

VILNIAUS UNIVERSITETAS

RŪTA KANANAVIČIŪTĖ

GEOBACILLUS GENTIES BAKTERIJŲ GENETINĖS
TRANSFORMACIJOS SISTEMOS KŪRIMAS

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, Biologija (01B)

Vilnius, 2015 metai

Disertacija rengta Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje 2008–2012 m. studijuojant doktorantūroje ir ginama eksternu

Mokslinis konsultantas – prof. dr. Donaldas Jonas Čitavičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

Turinys:

ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	10
1.1. <i>Geobacillus</i> genties bakterijų privalumai ir jų panaudojimo galimybės	10
1.2. Genetinės vektoriaus-šeimininko sistemos	12
1.2.1. Šeimininkas	13
1.2.2. Vektoriai	16
1.2.2.1. <i>Geobacillus</i> genties bakterijų plazmidės, šioms bakterijoms taikomi vektoriai	22
1.2.2.2. Atrankos žymuo	25
1.2.2.3. Promotoriai genų raiškai <i>Geobacillus</i> spp. ląstelėse	27
1.2.3. Transformacijos metodai	28
1.2.3.1. Protoplastų transformacija	30
1.2.3.2. Elektrotransformacija	31
1.2.3.3. Konjugacinis pernešimas	33
1.2.3.4. Šeimininko R-M sistemos įveikimo būdai	34
1.3. Pasiekimai <i>Geobacillus</i> spp. genetinėje inžinerijoje	35
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	37
2.1. Bakterijų kamienai, jų auginimo sąlygos bei naudotos plazmidės	37
2.2. DNR išskyrimas ir valymas	38
2.3. DNR klonavimo darbai/Molekulinės biologijos darbai.....	39
2.4. DNR sekoskaita ir sekų bioinformatinė analizė.....	42
2.5. Bakterijų transformacija.....	43
2.6. <i>G. stearothermophilus</i> transformacijos sąlygų optimizavimas.....	43
2.7. Plazmidžių segregacinio stabilumo nustatymas.....	45
2.8. DNR-DNR hibridizacija „Southern blot“ metodu	45
2.9. Realaus laiko kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija	46
3. DARBO REZULTATAI IR APTARIMAS	47
3.1. Plazmidės turinčių kamienų nustatymas ir jų identifikavimas	47
3.2. Plazmidžių sekų nustatymas ir jų analizė	49
3.2.1. Plazmidės pGTD7 replikonas.....	56
3.2.2. Plazmidės pGTG5 replikonas.....	58
3.3. Plazmidžių pGTG5 ir pGTD7 viengrandės DNR formų nustatymas	60
3.4. Darbe aprašytų plazmidžių replikonų funkcionalumo nustatymas.....	61
3.4.1. Plazmidės pGTD7 dariniai	63
3.4.1.1. Plazmidės pUCK7 segregacinis stabilumas	64
3.4.1.2. Santykinio pUCK7 plazmidės kopijų skaičiaus, tenkančio vienai ląstelei, nustatymas	66
3.4.2. Plazmidės pGTG5 dariniai	67
3.5. <i>G. stearothermophilus</i> NUB3621R elektroporacijos sąlygų nustatymas	68
3.7.1. Auginimo terpės parinkimas.....	69
3.7.2. Ląstelių veikimas sienelę susilpninančiais ar membraną pralaidinančiais veiksniais.....	72

3.7.3. Augimo stadijos įtaka	73
3.7.4. Elektroporacijos terpės įtaka	75
3.7.5. Elektrinio lauko stiprio įtaka	76
4. DARBO APIBENDRINIMAS	77
STRAIPSNIAI IR PRANEŠIMAI	82
Literatūros sąrašas.....	84
PRIEDAI.....	99

TRUMPINIAI IR SANTRUMPOS

ar. – aminorūgštis

Amp^R – atsparumas ampicilinui, angl. resistance to ampicillin

ASR – atviro skaitymo rėmelis

bp – bazių poros

Cam^r – atsparumas chloramfenikoliui, angl. resistance to chloramphenicol

CRISPR – sutelktos, reguliariai pertrauktos, trumpos palindrominės sekos, angl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats

DNR – deoksiribonukleorūgštis

dso – dvigrandės DNR replikacijos pradžios sritis, angl. double strand oorigin

ETT – elektrotransformacijos terpė

Kan^R – atsparumas kanamicinui, angl. resistance to kanamycin

kb – kilobazė

KNTazė – kanamicino nukleotidiltransferazė

KSV – kolonijas sudarantys vienetai

LB – Luria-Bertani

MCS – daugybinis klonavimo regionas, angl. multiple cloning site

NB – maitinamasis buljonas, angl. nutrient broth

nt – nukleotidai

NDS – natrio dodecilsulfatas

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

PKS – plazmidės kopijų skaičius

REazė – restrikcijos endonukleazė

RBS – ribosomos prisijungimo seka, angl. ribosome binding site

RL-kPGR – realaus laiko kiekybinė PGR

R-M – restrikcija-modifikacija

RNazė – ribonukleazė A

rpm – apsisukimai per minutę, angl. revolutions per minute

RR – riedančio rato (mechanizmas)

rRNR – ribosominė RNR

sso – viengrandės DNR replikacijos pradžios sritis, angl. single strand oorigin

SAVOKOS

Bazinis replikonas – plazmidės minimali seka, užtikrinanti jos replikaciją ir apimanti reguliacines sritis.

Minimalus replikonas – plazmidės minimali sekos dalis, užtikrinanti jos dauginimąsi, tačiau neapimanti reguliacinių sričių.

ori – plazmidės seka, nuo kurios yra pradeda jos replikacija.

ĮVADAS

Geobacillus genčiai priklauso termofilinės, gramteigiamosios, endosporas formuojančios bakterijos. Pirmieji šios genties atstovai buvo išskirti beveik prieš šimtą metų (Donk, 1920) ir nuo pat jų atradimo, iš karto atkreipė mokslininkų dėmesį kaip modelinis organizmas, tinkamas lyginamiesiems mezofilinių ir termofilinių organizmų fiziologijos ir metabolizmo skirtumų tyrimams (Amelunxen ir Lins, 1968; Kim ir kt., 2005; Neilson ir kt., 1959). Vėliau *Geobacillus* genties bakterijos tapo ir biotechnologijos objektu, potencialiai galinčiu pagerinti įvairių bioprocėsų efektyvumą.

Visų pirma geobacilos yra įvairių svarbių termostabilių fermentų šaltinis. Daugybėje darbų yra aprašyti jų gaminami fermentai, kurie gali praversti tiek pramoniniuose bioprocuose (proteazės, amilazės, celiulazės, lipazės), tiek ir molekulinės biotechnologijos darbuose (DNR polimerazės, atvirkštinės transkriptazės) (McMullan ir kt., 2004, Mead ir kt., 1991, Vellore ir kt., 2004). Tačiau trūkstant efektyvių *Geobacillus* spp. baltymų ekspresijos sistemų, šiuo metu plačiai naudojami tik keletas iš jų.

Kai kuriuose bioprocuose yra tikslinga naudoti ne atskirus išgrynintus fermentus, o visas ląsteles, gaminančias rinkinį įvairių fermentų, reikalingų tam tikrų medžiagų biokonversijai. *Geobacillus* genties ląstelės yra vienos iš parankiausių tokių procesų vykdytojų. Šios bakterijos yra nereiklios auginimo sąlygoms (yra lengva sudaryti joms reikiamas auginimo sąlygas), jos pasižymi didele kataboline įvairove bei geba pasisavinti įvairias maistines medžiagas, įskaitant ir vieną prieinamiausių planetoje anglies šaltinių – lignoceliuliozę (Olson ir kt., 2012). Be to, vykdant kai kuriuos bioprocus, šių termofilinių bakterijų auginimas aukštoje temperatūroje (50 °C – 70 °C) suteikia joms pranašumą, lyginant su mezofilų biogamybinėmis sistemomis (Lin ir Xu., 2013).

Šios bakterijos gali būti naudojamos ne tik žmogui naudingiems bioproduktams gaminti, bet ir aplinkosaugos tikslais. Šiuo metu yra žinomi

Geobacillus genties kamieniai, galintys skaidyti įvairius fenolinius junginius (aptinkamus fungicidų sudėtyje), sintetinius organofosfanatus (tokius, kaip herbicidą glifosatą), alkanus, akrilamidą. Tokie kamieniai yra ypač pravartūs bioremediacijoje, įvairių organinių teršalų šalinimui bei atliekų valymui.

Nepaisant didžiulio susidomėjimo šiomis bakterijomis, šiuo metu galima paminėti vos keletą sėkmingo jų pritaikymo pavyzdžių. Pagrindinė priežastis, apsunkinanti šių termofilų tyrimus ir jų potencialo išnaudojimą, yra patikimų genetinės transformacijos sistemų trūkumas. Tiek siekiant įgyti žinių apie šiuos termofilus, tiek ir norint juos panaudoti, yra būtina turėti efektyvią metodologiją, kuria vadovaujantis būtų galima įvesti ar, priešingai, išveiklinti tam tikrus genus, keisti jų metabolinius kelius ir savybes ir galiausiai pagerinti norimo produkto išėigą bei padidinti jų vykdomų bioprocėsų efektyvumą.

Genetinę tam tikro mikroorganizmo transformacijos sistemą sudaro (1) vektorius, tarnaujantis kaip tam tikro DNR fragmento nešiklis, ir (2) metodas, naudojamas to vektoriaus pernešimui į ląstelę šeimininkę. Vektorių, tinkamų *Geobacillus* genčiai, pasirinkimas yra labai ribotas, o tam tikras jų pernašos metodas yra pritaikytas tik keletui *Geobacillus* genties kamienų.

Dėl to šiame darbe buvo siekiama praplėsti *Geobacillus* genties genetinės transformacijos galimybes.

Darbo tikslas:

- Sukurti genetinę sistemą *Geobacillus* genties bakterijų transformacijai.

Darbo uždaviniai:

- Naujų, mažos molekulinės masės, *Geobacillus* spp. plazmidžių apibūdinimas.
- *Geobacillus* genčiai tinkamų vektorių sukūrimas, naudojantis naujai šiame darbe aprašytų plazmidžių replikonais.
- DNR pernašos į *Geobacillus* spp. ląsteles metodo parinkimas ir jo optimizavimas.

Darbo mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė:

Šiame darbe aprašytos dvi naujos *Geobacillus* spp. plazmidės: pGTG5 ir pGTD7. Be šiame darbe aprašytų plazmidžių, yra žinomos vos kelios RR mechanizmu besireplikuojančios *Geobacillus* genties bakterijų plazmidės (pSTK1, pTB913). Pati mažiausia (tiek iš šiame darbe tirtų, tiek ir apskritai iš visų aprašytų geobacilų plazmidžių) yra pGTG5 plazmidė. Remiantis šios plazmidės analize, ji priklauso naujai neaprašytai plazmidžių šeimai, kuriai, tikėtina, būdingas replikacijos mechanizmas skiriasi nuo kitų bakterijų plazmidžių šeimų. Darbo rezultatai, gauti analizuojant šią plazmidę, prisideda prie plazmidžių biologijos tyrimų.

Antroji tirta plazmidė – pGTD7 – yra vienos geriausiai aprašytų pC194/pUB110 plazmidžių šeimos atstovė. Parodyta, kad jos replikonas gali funkcionuoti ne tik natyviame savo šeimininke, bet ir *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R ląstelėse. Be to, šis replikonas jį turinčiai plazmidei leidžia turėti didelį kopijų skaičių ir suteikia gana didelį segregacinį stabilumą. Taigi, ši plazmidė praplečia replikonų, tinkančių vektoriams konstruoti, pasirinkimą.

Šeimininku šiame darbe sukurtoms plazmidėms buvo pasirinktas vienas iš daugiausiai tirtų kamienų – *G. stearothermophilus* NUB3621R. Darbo metu sukurta metodika leidžia transformuoti *G. stearothermophilus* NUB3621R kamieną elektroporacijos būdu. Šis metodas yra daug patogesnis nei iki tol NUB3621R kamienui naudota protoplastų transformacija. Galimybė patogiai transformuoti šį *Geobacillus* genties kamieną palengvina jo tolimesnius tyrimus ir įgalina spartesnę jo panaudojimą įvairiems biotechnologiniams tikslams.

Gynimui pristatomi teiginiai:

- Naujų *Geobacillus* genties bakterijų plazmidžių paieška yra būtina siekiant praplėsti šioms bakterijoms skirtų vektorių pasirinkimą bei sukurti įvairias molekulinės priemonės, pasižyminčias pagerintomis savybėmis.

- Priešingai vyraujančiai nuomonei, riedančio rato replikacijos tipo plazmidžių pagrindu sukurti vektoriai gali pasižymėti aukštesniu stabilumu nei θ (teta) tipo plazmidžių replikonus turintys vektoriai.
- *Geobacillus* genties bakterijose galima rasti naujų plazmidžių, kurios labai skiriasi nuo visų iki šiol aprašytų plazmidžių ir kurios gali sudominti plazmidžių biologijos tyrinėtojus.
- Elektroporacijos metodas puikiai tinka *G. stearothermophilus* NUB3621R kamieno transformacijai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *Geobacillus* genties bakterijų privalumai ir jų panaudojimo galimybės

Geobacillus genties bakterijų gebėjimas augti aukštoje temperatūroje ir nereiklumas auginimo terpei yra pagrindinės savybės, dėl kurių šios bakterijos yra patrauklios įvairiose biotechnologijos srityse.

Geobacilos optimaliai auga esant 50–60 °C temperatūrai, taigi ir jų gaminami fermentai pasižymi aukštu termostabilumu. Baltymų gebėjimas neprarasti aktyvumo esant aukštai temperatūrai yra labai svarbi savybė, nulemianti jų paklausą pramoniniuose ar kituose biotechnologijos procesuose, kurie yra vykdomi esant aukštai temperatūrai (Bruins ir kt., 2001; Haki ir Rakshit, 2003; Inoue ir Sako, 2013). Paprastai fermentai savo tikrajame (natyviame) šeimininke yra gaminami nedideliais kiekiais. Tam, kad pramoniniu mastu būtų galima gauti pakankamą kokio nors baltymo kiekį, yra būtina pasitelkti molekulinės biotechnologijos priemones, kurios leistų ženkliai padidinti to baltymo išeią.

Šiuo metu beveik visi biotechnologiškai gaminami termofilų fermentai yra gaminami mezofiliniuose šeimininkuose. Dažniausiai tam naudojami *Escherichia coli* kamienai. Pavyzdžiui, tokiu būdu išgaunamos *G. stearothermophilus* restrikcijos endonukleazės BsaI, BsmI (New England Biolabs, Patentų Nr. US 6723546 B2 ir US6335190 B1). Tačiau heterologinių termostabilių baltymų gamybos mezofiliniame šeimininke būdas tinka ne visiems termofilų fermentams (Inoue ir Sako, 2013). Kai kurie termofilų genų produktai, gaminami *E. coli* ląstelėse, yra gaunami netirpūs, nes jų teisingam susilankstymui į kataliziškai aktyvią formą yra reikalinga aukšta temperatūra (Suzuki ir kt., 2013a). Taip pat termofilų baltymų heterologinę gamybą gali apsunkinti reikiamo kofaktoriaus trūkumas, GC sudėties ir kodonų skirtumai (Turner ir kt., 2007). Dėl šių priežasčių geobacilų baltymus būtų parankiau gaminti šeimininkais naudojant pačias *Geobacillus* genties ląsteles.

Nors *Geobacillus* genties bakterijos optimaliai auga, esant 50–60 °C temperatūrai, tačiau kai kurių kamienų augimo temperatūros ribos gali būti nuo

37 iki 80 °C (Coorevits ir kt., 2012; Nazina ir kt., 2001). Dėl tokio plataus augimo temperatūros diapazono kai kurie *Geobacillus* genties kamienai gali būti idealiais šeimininkais baltymų kryptinei evoliucijai vykdyti arba termostabiliems baltymų variantams iš jų mezofilinės kilmės pirmtakų kurti (Pourmir ir Johannes, 2012).

Geobacilų prisitaikymas augti esant aukštai temperatūrai yra svarbus biotechnologijoje ne tik dėl jų gaminamų termostabilių baltymų, bet ir dėl galimybės panaudoti šias bakterijas kaip „visos ląstelės“ biokatalizatorių fermentacijos procesuose (Tang ir kt., 2009; Xiao ir kt., 2012). Termofilų fermentuojančios kultūros turi daug privalumų prieš mezofilų kultūras (Lin ir Xu., 2013). Visų pirma aukšta temperatūra yra veiksnys, ribojantis užteršimo riziką bei stabdantis žmonių, gyvūnų ir augalų patogenų augimą. Vykdamt anaerobinę fermentaciją, aukšta temperatūra palengvina anaerobinių sąlygų palaikymą (dėl mažesnio deguonies tirpumo). Be to, aukšta fermentacijos temperatūra sumažina lakių produktų (etanolio, butanolio, izopropanolio) išgavimo kaštus bei energijos suvartojimą bioreaktoriui šaldyti (Woolston ir kt., 2013). Aukštų temperatūrų bioprosesuose gali būti naudojami ir kiti termofilai, tokie kaip gramneigiamosios *Thermus* ar *Thermotoga* genčių bakterijos, archėja *Thermococcus kodakariensis* (Cava ir kt., 2009; Frock ir Kelly, 2012). Visgi *Geobacillus* genties bakterijos pranoksta šiuos termofilinius mikroorganizmus dėl savo nereiklumo auginimo terpei ir aukšto išgyvenamumo net ir jų augimui nepalankiomis sąlygomis.

Geobacillus genties atstovai yra aptinkami įvairioje aplinkoje: nuo karštųjų versmių, požeminių naftos telkinių iki vidutinės temperatūros dirvos, ar netgi amžinojo įšalo (Zeigler, 2014). Toks jų paplitimas rodo šių bakterijų „nelepumą“ ir gebėjimą išlikti įvairiomis sąlygomis ir yra susijęs su jų formuojamomis endosporomis. Tai suteikia šioms bakterijoms dar vieną privalumą, kadangi jų gajumas palengvina *Geobacillus* genties kultūrų saugojimą ir transportavimą.

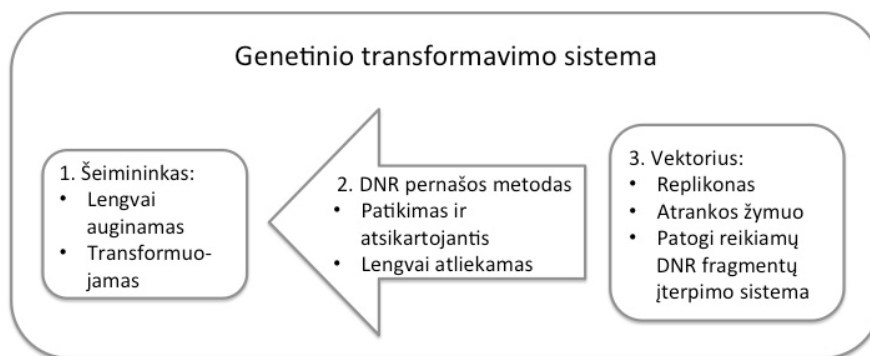
Geobacilos gali augti naudodamos įvairius anglies šaltinius, tarp jų ir ksilaną – vieną gausiausių hemiceliuliozės formų (Cordova ir Antoniewicz,

2015; Cordova ir kt., 2015; Brumm ir kt., 2015; Coorevits ir kt., 2012; Omokoko ir kt., 2008). Galimybė naudoti pigias ir lengvai prieinamas žaliavas šių bakterijų auginimui leidžia tikėtis, kad jų vykdomi bioprocesai gali būti ne tik efektyvūs, bet ir ekonomiškai naudingi.

Siekiant išnaudoti visus minėtus *Geobacillus* spp. privalumus ir įgyvendinti jų pritaikymą, yra būtina turėti patikimą genetinę (vektoriaus-šeimininko) sistemą, leidžiančią manipuliuoti jų genomu, keisti metabolinius kelius ar gauti aukštą jų gaminamų baltymų raišką (Hussein ir kt., 2015).

1.2. Genetinės vektoriaus-šeimininko sistemos

Genetinės tam tikro šeimininko transformacijos sistemos efektyvumą apsprendžia trys pagrindiniai veiksniai (1.1 pav.). Pirmasis jų yra pasirinkto šeimininko genetiškai nulemtos savybės bei jo kompetentinių ląstelių paruošimo būdas (Bosma ir kt., 2014; Zhang ir kt., 2012). Nors netransformuojamų bakterijų greičiausiai nėra, tačiau didžiosios jų daugumos atveju transformacijos sąlygų parinkimas yra ilgas ir varginantis darbas. Taigi antrasis transformacijos efektyvumą lemiantis veiksnys yra tinkamas vektoriaus pernašos į ląstelę metodas, kuris yra pasirenkamas priklausomai nuo ląstelės – būsimosios vektoriaus šeimininkės. Kai kurios bakterijų rūšys gali būti transformuojamos keliais skirtingais būdais, kurie yra pasirenkami priklausomai nuo jų efektyvumo bei kitų privalumų ar trūkumų (Aune ir Aachman, 2010; Yoshida ir Sato, 2009). Tuo tarpu kitų bakterijų transformacija yra pasiekama vos vienu metodu (Rhee ir kt., 2007). Galiausiai yra labai svarbu pasirinkti tinkamą vektorį. Vektoriai gali skirtis ne tik savo šeimininkų spektru, bet ir kopijų skaičiumi, stabilumu bei kitomis savybėmis (Taylor ir kt., 2011). Dėl to yra naudinga turėti rinkinį įvairių vektorių, iš kurių būtų galima rinktis, priklausomai nuo jų panaudojimo tikslo.



1.1. pav. Genetinio transformavimo sistemos elementai

Iki šio meto geobaciloms pritaikytų genetinių sistemų nėra daug, o ir jas vis dar reikia tobulinti. Pasiekimai, gauti *Geobacillus* bakterijų genetinės inžinerijos srityje, aprašyti tolimesniuose skyriuose. Taip pat aptariama metodologija, taikoma kitoms bakterijų gentims, ypatingą dėmesį sutelkiant į termofilines bakterijas ir geobaciloms giminingas mezofilines *Bacillus* spp. bakterijas.

1.2.1. Šeimininkas

Biotechnologijoje patogūs šeimininkai yra tokie mikroorganizmai, kurie 1) yra lengvai kultivuojami ir 2) gali būti lengvai genetiškai modifikuojami, suteikiant jiems naujų pageidaujamų savybių bei keičiant jų vykdomus metabolinius kelius. Daugybė *Geobacillus* genties kamienų puikiai atitinka pirmąją sąlygą, tačiau naudojant įvairias aprašytas metodikas, iki šio darbo parašymo datos, jų tebuvo transformuota vos keletas (žr. Priedas: 1 lentelė). Pažymėtini yra *Geobacillus stearothermophilus* NUB36 (Wu ir Welker, 1989; Couñago ir Shamoo, 2005), *Geobacillus thermoglucosidasius* NCIMB 11955 (Cripps ir kt., 2009; Bartosiak-Jentys ir kt., 2013; Van Zyl ir kt., 2013; Lin ir kt., 2014) ir *Geobacillus kaustophilus* HTA426 (Suzuki ir Yoshida, 2012) kamieniai, kurie iš kitų išsiskiria ypatingu tyrėjų dėmesiu.

Kadangi galimybė transformuoti bakterijas yra labai svarbus veiksnys, apsprendžiantis jų tolimesnį pritaikymą tam tikriems tikslams, kai kurie autoriai, rinkdamiesi savo darbo objektą, atlieka transformuojamų kamienų

paiešką tarp daugybės potencialių kandidatų (Narumi ir kt., 1992b). Bosma ir kt. (2014) išskyrę 44 termofilinių lazdelės formos bakterijų kamienus, pasižyminčių norimomis savybėmis, nustatė, kad tik trys iš jų gali būti transformuojami. Du iš šių kamienų priklausė *Geobacillus thermodenitrificans* rūšiai (gautas transformacijos efektyvumas – vos 4–6 transformantai/ μg DNR).

Sukurti *Geobacillus* genties bakterijų transformavimo protokolai (kaip ir daugybės kitų bakterijų atveju) paprastai nėra tokie efektyvūs, lyginant juos su metodikomis, sukurtomis vienam geriausiai ištirtų prokariotų – *E. coli*. Dėl to dažniausiai yra naudojami šaudykliniai vektoriai (aptariami 1.2.2 skyriuje), kurių pagalba naujai sukurtos rekombinantinės DNR molekulės yra padauginamos tarpiniame šeimininke, paprastai *E. coli* ląstelėse, ir tik tuomet perkeliamos į tikslinį šeimininką (Inoue ir Sako, 2013).

Naudojant kelis skirtingus šeimininkus gali būti susiduriama su keliomis kliūtimis. Pagrindinė jų – tai nesutampančios naudojamų šeimininkų restrikcijos-modifikacijos (R-M) sistemos (Monk ir Foster, 2012). R-M sistemos susijusios su dviejų fermentų aktyvumu: restrikcijos endonukleazės ir metiltransferazės. Metiltransferazė, atpažinusi tam tikras šeimininko DNR sekas, jas metilina ir tokiu būdu jas pažymi kaip savas. Tuo tarpu restrikcijos endonukleazės kardo svetimą DNR, jeigu ji nėra metilinta atitinkamose vietose. R-M sistemos yra suskirstytos į keturis pagrindinius tipus pagal jų sudarančių subvienetų sudėtį, atpažįstamas DNR sekas ir DNR kirpimo pozicijas, substrato specifiškumą bei kofaktorių būtinumą. Beveik visų sekvenuotų bakterijų genomuose yra aptinkama bent viena R-M sistema ir net 80% iš jų randamos kelios skirtingos R-M (Vasu ir Nagaraja, 2013). Ne išimtis yra ir *Geobacillus* spp. bakterijos, kurių genomuose aptinkamos 3–9 skirtingos R-M sistemos (REBASE restrikcijos endonukleazių duomenų bazė, Roberts ir kt., 2015). Tam, kad į ląsteles pernešama plazmidės DNR nebūtų degraduota, ji turėtų būti metilinta tokiu pačiu būdu, kaip ir būsimos ląstelės šeimininkės genomas.

Kita šeimininko sistema, apsauganti nuo svetimos į ląstelę patekusios DNR, yra CRISPR–Cas sistema. CRISPR lokusai ir su jais susijusių Cas

baltymų genai yra randami daugelio archėjų ir bakterijų genomuose. Šios sistemos suteikia bakterijoms galimybę, atpažinti tuos mobiliuosius genetinius elementus, su kuriais jos savo aplinkoje dažnai susiduria, t. y. įgyti jiems atsparumą. Tokiu būdu CRISPR sistemos baltymai gali atpažinti tam tikras sekas, sutampančias su plazmidžių (ar kitų mobilių genetinių elementų, pvz., bakteriofagų) sekų fragmentais ir jas sunaikinti (Jiang ir kt., 2013; Sorek ir kt., 2013). Taigi ši sistema gali blokuoti bakterijų (ypač laukinių jų kamienų, t. y. kamienų, kurie potencialiai yra susidūrę su plazmidėmis, turinčiomis vektoriui identišku sekos fragmentu) genetinę transformaciją.

Pritaikius tam tikrą metodą *Geobacillus* kamienų transformacijai, jie gali būti tobulinami toliau, sukuriant dar patogesnius šeiminius ar pritaikant juos tam tikriems tikslams.

Vienas iš sėkmingų pavyzdžių, kaip pasitelkus genų inžineriją yra pagerinamos ląstelių-šeiminių savybės, yra *Bacillus subtilis* kamienų modifikacijos. Siekiant pagerinti šių bakterijų augimą, yra sukurta keletas nesporuliuojančių kamienų ($\Delta spoIIIGA$, $\Delta spo0A$) (Kabisch ir kt., 2013; Yang ir kt., 2010). Tuo tarpu mutantiniai kamieniai, pasižymintys silpnesne lize ($\Delta lytC$) ar silpnesne užląstelinė proteazių raiška (išskirtos ar pažaidos proteazių AprA ir NprE genuose), yra efektyvesni sekretuojamų rekombinantinių baltymų gamintojai (Kabisch ir kt., 2013; Kawamura ir Doi, 1984).

Darbų, aprašančių *Geobacillus* kamienų patobulinimą, pritaikant juos tam tikriems tikslams nėra daug. Daugiausiai šia linkme yra nuveikę Suzuki ir jo darbo grupė. Sukurtas *G. kaustophilus* HTA426 mutantinis MK480 kamienas, kuriam yra būdingas didelis spontaninių mutacijų dažnis (išskritę 5 DNR reparacijos genai) (Suzuki ir kt., 2015). Toks kamienas gerai tinka kurti mutantiniams baltymams, pasižymintiems norimomis savybėmis. Kitas mutantinis MK244 kamienas (jo motininis kamienas – taip pat *G. kaustophilus* HTA426) sukurtas pašalinus genomo fragmentus su I ir IV tipo R-M sistemos genais. Tokiu būdu sukurtas kamienas, kuris lengviau transformuojamas įprastuose *E. coli* kamienuose (tokuose kaip DH5 α) padauginta DNR (Suzuki ir kt., 2013b).

