudarė 50 % hidrofobinių AR. Baltyminių fragmentų hidrofiliinių ir hidrofobinių savybių nustatymas yra svarbus jų sėkmingam eksponavimui ant nanostruktūrų. Kadangi hidrofobinės AR dažniausiai atsiduria baltymo vidinėje dalyje, todėl į hidrofiliinę baltymo dalį įterpus hidrofobinius baltymų fragmentus, gali būti sutrikdytas baltymų erdvinis susilankstymas. Pavyzdžiui, net 10 AR ilgio hidrofobinių peptidų prijungimas prie nanostruktūrą formuojančio baltymo gali neigiamai paveikti

baltymų erdvinį susilankstymą ir sutrikdyti nanostruktūrų formavimąsi (Peabody *et al.*, 2009). Tai leidžia daryti prielaidą, kad hidrofilingieji baltymų fragmentai turi mažesnę neigiamą poveikį gp39 pagrindu sukonstruotų chimerinių baltymų sintezės efektyvumui mielėse ir jų gebėjimui susirinkti į nanovamzdelius nei hidrofobiniai baltymų fragmentai, todėl prie gp39m ir gp39m_J C galo prijungiami peptidai ar baltymai turėtų būti hidrofilingi.

Prie gp39m ar gp39m_J prijungiamų peptidų 6x-His, Api-m4, HNTV170-181 ir eGFP baltymo pI reikšmės buvo skirtingos, todėl jų prijungimas, remiantis teoriniais skaičiavimais, nevienodai paveikė chimerinių baltymų krūvį. 6x-His peptidas buvo vienintelis, kurį prijungus prie gp39m ar gp39m_J, chimerinių gp39m_His ir gp39m_J_His krūvis beveik nepasikeitė kaip ir jų sintezės mielėse efektyvumas bei sugebėjimas formuoti tipinius, gp39 būdingus nanovamzdelius. Tuo tarpu peptidų HNTV170-181 ir Api-m4 prijungimas sumažino chimerinių baltymų neigiamą krūvio reikšmę nuo -8 iki -5,3 ar net -3,4, atitinkamai, ir tai galėjo prisidėti prie chimerinių baltymų sintezės efektyvumo sumažėjimo bei savaiminio susirinkimo į nanovamzdelius sutrikimų. eGFP prijungimas prie gp39m ar gp39m_J padidino chimerinių gp39m_eGFP ir gp39m_J_eGFP neigiamą krūvio reikšmę nuo -8 iki -15 ir galėjo lemti jų sintezės mielėse efektyvumo ir gebėjimo susirinkti į nanostruktūras pokyčius. Tai galėjo įvykti dėl to, kad į struktūrą formuojančio baltymo gp39 galą įterpus pastarajam nebūdingą neigiamą krūvį turintį eGFP, chimeriniai baltymai ar jų dalys galėjo tarpusavyje sąveikauti netinkamai. Galimai tą patį krūvį turintys ir dideliu dažniu eksponuojami baltyminiai fragmentai stūmė vienas kitą ir „trukdė“ struktūrą formuojančiam baltymui susirinkti į nanostruktūras (Bendahmane *et al.*, 1999; Uhde-Holzem *et al.*, 2007).

Kadangi nanovamzdelį teoriškai gali sudaryti nuo kelių šimtų iki kelių tūkstančių monomerų, o eGFP buvo didžiausias baltymas, sulietas su gp39m ir gp39m_J C galu, todėl galimai eGFP dydis, o ne krūvis, turėjo didžiausią neigiamą poveikį šių chimerinių baltymų gebėjimui formuoti struktūras. Aplink nanovamzdelį nedidelėje erdvėje eksponuojami eGFP baltymai galėjo ne tik fiziškai „trukdyti“ vienas kitam, tačiau galėjo sąveikauti tarpusavyje ir agreguoti (Gedvilaite *et al.*, 2006; Muthukutty *et al.*, 2013).

Tam, kad aplink nanovamzdelį galėtų būti sėkmingai eksponuojami baltyminiai fragmentai, reikia juos tinkamai atskirti erdvėje tiek nuo struktūrą formuojančio baltymo gp39, tiek nuo vienas kito. Vienas iš efektyviausių būdų yra jungtukinių peptidų panaudojimas (Kalnciema *et al.*, 2011; Lawatscheck *et al.*, 2007; Pavoni *et al.*, 2013; Urakami *et al.*, 2017). Šiuo atveju chimeriniame baltyme gp39m_J_eGFP panaudoto 15 AR ilgio jungtuko galėjo neužtekti dviejų baltymų gp39 ir eGFP erdviniam atskyrimui,

nes jungtukinio peptido panaudojimas chimeriniame baltyme gp39m_J_eGFP lėmė tik šiek tiek efektyvesnę sintezę mielėse ir ilgesnių nanostruktūrų formavimąsi nei chimerinio gp39m_eGFP. Nors moksliniuose tyrimuose dažniausiai naudojami nuo 4 AR iki 16 AR ilgio iš glicino ir serino AR sudaryti jungtukiniai peptidai (Pavoni *et al.*, 2013; Zvirbliene *et al.*, 2006), tačiau ilgesnio jungtuko panaudojimas turėtų dar labiau atitolinti baltymus gp39 ir eGFP ir pagerinti jų išsidėstymą erdvėje. Aplink nanovamzdelį eksponuojami eGFP, nuo gp39 atskirti ilgais ir lanksčiais jungtukais, turėtų tinkamai išsidėstyti erdvėje ir, galbūt, mažiau sąveikautų tarpusavyje.

Be jungtukinio peptido pailginimo ateityje galima būtų išbandyti kitas didelių baltymų eksponavimo ant virusinių nanostruktūrų strategijas. Pavyzdžiui, mielių ląstelėse kartu sintetinti chimerinį baltymą gp39m_J_eGFP ir nemodifikuotą baltymą gp39 taip sudarant sąlygas susiformuoti mozaikinėm-chimerinėm nanostruktūrom, kuriose eGFP baltymo koncentracija ant nanostruktūrų būtų sumažinta ir atskiri baltymų domenai tarpusavyje būtų labiau atskirti erdvėje (Kalnciema *et al.*, 2011; Lua *et al.*, 2015; Maharaj *et al.*, 2014).

Apibendrinant, chimerinių baltymų su prijungtais 6x-His, Api-m4, HNTV170-181 peptidais ir eGFP baltymu sintezės efektyvumas mielėse ir savaiminis susirinkimas į tvarkingus nanovamzdelius priklausė nuo prijungiamų baltyminių fragmentų fizikinių ir cheminių savybių visumos. Tam, kad prie gp39m ir gp39m_J prijungiami peptidai turėtų kuo mažesnę neigiamą poveikį chimerinių baltymų sintezės efektyvumui mielėse ir nanovamzdelių formavimuisi, jie turėtų būti neilgi – 6-20 ar ilgio, hidrofiliški ir žymiai nekeisti chimerinio baltymo krūvio. Atsižvelgus į išvardintas baltyminių fragmentų savybes, ateityje bus galima sėkmingiau pasirinkti baltymo dalis prijungimui prie gp39 C galo nesutrikdant chimerinių baltymų susirinkimo į nanovamzdelius.

3.9. Chimerinių baltymų su prijungtu eGFP erdvinio susilankstymo tyrimas

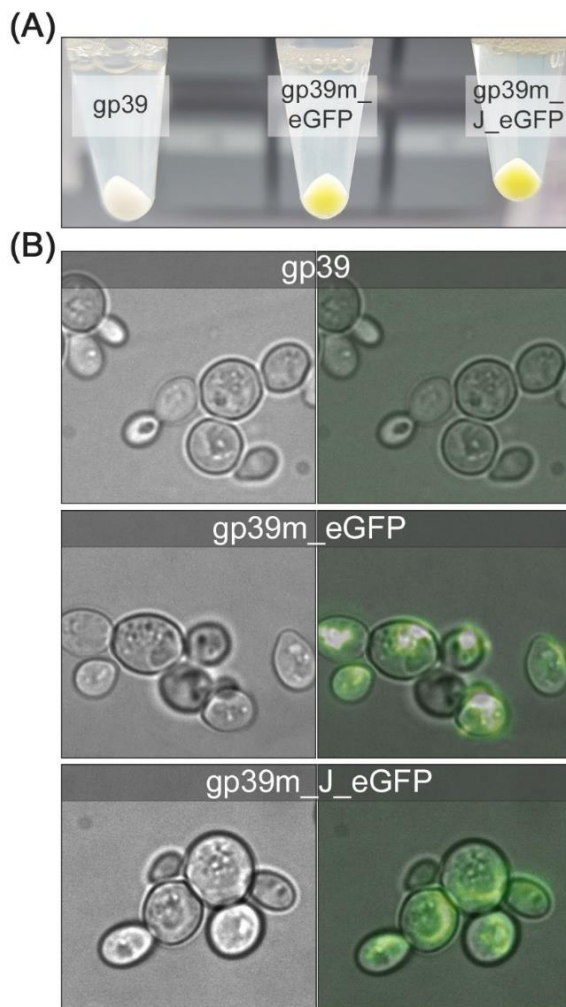
Baltymas eGFP fluorescuoja tik jam teisingai susilanksčius (Fukuda *et al.*, 2000), todėl jo erdvinio susilankstymo efektyvumas buvo nustatytas analizuojant *S. cerevisiae* mielėse susintetintų chimerinių baltymų gp39m_eGFP ir gp39m_J_eGFP fluorescenciją (38 pav.).

S. cerevisiae mielių AH22-214 kamieno ląstelėse buvo indukuota gp39 ir chimerinių gp39m_eGFP, gp39m_J_eGFP baltymų sintezė. Mielių ląsteles sukoncentravus mėgintuvėlio dugne, buvo palygintas mielių biomasės spalvos pokytis skirtinguose mėgintuvėliuose: mielės, sintetinančios gp39, buvo

tipinės baltos spalvos, tačiau mielės, sintetinančios chimerinius baltymus gp39m_eGFP ir gp39m_J_eGFP, buvo geltonai žalios spalvos (38 pav. A).

eGFP erdvinio susilankstymo efektyvumas buvo nustatytas *in vivo* analizuojant mielių ląstelėse sintetinius chimerinius baltymus gp39m_eGFP ir gp39m_J_eGFP fluorescenciniu mikroskopu (mikroskopavimą atliko dr. A. Sasnauskienė). Ant mikroskopavimo stikliuko, tiesiai iš mielių mitybinės terpės, buvo užlašintos mielių ląstelės, sintetinančios gp39 arba chimerinius gp39m_eGFP, gp39m_J_eGFP baltymus. Tam kad nepažeisti mielių ir jų baltymų, mielių ląstelės ant mikroskopavimo tinkliuko nebuvo fiksuojamos. Mikroskopavimo metu fluorescencija buvo stebima tik tose mielių ląstelėse, kurios sintetino chimerinius gp39m_eGFP bei gp39m_J_eGFP (38 pav. B).

Gauti rezultatai yra svarbūs įvertinant baltymo gp39 formuojamų nanovamzdelių galimybes pritaikant juos baltymų, kurių erdvinis susilankstymas yra svarbus jų funkciniam aktyvumui, eksponavimui. Fluorescencinės analizės rezultatai parodė, kad prie gp39m ir gp39m_J C galo prijungtas eGFP, kuris sudarė net 106,2 % baltymo gp39 ilgio, teisingai susilankstė erdvėje. Ne visi nanostruktūras formuojantys baltymai, prie jų prijungus didelius baltyminius fragmentus, gali susirinkti į nanostruktūras. Prie virusinių nanostruktūrų prijungiami baltymai kartais gali būti per dideli, o dėl nepakankamo dviejų baltymų atsiskyrimo erdvėje, funkcinį aktyvumą turintys fermentai ar fluorescuojantys baltymai gali tarpusavyje sąveikauti ir neigiamai paveikti nanostruktūrų formavimąsi (Gedvilaite *et al.*, 2006; Gleiter *et al.*, 1999; Lua *et al.*, 2015).



38 pav. Mielių, sintetinančių gp39 ir chimerinius gp39m_eGFP, gp39m_J_eGFP baltymus, fluorescencinės analizės tyrimas. (A) Mielių, sintetinančių baltymus gp39, gp39m_eGFP ir gp39m_J_eGFP, biomasės spalvinio pokyčio nuotrauka. **(B)** Mielių ląstelių šviesaus lauko ir fluorescencinės analizės nuotraukos. Mikroskopavimą atliko dr. A. Sasnauskienė (VU GMC Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra).

3.10. Nanovamzdelių su prijungtais *Acinetobacter baumannii* baltymų Blp1 ir OmpA fragmentais analizė

Įvertinus modelinių peptidų 6x-His, Api-m4, HNTV170-181 ir baltymo eGFP įtaką chimerinių baltymų sintezės efektyvumui mielėse ir gebėjimui susirinkti į nanostruktūras, buvo nuspręsta ištirti gp39 formuojamų nanovamzdelių pritaikymą *A. baumannii* bakterijos membraninių baltymų Blp1 bei OmpA fragmentų eksponavimui. Nors ankstesniuose bandymuose

buvo padaryta prielaida, kad baltyminiai fragmentai, drastiškai padidinantys arba sumažinantys chimerinio baltymo krūvį bei sudaryti iš daug β klosčių, gali neigiamai paveikti gp39 gebėjimą formuoti nanovamzdelius, šią prielaidą buvo nuspręsta patikrinti pasirenkant imunogeniškus ir potencialų pritaikymą vakcinos kūrimui prieš *A. baumannii* bakteriją turinčius baltymo Blp1 C galo fragmentus (Skerniškytė *et al.*, 2019a).

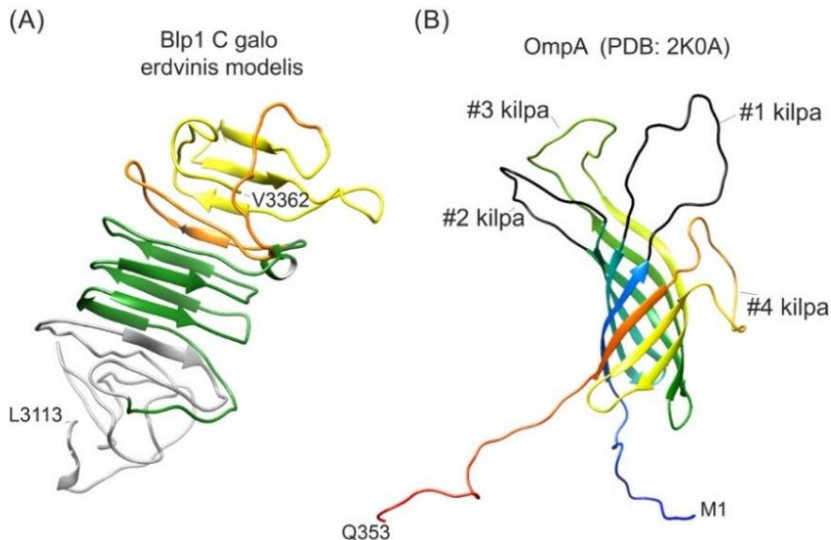
3.10.1. Blp1 ir OmpA baltyminių fragmentų pasirinkimas, jų charakterizavimas ir mielių raiškos vektorių konstravimas

Remiantis *A. baumannii* Blp1 bei OmpA baltymų erdvinės struktūros modeliais, eksponavimui ant nanovamzdelių buvo pasirinkti trys Blp1 ir du OmpA baltymų fragmentai.

Kadangi Blp1 sudaro 3362 AR, o jo C galas yra nukreiptas į bakterijos išorę (Skerniškytė *et al.*, 2019a), todėl prijungiamus baltymo Blp1 fragmentus buvo nutarta pasirinkti iš Blp1 C galo 250 AR dalies. Naudojant „I-TASSER“ internetinį įrankį (Zhang, 2008), buvo sumodeliuotas Blp1 C galo erdvinės struktūros modelis (Tm įvertis $0,46 \pm 0,15$), kuriame šis baltymo fragmentas formavo β klostes, išsidėsčiusias vieną priešais kitą (39 pav. A). Kadangi didelių baltymų, formuojančių iš β klosčių sudarytas erdvinės struktūras, prijungimas prie gp39 galimai trukdo jo susirinkimui į nanostruktūras, eksponavimui ant nanovamzdelių buvo pasirinkti 55 AR, 91 AR ir 163 AR dydžio Blp1 C galo fragmentai, kurie buvo pavadinti Blp55, Blp91 ir Blp163 (39 pav. A).

Daugelio Gram-neigiamų bakterijų OmpA baltymai formuoja panašias erdvinės struktūras (Confer ir Ayalew, 2013; Viale ir Evans, 2020), todėl *A. baumannii* baltymo OmpA erdvinės struktūros analogas buvo nustatytas naudojant „HHpred“ internetinį įrankį. Tiriamas OmpA baltymas turėjo didžiausią panašumą su *Klebsiella pneumoniae* bakterijos OmpA baltymu: tarpusavyje lyginamų baltymų erdvinių struktūrų susilankstymas 22-203 AR dalyje atitiko 99,79 % (įvertis $9,9e-18$). Dėl to *K. pneumoniae* baltymo OmpA erdvinės struktūros modelis buvo atsisiųstas iš PDB (PDB: 2K0A) ir vizualizuotas „UCSF Chimera v1.12“ programine įranga (39 pav. B). *K. pneumoniae* OmpA baltymo erdvinės struktūros modelį sudaro iš 8 β klosčių suformuota statinės struktūra su 4 kilpomis, o baltymo erdvinis susilankstymas atitiko kolegų gautus rezultatus modeliuojant šiame darbe tirtą *A. baumannii* OmpA baltymą (Skerniškytė, 2019). Kadangi OmpA yra membraninis baltymas, kurio kilpos yra nukreiptos į bakterijos paviršių (Smith *et al.*, 2007), todėl buvo pasirinkti į bakterijos paviršių nukreiptų dviejų

kilpų fragmentai: #1 kilpą sudarančios 28 AR ir #2 kilpą sudarančios 14 AR. Pasirinkti fragmentai buvo pavadinti Omp28 ir Omp14 (39 pav. B).



39 pav. Blyp1 C galo ir OmpA baltymų erdviųjų struktūrų modelių nuotraukos.