1.2.2. Vektoriai

Dauguma naudojamų bakterijų vektorių yra sukurti naudojant plazmidės. Plazmidės puikiai tinka molekulinį įrankių konstravimui, nes 1) jos paprastai yra mažo dydžio, 2) jomis lengva manipuliuoti ir be visa to 3) jos nėra gyvybiškai būtinos šeimininkui. Plazmidiniai vektoriai yra sudaryti iš trijų pagrindinių elementų:

1. Bazinio replikono (DNR srities, apimančios sekas, reikalingas molekulės replikacijai);
2. Atrankos žymens (būtino vektorių įgijusioms ląstelėms atpažinti ir jas atrinkti);
3. Daugybinių klonavimo regiono, sutrumpintai žymimo MCS (iš angl. k. – multiple cloning site), kuriame yra sutelktos vienetinės restrikcijos endonukleazių atpažįstamos sekos.

Pačiam paprasčiausiam *E. coli* vektoriui (klonavimo vektoriui) šių trijų komponentų visiškai užtenka, kad būtų galima klonuoti norimas DNR atkarpas, tačiau norint įterpti rekombinantinę DNR į daugelio kitų mikroorganizmų ląsteles, reikalingi sudėtingesni vektoriai.

Sunkiai transformuojamiems mikroorganizmams (tarp jų ir geobaciloms) yra naudojami šaudykliniai vektoriai, t. y. vektoriai, kurie gali funkcionuoti dviejuose (ar keliuose) skirtinguose (dažnai filogenetiškai tolimuose) organizmuose (Schweizer, 2008). Vienas iš šių šeimininkų yra tarpinis ir reikalingas rekombinantinėms DNR molekulėms atrinkti (dažniausiai tam naudojama *E. coli*). Kitas – tikslinis šeimininkas, į kurį perkeliama tarpiniame šeimininke padaugintos rekombinantinės molekulės. Vienas ir tas pats replikonas tik labai retais atvejais gali užtikrinti efektyvią replikaciją abiejuose organizmuose, dėl to tokie vektoriai dažniausiai turi du skirtingus replikonus. Transformantų atrankos žymenys taip pat naudojami du: vienas – tinkamas laikinam šeimininkui, kitas – tiksliniam. Dažnai šaudyklinių vektorių dalis, funkcionuojanti *E. coli* ląstelėse, yra gaunama iš vieno

dažniausiai naudojamų daugiakopijinių *E. coli* pUC serijos klonavimo vektorių (Yanisch-Perron ir kt., 1985). Tuo tarpu antrasis replikonas ir atrankos žymuo pasirenkamas priklausomai nuo tikslinio šeimininko (vektoriai, naudojami *Geobacillus* genties bakterijoms išvardinti 1.1 lentelėje).

Tam tikro tikslinio geno ekspresijai yra naudojami ekspresijos vektoriai. Ekspresijos vektoriai dažniausiai konstruojami į paprastą ar šaudyklinį vektorių įterpiant tinkamą promotorių, ribosomos prisijungimo (angl. RBS – ribosome binding site) ir terminatoriaus sekas (Rosano ir Ceccarelli, 2014).

Integracijos vektoriai naudojami stabiliems chromosominiams pokyčiams. Kadangi šie vektoriai integruojasi į chromosomą, jiems nereikia replikono, užtikrinančio stabilų jų išlaikymą tiksliniame šeimininke. Dėl to tokie vektoriai turi arba nestabilius replikonus, arba visai jų neturi. Vienas iš esminių integracinių vektorių elementų yra DNR atkarpos, kurios yra homologinės toms šeimininko chromosomos DNR sritims, per kurias yra norima įterpti tam tikrą geną (ar kitokią DNR seką). Šios DNR atkarpos būna išdėstytos iš abiejų vektoriaus intarpo pusių (3' ir 5' galų) ir įgalina homologinę rekombinaciją, kurios metu vektoriaus intarpas yra perkeliamas į chromosomą (Taylor ir kt., 2011).

1.2.2.1. Plazmidės: vektorių replikonų šaltinis

Bazinis replikonas yra svarbiausias veiksnys, kuris užtikrina vektoriaus stabilų išlaikymą ląstelėse, apsprendžia galimų šeimininkų ratą bei nulemia jo kopijų skaičių ląstelėje. Replikonų šaltiniu dažniausiai yra natūralios bakterijų plazmidės. Plazmidžių replikonai skiriasi savo mechanizmais, kuriuos naudoja savo kopijų sintezei ir tokiu būdu suteikia juos turintiems vektoriams skirtingas savybes. Šiuo metu yra išskiriami trys pagrindiniai plazmidžių replikacijos tipai: θ (teta), grandinės išstūmimo ir riedančio rato (RR) (del Solar ir kt., 1998).

1.1 lentelė. *Geobacillus* genties bakterijoms naudojami genetiniai vektoriai. Eilutėse, pažymėtose pilku fonu, nurodytos plazmidės, kurių replikonai panaudoti žemiau išvardintų vektorių kūrimui. Skliausteliuose nurodyta: plazmidžių dydis, natūralus šeimininkas, replikacijos tipas ir kitos savybės

Vektorius	Vektoriaus sudėtinės dalys ir žymenys		Dydis, kb	Pastabos	Nuorodos
	<i>E.coli</i> vektorius arba jo dalys	Termostabilus žymuo (jo pavadinimas ar kilmė) ir kitos savybės			
Vektoriai, turintys pBST1 plazmidės replikoną (~80 kb; <i>G. stearothermophilus</i> NRTL 1102; θ tipas)					Liao ir kt., 1986; Taylor ir kt., 2008
pBST22	pUC19	Kan ^R (<i>TK101</i>), Cam ^R (iš pC194)	7,6	Esant antibiotiko, stabiliai išlaikomas ląstelėse ≤68 °C. Neturi veikiančios „balta-mėlyna“ atrankos sistemos.	Liao ir Kanikula, 1990
pUCG18	pUC18	Kan ^R (<i>TK101</i>)	6,3	Savybės panašios į pBST22, tačiau turi funkcionalią „balta-mėlyna“ atrankos sistemą.	Taylor ir kt., 2008
pUCG3.8	pUC18 (be Amp ^R)	Kan ^R (<i>TK101</i>)	3,8	pUCG18 sumažinto dydžio darinys, pasižymintis aukštesniu geobacilų transformacijos efektyvumu.	Bartosiak-Jentys ir kt., 2013
Vektoriai, turintys pSTK1 plazmidės replikoną (1,9 kb; <i>G. stearothermophilus</i> TK015, RR tipas)					Nakayama ir kt., 1992; Nakayama ir kt., 1993
pSTE33	pUC19	Kan ^R (<i>TK101</i>)	5,7	Stabilus, esant 67 °C, netgi be atrankos spaudimo.	Narumi ir kt., 1993
Vektoriai, turintys pBC1 plazmidės replikoną (1,6 kb; <i>B. coagulans</i> , RR tipas; platus galimų šeimininkų ratas.					De Rossi ir kt., 1992
pRP9	Tik MCS iš pUC19	Cam ^R (iš pC194)	2,9	Mažas transformacijos efektyvumas ir (arba) vektoriaus stabilumas <i>E. coli</i> ląstelėse.	De Rossi ir kt., 1994; Taylor ir kt., 2008
pNW33N ^a	pUC19	Cam ^R (iš pC194)	3,9	Stabilus 60 °C temperatūroje.	Zeigler, 2001
Vektoriai, turintys pUB110 plazmidės replikoną (4,5 kb; <i>Staphylococcus aureus</i> ; RR tipas; Kan ^R)					Gryczan ir kt., 1978
pTMO31	pUC19	Kan ^R (iš pUB110)	5,1	Aukštai temperatūrai jautrus replikonas.	Cripps ir kt., 2009

Vektoriai, turintys pTB19 plazmidės replikoną (27 kb; termofilinis <i>Bacillus</i> sp.; sudėtyje turi dviejų tipų replikonus: θ tipo (RepA) ir RR tipo (RepB); Kan ^R , Tet ^R)					Imanaka ir kt., 1982; Oskam et al., 1991; Van der Lelie, ir kt., 1989
pTB90 ^b	-	Kan ^R iš pTB19 Tet ^R iš pTB19	-	<i>B. subtilis</i> - <i>G. stearothermophilus</i> šaudyklinė plazmidė. Neturi MCS. Stabilus esant ≤ 65 °C, veikiant kanamicino arba tetraciklino atrankos sistemai.	Imanaka ir kt., 1982; Imanaka ir kt., 1984
pTB913 ^b	-	Kan ^R (iš pTB19)	4,5	Stabilus išlaikymas ląstelėje priklauso nuo šeimininku naudojamo <i>Geobacillus</i> sp. kamieno.	Imanaka et al., 1984; Oskam ir kt., 1991
Vektoriai, turintys pTHT15 plazmidės replikoną (4,5 kb; termofilinis <i>Bacillus</i> sp.; Tet ^R ; stabiliai išlaikoma iki 60 °C)					Hoshino ir kt., 1985; Wu ir Welker, 1989
pIH41	-	Tet ^R (iš pTHT15), Cam ^R (iš pC194), Kan ^R (iš pTHN1)	7,6	Stabiliai išlaikomas ląstelėse iki 55 °C, neveikiant atrankos sistemai.	Nakayama ir kt., 1992; Narumi ir kt., 1992
pSTE12	pUC18	Tet ^R (iš pTHT15)	5,8	Nestabilus nesant aplinkoje antibiotiko. Didelis kopijų skaičius (96), auginant bakterijas su antibiotiku 60 °C temperatūroje.	Nakayama ir kt., 1992
Vektoriai be replikono, funkcionalaus <i>Geobacillus</i> spp. ląstelėse					
pGAM46	pUC19	<i>pyrF</i> , <i>oriT</i> , <i>GK0707</i> fragmentai	6,9	Transformacijai pasitelkiama konjugacija. Atrankos žymens genome napaliekanti heterologinių genų įterpimo sistema.	Suzuki ir kt., 2012
pAM120	pBR322	Tn916 (įskaitant Tet ^R (<i>tetM</i>))	21,4	Transformacijai pasitelkiamas transpozono konjugacijos aparatas.	Narajan ir Oriol., 1991

^aRemiantis Zeigler (2001) duomenimis pNW33N vektorius turi pBC1 plazmidės replikoną, tačiau į NCBI duomenų bazę įkeltoje pNW33N DNR sekoje (identifikacinis numeris AY237122) pažymėtas pTHT15 plazmidės replikacijos baltymo genas.

^bpTB90 ir pTB913 plazmidžių sudėtyje yra tikrai RR tipo replikonas (RepB)

Teta tipo plazmidžių replikacijos mechanizmas iš esmės yra panašus į chromosomos, kadangi pirmaujanti ir vėluojanti grandinės yra sintetinės koordinuotai, o vėluojančiajai grandinei būdinga „trūkinėjanti“ sintezė. Replikacija yra pradama išlydžius DNR duplexą. Pastarąjį procesą (DNR grandinių išlydymą) inicijuoja 1) pačios plazmidės koduojami Rep baltymai, kurie jungiasi prie savo atpažįstamų plazmidės sričių, arba 2) šeimininko RNR polimerazė, pradanti būsimo pradmens (angl. preprimer) transkripciją nuo promotoriaus, išsidėsčiusio prieš srovę nuo *ori*. Taigi replikacijos iniciacijos baltymai dalyje θ plazmidžių (B klasės) sekų nėra aptinkami. Vėliau yra suformuojama šeimininko baltymų replisoma, kuri ir vykdo plazmidės DNR sintezę. Priklausomai nuo replikacijos iniciacijos būdo θ plazmidės yra skirstomos į keturias klases: A, B, C, D (Lilly ir Camps, 2015). Plazmidės, turinčios θ replikonus, gali siekti keliasdešimt ir daugiau kb dydį. Vektoriams, sukurtiems tokių plazmidžių pagrindu, yra būdingas didelis struktūrinis stabilumas. Be to, į juos galima įterpti santykinai ilgus intarpus (Kiewiet ir kt., 1993).

Grandinės išstūmimo mechanizmas primena θ tipo plazmidžių replikaciją, tačiau šio tipo plazmidės yra mažiau priklausomos nuo šeimininko baltymų, kadangi pačios koduoja ne tik replikacijos iniciacijos baltymą (išlydantį DNR), bet ir kai kuriuos replisomos baltymus (helikazę RepA ir praimazę RepB). Be to, vėluojančiosios grandinės sintezė nors ir vyksta tuo pat metu, tačiau yra atsieta nuo pirmaujančios grandinės sintezės (Lilly ir Camps, 2015). Kadangi šio tipo plazmidės yra mažiau priklausomos nuo šeimininko, jos gali užtikrinti vektorių išlaikymą ypatingai plačiame šeimininkų rate. Kita vertus, kadangi pačios koduoja ne vieną replikacijos veiksnį, joms yra būdingas didelis dydis. Tai apsunkina jų perkėlimą į šeimininką, nes yra nustatyta atvirkštinė koreliacija tarp plazmidės dydžio ir transformacijos efektyvumo (Rhee ir kt., 2007). Dalis plazmidžių biologijos tyrėjų grandinės išstūmimo replikacijos tipo plazmidės priskiria θ tipo plazmidžių potipiui. Paprastumo dėlei, tokio plazmidžių skirstymo bus laikomasi ir šiame darbe.

RR mechanizmu besireplikuojančios plazmidės yra mažo dydžio (iki 10 kb) ir paprastai jos yra daugiakopijinės (Khan, 1997; Shintani ir kt., 2015). Joms yra būdingas replikonas, sudarytas iš dviejų modulių. Vienas iš jų sudarytas iš Rep baltymą koduojančios sekos ir dvigrandės DNR replikacijos pradžios srities, vadinamos *dso* (angl. double strand oorigin). Rep baltymai prisijungia prie jų atpažįstamo plazmidės *dso* regiono, vadinamo *bind*. Tuomet šie baltymai perkerpa vieną iš DNR grandinių ties labai konservatyviu *dso* regionu, vadinamu *nick*, ir inicijuoja pirmaujančios grandinės sintezę (Guglielmetti ir kt., 2007). RR plazmidžių replikacijos baltymai, perkirpę vieną iš plazmidės DNR grandinių, lieka prisikabinę prie naujai suformuoto 5' galo, tuo tarpu 3' galas tarnauja pradmeniu pirmaujančios grandinės sintezei (del Solar ir kt., 1993; Marsin ir Forterre, 1999). Remiantis Rep baltymų ir *dso* sekų panašumais, RR plazmidės yra skirstomos į šeimas, iš kurių geriausiai ištirtos yra pC194/pUB110, pT181/pC221 ir pMV158 plazmidžių šeimos (Espinosa ir kt., 1995).

Antrasis replikono modulis yra reikalingas plazmidės vėluojančios grandinės sintezei ir yra sudarytas iš sekos, vadinamos *sso* (angl. single strand oorigin). Plazmidžių *sso* sekos skirstomos į keletą tipų pagal tai, kokias struktūras jos formuoja ir koks tų sekų panašumas. Plazmidės gali turėti skirtingus šių modulių derinius. Taigi, tos pačios šeimos plazmidės gali turėti skirtingų tipų *sso* sekas (del Solar ir kt., 1998; Khan, 2000; Guglielmetti ir kt., 2007; Ruiz-Masó ir kt., 2015).

Vektoriams, sukurtiems RR plazmidžių pagrindu, buvo priskiriamas segregacinis ir (arba) struktūrinis nestabilumas (Ballester ir kt., 1989). Tačiau panašu, kad tokių vektorių nestabilumas buvo nulemtas nepakankamų žinių apie būtinus RR plazmidžių replikono komponentus. Mokslininkai, dirbantys su *Lactobacillus* spp. bakterijomis, pateikė keletą pavyzdžių, rodančių, kad vektoriai, turintys RR plazmidžių replikonus, pasižymi aukštu segregaciniu ir struktūriniu stabilumu (Leer ir kt., 1992). Vis dėlto reikia turėti omenyje, kad į vektorius, besidauginančius RR mechanizmu, galima įterpti mažesnius intarpus (iki 10 kb) nei į θ tipo plazmides (Leer ir kt., 1992).

Kuriant vektorius, viena iš svarbių plazmidės replikono savybių yra jo palaikomas plazmidės kopijų skaičius (PKS) ląstelėje. RR tipo plazmidžių daugiakopijškumas yra ypač pageidautina vektoriaus savybė, kuriant ekspresijos sistemas, kai nėra stiprių promotorių pasirinkimo. Pažymėtina, kad plazmidžių kopijų skaičius gali priklausyti nuo temperatūros (Nakayama ir kt., 1992), nuo naudojamo antibiotiko (Imanaka ir kt., 1982) ir kitų veiksnių.

Replikonas apsprendžia ir plazmidžių galimų šeimininkų spektrą. Dažnai θ tipo plazmidės turi siauresnį šeimininkų ratą nei RR tipo plazmidės. Natyvių plazmidžių galimų šeimininkų ratas gali būti apsprendžiamas ir jos sekos, GC sudėties (Nishida, 2012a; Nishida, 2012b).

1.2.2.1. *Geobacillus* genties bakterijų plazmidės, šioms bakterijoms taikomi vektoriai

Geobacillus genties bakterijose yra aptikta įvairių plazmidžių, kurių dydis svyruoja nuo beveik 2 iki 81 kb (žr. Priedas: 2 lentelė). Vienos jų ląstelėse dauginasi RR mechanizmu, kitos savo kopijų skaičiaus išlaikymui naudoja θ tipo replikacijos būdą. Tačiau tik nedaugelis jų yra panaudota vektorių kūrimui.

Vektoriai, besireplikuojantys θ tipo mechanizmu, yra sukurti naudojantis plazmide pBST1. Tai yra didelė, ~80 kb dydžio plazmidė, išskirta iš *Geobacillus stearothermophilus* NRTL 1102 kamieno (Liao ir kt., 1986; Taylor ir kt., 2008). Šios plazmidės seka yra tikrai dalinai nuskaityta – nustatyta tikrai ta jos sekos dalis, kuri yra panaudota pBST22 vektoriaus konstravimui (Liao ir Kanikula, 1990; Taylor ir kt., 2008). pBST22 plazmidės replikono pagrindu yra sukurtas ir šiuo metu vienas populiariausių vektorių – pUCG18 (Taylor ir kt., 2008). Pastarasis vektorius vėliau tos pačios mokslininkų grupės buvo modifikuotas: pašalinus visas nereikalingas sekas bei atsparumo ampicilinui geną buvo sumažintas jo dydis. Naudojantis sukurtu pUCG3.8 vektoriumi gautas didesnis *Geobacillus* sp. transformacijos efektyvumas (Bartosiak-Jentys ir kt., 2013).

Visi kiti *Geobacillus* genčiai naudoti vektoriai savo sudėtyje turi RR

tipo replikonus, tačiau ne visi jų yra kilę iš *Geobacillus* bakterijų.

Viena geriausiai ištirtų *Geobacillus* plazmidžių – tai 1,9 kb dydžio pSTK1 plazmidė, išskirta iš *Geobacillus stearothermophilus* TK015 (Nakayama ir kt., 1992; Nakayama ir kt., 1993). Ši plazmidė priskiriama pT181 plazmidžių šeimai. Jos koduojamas replikacijos iniciacijos baltymas, priklausantis Rep_trans baltymų (PF02486) šeimai, neseniai buvo kristalizuotas. Tikimasi, kad artimoje ateityje bus nustatyta ir jo tiksli struktūra (Carr ir kt., 2013). Šios plazmidės pagrindu yra sukurtas pSTE33 vektorius (Narumi ir kt., 1993). Parodyta, kad jis (lyginant su pUCG18 vektoriumi) gali būti sunkiau pernešamas į geobacilų ląsteles, tačiau jis užtikrina aukštą segregacinį stabilumą, net ir nesant terpėje antibiotiko (Suzuki ir Yoshida, 2012).

Kita natyvi *Geobacillus* genties bakterijų plazmidė – 27 kb dydžio pTB19. Ji įdomi tuo, kad savo sudėtyje turi dviejų skirtingų tipų replikonus: θ (RepA) ir RR (RepB) (Imanaka ir kt., 1982; Imanaka ir kt., 1984; Oskam ir kt., 1991; Oskam ir kt., 1992a). Šios plazmidės deleciniai dariniai, pTB90 (Imanaka ir kt., 1982) ir pTB913 (Imanaka ir kt., 1984), buvo panaudoti kaip šaudyklinės plazmidės tarp *Bacillus* ir *Geobacillus* genčių. Į jų sudėtį įeina šios plazmidės RR replikonas bei atsparumo kanamicinui ir tetraciklinui genai. Parodyta, kad pTB913 plazmidė yra gana stabiliai išlaikoma kai kuriuose *Geobacillus* kamienuose, net ir nenaudojant atrankos antibiotikais (Zhang ir kt., 1988; Oskam ir kt., 1992b). Deja, šį replikoną turinčios plazmidės nebuvo išvystytos iki šiuolaikinius reikalavimus atitinkančio vektoriaus ir šiuo metu nėra naudojamos.

Dar viena plazmidė, panaudota *Geobacillus* vektorių kūrimui – pTHT15 (Hoshino ir kt., 1985b). Ši plazmidė, kaip nurodyta originaliaame straipsnyje, yra išskirta iš termofilinio *Bacillus* sp. kamieno. Turint omenyje, kad tik 2001 metais *Geobacillus* gentis yra atskirta nuo *Bacillus*, ir kad šio kamieno 16S rDNR seka nežinoma, neįmanoma tiksliai pasakyti, kokiai genčiai priklauso jos natyvus šeimininkas. pTHT15 plazmidė nors ir nėra sekvenuota, tačiau, remiantis NCBI duomenų bazėje esančiais duomenimis, jos replikonas buvo

panaudotas pNW33N vektoriaus (identifikacinis numeris AY237122) konstravimui, o jos Rep baltymas yra priskiriamas Rep_1 RR plazmidžių baltymams. Tai patvirtina Hoshino ir kt. (1985a) darbas, kuriame nukleorūgščių hibridizacijos metodu buvo parodyta, kad šios plazmidės su replikacija susijusi sritis yra homologiška pUB110 atitinkamai sričiai.

Geobacillus genties bakterijų vektoriai gali būti kuriami ir pasitelkiant kitų joms giminingų bakterijų plazmidės, kurioms yra būdingas platus šeimininkų spektras. Viena tokių plazmidžių yra *Bacillus coagulans* plazmidė pBC1, galinti replikuotis įvairiose gramteigiamosiose bakterijose (tarp jų ir *Geobacillus* spp.) (De Rossi ir kt., 1989; De Rossi ir kt., 1994). Šios plazmidės pagrindu sukurtas pRP9 vektorius. Teigiama, kad šio vektoriaus vienintelis turimas pBC1 replikonas užtikrina jo replikaciją ne tik geobacilose (ar kitose gramteigiamosiose bakterijose), bet ir *E. coli* ląstelėse. Visgi keliuose darbuose parodyta, kad *E. coli* transformacija šiuo vektoriumi yra neefektyvi arba transformuotos *E. coli* greitai praranda šią plazmidę (De Rossi ir kt., 1994; Narumi ir kt., 1995; Taylor ir kt., 2008).

Mezofilinių, net ir giminingų bakterijų plazmidžių replikonai paprastai nefunkcionuoja termofilinėse bakterijose. Tai galima būtų paaiškinti tuo, jog skirtingose temperatūrose gali netinkamai susiformuoti replikacijai reikalingos plazmidinės DNR antrinės struktūros (RR plazmidžių atveju *sso*) ar replikacijos baltymai. Tačiau kai kada tokia mezofilų plazmidžių savybė (jų nestabilumas esant aukštai temperatūrai) tampa privalumu. To pavyzdys – *Staphylococcus aureus* pUB110 plazmidė, kurios replikonas kartu su jos koduojamu atsparumo kanamicinui genu buvo panaudotas temperatūrai jautriam integraciniam pTMO31 vektoriui konstruoti (Cripps ir kt., 2009). pUB110 plazmidė gali replikuotis įvairiose gramteigiamosiose bakterijose (Gryczan ir kt., 1978), tačiau termofilinėse *Geobacillus* spp. ji funkcionuoja tiksliai esant ne aukštesnei nei 55 °C temperatūrai (Imanaka ir kt., 1982; Matsamura ir kt., 1984). Tokiu būdu pTMO31 vektorius gali būti stabiliai išlaikomas *Geobacillus* spp. ląstelėse, jas auginant žemesnėje nei 55 °C temperatūroje ir lengvai iš jų pašalinamas, pakėlus auginimo temperatūrą iki

65 °C (Cripps ir kt., 2009).

1.2.2.2. Atrankos žymuo

Atrankos žymuo yra būtinas genetinėse vektoriaus-šeimininko sistemose, kadangi pagal jį galima įvertinti, ar įvyko genetinė transformacija bakterijų ląstelėse. Be to, jis užtikrina tolimesnį stabilų plazmidės išlaikymą ląstelėse, auginamose tam tikromis sąlygomis.

Labai dažnai atrankos žymeniu tiek mezofilinių, tiek ir termofilinių bakterijų ląstelėse yra naudojami genai, suteikiantys atsparumą tam tikram augimo slopintojui, paprastai antibiotikui. Tačiau termofilų atveju, tokių atsparumu pagrįstų atrankos sistemų pasirinkimas yra ribotas, nes bakterijų augimą slopinančios medžiagos dažnai yra nestabilios aukštoje (50 °C ir daugiau) temperatūroje. Be to, dauguma naudojamų už atsparumą atsakingų genų yra kilę mezofilinėse bakterijose. Pastarųjų genų raiška termofiliniame šeimininke dažnai nėra efektyvi (Taylor ir kt., 2011). Norint sukurti termofilams pritaikytas antibiotiko ir atsparumo jam atrankos sistemas, reikia surasti termostabilias antibakterines medžiagas bei padidinti atsparumą nulemiančių baltymų stabilumą aukštoje temperatūroje (Inoue ir Sako, 2013).

Vienas iš termostabiliausių antibiotikų yra kanamicinas (Peteranderl ir kt., 1990). Jam atsparumą suteikiantis atrankos žymuo (Kan^R), kuris yra atsparus karščiui, buvo gautas pagerinus mezofilų pUB110 plazmidės koduojamos kanamicino nukleotidiltransferazės (KNTazės) termostabilumą. Šis termostabilus KNTazės variantas, pavadintas TK101, savo šeimininkui gali suteikti atsparumą kanamicinui net ir esant 70 °C temperatūrai (Liao ir Kanikula, 1990). Be to, yra parodyta, kad šis žymuo gali veikti ne tik geobacilose, bet ir *E. coli* ląstelėse (Bartosiak-Jentys ir kt., 2013). Šis atrankos žymuo yra naudojamas daugelyje šiuolaikinių *Geobacillus* spp. vektorių (Taylor ir kt., 2008, Kobayashi ir kt., 2015).

Kitas dažnai naudojamas antibiotikas yra chloramfenikolis. *Geobacillus* genties bakterijų vektoriuose naudojamas šiam antibiotikui atsparumą

suteikiantis žymuo – chloramfenikolio acetiltransferazės (CAT) genas, gautas iš *Staphylococcus aureus* pC194 plazmidės (De Rossi ir kt., 1991; De Rossi ir kt., 1994; Liao ir Kanikula, 1990; Zeigler, 2001). Šio geno koduojama acetiltransferazė nepasižymi aukštu termostabilumu ir dėl to yra gana nepatogus žymuo geobaciloms. Transformantų, įgijusių plazmidę su *cat* genu, atranka turi būti vykdoma žemesnėje temperatūroje, nei šių bakterijų augimo temperatūros optimumas ir todėl ji ilgai užtrunka (Imanaka ir kt., 1982; Wu ir Welker 1989). Tačiau visai neseniai, Kobayashi ir kt. (2015) savo tyrimuose gavo mutantinį termostabilesnį CAT variantą, kuris galėtų būti efektyvesnis žymuo, nei jo pirmtakas (aktyvumas, beje, išliko toks pats, o pakito tik baltymo stabilumas). Visgi reikia pažymėti, kad chloramfenikolio naudojimas transformantų atrankai turi dar vieną trūkumą – keliuose tyrimuose yra parodyta, kad šio antibiotiko naudojimas tiesioginei transformantų atrankai gali ženkliai sumažinti transformacijos efektyvumą ($\geq 10^3$ kartų) ir (arba) atsikartojamumą (Liao ir Kanikula, 1990; Kobayashi ir kt., 2015; Vojcic ir kt., 2012).

Kitiems termofiliniams prokariotams, be aukščiau minėtų antibiotikų, taip pat yra naudojami higromicinas B, eritromicinas ir keletas kitų augimo inhibitorių (Inoue ir Sako, 2013). Nors jie vis dar nėra naudojami geobaciloms, tačiau tikėtina, kad ateityje bus pritaikyti jų genetinės transformacijos sistemoms.

Nors atrankos sistemos pagrįstos atsparumu antibiotikams yra paprasčiausios ir dėl to dažnai naudojamos, tačiau įvairiose biotechnologinėse srityse (ypač pramoninėje biotechnologijoje) didėja nuo antibiotikų nepriklausomų atrankos sistemų poreikis. Tuo tikslu yra naudojami auksotrofijos žymenys – genai, susiję su tam tikrais metaboliniais keliais. Šie žymenys yra naudojami šeimininko genomo mutacijos komplementacijai. Dažniausiai naudojami auksotrofijos žymenys – timidino, triptofano ir uracilo sintezės genai (Inoue ir Sako, 2013; Taylor ir kt., 2011).

Vienas iš patogiausių tokių žymenų yra *pyrF* genas (eukariotų *ura3* atitikmuo), koduojantis orotidino 5'-fosfato dekarboksilazę. PyrF yra būtinas

pirimidinų (UTP) *de novo* sintezei. Be to, šis fermentas katalizuoja 5-fluoroorotinės rūgšties vertimą į toksiškus metabolitus. Dėl mutacijų (pažaidų) *pyrF* gene bakterijos įgyja uracilo auksotrofijos fenotipą ir tampa atsparios 5-fluoroorotinei rūgščiai. Tokiam auksotrofiniam kamienui gali būti panaudota atrankos ir (arba) atvirkštinės atrankos sistema, pagrįsta vektoriuje koduojamo *pyrF* geno raiška (Suzuki ir kt., 2012).

Suzuki ir kt. (2012) pasinaudodami šia sistema sukūrė metodą, įgalinantį *G. kaustophilus* HTA426 genetinę modifikaciją, po kurios šių bakterijų genome nelieka atrankos žymens (angl. marker-free). Tai yra vienintelis atvejis, kai auksotrofijos žymenis yra pritaikomi geobaciloms. Turint omenyje nuo antibiotikų nepriklausomų atrankos sistemų aktualumą ir tai, jog jau yra sukurta daugybė įvairių auksotrofinių *G. stearothermophilus* NUB36 kamieno mutantų (Vallier ir Welker, 1990), tikėtina, kad šios genties bakterijoms bus pritaikyta ir daugiau auksotrofijos žymenų.

Tais atvejais, kai šeimininkas yra lengvai transformuojamas, naujai sukurtų rekombinantinių DNR molekulių atrankai yra tikslinga naudoti tą patį kamieną. Tam vektorius turi turėti antrąjį markerį, skirtą klonuotų intarpų atrankai. Tokiu žymeniu gali būti genai fermentų, kurių katalizės produktai suteikia transformuotų ląstelių kolonijoms tam tikrą spalvą (β -galaktozidazės genas, *Thermus thermophilus* atveju – karotenoidų sintazės genas). Įterpus norimą intarpą per šiame gene esantį restrikcijos saitą, pastarasis yra suardomas. Tokiu būdu tuščius vektorius turintys transformantai formuoja spalvotas kolonijas, tuo tarpu ląstelės, įgijusios vektorius su insertu, išlaiko savo pirmykštę spalvą (Fujita ir kt., 2013). Nors geobacilų transformacija kol kas dar nėra tiek išvystyta, kad rekombinantines DNR molekules būtų galima atrinkti pačiose bakterijų ląstelėse, tačiau turint omenyje pastarųjų metų susidomėjimą šiomis bakterijomis, tikimasi, kad situacija turėtų pasikeisti.

1.2.2.3. Promotoriai genų raiškai *Geobacillus* spp. ląstelėse

Svarbiausias baltymų ekspresijos elementas yra promotorius.

Geobacillus genčiai tinkami promotoriai yra šiuo metu intensyviai tiriami: yra ieškoma tiek stiprių indukuojamų, tiek ir konstitutyvių promotorių, kurie kilę iš *Geobacillus* genties ar kitų giminingų bakterijų.

Promotoriui charakterizuoti ir analizuoti reikalingas genas reporteris, kurio ekspresiją būtų galima greitai ir patogiai įvertinti kiekybiškai. *Geobacillus* genties bakterijose tam naudojami įvairūs cukrų metabolizmo genai:

β -galaktozidazė, α -galaktozidazė ir amilazė, (Blanchard ir kt., 2014; Lin ir kt., 2014; Suzuki ir kt., 2012), katecholio 2,3-dioksigenazė (Bartosiak-Jentys ir kt., 2013), termostabilus žaliasis fluorescuojantis baltymas (Blanchard ir kt., 2014).

Naudojantis šiais reporteriais buvo aprašyti keli konstitutyvūs (P_{PerA} , P_{SigA} , P_{RHII}) ir indukuojami (P_{Idh} , P_{gk704} , $P_{\beta glu}$) promotoriai, tinkantys *Geobacillus* baltymų ekspresijos sistemoms (Bartosiak ir kt., 2012; Blanchard ir kt., 2014; Cripps ir kt., 2009; Lin ir kt., 2014; Narumi ir kt., 1992a; Suzuki ir kt., 2012, Suzuki ir kt., 2013a).

1.2.3. Transformacijos metodai

Vienas iš sudėtingiausių bakterijų transformacijos etapų yra rekombinantinės DNR pernašos metodikos parinkimas ir sąlygų optimizavimas. Bakterijos užląstelinę DNR gali įgyti 3 natūraliai egzistuojančiais būdais: 1) natūralios genetinės kompetencijos išvystymo, 2) konjugacijos ir 3) transdukcijos (Aune ir Aachmenn, 2010; César ir kt., 2011). Iš jų tikslinei genetinei *Geobacillus* genties bakterijų (tiksliau, poros *Geobacillus* kamienų) modifikacijai, sėkmingai pritaikyta tiktai konjugacija (aptarta 1.2.3.3 skyriuje) (Natarajan ir Oriel, 1991; Suzuki ir Yoshida, 2012). Transdukcija bakteriofagais taip pat yra panaudota vieno *Geobacillus* kamieno (*G. stearothermophilus* NUB36) modifikacijai (Welker, 1988), tačiau ji taip ir nebuvo išvystyta sukuriant patogią transformacijos metodologiją. Tuo tarpu apie geobacilų natūralią kompetenciją duomenų, pagrįstų eksperimentiniais tyrimais, nėra.

Nors natūralios kompetencijos indukcija nėra taikoma geobaciloms, tačiau kai kurių kitų bakterijų transformacijai ji yra sėkmingai naudojama. Transformacija, indukuojant natūralią bakterijų kompetenciją, yra sąlyginai paprastas metodas, nereikalaujantis ypatingos įrangos. Jo efektyvumas priklauso nuo bakterijų augimo fazės, mitybinių sąlygų ir stresinių aplinkos veiksnių. Tačiau kiekvienam kamienui ir rūšiai tinkamos sąlygos gali labai skirtis, o kartais netgi turėti visiškai priešingą efektą skirtingų rūšių kompetencijos indukcijai (Johnston ir kt., 2014; Vojcic ir kt., 2012).

Ypač efektyvi transformacijos sistema yra išvystyta termofilinėms gramneigiamosioms *Thermus thermophilus* ir *Thermus aquaticus* bakterijoms (Inoue ir Sako, 2013). Šis metodas taip pat yra naudojamas ir *B. subtilis* transformacijai (Anagnostopoulous ir Spizizen, 1961; Vojcic ir kt., 2012). *B. subtilis* neprilygsta transformacijos efektyvumu *Thermus* genties bakterijoms, tačiau yra parodyta, kad „superkompetentinius“ *B. subtilis* kamienus galima sukurti, įvedus papildomą ComK (pagrindinio *Bacillus* spp. natūralios kompetencijos reguliatoriaus) geną ir vykdant indukuojamą šio baltymo viršprodukciją (Zhang ir Zhang; 2011).

Tikėtina, kad pasitelkus šį kitoms bakterijoms tinkamą DNR pernašos būdą, įmanoma sukurti transformavimo sistemą ir geobaciloms, kadangi sekvenotuose *Geobacillus* genties bakterijų genomuose sekose taip pat yra nustatyti *Bacillus* spp. *com* genų homologai, būtini genetinei kompetencijai (Kovács ir kt., 2009, Wiegand ir kt., 2013).

Natūralius genų pernašos metodus galima pritaikyti ne visoms bakterijoms, dėl to šiuolaikinėje biotechnologijoje yra sukurta daugybė kitų dirbtinių metodų, kurie ir toliau yra vystomi, siekiant praplėsti transformuojamų bakterijų spektrą ir transformacijos efektyvumą (Aune ir Aachmenn, 2010; Divya Prakash ir kt., 2011; Lin ir kt., 2010). Dažniausiai naudojami yra: 1) cheminė transformacija (paprastai veikiant ląsteles CaCl_2), 2) elektrotransformacija, 3) protoplastų ar sferoplastų transformacija. Cheminė transformacija yra efektyvi tik silpnėse sienelė turinčių gramneigiamųjų bakterijų atveju. Tuo tarpu kiti du metodai yra plačiai taikomi DNR pernašai ir

į gramteigiamą bakterijas, iš jų ir geobacilas.

Dažniausiai visi transformacijos metodai dalijami į tris pagrindinius etapus. Pirmajame etape yra paruošiamos ląstelės, būsimosios vektoriaus šeimininkės (recipientės): jos padaromos imlios išorinei DNR. Antrajame etape ląstelėms yra sukeliamas šokas, kuris įgalina DNR perkėlimą į ląstelę, tačiau nėra jai (ląstelei) letalus. Paskutiniame etape transformuotos ląstelės yra atgaivinamos, auginamos ypatingomis sąlygomis, kad būtų atkurti transformacijos metu pažeisti jos kompartmentai (Inoue ir Sako, 2013).

Tik nedaugeliui bakterijų yra sukurta metodika, leidžianti gauti optimalų transformantų kiekį. Visų kitų bakterijų kamienų transformacijai reikalingos sąlygos nėra žinomos ir jos turi būti nustatomos eksperimentiškai. Iki šiol kai kuriuos iš *Geobacillus* genties bakterijų kamienų pavyko transformuoti naudojant tris metodus: 1) protoplastų transformaciją, 2) elektroporaciją ir 3) konjugacinį pernešimą. Šie metodai plačiau aptariami kituose skyriuose.

1.2.3.1. Protoplastų transformacija

Protoplastų transformacija buvo pirmasis metodas, pritaikytas *Geobacillus* genties kamienų transformacijai (Imanaka ir kt., 1982) ir buvo sukurtas pagal Chang ir Cohen (1979) metodą, taikytą *B. subtilis* bakterijoms. *Geobacillus* spp. protoplastai yra paruošiami naudojant lizocimą, kuris suardo pagrindinį ir tvirčiausią bakterijų ląstelių sienelės komponentą, peptidoglikaną. Gauti protoplastai yra transformuojami naudojant polietilenglikolį, kuris palengvina terpėje esančios DNR pernašą į ląstelę. Galiausiai ląstelės įgijusios plazmidę yra regeneruojamos ir atrenkamos, naudojant atrankišką terpes (Imanaka ir kt., 1982; Liao ir kt., 1986; Wu ir Welker, 1989).

Šis metodas yra taikytas *G. stearothermophilus* CU21 ir NUB3621R kamienams transformuoti. Priklausomai nuo naudotos plazmidinės DNR kilmės, transformacijos efektyvumas siekė nuo 10^7 – 10^8 (naudojant plazmidę, išskirtą iš to paties kamieno) iki 10^3 – 10^4 (naudojant plazmidę, išskirtą iš *B. subtilis* kamieno) (Imanaka ir kt., 1982; Wu ir Welker, 1989).

Visgi protoplastų transformacija yra gana sudėtinga ir daug laiko užimanti procedūra. Jos metu naudojami protoplastai yra jautrūs ir lengvai pažeidžiami, dėl to reikalauja ypatingo atsargumo. Be to, protoplastų regeneracijai tinkamiausia temperatūra yra artima transformuojamų kamienų augimo temperatūros minimumui (Wu ir Welker, 1989), o auginimas tokioje temperatūroje dar labiau prailgina visą procedūros trukmę. Taip pat ypatingą dėmesį reiktų atkreipti į regeneracijos terpės sudėtį tais atvejais, kai atrankai naudojama atsparumo kanamicinui sistema. Yra parodyta, kad esant aukštai temperatūrai (≥ 50 °C), dideli laktozės ir kalcio kiekiai, būdingi kai kurių regeneracijos terpių sudėčiai, slopina kanamicino poveikį ląstelėms (Wu ir Welker, 1989).

Taigi, kadangi protoplastų ruošimas yra santykinai sudėtingas ir daug laiko užimantis (Vojcic ir kt., 2012) transformacijos būdas, yra ieškoma patogesnių metodų.

1.2.3.2. Elektrotransformacija

Elektrotransformacija yra vienas dažniausiai naudojamų metodų, įgalinančių svetimos DNR pernašą tiek į gramteigiamųjų, tiek ir į gramneigiamųjų bakterijų ląsteles (Aune ir Aachman, 2010). Transformuojant ląsteles šiuo būdu, DNR į ląstelės vidų yra pernešama, paveikus ją stipriu ir trumpu elektriniu impulsu. Nėra iki galo įrodytas mechanizmas, kuriuo DNR patenka į ląsteles, tačiau vyraujantis šio proceso paaiškinimas – elektroporacijos teorija. Pasak jos, elektrinio impulso metu elektrinio lauko stipriui pasiekus tam tikrą slenkstinę vertę citoplazminėje membranoje susiformuoja poros, pro kurias į ląstelę gali patekti jos išorėje esanti DNR. Elektrinio lauko stipriui sumažėjus iki pradinės vertės, poros vėl užsiveria ir tranformuotos ląstelės yra atgaivinamos (Brambach ir kt., 2013; Escoffre ir kt., 2009; Young ir Deanx, 2015).

Elektrotransformacijos efektyvumas priklauso nuo daugybės veiksnių, todėl skirtingoms bakterijų rūšims ar netgi kamienams elektrotransformacijai palankiausios sąlygos gali labai skirtis. Pavykus optimizuoti šį metodą

kamienai, gaunami geri, patikimai atsikartojantys rezultatai – *E. coli* gaunama iki 10^9 – 10^{10} transformuotų kolonijų sudarančių vienetų (KSV), tuo tarpu gramteigiamųjų bakterijų *B. subtilis* paprastai gaunama iki 10^5 – 10^6 transformuotų KSV (Aune ir Aachmen, 2010; Lu ir kt., 2012; Xue ir kt., 1999).

Įvairioms bakterijoms nustatyta gausybė veiksnių, įtakančių transformacijos efektyvumą, visuose trijuose elektrotransformacijos etapuose: elektrokompetentinių ląstelių paruošimo, elektroporacijos ir ląstelių atgaivinimo (Assad-García ir kt., 2008; Cao ir kt., 2011; Lu ir kt., 2012; Shen ir kt., 2013; Lu et al., 2014; Landete ir kt., 2014; Meddeb-Mouelhi ir kt., 2012; Rhee ir kt., 2007; Rodríguez ir kt., 2007; Turgeon ir kt., 2006; Xue ir kt., 1999; Yang ir kt., 2010; Zhang ir kt., 2011; Zhang ir kt., 2015). Tačiau terastas vienas darbas, kuriame būtų aprašoma *Geobacillus* genties bakterijų elektrotransformacijos optimizacija (Narumi ir kt., 1992b). Narumi su bendraautoriais (1992b) tyrė kultūros augimo stadijos, taikomo elektrinio lauko stiprio ir atrankos veiksnio įtaką *Geobacillus thermodenitrificans* K1041 (šis kamienas anksčiau buvo priskiriamas *Bacillus stearothermophilus* rūšiai (Studholme et al., 1999)). Didžiausias šio kamieno transformantų kiekis (10^5 transformantų/ μ g DNR) buvo gautas ląsteles auginant iki vėlyvos logaritminės augimo fazės ir surinktas bei 10 % glicerolio elektrotransformacijos terpėje (ETT) suspenduotas ląsteles paveikiant 10 kV/cm elektrinio lauko stiprio impulsu (Narumi et al., 1992b). Tačiau kiti *geobacillus* genties kamieniai nėra taip lengvai ir efektyviai transformuojami. Jiems taikomi transformacijos protokolai kuriami keičiant ląstelių auginimo sąlygas, elektrotransformacijos terpės sudėtį, elektroporacijos parametrus ir ląstelių atgaivinimo sąlygas (Thompson ir kt., 2008).

Aukštesnis plazmidinės DNR elektropernašos efektyvumas gali būti pasiektas didinant elektrinio lauko stiprį. Tačiau didesnis elektrinio lauko stipris taip pat mažina ir ląstelių gyvybingumą, taigi jis gali būti keliamas tiksliai iki tam tikro dydžio. Gramteigiamųjų bakterijų transformacijai optimalus elektrinio lauko stipris svyruoja tarp 4,0 ir 12,5 kV/cm (Belliveau ir Trevors, 1989; Trevors ir kt., 1992; Xue ir kt., 1999). Maksimalią taikomo elektrinio

lauko stiprio vertę galima padidinti iki ≥ 20 kV/cm, taikant aukšto osmoliaringumo metodą, t. y. papildant visas elektroporacijai naudojamas terpes suderinamaisiais junginiais (angl. compatible solutes) – sorbitoliu ir manitoliu, kurie padidina elektros impulsu paveiktų ląstelių išgyvenamumą. Šis metodas leido sukurti itin efektyvų *Bacillus* spp. elektrotransformacijos metodą (Lu ir kt., 2012; Xue ir kt., 1999). Aukšto osmoliaringumo elektrotransformacijos terpė buvo naudota ir *Geobacillus thermoglucosidasius* DL33 ir NCIMB 11955 (Cripps ir kt., 2009) kamienų transformacijai, taikant 25 kV/cm elektrinio lauko stiprį. Didžiausias gautas elektrotransformacijos efektyvumas buvo $2,8 \cdot 10^5$ transformantų/ μ g DNR (Bartosiak-Jentys ir kt., 2013). Visgi pastaruosiuose darbuose nebuvo aprašyta įvairių kitų veiksmų (ląstelių auginimo terpės, jų augimo stadijos, elektroporacijos parametrų ir kt.) įtaka elektrotransformacijos efektyvumui. Taigi nėra žinoma, ar šios sąlygos yra pačios tinkamiausios. Dėl to šioje srityje yra būtina atlikti daugiau tyrimų, kurių rezultatai leistų sukurti efektyvią transformacijos metodologiją, tinkamą įvairiems *Geobacillus* kamienams.

1.2.3.3. Konjugacinis pernešimas

Bakterijų transformacija, pasitelkiant bakterijų konjugacijos mechanizmą, yra gana sudėtingas transformacijos būdas. Tam reikia ląstelių donorių, kurios perduotų reikiamą DNR molekulę galutiniam šeimininkui. Tačiau kai kuriais atvejais konjugacija gali būti labai pravartus metodas.

Konjugacija gali būti atliekama pasinaudojant 1) konjugacinių plazmidžių arba 2) transpozonų DNR pernašos aparatu. Pirmuoju atveju donorėmis naudojamos *E. coli* ląstelės, turinčios dvi plazmidės, iš kurių viena yra pagalbinė ir koduoja pernašos aparatą, reikalingą pernešti antrajai plazmidei, turinčiai *oriT* seką (angl. origin of transfer; plazmidės seka, nuo kurios yra pradedama plazmidės pernaša) (Suzuki ir Yoshida, 2012). Antruoju atveju yra naudojamos *E. coli*, turinčios plazmidę su joje įterptu transpozonu (Natarajan ir Oriol, 1991). Atskirai užaugintos ląstelės donorės ir *Geobacillus*

genties recipientės yra sumaišomos ir inkubuojamos mažiausiai tris valandas 37 °C temperatūroje. Galiausiai ląstelių mišinys yra išsėjamas ant atrankiosios agarizuotos terpės. Tolimesnė inkubacija geobacilų augimui reikiamoje temperatūroje leidžia atsikratyti ląstelių donorių ir pasirinkti tiksliai *Geobacillus* genties transformantus.

Konjugacinis pernešimas, pasitelkus platų šeimininkų spektrą turintį Tn916 transpozoną, buvo panaudotas *Geobacillus stearothermophilus* BR219 (DSMZ 6285) stabiliai genomo modifikacijai. Tuo tarpu Suzuki ir Yoshida (2012) *G. kaustophilus* HTA426 transformacijai pritaikė plazmidžių konjugacinį pernešimą. Šiuo metodu jiems pavyko transformuoti minėtą bakterijų kamieną, kuris net ir naudojant elektroporaciją buvo sunkiai transformuojamas.

1.2.3.4. Šeimininko R-M sistemos įveikimo būdai

Nepriklausomai nuo pasirinkto transformacijos būdo, dažnai yra susiduriama su šeimininko R-M sistemos barjeru. Stengiantis įveikti R-M sistemų sukeltą kliuvinį naudojamos kelios strategijos. Šeimininko R-M sistema (-os) gali būti laikinai inaktyvuojama paveikiant ląsteles karščio šoku (trumpą laiką ląsteles palaikant 7–19 °C aukštesnėje temperatūroje už jų augimo temperatūrą). Taikant šią strategiją kai kurioms *Bacillus* ir *Staphylococcus* genčių bakterijoms, transformacijos efektyvumas yra pagerintas nuo 10 iki 1000 kartų (Cui ir kt., 2015; Löfblom ir kt., 2007; Zhang ir kt., 2011). Tačiau skirtingų rūšių restrikcijos fermentai pasižymi skirtingu termostabilumu, taigi ir šis metodas negali būti taikomas visoms bakterijoms.

Kitas būdas įveikti šeimininko R-M sistemą yra vektoriaus DNR modifikacija *in vitro* naudojant komerciškai prieinamas metilazes arba bakterijų beląstelinius ekstraktus. Toks metodas sėkmingai buvo panaudotas *B. cereus* ir *Bacillus weihenstephanensis* transformacijai (Groot ir kt., 2008) ir gramneigiamajai bakterijai *Haemophilus parasuis* (Chen ir kt., 2012).

Galiausiai vektorius gali būti padauginamas tokia šeimininke

(tokiame *E. coli* kamienne), kuriame DNR yra metilinama panašiu būdu kaip ir galutiniame šeimininke (Spath ir kt., 2012; van Zyl ir kt., 2013). Tuo tikslu Suzuki ir kt. (2012) sukūrė *E. coli* kamieną, gaminantį kai kurias iš *G. kaustophilus* HT4A26 (tikslinio šeimininko) metiltransferazių. Šis *E. coli* kamienas leido efektyviai transformuoti minėtą *Geobacillus* kamieną.

1.3. Pasiekimai *Geobacillus* spp. genetinėje inžinerijoje

Nors *Geobacillus* spp. genetinio manipuliavimo priemonių pasirinkimas yra skurdus, tačiau naudojantis esamomis technologijomis jau yra gauti keli genetiškai modifikuotų geobacilų kamienai, naudingi įvairiems praktiniams pritaikymams.

Geobacillus genties bakterijos yra itin patrauklūs organizmai žaliosios biotechnologijos srityje, kadangi gali būti pritaikytos ekonomiškai efektyviai fermentacijos produktų gamybai iš atsinaujinančių šaltinių, tokių kaip augalų biomasė, kurios pagrindinis komponentas yra lignoceliuliozė. Šios genties bakterijos, naudodamos įvairius cukrus, vykdo mišraus tipo fermentaciją, kurios metu, priklausomai nuo kamieno, gamina įvairius kiekius laktato, acetato, formato, etanolio ir (arba) kitų fermentacijos produktų (Cripps ir kt., 2009; Bosma ir kt., 2014). Pasitelkus genų inžineriją, įmanoma padidinti norimo metabolito išeią. Sėkmingas tokios genetinės modifikacijos pavyzdys yra *G. thermoglucosidasius* kamienas, paverstas daug žadančiu etanolio gamintoju.

Vienas iš būdų, padidinti šio kamieno etanolio išeią, yra jo paties koduojamo mišrios fermentacijos kelio modifikacija, padidinant acetyl-CoA (tarpinis produktas etanolio gamyboje) sintezę ir blokuojant kitų fermentacijos produktų gamybą. Cripps su bendradarbiais (2009) tokiu būdu sukūrė *Geobacillus thermoglucosidasius* kamieną TM242 (*ldh*⁻, *pfl*⁻, *pdh*^{up}), kurio pagrindinis fermentacijos produktas yra etanolis (0,47 g etanolio iš 1 g gliukozės). Remiantis šio kamieno (auginamo terpėje su celobioze) metabolinių srautų analize, spėjama, kad, optimizavus šio kamieno vykdomą

etanologenezę, įmanoma išgauti iki 5,4 g etanolio iš vieno litro kultūros per valandą (Niu ir kt., 2015).

Kitas būdas, padidinti geobacilų gaminamo etanolio kiekį, yra heterologinė piruvato dekarboksilazės ekspresija. Piruvato dekarboksilazė – pagrindinis homoetanolinės fermentacijos fermentas, koduojamas *pdc* geno, yra būdingas tik nedaugeliui bakterijų. Siekiant sukurti nuo *pdc* priklausomą etanolio sintezės kelią, geobacilose buvo atlikti keli bandymai, tačiau ne visi jie buvo sėkmingi (Thompson ir kt., 2008). Geno *pdc* ekspresiją geobacilose apsunkina tai, kad skiriasi kodonų naudojimo dažnis geobacilose ir šio geno šeimininko ląstelėse. *Gluconobacter oxydans* piruvato dekarboksilazės geno ekspresija *G. thermoglucosidasius* ląstelėse gauta tik suvienodinus geno kodonus su tinkamais naujam šeimininkui (van Zyl ir kt., 2013).

Geobacillus genties bakterijas galima naudoti ne tik natūraliai jų sintetiniams, bet ir naujiems, joms nebūdingiems, produktams gaminti. Tą pademonstravo Lin ir kt. (2014), sukūrę naują izobutanolio susidarymo kelią *G. thermoglucosidasius* ląstelėse.

Pastarųjų metų pasiekimai, gauti tiriant *Geobacillus* spp. ekspresijos sistemas, leidžia panaudoti kai kuriuos *Geobacillus* kamienus pramonėje svarbių baltymų gamybai. Našiausia ekspresijos sistema yra pritaikyta *G. kaustophilus* HTA426 kamienui. Naudojantis šia maltoze indukuojama ekspresijos sistema, galima gauti net iki 59 g tikslinio baltymo iš 1 litro kultūros. Be to, yra parodyta, kad jos pagalba galima išgauti net ir tuos fermentus, kurie, ekspresuojami *E. coli* ląstelėse, praranda aktyvumą (Suzuki ir kt., 2013a).

Geobacillus genties bakterijose galima ne tik ekspresuoti rekombinantinius baltymus, bet ir vykdyti kryptingą jų evoliuciją. Kryptinga evoliucija yra metodas taikomas baltymų ar kitų biomolekulių savybėms pagerinti. Jos metu, iš didžiulės tam tikro geno variantų bibliotekos, pasitelkus atrankos spaudimą, yra atsirenkami mutantai, pasižymintys reikiamomis savybėmis (Pourmir ir Johannes, 2012). Geobacilos yra puikūs šeimininkai, kai siekiama sukurti termostabilius mezofilų baltymų variantus (Kobayashi ir kt.,

2015). Tačiau šis būdas gali būti naudojamas tikrai tuomet, jei tikslinis baltymas yra gyvybiškai būtinas ląstelei. *Geobacillus* auginant žemesnėje temperatūroje galima gauti karščiui jautrių baltymų ekspresiją, tuo tarpu pakėlus auginimo temperatūrą yra atsirenkami tikrai tie kamienai, kurie turi termostabilius to baltymo variantus (Couñago ir Shamoo, 2005; Couñago ir kt., 2006). Tokiu būdu buvo gauti termostabilūs transformantų atrankos žymenys, tokie kaip, pavyzdžiui, termostabilus KNTazės variantas (Liao ir Kanikula, 1990) ir termostabilus tiostreptono atsparumo žymuo (Wada ir kt., 2015).

Nepaisant didžiulio *Geobacillus* genties potencialo, šiuo metu galima išvardinti tikrai kelis jų sėkmingo pritaikymo atvejus. Pagrindinis kliuvinys, stabdantis jų tyrimus, yra sudėtinga jų transformacija. Tikimasi, kad sukūrus naujas genetinės manipuliacijos metodologijas, bus ne tik paspartinti šių termofilų tyrimai, tačiau ir išplėstos jų pritaikymo galimybės.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Bakterijų kamienai, jų auginimo sąlygos bei naudotos plazmidės

Šiame darbe naudoti bakterijų kamienai ir plazmidės išvardinti 2.1 lentelėje. Darbe naujai aprašytų plazmidžių šaltiniu buvo du termofiliniai gramteigiamieji sporas formuojantys bakterijų kamienai, turimi Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros (VU GMF MBK) kolekcijoje (Elenos Butaitės magistro darbas, 2008), kurių priklausomybė genčiai nustatyta šiame darbe (žr. 2.2 skyrių).

E. coli kamieno DH5α auginimui naudota Luria-Bertani (LB; Sambrook and Russell, 2001) terpė. Ląstelės augintos su purtymu 37 °C temperatūroje. Termofiliniai kamienai įprastiniuose darbuose buvo auginami aerobiškai, su purtymu, 55 °C temperatūros sąlygomis, maitinamajame buljone (angl. nutrient broth; NB; 1 % peptono, 0,5 % mėsos ekstrakto, 0,5 % NaCl).