(A) Blyp1 C galo 250 AR erdvinės struktūros modelio nuotrauka. Eksponavimui ant nanovamzdelių pasirinktas 55 AR dydžio fragmentas pateiktas geltona spalva, 91 AR dydžio fragmentas – oranžine ir geltona spalvomis, 163 AR dydžio fragmentas – žalia, oranžine ir geltona spalvomis. (B) OmpA erdvinės struktūros (PDB: 2K0A) modelio nuotrauka. β statinės struktūrą sudaro 1-353 AR, kurios formuoja aštuonias β klostes ir 4 kilpas. Eksponavimui ant nanovamzdelių buvo pasirinktos #1 kilpos ir #2 kilpos dalys (kilpos pažymėtos juoda spalva). Blyp1 C galo struktūros modelis buvo sumodeliuotas „I-TASSER“ internetiniu įrankiu, baltymų erdviųjų struktūrų modeliai vizualizuoti „UCSF Chimera v1.12“ (Pettersen *et al.*, 2004; Zhang, 2008).

Blyp1 fragmentų Blyp55, Blyp91 ir Blyp163 bei OmpA fragmentų Omp28 ir Omp14 AR sekos buvo išanalizuotos bioinformatiniais metodais įvertinant šių fragmentų dydį, jų teorines hidrofines ir hidrofobines savybes, pI vertes (39 pav.; 14 lentelė). Analizė parodė, kad pasirinkti baltymų fragmentai labai skyrėsi pagal fizikines ir chemines savybes. Baltymų fragmentų dydis kito nuo 14 AR iki 163 AR ir skyrėsi pagal teorinius hidropatiškumo indeksus (GRAVY nuo 0,02 iki -1,5). Nors pasirinktų fragmentų pI reikšmės buvo panašios (nuo 4,05 iki 4,7), tačiau jų galima įtaka chimerinio baltymo krūviui buvo skirtinga: Omp14 prijungimas prie gp39m ar gp39m_J turėjo mažiausią poveikį chimerinio baltymo krūvio pokyčiui (pasikeitė nuo -8 iki -9,4), tačiau Blyp163 fragmento prijungimas prie gp39m ar gp39m_J pakeitė chimerinio baltymo krūvį nuo -8 iki -27,2 (14 lentelė).

14 lentelė. Baltymo gp39 ir baltymų Blp1, OmpA fragmentų esminės charakteristikos.

Fragmento pavadinimas	AR seka	AR skaičius	GRAVY indeksas	Fragmento pI	Chimerinio baltymo pI/krūvis
gp39	NCBI: YP_009284663	224	-0,16	4,88	-/ -8
Blp55	SALAKFITVEQDA GNTTISLDRDGE TMFNSVSLTLNQ VNTTLDLNNQ IIV	55	0,02	4,05	4,69/ -13,4
Blp91	NGHDTVLDFTLGD IRTNLQADKIDLS ELLIDYSKDVSA AKFITVEQDAGNT TISLDRDGE NSVSLTLNQVNT TLDELLNNQ IIV	91	-0,11	4,23	4,63/ -18,3
Blp163	DSFLESGRYVEDL ELVGS AHLNATGN ALDNLLTGNSGNN VLNGREGNDTYIT NEGTD TIVFQLLN SQDATGGNGHDTV LDFTLGDIRTNLQ ADKIDLSELLIDY SKDVSALAKFITV EQDAGNTTISLDR DGE TMFNSVSL TLNQVNTTLDL NNQ IIV	163	-0,25	4,13	4,5/ -27,2
Omp14	KGDVDGLAAGAEYK	14	-0,53	4,7	4,86/ -9,4
Omp28	GYTFQDTQHNNGG KDGE LTNGPELQD DL	28	-1,5	4,12	4,72/ -13,3

Kuo GRAVY indeksas neigiamas, tuo daugiau hidrofilinių AR sudaro seką ir *vice versa*. Chimerinius baltymus sudarė gp39 ir prie jo prijungti fragmentai Blp55, Blp91, Blp163, Omp14, Omp28. Chimerinių baltymų teorinis krūvis paskaičiuotas tirpalo pH esant 7,5.

Buvo konstruojami mielių raiškos vektoriai, kurie koduotų chimerinius baltymus, sudarytus iš gp39m ir gp39m_J ir prie jų C galo prijungtų *A. baumannii* Blp55, Blp91, Blp163, Omp14, ir Omp28 baltyminių fragmentų. Omp14 fragmentą koduojanti seka buvo susintetinta chemiškai (Invitrogen), o oligonukleotidiniai pradmenys buvo hibridizuoti. Blp1 fragmentus Blp55, Blp91, Blp163 ir Omp28 koduojančios sekos buvo pagausintos PGR metodu naudojant bakterijų *A. baumannii* lizate esančią genomine DNR kaip matricą (Skerniškytė *et al.*, 2019a, 2019b). Hibridizuotas

Omp14 DNR fragmentas bei PGR metodu pagausinti DNR fragmentai 5' ir 3' galuose turėjo įterptas SmaI ir BamHI RE atpažinimo sekas, todėl šie fragmentai buvo įterpti į pFX7_gp39m ir pFX7_gp39m_J vektorius. Buvo sukonstruota 10 mielių raiškos vektorių, koduojančių chimerinius baltymus su prijungtais *A. baumannii* baltymų Blp1 ir OmpA fragmentais (15 lentelė). Buvo atlikta mielių raiškos vektorių sekoskaita, o gautos sekos išanalizuotos.

15 lentelė. Mielių raiškos vektorių, koduojančių chimerinius baltymus su *A. baumannii* baltymų Blp1 ir OmpA fragmentais, aprašymas.

Baltymas	DNR sekos pagausinimui naudoti oligonukleotidai	Konstravimui naudoti raiškos vektoriai	Sukonstruoto vektoriaus pavadinimas	
gp39m_Blp55	Blp55_F		pFX7_gp39m_Blp55	
gp39m_J_Blp55	Blp55_R		pFX7_gp39m_J_Blp55	
gp39m_Blp91	Blp91_F		pFX7_gp39m_Blp91	
gp39m_J_Blp91	Blp91_R		pFX7_gp39m_J_Blp91	
gp39m_Blp163	Blp163_F		pFX7_gp39m	pFX7_gp39m_Blp163
gp39m_J_Blp163	Blp163_R		pFX7_gp39m_J	pFX7_gp39m_J_Blp163
gp39m_Omp14	Omp14_F			pFX7_gp39m_Omp14
gp39m_J_Omp14	Omp14_R			pFX7_gp39m_J_Omp14
gp39m_Omp28	Omp28_F			pFX7_gp39m_Omp28
gp39m_J_Omp28	Omp28_R			pFX7_gp39m_J_Omp28

3.10.2. Chimerinių baltymų su Blp1 ir OmpA fragmentais sintezė mielėse bei savaiminio susirinkimo į nanostruktūras nustatymas

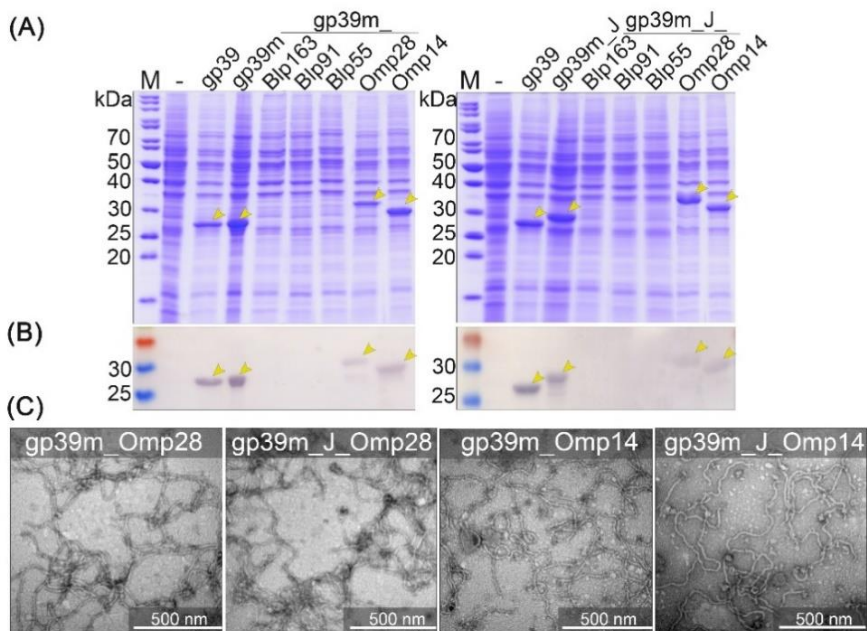
S. cerevisiae mielių AH22-214 kamieno ląstelės buvo transformuotos mielių raiškos vektoriais, koduojančiais chimerinius baltymus su prijungtais *A. baumannii* baltymų fragmentais. Tikslinių baltymų sintezės efektyvumas mielių ląstelėse buvo įvertintas NDS-PAGE bei imunoblotuose (40 pav. A). Trijų nepriklausomų eksperimentų duomenimis, *S. cerevisiae* mielėse chimeriniai baltymai buvo sintetiniai skirtingu efektyvumu. Visų trijų baltymo Blp1 fragmentų prijungimas prie gp39 C galo ypač neigiamai paveikė chimerinių baltymų sintezės efektyvumą: jų sintezė mielių lizatuose buvo neaptinkama (40 pav. A, B) ir nepriklausė nei nuo juos sudarančių AR skaičiaus, nei nuo jungtukinio peptido buvimo. Kadangi baltymo Blp1 fragmentų prijungimas prie gp39 C galo turėjo neigiamos įtakos chimerinių baltymų sintezei, šie mėginiai toliau analizuojami nebuvo.

Omp14 ir Omp28 fragmentų prijungimas prie gp39 C galo buvo puikiai toleruojamas. Chimeriniai baltymai gp39m_Omp14 ir gp39m_J_Omp14 buvo sintetiniai mielėse panašiu efektyvumu, kuris nepriklausė nuo jungtukinio

peptido buvimo. Tuo tarpu Omp28 fragmentą prijungus prie gp39m be jungtukinio peptido, mielių lizate aptinkamas chimerinio baltymo gp39m_Omp28 kiekis buvo mažesnis negu nemodifikuoto gp39, tačiau kai Omp28 buvo prijungtas prie gp39 per jungtukinį peptidą, chimerinio baltymo gp39m_J_Omp28 kiekis jau buvo panašus į nemodifikuoto baltymo gp39 kiekį (40 pav. A, B).

Išgrynintų chimerinių baltymų gp39m_Omp14, gp39m_J_Omp14, gp39m_Omp28 ir gp39m_J_Omp28 mėginių analizė TEM parodė, kad OmpA fragmentų prijungimas prie gp39m ir gp39m_J C galo nepaveikė šio fago baltymo sugebėjimo susirinkti į nanostruktūras ir TEM nuotraukose vis dar buvo aptinkami tvarkingi, ilgi ir lankstūs nanovamzdeliai, panašūs į nemodifikuoto gp39 formuojamus nanovamzdelius (40 pav. C, 16 lentelė).

Šiame darbe tirtas 28 AR ilgio baltymo OmpA fragmentas Omp28 kartu su 15 AR ilgio [GGGS]_{3x} jungtuku sudarė ilgiausią baltyminių fragmentą, kurio prijungimas prie gp39 C galo nesutrikdė chimerinio baltymo susirinkimo į tvarkingus nanovamzdelius (40 pav. C, 16 lentelė). Kadangi virusinės nanostruktūros tarpusavyje skiriasi jas sudarančių subvienetų skaičiumi ir jų savybėmis, todėl kiekviena nanostruktūra gali eksponuoti skirtingo ilgio baltyminius fragmentus. Dažniausiai toleruojami baltyminiai fragmentai yra iki 23 AR ilgio (Carignan *et al.*, 2015), tačiau kai kurios nanostruktūros gali eksponuoti iki 71 AR ilgio baltyminius fragmentus ar net pilno ilgio ~26 kDa dydžio eGFP baltymus (Gedvilaite *et al.*, 2006; Gilbert *et al.*, 2004; Kalnciema *et al.*, 2011).



40 pav. Chimerinių baltymų su prijungtais baltymų Blp1 ir OmpA fragmentais sintezės efektyvumo mielėse bei gebėjimo susirinkti į nanostruktūras tyrimas. (A) Mielėse susintetintų chimerinių baltymų sintezės analizė PAA gelyje bei (B) jų nustatymas imunoblotu metodu su anti-gp39 PAK. M – baltymų molekulinės masės standartas „Page Ruler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific Baltics); „-“ žymi mielių, transformuotų „tuščiu“ raiškos vektoriumi pFX7, lizata; toliau pateikiami mielių, sintetinančių tikslius baltymus, lizatai. (C) Chimerinių baltymų formuojamų nanovamzdelių TEM nuotraukos.

16 lentelė. Chimerinių baltymų, sudarytų iš gp39 ir OmpA fragmentų, formuojamų nanovamzdelių esminės charakteristikos.

Baltymų variantai	Nanovamzdelių morfologija
gp39m_Omp28	Tvarkingi, lankstūs nanovamzdeliai. Ilgiausia struktūra > 2,2 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis 0,5-1,3 μm . Skersmuo 12-14 nm.
gp39m_J_Omp28	Tvarkingi, lankstūs nanovamzdeliai. Ilgiausia struktūra >1,3 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis 0,5-1 μm . Skersmuo 12-14 nm.
gp39m_Omp14	Tvarkingi, lankstūs nanovamzdeliai. Ilgiausia struktūra >2,2 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis 0,5-1,3 μm . Skersmuo 12-14 nm.
gp39m_J_Omp14	Tvarkingi, lankstūs nanovamzdeliai. Ilgiausia struktūra >1,2 μm ilgio, vyraujantis struktūrų ilgis 0,5-1 μm . Skersmuo 12-14 nm.

Lentelėje apibendrinti dviejų nepriklausomų eksperimentų duomenys.

3.10.3. Baltymų Blp1 ir OmpA fragmentų, prijungtų prie gp39, poveikio chimerinių baltymų savybėms aptarimas

Baltymo Blp1 fragmentų Blp55, Blp91, Blp163 bei baltymo OmpA fragmentų Omp14 ir Omp28 prijungimas prie gp39m ir gp39m_J C galo lėmė nevienodą chimerinių baltymų sintezės efektyvumą mielėse ir gebėjimą susirinkti į nanostruktūras. Omp14 ir Omp28 buvo trumpi (juos sudarė 14 AR ir 28 AR, atitinkamai) ir jie neformavo sudėtingų erdvinių struktūrų. Priešingai, baltymo Blp1 fragmentai buvo ilgesni (juos sudarė nuo 55 AR iki 163 AR) ir jie formavo iš β klosčių sudarytas erdvines struktūras. Kadangi baltymo Blp1 fragmentų prijungimas prie gp39 buvo toks nepalankus, kad chimerinių baltymų sintezė mielėse net nebuvo aptinkama, tai rodo, jog prijungiamo baltyminio fragmento dydis ir erdvinis susilankstymas yra labai svarbūs parenkant fragmentus eksponavimui ant gp39 formuojamų nanovamzdelių.

Teoriškai paskaičiuotos visų prijungtų baltyminių fragmentų pI reikšmės buvo panašios, tačiau skyrėsi jų įtaka chimerinių baltymų krūvio pokyčiui. Blp1 fragmentų prijungimas prie gp39 labai pakeitė chimerinių baltymų krūvį vietoje -8 į -13,4, -18,3 ir -27,2. Tuo tarpu Omp28 fragmento prijungimas prie gp39m ir gp39m_J chimerinių baltymų krūvį keitė palyginti nedaug į -9,4 ir -13,3. Kadangi prie gp39 prijungus Blp55 ir Omp28 fragmentus, chimerinių baltymų krūvis pasikeitė iki panašių reikšmių, galima daryti prielaidą, kad baltymų krūvis, nors svarbus, bet nėra pagrindinis veiksnys, nulemiantis prijungiamo baltyminio fragmento toleravimą nanostruktūrų sudėtyje. Panašu, kad pakitęs chimerinių gp39m_Bl55, gp39m_Bl91, gp39m_Bl163 krūvis tik sustiprino dėl dydžio ir erdvinio susilankstymo neigiamą baltymo Blp1 fragmentų poveikį chimerinių baltymų sintezės ir struktūrų formavimosi efektyvumui. Sąlyginai nedidelėje erdvėje arti vienas kito sukonzentruoti baltymo Blp1 fragmentai, formuojantys „standžias“ β klostes ir turintys krūvį, stūmė vienas kitą ir „trukdė“ susirinkimui į tvarkingas nanostruktūras. Netvarkinga baltymų agregacija sukėlė jų degradaciją, todėl šių baltymų sintezė mielėse nebuvo aptikta. Panašūs rezultatai yra gauti kuriant MS2 bakteriofagu parentą nešiklį – kai kurie įterpti baltyminiai fragmentai neigiamai paveikė baltymų erdvinį susilankstymą, o tai lėmė chimerinių baltymų agregaciją ir degradaciją (Peabody *et al.*, 2008).

Prie gp39 prijungus Omp28 fragmentą, kuris buvo trumpesnis už baltymo Blp1 fragmentus ir neformavo erdvinių struktūrų, sudarytų iš β klosčių, šiek tiek pakitęs chimerinio baltymo gp39m_Omp28 krūvis stipriai neįtakėjo jo sintezės efektyvumo mielėse ir gebėjimo susirinkti į nanovamzdelius. Gali

būti, kad Omp28 fragmento prijungimas per jungtukinį peptidą dar labiau sumažino krūvio poveikį ir pagerino gp39m_J_Omp28 sintezės mielėse efektyvumą lyginant su gp39m_Omp28.

3.11. Nanovamzdelių toleruojamų baltyminių fragmentų savybių apibendrinimas

Mielėse susintetinus chimerinius gp39 su prijungtais 6x-His, Api-m4, HNTV170-181 peptidais, baltymų Blp1 ir OmpA fragmentais (Blp55, Blp91, Blp163, Omp14, Omp28) bei eGFP baltymu, buvo apibendrintos visų šiame darbe naudotų baltyminių fragmentų savybės su jų poveikiu chimerinių baltymų gebėjimui formuoti nanostruktūras.

Mažų 6-28 AR ilgio peptidų, išskyrus peptidą Api-m4, prijungimas prie gp39 C galo turėjo mažesnę neigiamą poveikį chimerinių baltymų sintezės mielėse efektyvumui ir jų savaiminiam susirinkimui nei didelių baltyminių fragmentų prijungimas (55-238 AR ilgio įskaitant 26 AR ilgio Api-m4 peptidą). Tai rodo, kad parenkant baltyminių fragmentą eksponavimui ant nanovamzdelių, yra svarbu atsižvelgti į jo ilgį. Panašu, kad geriausiai ant nanovamzdelių buvo eksponuojami neilgi, 6-28 AR ilgio baltyminiai fragmentai.

Prie gp39 C galo prijungtus ir geriausiai toleruojamus baltyminius fragmentus 6x-His, Omp14 ir Omp28 sudarė daugiausia hidrofiliinių AR (GRAVY indeksai buvo -3,2, -0,53, -1,5, atitinkamai). Kiti baltyminiai fragmentai buvo labiau hidrofobiški (GRAVY indeksai varijavo nuo -0,48 iki 0,27) ir mažiau toleruojami juos įterpus prie gp39 C galo. Papildomą poveikį chimerinių baltymų gebėjimui formuoti struktūras turėjo ir jų krūvio pokyčiai dėl prie gp39 C galo prijungtų baltyminių fragmentų. Geriausiai toleruojami 6x-His, Omp14 ir Omp28, kurių prijungimas prie gp39 C neturėjo neigiamo poveikio chimerinių baltymų savaiminiam susirinkimui, chimerinio baltymo krūvio reikšmių beveik nepakeitė. Priešingai, Api-m4 peptido prijungimas sumažino chimerinio baltymo krūvį nuo -8 iki -3,4 ir tai turėjo neigiamos įtakos chimerinių baltymų sintezės mielėse bei nanostruktūrų formavimosi efektyvumui. Blp55, Blp91 ir Blp163 prijungimas prie gp39 labai pakeitė chimerinių baltymų teorinį krūvį nuo -8 iki -13,4, -18,3 ir -27,2 ir buvo nepalankus jų sintezei mielėse. Taigi, ant gp39 formuojamų nanovamzdelių eksponuojami baltyminiai fragmentai turėtų būti hidrofiliški ir žymiai nekeisti chimerinių baltymų krūvio.

Blp55, Blp91 ir Blp163 fragmentai buvo vieninteliai, kuriuos prijungus prie gp39, chimerinių baltymų sintezė mielėse nebuvo aptinkama. Kadangi puikiai toleruojamas Omp28 fragmentas ir visiškai netoleruojamas Blp55

fragmentas beveik identiškai pakeitė chimerinių baltymų krūvį, tai rodo, kad šiuo atveju krūvis nebuvo vienintelis veiksnys, turintis įtakos chimerinių baltymų sintezės efektyvumui mielėse ir jų gebėjimui susirinkti į nanostruktūras. Ši prielaida atitinka kitų mokslinių tyrimų duomenis, kuriuose aprašomos virusinių nanostruktūrų toleruojamų baltymo fragmentų savybės atkreipiant dėmesį į jų dydį, erdvinį susilankstymą bei įterpimo į baltymą vietą (Chen *et al.*, 2021; Uhde-Holzem *et al.*, 2007).

Iš 15 AR sudarytas jungtukinis peptidas [GGGGS]_{3x} gali būti naudojamas kaip erdvinis atskyrklis sumažinti kai kurių baltyminių fragmentų neigiamą poveikį nanovamzdelį formuojančio gp39 erdviniam susilankstymui. Nors prie gp39 C galo prijungus 6x-His peptidą, jungtuko buvimas jokios įtakos neturėjo, nes 6x-His peptidas buvo gerai toleruojamas ir chimeriniams baltymams neigiamo poveikio neturėjo, tačiau jungtukas pagerino chimerinio baltymo su Omp28 fragmentu sintezę. Šiuo atveju jungtukas galėjo atitolinti neigiamą krūvį turintį Omp28 fragmentą nuo baltymo gp39. Tačiau jungtuko naudojimas ne visada pagerindavo chimerinių baltymų sintezės efektyvumą mielėse ir jų savaiminį susirinkimą, nes eGFP, B1p55, B1p91, B1p163 poveikis chimeriniams baltymams nepriklausė vien tik nuo jungtukinio peptido buvimo. Gauti rezultatai rodo, kad fragmentai virš 55 AR ilgio, sudaryti iš daug β klosčių ir pakeičiantys chimerinio baltymo krūvį yra nepalankūs eksponavimui ant nanovamzdelių. Gali būti, kad erdvėje labiau nuo gp39 atskirti prijungiami baltyminiai fragmentai galėtų įgyti teisingą erdvinį susilankstymą, todėl chimeriniai baltymai nebūtų degraduojami ir sugebėtų formuoti nanostruktūras.

Apibendrinant, gp39 formuojami nanovamzdeliai gali būti pritaikyti baltyminių fragmentų eksponavimui atsižvelgiant į prijungiamo fragmento savybių visumą: jie turėtų būti nedideli 6-28 AR ilgio, hidrofiliški, neformuoti β klosčių ir žymiai nekeisti chimerinio baltymo krūvio. Šio darbo metu nustatytos gp39 toleruojamų baltyminių fragmentų savybės atitinka kitų mokslinių tyrimų rezultatus, kuriose taip pat pademonstruota, kad chimerinių baltymų susirinkimui į nanostruktūras įtakos turėjo baltyminių fragmentų savybių visuma: juos sudarančių AR skaičius (Hassani-Mehraban *et al.*, 2015; Porta *et al.*, 2003), hidrofilišės savybės (Karpenko *et al.*, 2000; Peabody *et al.*, 2008), pI reikšmės, jų įtaka chimerinių baltymų krūvio pokyčiui (Bendahmane *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2021; Uhde-Holzem *et al.*, 2007) bei jų erdvinis susilankstymas (Brown *et al.*, 2009; Fietze *et al.*, 2016). Atsižvelgus į gp39 toleruojamų baltyminių fragmentų savybes, ateityje galima bus kurti nanovamzdelius, sėkmingai eksponuojančius prie jų prijungtas baltymų dalis.

APIBENDRINIMAS

Fago NBD2 baltymo gp39 gebėjimas formuoti nanovamzdelius leido detaliau apibūdinti baltymų tarpusavio sąveikas ir savaiminio susirinkimo procesą, nes ataugą turinčių fagų vamzdelio baltymų savaiminis susirinkimas iki šiol nebuvo detaliai tiriamas. Nors fagų ataugos susirinkimas yra griežtai kontroliuojamas, tačiau baltymas gp39, be kitų fago reguliacinių baltymų, savaime susirinko į nanovamzdelius tiek *S. cerevisiae* mielėse, tiek *E. coli* bakterijose pademonstruojant, kad raiškos sistema gp39 gebėjimui formuoti nanovamzdelius ir jų morfologijai įtakos neturėjo (Šimoliūnas, 2017; Špakova *et al.*, 2019). Visgi, baltymas gp39 formavo nevienodo ilgio nanovamzdelius, o tai rodo, kad fago NDB2 reguliaciniai baltymai nėra būtini gp39 savaiminio susirinkimo iniciacijai, tačiau jie gali būti svarbūs nanovamzdelių ilgio reguliacijai.

Pelėms į poodį suleisti nanovamzdeliai buvo imunogeniški ir sukėlė baltymui gp39 specifinių antikūnų sintezę net ir nenaudojant adjuvantų. Taip pat buvo nustatyta, kad baltymas gp39 ir jo formuojami nanovamzdeliai yra stabilūs kaitinant, šaldant, skaldant tripsinu, inkubuojant skirtingos sudėties ir pH reikšmių buferiniuose tirpaluose ar denatūruojant 6 M karbamido tirpale. Tokiomis savybėmis pasižymintys virusinės nanostruktūros gali būti pritaikytos įvairiose mokslo srityse, viena jų – vakcinų kūrimui.

Pritaikant virusines nanostruktūras baltyminių fragmentų eksponavimui, eksperimentiniais tyrimais yra ieškoma baltyminių fragmentų, nesutrikdančių chimerinių baltymų savaiminio susirinkimo į nanostruktūras. Daugelyje mokslinių tyrimų atliekama nepakankamai išsami baltyminių fragmentų savybių analizė ir jų įtaka nanostruktūrų formavimuisi, todėl tai apsunkina baltymo dalių pasirinkimą sėkmingam eksponavimui ant nanostruktūrų. Šiame darbe, remiantis bioinformatinės analizės ir eksperimentiniais tyrimais, buvo nustatytas prie gp39 C galo prijungiamų baltyminių fragmentų poveikis chimerinių baltymų gebėjimui formuoti nanovamzdelius ir buvo įvertintos baltyminių fragmentų savybės, toleruojamos nanovamzdelių sudėtyje. Atsižvelgus į šią analizę aprašytas baltyminių fragmentų savybes, gp39 formuojami nanovamzdeliai, ar net kitos virusinės nanostruktūros, galės būti paprasčiau pritaikyti kuriant nešiklius baltyminių fragmentų eksponavimui.

Dėl blogėjančios *A. baumannii* bakterijos epidemiologinės situacijos (Lötsch *et al.*, 2020; World Health Organization, 2017), gp39 formuojami nanovamzdeliai buvo pritaikyti *A. baumannii* baltymo OmpA fragmentų eksponavimui. Kadangi OmpA baltymas yra tinkamas vakcinės kandidatas (Badmasti *et al.*, 2015), todėl nanovamzdeliai, eksponuojantys OmpA baltymo dalį, turi potencialų pritaikymą vakcinės kūrimui prieš *A. baumannii*.

IŠVADOS

1. *S. cerevisiae* raiškos sistema yra tinkama efektyviai bakteriofago NBD2 rekombinantinio baltymo gp39 sintezei ir jo formuojamų nanovamzdelių susiformavimui.
2. Baltymo gp39 formuojami nanovamzdeliai yra imunogeniški net nenaudojant adjuvantų bei išlieka stabilūs juos liofilizuojant, kaitinant, šaldant, keičiant tirpalų pH nuo 3,2 iki 9,6, denatūruojant 6 M karbamido tirpale bei skaldant tripsinu.
3. Baltymo gp39 N ir C galuose esančios aminorūgštys yra svarbios savaiminiam susirinkimui į nanovamzdelius.
4. Baltymas gp39 toleruoja baltyminių fragmentų prijungimą prie C, bet ne N galo, tačiau gebėjimas formuoti nanovamzdelius priklauso nuo prijungiamo baltyminio fragmento savybių visumos: jis turėtų būti 6-28 AR ilgio, hidrofiliškas, žymiai nekeičiantis chimerinio baltymo krūvio ir neformuojantis β klosčių.
5. Baltymo gp39 formuojami nanovamzdeliai gali būti panaudoti kaip nešikliai oportunistinės bakterijos *A. baumannii* išorinės membranos baltymo OmpA fragmentų eksponavimui.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Su disertacija susijusios publikacijos:

1. **Špakova A.**, Dalgėdienė I., Insodaitė R., Sasnauskienė A., Žvirblienė A., Petraitytė-Burneikienė R. vB_EcoS_NBD2 bacteriophage-originated polytubes as a carrier for the presentation of foreign sequences. *Virus Res.* 2020, 290: 198194.
2. **Špakova A.**, Šimoliūnas E., Batiuškaitė R., Pajeda S., Meškys R., Petraitytė-Burneikienė R. Self-Assembly of Tail Tube Protein of Bacteriophage vB_EcoS_NBD2 into Extremely Long Poly tubes in *E. coli* and *S. cerevisiae*. *Viruses* 2019, 11(3): 208.

Su disertacija nesusijusios publikacijos:

1. Drewes S., Jeske K., Straková P., Balčiauskas L., Ryll R., Balčiauskienė L., Kohlhouse D., Schnidrig G. A., Hiltbrunner M., **Špakova A.**, Insodaitė R., Petraitytė-Burneikienė R., Heckel G., Ulrich R. G. Identification of a novel hantavirus strain in the root vole (*Microtus oeconomus*) in Lithuania, Eastern Europe. *Infect. Genet. Evol.* 2020, 104520.
2. Jeske K., Hiltbrunner M., Drewes S., Ryll R., Wenk M., **Špakova A.**, Petraitytė-Burneikienė R., Heckel G., Ulrich R.G. Field vole-associated Traemmersee hantavirus from Germany represents a novel hantavirus species. *Virus Genes* 2019, 1-6.

Publikuota konferencijos santrauka:

Špakova A., Dalgėdienė I., Žvirblienė A., Petraitytė-Burneikienė R. Development of a Tubular Bacteriophage-Based Vaccine Platform that Induces an Immune Response in Mice. *Proceedings* 2020, 50: 28.

Konferencijoje skaitytų pranešimų sąrašas:

1. **Avižinienė A.**, Armalytė J., Petraitytė-Burneikienė R. vB_EcoS_NBD2 Bacteriophage-Originated Tubular Nanostructures as a Carrier for the Presentation of Foreign Sequences. Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje “World Microbe Forum”, 2021 m. birželio 20-24 d. (nuotolinė konferencija).
2. **Špakova A.**, Insodaitė R., Sasnauskienė A., Petraitytė-Burneikienė R. The strategy for foreign protein epitope display on vB_EcoS_NBD2 bacteriophage-originated polytubes. Stendinis pranešimas tarptautinėje

konferencijoje „Conference of Life Sciences The COINS“, 2020 m. vasario 25-27 d., Vilnius, Lietuva. *Gautas geriausio stendinio pranešimo apdovanojimas.*

3. **Špakova A.**, Dalgėdienė I., Žvirblienė A., Petraitytė-Burneikienė R. Development of a tubular bacteriophage-based vaccine platform that induces immune response in mice. Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje „Viruses 2020: Novel concepts in Virology“, 2020 m. vasario 4-7 d., Barselona, Ispanija.
4. Insodaitė R., **Špakova A.**, Petraitytė-Burneikienė R. Expression of foreign protein epitopes on vB_EcoS_NBD2 bacteriophage-originated polytubes in *S. cerevisiae*. Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje „4th Vita Scientia - International Life Sciences conference“, 2020 m. sausio 3 d., Vilnius, Lietuva.
5. **Špakova A.**, Dalgėdienė I., Žvirblienė A., Petraitytė-Burneikienė R. The immunogenicity of yeast-derived vB_EcoS_NBD2 bacteriophage polytubes. Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje „International FEBS3+ conference of Latvian Biochemical Society“, 2019 m. birželio 17-19 d., Riga, Latvija.
6. **Špakova A.**, Batiuškaitė R., Petraitytė-Burneikienė R., Šimoliūnas E., Truncaitė L., Časaitė V., Meškys R. Synthesis and self-assembly of bacteriophage-like particles in yeast: a novel molecular toolboxes. Žodinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje „23rd International Conference on Pharmaceutical Biotechnology“, 2018 m. gruodžio 10-11, Roma, Italija. *Gautas garbės sertifikatas ir apdovanojimas už kelių dienų moderavimą tarptautinėje konferencijoje.*
7. **Špakova A.**, Batiuškaitė R., Šimoliūnas E., Meškys R., Petraitytė-Burneikienė R. Mutagenesis of tail tube protein encoding sequence of vB_EcoS_NBD2 bacteriophage in yeast. Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje „Life Sciences Baltics 2018“, 2018 m. rugsėjo 26-27 d., Vilnius, Lietuva.
8. **Špakova A.**, Batiuškaitė R., Šimoliūnas E., Meškys R., Petraitytė-Burneikienė R. Three bacteriophage-originated rod-shaped structures in yeast: a new tools for nanotechnology? Žodinis pranešimas tarptautinėje

konferencijoje „4th Congress of Baltic Microbiologists“, 2018 m. rugsėjo 10-12 d., Gdanskas, Lenkija.

9. **Špakova A.**, Batiuškaitė R., Petraitytė-Burneikienė R., Šimoliūnas E., Truncaitė L., Časaitė V., Meškys R. Construction and characterization of self-assembling bacteriophage-like particles in yeast. Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje „International XVth Conference of the Lithuanian Biochemical Society“, 2018 m. birželio 26-29 d., Dubingiai, Lietuva.
10. **Špakova A.**, Batiuškaitė R., Šimoliūnas E., Truncaitė L., Meškys R., Petraitytė-Burneikienė R. Self-assembly of bacteriophage-originated nanotubes in yeast. Žodinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje „International Doctoral Student's Conference Science for Health“, 2018 m. balandžio 13 d., Kaunas, Lietuva. *Gautas antros vietos apdovanojimas už geriausią žodinį pristatymą.*
11. **Špakova A.**, Batiuškaitė R., Šimoliūnas E., Truncaitė L., Meškys R., Petraitytė-Burneikienė R. Tailed bacteriophage-inspired nanotubes as a phage display: a strategy incorporating yeast. Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje „International Conference of Life Sciences The COINS“, 2018 m. vasario 28 - kovo 2 d., Vilnius, Lietuva. *Gautas geriausio stendinio pranešimo apdovanojimas.*

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ackermann, H.W., 2011. On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. Note by M. F. d'Herelle, presented by M. Roux. *Comptes Rendus Academie des Sciences* 1917; 165:373–5. *Bacteriophage* 1, 3–5.

2. Ackermann, H.W., 2009. Phage classification and characterization. *Methods Mol. Biol.* 501, 127–140.

3. Adamik, B., Zielinski, S., Smiechowicz, J., Kübler, A., 2015. Endotoxin elimination in patients with septic shock: an observation study. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 63, 475–483.

4. Adler, L.N., Jiang, W., Bhamidipati, K., Millican, M., Macaubas, C., Hung, S.C., Mellins, E.D., 2017. The other function: class II-restricted antigen presentation by B cells. *Front. Immunol.* 8, 319.

5. Adriaenssens, E.M., Sullivan, M.B., Knezevic, P., van Zyl, L.J., Sarkar, B.L., Dutilh, B.E., Alfenas-Zerbini, P., Łobocka, M., Tong, Y., Brister, J.R., Moreno Switt, A.I., Klumpp, J., Aziz, R.K., Barylski, J., Uchiyama, J., Edwards, R.A., Kropinski, A.M., Petty, N.K., Clokie, M.R.J., Kushkina, A.I., Morozova, V. V., Duffy, S., Gillis, A., Rumnieks, J., Kurtböke, I., Chanishvili, N., Goodridge, L., Wittmann, J., Lavigne, R., Jang, H. Bin, Prangishvili, D., Enault, F., Turner, D., Poranen, M.M., Oksanen, H.M., Krupovic, M., 2020. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018-2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. *Arch. Virol.* 165, 1253–1260.

6. Adriaenssens, E.M., Wittmann, J., Kuhn, J.H., Turner, D., Sullivan, M.B., Dutilh, B.E., Bin Jang, H., van Zyl, L.J., Klumpp, J., Lobocka, M., Moreno Switt, A.I., Rumnieks, J., Edwards, R.A., Uchiyama, J., Alfenas-Zerbini, P., Petty, N.K., Kropinski, A.M., Barylski, J., Gillis, A., C Clokie, M.R., Prangishvili, D., Lavigne, R., Karam Aziz, R., Duffy, S., Krupovic, M., Poranen, M.M., Knezevic, P., Enault, F., Tong, Y., Oksanen, H.M., Rodney Brister, J., 2018. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2017 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. *Arch. Virol.* 163, 1125–1129.