Agarizuotos terpės ruoštos į atitinkamą skystą terpę pridedant 1,5 % agarą. Auginant transformuotus *E. coli* kamienus, terpė buvo papildoma ampicilinu arba kanamicinu iki, atitinkamai, 100 µg/ml ir 30 µg/ml galutinės jų

koncentracijos. Trasformuotų *Geobacillus* spp. auginimui terpės buvo papildytos kanamicinu iki 12,5 µg/ml galutinės koncentracijos.

2.1 lentelė. Darbe naudoti bakterijų kamienai ir plazmidės

Pavadinimas	Savybės	Šaltinis
Kamienas		
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	VU GMF MBK mikroorganizmų kolekcija
<i>G. stearothermophilus</i> NUB3621R	Hsr ⁻ Hsm ⁻ Rif ^R	<i>Bacillus</i> Genetic Stock Center, BGSC
<i>G. stearothermophilus</i> NUB3621R_pUCG18	<i>G. stearothermophilus</i> NUB3621R transformuotas su pUCG18	Šis darbas
<i>G. stearothermophilus</i> NUB3621R_pUCK7	<i>G. stearothermophilus</i> NUB3621R transformuotas su pUCK7	Šis darbas
<i>Geobacillus</i> sp. 1121	Kamienas, turintis plazmidę pGTG5	VU GMF MBK mikroorganizmų kolekcija
<i>Geobacillus</i> sp. 610	Kamienas, turintis plazmidę pGTD7	VU GMF MBK mikroorganizmų kolekcija
Plazmidė		
pGTD7	Kriptinė plazmidė, išskirta iš <i>Geobacillus</i> sp. 610	Šis darbas
pGTG5	Kriptinė plazmidė, išskirta iš <i>Geobacillus</i> sp. 1121	Šis darbas
pTZ57R/T	TA klonavimo vektorius, <i>lacZ</i> , Amp ^R	Thermo Fisher Scientific
pUC19	Klonavimo vektorius, <i>lacZ</i> , Amp ^R	Thermo Fisher Scientific
pUCG18	<i>E. coli</i> – <i>Geobacillus</i> spp. šaudyklinis vektorius, pBST1 replikonas, Kan ^R (TK101)	Taylor ir kt. (2008)
pUCK	pUC19 su įterptu TK101 genu	Šis darbas
pUCK7	pUCK plazmidė su įterptu pGTD7 replikonu	Šis darbas

2.2. DNR išskyrimas ir valymas

Plazmidžių DNR buvo gryninama 1) naudojant GeneJET plazmidinės DNR išskyrimo mini rinkinius (Thermo Fisher Scientific) ir laikantis gamintojo rekomendacijų arba 2) šarminės lizės metodu, aprašytu Sambrook ir Russell (2001). Skiriant plazmides iš granteigiamųjų bakterijų, ląstelės prieš skyrimą buvo veikiamos lizocimu. Koncentruoto lizocimo tirpalo buvo dedama į ląstelių suspensiją iki galutinės 2,5 mg/ml koncentracijos ir laikoma 15–30 min 37 °C temperatūroje.

Visa genomine DNR iš *Geobacillus* sp. buvo gryninama iš ~4 ml užaugintos kultūros. Ląstelės nusodintos kultūrą centrifuguojant (8000 g 5 min), du kartus praplautos TE buferiu (10 mM Tris-HCl [pH 8], 1 mM EDTA) ir suspenduotos 8 ml to paties buferio. Suspensija papildyta lizocimu (iki galutinės koncentracijos 2,5 mg/ml) ir ribonukleaze A (RNazė A; iki galutinės koncentracijos 25 µg/ml) ir laikyta esant 37 °C temperatūrai. Po 30 min į suspensiją įpilta 500 µl 10 % natrio dodecilsulfato (NDS) ir proteinazės K (iki galutinės koncentracijos 0,5 mg/ml) ir inkubuota 55 °C temperatūroje. Tuomet mišinys buvo grynintas fenolio ir chloroformo mišiniu (tūrio santykis 1:1) ir 2 kartus chloroformu. Po paskutinio gryninimo surinkta viršutinė frakcija buvo užpilta 2 kartus didesniu 96 % etanolio tūriu. DNR nusodinta centrifuguojant (15000 g 20 min +4 °C). Nuosėdos ištirpintos vandenyje arba TE buferyje.

Genominė DNR buvo gryninama ir GeneJET genomines DNR valymo rinkiniu (Thermo Fisher Scientific) vadovaujantis gamintojo pateiktu protokolu. Mėginių DNR kiekis ir kokybė buvo vertinami elektroforetiškai ir (arba) spektrofotometriškai.

2.3. DNR klonavimo darbai/Molekulinės biologijos darbai

Visi darbe naudoti fermentai: restrikcijos endonukleazės (REazės; AatII, Acc65I, BamHI, Bsh1365I, Bsp1407I, Bsp68I, DraI, Eco31I, Eco52I, Eco88I, Eco91I, EcoRI, HincII, HindIII, KpnI, NcoI, NdeI, NheI, NotI, PaeI, PaeII, PstI, PvuI, PvuII, SacI, SalI, ScaI, SmaI, SspI, VspI, XbaI, XhoI), Taq polimerazė, T4 ligazė buvo įsigyti iš Thermo Fisher Scientific. Fermentinės

reakcijos vykdytos remiantis tiekėjo nurodymais. Visi darbe naudoti pradmenys nurodyti 2.2 lentelėje. Šio darbo metu sukurti pradmenys buvo užsakyti iš Metabion (Vokietija).

2.2 lentelė. Darbe naudoti pradmenys

Pradmenų pora	Sekos	Šaltinis
27F 1495R	3'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-5' CTACGGCTACCTTGTTACGA-5'	3'- Studholme ir kt., 1999
5r1 5f1	3'-AACTTAAACGCGACCCTCACATCA-5' 3'-CGGAAGGCGCTCGAAACAGA-5'	Kananavičiūtė ir kt., 2014
7f1 7r1	3'-CGGGCGATCGATACGGTTCAT-5' AGCCTTACGCCAGCGACAATCC-5'	3'- Kananavičiūtė ir kt., 2014
adk_F adk_R	3'-AAGCCAGGCGTTTGCGATAA-5' 3'-AGCGGCTGCGTTTGTTGAC-5'	Šis darbas
M13/pUC M13/pUC reverse	3'-GTAAAACGACGGCCAGT-5' CAGGAAACAGCTATGAC-5'	3'- Thermo Fisher Scientific
TK_F TK_R	3'-GGGGATGATGTAAAGGCTATTGG-5' GCTGAACTCTGCTTCCTCTGTTG-5'	3'- Šis darbas
TK101_F TK101_R	3'-TGAGAGTGCACCATATGTCAAATG-5' GTT <u>CATATG</u> ATTTGGAGGAAGGTTTACAC-5' (NdeI)*	3'- Šis darbas
7pK_F 7pK_R	3'-TGGCCCGTTTGTGAACTCTTTGATCGAT ACGGTTCATGGGT-5' GCAGCCTGAATGGCGAATGGCGTCGCA ACCAAAGTTGCT-5'	3'- Šis darbas

*Skliausteliuose nurodytas restrikcijos endonukleazės pavadinimas, kurios atpažinimo seka (sekoje pabraukta apatiniu brūkšniu) įterpta į oligonukleotidą.

Vektorius pUCK buvo sukonstruotas įterpiant termostabilios kanamicino nukleotidiltransferazės (KNTazės) geną į vektorių pUC19. KNTazės (TK101) šaltiniu buvo vektorius pUCG18. TK101 padaugintas pradmenimis TK101_F ir TK101_R, 5'gale įterpiant papildomą NdeI atpažinimo seką. Gautas PGR produktas buvo karpytas NdeI REaze ir įterptas į plazmidę pUC19 per šios REazės atpažinimo seką. Kadangi ši seka yra išdėstyta už pUC19 vektoriaus daugybinio klonavimo regiono (MCS, angl. multiple cloning site), transformantai buvo atrenkami naudojant atrankos terpę su kanamicinu. Įterptos sekos orientacija patikrinta karpant HincII REaze.

pUCK7 buvo sukonstruotas iš pUCK vektoriaus ir pGTD7 plazmidės replikono. Tam pGTD7 fragmentas, apimantis šios plazmidės replikacijai reikalingas sekas (nustatytas *in silico* (žr. 2.4 skyrių)) nuo 1320 iki 3279 nt ir nuo 1 iki 250 nt, buvo padaugintas 7f1 ir 7r1 pradmenimis ir įterptas į pTZ57R/T-TA klonavimo vektorių. Gauta rekombinantinė plazmidė buvo sukarpyta BamHI bei KpnI REazėmis ir iš agarozės išgrynintas 2208 bp dydžio DNR fragmentas (kuris atitiko padauginto pGTD7 replikono dydį). Pastarasis fragmentas buvo liguotas į pUCK vektorių per atitinkamų REazių atpažinimo sekose esančius MCS.

pUK5K ir pUK5EH konstruktai buvo gauti į pUCK vektorių per atitinkamas REazių atpažinimo sekas įterpus skirtingus pGTG5 plazmidės fragmentus. Į pUK5K sudėtį įėjo visa pGTG5 plazmidė, perkirpta ties 1391 nt KpnI REaze. Tuo tarpu pUK5EH konstrukto intarpas buvo gautas pradmenimis 5f1 ir 5r1 padauginus pGTG5 plazmidės fragmentą, apimančią regioną nuo 302 nt iki 1540 nt ir nuo 1 nt iki 99 nt, ir įterptas į pTZ57R vektorių. Galiausiai šis fragmentas buvo iškirptas EcoRI bei HindIII REazėmis, išgrynintas iš agarozinio gelio ir panaudotas tolimesniems klonavimo darbams.

Konstruktas p7K buvo gautas naudojantis nuo restrikcijos nepriklausomu klonavimo metodu (Van Den Ent ir Löwe; 2006; Bond ir Naus; 2012). Iš pradžių buvo padaugintas norimas įterpti pGTD7 fragmentas pradmenimis (jų 3'-dalis yra komplementari norimo įterpti pGTD7 plazmidės fragmento galams, o 5'-dalis – vektoriaus galinėms sekoms, ties kuriomis norima įterpti tą fragmentą). PGR buvo atlikta naudojant „Phusion“ DNR polimerazę (Thermo Fisher Scientific), vadovaujantis gamintojo nurodymais. Ciklų parametrai: pradinė denatūracija – 45 s (98 °C), 30 ciklų po 10 s (98 °C), 20 s (65 °C), 45 s (72 °C), galutinė DNR sintezė – 10 min (72 °C). Gautas produktas naudotas kaip megapradmuo, kurio pagalba padaugintasis pGTD7 fragmentas buvo įterptas į pUCK7 plazmidės seką. Antrosios PGR ciklų parametrai: pradinė denatūracija – 45 s (98 °C), 15 ciklų po 10 s (98 °C), 20 s (65 °C), 90 s (72 °C), galutinė DNR sintezė – 10 min (72 °C). Galiausiai reakcijos mišinys buvo paveikiamas DpnI REaze (iki galutinės koncentracijos

reakcijos mišinyje 10 u/μl) 2 val. (37 °C), kurios veikla sustabdoma laikant 20 min (80 °C). Tokiu būdu iš reakcijos mišinio yra pašalinama metilinta pradinė pUCK plazmidė. Gauti konstruktai naudojami pernašai į *E. coli* ląsteles.

Gavus transformantus, juose esančių plazmidžių buvimas įvertintas išskyrus iš jų plazmidinę DNR ir atlikus restrikcinę analizę.

2.4. DNR sekoskaita ir sekų bioinformatinė analizė

Termofiliniai, plazmidžių turintys kamienai buvo identifikuojami atliekant 16S rRNR geno analizę. 16S rRNR genai buvo padauginti polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) būdu, į reakcijos mišinį dedant iš atitinkamo kamieno išskirtos genomines DNR ir naudojant universalių pradmenų porą: 27F ir 1495R (2.2 lentelė). Gautų fragmentų sekos nustatytos DNR grandinės terminacijos (Sanger-dideoxy) metodu Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre (Lietuva). Sekų panašumų buvo ieškoma duomenų bazėse naudojantis BLAST (angl. Basic Local Alignment Search Tool) programa, pasiekama per NCBI (angl. National Centre for Biotechnology Information) tinklalapį (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Išskirta plazmidinė DNR pGTG5 ir pGTD7 plazmidžių sekoms nustatyti buvo atitinkamai perkerpama HincII ir BamHI REazėmis. Gauti fragmentai klonuoti į pUC19 vektorių, jų sekos nustatytos naudojant M13 pradmenų porą. Pasinaudojus nustatytomis sekomis, buvo sukurti kiti pradmenys, reikalingi trūkstančių plazmidžių fragmentų sekoskaitai.

Atviro skaitymo rėmeliai (ASR) buvo nustatyti naudojantis „ORF Finder“ programa, esančia NCBI tinklalapyje ir FGENESB programa, pasiekama iš Softberry tinklalapio (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>). Sekos, kurios galimai koduoja baltymus, buvo toliau tiriamos naudojantis BLASTX ir konservatyvių domenų paieškos (CD-search) programomis, pasiekiamomis iš NCBI tinklalapio. Baltymų ir DNR sekų palyginimai buvo atlikti ClustalW programa, pasiekama iš EMBL-EBL tinklalapio (<http://www.ebi.ac.uk>). DNR formuojamos galimos antrinės struktūros buvo

nustatytos naudojant Mfold programą (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>).

2.5. Bakterijų transformacija

Elektrokompetentinės *E. coli* DH5 α ląstelės buvo ruošiamos ir elektrotransformuojamos pagal metodiką, pateiktą Sambrook and Russell (2001).

Elektrokompetentinės *G. stearothermophilus* NUB3621R ląstelės buvo augintos skystoje terpėje esant 55 °C temperatūrai purtyklėje iki tam tikros ląstelių augimo stadijos. Tuomet ląstelės atvėsinaamos laikant jas 15 min ledo vonioje ir surenkamos jas centrifuguojant 10 min (8000 g., 4 °C). Nuosėdos 4 kartus praplaunamos ir suspenduojamos toje pačioje elektrotransformacijos terpėje (ETT). Gaunama ląstelių suspensija, kurios OT₅₉₀ siekia ~100. Suspensija išpilstoma po 50 μ l į atskirus mėgintuvėlius. Visi etapai atliekami esant +4 °C temperatūrai arba laikant ląsteles ledo vonioje. Paruoštos ląstelės naudojamos elektrotransformacijai iš karto arba laikomos -70 °C šaldiklyje iki panaudojimo.

Elektrotransformacijai ląstelės buvo sumaišomos su ~100 ng plazmidinės DNR (1 μ l) ir, naudojant aparatą „Eppendorf Multiporator“ (eksponentiškai mažėjantis pulsas, laiko konstanta 5 ms, varža 600 Ω , kondensatorius 10 μ F), paveikiamos elektrinio lauko tam tikro stiprio impulsu. Transformuotos ląstelės perkeliamos į 1,5 ml gaivinimo terpės ir purtant (180 rpm) laikomos reikiamos temperatūros purtyklėje. Po 1,5 val. ląstelės išsėjamos ant agarizuotos terpės ir laikomos 55 °C temperatūroje 12–24 val. Reikiamą plazmidę turintys transformantai yra patikrinami išskiriant iš jų plazmidinę DNR ir atliekant restrikcinę analizę arba kolonijų PGR metodu. Transformacijos efektyvumas įvertinamas gautų transformantų skaičiumi, tenkančiu 1 μ g plazmidinės DNR.

2.6. *G. stearothermophilus* transformacijos sąlygų optimizavimas

Parenkant geriausias sąlygas *G. stearothermophilus* NUB3621R

transformacijai, ląstelės buvo auginamos naudojant kelias skirtingas terpes, nurodytas 2.3lentelėje.

2.3 lentelė. Naudotų auginimo terpių sudėtis

Terpės pavadinimas	Sudėtis
ANB	NB, papildyta 2,30 mM CaCl ₂ , 1,10 mM MgCl ₂ , 0,07 mM KCl, 0,91 μM ZnSO ₄ , 0,47 μM MnSO ₄
ANBS	ANB, papildyta 0,5 M sorbitolio
LB	1 % peptono, 0,5 % NaCl, 0,5 % mielių ekstrakto
mLB (Zeigler, 2001)	LB, papildyta 1,05 mM nitrilotriacto rūgšties, 0,59 mM MgSO ₄ , 0,91 mM CaCl ₂ , 0,04 mM FeSO ₄
NB	1 % peptono, 0,5 % NaCl, 0,5 % mėsos ekstrakto
TSB (Merck)	1,7 % kazeino peptono, 0,3 % sojų peptono, 0,25 % gliukozės, 5 % NaCl, 0,25 % K ₂ HPO ₄

Ląstelės buvo augintos kiekvienoje iš šių terpių vis įvertinant kultūros optinį tankį (OT). OT₅₉₀ pasiekus 1,0 ląstelės buvo surenkamos. Naudojant ANB terpę, ląstelės taip pat buvo surenkamos ir tada, kai OT₅₉₀ vertė buvo 0,75; 1,0; 1,15; 1,3 bei 1,4. Tiriant glicino poveikį, ląstelės buvo auginamos mLBS terpėje. OT₅₉₀ pasiekus 0,2 vertę, kultūra buvo papildoma 2 %, 1 % arba 0,5 % glicino ir inkubuojama toje pačioje temperatūroje dar 1 val.

Surinktos ir praplautos ląstelės suspenduojamos elektrotransformacijos terpėje (ETT) iki OT₅₉₀ ~100. Naudotų ETT sudėtis nurodyta 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. Naudotų elektrotransformacijos terpių sudėtis

Terpės pavadinimas	Terpės sudėtis				
	Glicerolis	Sorbitolis	Manitolis	Trehalozė	MgCl ₂
G	10 %				
SMG	10 %	0,4 M	0,4 M		
SMGM	10 %	0,4 M	0,4 M		1 mM
TG	10 %			0,5 M	

Paruoštos elektrokompetentinės ląstelės sumaišomos su plazmidine DNR (100 ng) ir paveikiamos 16, 18, 20, 22 arba 24 kV/cm stiprio elektriniu

lauku. Ląstelėms atgaivinti buvo naudotos terpės, identiškos jų auginimo terpėms, išskyrus TSB terpėje auginamas ląsteles, kurios buvo gaivinamos 2×LBG terpėje (dvigubos koncentracijos LB terpė, papildyta 0,5 % gliukozės ir 0,01 % albumino; Narumi ir kt., 1992b). Perkeltos į šias terpes, ląstelės buvo laikomos 120 min (50 °C) arba 90 min 55 °C temperatūroje su purtymu ir galiausiai išsėjamos ant agarizuotos terpės, papildytos reikiamu antibiotiku.

Elektrotransformacijos sąlygų optimizavimui buvo naudojama pUCG18 plazmidė. Visos kitos plazmidės į NUB3621 kamieną buvo perkeliamos tomis sąlygomis, kuriomis transformacija vyko intensyviausiai.

Ląstelių gyvybingumas po elektrotransformacijos buvo nustatomas išsėjant atitinkamo stiprio elektros impulsu paveiktas ląsteles ant agarizuotos ANB terpės (be kanamicino) ir lyginant suformuotų kolonijų skaičių su elektriniu impulsu nepaveiktų ląstelių formuojamų kolonijų skaičiumi.

2.7. Plazmidžių segregacinio stabilumo nustatymas

Segregacinis tiriamų plazmidžių stabilumas buvo nustatomas auginant tas plazmides turinčius kamienus (NUB3621R_pUCK7 ir NUB3621R_pUCG18) ANB terpėje be antibiotikų esant 55 °C temperatūrai. Kas 12 generacijų dalis kultūros buvo perkeliama į šviežią ANB terpę ir auginama toliau. Taip pat, kas 12 generacijų buvo nustatoma plazmides išlaikiusių ląstelių procentinė dalis. Tam bakterijų kultūra buvo išsėjama ant dviejų skirtingų agarizuotų terpių: 1) ANB terpės ir 2) ANB terpės su kanamicinu. Abiejų terpių KSV skaičius įvertinamas po 24 val. auginimo 55 °C temperatūroje.

2.8. DNR-DNR hibridizacija „Southern blot“ metodu

DNR hibridizacija su biotinu žymėtais DNR zondais buvo atliekama vadovaujantis Thermo Fisher Scientific pateiktu protokolu. Trumpai aprašant, visa genomine DNR iš kamienų 1121 ir 610 buvo paveikiama S1 nukleaze. Tuomet S1 nukleaze paveiktų ir nepaveiktų mėginių DNR išskirstyta

agaroziniame gelyje. Kiekvieno mėginio buvo leidžiama į du atskirus agarozės gelio takelius. Po elektroforezės gelis padalinamas į dvi dalis, kad kiekvienai jų tektų po vieną kiekvieno mėginio takelį. Tuomet viena gelio dalis iš karto perkeliama į neutralizacijos buferį, o kita prieš neutralizaciją 30 min palaikoma šarminiame tirpale. Po to DNR perkeliama ant nailoninės membranos (SensiBlot Plus Nylon Membrane, Thermo Fisher Scientific). Biotinu žymėti zondai buvo susintetinti pasinaudojant pradmenų poromis 7f1 ir 7r1 (pGTD7 plazmidei), bei 5f1 ir 5r1 (pGTG5 plazmidei) naudojantis „Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit“ (Thermo Fisher Scientific) rinkiniu. Su zondais hibridizavusi DNR buvo įvaizdinta „Biotin Chromogenic Detection Kit“ (Thermo Fisher Scientific) rinkiniu.

2.9. Realus laiko kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija

Santykinis pUCG18 ir pGTD7 plazmidžių kopijų skaičius *G. stearothermophilus* NUB3621R ląstelėse buvo nustatytas realaus laiko kiekybinės polimerazinės grandininės reakcijos metodu (RT-qPCR). *G. stearothermophilus* NUB3621R_pUCG18 ir NUB3621R_pUCK7 kamienų ląstelės buvo augintos maždaug 8 val. ANB terpėje su kanamicinu iki $OT_{590} \sim 2,0$. Tada surinkus ląsteles iš jų buvo išskiriama visa genomine DNR. DNR mėginius praskiedus dešimt kartų, su jais buvo paruošiami 20 μ l bendro tūrio PGR reakcijos mišiniai, tam naudojant „Thermo Fisher Maxima SYBR Green qPCR Master Mix“ rinkinį. Buvo naudotos dvi pradmenų poros (2.2 lentelė). Pradmenų TK_F ir TK_R taikynys – 114 bp ilgio fragmentas – iš abiejose plazmidėse esančio TK101 geno. Tuo tarpu pradmenimis adk_F ir adk_R buvo padaugintas 110 bp ilgio fragmentas iš vienkopijinio chromosominio geno *adk*, koduojančio adenilato kinazę (GeneBank # AY729037). Kiekvieno pradmens į reakcijos mišinį buvo dedama iki 0,5 μ M galutinės jo koncentracijos. Kiekviena iš reakcijų buvo kartojama bent tris kartus.

Amplifikacijai ir gautų duomenų registracijai buvo naudojama BioRad CFX96 realaus laiko nustatymo sistema. Reakcijos atliktos pagal tokią

temperatūrinių ciklų protokolą: 10 min (95 °C) pradinei denatūracijai, po kurios sekė 40 ciklų susidedančių iš 15 s (95 °C), 30 s (58 °C) ir 30 s (72 °C).

Pradmenų specifiškumas buvo patvirtintas atlikus PGR produktų lydymosi temperatūros analizę (temperatūrą keičiant nuo 60 iki 90 °C po 0,3 °C per sekundę) ir agarozės gelio elektroforezės metodu. Santykinis plazmidžių kopijų skaičius (PKS) ląstelei buvo apskaičiuotas pagal formulę: $PKS = (E_c)^{C_{tc}} / (E_p)^{C_{tp}}$ (Skulj ir kt., 2008), kur E_c ir E_p yra amplifikacijos efektyvumas chromosominiam (*adk*) ir plazmidiniam (TK101) taikiniams, C_{tc} ir C_{tp} – slenkstinė ciklo vertė chromosominiam ir plazmidiniam taikiniams.

3. DARBO REZULTATAI IR APTARIMAS

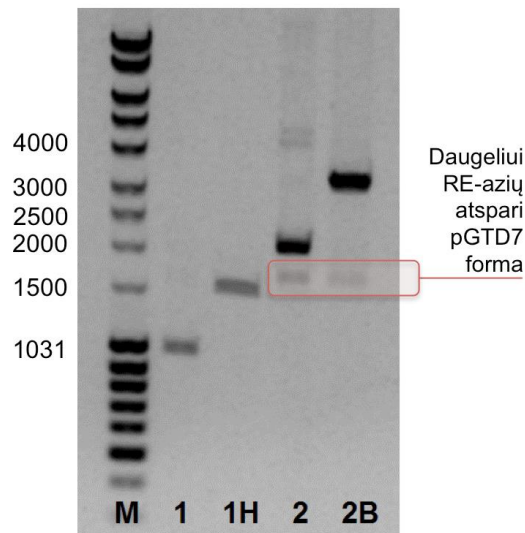
3.1. Plazmidės turinčių kamienų nustatymas ir jų identifikavimas

Pirmasis šio darbo uždavinys buvo naujų plazmidžių, kurios galėtų būti panaudotos *Geobacillus* spp. vektorių kūrimui, apibūdinimas. Plazmidžių paieška buvo atlikta tarp 68 neidentifikuotų termofilinių gramteigiamųjų, sporas formuojančių bakterijų kamienų, išskirtų iš dirvos (Elenos Butaitės magistro baigiamasis darbas) ir saugomų Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros mikroorganizmų kolekcijoje (Gamtos mokslų fakultetas, Vilniaus universitetas, Lietuva). Dviejuose iš tirtų kamienų buvo aptiktos 2 mažos molekulinės masės plazmidės (kiekviename kamiene po vieną plazmidę).

1121 kamieno plazmidinės DNR mėginyje po elektroforezės agaroziniame gelyje buvo identifikuota viena 1,5 kb dydžio plazmidė, pavadinta pGTG5 ir turinti vienetinę HincII REazės atpažinimo seką (3.1 pav.). Antrojo 610 kamieno plazmidinės DNR mėginyje buvo nustatyta 3,3 kb plazmidė, pavadinta pGTD7, turinti vienetinę BamHI atpažinimo seką. Pastarojo kamieno plazmidinės DNR mėginyje be pGTD7 plazmidės sudarytos juostos taip pat buvo identifikuota kiek žemiau išsidėstanti DNR juosta, besiskirianti savo restrikcijos profiliu (3.1 pav.). Dėl to iš pradžių buvo manoma, kad ši DNR juosta yra suformuota antrosios 610 kamieno plazmidės. Jos DNR buvo atspari visoms darbe naudotoms REazėms (visos darbe

naudotos REazės išvardintos 2.3 skyriuje), išskyrus vienintelę REazę Bsp1431, kuri šią DNR sukarpo į smulkius fragmentus. Tačiau atskyrus ją nuo likusios kamieno plazmidinės DNR (išskyrus iš agarozės gelio) ir klonavus bei sekvenavus 200–900 bp ilgio Bsp1431 restrikcijos fragmentus buvo nustatyta, kad visų tų fragmentų sekos sutampa su plazmidės pGTD7 atitinkamais fragmentais. Taigi, padaryta išvada, kad agaroziniame gelyje matomą juostą sudarė ta pati, daugeliui REazių atspari, pGTD7 plazmidė.

1121 ir 610 kamienai buvo identifikuoti atlikus 16S rRNR genų sekų analizę. Naudojant 27F ir 1495R pradmenis buvo gautos dalinės tiriamo geno sekos. Nustatytų sekų panašumas buvo analizuojamas programa BLASTN lyginant jas su sekomis, esančiomis duomenų bazėse.



3.1 pav. Kamienų *Geobacillus* sp. 1121 ir 610 plazmidinė DNR. Agarozinio gelio 1 takelyje matoma kamieno 1121 (plazmidė pGTG5), 2 – kamieno 610 (plazmidė pGTD7) plazmidinė DNR. Takelyje 1H matoma kamieno 1121 plazmidė, kirpta HincII REaze, o takelyje 2B – kamieno 610 plazmidė, karpyta BamHI REaze. Naudotas markeris (M) – SM0403

Parodyta, kad 610 kamienas pagal tą seką yra 100 % identiškąs *Geobacillus thermodenitrificans* SSCT85 AB210952 sekai. Tuo tarpu 1121 kamieno 16S rRNR geno seka buvo 100 % identiška kelioms *G. thermoglucosidasius* sekoms (FJ491390, AY608990, AY608984) ir vienai *G. stearothermophilus* sekai (AY608989). Remiantis šiais duomenimis tirti kamienai priskirti *Geobacillus* genčiai ir toliau darbe yra vadinami *Geobacillus*

sp. 610 ir *Geobacillus* sp. 1121 kamienais. Abiejų kamienų sekos įkeltos į GeneBank duomenų bazę, joms buvo suteikti tokie identifikacijos numeriai: KC013279 – 610 kamieno 16S rDNR sekai, ir KC243779 – 1121 kamieno 16S rDNR sekai.