7. Agnandji, S.T., Fernandes, J.F., Bache, E.B., Ramharter, M., 2015. Clinical development of RTS,S/AS malaria vaccine: a systematic review of clinical Phase I-III trials. *Future Microbiol.* 10, 1553–1578.

8. Aksyuk, A.A., Leiman, P.G., Kurochkina, L.P., Shneider, M.M., Kostyuchenko, V.A., Mesyanzhinov, V. V., Rossmann, M.G., 2009. The tail sheath structure of bacteriophage T4: a molecular machine for infecting bacteria. *EMBO J* 28, 821–829.

9. Al-Kadmy, I.M.S., Ibrahim, S.A., Al-Saryi, N., Aziz, S.N., Besinis, A., Hetta, H.F., 2020. Prevalence of genes involved in colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*: first report from Iraq. *Microb. Drug Resist.* 26, 616–622.

10. Allman, D., Wilmore, J.R., Gaudette, B.T., 2019. The continuing story of T-cell independent antibodies. *Immunol. Rev.* 288, 128–135.

11. Arnaud, C.A., Effantin, G., Vives, C., Engilberge, S., Bacia, M.,

Boulanger, P., Girard, E., Schoehn, G., Breyton, C., 2017. Bacteriophage T5 tail tube structure suggests a trigger mechanism for Siphoviridae DNA ejection. *Nat. Commun.* 8, 1953.

12. Arumugam, T.U., Ito, D., Takashima, E., Tachibana, M., Ishino, T., Torii, M., Tsuboi, T., 2014. Application of wheat germ cell-free protein expression system for novel malaria vaccine candidate discovery. *Expert Rev. Vaccines* 13, 75–85.

13. Ashley, C.E., Carnes, E.C., Phillips, G.K., Durfee, P.N., Buley, M.D., Lino, C.A., Padilla, D.P., Phillips, B., Carter, M.B., Willman, C.L., Brinker, C.J., Caldeira, J.D.C., Chackerian, B., Wharton, W., Peabody, D.S., 2011. Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles. *ACS Nano* 5, 5729–5745.

14. Asif, M., Alvi, I.A., Ur Rehman, S., 2018. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infect. Drug Resist.* 11, 1249–1260.

15. Asor, R., Khaykelson, D., Ben-nun-Shaul, O., Levi-Kalisman, Y., Oppenheim, A., Raviv, U., 2020. pH stability and disassembly mechanism of wild-type simian virus 40. *Soft Matter* 16, 2803–2814.

16. Atabekov, J., Nikitin, N., Arkhipenko, M., Chirkov, S., Karpova, O., 2011. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles. *J. Gen. Virol.* 92, 453–456.

17. Auzat, I., Dröge, A., Weise, F., Lurz, R., Tavares, P., 2008. Origin and function of the two major tail proteins of bacteriophage SPP1. *Mol. Microbiol.* 70, 557–569.

18. Auzat, I., Petitpas, I., Lurz, R., Weise, F., Tavares, P., 2014. A touch of glue to complete bacteriophage assembly: the tail-to-head joining protein (THJP) family. *Mol. Microbiol.* 91, 1164–1178.

19. Bachmann, M.F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1995. T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction. *Eur. J. Immunol.* 25, 3445–3451.

20. Bachmann, M.F., Zinkernagel, R.M., 1996. The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. *Immunol. Today* 17, 553–558.

21. Badmasti, F., Ajdary, S., Bouzari, S., Fooladi, A.A.I., Shahcheraghi, F., Siadat, S.D., 2015. Immunological evaluation of OMV(PagL)+Bap(1-487aa) and AbOmpA(8-346aa)+Bap(1-487aa) as vaccine candidates against *Acinetobacter baumannii* sepsis infection. *Mol. Immunol.* 67, 552–558.

22. Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A.A., Hoseinpour, R., Rahbarnia, L., Aria, M., 2019. Yeast expression systems: overview and recent advances. *Mol. Biotechnol.* 61, 365–384.

23. Balke, I., Zeltins, A., 2019. Use of plant viruses and virus-like particles for the creation of novel vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 145, 119–129.

24. Baneyx, F., Mujacic, M., 2004. Recombinant protein folding and

misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 22, 1399–1408.

25. Barua, S., Yoo, J.W., Kolhar, P., Wakankar, A., Gokarn, Y.R., Mitragotri, S., 2013. Particle shape enhances specificity of antibody-displaying nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 3270–3275.

26. Bebeacua, C., Lai, L., Vegge, C.S., Brondsted, L., van Heel, M., Veesler, D., Cambillau, C., 2013. Visualizing a complete *Siphoviridae* member by single-particle electron microscopy: the structure of Lactococcal Phage TP901-1. *J. Virol.* 87, 1061–1068.

27. Beijerinck, M.J., 1898. Concerning a contagium vivum fluidum as cause of the spot disease of tobacco leaves. *Verh. der Koninkyke Akad. Wettenschappen te Amsterdam* 65, 3–21.

28. Belval, L., Hemmer, C., Sauter, C., Reinbold, C., Fauny, J.D., Berthold, F., Ackerer, L., Schmitt-Keichinger, C., Lemaire, O., Demangeat, G., Ritzenthaler, C., 2016. Display of whole proteins on inner and outer surfaces of grapevine fanleaf virus-like particles. *Plant Biotechnol. J.* 14, 2288–2299.

29. Bendahmane, M., Koo, M., Karrer, E., Beachy, R.N., 1999. Display of epitopes on the surface of tobacco mosaic virus: impact of charge and isoelectric point of the epitope on virus-host interactions. *J. Mol. Biol.* 290, 9–20.

30. Berger, I., Fitzgerald, D.J., Richmond, T.J., 2004. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nat. Biotechnol.* 22, 1583–1587.

31. Bernstein, D.I., Atmar, R.L., Lyon, G.M., Treanor, J.J., Chen, W.H., Jiang, X., Vinje, J., Gregoricus, N., Frenck, R.W., Moe, C.L., Al-Ibrahim, M.S., Barrett, J., Ferreira, J., Estes, M.K., Graham, D.Y., Goodwin, R., Borkowski, A., Clemens, R., Mendelman, P.M., 2015. Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: a challenge study in healthy adults. *J. Infect. Dis.* 211, 870–878.

32. Biddlecome, A., Habte, H.H., McGrath, K.M., Sambanthamoorthy, S., Wurm, M., Sykora, M.M., Knobler, C.M., Lorenz, I.C., Lasaro, M., Elbers, K., Gelbart, W.M., 2019. Delivery of self-amplifying RNA vaccines in in vitro reconstituted virus-like particles. *PLoS One* 14, e0215031.

33. Biggar, K.K., Dawson, N.J., Storey, K.B., 2012. Real-time protein unfolding: a method for determining the kinetics of native protein denaturation using a quantitative real-time thermocycler. *Biotechniques* 53, 231–238.

34. Bodelon, G., Palomino, C., Fernández, L.Á., 2013. Immunoglobulin domains in *Escherichia coli* and other enterobacteria: from pathogenesis to applications in antibody technologies. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 204–250.

35. Boga, J.A., Martín Alonso, J.M., Casais, R., Parra, F., 1997. A single dose immunization with rabbit haemorrhagic disease virus major capsid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection. *J. Gen. Virol.* 78, 2315–2318.

36. Brodsky, J.L., Skach, W.R., 2011. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 464–475.

37. Brown, S.D., Fiedler, J.D., Finn, M.G., 2009. Assembly of hybrid bacteriophage Qbeta virus-like particles. *Biochemistry* 48, 11155–11157.
38. Bruckman, M.A., Randolph, L.N., Vanmeter, A., Hern, S., Andrew, J., Taurog, R.E., Steinmetz, N.F., 2014. Biodistribution, pharmacokinetics, and blood compatibility of native and PEGylated tobacco mosaic virus nano-rods and -spheres in mice. *Virology* 449, 163–173.
39. Buckholz, R.G., Gleeson, M.A., 1991. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnol.* 9, 1067–1072.
40. Burgdorf, S., Schölz, C., Kautz, A., Tampé, R., Kurts, C., 2008. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat. Immunol.* 9, 558–566.
41. Butler, P.J.G., 1999. Self-assembly of tobacco mosaic virus: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed. *Philos. Trans. R. Soc. L. B. Biol. Sci.* 354, 537–550.
42. Caballero-Herrera, A., Nordstrand, K., Berndt, K.D., Nilsson, L., 2005. Effect of urea on peptide conformation in water: molecular dynamics and experimental characterization. *Biophys. J.* 89, 842–857.
43. Cai, H., Shukla, S., Wang, C., Masarapu, H., Steinmetz, N.F., 2019. Heterologous prime-boost enhances the antitumor immune response elicited by plant-virus-based cancer vaccine. *J. Am. Chem. Soc.* 141, 6509–6518.
44. Cai, X., Sun, J., Bao, L., Li, W., 2012. Risk factors and antibiotic resistance of pneumonia caused by multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in pediatric intensive care unit. *World J. Emerg. Med.* 3, 202.
45. Caldeira, J.C., Perrine, M., Pericle, F., Cavallo, F., 2020. Virus-like particles as an immunogenic platform for cancer vaccines. *Viruses* 12, 488.
46. Campbell, P.L., Duda, R.L., Nassur, J., Conway, J.F., Huet, A., 2020. Mobile loops and electrostatic interactions maintain the flexible tail tube of bacteriophage Lambda. *J. Mol. Biol.* 432, 384–395.
47. Cantin, G.T., Resnick, S., Jin, H., O’Hanlon, R., Espinosa, O., Stevens, A., Payne, J., Glenn, N.R., Rasochova, L., Allen, J.R., 2011. Comparison of methods for chemical conjugation of an influenza peptide to wild-type and cysteine-mutant virus-like particles expressed in *Pseudomonas fluorescens*. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 17, 217–224.
48. Cardarelli, L., Lam, R., Tuite, A., Baker, L.A., Sadowski, P.D., Radford, D.R., Rubinstein, J.L., Battaile, K.P., Chirgadze, N., Maxwell, K.L., Davidson, A.R., 2010. The crystal structure of bacteriophage HK97 gp6: defining a large family of head-tail connector proteins. *J. Mol. Biol.* 395, 754–768.
49. Carignan, D., Thérien, A., Rioux, G., Paquet, G., Gagné, M.È.L., Bolduc, M., Savard, P., Leclerc, D., 2015. Engineering of the PapMV vaccine platform with a shortened M2e peptide leads to an effective one dose influenza vaccine. *Vaccine* 33, 7245–7253.
50. Çelik, E., Çalik, P., 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol. Adv.* 30, 1108–1118.
51. Chackerian, B., 2007. Virus-like particles: flexible platforms for

vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 6, 381–390.

52. Chao, C.N., Yang, Y.H., Wu, M.S., Chou, M.C., Fang, C.Y., Lin, M.C., Tai, C.K., Shen, C.H., Chen, P.L., Chang, D., Wang, M., 2018. Gene therapy for human glioblastoma using neurotropic JC virus-like particles as a gene delivery vector. *Sci. Rep.* 8, 2213.

53. Chauhan, B.S., Opeña, J.L., 2013. Effect of plant spacing on growth and grain yield of soybean. *Am. J. Plant Sci.* 4, 2011–2014.

54. Chauhan, V.P., Popović, Z., Chen, O., Cui, J., Fukumura, D., Bawendi, M.G., Jain, R.K., 2011. Fluorescent nanorods and nanospheres for real-time in vivo probing of nanoparticle shape-dependent tumor penetration. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50, 11417–11420.

55. Chen, L.S., Wang, M., Ou, W.C., Fung, C.Y., Chen, P.L., Chang, C.F., Huang, W.S., Wang, J.Y., Lin, P.Y., Chang, D., 2010. Efficient gene transfer using the human JC virus-like particle that inhibits human colon adenocarcinoma growth in a nude mouse model. *Gene Ther.* 17, 1033–41.

56. Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., Zhang, L., 2020. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 395, 507–513.

57. Chen, Q., Lai, H., 2013. Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* 9, 26–49.

58. Chen, T.H., Hu, C.C., Lee, C.W., Feng, Y.M., Lin, N.S., Hsu, Y.H., 2021. Stable display of artificially long foreign antigens on chimeric bamboo mosaic virus particles. *Viruses* 13, 572.

59. Chih, H.W., Gikanga, B., Yang, Y., Zhang, B., 2011. Identification of amino acid residues responsible for the release of free drug from an antibody-drug conjugate utilizing lysine-succinimidyl ester chemistry. *J. Pharm. Sci.* 100, 2518–2525.

60. Chin, A.W.H., Chu, J.T.S., Perera, M.R.A., Hui, K.P.Y., Yen, H.L., Chan, M.C.W., Peiris, M., Poon, L.L.M., 2020. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *The Lancet Microbe* 1, e10.

61. Chisari, F. V., Ferrari, C., Mondelli, M.U., 1989. Hepatitis B virus structure and biology. *Microb. Pathog.* 6, 311–325.

62. Choi, J.H., Keum, K.C., Lee, S.Y., 2006. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem. Eng. Sci.* 61, 876–885.

63. Chou, M.I., Hsieh, Y.F., Wang, M., Chang, J.T., Chang, D., Zouali, M., Tsay, G.J., 2010. In vitro and in vivo targeted delivery of IL-10 interfering RNA by JC virus-like particles. *J. Biomed. Sci.* 17, 1–9.

64. Chroboczek, J., Szurgot, I., Szolajska, E., 2014. Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochim. Pol.* 61, 531–539.

65. Chung, Y.H., Cai, H., Steinmetz, N.F., 2020. Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 156, 214–235.

66. Comas-Garcia, M., Colunga-Saucedo, M., Rosales-Mendoza, S., 2020. The role of virus-like particles in medical biotechnology. *Mol. Pharm.* 17, 4407–4420.
67. Confer, A.W., Ayalew, S., 2013. The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Vet. Microbiol.* 163, 207–222.
68. Crisci, E., Bárcenab, J., Montoya, M., 2013. Virus-like particle-based vaccines for animal viral infections. *Imunologia* 2, 102–116.
69. Cuervo, A., Pulido-Cid, M., Chagoyen, M., Arranz, R., González-García, V.A., Garcia-Doval, C., Castón, J.R., Valpuesta, J.M., Van Raaij, M.J., Martín-Benito, J., Carrascosa, J.L., 2013. Structural characterization of the bacteriophage T7 tail machinery. *J. Biol. Chem.* 288, 26290–26299.
70. D'Hérelle, F., 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentérique. *Acad. Sci. Paris* 165, 373–375.
71. Davidson, A.R., Cardarelli, L., Pell, L.G., Radford, D.R., Maxwell, K.L., 2012. Long noncontractile tail machines of bacteriophages, in: *Viral Molecular Machines*; Rossmann, M.G., Rao, V.B. (Eds.); Springer, Boston, MA, USA, pp. 115–142.
72. De Gregorio, E., Del Franco, M., Martinucci, M., Roscetto, E., Zarrilli, R., Di Nocera, P.P., 2015. Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*. *BMC Genomics* 16, 933.
73. Ding, X., Liu, D., Booth, G., Gao, W., Lu, Y., 2018. Virus-like particle engineering: from rational design to versatile applications. *Biotechnol. J.* 13, e1700324.
74. Dintzis, H.M., Dintzis, R.Z., Vogelstein, B., 1976. Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3671–3675.
75. Dion, M.B., Oechslin, F., Moineau, S., 2020. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 125–138.
76. Donaldson, B., Al-Barwani, F., Young, V., Scullion, S., Ward, V., Young, S., 2015. Virus-like particles, a versatile subunit vaccine platform. *Adv. Deliv. Sci. Technol.* 2014, 159–180.
77. Dopp, J.L., Reuel, N.F., 2018. Process optimization for scalable *E. coli* extract preparation for cell-free protein synthesis. *Biochem. Eng. J.* 138, 21–28.
78. Dorn, D.C., Lawatscheck, R., Zvirbliene, A., Aleksaite, E., Pecher, G., Sasnauskas, K., Özel, M., Raftery, M., Schnörich, G., Ulrich, R.G., Gedvilaite, A., 2008. Cellular and humoral immunogenicity of hamster polyomavirus-derived virus-like particles harboring a mucin 1 cytotoxic T-cell epitope. *Viral Immunol.* 21, 12–26.
79. Dunn, I.S., 1996. Total modification of the bacteriophage lambda tail tube major subunit protein with foreign peptides. *Gene* 183, 15–21.
80. Dunn, I.S., 1995. Assembly of functional bacteriophage lambda virions incorporating C-terminal peptide or protein fusions with the major tail protein. *J. Mol. Biol.* 248, 497–506.
81. Eisen, H.N., 2014. Affinity enhancement of antibodies: how low-

affinity antibodies produced early in immune responses are followed by high-affinity antibodies later and in memory B-cell responses. *Cancer Immunol. Res.* 2, 381–392.

82. Embgenbroich, M., Burgdorf, S., 2018. Current concepts of antigen cross-presentation. *Front. Immunol.* 9.

83. Endo, Y., Sawasaki, T., 2006. Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 373–380.

84. Esmaili, I., Mohammad Sadeghi, H., Akbari, V., 2018. Effect of buffer additives on solubilization and refolding of reteplase inclusion bodies. *Res. Pharm. Sci.* 13, 413.

85. Fan, X.Z., Pomerantseva, E., Gnerlich, M., Brown, A., Gerasopoulos, K., McCarthy, M., Culver, J., Ghodssi, R., 2013. Tobacco mosaic virus: a biological building block for micro/nano/bio systems. *J. Vac. Sci. Technol. A* 31, 050815.

86. Fattahian, Y., Rasooli, I., Mousavi Gargari, S.L., Rahbar, M.R., Darvish Alipour Astaneh, S., Amani, J., 2011. Protection against *Acinetobacter baumannii* infection via its functional deprivation of biofilm associated protein (Bap). *Microb. Pathog.* 51, 402–406.

87. Fauci, A.S., Morens, D.M., 2016. Zika Virus in the Americas – yet another arbovirus threat. *N. Engl. J. Med.* 374, 601–604.

88. FDA, 2019. Engerix-B [<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/engerix-b>, duomenys tikrinti 2021 09 10]

89. Feng, G., Wang, W., Qian, Y., Jin, H., 2013. Anti-A β antibodies induced by A β -HBc virus-like particles prevent A β aggregation and protect PC12 cells against toxicity of A β 1–40. *J. Neurosci. Methods* 218, 48–54.