3.2. Plazmidžių sekų nustatymas ir jų analizė

Nuskaičius plazmidžių pGTD7 ir pGTG5 sekas, nustatytas jų tikslus dydis ir GC sudėtis. pGTD7 plazmidė sudaryta iš 3279 bp, kurių GC sudėtis yra 45,90 %. pGTG5 plazmidė yra 1540 bp ilgio, o jos GC sudėtis – 46,04 %.

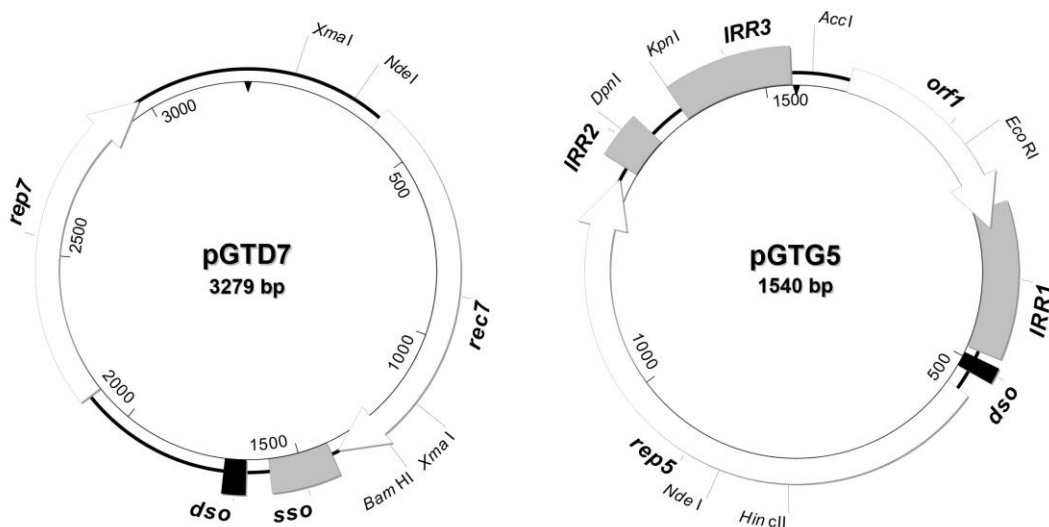
Abiejų plazmidžių GC sudėtis atitinka *Geobacillus* genties genomui būdingą GC sudėtį, kuri gali svyruoti nuo 42 iki 55 % (Coorevits ir kt., 2012). Tačiau ji yra mažesnė už GC sudėtį, būdingą tipiniams genties kamienams, į kuriuos savo 16S rDNR sekomis yra panašiausi šių plazmidžių natyvūs šeimininkai: *G. thermodenitrificans* – (48–52 %) ir *G. thermoglucosidasius* – (53 %) (Nazina ir kt., 2001). Šie rezultatai sutampa su literatūroje aprašytais duomenimis, rodančiais, kad bakterijose aptinkamų plazmidžių ir kitų judriųjų genetinių elementų GC sudėtis paprastai yra panaši ir dažniausiai iki 10 % mažesnė nei jų pačių chromosomų GC sudėtis (van Passel ir kt., 2006; Nishida, 2012a). Tai leidžia daryti išvadą, kad plazmidės pGTG5 ir pGTD7 jau ilgą laiką koevoliucionuoja kartu su savo šeimininkais ir yra stabiliai perduodamos vertikaliu būdu.

Atlikus plazmidžių sekų bioinformatinę analizę parodyta, kad abi plazmidės koduoja po du atviro skaitymo rėmelius (ASR), susijusius su šių plazmidžių stabilium išlaikymu ląstelėse.

Plazmidės pGTD7 baltymai, koduojami ta pačia kryptimi orientuotų ARS, išsidėsčiusių ties 372–1397 nt ir 2111–2980 nt, pavadinti Rec7 ir Rep7 (3.2 pav.). Remiantis jų sekų palyginimu su kitų baltymų sekomis, esančiomis NCBI duomenų bazėje, abu baltymai panašūs tuo, kad skelia DNR kirpdami vieną iš dvigrandės DNR grandinių, tarpiniame etape kovalentiškai prisijungdami prie vieno iš naujai suformuotų DNR galų per tirozino liekaną,

tačiau skiriasi skėlimo poliškumu.

Rep7 yra iš 289 aminorūgščių (ar.) sudarytas baltymas, kuris savo seka yra panašiausias į *Bacillaceae* šeimos bakterijų plazmidėms – pL3 (*Halobacillus halophilus*), pBC1 (*Bacillus coagulans*), pJAM1 (*Bacillus* sp.) ir pAO1 (*Aeribacillus pallidus*) – būdingus Rep baltymus. Išvardintos plazmidės yra priskiriamos vienai iš geriausiai ištirtų RR plazmidžių šeimų – pC194/pUB110, kurios replikacijos baltymai sudaro Rep_1 baltymų superšeimą. RR plazmidžių replikacijos iniciacijos baltymai priklauso HUH endonukleazių šeimai (Chandler ir kt., 2013). Šie baltymai atpažįsta tam tikrą DNR seką, perskelia vieną iš DNR grandinių ir lieka kovalentiškai prisijungę prie 5' DNR molekulės galo. Likęs laisvas 3'galas yra naudojamas kaip pradmuo pirmaujančios grandinės sintezei. Tokiu būdu Rep7 baltymas inicijuoja plazmidės replikaciją.



3.2 pav. Plazmidžių pGTD7 (kairėje) ir pGTG5 (dešinėje) schemas. Baltomis strėlėmis pažymėti atviri skaitymo rėmeliai; juodomis juostomis pažymėtos sekos, identiškos konservatyviai RR plazmidžių *dso* sekai; pilkomis juostomis – sritys, identifikuotos kaip *sso*, arba sekos, potencialiai galinčios būti *sso*

Antrasis Rec7 baltymas sudarytas iš 341 ar. Jis savo seka yra panašiausias į kai kuriuos *Bacillales* eilės bakterijų plazmidžių ar chromosomų (tikslī plazmidžių ar chromosomų informacija nepateikta, kadangi genomai

nebaigti sekvenuoti) baltymus, kuriems funkcija buvo priskirta remiantis sekos panašumu į kitus baltymus (3.1 lentelė). Rec7 baltymo sekoje, esančioje tarp 142 ir 272 ar., nustatytas Int_Rec_C konservatyvus domenas (būdingas fagų integrazių šeimos PF00589 (PFAM baltymų duomenų bazėje) baltymams ir yra priskirtinas prie DNA_Bre_C (DNA breaking-rejoining enzymes, C-terminal domain) superšeimos baltymų.

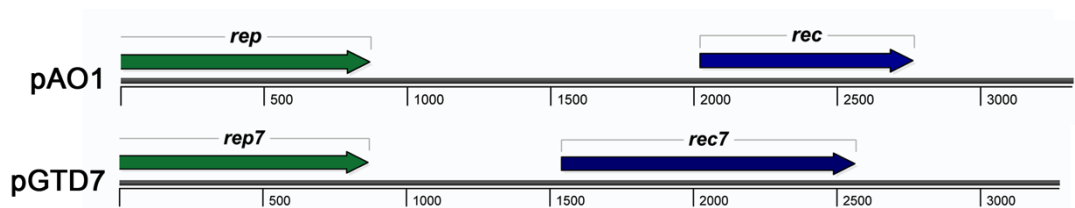
DNA_Bre_C domenas yra būdingas specifinių, nuo tirozino priklausomų rekombinazių šeimai, dar vadinamai λ (lambda) integrazių šeima. Vieni geriausiai ištirti šios šeimos atstovai yra bakterijų XerC/Dir λ fago Cre rekombinazės (Grindley ir kt., 2006). Šie baltymai atlieka DNR grandinės skėlimo ir sujungimo reakciją. Tarpiniame etape baltymas per tirozino liekaną kovalentiškai prisijungia prie perskeltos grandinės 3' galo, kuris kitame etape yra pernešamas prie kitos duplekso grandinės 5' galo.

Taigi tikėtina, kad ir Rec7 baltymas atlieka rekombinazės funkciją. Rekombinazės yra reikalingos plazmidžių multimerų (susidarančių dėl homologinės rekombinacijos) išskyrimui ir plazmidžių paskirstymui ląstelėms dalijantis (segregacijai) bei lemia stabilų plazmidžių išlaikymą ląstelių populiacijoje (Grainge ir Sherratt, 2007).

Visgi turint omenyje nedidelį Rec7 panašumą minėtiems šios superšeimos baltymams, kurių mechanizmas ir funkcija yra įrodyta eksperimentiškai, negalima atmesti galimybės, kad šis baltymas gali turėti ir kitokį vaidmenį. Didelė dalis mažų RR plazmidžių (iki 5 kb) savo sudėtyje be Rep baltymo taip pat turi ir kitą baltymą, relaksazę (Fernandez-Lopez ir kt., 2014; Smillie ir kt., 2010). Relaksazė taip pat įkerpa vieną iš dvigrandės DNR grandinių tam tikroje jos atpažįstamoje sekoje ir tokiu būdu mobilizuoja plazmidę, t. y. įgalina plazmidės pernašą į kitas ląsteles, dalyvaujant transveiksniams (konjugacijos aparatui, kurio komponentai koduojami kitos plazmidės, vadinamos pagalbine). (Fernandez-Lopez ir kt., 2014). Nors Rec7 savo sekoje ir neturi aprašytų ar spėjamų relaksazių konservatyvių motyvų, bet taip pat gali būti susijęs su plazmidės mobilizacija, kadangi yra parodyta, kad kai kurių relaksazių šeimų baltymai gali persikloti su kitoms šeimoms

priklausančiais baltymais, kurių atstovai kerpa vieną iš DNR grandinių (Rep baltymų šeimos, transpozazės) (Garcillan-Barcia ir kt., 2007).

Įdomu tai, kad pGTD7 plazmidės genetinė struktūra yra labai panaši į *Aeribacillus pallidus* (bazonimas *Bacillus pallidus*) pAO1 plazmidės (plazmidės šeimininkas išskirtas iš komposto Japonijoje) (Karita ir kt., 2001) genetinę struktūrą. Abi plazmidės yra panašaus dydžio (3,3 kb) ir turi du homologiškus ASR (3.1 lentelė), išdėstytus panašia tvarka (3.3 pav.). Toks šių plazmidžių panašumas leidžia spėti apie jų bendrą kilmę. Tačiau pastebimas GC sudėties skirtumas: pAO1 plazmidės GC sudėtis – 39,4 %, maždaug 7 % mažesnė nei pGTD7 plazmidės. Toks skirtumas gali būti aiškinamas jų prisitaikymu prie šeimininko (*A. pallidus* chromosomoje GC sudaro 39–41 %; Yasawong ir kt., 2011).



3.3 pav. Plazmidžių pGTD7 ir pAO1 schemas

pGTG5 plazmidės sekoje nustatyti ASR yra transkribuojami ta pačia kryptimi ir yra išsidėstę ties 68–331 nt ir 539–1273 nt. (3.2 pav.). Pirmojo jų produktas pavadintas Orf1, antrojo – Rep5. Rep5 yra 244 ar. dydžio baltymas, kuris savo seka yra panašiausias su *Brevibacillus borstelensis* spėjamu Rep baltymu, koduojamu pHT926 plazmidės, o taip pat ir su kai kurių kitų bakterijų į duomenų bazę įtrauktų, tačiau netyrinėtų, baltymų sekomis. Nors šio baltymo sekoje aptiktas domenai, sietinas su RR replikacijos mechanizmu, tačiau savo konservatyviais motyvais nepanašus nei į vieną iš aprašytų plazmidžių šeimų baltymų. Rep5 baltymui priskirta pGTG5 plazmidės replikacijos iniciacijos funkcija.

3.1 lentelė. Plazmidžių pGTG5 ir pGTD7 numanomų genų koduojamų produktų panašumas į kitus NCBI duomenų bazėje esančius baltymus

Plazmidės pavadinimas	Spėjamas genas				Panašiausi baltymai			
	Pavadinimas	Pozicija plazmidės sekoje	Produkto ilgis, ar.	Spėjama funkcija	Baltymas (Organizmas, plazmidė)	Sutapsių a.r. skaičius/tikrintų ar. skaičius (%)	E-vertė	Identifikacijos numeris
pGTG5	orf1	68–331	87	Nežinoma	Hipotetinis baltymas (<i>Anoxybacillus</i> sp. KU2-6(11))	58/87(67%)	7e-26	WP_035050340
					Hipotetinis baltymas (<i>Geobacillus</i> sp. A8)	27/77 (35%)	1e-04	WP_021321271
					Hipotetinis baltymas (<i>Bacillus thuringiensis</i> , p08)	19/65(29%)	0,023	AFQ20077
					Hipotetinis baltymas (<i>G. stearothermophilus</i> , pSTK1)	19/88(22%)	0,19	NP_044340
	rep5	539–1237	244	Replikacija	Hipotetinis baltymas ^A (<i>Geobacillus</i> sp. A8)	166/186(89%)	6e-103	EQB97645
					Replikacijos baltymas (<i>Br. borstelensis</i> , pHT926)	116/259(45%)	2e-62	WP_011116963
Replikacijos baltymas (<i>Brevibacillus laterosporus</i> , pBRLA07)					94/263(36%)	5e-42	WP_003338839	
pGTD7	rec7	372–1397	341	Rekombinacija	Fagų integrazių šeimai priklausanti site-spezifinė rekombinazė (<i>Sporosarcina newyorkensis</i>)	189/339(56%)	1e-90	EGQ18955
					Integrazė (<i>Solibacillus silvestris</i> , pSSIL1)	115/357(32%)	3e-51	WP_014829545
					Rekombinazė (<i>Bacillus</i> sp. B-3 ^B , pAO1)	75/264(28%)	3e-31	NP_077029
	rep7	2111–2980	289	Replikacija	Replikacijos baltymas (<i>H. halophilus</i> , pL3)	203/281(72%)	8e-113	WP_014645401
					Replikacijos baltymas (<i>B. coagulans</i> , pBC1)	191/280(68%)	1e-105	AAA98048
					Replikacijos baltymas (<i>Bacillus</i> sp. JAMB750, pJAM1)	190/280(68%)	6e-101	YP_003939563
				Replikacijos baltymas (<i>Bacillus</i> sp., B-3 ^B , pAO1)	186/280(66%)	2e-103	NP_077030	

^APažymėto baltymo žinoma ne visa seka

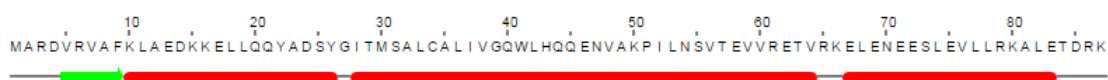
^BDabartinis šios rūšies pavadinimas – *Aeribacillus* sp.

^CE-value (expectation value) – skaitinė išraiška išreikšta tikimybe, kad dvi sekos – duomenų bazėje rastoji ir tiriamoji – tarpusavyje sutampa ne dėl panašumo ir homologijos, o atsitiktinai.

3.2 lentelė. Rep baltymų konservatyvių motyvų aminorūgščių ir *dso nick* sričių nukleorūgščių sekų palyginimas. Aminorūgštys ir nukleotidai, sutampantys su pGTD7 ir pGTG5, yra pažymėti geltonai. Pasviręs brūkšnys *dso* sekoje nurodo spėjamą kirpimo („*nick*“) vietą.

Plazmidė	Rep baltymų konservatyvios sekos			<i>Dso nick</i> regionas	Organizmas
	Motyvas I	Motyvas II	Motyvas III		
	pC194/pUB110 šeimos plazmidės				
pGTD7	FLTLTVRN	YHPHFHVLLCV	ILEVSKYPVKDQDV	TTCTTTCTTATCTTG/AT	<i>Geobacillus</i> sp. 610 <i>A. pallidus</i> <i>B. thuriengiensis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. aureus</i>
pA01	FLTLTVRN	YHPHFHVLLAV	ILEVSKYPVKDQDV	TTTTTTCTTATCTTG/AT	
pFL5	FLTLTVRN	YHPHFHVLPV	VLEISKYPVKDQDI	TCTTTCTTATCTTG/AT	
pUB110	FLTLTVKN	YNQHMVHVLVCV	--ETAKYPVKDQDF	TTCTTTCTTATCTTG/AT	
pC194	FLTLTTPN	YNPHFHVLIAM	LYEMAKYSGKDSQY	TTCTTTCTTATCTTG/AT	
Konsensusas	FLTLTxxN	YxxHUHVLUxV	ExxKYxxKxxDU		
	Plazmidžių ir fagų replikonai panašūs į ΦX174				
pGTG5	FFTLTFRE	GAVHYHVVFVN	GAYVTKYMTKNMPY	CTATTACTTTACTTG/ATTAT	<i>Geobacillus</i> sp. 1121 <i>Br. borstelensis</i> <i>Br. laterosporus</i> Chlamydia phage Enterobacteria phage
pHT926	FMTLTFAE	GAVHYHCVFFN	GAYVTKYMQKNLQF	CATCCTGTTAACTTG/ATTAT	
pBRLA07	FITLTYEE	GAVHYHMM-SN	GAYISKYMMKNLQY	TCCTTATTAGACTTG/ATTTA	
chp2	FLTLTYED	QRPHYHLLIYN	AGYVARYSLKNYDF	ATAACAGTCTACTTG/ATCTG	
ΦX174	FDLTLAD	GRLHFHAVHFM	GFYVAKYVNMRTL	CGAAAAATTATCTTG/ATAAA	
Konsensusas	futLt	gxuHUHuxuu	gxYuakYuxk		

Orf1 koduoja nedidelį (80 ar.) baltymą, kurio seka šiek tiek panaši į kelis hipotetinius baltymus, būdingus kai kurioms *Bacillaceae* šeimos bakterijų plazmidėms. Šio baltymo N-galo 6–48 ar. atkarpa yra panaši į juostos-spiralės-spiralės (RHH; angl. ribbon-helix-helix) motyvą, esantį minėtųjų baltymų sekose. RHH motyvo struktūrai būdinga viena β juosta už kurios iš karto išsidėsto dvi α spirales. Dviejų, homodimerą sudarančių, RHH baltymų β juostos sąveikauja tarpusavyje sudarydamos β klostytą lakštą, kuris įsiterpia į DNR didįjį griovį. Šis motyvas yra būdingas transkripcijos veiksniams, tarp jų ir pMV158 plazmidės CopG baltymui, represuojančiam šios plazmidės replikacijos iniciacijos baltymo sintezę ir tokiu būdu reguliuojančiam jos kopijų skaičių ląstelėje (Schreiter and Drennan, 2007). Patikrinus Orf1 antrinę struktūrą *in silico* (3.4 pav.) (naudojantis Jpred4 programa (Drozdetskiy ir kt., 2015)), matoma, kad baltymo N-galo 4–10 ar. yra linkusios įgyti β juostos struktūrą, o toliau išsidėsčiusios ar. gali sudaryti tris α spirales. Visgi turint omenyje, kad į šį baltymą panašiausi kitų prokariotų baltymai taip pat yra lokalizuoti plazmidėse (arba jų tiksli lokalizacija genome nežinoma), galima daryti prielaidą, kad Orf1 atliekama funkcija yra susijusi su jį koduojančios plazmidės stabilumu ir (arba) kopijų skaičiaus palaikymu.



3.4 pav. pGTG5 plazmidės hipotetinio Orf1 baltymo spėjama antrinė struktūra. Žalia rodykle pažymėta β juosta, raudonomis linijomis – α spirales.

Nustatytos plazmidžių sekos įkeltos į GeneBank duomenų bazę ir yra pasiekiamos pagal tokius identifikacijos numerius: KC255223 (pGTD7 plazmidės seka) ir KC255224 (pGTG5 plazmidės seka).

Abi šiame darbe aprašytosios plazmidės yra vienos iš mažiausių *Geobacillus* genties bakterijų plazmidžių; iš jų pGTG5 yra pati mažiausia iš visų iki šio darbo parašymo datos aprašytų plazmidžių, būdingų šiai genčiai. Apskritai mažos plazmidės yra retai sutinkamos *Geobacillus* genties bakterijose. Kaip galima matyti iš duomenų NCBI duomenų bazėje, šiose

bakterijose yra neretai aptinkamos plazmidės, tačiau visos jos yra >10 kb dydžio (žr. Priedas: 1 lentelė). Tuo tarpu mažų RR tipo plazmidžių, be šiame darbe aprašytųjų, yra sekvenuota ir apibūdinta tik viena, pSTK1, priskiriama pT181 plazmidžių šeimai (replikacijos baltymas priklauso Rep_trans baltymų šeimai) (Carr ir kt., 2013). Taip pat reikia paminėti ir plazmidę pTB19, kuri nors ir yra didesnė (27 kb), tačiau sudaryta iš dviejų skirtingų tipų replikonus turinčių plazmidžių, iš kurių vienas yra RR tipo (Rep_1 šeimos replikacijos baltymas). Pastarasis, kaip ir pGTD7 plazmidė, yra priskirtinas pUB110 plazmidžių šeimai.

3.2.1. Plazmidės pGTD7 replikonas

Plazmidės pGTD7 sekoje buvo nustatyti visi elementai, būdingi RR plazmidžių replikonams: 1) pirmaujančios grandinės sintezei reikalingas modulis, sudarytas iš replikacijos baltymo geno (*rep7*) ir *dso* srities, bei 2) vėluojančios grandinės sintezei būtina *sso* seka.

Šios plazmidės baltymo Rep7 ir *dso* srities analizė leido priskirti ją vienai geriausiai ištirtų, RR mechanizmu besireplikuojančių pC194/pUB110 plazmidžių šeimai. Rep7 priklauso Rep_1 superšeimai – vienai geriausiai ištirtų replikacijos baltymų šeimų, kurios atstovai yra dažnai koduojami *Bacillaceae* šeimos bakterijų plazmidėse (Lorenzo-Díaz ir kt., 2014).

Atlikus Rep7 ir jam giminingų baltymų ar sekų palyginimą, nustatyti trys konservatyvūs motyvai, būdingi visiems RR būdu besireplikuojančių plazmidžių ir fagų replikacijos baltymams (3.2 lentelė). Šių motyvų sekos sutapo su pC194/pUB110 konsensuso sekomis (Koonin ir Ilyina, 1993). Pirmasis motyvas, kurio konsensuso seka yra FLTLT, yra lokalizuotas tarp 31 ir 35 ar. Atrasis HUH (Histidinas-Hidrofobinė ar.-Histidinas) motyvas yra susijęs su metalo jono prijungimu ir randamas tarp 117 ir 122 ar. Trečiasis motyvas, į kurį įeina ir katalizinė tirozino ar., buvo nustatytas tarp 190 ir 199 ar.

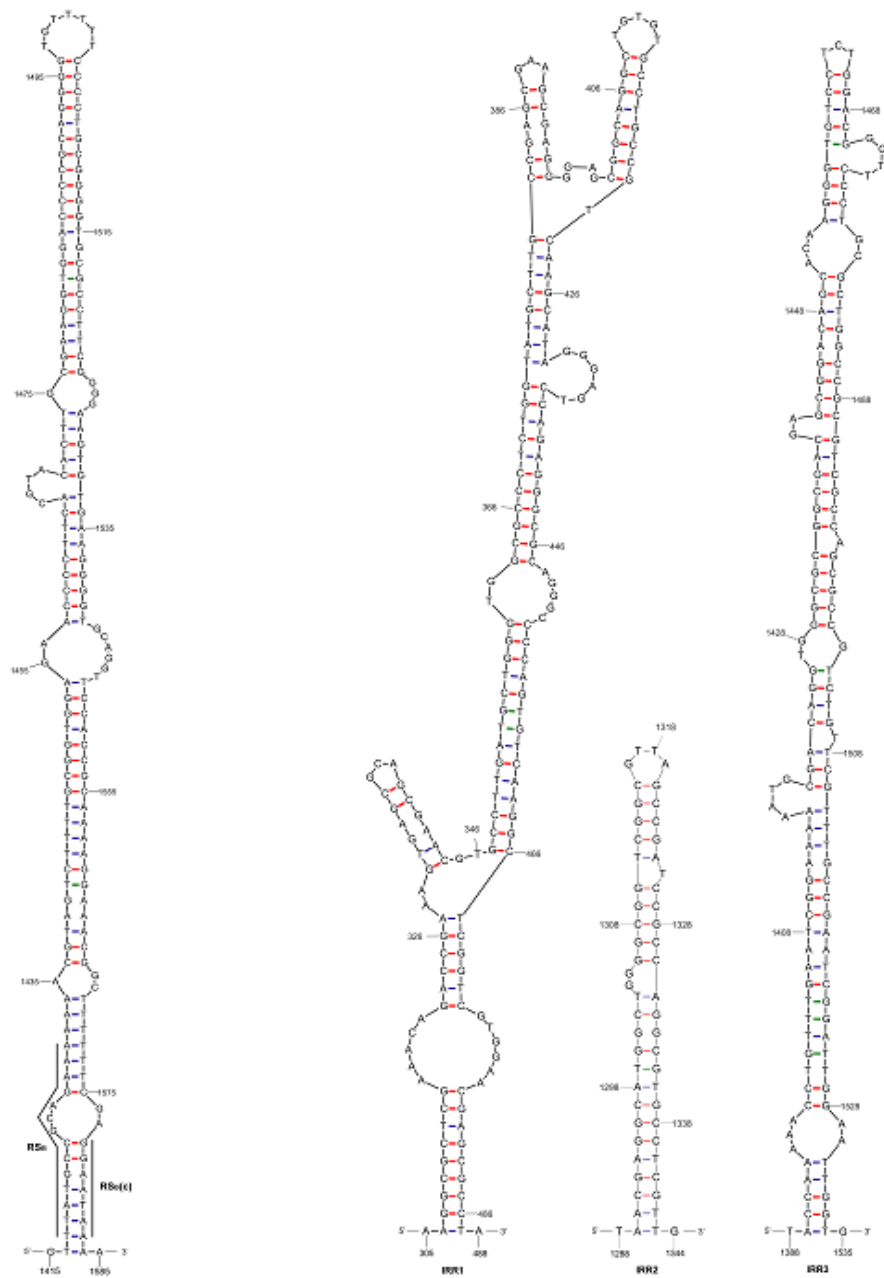
Dso nick regiono konservatyvi seka (5'-TCTTATCTTG/AT-3'), būdinga

pC194/pUB110 plazmidžių šeimai (Seery ir kt., 1993), buvo nustatyta ir plazmidės pGTD7 sekoje, išsidėsčiusi prieš srovę nuo *rep7* (1662–1651 nt). Geno *rep7* start kodoną ir *dso* srities kirpimo tašką skiria 451 bp. Tuo tarpu kitų pC194 šeimos plazmidžių sekose *dso* paprastai būna nutolęs maždaug per 200 bp (Andrup ir kt., 2003).

Sso sekos nėra tokios konservatyvios ir dažniausiai atpažįstamos iš formuojamų netaisyklingų kamieno-kilpos struktūrų. Daug palindrominių sekų turintis regionas, galintis formuoti stambias antrines struktūras, buvo nustatytas prieš srovę nuo *dso* sekos (1417–1583 nt) (3.5 pav.). Šio regiono 5' gale nustatyta 5'-TTATGCCGCAGAAA-3'seka, o 3' gale – 5'-GGAATAA-3' seka. Šios dvi sekos yra labai panašios į RS_B ir jai dalinai komplementarią $RS_B(c)$, – t. y. į tipiškas *ssoA* tipo vėluojančios grandinės replikacijos pradžios sekas (Kramer ir kt., 1998).

SsoA tipo sekose taip pat aptinkamas trečiasis konservatyvus elementas CS-6, tačiau į jį panašaus fragmento nebuvo rasta spėjamoje pGTD7 plazmidės *sso* sekoje. CS-6 elemento taip pat trūksta ir kai kurių kitų plazmidžių *ssoA* sekose. Jos nėra *Bacillus licheniformis* pFL5, pFL7 ir kitose *Bacillus* genties bakterijų plazmidėse. *SsoA* tipo sekos savo funkciją gali atlikti tik tai savo natūraliuose šeimininkuose. Taigi gali būti, kad CS-6 sekų (ar jas atitinkančių sekų, atliekančių analogišką funkciją plazmidėse su *ssoA* be CS-6 elemento) skirtumai nulemia šeimininko specifiškumą (Parini ir kt., 2004).

Yra parodyta, kad *ssoA* tipo sekos paprastai funkcionuoja tik tai savo natyviame ir jam filogenetiškai artimuose šeimininkuose (Kramer ir kt., 1995; Kramer ir kt., 1998). Taigi tikėtina, kad ir šios plazmidės replikonas užtikrins jį turinčio vektoriaus replikaciją siaurame šeimininkų rate. Tai yra tam tikras privalumas, kadangi siauras šeimininkų ratas sumažina plazmidės horizontalaus perdavimo galimybę ir jame koduojamų antibiotikų atsparumo genų plitimą aplinkoje (Chang ir Yan, 2013).



A

B

3.5 pav. Plazmidžių pGTD7 (A) ir pGTG5 (B) viengrandės DNR fragmentai, gebantys formuoti antrines struktūras

3.2.2. Plazmidės pGTG5 replikonas

In silico nustatyto Rep5 baltymo sekoje rasti visi trys konservatyvūs RR

būdu besidauginančioms plazmidėms ir fagams būdingi motyvai. Tačiau šių motyvų sekos pasižymi didžiausiu panašumu į fagų replikacijos baltymų konsensuso sekas.

Pagrindinis RR fagų iniciacijos baltymų bruožas yra tas, kad jų aktyvų centrą sudarančiame trečiajame motyve yra dvi konservatyvios tirozino liekanos, kai tuo tarpu RR plazmidės paprastai teturi tik vieną (Koonin ir Ilyina, 1993). Dvi tirozino liekanas šiame motyve turi ir kai kurių *Euryarcheota* tipo archėjų pNB101 (Zhou et al., 2004), pTP2 (Gorlas ir kt., 2013) ir kai kurių kitų plazmidžių (Forterre ir kt., 2014) Rep baltymai, tačiau jos tėra tolimai giminingos pGTG5 plazmidei. Konservatyvių domenų paieška parodė, kad Rep5 sritis apimanti 78–176 ar. (į jos sudėtį įeina visi trys motyvai) yra panaši (E-vertė: 3,61e-03) į PHA00330, kaip manoma, replikazių šeimos baltymus. Šios superšeimos baltymai priklauso *Microviridae* fagų replikacijos iniciacijos baltymų grupei.

Šios plazmidės replikacijos baltymo sekoje nustatytas III motyvas, būdingas kai kuriems viengrandę DNR turintiems fagams, tarp jų ir ΦX174 fagui. Šio fago replikacijos baltymo III motyvui yra būdingi du tirozinai (taip pat išsidėstę ir atitinkamo motyvo Rep5 sekoje), kurie dalyvauja plazmidės replikacijos iniciacijoje ir terminacijoje (Van Mansfeld ir kt., 1986). Tuo tarpu didžiosios daugumos bakterijų plazmidžių (įskaitant ir pGTD7 plazmidę) Rep baltymai III motyve turi tik vieną tiroziną, o antrasis tirozinas pakeistas kita ar. (pC194 šeimos plazmidėse – glutaminu) (Marsin ir Forterre, 1999; Zhou ir kt., 2008).

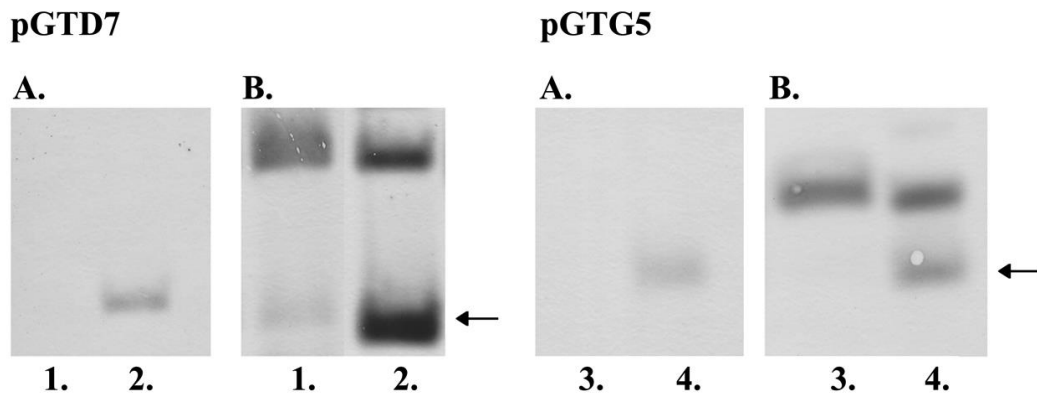
Prieš srovę nuo *rep5* start kodono (38 nt iki start kodono) aptikta 5'-CTTGAT-3'seka. Tai labai konservatyvi seka aptinkama visuose RR besireplikuojančiuose pUB110/pC194 plazmidžių ir ΦX174 fagų šeimų *dso-nick* regionuose. Ebisu ir bendradarbiai (1995), analizavę pHT926 plazmidę, kurios Rep baltymas yra Rep5 homologas, eksperimentiškai parodė, kad šios plazmidės *dso* yra lokalizuotas tarp 1 ir 307 nt. Homologiškas regionas buvo nustatytas ir pGTG5 sekoje tarp 493–798 nt. Jis apima *rep5* geno 5'galo trumpą atkarpą prieš srovę nuo *rep5*, į kurią įeina ir nustatyta *dso-nick* būdinga

konservatyvi seka. Tai patvirtina spėjimą, kad būtent ši seka pGTG5 plazmidei yra reikalinga pirmaujančios grandinės replikacijos iniciacijai. Taip pat visi šie duomenys rodo, kad pGTG5 plazmidė, nors ir yra priskirtina prie RR plazmidžių, tačiau kartu su jai giminingomis plazmidėmis turėtų būti priskirta naujai bakterijų plazmidžių šeimai.

Tipiškos *sso* sekos pGTG5 plazmidėje nerasta, tačiau nustatyti trys regionai (IRR1, IRR2 ir IRR3), kuriuose yra gausu invertuotų pasikartojimų. IRR1 yra nuo 306 iki 485 nt prieš pat *dso* geną ir potencialiai gali formuoti didžiulę antrinę struktūrą. Kiti du regionai – IRR2 ir IRR3 – lokalizuoti už *rep5* geno, atitinkamai tarp 1289–1343 nt ir 1390–1533 nt. IRR2 gali formuoti didžiulę netaisyklingą kamieno-segtuko struktūrą, panašią į *ssoA* tipo formuojamas, tačiau jos nukleotidų sekoje nenustatyta nei vieno iš *ssoA* sekai būdingų elementų (RSB, RSB(c), CS-6). Kuris iš trijų regionų funkcionuoja kaip *sso*, turėtų būti nustatyta eksperimentiškai.

3.3. Plazmidžių pGTG5 ir pGTD7 viengrandės DNR formų nustatymas

pGTG5 ir pGTD7 plazmidžių sekų analizė parodė, kad jų replikacijos baltymų ir *dso* sekos yra homologiškos atitinkamoms RR plazmidžių ir fagų sekoms. Tačiau norint įrodyti, kad plazmidės dauginasi RR mechanizmu, būtina parodyti, kad bakterijose plazmidžių replikacijos metu susidaro viengrandė jų tarpinė forma (te Riele ir kt., 1986). Tam genominė DNR buvo išskirta iš *Geobacillus* sp. 610 ir 1121 kamienų, perkelta ant nailoninės membranos prieš tai ją denatūravus arba nedematūravus. Tuomet DNR buvo hibridizuojama su biotinu žymėtais pGTD7 ir pGTG5 plazmidžių fragmentais. Prieš perkėlimą DNR mėginiai buvo paveikiami arba neveikiami S1 nukleaze – fermentu, skaldančiu tik viengrandę DNR.



3.6 pav. pGTD7 ir pGTG5 plazmidžių viengrandės DNR tarpinio produkto nustatymas. DNR ant membranos buvo perkeliama natyviomis (A) arba denatūruojančiomis (B) sąlygomis. Genominė DNR buvo paveikiama (1, 3) arba neveikiama (2, 4) S1 nukleaze. Strėlytės rodo juostas su viengrande DNR

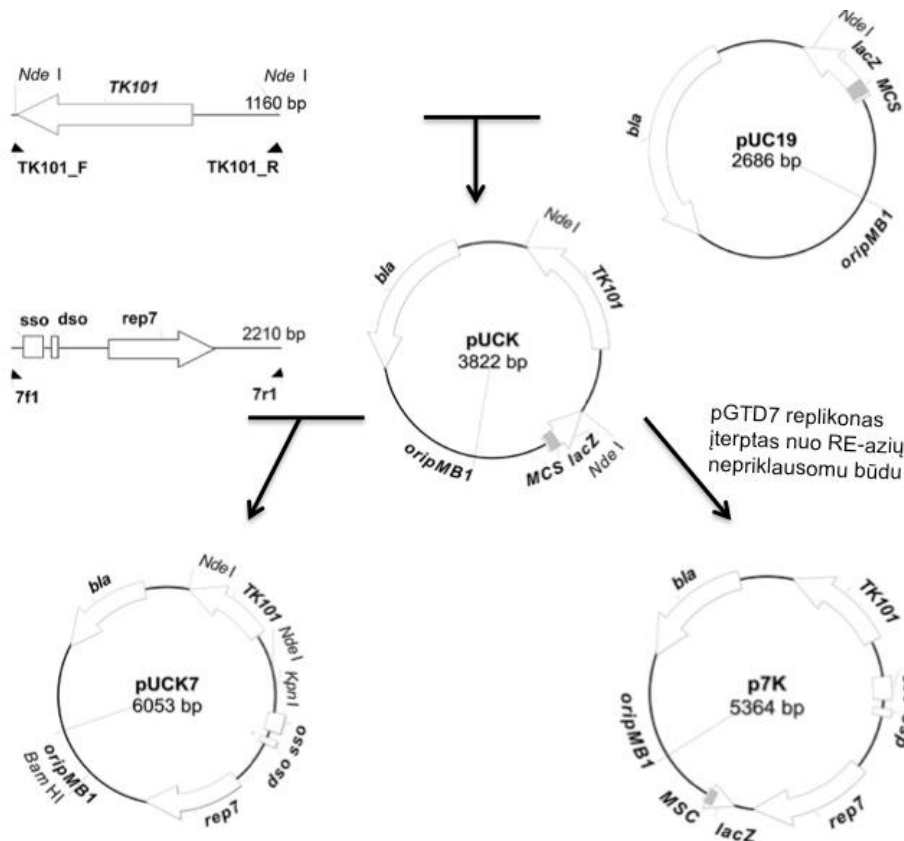
Viengrandė DNR ant nailoninės membranos buvo identifikuota kaip neryški juosta, kuri yra nukeliavusi toliau nei dvigrandė DNR, kuri išnyksta paveikus mėginį S1 nukleaze ir kuri buvo matoma, net kai mėginio DNR nebuvo denatūruota (3.6 pav.). Šios juostos buvo nustatytos abiejų plazmidžių tyrime, o tai įrodo, kad plazmidės pGTD7 ir pGTG5 replikuojasi riedančio rato mechanizmu.

3.4. Darbe aprašytų plazmidžių replikonų funkcionalumo nustatymas

Nustačius tiriamų plazmidžių numanomų replikonų sekas *in silico* ir išsiaiškinus jų vykdomą replikacijos būdą, toliau darbe buvo siekiama parodyti abiejų replikonų funkcionalumą ir galimybę juos panaudoti naujų vektorių kūrimui.

Tam tikslui iš pradžių buvo sukurtas pUCK vektorius (3.7 pav.). Jis sudarytas iš *E. coli* universalus klonavimo pUC19 vektoriaus, į kurį buvo įterptas termostabilios KNTazės genas *TK101*, kilęs iš pUCG18 vektoriaus. Termostabilus *TK101* žymuo yra gautas iš pUB110 plazmidės KNTazės geno (atsitiktinės mutagenozės būdu), įvedus dvi taškines „missense“ mutacijas (Asp-80→Tyr; Thr-130→Lys), lemiančias jo produkto stabilumą esant 69 °C

temperatūrai (Liao ir kt., 1986). Genas *TK101* į vektorių buvo įkeltas analogiškai, kaip aprašyta Schweizer darbe (1991), per *Nde*I atpažinimo seką, esančią β -galaktozidazės geno 3'gale. Klonavimas per šią seką nesutrikdė β -galaktozidazės raiškos. Taigi paliekama galimybė į gautą konstruktą per MCS regioną įterpti kitą intarpą ir atrinkti rekombinantines molekules, naudojantis „mėlyna-balta“ paieškos sistema.



3.7 pav. Vektoriaus pUCK ir plazmidės pGTD7 darinių sukūrimas

Literatūroje yra duomenų, rodančių, kad *TK101* koduojama KNTazė gali būti naudojama ne tik geobacilų, bet ir *E. coli* transformantų atrankos žymeniu (Bartosiak-Jentys ir kt., 2013). Šiame darbe, naudojant *TK101* pagrįstą transformuotų *E. coli* atrankos sistemą, nebuvo gauta šių bakterijų transformantų. Tačiau *E. coli* ląstelės, jau turinčios plazmidę su *TK101* (atrinktos remiantis atsparumu, koduojamu kito tos pačios plazmidės geno), gali augti terpėje su kanamicinu. Dėl to buvo vykdyta dviguba atranka. *E. coli* transformantai, kurie turėjo naujai įgytas pUCK plazmides, pirmiausia buvo atrinkti naudojant terpę su ampicilinu. Tuomet susiformavusios kolonijos buvo

perkeltos antspaudų metodu ant terpės su kanamicinu. Narumi ir kt. (1993) taip pat yra parodę, kad šio geno naudojimas kito *E. coli* kamieno transformantų atrankai ženkliai (100 kartų) sumažina transformacijos efektyvumą. Taigi galima teigti, kad *TK101* genas nėra tinkamas žymuo efektyviai *E. coli* transformacijai siekiant atrinkti naujai sukurtas rekombinantines vektoriaus DNR molekules.

Įdomu, kad panašius rezultatus, kai bakterijos neauga terpėje su antibiotiku, jeigu jos yra naujai transformuotos, t. y. naujai įgijusios plazmidę, suteikiančią atsparumą tam antibiotikui, yra gavę ir kiti mokslininkai. Kobayashi ir kt. (2015), dirbdami su *Geobacillus kaustophilus* MK242 kamieniu, parodė, kad šis kamienas, turintis plazmidę su termostabiliu CAT genu, gali augti terpėje su chloramfenikoliu, tačiau, jeigu jis yra naujai transformuojamas šia plazmide, jo augimas yra inhibuojamas.

Šiame darbe gautas plazmidinis pUCK vektorius pasižymi dvejomis tolimesniems darbams reikiamomis savybėmis: 1) jis tinka tiriamam replikonui klonuoti ir reikiamoms rekombinantinėms molekulėms greitai atrinkti *E. coli* ląstelėse bei 2) turi termostabilią atrankos žymenį *Geobacillus* transformantams.

3.4.1. Plazmidės pGTD7 dariniai

Sekančiame etape į pUCK vektorių buvo įterptas pGTD7 plazmidės fragmentas, padaugintas 7f1 ir 7r1 pradmenimis ir apimantis šios plazmidės replikaciją užtikrinančių genų (*rep7*, *dso* ir *sso*) sekas (3.7 pav.). pUCK7 pavadinta gauta plazmidė buvo sėkmingai perkelta į *G. stearothermophilus* NUB3621R kamieno ląsteles vadovaujantis šiame darbe sukurtu elektrotransformacijos protokolu, aprašytu 3.7 skyriuje. Šis bandymas parodė, kad pGTD7 replikonas gali užtikrinti plazmidės replikaciją ne tik kamiene, iš kurio jis yra kilęs, bet ir kitame tos pačios genties kamiene. Toliau buvo tiriamos pUCK7 plazmidės savybės, kurias jai suteikia pGTD7 replikonas.

Įsitikinus, kad pGTD7 replikonas gali būti naudingas naujų vektorių kūrimui (aprašyta poskyriuose 3.3.1.1 ir 3.3.1.2), kitame etape buvo siekiama

sukurti *Geobacillus-E. coli* vektorių, turintį ne tik termostabilų atrankos žymenį – pGTD7 replikoną, bet ir išlaikiusį nepažeistą MCS, patogiam norimų genų klonavimui ir tolimesniam jų pernešimui į geobacilas. Tam buvo sukurtas p7K konstruktas, sudarytas iš pUCK vektoriaus, į kurį tarp KNTazės ir lacZ genų įterptas pGTD7 plazmidės replikonas, pagausintas 7pK_F ir 7pK_R pradmenimis (3.7 pav.). Sukurtas konstruktas buvo padaugintas *E. coli* ląstelėse ir perkeliamas į *G. stearothermophilus* NUB3621R ląsteles, tačiau transformantų nebuvo gauta.

3.4.1.1. Plazmidės pUCK7 segregacinis stabilumas

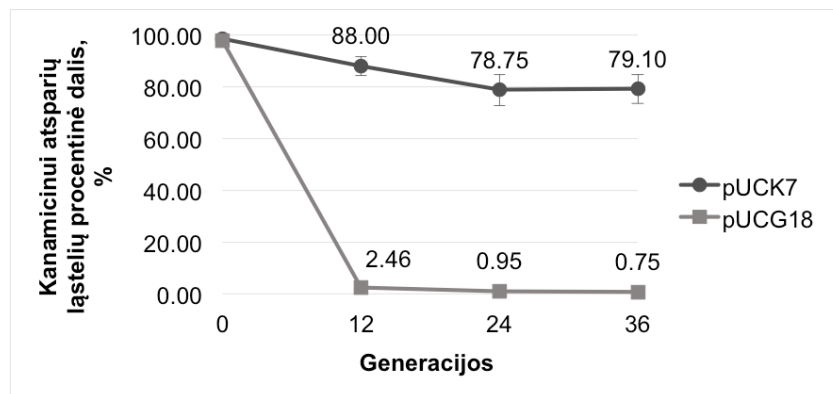
Pati svarbiausia vektoriaus savybė – jo stabilumas. Dėl to pirmiausia buvo tiriama, kaip pUCK7 plazmidė išlaikoma NUB3621R kamieno ląstelėse nesant atrankos spaudimo (be atrankos veiksnio). Ši plazmidė savo sudėtyje turi, kaip parodyta šiame darbe, RR replikaciją vykdančią replikoną. Palyginimui taip pat buvo tiriamas ir vienas populiariausių *E.coli-Geobacillus* spp. šaudyklinis vektorius pUCG18. Šis vektorius savo sudėtyje turi θ tipo replikoną, kuris kilęs iš *G. stearothermophilus* pBST1 plazmidės (Taylor ir kt., 2008).

Ląstelės, turinčios šį konstruklą (NUB3621R_pUCK7) arba pUCG18 vektorių (NUB3621R_pUCG18), buvo auginamos ANB terpėje be antibiotiko ir kas 12 generacijų išsėjamos ant agarizuotų terpių, kurių viena dalis buvo papildyta antibiotiku, o kita dalis – be antibiotiko. Apskaičiavus KSV, nustatyta kanamicinui atsparių ląstelių procentinė dalis. Siekiant patikrinti, ar kanamicinui atsparios kolonijos yra išaugusios iš plazmidę išlaikiusių ląstelių, buvo atliekamas plazmidžių skyrimas ir jų restrikcinė analizė.

Gauti rezultatai rodo (3.8 pav.), kad perkėlus NUB3621_pUCG18 kamieną į terpę be kanamicino, pUCG18 plazmidė buvo greitai „pametama“. Aplinkoje nesant teigiamos atrankos veiksnio, jau po 12 generacijų šią plazmidę išlaiko vos 2,5 % ląstelių. Panašūs duomenys taip pat yra gauti ir Suzuki su Yoshida (2012), kurie nustatė, kad *G. kaustophilus* HTA426 kamieno

pUCG18 plazmidės pasižymi mažu segregaciniu stabilumu.

Kai ląstelės su NUB3621R_pUCK7 konstruktu pradžioje auginamos terpėje su antibiotikais, o po to perkeliamos į naują terpę be antibiotikų, po 24 generacijų plazmidę praranda apie 20 % populiacijos ląstelių. Stebint plazmidžių išlaikymo dinamiką, toliau šią plazmidę turinčių ląstelių skaičius keičiasi nežymiai. Taigi galima daryti išvadą, kad pGTD7 replikoną turinti plazmidė yra gana stabiliai išlaikoma ląstelėse.



3.8 pav. Plazmidžių pUCK7 ir pUCG18 segregacinis stabilumas *G. stearotherophilus* NUB3621R ląstelėse

Plazmidžių, neturinčių aktyvios segregacijos aparato, stabilumas tam tikrame kamiene gali būti nulemtas aukšto jos kopijų skaičiaus, kadangi kuo didesnis plazmidžių kopijų skaičius yra randamas motininėse ląstelėse, tuo mažesnė yra tikimybė, kad vienai iš dukterinių ląstelių neteks nei vienos jos kopijos (Million-Weather ir Camps, 2014; kaip manoma, šis mechanizmas susijęs su daugelio RR plazmidžių stabilumu). Kita vertus, daug plazmidės kopijų yra per didelė našta ląstelei, jeigu ši plazmidė esamomis sąlygomis nesuteikia jokių privalumų, todėl populiacijoje atsiradusios plazmidės praradusios ląstelės įgauna nemažą pranašumą. Nepaisant to, yra parodyta, kad plazmidės gali būti išlaikomos bakterijų populiacijoje net iki 100 generacijų (San Millan ir kt., 2014). Tokių plazmidžių stabilumą ląstelėse, kurių neveikia teigiama atranka, galima paaiškinti kompensaciniu prisitaikymu (angl. compensatory adaptation). Yra parodyta, kad plazmidės turinčių kamienų

genome įvyksta mutacijos, dėl kurių sumažėja plazmidžių „išlaikymo kaštai“ (San Millan ir kt., 2014).

3.4.1.2. Santykinio pUCK7 plazmidės kopijų skaičiaus, tenkančio vienai ląstelei, nustatymas

Plazmidžių kopijų skaičius (PKS) – tai dar viena svarbi savybė, apsprendžianti tam tikrų plazmidžių tinkamumą genetinių vektorių konstravimui. Dėl to buvo nustatomas pUCK7 PKS *G. stearothermophilus* NUB3621R ląstelėse. Palyginimui tame pačiame kamienne taip pat buvo nustatytas ir pUCG18 vektoriaus PKS. Santykinis šių plazmidžių kopijų skaičius buvo įvertintas atlikus RL-kPGR.

Visa genomine DNR buvo išskirta iš *G. stearothermophilus* NUB3621R_pUCG18 ir NUB3621R_pUCK7 kamienų. Atlikus abiejų DNR mėginių dešimtkartinius serijinius praskiedimus buvo gautos padaugintų *adk* ir *TK101* fragmentų standartinės kreivės. Abiejų kamienų ir abiejų genų fragmentų atveju gautos standartinės kreivės buvo linijinės ($R^2 > 0,99$). NUB3621R_pUCG18 mėginio standartinių kreivių nuolydis, naudojant pradmenų rinkinius *adk* ir *TK101* genams, buvo atitinkamai lygus 3,482 ir 3,510; o NUB3621R_pUCK7 mėginio standartinių kreivių nuolydis buvo atitinkamai lygus 3,351 ir 3,341. Gautų PGR produktų lydymosi kreivės ir gelio elektroforezės analizė parodė, kad buvo padaugintos tik reikiamo fragmento atkarpos.

Rezultatų analizė atskleidė, kad pUCK7 ir pUCG18 plazmidžių PKS, tenkantis chromosomai, atitinkamai yra lygus 447,5 ir 558,0. Didelis PKS yra būdingas RR plazmidėms. Tuo tarpu θ tipo plazmidės yra laikomos mažakopijinėmis; paprastai šių plazmidžių nustatoma 1–10 kopijų vienoje ląstelėje. Dėl to toks didelis pUCG18 kopijų skaičius yra netikėtas ir galėjo būti sąlygotas plazmidės replikacijos kontrolės veiksnių trūkumo. Į pUCG18 plazmidės sudėtį įeina 1,7 kb ilgio pBST1 plazmidės fragmentas, kuris užtikrina plazmidės replikaciją *Geobacillus* spp. bakterijose (Taylor ir kt., 2008). Visgi į šį fragmentą matomai neįeina visos sekos, reikalingos mažam

kopijų skaičiui užtikrinti. Be to, abiejų plazmidžių PKS gali būti įtakojamas kamieno-šeimininko (Oskam ir kt., 1992), auginimo terpės ypatybių (pvz.: antibiotiko koncentracijos) (Imanaka ir kt., 1981), ląstelių augimo stadijos (Zhong ir kt., 2011), auginimo temperatūros (Wu ir Welker 1989).

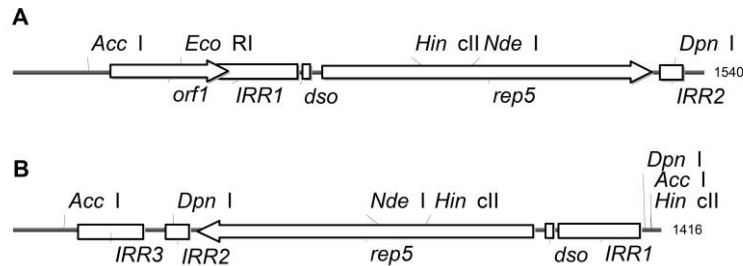
Nustatytas pUCK7 kopijų skaičius rodo, kad pGTD7 replikonas gali užtikrinti didelį jį turinčios plazmidės kopijų skaičių *G. stearothermophilus* NUB3621R ląstelėse. Didelis PKS yra dažnai pageidautina savybė kuriant ekspresijos vektorius. Ši pGTD7 ypatybė, kartu su kitomis nustatytomis pGTD7 savybėmis, gali būti naudinga siekiant sukurti rekombinantinių baltymų gamybai tinkamą genetinę sistemą *Geobacillus* sp. ląstelėse.

3.4.2. Plazmidės pGTG5 dariniai

Šiame darbe sukurtas pUCK vektorius taip pat buvo naudojamas konstruojant plazmides, turinčias pGTG5 plazmidės replikoną. Tuo tikslu į pUCK vektorių per MCS buvo įterpti skirtingi minėtosios plazmidės fragmentai (3.9 pav.). pUK5K konstruktas buvo sukurtas linearizavus pGTG5 plazmidę KpnI REaze ir įterpus į pUCK vektorių. pUK5EH plazmidė buvo sukurta 5f ir 5r pradmenimis padauginus plazmidės replikono komponentus apimančią pGTG5 plazmidės fragmentą ir jį įterpus į pTZ57R klonavimo vektorių. Tuomet šis fragmentas buvo iškirptas EcoRI ir HindIII REazėmis ir įterptas į pUCK vektorių.

Gauti konstruktai iš pradžių padauginami *E. coli* DH5α ląstelėse. Pastebėta, kad skirtingų pGTG5 plazmidės fragmentų įterpimas į pUCK vektorių, gali žymiai pakeisti gautų konstrukto išėigą, skiriant juos iš *E. coli* ląstelių. Skiriant pUK5EH iš *E. coli* gaunama vos ~10 ng DNR/μl. Tuo tarpu tokiomis pačiomis sąlygomis skiriant kitus pUCK konstruktus gaunama >100 ng DNR/μl. Tikėtina, kad tai gali būti susiję su pGTG5 plazmidės sekai būdingais gausiais invertuotais pasikartojimais, galinčiais sudaryti antrines struktūras, kurios žemesnėje temperatūroje (*E. coli* auginimo temperatūra – 37 °C) tampa stabilesnės. Įterpiant skirtingose vietose perkirptus pGTG5

plazmidės fragmentus, skiriasi ir gautų konstrukty tam tikrų sričių polinkis formuoti antrines struktūras. Matomai pUK5EH dėl į jį įterptos pGTG5 plazmidės fragmento sekos, negali efektyviai replikuotis *E. coli* šeimininke.



3.9 pav. Plazmidės pGTG5 fragmentai, įterpti į vektorių pUCK per MCS esančias atitinkamas REazių sekas. Į gauto plazmidinio darinio pUK5K sudėtį įeina fragmentas, pavaizduotas A paveikslo dalyje, į pUK5EH – B

Gauti konstruktai buvo perkelti į *G. stearothermophilus* NUB3621R kamieną, tačiau transformantų nebuvo gauta. Tokius rezultatus galėjo sąlygoti tai, kad 1) plazmidei pGTG5 būdingas siauras šeimininkų ratas ir kamieno NUB3621R jos replikonas nėra funkcionalus, arba tai, kad 2) kuriant konstruktus buvo pažeistos sekos, būtinos plazmidės replikacijai *Geobacillus* šeimininke. Taip pat negalima atmesti tikimybės, kad transformantų nebuvo gauta 3) dėl mažo šio kamieno transformacijos efektyvumo.

3.5. *G. stearothermophilus* NUB3621R elektroporacijos sąlygų nustatymas

Tam, kad būtų galima patikrinti tiriamų plazmidžių replikonų funkcionalumą ir nustatyti jų tinkamumą vektoriams kurti, sukonstruoti pGTG5 ir pGTD7 plazmidžių dariniai turėjo būti perkelti į *Geobacillus* genties bakterijų ląsteles.

Šiam tikslui šeimininku buvo pasirinktas *G. stearothermophilus* NUB3621R kamienas. Teigiama, kad šis kamienas neturi veiklios R-M sistemos (Blanchard ir kt., 2014; Wu ir Welker, 1989), taigi jis turėtų būti lengviau transformuojamas *E. coli* ląstelėse padaugintomis plazmidėmis. Šis kamienas yra vienas iš geriausiai ištirtų *Geobacillus* genties atstovų. Jo tėvinis

kamienas NUB36 buvo pradėtas intensyviai tirti praėjusio amžiaus 9-ajame dešimtmetyje. Buvo sukurti įvairūs NUB36 mutantiniai kamienai, tarp jų ir NUB3621 (Chen ir kt., 1986; Vallier ir Welker, 1990; Welker, 1988; Wu ir Welker, 1989), iš kurio vėliau buvo gautas ir kamienas NUB3621R (nepublikuoti rezultatai, konsultuotasi su dr. D.R. Zeigler). Literatūroje yra aprašytas kamieno NUB3621 transformavimo protoplastų metodu protokolas. Tačiau šis metodas yra gana ilgai trunkantis (~3 paras ar ilgiau) ir be to, jis nėra tinkamas atrankos sistemai, pagrįstai atsparumu kanamicinui (Wu ir Welker, 1989). Dėl to buvo pasirinktas elektrotransformacijos metodas.