90. Fokine, A., Chipman, P.R., Leiman, P.G., Mesyanzhinov, V. V., Rao, V.B., Rossmann, M.G., 2004. Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6003–6008.

91. Fokine, A., Islam, M.Z., Zhang, Z., Bowman, V.D., Rao, V.B., Rossmann, M.G., 2011. Structure of the three N-terminal immunoglobulin domains of the highly immunogenic outer capsid protein from a T4-like bacteriophage. *J. Virol.* 85, 8141–8148.

92. Fokine, A., Rossmann, M.G., 2014. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage* 4, 1–22.

93. Fraser, J.S., Yu, Z., Maxwell, K.L., Davidson, A.R., 2006. Ig-like domains on bacteriophages: a tale of promiscuity and deceit. *J. Mol. Biol.* 359, 496–507.

94. Fries, L., Shinde, V., Stoddard, J.J., Thomas, D.N., Kpamegan, E., Lu, H., Smith, G., Hickman, S.P., Piedra, P., Glenn, G.M., 2017. Immunogenicity and safety of a respiratory syncytial virus fusion protein (RSV F) vaccine in older adults. *Immun. Ageing* 14.

95. Frietze, K.M., Peabody, D.S., Chackerian, B., 2016. Engineering virus-like particles as vaccine platforms. *Curr. Opin. Virol.*

96. Fuenmayor, J., Gòdia, F., Cervera, L., 2017. Production of virus-like particles for vaccines. *N. Biotechnol.* 39, 174–180.

97. Fukuda, H., Arai, M., Kuwajima, K., 2000. Folding of green fluorescent protein and the Cycle3 mutant. *Biochemistry* 39, 12025–12032.
98. Galaway, F.A., Stockley, P.G., 2013. MS2 viruslike particles: a robust, semisynthetic targeted drug delivery platform. *Mol. Pharm.* 10, 59–68.
99. Garland, S.M., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C.M., Perez, G., Harper, D.M., Leodolter, S., Tang, G.W.K., Ferris, D.G., Steben, M., Bryan, J., Taddeo, F.J., Railkar, R., Esser, M.T., Sings, H.L., Nelson, M., Boslego, J., Sattler, C., Barr, E., Koutsky, L.A., 2007. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N. Engl. J. Med.* 356, 1928–1943.
100. Ge, P., Scholl, D., Leiman, P.G., Yu, X., Miller, J.F., Zhou, Z.H., 2015. Atomic structures of a bactericidal contractile nanotube in its pre- and postcontraction states. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 377–382.
101. Gedvilaite, A., Dorn, D.C., Sasnauskas, K., Pecher, G., Bulavaite, A., Lawatscheck, R., Staniulis, J., Dalianis, T., Ramqvist, T., Schönrich, G., Raftery, M.J., Ulrich, R., 2006. Virus-like particles derived from major capsid protein VP1 of different polyomaviruses differ in their ability to induce maturation in human dendritic cells. *Virology* 354, 252–260.
102. Gedvilaite, A., Frömmel, C., Sasnauskas, K., Micheel, B., Özel, M., Behrsing, O., Staniulis, J., Jandrig, B., Scherneck, S., Ulrich, R., 2000. Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. *Virology* 273, 21–35.
103. Gellings, P.S., Wilkins, A.A., Morici, L.A., 2020. Recent advances in the pursuit of an effective *Acinetobacter baumannii* vaccine. *Pathogens* 9, 1–19.
104. Geng, Y., Dalhaimer, P., Cai, S., Tsai, R., Tewari, M., Minko, T., Discher, D.E., 2007. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat. Nanotechnol.* 2, 249–255.
105. Geymonat, M., Spanos, A., Sedgwick, S.G., 2007. *Saccharomyces cerevisiae* autoselection system for optimised recombinant protein expression. *Gene* 399, 120–128.
106. Ghosh, D., Lee, Y., Thomas, S., Kohli, A.G., Yun, D.S., Belcher, A.M., Kelly, K.A., 2012. M13-templated magnetic nanoparticles for targeted in vivo imaging of prostate cancer. *Nat. Nanotechnol.* 7, 677–682.
107. Gilbert, L., Toivola, J., Lehtomäki, E., Donaldson, L., Käpylä, P., Vuento, M., Oker-Blom, C., 2004. Assembly of fluorescent chimeric virus-like particles of canine parvovirus in insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 878–887.
108. Gleiter, S., Stubenrauch, K., Lilie, H., 1999. Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1. *Protein Sci.* 8, 2562–2569.
109. González-Domínguez, I., Puente-Massaguer, E., Cervera, L., Gòdia, F., 2020. Quantification of the HIV-1 virus-like particle production process by super-resolution imaging: from VLP budding to nanoparticle analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 117, 1929–1945.

110. Goulet, A., Spinelli, S., Mahony, J., Cambillau, C., 2020. Conserved and diverse traits of adhesion devices from *Siphoviridae* recognizing proteinaceous or saccharidic receptors. *Viruses* 12, 512.
111. Govasli, M.L., Diaz, Y., Puntervoll, P., 2019. Virus-like particle-display of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxoid STh-A14T elicits neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 37, 6405–6414.
112. Gratton, S.E.A., Ropp, P.A., Pohlhaus, P.D., Luft, J.C., Madden, V.J., Napier, M.E., DeSimone, J.M., 2008. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 11613–11618.
113. Gupta, A., Onda, M., Pastan, I., Adhya, S., Chaudhary, V.K., 2003. High-density functional display of proteins on bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 334, 241–254.
114. Habibi, P., Prado, G.S., Pelegrini, P.B., Hefferon, K.L., Soccol, C.R., Grossi-de-Sa, M.F., 2017. Optimization of inside and outside factors to improve recombinant protein yield in plant. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 130, 449–467.
115. Hamilton, S.R., Davidson, R.C., Sethuraman, N., Nett, J.H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T.A., Li, H., Choi, B.K., Hopkins, D., Wischnewski, H., Roser, J., Mitchell, T., Strawbridge, R.R., Hoopes, J., Wildt, S., Gerngross, T.U., 2006. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science* 313, 1441–1443.
116. Hashemi, K., Ghahramani Seno, M.M., Ahmadian, M.R., Malaekhe-Nikouei, B., Bassami, M.R., Dehghani, H., Afkhami-Goli, A., 2021. Optimizing the synthesis and purification of MS2 virus like particles. *Sci. Rep.* 11, 19851.
117. Hassani-Mehraban, A., Creutzburg, S., Heereveld, L., Kormelink, R., 2015. Feasibility of cowpea chlorotic mottle virus-like particles as scaffold for epitope presentations. *BMC Biotechnol.* 15, 1–17.
118. Hawkes, N., 2015. European medicines agency approves first malaria vaccine. *BMJ* 351, h4067.
119. Heath, W.R., Carbone, F.R., 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 126–134.
120. Hendrix, R.W., 2003. Bacteriophage genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 506–511.
121. Herbert, F.C., Brohlin, O., Galbraith, T., Benjamin, C., Reyes, C.A., Luzuriaga, M.A., Shahriarkevisahi, A., Gassensmith, J.J., 2020. Supramolecular encapsulation of small-ultra red fluorescent proteins in virus-like nanoparticles for non-invasive in vivo imaging agents 31, 1529–1536.
122. Herrera-Rodriguez, J., Signorazzi, A., Holtrop, M., de Vries-Idema, J., Huckriede, A., 2019. Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on influenza virions to optimize vaccine production. *Vaccine* 37, 1630–1637.
123. Hervas-Stubbs, S., Rueda, P., Lopez, L., Leclerc, C., 2007. Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN. *J. Immunol.* 178, 2361–2369.

124. Ho, Y., Lo, H.R., Lee, T.C., Wu, C.P.Y., Chao, Y.C., 2004. Enhancement of correct protein folding in vivo by a non-lytic baculovirus. *Biochem. J.* 382, 695–702.
125. Horby, P., 2018. Improving preparedness for the next flu pandemic. *Nat. Microbiol.* 3, 848–850.
126. Hu, H., Masarapu, H., Gu, Y., Zhang, Y., Yu, X., Steinmetz, N.F., 2019. Physalis mottle virus-like nanoparticles for targeted cancer imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11, 18213–18223.
127. Hu, H., Steinmetz, N.F., 2020. Doxorubicin-loaded physalis mottle virus particles function as a pH-responsive prodrug enabling cancer therapy. *Biotechnol. J.* 15, 1–8.
128. Hu, W., Li, F., Yang, X., Li, Z., Xia, H., Li, G., Wang, Y., Zhang, Z., 2004. A flexible peptide linker enhances the immunoreactivity of two copies HBsAg preS1 (21-47) fusion protein. *J. Biotechnol.* 107, 83–90.
129. Huang, X., Wang, X., Zhang, J., Xia, N., Zhao, Q., 2017. *Escherichia coli*-derived virus-like particles in vaccine development. *Vaccines* 2, 1–8.
130. Hume, C.H.K., Vidigal, J., Carrondo, M.J.T., Middelberg, A.P.J., Roldão, A., Lua, L.H.L., 2019. Synthetic biology for bioengineering virus-like particle vaccines. *Biotechnol. Bioeng.* 116, 919–935.
131. Huynh, M.L., Russell, P., Walsh, B., 2009. Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis. *Methods Mol. Biol.* 519, 507–513.
132. Ikonomou, L., Schneider, Y.J., Agathos, S.N., 2003. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 1–20.
133. Irvine, D.J., Swartz, M.A., Szeto, G.L., 2013. Engineering synthetic vaccines using cues from natural immunity. *Nat. Mater.* 12, 978–990.
134. Iwanowski, D., 1892. Concerning the mosaic disease of the tobacco plant. *St. Petersburg Acad. Imp. Sci. Bul.* 35, 67–70.
135. Iyer, R., Moussa, S.H., Durand-Réville, T.F., Tommasi, R., Miller, A., 2018. *Acinetobacter baumannii* OmpA is a selective antibiotic permeant porin. *ACS Infect. Dis.* 4, 373–381.
136. Jackson, L.A., Anderson, E.J., Roupael, N.G., Roberts, P.C., Makhene, M., Coler, R.N., McCullough, M.P., Chappell, J.D., Denison, M.R., Stevens, L.J., Pruijssers, A.J., McDermott, A., Flach, B., Doria-Rose, N.A., Corbett, K.S., Morabito, K.M., O'Dell, S., Schmidt, S.D., Swanson, P.A., Padilla, M., Mascola, J.R., Neuzil, K.M., Bennett, H., Sun, W., Peters, E., Makowski, M., Albert, J., Cross, K., Buchanan, W., Pikaart-Tautges, R., Ledgerwood, J.E., Graham, B.S., Beigel, J.H., 2020. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 – preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 383, 1920–1931.
137. Jahangiri, A., Rasooli, I., Owlia, P., Fooladi, A.A.I., Salimian, J., 2017. In silico design of an immunogen against *Acinetobacter baumannii* based on a novel model for native structure of Outer membrane protein A. *Microb. Pathog.* 105, 201–210.
138. Jegerlehner, A., Storni, T., Lipowsky, G., Schmid, M., Pumpens, P., Bachmann, M.F., 2002. Regulation of IgG antibody responses by epitope

- density and CD21-mediated costimulation. *Eur. J. Immunol.* 32, 3305–3314.
139. Jegerlehner, A., Wiesel, M., Dietmeier, K., Zabel, F., Gatto, D., Saudan, P., Bachmann, M.F., 2010. Carrier induced epitopic suppression of antibody responses induced by virus-like particles is a dynamic phenomenon caused by carrier-specific antibodies. *Vaccine* 28, 5503–5512.
140. Jepson, C.D., March, J.B., 2004. Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. *Vaccine* 22, 2413–2419.
141. Jiang, F., Li, N., Wang, X., Cheng, J., Huang, Y., Yang, Y., Yang, J., Cai, B., Wang, Y.P., Jin, Q., Gao, N., 2019. Cryo-EM structure and assembly of an extracellular contractile injection system. *Cell* 177, 370–383.e15.
142. Jiang, W., Pilkington, E.H., Kelly, H.G., Tan, H.-X., Juno, J.A., Wheatley, A.K., Kent, S.J., 2020. Aggregation by peptide conjugation rescues poor immunogenicity of the HA stem. *PLoS One* 15, e0241649.
143. Joklik, W.K., 1981. Structure and function of the reovirus genome. *Microbiol. Rev.* 45, 483–501.
144. Jürgen, B., Breitenstein, A., Urlacher, V., Büttner, K., Lin, H., Hecker, M., Schweder, T., Neubauer, P., 2010. Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 9.
145. Kaiser, C.R., Flenniken, M.L., Gillitzer, E., Harmsen, A.L., Harmsen, A.G., Jutila, M.A., Douglas, T., Young, M.J., 2007. Biodistribution studies of protein cage nanoparticles demonstrate broad tissue distribution and rapid clearance *in vivo*. *Int. J. Nanomedicine* 2, 715–733.
146. Kaliniene, L., Truncaitė, L., Šimoliūnas, E., Zajančauskaitė, A., Vilkaitytė, M., Kaupinis, A., Skapas, M., Meškys, R., 2017. Molecular analysis of the low-temperature *Escherichia coli* phage vB_EcoS_NBD2. *Arch. Virol.* 163, 105–114.
147. Kalnciema, I., Skrastina, D., Ose, V., Pumpens, P., Zeltins, A., 2011. Potato virus Y-like particles as a new carrier for the presentation of foreign protein stretches. *Mol. Biotechnol.* 52, 129–139.
148. Karpenko, L.I., Ivanisenko, V.A., Pika, I.A., Chikhaev, N.A., Eroshkin, A.M., Veremeiko, T.A., Ilyichev, A.A., 2000. Insertion of foreign epitopes in HBcAg: how to make the chimeric particle assemble. *Amino Acids* 18, 329–337.
149. Katsura, I., 1990. Mechanism of length determination in bacteriophage lambda tails. *Adv. Biophys.* 26, 1–18.
150. Katsura, I., 1981. Structure and function of the major tail protein of bacteriophage lambda. Mutants having small major tail protein molecules in their virion. *J. Mol. Biol.* 146, 493–512.
151. Katsura, I., Hendrix, R.W., 1984. Length determination in bacteriophage lambda tails. *Cell* 39, 691–698.
152. Katsura, I., Tsugita, A., 1977. Purification and characterization of the major protein and the terminator protein of the bacteriophage lambda tail. *Virology* 76, 129–45.
153. Kegel, W.K., Van Der Schoot, P., 2006. Physical regulation of the self-assembly of tobacco mosaic virus coat protein. *Biophys. J.* 91, 1501–

1512.

154. Kenney, J.L., Volk, S.M., Pandya, J., Wang, E., Liang, X., Weaver, S.C., 2011. Stability of RNA virus attenuation approaches. *Vaccine* 29, 2230–2234.

155. Kikuchi, Y., King, J., 1975. Genetic control of bacteriophage T4 baseplate morphogenesis: III. Formation of the central plug and overall assembly pathway. *J. Mol. Biol.* 99, 695–716.

156. Knez, M., Sumser, M., Bittner, A.M., Wege, C., Jeske, H., Martin, T.P., Kern, K., 2004. Spatially selective nucleation of metal clusters on the tobacco mosaic virus. *Adv. Funct. Mater.* 14, 116–124.

157. Kolhar, P., Anselmo, A.C., Gupta, V., Pant, K., Prabhakarprandian, B., Ruoslahti, E., Mitragotri, S., 2013. Using shape effects to target antibody-coated nanoparticles to lung and brain endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 10753–10758.

158. Koudelka, K.J., Pitek, A.S., Manchester, M., Steinmetz, N.F., 2015. Virus-based nanoparticles as versatile nanomachines. *Annu. Rev. Virol.* 2, 379–401.

159. Kovacs, E.W., Hooker, J.M., Romanini, D.W., Holder, P.G., Berry, K.E., Francis, M.B., 2007. Dual-surface-modified bacteriophage MS2 as an ideal scaffold for a viral capsid-based drug delivery system. *Bioconjug. Chem.* 18, 1140–1147.

160. Krammer, F., 2020. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* 586, 516–527.

161. Krupovic, M., Prangishvili, D., Hendrix, R.W., Bamford, D.H., 2011. Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 610–635.

162. Ksiazek, T.G., Erdman, D., Goldsmith, C.S., Zaki, S.R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J.A., Lim, W., Rollin, P.E., Dowell, S.F., Ling, A.E., Humphrey, C.D., Shieh, W.-J., Guarner, J., Paddock, C.D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J.Y., Cox, N., Hughes, J.M., LeDuc, J.W., Bellini, W.J., Anderson, L.J., 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1953–1966.

163. Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.

164. Kündig, T.M., Senti, G., Schnetzler, G., Wolf, C., Prinz Vavricka, B.M., Fulurija, A., Hennecke, F., Sladko, K., Jennings, G.T., Bachmann, M.F., 2006. Der p 1 peptide on virus-like particles is safe and highly immunogenic in healthy adults. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 1470–1476.

165. Kurg, R., Reinsalu, O., Jagur, S., Õunap, K., Vösa, L., Kasvandik, S., Padari, K., Gildemann, K., Ustav, M., 2016. Biochemical and proteomic characterization of retrovirus Gag based microparticles carrying melanoma antigens. *Sci. Rep.* 6, 29425.

166. Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.