Iš pradžių buvo bandyta transformuoti šį kamieną pagal kitiems dviems *Geobacillus* genties kamienams (*G. thermodenitrificans* K1041 ir *G. thermoglucosidasius* NCIMB 11955) sukurtus protokolus (Narumi ir kt., 1992b; Taylor ir kt., 2008). Tačiau NUB3621R kamienui transformuoti nei vienas iš jų netiko. Naudojantis Narumi ir kt. (1992b) aprašytu metodu transformantų nebuvo gauta, o Taylor ir kt. (2008) aprašytame protokole naudojama terpė netiko šiam kamienui auginti.

Dėl to NUB3621R kamienui tinkamos elektrotransformacijos sąlygos turėjo būti nustatytos eksperimentiškai. Metodo sąlygų parinkimui naudotasi žinomu *Geobacillus-E. coli* šaudykliniu vektoriumi, pUCG18 (Taylor ir kt., 2008). Šis vektorius, o ne naujai šiame darbe sukurti plazmidiniai dariniai, buvo pasirinktas todėl, kad tuo atveju, jeigu būtų gauti neigiami rezultatai, liktų neaišku, ar to priežastis yra netinkamai sukonstruotos plazmidės, ar – netinkamai parinktos transformacijos sąlygos.

3.7.1. Auginimo terpės parinkimas

Parentant elektrokompetentinių ląstelių paruošimo sąlygas, visų pirma buvo tiriama auginimo terpių įtaka. Yra žinoma, kad įvairūs auginimo terpių komponentai ar skirtingi jų kiekiai modifikuoja ląstelių fiziologiją, metabolizmą (Egli ir Zin, 2003), ir gali keisti ir jų genetinės transformacijos galimybes. Parodyta, kad *Bacillus* genties kai kurių kamienų transformacijos

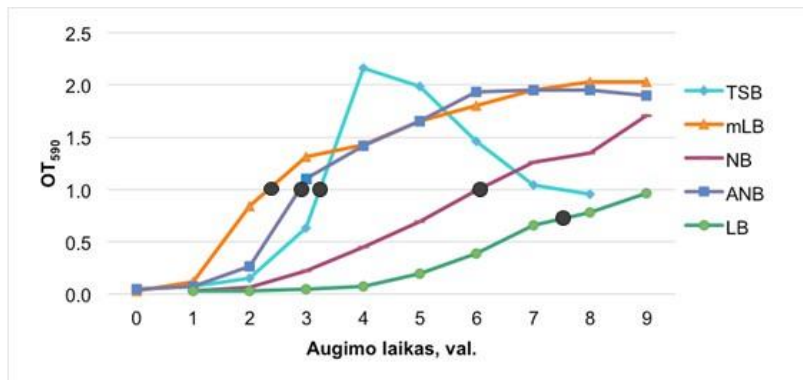
efektyvumas teigiamai koreliuoja su didesniu druskų (tokių kaip kalio fosfatai) kiekiu augimo terpėje, tuo tarpu mitybinių medžiagų gausa (triptono, mielių ekstrakto) priešingai – jį mažina (Zhang ir kt., 2011). Kiti tyrėjai, dirbę su *E. coli*, nustatė, kad šių bakterijų transformaciją ženkliai pagerina jų auginimas turtingoje auginimo terpėje, kurios sudėtyje yra gliukozės, tuo tarpu magnio druskos gali sumažinti transformacijos efektyvumą. Įdomu, kad terpės komponentų įtaka elektrokompentinių ląstelių gamybai, taip pat gali priklausyti ir nuo auginimo temperatūros (t. y. tas pats komponentas, esant skirtingoms temperatūroms, skirtingai veikia ląsteles) (Nováková ir kt., 2014). Taigi elektrokompentinėms ląstelėms paruošti skirta terpė gali labai stipriai priklausyti nuo bakterijų rūšies ar netgi kamieno. Todėl kiekvienu atveju yra svarbu surasti optimalią terpę.

Ieškant tokios mitybinės terpės, kurioje tiriamas kamienas gerai augtų ir kuri tiktų elektrokompentinių ląstelių paruošimui, ląstelės buvo augintos keliose skirtingose terpėse: 1) LB, 2) mLB (LB terpė papildyta nitrilotriacetatu ir Mg^{2+} , Ca^{2+} ir Fe^{2+} druskomis), 3) NB (terpė savo sudėtimi identiška LB, tik vietoje mielių ekstrakto, į ją dedamas toks pats kiekis mėsos ekstrakto), 4) ANB (NB terpė, papildyta Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Mn^{2+} druskomis) ir 5) TSB (turtinga terpė, kurios sudėtyje buvo gliukozės ir KH_2PO_4).

Lyginant bakterijų augimą skirtingose terpėse pastebėta, kad šio kamieno augimą teigiamai įtakojo įvairių druskų, tokių kaip $MgCl_2$, $CaCl_2$ (mLB ir ANB terpėse), jonai. Iš gautų augimo kreivių matyti, kad NB ir LB terpėse šis kamienas augo lėčiausiai. Šias terpes papildžius aukščiau išvardintais komponentais (žr. terpių mLB ir ANB sudėtį) kultūros augimo lygis ženkliai išaugo (3.10 pav.).

Greitas augimas taip pat yra pasiekiamas ir naudojant turtingą terpę (TSB), kurioje yra gausu maistinių medžiagų, tarp jų ir gliukozės. Tačiau auginant ląsteles tokioje terpėje, kultūros OT₅₉₀ pasiekus maksimalią vertę, ląstelių tankis pradeda ženkliai mažėti. Panašus reiškinys yra aprašytas ir tyrėjų, dirbusių su *G. thermoleovorans* kamieniu. Jų darbe buvo parodyta, kad terpėje, kurią sudaro 0,1 % gliukozės, yra stebimas itin spartus *G.*

thermoleovorans augimas, lydymas intensyvios ląstelių žūties ir lizės. Tuo tarpu sumažinus gliukozės kiekį, bakterijų augimo tempas sulėtėja, o pasiekus didžiausią augimo tašką, nepereina į lizės stadiją (Pavlostathis ir kt., 2006). Taigi, šiame darbe tiriamo NUB3621R kamieno greitas augimas TSB terpėje, po kurio seka staigus OT₅₉₀ mažėjimas, greičiausiai taip pat yra sietinas su gliukozės kiekiu naudotoje terpėje.



3.10 pav. *G. stearothermophilus* NUB3621R kamieno augimas skirtingose terpėse. Juodais taškais pažymėtos auginamos bakterijų kultūros OT₅₉₀ vertės, kurias pasiekus, ląstelės buvo surenkamos.

Priklausomai nuo bakterijų augimo pobūdžio šiose terpėse, ląstelės buvo auginamos tol, kol kultūros OT₅₉₀ pasiekdavo 1,00 arba 0,75 (3.10 pav.). Surinktos ląstelės iš pradžių buvo ruošiamos suspenduojant jas 10 % glicerolio terpėje. Elektroporacijai buvo taikoma 22 kV/cm stiprio elektrinio lauko impulsai. Tačiau negavus transformantų, ši ETT buvo pakeista SMG terpe, o ląstelės veikiamos jau minėto stiprio elektrinio lauko impulsais. Tokiomis sąlygomis transformantai buvo gauti tiksliai iš ląstelių, auginamų ANB terpėje, nepaisant to, kad augimas šioje terpėje buvo labai panašus į augimą, stebimą mLB terpėje. Tai rodo, kad elektrokompetentinių NUB3621R ląstelių paruošimui, kaip ir kai kurių kitų bakterijų atveju, auginimo terpės sudėtis yra labai svarbus veiksnys, lemiantis jų elektrokompetentiškumą. Gautas transformacijos efektyvumas buvo 120 transformantų 1 μg plazmidinės DNR.

Gavus pirmąjį NUB3621R transformantą, tolimesni optimizacijos bandymai buvo atliekami naudojantis iš šio kamieno išskirta pUCG18

plazmide. Nors yra rašoma, kad NUB3621 kamienas (taigi ir jo išvestinis NUB3621R kamienas) neturi veiklios R-M sistemos (Zeigler, 2001). Be to, jo iki šios datos sekvenuotoje genomo sekos dalyje neaptikta restrikcijos endonukleazių genų (Blanchard ir kt., 2014), tačiau pastebėta, kad jo transformacijos efektyvumas yra didesnis daugiau nei 2 kartus tais atvejais, kai yra naudojama iš to paties kamieno išskirta plazmidinė DNR. Tai reiškia, kad 1) šio kamieno DNR yra modifikuojama kitu, ne R-M sistemos tipo, būdu, arba 2) šiam kamienui visgi yra būdinga R-M sistema, kurią koduojantys genai iki šiol nenustatyti (iki šio darbo parašymo datos buvo žinoma tik nepilna šio kamieno genomo seka).

Kadangi transformantai buvo gauti naudojant aukšto osmoliaringumo elektrotransformacijos terpę (ETT), toliau elektroporacijos efektyvumą buvo bandoma pagerinti pakoregavus elektrokompentinių ląstelių ruošimo protokolą ir auginant jas ANB terpėje, papildytoje 0,5 M sorbitolio (ANBS). Tokiu būdu buvo siekiama apsaugoti ląsteles nuo osmotinio šoko, kai jos yra perkeliamos iš įprastos ANB terpės į didelio osmoliaringumo ETT. Aukšto osmoliaringumo metodas, kuomet visos ląstelių ruošimo terpės yra papildomos osmotikais, yra naudojamas ir optimizuotuose *Bacillus* spp. elektrotransformacijos protokoluose (Xue ir kt., 1999). Tačiau *G. stearothermophilus* NUB3621R kamieno atveju buvo priešingai – didesnio osmoliaringumo auginimo terpė sumažino šio kamieno transformacijos efektyvumą.

3.7.2. Ląstelių veikimas sienelę susilpninančiais ar membraną pralaidinančiais veiksniais

Gramteigiamosios bakterijos (tarp jų ir *Geobacillus* spp.) visada yra sunkiau transformuojamos nei gramneigiamosios dėl jų ląstelės sienelės ypatumų, o tiksliau – dėl storo peptidoglikano sluoksnio ir sienelės sudėtyje esančių teicho rūgščių (Dunny ir kt., 1991; Holland ir kt., 2010). Šią kliūtį yra bandoma įveikti apdorojant ląsteles veiksniais, silpninančiais gramteigiamųjų

bakterijų sienelę. Vienas iš dažniausiai naudojamų tokių veiksnių yra glicinas (Peng ir kt., 2009). Ląstelėms augant ir dalijantis glicinas gali būti įterpiamas vietoje D- ir L-alanino į sintetinamo peptidoglikano tetrapeptidų sudėtį. Dėl to peptidoglikane sumažėja skersinių jungčių tarp skirtingų glikano grandinių peptidinių „uodegų“ ir jis tampa pralaidesnis (Hammes ir kt., 1973).

Taigi toliau geobacilų transformacijos efektyvumą buvo bandoma pagerinti eksponentinės augimo stadijos pradžioje ląsteles paveikiant sienelę silpninančiu veiksmu, glicinu. Ruošiant elektrokompetentines ląsteles ANB arba ANBS terpėse, ankstyvąją logaritminę fazę pasiekusi kultūra buvo papildyta 0,25–2,00 % glicino ir auginama toliau. Tačiau visose terpėse net ir mažiausia naudota glicino koncentracija sukėlė greitą ląstelių lizę.

Literatūroje yra aprašyta daug darbų, kuriuose parodyta, kad glicinas pagerina daugelio įvairių gramteigiamųjų bakterijų (*Bacillus amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis*, *Bacillus pseudofirmus*, įvairių pienarūgščių bakterijų) transformacijos efektyvumą (Ito ir Nagane, 2001; Landete ir kt., 2014; Peng ir kt., 2009; Zhang ir kt., 2011). Tačiau yra ir tokių duomenų, kurie rodo, kad kai kurių kitų bakterijų (*Bacillus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus* genčių kai kurių kamienų) transformacijai glicinas įtakos nedaro ar turi netgi neigiamą įtaką (Rodríguez ir kt., 2007; Turgeon ir kt., 2006; Shen ir kt., 2013). Toks nevienodas glicino poveikis skirtingų bakterijų rūšių transformacijai gali būti aiškinamas skirtinga jų sienelių sudėtimi bei fiziologija.

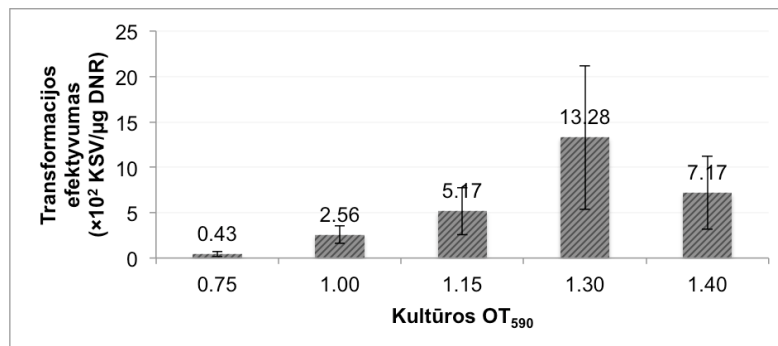
Taip pat buvo bandoma padidinti ląstelių plazminės membranos laidumą suspenduojant jas ETT buferyje su 5 % etanoliu. Tačiau šis būdas, leidęs gauti kai kurių gramteigiamųjų bakterijų transformantus, kurie jokiomis kitomis sąlygomis nebuvo transformuoti (Assad-García ir kt., 2008), buvo visiškai netinkamas tiriamajam kamieniui.

3.7.3. Augimo stadijos įtaka

Su *Bacillus* genties bakterijomis dirbančių autorių yra parodyta, kad

transformacijos efektyvumui didelę įtaką turi kultūros augimo stadija, kurią pasiekus ląstelės yra surenkamos. Kai kurių kamienų atveju vienodai geri rezultatai gaunami surenkant ląsteles, augintas tiek iki logaritminės stadijos vidurio, tiek ir iki vėlyvosios logaritminės stadijos. Tuo tarpu kitų kamienų tinkamiausias augimo fazės intervalas gali būti daug siauresnis ir pasistūmėti link ankstyvosios augimo fazės (Lu ir kt., 2012; Shen ir kt., 2013).

Taigi sekančiame etape buvo tiriama, kuriame iš pasirinktų augimo stadijos taškų surinkus ląsteles gaunama daugiausiai transformantų. Ląstelės, augintos ANB terpėje, buvo surenkamos kultūros OT₅₉₀ vertei pasiekus skirtingas vertes (0,75; 1,00; 1,15; 1,30 ir 1,40). Išvedus trijų bandymų vidurkius matyti, kad elektrokompentines NUB3621R ląsteles galima paruošti iš kultūros, augintos iki OT₅₉₀ tampa lygus 0,75–1,40 (3.11 pav.), tačiau didžiausias efektyvumas gaunamas ląsteles auginant iki 1,30 dydžio OT₅₉₀. Tuo tarpu, jeigu ląstelės surenkamos, kai kultūros OT₅₉₀ yra mažesnis, gaunamas du ir daugiau kartų mažesnis transformacijos efektyvumas.



3.11 pav. Transformacijos efektyvumo priklausomybė nuo kultūros optinio tankio (OT₅₉₀), kurį pasiekus ląstelės buvo surenkamos, suspenduojamos SMG ir transformuojamos taikant 20 kV/cm stiprio elektrinio lauko impulsus. Paklaidų juostos rodo standartinį nuokrypį

Pastebėtina, kad tiek šiame, tiek ir kituose augimo stadijos taškuose stebimas didelis rezultatų išsibarstymas apie vidurkį. Elektroporuojuojant net ir to paties paruošimo ląsteles ir taikant tas pačias elektroporacijos sąlygas, transformacijos efektyvumas skyrėsi daugiau nei 10 kartų. Viena iš tų lemiančių priežasčių gali būti elektroporacijai taikomo elektrinio impulso tipas.

Daugelis komercinių bakterijų transformacijai skirtų elektroporatorių sukuria eksponentiškai mažėjančio tipo pulsus (Young ir Deanx, 2015). Tokių pulsų trūkumas yra tas, kad jie nėra griežtai reguliuojami, ir kiekvieną kartą ląsteles elektroporuoja pagal tuos pačius nustatytus parametrus, joms realiai taikomi pulso parametrai (įtampa ir laiko konstanta) šiek tiek skiriasi nuo nustatytųjų. Išėjimas tam būtų elektroporatoriai, generuojantys aukštos įtampos kvadratinės bangos impulsus. Tačiau tokie aparatai nėra plačiai naudojami ir šiuo metu vis dar yra tobulinimo stadijoje.

3.7.4. Elektroporacijos terpės įtaka

Kitame etape buvo tiriama ETT sudėties įtaka transformacijos efektyvumui (3.3 lentelė). Naudojant 10 % glicerolio terpę (G terpę), kaip jau minėta anksčiau, transformantų nebuvo gauta. Ląsteles suspendavus SMG ir TG terpėse (t. y. terpėse, į kurių sudėtį be glicerolio taip pat įeina osmotikai) gautas transformacijos efektyvumas atitinkamai buvo $5,2 \cdot 10^2$ ir $2,8 \cdot 10^2$ transformantų/ μg DNR.

3.3 lentelė. Transformacijos efektyvumo priklausomybė nuo naudojamos ETT. Šiuose bandymuose ląstelės buvo augintos iki OT₅₉₀ 1,15 ir, suspendavus atitinkamoje ETT, elektrotransformuojamos 22 kV/cm stiprio elektrinio lauko impulsais. Paklaidos rodo standartinę nuokrypį

ETT	Terpės sudėtis	Efektyvumas, transformantai/ μg DNR
G	10 % glicerolio	0,0
SMG	10 % glicerolio, 0,4 M sorbitolio, 0,4 M manitolio	$(5,2 \pm 2,5) \cdot 10^2$
SMGM	SMG, papildyta 1 mM MgCl ₂	$(4,7 \pm 4,3) \cdot 10^3$
TG	10 % glicerolio, 0,5 M trehalozės	$(2,8 \pm 2,6) \cdot 10^2$

Taigi ETT terpėje sorbitolį ir manitolį pakeitus trehaloze, gaunamas maždaug per pusę mažesnis transformantų kiekis. Kitų mokslininkų, dirbančių su *Bacillaceae* šeimos bakterijomis, darbuose taip pat yra parodyta, kad ETT papildymas osmotikais yra vienas iš svarbiausių veiksnių, užtikrinančių

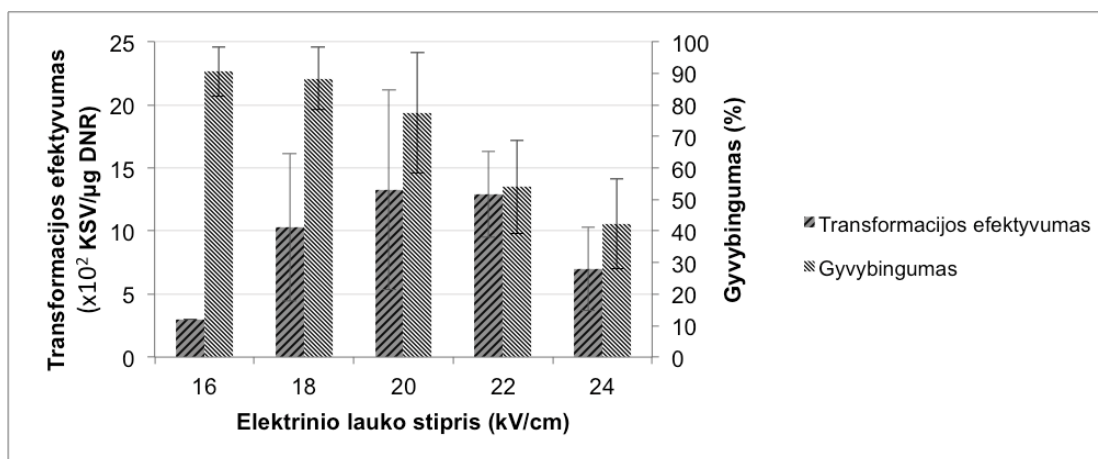
sėkmingą šių bakterijų transformaciją (Shen ir kt., 2013).

Tuo tarpu SMG terpę papildžius 1 mM $MgCl_2$ (SMGM terpė), transformacijos efektyvumas išauga iki 9 kartų. Taigi Mg^{2+} daro teigiamą įtaką šio kamieno ląstelių elektrotransformacijai. Mg^{2+} (bei kai kurie kiti katjonai), manoma, gali palengvinti DNR pernašą į ląstelę, kadangi 1) „atsveria“ DNR sudėtyje eančių fosfatų neigiamą krūvį ir taip palengvina DNR sąveiką su bakterijų membrana, bei 2) padeda DNR molekulei kompaktiškiau išsidėstyti (Aune ir Aachmaan, 2010).

3.7.5. Elektrinio lauko stiprio įtaka

Elektrinis lauko stipris yra vienas svarbiausių veiksnių, įtakojančių elektrotransformacijos efektyvumą. Didesnio stiprio elektrinis laukas koreliuoja su didesniu bakterijų citoplazminės membranos pralaidinimu, taigi ir didesniu transformacijos efektyvumu. Tačiau stipresnis elektrinis laukas tuo pat metu neigiamai veikia ląstelių gyvybingumą (Trevors ir kt., 1992). Taigi turi būti parenkama tokia elektrinio lauko stiprio vertė, kuri maksimaliai padidintų ląstelių membranų pralaidumą, bet tuo pačiu ląstelių gyvybingumas išliktų toks, kad leistų gauti didelį kiekį transformantų.

Tam ląstelės buvo augintos iki OT_{590} vertė pasiekia 1,3; surinktos ir suspenduotos SMG terpėje bei, sumaišius su plazmidės DNR, paveiktos 16–24 kV/cm stiprio elektrinio lauko impulsu. Po elektrinio impulso atgaivinus ląsteles ir užauginus jų kolonijas buvo apskaičiuotas transformacijos efektyvumas ir ląstelių gyvybingumas (3.12 pav.).



3.12 pav. Elektrinio lauko įtaka transformacijos efektyvumui ir ląstelių gyvybingumui. Šiuose bandymuose ląstelės buvo augintos iki OT₅₉₀ 1,3 ir suspenduotos SMG terpėje

Elektroporacijai taikant iki 18 kV/cm stiprio elektrinius impulsus ląstelių gyvybingumas siekia apie 90 %, tačiau keliant elektrinio lauko stiprį ląstelių gyvybingumas žymiai sumažėja. Tuo tarpu transformacijos efektyvumas auga didinant elektrinio lauko stiprį iki 20–22 kV/cm ir pasiekia $1,3 \cdot 10^3$ transformantų/ μ g DNR.

Nustačius sąlygas, tinkamas pUCG18 vektoriaus pernašai į NUB3621R kamieno ląsteles, jos buvo naudojamos ir kitų, šiame darbe sukonstruotų plazmidžių (aptariamų 3.5 ir 3.6 skyriuose) pernašai. NUB3621R kamieno ląstelės buvo augintos iki OT₅₉₀ 1,15–1,30, tuomet suspenduotos SMGM terpėje, sumaišytos su pGTD7 ir pGTG5 plazmidžių dariniais (sukonstruotais ir padaugintais *E. coli* ląstelėse) ir elektroporuotos 22 kV/cm impulsu. Kaip minėta 3.4 skyriuje, transformantai gauti tikta naudojantis pUCK7 plazmide. pUCK7 turintys transformantai buvo patikrinti atlikus kolonijų PGR bei plazmidžių restrikcijos analizę. Gautas transformacijos efektyvumas buvo $4,6 \cdot 10^2$ transformantų/ μ g DNR.

4. DARBO APIBENDRINIMAS

Šiame darbe buvo siekiama padidinti *Geobacillus* genties bakterijų genetinės inžinerijos galimybes, praplečiant joms tinkamų vektorių

pasirinkimą ir nustatant tinkamas sąlygas (šiam darbe sukurtų ar kitų) vektorių pernašai į pasirinktą *Geobacillus* spp. kamieną. Vektorių šeiminiuku buvo pasirinktas *G. stearothermophilus* NUB3621R kamienas, kuris yra naudojamas kaip modelinis termofilinis mikroorganizmas įvairiuose moksliniuose tyrimuose.

NUB3621 kamieno genetinei inžinerijai yra naudojama protoplastų transformacija – nepatogus metodas, užimantis daug laiko ir reikalaujantis ypatingo atsargumo. Todėl mano darbe buvo siekiama palengvinti šio kamieno transformaciją – nustatyti sąlygas, įgalinančias tam pritaikyti elektrotransformaciją (elektroporaciją). Tam elektrokompetentinės ląstelės buvo ruošiamos keičiant auginimo ir elektroporacijos terpės sudėtį, surenkant ląsteles skirtinguose jų augimo periodo taškuose ir jas veikiant sienele silpninančiais veiksniais. Elektroporuojuojant ląsteles buvo keičiami elektroporacijos parametrai bei ląstelių atgaivinimo sąlygos. Nustatyta, kad didžiausias kamieno transformacijos efektyvumas yra gaunamas 1) ląsteles auginant ANB terpėje, 2) jas surenkant, kai kultūros OT_{590} pasiekia 1.1–1,3 vertę, 3) suspenduojant elektroporacijos SMGM terpėje, 4) elektroporacijai taikant 22 kV/cm stiprio elektrinio lauko impulsus, 5) po transformacijos ląsteles perkėlus į terpę, identišką auginimo terpei, ir gaivinant jas 2 val. 50 °C temperaturoje.

Toks protokolai leido pasiekti $4,7(\pm 4,4) \cdot 10^3$ transformantų mikrogramui naudotos plazmidinės DNR transformacijos efektyvumą. Jis yra pakankamas tikslinio DNR fragmento pernašai į šias ląsteles, tačiau yra stebimas didelis rezultatų išsibarstymas apie vidurkį. Viena iš tų sąlygojančių priežasčių gali būti nulemta elektroporatoriaus savybių, o tiksliau jo taikomų elektrinių impulsų tipo. Daugelis šiandieninių komercinių elektroporatorių, skirtų bakterijų transformacijai, sukuria eksponentiškai mažėjančio tipo impulsus. Tokių impulsų trūkumas, kad jie nėra griežtai reguliuojami, ir realiai bakterijų transformacijai taikyti pulso parametrai (įtampa ir laiko konstanta) skiriasi nuo tų, kurie buvo nustatyti prietaise. Išėitis tam būtų aukštos įtampos kvadratinės bangos impulsus generuojantys elektroporatoriai, tačiau tokio tipo aparatai

labai mažai kur naudojami ir vis dar tobulinami.

Elektrotransformacijos sąlygų nustatymui buvo naudotas pUCG18 vektorius. Tai vienas iš trijų šiandien naudojamų *Geobacillus* bakterijoms tinkamų vektorių (kiti du vektoriai – pSTE33 ir pNW33N). Tokia nedidelė vektorių ir jų konstravimui panaudotų skirtingų plazmidžių replikonų įvairovė paskatino šiame darbe ieškoti naujų *Geobacillus* sp. plazmidžių, kurių replikonai galėtų suteikti teigiamų savybių naujai kuriamiems vektoriams.

Darbe buvo apibūdintos dvi naujos *Geobacillus* genties plazmidės, pavadintos pGTG5 ir pGTD7. Abi jos yra mažo dydžio, slaptosios (angl. cryptic), RR mechanizmu besidauginančios plazmidės. pGTD7 plazmidė, remiantis jos sekos analize, yra priskirta vienai geriausiai ištirtų RR plazmidžių šeimų, kurios atstovams yra būdingi Rep_1 šeimos replikacijos baltymai. Tai pačiai šeimai priklauso ir pUB101 plazmidė, naudojama kaip vektorius įvairioms mezofilinėms gramteigiamosioms bakterijoms.

Plazmidės pGTD7 replikonas buvo panaudotas gaminant pUCK7 konstrukta. Gautas konstruktas buvo sėkmingai perkeltas į *G. stearothermophilus* NUB3621R kamieną anksčiau aprašytomis sąlygomis. Tokiu būdu parodyta, kad plazmidės pGTD7 replikonas užtikrina jį turinčios plazmidės replikaciją ne tik savo natyviame, bet ir kitame tos pačios genties kamienne. Taip pat buvo nustatytas pUCK7 konstrukto segregacinis stabilumas ir jo kopijų skaičiaus išlaikymas. Parodyta, kad, lyginant su pUCG18 vektoriumi, pUCK7 konstruktas pasižymi aukštesniu segregaciniu stabilumu, nesant aplinkoje atrankos veiksnio. Tuo tarpu NUBR621R ląstelėse, jas auginant terpėje su antibiotiku, stebimas panašus didelis abiejų plazmidžių kopijų skaičius. Gauti rezultatai rodo, kad pGTD7 replikoną turintis vektorius pasižymi dideliu kopijų skaičiumi ir yra stabiliai išlaikomas ląstelėse. Be to, segregaciniu stabilumu pranoksta kitą, šiuo metu dažnai tyrėjų naudojamą pUCG18 vektorių.