167. Lacson, E., Teng, M., Ong, J., Vienneau, L., Ofsthun, N., Lazarus, J.M., 2005. Antibody response to Engerix-B and Recombivax-HB hepatitis B vaccination in end-stage renal disease. *Hemodial. Int.* 9, 367–375.
168. Lai, C.C., Wang, C.Y., Hsueh, P.R., 2020. Co-infections among patients with COVID-19: the need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents? *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 53, 505–512.
169. Lai, W.B., Middelberg, A.P.J., 2002. The production of human papillomavirus type 16 L1 vaccine product from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 25, 121–128.
170. Landry, N., Ward, B.J., Trépanier, S., Montomoli, E., Le Dargis, M., Lapini, G., Vézina, L.P., 2010. Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 influenza. *PLoS One* 5, e15559.
171. Langlois, C., Cukkemane, A., Auzat, I., Chagot, B., Gilquin, B., Ignatiou, A., Petitpas, I., Kasotakis, E., Paternostre, M., White, H.E., Orlova, E. V., Baldus, M., Tavares, P., Zinn-Justin, S., 2015. Bacteriophage SPP1 tail tube protein self-assembles into β -structure-rich tubes. *J Biol Chem* 290, 3836–3849.
172. Lawatscheck, R., Aleksaite, E., Schenk, J.A., Micheel, B., Jandrig, B., Holland, G., Sasnauskas, K., Gedvilaite, A., Ulrich, R.G., 2007. Chimeric polyomavirus-derived virus-like particles: the immunogenicity of an inserted peptide applied without adjuvant to mice depends on its insertion site and its flanking linker sequence. *Viral Immunol.* 20, 453–460.
173. Le, D.T., Radukic, M.T., Müller, K.M., 2019. Adeno-associated virus capsid protein expression in *Escherichia coli* and chemically defined capsid assembly. *Sci. Reports* 9, 18631.
174. Lee, B., Ko, Y., Kwon, G., Lee, S., Ku, K., Kim, J., Kang, K., 2018. Exploiting biological systems: toward eco-friendly and high-efficiency rechargeable batteries. *Joule* 2, 61–75.
175. Lee, K.L., Carpenter, B.L., Wen, A.M., Ghiladi, R.A., Steinmetz, N.F., 2016. High-aspect ratio nanotubes formed by tobacco mosaic virus for delivery of photodynamic agents targeting melanoma. *ACS Biomater Sci Eng.* 2, 838–844.
176. Lee, L.A., Nguyen, Q.L., Wu, L., Horvath, G., Nelson, R.S., Wang, Q., 2012. Mutant plant viruses with cell binding motifs provide differential adhesion strengths and morphologies. *Biomacromolecules* 13, 422–431.
177. Lee, M.F., Chiang, C.H., Li, Y.L., Wang, N.M., Song, P.P., Lin, S.J., Chen, Y.H., 2018. Oral edible plant vaccine containing hypoallergen of American cockroach major allergen Per a 2 prevents roach-allergic asthma in a murine model. *PLoS One* 13, e0201281.
178. Lehle, L., Strahl, S., Tanner, W., 2006. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45, 6802–6818.
179. Lei, X., Cai, X., Yang, Y., 2020. Genetic engineering strategies for construction of multivalent chimeric VLPs vaccines. *Expert Rev. Vaccines*

19, 235–246.

180. Leiman, P.G., Shneider, M.M., 2012. Contractile tail machines of bacteriophages. *Adv. Exp. Med. Biol.* 726, 93–114.

181. Leonard, K.R., Kleinschmidt, A.K., Lake, J.A., 1973. *Caulobacter crescentus* Bacteriophage phiCbK: structure and *in vitro* self-assembly of the tail. *J. Mol. Biol.* 81, 349–365.

182. Leroux-Roels, G., Cramer, J.P., Mendelman, P.M., Sherwood, J., Clemens, R., Aerssens, A., De Coster, I., Borkowski, A., Baehner, F., Van Damme, P., 2018. Safety and immunogenicity of different formulations of norovirus vaccine candidate in healthy adults: a randomized, controlled, double-blind clinical trial. *J. Infect. Dis.* 217, 597–607.

183. Leung, S.S.Y., Parumasivam, T., Gao, F.G., Carter, E.A., Carrigy, N.B., Vehring, R., Finlay, W.H., Morales, S., Britton, W.J., Kutter, E., Chan, H.K., 2017. Effects of storage conditions on the stability of spray dried, inhalable bacteriophage powders. *Int. J. Pharm.* 521, 141–149.

184. Li, D., Chen, T., Hu, Y., Zhou, Y., Liu, Q., Zhou, D., Jin, X., Huang, Z., 2016. An ebola virus-like particle-based reporter system enables evaluation of antiviral drugs *in vivo* under non-biosafety level 4 conditions. *J. Virol.* 90, 8720–8728.

185. Lico, C., Capuano, F., Renzone, G., Donini, M., Marusic, C., Scaloni, A., Benvenuto, E., Baschieri, S., 2006. Peptide display on potato virus X: molecular features of the coat protein-fused peptide affecting cell-to-cell and phloem movement of chimeric virus particles. *J. Gen. Virol.* 87, 3103–3112.

186. Linares, R., Arnaud, C.A., Degroux, S., Schoehn, G., Breyton, C., 2020. Structure, function and assembly of the long, flexible tail of siphophages. *Curr. Opin. Virol.* 45, 34–42.

187. Liu, W.C., Gong, T., Wang, Q.H., Liang, X., Chen, J.J., Zhu, P., 2016. Scaling-up fermentation of *Pichia pastoris* to demonstration-scale using new methanol-feeding strategy and increased air pressure instead of pure oxygen supplement. *Sci. Rep.* 6, 18439.

188. Loehfelm, T.W., Luke, N.R., Campagnari, A.A., 2008. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J. Bacteriol.* 190, 1036–1044.

189. Lorizate, M., Kräusslich, H.G., 2011. Role of lipids in virus replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a004820.

190. Lötsch, F., Albiger, B., Monnet, D.L., Struelens, M.J., Seifert, H., Kohlenberg, A., Apfalter, P., Hartl, R., Huang, T.D.D., Denis, O., Sabtcheva, S., Ivanov, I.N., Andrašević, A.T., Pristaš, I., Maikanti, P., Pieridou, D., Hrabak, J., Žemlickova, H., Hammerum, A.M., Roer, L., Jurna-Ellam, M., Jalava, J., Raisanen, K., Potron, A., Plesiat, P., Pfennigwerth, N., Pournaras, S., Vatopoulos, A., Toth, A., Kurcz, A., Helgason, K.O., Burns, K., Monaco, M., Errico, G., Savicka, O., Mierauskaite, A., Perrin, M., Mzabi, A., Scicluna, E.A., Nestorova, N., Schouls, L.M., Samuelsen, O., Kacelnik, O., Zabicka, D., Canica, M., Manageiro, V., Codita, I., Popescu, G., Schreterova, E., Žakova, A., Pirš, M., Oteo-Iglesias, J., Aracil, B., Sjöstrom, K., Edquist, P., Hopkins,

K.L., Turton, J., Nugent, C., Leanord, A., Wootton, M., Morgan, M., Koraqi, A., Bego, A., Travar, M., Kurti, A., Raka, L., Vuksanovic, V., Lopivic, M., Kaftandjjeva, A., Cirkovic, I., Medic, D., Yildiz, S.S., Simsek, H., 2020. Epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Europe, 2019. *Eurosurveillance* 25, 2001735.

191. Lua, L.H.L., Connors, N.K., Sainsbury, F., Chuan, Y.P., Wibowo, N., Middelberg, A.P.J., 2014. Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 425–440.

192. Lua, L.H.L., Fan, Y., Chang, C., Connors, N.K., Middelberg, A.P.J., 2015. Synthetic biology design to display an 18kDa rotavirus large antigen on a modular virus-like particle. *Vaccine* 33, 5937–5944.

193. Luna, J., Plata, M., Gonzalez, M., Correa, A., Maldonado, I., Nossa, C., Radley, D., Vuocolo, S., Haupt, R.M., Saah, A., 2013. Long-term follow-up observation of the safety, immunogenicity, and effectiveness of Gardasil in adult women. *PLoS One* 8, e83431.

194. Luo, G., Lin, L., Ibrahim, A.S., Baquir, B., Pantapalangkoor, P., Bonomo, R.A., Doi, Y., Adams, M.D., Russo, T.A., Spellberg, B., 2012. Active and passive immunization protects against lethal, extreme drug resistant-*Acinetobacter baumannii* infection. *PLoS One* 7, e29446.

195. Lwoff, A., Tournier, P., 1966. The classification of viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 20, 45–74.

196. Lyytinen, O.L., Starkova, D., Poranen, M.M., 2019. Microbial production of lipid-protein vesicles using enveloped bacteriophage phi6. *Microb. Cell Fact.* 18, 29.

197. Ma, Y., Nolte, R.J.M., Cornelissen, J.J.L.M., 2012. Virus-based nanocarriers for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 811–825.

198. Magalhães, P.O., Lopes, A.M., Mazzola, P.G., Rangel-Yagui, C., Penna, T.C., Pessoa, A., 2007. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 10, 388–404.

199. Maharaj, P.D., Mallajosyula, J.K., Lee, G., Thi, P., Zhou, Y., Kearney, C.M., McCormick, A.A., 2014. Nanoparticle encapsidation of flock house virus by auto assembly of tobacco mosaic virus coat protein. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 18540.

200. Mahony, J., Alqarni, M., Stockdale, S., Spinelli, S., Feyereisen, M., Cambillau, C., Van Sinderen, D., 2016. Functional and structural dissection of the tape measure protein of lactococcal phage TP901-1. *Sci. Rep.* 6, 1–10.

201. Mallajosyula, J.K., Hiatt, E., Hume, S., Johnson, A., Jeevan, T., Chikwamba, R., Pogue, G.P., Bratcher, B., Haydon, H., Webby, R.J., McCormick, A.A., 2014. Single-dose monomeric HA subunit vaccine generates full protection from influenza challenge. *Hum. Vaccines Immunother.* 10, 586–595.

202. Malm, M., Uusi-Kerttula, H., Vesikari, T., Blazevic, V., 2014. High serum levels of norovirus genotype-specific blocking antibodies correlate with protection from infection in children. *J. Infect. Dis.* 210, 1755–1762.

203. Mao, C., Solis, D.J., Reiss, B.D., Kottmann, S.T., Sweeney, R.Y., Georgiou, G., Iverson, B., Belcher, A.M., 2004. Virus-based genetic toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires. *AIChE Annu. Meet. Conf. Proc.* 303, 2401.
204. Maruyama, I.N., Maruyama, H.I., Brenner, S., 1994. Lambda foo: a lambda phage vector for the expression of foreign proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8273–8277.
205. Maurer, P., Jennings, G.T., Willers, J., Rohner, F., Lindman, Y., Roubicek, K., Renner, W.A., Müller, P., Bachmann, M.F., 2005. A therapeutic vaccine for nicotine dependence: preclinical efficacy, and phase I safety and immunogenicity. *Eur. J. Immunol.* 35, 2031–2040.
206. May, R.A., Stevenson, K.J., 2009. Software review of origin 8. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 872.
207. McCluskie, M.J., Evans, D.M., Zhang, N., Benoit, M., McElhiney, S.P., Unnithan, M., DeMarco, S.C., Clay, B., Huber, C., Deora, A., Thorn, J.M., Stead, D.R., Merson, J.R., Davis, H.L., 2016. The effect of preexisting anti-carrier immunity on subsequent responses to CRM197 or Qb-VLP conjugate vaccines. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 38, 184–196.
208. McManus, J.J., Charbonneau, P., Zaccarelli, E., Asherie, N., 2016. The physics of protein self-assembly. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 22, 73–79.
209. Medicago, 2021. Medicago and GSK announce positive interim phase 2 results for adjuvanted COVID-19 vaccine candidate. [www.medicago.com/en/; duomenys tikrinti 2021 09 10].
210. Meng, X.J., 2010. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet. Microbiol.* 140, 256–265.
211. Merck, 2021a. Dosage and Administration for GARDASIL 9. [www.merckvaccines.com/gardasil9/dosing-administration/; duomenys tikrinti 2021 09 10].
212. Merck, 2021b. Dosage and Administration for RECOMBIVAX HB® [Hepatitis B Vaccine (Recombinant)] [www.merckvaccines.com/recombivax-hb/dosage-administration/; duomenys tikrinti 2021 09 10].
213. Mobini, S., Chizari, M., Mafakher, L., Rismani, Elmira, Rismani, Elham, 2020. Computational design of a novel VLP-based vaccine for hepatitis B virus. *Front. Immunol.* 11, 2074.
214. Mohsen, M.O., Gomes, A.C., Vogel, M., Bachmann, M.F., 2018. Interaction of viral capsid-derived virus-like particles (VLPs) with the innate immune system. *Vaccines* 6, 37.
215. Mok, D.Z.L., Chan, K.R., 2020. The effects of pre-existing antibodies on live-attenuated viral vaccine. *Viruses* 12, 520.
216. Monem, S., Furmanek-Błaszczak, B., Łupkowska, A., Kuczyńska-Wiśnik, D., Stojowska-Swędrzyńska, K., Laskowska, E., 2020. Mechanisms protecting *Acinetobacter baumannii* against multiple stresses triggered by the host immune response, antibiotics, and outside host environment. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5498.

217. Mushegian, A.R., 2020. Are there 1031 virus particles on earth, or more, or fewer? *J. Bacteriol.* 202, e00052-20.
218. Muthukutty, P., Kato, T., Park, E.Y., 2013. Production of human papillomavirus 6b L1 virus-like particles incorporated with enhanced green fluorescent whole protein in silkworm larvae. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 18, 514–519.
219. Nakayama, K., Takashima, K., Ishihara, H., Shinomiya, T., Kageyama, M., Kanaya, S., Ohnishi, M., Murata, T., Mori, H., Hayashi, T., 2000. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol. Microbiol.* 38, 213–231.
220. Nam, K.T., Kim, D.W., Yoo, P.J., Chiang, C.Y., Meethong, N., Hammond, P.T., Chiang, Y.M., Belcher, A.M., 2006. Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes. *Science* 312, 885–888.
221. Neefjes, J., Jongma, M.L.M., Paul, P., Bakke, O., 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 823–836.
222. Ngweniform, P., Abbineni, G., Cao, B., Mao, C., 2009. Self-assembly of drug-loaded liposomes on genetically engineered target-recognizing M13 phage: a novel nanocarrier for targeted drug delivery. *Small* 5, 1963–1969.
223. Niehl, A., Appaix, F., Boscá, S., van der Sanden, B., Nicoud, J.-F., Bolze, F., Heinlein, M., 2016. Fluorescent tobacco mosaic virus-derived bio-nanoparticles for intravital two-photon imaging. *Front. Plant Sci.* 6, 1244.
224. Nobrega, F.L., Vlot, M., de Jonge, P.A., Dreesens, L.L., Beaumont, H.J.E., Lavigne, R., Dutilh, B.E., Brouns, S.J.J., 2018. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 760–773.
225. Novavax, 2021. Coronavirus Vaccine Candidate Updates [www.novavax.com; duomenys tikrinti 2021 09 26].
226. Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28, 1166–1167.
227. Overton, T.W., 2014. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov. Today* 19, 590–601.
228. Papadimitriou-Olivgeris, M., Fligou, F., Spiliopoulou, A., Koutsileou, K., Kolonitsiou, F., Spyropoulou, A., Zotou, A., Marangos, M., Anastassiou, E.D., Christofidou, M., Spiliopoulou, I., 2017. Risk factors and predictors of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* mortality in critically ill bacteraemic patients over a 6-year period (2010–15): antibiotics do matter. *J. Med. Microbiol.* 66, 1092–1101.
229. Park, J.S., Lee, W.C., Yeo, K.J., Ryu, K.S., Kumarasiri, M., Heseck, D., Lee, M., Mobashery, S., Song, J.H., Kim, S.I., Lee, J.C., Cheong, C., Jeon, Y.H., Kim, H.Y., 2012. Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane. *FASEB J.* 26, 219–228.
230. Park, Y.J., Lacourse, K.D., Cambillau, C., DiMaio, F., Mougous, J.D., Veessler, D., 2018. Structure of the type VI secretion system TssK–TssF–TssG

baseplate subcomplex revealed by cryo-electron microscopy. *Nat. Commun.* 9, 5385.

231. Pattinson, D.J., Apte, S.H., Wibowo, N., Chuan, Y.P., Rivera-Hernandez, T., Groves, P.L., Lua, L.H., Middelberg, A.P.J., Doolan, D.L., 2019. Chimeric murine polyomavirus virus-like particles induce *Plasmodium* antigen-specific CD8⁺ T cell and antibody responses. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 215.

232. Pavoni, E., Vaccaro, P., Alessio, V.D., Santis, R. De, Minenkova, O., 2013. Simultaneous display of two large proteins on the head and tail of bacteriophage lambda. *BMC Biotechnol.* 13, 79.

233. Peabody, D.S., Manifold-Wheeler, B., Medford, A., Jordan, S.K., do Carmo Caldeira, J., Chackerian, B., 2009. Immunogenic display of diverse peptides on virus-like particles of RNA phage MS2. *J. Mol. Biol.* 380, 252–263.

234. Peabody, D.S., Manifold-Wheeler, B., Medford, A., Jordan, S.K., do Carmo Caldeira, J., Chackerian, B., 2008. Immunogenic display of diverse peptides on virus-like particles of RNA phage MS2. *J. Mol. Biol.* 380, 252–263.

235. Pell, L.G., Gasmi-Seabrook, G.M.C., Morais, M., Neudecker, P., Kanelis, V., Bona, D., Donaldson, L.W., Edwards, A.M., Howell, P.L., Davidson, A.R., Maxwell, K.L., 2010. The solution structure of the C-terminal Ig-like domain of the bacteriophage λ tail tube protein. *J. Mol. Biol.* 403, 468–479.

236. Pell, L.G., Kanelis, V., Donaldson, L.W., Howell, P.L., Davidson, A.R., Howell, P.L., Davidson, A.R., 2009a. The phage lambda major tail protein structure reveals a common evolution for long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 4160–4165.

237. Pell, L.G., Liu, A., Edmonds, L., Donaldson, L.W., Howell, P.L., Davidson, A.R., 2009b. The X-Ray crystal structure of the phage λ tail terminator protein reveals the biologically relevant hexameric ring structure and demonstrates a conserved mechanism of tail termination among diverse long-tailed phages. *J. Mol. Biol.* 389, 938–951.

238. Petrosky, E., Bocchini, J.A., Hariri, S., Chesson, H., Curtis, R.C., Saraiya, M., Unger, E.R., Markowitz, L.E., 2015. Use of 9-valent human papillomavirus (HPV) vaccine: updated HPV vaccination recommendations of the advisory committee on immunization practices. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 64, 300–304.

239. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612.

240. Pomerantseva, E.A., Gerasopoulos, K., Gnerlich, M., Odenwald, P., Culver, J., Ghodssi, R., 2013. Creating high-performance microbatteries with tobacco mosaic virus. *Nanotechnology* 3–5.

241. Pomwised, R., Intamaso, U., Teintze, M., Young, M., Pincus, S.H.,

2016. Coupling peptide antigens to virus-like particles or to protein carriers influences the Th1/Th2 polarity of the resulting immune response. *Vaccines* 4, 15.

242. Porta, C., Spall, V.E., Findlay, K.C., Gergerich, R.C., Farrance, C.E., Lomonosoff, G.P., 2003. Cowpea mosaic virus-based chimaeras: effects of inserted peptides on the phenotype, host range, and transmissibility of the modified viruses. *Virology* 310, 50–63.

243. Portnoff, A.D., Patel, N., Massare, M.J., Zhou, H., Tian, J.H., Zhou, B., Shinde, V., Glenn, G.M., Smith, G., 2020. Influenza hemagglutinin nanoparticle vaccine elicits broadly neutralizing antibodies against structurally distinct domains of H3N2 HA. *Vaccines* 8, 99.

244. Povilonis, J., Seputiene, V., Krasauskas, R., Juskaite, R., Miskinyte, M., Suziedelis, K., Suziedeliene, E., 2013. Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1000–1006.

245. Prigent, M., Leroy, M., Confalonieri, F., Dutertre, M., DuBow, M.S., 2005. A diversity of bacteriophage forms and genomes can be isolated from the surface sands of the Sahara Desert. *Extremophiles* 9, 289–296.

246. Pushko, P., Tretyakova, I., 2020. Influenza virus like particles (VLPs): opportunities for H7N9 vaccine development. *Viruses*. 12:518.

247. Qian, C., Liu, X., Xu, Q., Wang, Z., Chen, J., Li, T., Zheng, Q., Yu, H., Gu, Y., Li, S., Xia, N., 2020. Recent progress on the versatility of virus-like particles. *Vaccines* 8, 1–14.

248. Qiao, Y.L., Wu, T., Li, R.C., Hu, Y.M., Wei, L.H., Li, C.G., Chen, W., Huang, S.J., Zhao, F.H., Li, M.Q., Pan, Q.J., Zhang, X., Li, Q., Hong, Y., Zhao, C., Zhang, W.H., Li, Y.P., Chu, K., Li, M., Jiang, Y.F., Li, J., Zhao, H., Lin, Z.J., Cui, X.L., Liu, W.Y., Li, C.H., Guo, D.P., Ke, L.D., Wu, X., Tang, J., Gao, G.Q., Li, B.Y., Zhao, B., Zheng, F.X., Dai, C.H., Guo, M., Zhao, J., Su, Y.Y., Wang, J.Z., Zhu, F.C., Li, S.W., Pan, H.R., Li, Y.M., Zhang, J., Xia, N.S., 2020. Efficacy, safety, and immunogenicity of an *Escherichia coli*-produced bivalent human papillomavirus vaccine: an interim analysis of a randomized clinical trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 112, 145–153.

249. Qing, G., Ma, L.C., Khorchid, A., Swapna, G.V.T., Mal, T.K., Takayama, M.M., Xia, B., Phadtare, S., Ke, H., Acton, T., Montelione, G.T., Ikura, M., Inouye, M., 2004. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 22, 877–882.

250. Rajagopala, S. V., Casjens, S., Uetz, P., 2011. The protein interaction map of bacteriophage lambda. *BMC Microbiol.* 11, 213.

251. Rawson, T.M., Moore, L.S.P., Zhu, N., Ranganathan, N., Skolimowska, K., Gilchrist, M., Satta, G., Cooke, G., Holmes, A., 2020. Bacterial and fungal coinfection in individuals with Coronavirus: a rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. *Clin. Infect. Dis.* 71, 2459–2468.

252. Razanskiene, A., Schmidt, J., Geldmacher, A., Ritzi, A., Niedrig, M.,

Lundkvist, Å., Krüger, D.H., Meisel, H., Sasnauskas, K., Ulrich, R., 2004. High yields of stable and highly pure nucleocapsid proteins of different hantaviruses can be generated in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 111, 319–333.

253. Rebedea, I., Diaconescu, I.G., Bach, D., Bartelsen, O., Arndtz, N., 2006. Comparison of thiomersal-free and thiomersal-containing formulations of a recombinant hepatitis B vaccine (Hepavax-Gene®) in healthy adults. *Vaccine* 24, 5320–5326.

254. Richardson, E.T., Barrie, M.B., Kelly, J.D., Dibba, Y., Koedoyoma, S., Farmer, P.E., 2016. Biosocial approaches to the 2013–2016 Ebola pandemic. *Health Hum. Rights* 18, 115–128.

255. Riekkel, C., Burghammer, M., Snigirev, I., Rosenthal, M., 2018. Microstructural metrology of tobacco mosaic virus nanorods during radial compression and heating. *Soft Matter* 14, 194–204.

256. Rioux, G., Babin, C., Majeau, N., Leclerc, D., 2012. Engineering of Papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles through fusion of the ha11 peptide to several putative surface-exposed sites. *PLoS One* 7, 5–12.

257. Röder, J., Fischer, R., Commandeur, U., 2017. Adoption of the 2A ribosomal skip principle to tobacco mosaic virus for peptide display. *Front. Plant Sci.* 8, 1125.

258. Rogosnitzky, M., Branch, S., 2016. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *BioMetals* 29, 365–376.

259. Roldão, A., Silva, A.C., Mellado, M.C.M., 2017. Viruses and virus-like particles in biotechnology: fundamentals and applications. *Compr. Biotechnol.* 633–656.

260. Rong, J., Niu, Z., Lee, L.A., Wang, Q., 2011. Self-assembly of viral particles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 16, 441–450.

261. Roohvand, F., Shokri, M., Abdollahpour-Alitappeh, M., Ehsani, P., 2017. Biomedical applications of yeast- a patent view, part one: yeasts as workhorses for the production of therapeutics and vaccines. *Expert Opin. Ther. Pat.* 27, 929–951.

262. Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* 5, 172.

263. Sabalza, M., Christou, P., Capell, T., 2014. Recombinant plant-derived pharmaceutical proteins: current technical and economic bottlenecks. *Biotechnol. Lett.* 36, 2367–2379.

264. Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Courtin, P., Armalyte, J., Meyrand, M., Giaouris, E., Palussière, S., Furlan, S., Péchoux, C., Ainsworth, S., Mahony, J., Van Sinderen, D., Kulakauskas, S., Guérardel, Y., Chapot-Chartier, M.P., 2017. Another brick in the wall: a rhamnan polysaccharide trapped inside peptidoglycan of *Lactococcus lactis*. *MBio* 8, e01303–e01317.

265. Samsudin, F., Ortiz-Suarez, M.L., Piggot, T.J., Bond, P.J., Khalid, S., 2016. OmpA: a flexible clamp for bacterial cell wall attachment. *Structure* 24, 2227–2235.

266. Sánchez-Encinales, V., Álvarez-Marín, R., Pachón-Ibáñez, M.E., Fernández-Cuenca, F., Pascual, A., Garnacho-Montero, J., Martínez-Martínez, L., Vila, J., Tomás, M.M., Cisneros, J.M., Bou, G., Rodríguez-Baño, J., Pachón, J., Smani, Y., 2017. Overproduction of outer membrane protein a by *Acinetobacter baumannii* as a risk factor for nosocomial pneumonia, bacteremia, and mortality rate increase. *J. Infect. Dis.* 215, 966–974.
267. Sanchez-Garcia, L., Martín, L., Mangues, R., Ferrer-Miralles, N., Vázquez, E., Villaverde, A., 2016. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microb. Cell Fact.* 15.
268. Sasnauskas, K., Bulavaite, A., Hale, A., Jin, L., Knowles, W.A., Gedvilaite, A., Dargevičiute, A., Bartkevičiute, D., Žvirbliene, A., Staniulis, J., Brown, D.W., Ulrich, R., 2002. Generation of recombinant virus-like particles of human and non-human polyomaviruses in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Intervirology* 45, 308–317.
269. Sasnauskas, K., Buzaitė, O., Vogel, F., Jandrig, B., Razanskas, R., Staniulis, J., Scherneck, S., Krüger, D.H., Ulrich, R., 1999. Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. *Biol. Chem.* 380, 381–386.
270. Sasnauskas, K., Jomantien, R., Januska, A., Lebedien, E., Lebedys, J., Janulaitis, A., 1992. Cloning and analysis of a *Candida maltosa* gene which confers resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 122, 207–211.
271. Saunders, K., Lomonosoff, G.P., 2017. In planta synthesis of designer-length tobacco mosaic virus-based nano-rods that can be used to fabricate nano-wires. *Front. Plant Sci.* 8, 1335.
272. Schlick, T.L., Ding, Z., Kovacs, E.W., Francis, M.B., 2005. Dual-surface modification of the tobacco mosaic virus. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 3718–3723.
273. Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
274. Serradell, M.C., Rupil, L.L., Martino, R.A., Prucca, C.G., Carranza, P.G., Saura, A., Fernández, E.A., Gargantini, P.R., Tenaglia, A.H., Petiti, J.P., Tonelli, R.R., Reinoso-Vizcaino, N., Echenique, J., Berod, L., Piaggio, E., Bellier, B., Sparwasser, T., Klatzmann, D., Luján, H.D., 2019. Efficient oral vaccination by bioengineering virus-like particles with protozoan surface proteins. *Nat. Commun.* 10: 361.
275. Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., D’Ari, R., 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* 189, 8746–8749.
276. Shan, W., Zhang, D., Wu, Y., Lv, X., Hu, B., Zhou, X., Ye, S., Bi, S., Ren, L., Zhang, X., 2018. Modularized peptides modified HBc virus-like particles for encapsulation and tumor-targeted delivery of doxorubicin. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 14, 725–734.
277. Shenton, W., Douglas, T., Young, M., Stubbs, G., Mann, S., 1999. Inorganic-organic nanotube composites from template mineralization of

tobacco mosaic virus. *Adv. Mater.* 11, 253–256.

278. Shukla, S., Ablack, A.L., Wen, A.M., Lee, K.L., Lewis, J.D., Steinmetz, N.F., 2012. Increased tumor homing and tissue penetration of the filamentous plant viral nanoparticle potato virus X. *Mol. Pharm.* 10, 33–42.

279. Shukla, S., Dickmeis, C., Nagarajan, A.S., Fischer, R., Commandeur, U., Steinmetz, N.F., 2014. Molecular farming of fluorescent virus-based nanoparticles for optical imaging in plants, human cells and mouse models. *Biomater. Sci.* 2, 784–797.

280. Shukla, S., Eber, F.J., Nagarajan, A.S., Difrancia, N.A., Schmidt, N., Virology, P., Wen, A.M., Eiben, S., Twyman, R.M., Wege, C., Steinmetz, N.F., 2015. The impact of aspect ratio on the biodistribution and tumor homing of rigid soft-matter nanorods. *Adv. Heal. Mater.* 4, 874–882.

281. Šimoliūnas, E., 2017. Bakteriofagų struktūrinių baltymų panaudojimas savitvarkių nanostruktūrų susirinkimui [disertacija]. Vilnius: Vilniaus universitetas, Lietuva.

282. Šimoliūnas, E., Truncaitė, L., Rutkienė, R., Povilonienė, S., Goda, K., Kaupinis, A., Valius, M., Meškys, R., 2019. The robust self-assembling tubular nanostructures formed by gp053 from phage vB_EcoM_FV3. *Viruses* 11, 50.

283. Singh, P., Prasuhn, D., Yeh, R.M., Destito, G., Rae, C.S., Osborn, K., Finn, M.G., Manchester, M., 2007. Bio-distribution, toxicity and pathology of cowpea mosaic virus nanoparticles in vivo. *J. Control. Release* 120, 41–50.

284. Skerniškytė, J., 2019. *Acinetobacter baumannii* patogenezės molekuliniai mechanizmai [disertacija]. Vilnius: Vilniaus universitetas, Lietuva.

285. Skerniškytė, J., Karazijaitė, E., Deschamps, J., Krasauskas, R., Armalytė, J., Briandet, R., Sužiedėlienė, E., 2019a. Bfp1 protein shows virulence-associated features and elicits protective immunity to *Acinetobacter baumannii* infection. *BMC Microbiol.* 19, 259.

286. Skerniškytė, J., Karazijaitė, E., Deschamps, J., Krasauskas, R., Briandet, R., Sužiedėlienė, E., 2019b. The mutation of conservative Asp268 residue in the peptidoglycan-associated domain of the OmpA. *Molecules* 24, 1972.

287. Skerniškytė, J., Karazijaitė, E., Lučiūnaitė, A., Sužiedėlienė, E., 2021. OmpA protein-deficient *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles trigger reduced inflammatory response. *Pathogens* 10, 407.

288. Slavov, N., Botstein, D., 2011. Coupling among growth rate response, metabolic cycle, and cell division cycle in yeast. *Mol. Biol. Cell* 22, 1997–2009.

289. Slibinskas, R., Samuel, D., Gedvilaite, A., Staniulis, J., Sasnauskas, K., 2004. Synthesis of the measles virus nucleoprotein in yeast *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 107, 115–124.

290. Smani, Y., Fabrega, A., Roca, I., Sánchez-Encinales, V., Vila, J., Pachón, J., 2014. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 1806–1808.

291. Smith, J.D., Morton, L.D., Ulery, B.D., 2015. Nanoparticles as synthetic vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* 34, 217–224.
292. Smith, M.L., Lindbo, J.A., Dillard-Telm, S., Brosio, P.M., Lasnik, A.B., McCormick, A.A., Nguyen, L. V., Palmer, K.E., 2006. Modified tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications. *Virology* 348, 475–488.
293. Smith, M.T., Hawes, A.K., Bundy, B.C., 2013. Reengineering viruses and virus-like particles through chemical functionalization strategies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 620–626.
294. Smith, S.G.J., Mahon, V., Lambert, M.A., Fagan, R.P., 2007. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol. Lett.* 273, 1–11.
295. Špakova, A., Šimoliūnas, E., Batiuškaitė, R., Pajeda, S., Meškys, R., Petraitytė-Burneikienė, R., 2019. Self-assembly of tail tube protein of bacteriophage vB_EcoS_NBD2 into extremely long polytubes in *E. coli* and *S. cerevisiae*. *Viruses* 11, e208.
296. Spellberg, B., Rex, J.H., 2013. The value of single-pathogen antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 12, 963.
297. Spinelli, S., Campanacci, V., Blangy, S., Moineau, S., Tegoni, M., Cambillau, C., 2006. Modular structure of the receptor binding proteins of *Lactococcus lactis* phages: the RBP structure of the temperate phage TP901-1. *J. Biol. Chem.* 281, 14256–14262.
298. Steinmetz, N.F., Miertens, M.E., Taurog, R.E., Johnson, J.E., Commandeur, U., Fischer, R., Manchester, M., 2010. Potato virus X as a novel platform for potential biomedical applications. *Nano Lett.* 10, 305–312.
299. Stevens, C.E., Taylor, P.E., Tong, M.J., Toy, P.T., Vyas, G.N., Nair, P. V., Weissman, J.Y., Krugman, S., 1987. Yeast-recombinant hepatitis B vaccine: efficacy with hepatitis B immune globulin in prevention of perinatal hepatitis B virus transmission. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 257, 2612–2616.
300. Strable, E., Finn, M.G., 2009. Chemical modification of viruses and virus-like particles. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 327, 1–21.
301. Sun, Z.Z., Hayes, C.A., Shin, J., Caschera, F., Murray, R.M., Noireaux, V., 2013. Protocols for implementing an *Escherichia coli* based TX-TL cell-free expression system for synthetic biology. *J. Vis. Exp.* 50762.
302. Tagit, O., De Ruyter, M. V., Brasch, M., Ma, Y., Cornelissen, J.J.L.M., 2017. Quantum dot encapsulation in virus-like particles with tuneable structural properties and low toxicity. *RSC Adv.* 7, 38110–38118.
303. Tamošiūnas, P.L., Simutis, K., Kodzė, I., Firantienė, R., Emužytė, R., Petraitytė-Burneikienė, R., Zvirblienė, A., Sasnauskas, K., 2013. Production of human parvovirus 4 VP2 virus-like particles in yeast and their evaluation as an antigen for detection of virus-specific antibodies in human serum. *Intervirology* 56, 271–277.
304. Tan, F.H., Kong, J.C., Ng, J.F., Alitheen, N.B., Wong, C.L., Yong, C.Y., Lee, K.W., 2021. Recombinant turnip yellow mosaic virus coat protein as a potential nanocarrier. *J. Appl. Microbiol.* 131, 2072–2080.

305. Tang, H., Wang, S., Wang, J., Song, M., Xu, M., Zhang, M., Shen, Y., Hou, J., Bao, X., 2016. N-hypermannose glycosylation disruption enhances recombinant protein production by regulating secretory pathway and cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* 6, 25654.
306. Taylor, N.M.I., Prokhorov, N.S., Guerrero-Ferreira, R.C., Shneider, M.M., Browning, C., Goldie, K.N., Stahlberg, H., Leiman, P.G., 2016. Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction. *Nature* 533, 346–352.
307. Taylor, N.M.I., van Raaij, M.J., Leiman, P.G., 2018. Contractile injection systems of bacteriophages and related systems. *Mol. Microbiol.* 108, 6–15.
308. Thomas, J.A., 2007. Locking self-assembly: strategies and outcomes. *Chem. Soc. Rev.* 36, 856–868.
309. Tian, Y., Zhou, M., Shi, H., Gao, S., Xie, G., Zhu, M., Wu, M., Chen, J., Niu, Z., 2018. Integration of cell-penetrating peptides with rod-like bionanoparticles: virus-inspired gene-silencing technology. *Nano Lett.* 18, 5453–5460.
310. Toy, R., Peiris, P.M., Ghaghada, K.B., Karathanasis, E., 2014. Shaping cancer nanomedicine: the effect of particle shape on the *in vivo* journey of nanoparticles. *Nanomedicine* 9, 121–134.
311. Tseng, R.J., Tsai, C., Ma, L., Ouyang, J., Ozkan, C.S., Yang, Y., 2006. Digital memory device based on tobacco mosaic virus conjugated with nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* 1, 72–77.
312. Tu, Y.F., Chien, C.S., Yarmishyn, A.A., Lin, Y.Y., Luo, Y.H., Lin, Y.T., Lai, W.Y., Yang, D.M., Chou, S.J., Yang, Y.P., Wang, M.L., Chiou, S.H., 2020. A review of SARS-CoV-2 and the ongoing clinical trials. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2657.
313. Tuladhar, E., Bouwknegt, M., Zwietering, M.H., Koopmans, M., Duizer, E., 2012. Thermal stability of structurally different viruses with proven or potential relevance to food safety. *J. Appl. Microbiol.* 112, 1050–1057.
314. Uhde-Holzem, K., Fischer, R., Commandeur, U., 2007. Genetic stability of recombinant potato virus X virus vectors presenting foreign epitopes. *Arch. Virol.* 152, 805–811.
315. Uhde, K., Fischer, R., Commandeur, U., 2005. Expression of multiple foreign epitopes presented as synthetic antigens on the surface of potato virus X particles. *Arch. Virol.* 150, 327–340.
316. Urakami, A., Sakurai, A., Ishikawa, M., Yap, M.L., Flores-Garcia, Y., Haseda, Y., Aoshi, T., Zavala, F.P., Rossmann, M.G., Kuno, S., Ueno, R., Akahata, W., 2017. Development of a novel virus-like particle vaccine platform that mimics the immature form of alphavirus. *Clin. Vaccine Immunol.* 24, e00090-e00117.
317. Veesler, D., Cambillau, C., 2011. A common evolutionary origin for tailed-bacteriophage functional modules and bacterial machineries. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 423–433.

318. Viale, A.M., Evans, B.A., 2020. Microevolution in the major outer membrane protein OmpA of *Acinetobacter baumannii*. *Microb. Genomics* 6, 1–14.
319. Vieira Gomes, A., Souza Carmo, T., Silva Carvalho, L., Mendonça Bahia, F., Parachin, N., 2018. Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. *Microorganisms* 6, 38.
320. Villadangos, J.A., Schnorrer, P., 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 543–555.
321. Walboomers, J.M.M., Jacobs, M. V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K. V., Snijders, P.J.F., Peto, J., Meijer, C.J.L.M., Muñoz, N., 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189, 12–19.
322. Wang-Lin, S.X., Olson, R., Beanan, J.M., MacDonald, U., Balthasar, J.P., Russo, T.A., 2017. The capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* is an obstacle for therapeutic passive immunization strategies. *Infect. Immun.* 85, e00591–e00617.
323. Wang, D., Zhang, S., Zou, Y., Yu, W., Jiang, Y., Zhan, Y., Wang, N., Dong, Y., Yang, Y., 2018. Structure-based design of porcine circovirus type 2 chimeric VLPs (cVLPs) displays foreign peptides on the capsid surface. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 232.
324. Wang, G., Huang, M., Nielsen, J., 2017. Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 48, 77–84.
325. Wang, J., Brackmann, M., Castaño-Díez, D., Kudryashev, M., Goldie, K.N., Maier, T., Stahlberg, H., Basler, M., 2017. Cryo-EM structure of the extended type VI secretion system sheath-tube complex. *Nat. Microbiol.* 2, 1507–1512.
326. Wang, Q., Kaltgrad, E., Lin, T., Johnson, J.E., Finn, M.G., 2002. Natural supramolecular building blocks: wild-type cowpea mosaic virus. *Chem. Biol.* 9, 805–811.
327. Webby, R.J., Webster, R.G., 2003. Are we ready for pandemic influenza? *Science* 302, 1519–1522.
328. Wei, D., Zhao, X., Chen, L., Lan, X., Li, Y., Lin, Y., Wang, Q., 2014. Viral nanoparticles as antigen carriers: influence of shape on humoral immune responses in vivo. *RSC Adv.* 4, 23017–23021.
329. Wen, A.M., Steinmetz, N.F., 2016. Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy. *Chem. Soc. Rev.* 45, 4074–4126.
330. Wheeler, C.M., Kjaer, S.K., Sigurdsson, K., Iversen, O.E., Mauricio, H.A., Perez, G., Brown, D.R., Koutsky, L.A., Tay, E.H., García, P., Ault, K.A., Garland, S.M., Leodolter, S., Olsson, S.E., Tang, G.W.K., Ferris, D.G., Paavonen, J., Steben, M., Bosch, F.X., Dillner, J., Joura, E.A., Kurman, R.J., Majewski, S., Muñoz, N., Myers, E.R., Villa, L.L., Taddeo, F.J., Roberts, C., Tadesse, A., Bryan, J., Lupinacci, L.C., Giacoletti, K.E.D., James, M.,

Vuocolo, S., Hesley, T.M., Barra, E., 2009. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; Types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine hpv types in sexually active women aged 16-26 years. *J. Infect. Dis.* 199, 936–944.

331. WHO, 2021. COVID-19 – Landscape of novel coronavirus candidate vaccine development worldwide [<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>; duomenys tikrinti 2021 09 14].

332. Wi, S., Seong Hwang, I., Hoon Jo, B., 2020. Engineering a plant viral coat protein for in vitro hybrid self-assembly of CO₂-capturing catalytic nanofilaments. *Biomacromolecules* 21, 3847–3856.

333. Wiczorek, M., Abualrous, E.T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F., Freund, C., 2017. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation. *Front. Immunol.* 8, 292.

334. Willyard, C., 2017. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature* 543, 15.

335. Wimmer, E., Hellen, C.V.T., Cao, X., 1993. Genetics of poliovirus. *Annu. Rev. Genet.* 27, 353–436.

336. World Health Organization, 2017. Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities. Geneva: World Health Organization.

337. Worst, E.G., Exner, M.P., De Simone, A., Schenkelberger, M., Noireaux, V., Budisa, N., Ott, A., 2015. Cell-free expression with the toxic amino acid canavanine. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 25, 3658–3660.

338. Wu, M., Shi, J., Fan, D., Zhou, Q., Wang, F., Niu, Z., Huang, Y., 2013. Biobehavior in normal and tumor-bearing mice of tobacco mosaic virus. *Biomacromolecules* 14, 4032–4037.

339. Xiao, S.J., Brunner, S., Wieland, M., 2004. Reactions of surface amines with heterobifunctional cross-linkers bearing both succinimidyl ester and maleimide for grafting biomolecules. *J. Phys. Chem. B* 108, 16508–16517.

340. Xiao, Y., Zhao, P., Du, J., Li, X., Lu, W., Hao, X., Dong, B., Yu, Y., Wang, L., 2018. High-level expression and immunogenicity of porcine circovirus type 2b capsid protein without nuclear localization signal expressed in *Hansenula polymorpha*. *Biologicals* 51, 18–24.

341. Xu, Jin, Guo, H.C., Wei, Y.Q., Dong, H., Han, S.C., Ao, D., Sun, D.H., Wang, H.M., Cao, S.Z., Sun, S.Q., 2014. Self-assembly of virus-like particles of canine parvovirus capsid protein expressed from *Escherichia coli* and application as virus-like particle vaccine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014 988 98, 3529–3538.

342. Xu, Jun, Hendrix, R.W., Duda, R.L., 2014. Chaperone-protein interactions that mediate assembly of the bacteriophage lambda tail to the correct length. *J. Mol. Biol.* 426, 1004–1018.

343. Xu, J., Hendrix, R.W., Duda, R.L., 2013. A balanced ratio of proteins from gene G and frameshift-extended gene GT is required for phage lambda tail assembly. *J. Mol. Biol.* 425, 3476–3487.
344. Yamamoto, T., Hoshikawa, K., Ezura, K., Okazawa, R., Fujita, S., Takaoka, M., Mason, H.S., Ezura, H., Miura, K., 2018. Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants. *Sci. Rep.* 8, 4755.
345. Yang, C. Da, Lai, C.Y., Jong, M.H., Liang, C.M., Lin, Y.L., Lin, N.S., Hsu, Y.H., Liang, S.M., Liao, J.T., 2007. Induction of protective immunity in swine by recombinant bamboo mosaic virus expressing foot-and-mouth disease virus epitopes. *BMC Biotechnol.* 7, 62.
346. Yang, J., Zhang, Q., Liu, Y., Zhang, X., Shan, W., Ye, S., Zhou, X., Ge, Y., Wang, X., Ren, L., 2020. Nanoparticle-based co-delivery of siRNA and paclitaxel for dual-targeting of glioblastoma. *Nanomedicine* 15, 1391–1409.
347. Yee, C.M., Zak, A.J., Hill, B.D., Wen, F., 2018. The coming age of insect cells for manufacturing and development of protein therapeutics. *Ind. Eng. Chem. Res.* 57, 10061–10070.
348. Yi, H., Ghosh, D., Ham, M., Qi, J., Barone, P., Strano, M., Belcher, A., 2012. M13 phage-functionalized single-walled carbon nanotubes as nanoprobes for second near-infrared window fluorescence imaging of targeted tumors. *Nano Lett.* 12, 1176–1183.
349. Zaki, A.M., van Boheemen, S., Bestebroer, T.M., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., 2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 367, 1814–1820.
350. Zeltins, A., 2016. Viral Nanoparticles. Principles of construction and characterization, in: *Viral nanotechnology*. Khudyakov, Y.E., Pumpens, P. (Eds.); CRC Press, Taylor & Francis group, Boca Raton, FL, USA, pp 93–120.
351. Zeltins, A., 2013. Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Mol. Biotechnol.* 53, 92–107.
352. Zhang, B., Yin, S., Wang, Y., Su, Z., Bi, J., 2021. Cost-effective purification process development for chimeric hepatitis B core (HBc) virus-like particles assisted by molecular dynamic simulation. *Eng. Life Sci.* 21, 438–452.
353. Zhang, Q., Shan, W., Ai, C., Chen, Z., Zhou, T., Lv, X., Zhou, X., Ye, S., Ren, L., Wang, X., 2018. Construction of multifunctional Fe₃O₄-MTX@HBc nanoparticles for mr imaging and photothermal therapy/chemotherapy. *Nanotheranostics* 2, 87–95.
354. Zhang, Y., 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9, 40.
355. Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, B., Yin, S., Li, X., Zhao, D., Wang, W., Bi, J., Su, Z., 2021. In vitro preparation of uniform and nucleic acid free hepatitis B core particles through an optimized disassembly-purification-reassembly process. *Protein Expr. Purif.* 178, 105747.

356. Zhang, Y., Skolnick, J., 2004. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 57, 702–710.
357. Zheng, C., Yang, L., Hoopmann, M.R., Eng, J.K., Tang, X., Weisbrod, C.R., Bruce, J.E., 2011. Cross-linking measurements of *in vivo* protein complex topologies. *Mol. Cell. Proteomics* 10, m110.006841.
358. Zheng, W., Wang, F., Taylor, N.M.I., Guerrero-Ferreira, R.C., Leiman, P.G., Egelman, E.H., 2017. Refined cryo-EM structure of the T4 tail tube: exploring the lowest dose limit. *Structure* 25, 1436–1441.
359. Zhou, H., Yao, Y., Zhu, B., Ren, D., Yang, Q., Fu, Y., Yu, Y., Zhou, J., 2019. Risk factors for acquisition and mortality of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia; a retrospective study from a Chinese hospital. *Medicine (Baltimore)*. 98, e14937.
360. Zhu, F.C., Zhang, J., Zhang, X.F., Zhou, C., Wang, Z.Z., Huang, S.J., Wang, H., Yang, C.L., Jiang, H.M., Cai, J.P., Wang, Y.J., Ai, X., Hu, Y.M., Tang, Q., Yao, X., Yan, Q., Xian, Y.L., Wu, T., Li, Y.M., Miao, J., Ng, M.H., Shih, J.W.K., Xia, N.S., 2010. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 376, 895–902.
361. Zimmerman, E.S., Heibeck, T.H., Gill, A., Li, X., Murray, C.J., Madlansacay, M.R., Tran, C., Uter, N.T., Yin, G., Rivers, P.J., Yam, A.Y., Wang, W.D., Steiner, A.R., Bajad, S.U., Penta, K., Yang, W., Hallam, T.J., Thanos, C.D., Sato, A.K., 2014. Production of site-specific antibody-drug conjugates using optimized non-natural amino acids in a cell-free expression system. *Bioconjug. Chem.* 25, 351–361.
362. Zimmermann, L., Stephens, A., Nam, S.Z., Rau, D., Kubler, J., Lozajic, M., Gabler, F., Söding, J., Lupas, A.N., Alva, V., 2018. A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. *J. Mol. Biol.* 430, 2237–2243.
363. Zinke, M., Sachowsky, K.A.A., Öster, C., Zinn-Justin, S., Ravelli, R., Schröder, G.F., Habeck, M., Lange, A., 2020. Architecture of the flexible tail tube of bacteriophage SPP1. *Nat. Commun.* 11, 5759.
364. Zivanovic, Y., Confalonieri, F., Ponchon, L., Lurz, R., Chami, M., Flayhan, A., Renouard, M., Huet, A., Decottignies, P., Davidson, A.R., Breyton, C., Boulanger, P., 2014. Insights into bacteriophage T5 structure from analysis of its morphogenesis genes and protein components. *J. Virol. Methods* 88, 1162–1174.
365. Zvirbliene, A., Samonskyte, L., Gedvilaite, A., Voronkova, T., Ulrich, R., Sasnauskas, K., 2006. Generation of monoclonal antibodies of desired specificity using chimeric polyomavirus-derived virus-like particles. *J. Immunol. Methods* 311, 57–70.

CURRICULUM VITAE

Vardas, Pavardė	ALIONA AVIŽINIENĖ (ŠPAKOVA)
Gimimo data	1991-12-23
Darbo adresas, el. paštas	Vilniaus Universitetas (VU), Gyvybės mokslų centras (GMC), Biotechnologijos institutas (BTI), Eukariotų genų inžinerijos skyrius (EGIS), Saulėtekio al. 7, C469 kab., Vilnius. aliona.aviziniene@bti.vu.lt
Išsilavinimas	
2010-2014 m.	VU, Genetikos bakalauro laipsnis
2014-2016 m.	VU, Genetikos magistro laipsnis
2016-2020 m.	Chemijos inžinerijos doktorantūros studijos, VU GMC BTI EGIS
Darbo patirtis	
2013-2018 m.	VU GMC BTI EGIS laborantė
Nuo 2018 m.	VU GMC BTI EGIS jaunesnioji mokslo darbuotoja
Mokslinė stažuotė	
2017 m. 04.20-23	Mokslinė komandiruotė Valstybiniame gyvūnų sveikatos tyrimų institute, Vokietijoje (Friedrich Loeffler Institut).
Apdovanojimai ir sertifikatai	
2020 m.	Geriausio standinio pranešimo apdovanojimas tarptautinėje <i>“International Conference of Life Sciences The COINS”</i> konferencijoje, Vilnius, Lietuva.
2019 m.	VU GMC vardinė stipendija už mokslinius pasiekimus.
2019 m.	Lietuvos Mokslo Tarybos vienkartinė tikslinė stipendija už mokslinius pasiekimus.
2018 m.	Garbės sertifikatas ir apdovanojimas už moderavimą tarptautinėje konferencijoje <i>“23rd International Conference on Pharmaceutical Biotechnology”</i> , Roma, Italija.
2018 m.	Antros vietos apdovanojimas už geriausių žodinių pristatymą tarptautinėje <i>“Science for Health”</i> konferencijoje, Kaunas, Lietuva.
2018 m.	Geriausio standinio pranešimo apdovanojimas tarptautinėje <i>“International Conference of Life Sciences The COINS”</i> konferencijoje, Vilnius, Lietuva.

Lentelės tęsinys kitame puslapyje

Mokslo populiarinimo ir edukacinė veikla

Nuo 2020 m.	VU Molekulinės biologijos magistro studijų studentų baigiamųjų darbų konsultantė (R. Insodaitė, G. Motiejūnaitė).
2016-2020 m.	VU molekulinės biologijos, biochemijos ir genetikos bakalauro studijų studentų baigiamųjų darbų vadovė (R. Žemaitytė, G. Pételytė, R. Batiuškaitė, R. Insodaitė, G. Motiejūnaitė).
2016 m. 11-12 mėn., 2018 m. 05-06 mėn.	Doktorančių M. Dafalla ir K. Jeske iš Friedrich Loeffler tyrimų instituto (Greifswald-Insel Riems, Vokietija) priėmimas ir vadovavimas jų atliekamiems tyrimams VU GMC EGIS.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo vadovei dr. Rasai Petraitytei-Burneikienei už suteiktą galimybę dirbti ir tobulėti EGIS skyriuje. Rasa, ačiū, kad manimi tikėjote, dalinotės savo idėjomis bei patirtimi. Esu be galo dėkinga už nevaržomas galimybes dalyvauti tarptautinėse mokslinėse konferencijose pristatant mokslinius pasiekimus mokslininkams iš viso pasaulio.

Taip pat dėkoju visam EGIS kolektyvui už sukurta šaunią darbinę aplinką. Dėkoju dr. Almai Gedvilaitei už vertingas pastabas, suteiktas žinias ir naudingus patarimus rašant šį darbą. Ačiū Jutai Rainytei, Justui Lazutkai, Pauliui Lukui Tamošiūnui, Danguolei Žiogienei, Mildai Norkienei bei Arūnei Verbickaitei už patarimus, idėjas, palaikymą bei už tai, kad laboratoriją pavertė antraisiais namais. Ačiū buvusioms ir esamoms mano studentėms: Gertrūdei Pėtelytei, Ramintai Batiuškaitei, Rūtai Žemaitytei, Rasai Insodaitei bei Gertrūdei Motiejūnaitei, nes mokydama savo studentes, tobulėjau kartu su jomis.

Taip pat dėkoju Biotechnologijos instituto ILBS kolektyvui už malonų ir produktyvų bendradarbiavimą. Ypatingai dėkoju prof. Aurelijai Žvirblienei už vertingas pastabas bei Andrei Dalgėdienei už atliktas pelių imunizacijas, antikūnus, mokslines diskusijas, pamokymus bei pagalbą rašant antrąjį mokslinį straipsnį.

Dėkoju kolegoms iš Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus. Ypatingai ačiū prof. Rolandui Meškiui už tyrimų objektą – bakteriofago vB_EcoS_NBD2 ataugos vamzdelio baltymą gp39, už naudingus patarimus ir įdomias mokslines diskusijas. Už mokslinį susidomėjimą savaime susirenkančiomis struktūromis ypatingai dėkoju dr. Eugenijui Šimoliūnui. Nepamiršiu įdomių mokslinių diskusijų rašant mano pirmąjį mokslinį straipsnį. Monika Šimoliūniene, ačiū, kad buvai šalia ir palaikai mane.

Galiausiai, noriu nuoširdžiai padėkoti savo šeimai, nes mylimų žmonių palaikymas buvo didžiausias motyvuojantis veiksnys tobulėti ir nesustoti. Ačiū mamai ir sesei, kurios manimi tikėjo ir niekad neabejojo mano sugebėjimais. Ačiū mano vyrui Tomui už meilę ir pasiaukojimą klausant beveik visų mano mokslinių pristatymų ir už vertingus patarimus. Ačiū tau, Tomai, už tavo palaikymą visur ir visada.

Jūsų visų dėka rašau šias paskutines disertacijos eilutes.

Aliona

2021 m. lapkričio mėn.

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 11 egz.