Antroji darbe tirta plazmidė pGTG5 yra mažiausia iš visų žinomų *Geobacillus* genties bakterijų plazmidžių. pGTG5 su replikacija susijusios sekos buvo nepanašios nei į vieną iš aprašytų plazmidžių šeimų sekų. Jos

replikacijos iniciacijos baltymo sekoje identifikuoti motyvai, būdingi RR mechanizmu besidauginančių fagų atitinkamiems baltymams. pGTG5 plazmidės mažas dydis ir replikono panašumas su virusų atitinkamomis sekomis leidžia daryti išvadą apie jų ir virusų evoliucinį ryšį, aprašytą Koonin ir Dolja (2013). Vienintelis skirtumas tarp tokių mažų kriptinių plazmidžių, koduojančių tikrai savo pačių egzistencijai reikalingus genus, ir virusų yra tas, kad pastarieji mobilūs genetiniai elementai papildomai dar koduoja bent vieną kapsidės baltymą ir gali suformuoti viruso daleles (Forterre ir kt., 2014).

Apibendrinant, šiame darbe buvo sukurta *G. stearothermophilus* NUB3621R elektrotransformacijos metodologija, kuri nors ir nebuvo tokia efektyvi kaip protoplastų transformacija, tačiau parinktos sąlygos gali būti atspirties tašku, toliau tobulinant šį metodą. Be to, aprašytos dvi naujos geobacilų plazmidės, kurios yra ne tik įdomios mokslinio tyrinėjimo tikslais, bet viena iš jų (pGTD7) taip pat yra puikus šaltinis naujų, stabilių daugiakopijinių replikatyvinių *Geobacillus* genties vektorių kūrimui.

IŠVADOS

1. Šiame darbe aprašyta pGTD7 plazmidė yra tinkamas šaltinis naujų *Geobacillus* genties vektorių kūrimui, nes jos replikoną turinčios plazmidės pasižymi dideliu kopijų skaičiumi ir segregaciniu stabilumu net ir tada, kai aplinkoje nėra jokio atrankos veiksnio.
2. Plazmidės, kurių replikaciją vykdo RR tipo pGTD7 replikonas, yra išlaikomos stabiliau už θ (teta) replikoną, turintį pUCG18 vektorių.
3. *Geobacillus* sp. 1121 kamieno pGTG5 plazmidė priskirtina naujai iki šiol neapibūdintai plazmidžių šeimai, pasižyminčiai tuo, jog koduoja replikacijos iniciacijos baltymus, savo sekomis panašius į atitinkamus kai kurių bakteriofagų baltymus.
4. Transformuojant *G. stearothermophilus* NUB3621 kamieną elektroporacijos būdu gaunamas 10^3 eilės transformacijos efektyvumas.

STRAIPSNIAI IR PRANEŠIMAI

Mokslinių straipsnių disertacijos tema sąrašas

1. Kananavičiūtė, R., Butaitė, E., Čitavičius, D., 2014. Characterization of two novel plasmids from *Geobacillus* sp. 610 and 1121 strains. *Plasmid* 71: 23–31.
2. Kananavičiūtė, R., Čitavičius, D., 2015. Genetic engineering of *Geobacillus* spp. *J Microbiol Methods*. 111:31–39.
3. Kananavičiūtė, R., Kanišauskaitė, I., Novickij, V., Čitavičius, D., 2015. *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R genetic transformation by electroporation. *Biologija*. 61:101–108.

Pranešimų disertacijos tema sąrašas

1. Kananavičiūtė, R., Čitavičius, D. Optimization of electroporation of thermophilic bacteria *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R. FEMS 2013 : 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, July 21–25, 2013 [abstracts]. Art. no. 83.
2. Kananavičiūtė, R., Kanišauskaitė, I., Kalėdienė, L., Lastauskienė, E., Čitavičius, D. Improvement of genetic transformation system for thermophilic bacteria *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R. *Journal of biotechnology*. 2014, vol. 185, Supplement:S101. European Biotechnology Congress 2014. ISSN 0168–1656.

PADEKA

Esu dėkinga prof. Donaldui Čitavičiui už suteiktą galimybę atlikti šį mokslinį tyrimą, už patarimus ir pagalbą.

Nuoširdžiai dėkoju visam Vilniaus universiteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros kolektyvo buvusiems ir esamiems nariams, tarp jų: Elenai Butaitei ir Indrei Kanišauskaitei už bendradarbiavimą, prof. Lilijai Kalėdienei už palaikymą, prof. Nomedai Kuisienei už pagalbą atliekant realaus laiko kokybinės PGR bandymus, dr. Juozui Raugalui, Raimondai Petkauskaitei, Andriui Jasilioniui, dr. Eglei Lastauskienei už vertingas pastabas dėl darbo apipavidalinimo ir lietuvių kalbos taisyklių priminimą, Ramintai Venskutonytei ir Taduį Jakočiūnui už patarimus ir pagalbą skelbiant rezultatus.

Ačiū daugybei kitų žmonių, tiesiogiai ar netiesiogiai prisidėjusių prie šio darbo atsiradimo, ir ypatingai savo šeimai.

Literatūros sąrašas

1. Amelunxen, R., Lins, M., 1968. Comparative thermostability of enzymes from *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus*. Arch Biochem Biophys. 125(3), 765–9.
2. Anagnostopoulos, C., Spizizen, J., 1961. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 81(5):741–6.
3. Andrup, L., Jensen, G.B., Wilcks, A., Smidt, L., Hoflack, L., Mahillon, J., 2003. The patchwork nature of rolling-circle plasmids: comparison of six plasmids from two distinct *Bacillus thuringiensis* serotypes. Plasmid 49, 205–32.
4. Assad-García, J.S., Bonnin-Jusserand, M., Garmyn, D., Guzzo, J., Alexandre, H., Grandvalet, C., 2008. An improved protocol for electroporation of *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 using ethanol as immediate membrane fluidizing agent. Lett Appl Microbiol. 47(4):333–8.
5. Aune, T.E., Aachmann, F.L., 2010. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. Appl Microbiol Biotechnol. 85(5):1301–13.
6. Ballester, S., Lopez, P., Espinosa, M., Alonso, J.C., Lacks, S. A., 1989. Plasmid structural instability associated with pC194 replication functions. J Bacteriol. 171(5): 2271–7.
7. Banat, I.M., Marchant, R., 2011. *Geobacillus* activities in soil and oil contamination remediation. In: Logan, N.A., De Vos, P. (Eds.), Endospore-Forming Soil Bacteria. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 259–70.
8. Bartosiak-Jentys, J., Eley, K., Leak, D.J., 2012. Application of *pheB* as a reporter gene for *Geobacillus* spp., enabling qualitative colony screening and quantitative analysis of promoter strength. Appl Environ Microbiol. 78(16), 5945–7.
9. Bartosiak-Jentys, J., Hussein, A.H., Lewis, C.J., Leak, D.J., 2013. Modular system for assessment of glycosyl hydrolase secretion in *Geobacillus thermoglucosidasius*. Microbiology. 159(7):1267–75.
10. Belliveau, B.H., Trevors, J.T., 1989. Transformation of *Bacillus cereus* vegetative cells by electroporation. Appl Environ Microbiol. 55(6):1649–52.
11. Blanchard, K., Robic, S., Matsumura, I., 2014. Transformable facultative thermophile *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621 as a host strain for metabolic engineering. Appl Microbiol Biotechnol. 2014 doi:10.1007/s00253-014-5746-z.
12. Bond, S.R., Naus, C.C., 2012. RF-Cloning.org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects. Nucleic Acids Res. 40: W209–W213.
13. Bosma, E.F., van de Weijer, A.H., Daas, M.J., van der Oost, J., de

- Vos, W.M., van Kranenburg, R., 2015. Isolation and screening of thermophilic bacilli from compost for electrotransformation and fermentation: characterization of *Bacillus smithii* ET 138 as a new biocatalyst. *Appl Environ Microbiol.* 81(5):1874–83.
14. Brambach, B.C., Michels, A., Franzke, J., Kettler, R., 2013. Current density and conductivity dependent electroporation of *Escherichia coli* C600. *Prog Biophys Mol Biol.* 111(1): 46–54.
 15. Bruins, M.E., Janssen, A.E., Boom, R.M., 2001. Thermostables and their applications: a review of recent literature and patents. *Appl Biochem Biotechnol.* 90(2):155–86.
 16. Brumm, P.J., De Maayer, P., Mead, D.A., Cowan, D.A., 2015. Genomic analysis of six new *Geobacillus* strains reveals highly conserved carbohydrate degradation architectures and strategies. *Front. Microbiol.* 6:430. doi:10.3389/fmicb.2015.00430.
 17. Cao, G., Zhang, X., Zhong, L., Lu, Z., 2011. A modified electrotransformation method for *Bacillus subtilis* and its application in the production of antimicrobial lipopeptides. *Biotechnol Lett.* 33(5):1047–51.
 18. Carr, S.B., Mecia, L.B., Phillips, S.E.V., Thomas, Ch. D., 2013. Identification, characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of the rolling-circle replication initiator protein from plasmid pSTK1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 69(10): 1123–6.
 19. Cava, F., Hidalgo, A., Berenguer, J., 2009. *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles.* 13(2):213–31.
 20. César, C.E., Álvarez, L., Bricio, C., van Heerden, E., Littauer, D., Berenguer, J., 2011. Unconventional lateral gene transfer in extreme thermophilic bacteria. *Int Microbiol.* 14(4):187–99.
 21. Chandler, M., de la Cruz, F., Dyda, F., Hickman, A.B., Moncalian, G., Ton-Hoang, B., 2013. Breaking and joining single-stranded DNA: the HUH endonuclease superfamily. *Nat Rev Microbiol.* 11(8):525–38.
 22. Chang, S., Cohen, S.N., 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol Gen Genet.* 168(1):111–5.
 23. Chang, S.M., Yan, T.R., 2013. Genetic engineering techniques for lactic acid bacteria: construction of a stable shuttle vector and expression vector for β -glucuronidase. *Biotechnol Lett.* doi:10.1007/s10529-013-1363-7.
 24. Chen, L., Wu, D., Cai, X., Guo, F., Blackall, P.J., Xu, X., Chen, H., 2012. Electrotransformation of *Haemophilus parasuis* with in vitro modified DNA based on a novel shuttle vector. *Vet Microbiol.* 155(2-4):310–6.
 25. Chen, Z.F., Wojcik, S.F., Welker, N.E., 1986. Genetic analysis of *Bacillus stearothermophilus* by protoplast fusion. *J. Bacteriol.* 165 (3), 994–1001.

26. Coorevits, A., Dinsdale, A.E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A., Logan, N.A., 2012. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly ‘thermoglucosidasius’); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1470–85.
27. Cordova, L.T., Antoniewicz, M.R., 2015. ¹³C Metabolic flux analysis of the extremely thermophilic, fast growing, xylose-utilizing *Geobacillus* strain LC300. *Metab Eng.* doi:10.1016/j.ymben.2015.06.004.
28. Cordova, L.T., Long, C.P., Venkataramanan, K.P., Antoniewicz, M.R., 2015. Complete genome sequence, metabolic model construction and phenotypic characterization of *Geobacillus* LC300, an extremely thermophilic, fast growing, xylose-utilizing bacterium. *Metab Eng.* 32, 74–81.
29. Couñago, R., Chen, S., Shamoo, Y., 2006. In vivo molecular evolution reveals biophysical origins of organismal fitness. *Mol Cell.* 2006 May 19;22(4):441–9.
30. Couñago, R., Shamoo, Y., 2005. Gene replacement of adenylate kinase in the gram-positive thermophile *Geobacillus stearothermophilus* disrupts adenine nucleotide homeostasis and reduces cell viability. *Extremophiles.* 9(2):135–44.
31. Cripps, R.E., Eley, K., Leak, D.J., Rudd, B., Taylor, M., Todd, M., Boakes, S., Martin, S., Atkinson, T., 2009. Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production. *Metab. Eng.* 11, 398–408.
32. Cui, B., Smooker, P.M., Rouch, D.A., Deighton, M.A., 2015. Enhancing DNA electro-transformation efficiency on a clinical *Staphylococcus capitis* isolate. *J Microbiol Methods.* 109:25–30.
33. De Rossi, E., Brigidi, P., Riccardi, G., Matteuzzi, D., 1989. Plasmid screening in thermophilic *Bacillus*: physical characterization and molecular cloning. *Curr Microbiol* 19:13–19.
34. De Rossi, E., Brigidi, P., Rossi, M., Matteuzzi, D., Riccardi, G., 1991. Characterization of gram-positive broad host-range plasmids carrying a thermophilic replicon. *Res. Microbiol.* 142 (4), 389–96.
35. De Rossi, E., Brigidi, P., Welker, N.E., Riccardi, G., Matteuzzi, D., 1994. New shuttle vector for cloning in *Bacillus stearothermophilus*. *Res. Microbiol.* 145 (8), 579–83.
36. Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M., Diaz-Orejas, R., 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 434–64.
37. Del Solar, G., Moscoso, M., Espinosa, M., 1993. In vivo definition

- of the functional origin of replication (ori(+)) of the promiscuous plasmid pLS1. *Mol Gen Genet.* 237(1-2):65–72.
38. Divya Prakash, G., Anish, R.V., Jagadeesh, G., Chakravorty, D., 2011. Bacterial transformation using micro-shock waves. *Anal Biochem.* 419(2):292–301.
 39. Donk, P. J., 1920. A Highly Resistant Thermophilic Organism. *J Bacteriol.* 5(4): 373–4.
 40. Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., Barton, G.J., 2015. JPred4: a protein secondary structure prediction server, *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkv332.
 41. Dunny, G.M., Lee, L.N. and LeBlanc, D.J., 1991. Improved electroporation and cloning vector system for Grampositive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 57, 1194–201.
 42. Ebisu, S., Murahashi, Y., Takagi, H., Kadowaki, K., Yamaguchi, K., Yamagata, H., Udaka, S., 1995. Nucleotide sequence and replication properties of the *Bacillus borstelensis* cryptic plasmid pHT926. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3154–7.
 43. Egli, T., Zinn, M., 2003. The concept of multiple-nutrient-limited growth of microorganisms and its application in biotechnological processes. *Biotechnol Adv.* 22(1-2):35–43.
 44. Escoffre, J.M., Portet, T., Wasungu, L., Teissié, J., Dean, D., Rols, M.P., 2009. What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol Biotechnol.* 41(3):286–95.
 45. Espinosa, M., del Solar, G., Rojo, F., Alonso, J.C., 1995. Plasmid rolling circle replication and its control *FEMS Microbiol. Lett.* 130: 111–20.
 46. Forterre P, Krupovic M, Raymann K, Soler N. 2014. Plasmids from Euryarchaeota. *Microbiol Spectrum* 2(6):PLAS-0027-2014. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0027-2014.
 47. Frock, A.D., Kelly, R.M., 2012. Extreme thermophiles: Moving beyond single-enzyme biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Eng.* 1, 363–72.
 48. Fujita A1, Misumi Y, Honda S, Sato T, Koyama Y., 2013. Construction of new cloning vectors that employ the phytoene synthase encoding gene for color screening of cloned DNA inserts in *Thermus thermophilus*. *Gene.* 2013 Sep 25;527(2):655–62.
 49. Gorlas, A., Krupovic, M., Forterre, P., Geslin, C., 2013. Living side by side with a virus: characterization of two novel plasmids from *Thermococcus prieurii*, a host for the spindle-shaped virus TPV1. *Appl Environ Microbiol.* 79(12):3822–8.
 50. Grainge, I., Sherratt, D.J., 2007. Site specific recombination. In: Aguilera, A., Rothstein, R. (Eds.), *Molecular Genetics of Recombination, Topics in Current Genetics.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 443–67.

51. Grindley, N.D., Whiteson, K.L., Rice, P.A., 2006. Mechanisms of site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 567–605.
52. Gryczan, T.J., Contente, S., Dubnau, D.J., 1978. Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*. *Bacteriol.* 134(1):318–29.
53. Groot, M.N., Nieboer, F., Abee, T., 2008. Enhanced transformation efficiency of recalcitrant *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* isolates upon in vitro methylation of plasmid DNA. *Appl Environ Microbiol.* 74(24):7817–20.
54. Guglielmetti, S., Mora, D., Parini, C., 2007. Small rolling circle plasmids in *Bacillus subtilis* and related species: organization, distribution, and their possible role in host physiology. *Plasmid* 57, 245–64
55. Haki, G.D., Rakshit, S.K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol.* 89(1):17–34.
56. Hammes W., Schleifer K.H., Kandler O. Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 1973;116:1029–53.
57. Holland, L.M., Conlon, B., O'Gara, J.P., 2011. Mutation of tagO reveals an essential role for wall teichoic acids in *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *Microbiology.* 157(2):408–18.
58. Hoshino, T., Ikeda, T., Furukawa, K., Tomizuka, N., 1985a. Genetic relationship between pUB110 and antibiotic-resistant plasmids obtained from thermophilic bacilli. *Can J Microbiol.* 31(7):614–9.
59. Hoshino, T., Ikeda, T., Narushima, .H, Tomizuka, N., 1985b. Isolation and characterization of antibiotic-resistance plasmids in thermophilic bacilli. *Can J Microbiol.* 31(4):339–45.
60. Hussein, A.H., Lisowska, B.K., Leak, D.J., 2015. The genus *Geobacillus* and their biotechnological potential. *Adv Appl Microbiol.* 92:1–48.
61. Imanaka, T. Fujii, M., Aramori, I., Aiba, S., 1982. Transformation of *Bacillus stearothermophilus* with plasmid DNA and characterization of shuttle vector plasmids between *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 149(3):824–30.
62. Imanaka, T., Fujii, M., Aiba, S., 1981. Isolation and characterization of antibiotic resistance plasmids from thermophilic bacilli and construction of deletion plasmids. *J Bacteriol.* 146(3): 1091–7.
63. Inoue, T., Sako, Y., 2013. Host-Vector Systems in Thermophiles. In: Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kawarabayasi Y. (Eds), *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. Springer Netherlands, pp. 351–73. doi:10.1007/978-94-007-5899-5_13.
64. Ito, M. and Nagane, M., 2001. Improvement of the electrotransformation efficiency of facultatively alkaliphilic *Bacillus*

- pseudofirmus* OF4 by high osmolarity and glycine treatment. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 2773–5.
65. Yang, M.M., Zhang, W.W., Bai, X.T., Li, H.X., Cen, P.L., 2010. Electroporation is a feasible method to introduce circularized or linearized DNA into *B. subtilis* chromosome. *Mol Biol Rep.* 37(5), 2207–13.
 66. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J., 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33 (1), 103–19.
 67. Yasawong, M., Areekit, S., Pakpitchareon, A., Santiwatanakul, S., Chansiri, K., 2011. Characterization of thermophilic halotolerant *Aeribacillus pallidus* TD1 from Tao Dam Hot Spring, Thailand. *Int J Mol Sci.* 12(8):5294–303.
 68. Yoshida, N., Sato, M., 2009. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Appl Microbiol Biotechnol.* 83(5):791–8.
 69. Young, J.L., Deanx, D.A., 2015. Electroporation-Mediated Gene Delivery. *Advances in Genetics.* 89: 49–88
 70. Jiang, W., Maniv, I., Arain, F., Wang, Y., Levin, B.R., Marraffini, L.A., 2013. Dealing with the evolutionary downside of CRISPR immunity: bacteria and beneficial plasmids. *PLoS Genet.* 9(9):e1003844. doi:10.1371/journal.pgen.1003844.
 71. Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., Claverys, J.P., 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Mar;12(3):181–96.
 72. Kabisch, J., Thürmer, A., Hübel, T., Popper, L., Daniel, R., Schweder, T., 2013. Characterization and optimization of *Bacillus subtilis* ATCC 6051 as an expression host. *J Biotechnol.* 163(2):97–104.
 73. Kananavičiūtė, R., Butaitė, E., Čitavičius, D., 2014. Characterization of two novel plasmids from *Geobacillus* sp. 610 and 1121 strains. *Plasmid* 71: 23–31.
 74. Karita, S., Ohtaki, A., Noborikawa, M., Nakasaki, K., 2001. A cryptic plasmid, pAO1, from a compost bacterium, *Bacillus* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 226–8.
 75. Kawamura, F., Doi, R.H., 1984. Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *J Bacteriol.* 160(1):442–4.
 76. Khan, S. A., 1997. Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61(4): 442–55.
 77. Khan, S.A., 2000. Plasmid rolling-circle replication: recent developments. *Mol Microbiol.* 37(3):477–84.
 78. Kiewiet, R., Kok, J., Seegers, J. F. M. L., Venema, G., Bron, S., 1993. The mode of replication is a major factor in segregational plasmid instability in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 59, 358–64.

79. Kim H. S., Damo S. M., Lee S. Y., Wemmer D., Klinman J. P., 2005. Structure and hydride transfer mechanism of a moderate thermophilic dihydrofolate reductase from *Bacillus stearothermophilus* and comparison to its mesophilic and hyperthermophilic homologues. *Biochemistry* 44: 11428–39.
80. Kobayashi, J., Furukawa, M., Ohshiro, T., Suzuki, H., 2015. Thermoadaptation-directed evolution of chloramphenicol acetyltransferase in an error-prone thermophile using improved procedures. *Appl Microbiol Biotechnol.* doi:10.1007/s00253-015-6522-4.
81. Koonin, E.V., Dolja, V.V., 2013. A virocentric perspective on the evolution of life. *Curr Opin Virol.* 3(5):546–57.
82. Koonin, E.V., Ilyina, T.V., 1993. Computer-assisted dissection of rolling-circle DNA replication. *Biosystems* 30, 241–68.
83. Kovács, A.T., Smits, W.K., Mirończuk, A.M., Kuipers, O.P., 2009. Ubiquitous late competence genes in *Bacillus* species indicate the presence of functional DNA uptake machineries. *Environ. Microbiol.* 11, 1911–22.
84. Kramer MG, Solar G del, Espinosa M., 1995. Lagging-strand origins of the promiscuous plasmid pMV158: physical and functional characterization. *Microbiology*, 141:655–62.
85. Kramer, M.G., Espinosa, M., Misra, T.K., Khan, S.A., 1998. Lagging strand replication of rolling-circle plasmids: specific recognition of the ssoA type origins in different gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10505–10.
86. Landete, J.M., Arqués, J.L., Peirotén, A., Langa, S., Medina, M., 2014. An improved method for the electrotransformation of lactic acid bacteria: A comparative survey. *J Microbiol Methods.* 105:130–3.
87. Leer, R.J., van Luijk, N., Posno, M., Pouwels, P.H., 1992. Structural and functional analysis of two cryptic plasmids from *Lactobacillus pentosus* MD353 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Mol Gen Genet.* 234(2):265–74.
88. Liao, H., McKenzie, T., Hageman, R., 1986. Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83(3), 576–80.
89. Liao, H.H., Kanikula, A.M., 1990. Increased efficiency of transformation of *Bacillus stearothermophilus* by a plasmid carrying a thermostable kanamycin resistance marker. *Curr. Microbiol.* 21, 301–6.
90. Lilly, J., Camps, M., 2015. Mechanisms of Theta Plasmid Replication. *Microbiol Spectrum* 3(1):PLAS-0029-2014. doi:10.1128/microbiolspec.
91. Lin, L., Song, H., Ji, Y., He, Z., Pu, Y., Zhou, J., Xu, J., 2010. Ultrasound-mediated DNA transformation in thermophilic gram-positive anaerobes. *PLoS One.* 2010 Sep 4;5(9):e12582.

doi:10.1371/journal.pone.0012582.

92. Lin, L., Xu, J., 2013. Dissecting and engineering metabolic and regulatory networks of thermophilic bacteria for biofuel production. *Biotechnol Adv.* 31(6), 827–37.
93. Lin, P.P., Rabe, K.S., Takasumi, J.L., Kadisch, M., Arnold, F.H., Liao, J.C, 2014. Isobutanol production at elevated temperatures in thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius*. *Metabolic Engineering.* 24:1–8. doi:10.1016/j.ymben.2014.03.006.
94. Löfblom, J., Kronqvist, N., Uhlén, M., Ståhl, S., Wernérus, H., 2007. Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism. *J Appl Microbiol.* 102(3):736–47.
95. Lorenzo-Díaz, F., Fernández-López, C., Garcillán-Barcia, M.P., Espinosa, M., 2014. Bringing them together: plasmid pMV158 rolling circle replication and conjugation under an evolutionary perspective. *Plasmid* 74, 15–31.
96. Lu Y.P., Zhang C., Lv F.X., Bie X.M., Lu Z.X., 2012. Study on the electro-transformation conditions of improving transformation efficiency for *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol.* 55(1), 9–14.
97. Lu, S., Nie, Y., Tang, Y.Q., Xiong, G., Wu, X.L., 2014. A critical combination of operating parameters can significantly increase the electrotransformation efficiency of a gram-positive *Dietzia* strain. *J Microbiol Methods.* 103:144–51.
98. Marsin, S., Forterre, P., 1999. The active site of the rolling circle replication protein Rep75 is involved in site-specific nuclease, ligase and nucleotidyl transferase activities. *Mol Microbiol.* 33(3):537–45.
99. Matsumura, M., Katakura, Y., Imanaka, T., Aiba, S., 1984. Enzymatic and nucleotide sequence studies of a kanamycin-inactivating enzyme encoded by a plasmid from thermophilic bacilli in comparison with that encoded by plasmid pUB110. *J Bacteriol.* 160(1), 413–20.
100. McMullan, G., Christie, J.M., Rahman, T.J., Banat, I.M., Ternan, N.G., Marchant, R., 2004. Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 214–7.
101. Mead, D.A., McClary, J.A., Luckey, J.A., Kostichka, A.J., Witney, F.R., Smith, L.M., 1991. Bst DNA polymerase permits rapid sequence analysis from nanogram amounts of template. *Biotechniques* 11, 76–8.
102. Meddeb-Mouelhi, F., Dulcey, C., Beauregard, M., 2012. High transformation efficiency of *Bacillus subtilis* with integrative DNA using glycine betaine as osmoprotectant. *Anal Biochem.* 424(2):127–9.
103. Million-Weaver, S., Camps, M., 2014. Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? *Plasmid.* 75:27–36.

104. Monk, I.R., Foster, T.J., 2012. Genetic manipulation of Staphylococci-breaking through the barrier. *Front Cell Infect Microbiol.* 2:49. doi:10.3389/fcimb.2012.00049.
105. Nakayama, N., Narumi I., Nakamoto, S., Kihara H., 1992. A new shuttle vector for *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 14(8), 649–52.
106. Nakayama, N., Narumi, I., Nakamoto, S., Kihara, H., 1993. Complete nucleotide sequence of pSTK1, a cryptic plasmid from *Bacillus stearothermophilus* TK015. *Biotechnol. Lett.* 15, 1013–6.
107. Narumi, I., Nakayama, N., Nakamoto, S., Kimura, T., Yanagisawa, T., Kihara, H., 1993. Construction of a new shuttle vector pSTE33 and its stabilities in *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 15, 815–20
108. Narumi, I., Sawakami, K., Kimura, T., Nakamoto, N., Nakayama, N., Yanagisawa, T., Takahashi, N. and Kihara, H., 1992a. A novel oligonucleotide cassette for the overproduction of *Escherichia coli* aspartate transcarbamylase in *Bacillus stearothermophilus*. *Biotechnol. Lett.* 14, 759–64.
109. Narumi, I., Sawakami, K., Nakamoto, S., Nakayama, N., Kimura, T., Yanagisawa, T., Kihara, H., 1992b. A newly isolated *Bacillus stearothermophilus* K1041 and its transformation by electroporation. *Biotechnol. Tech.* 6, 83–6.
110. Natarajan, M.R., Oriel, P., 1991. Conjugal transfer of recombinant transposon Tn916 from *Escherichia coli* to *Bacillus stearothermophilus*. *Plasmid* 26 (1), 67–73.
111. Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., Ivanov, M.V., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenuatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 433–46.
112. Neilson N.E., Macquillan M.F., Campbell J.J., 1959. Growth studies on *Bacillus stearothermophilus*. *Can J Microbiol.* 5(3), 293–7.
113. Nishida, H., 2012a. Comparative analyses of base compositions, DNA sizes, and dinucleotide frequency profiles in archaeal and bacterial chromosomes and plasmids. *Int J Evol Biol.* 2012:342482. doi:10.1155/2012/342482.
114. Nishida, H., 2012b. Genome DNA Sequence Variation, Evolution, and Function in Bacteria and Archaea. *Curr Issues Mol*

Biol. 15(1):19–24.

115. Niu, H., Leak, D., Shah, N., Kontoravdi, C., 2015. Metabolic characterization and modeling of fermentation process of an engineered *Geobacillus thermoglucosidasius* strain for bioethanol production with gas stripping. *Chem. Eng. Sci.* 122, 138–49.
116. Nováková, J., Izsáková, A., Grivalský, T., Ottmann, C., Farkašovský, M., 2014. Improved method for high-efficiency electrotransformation of *Escherichia coli* with the large BAC plasmids. *Folia Microbiol (Praha)*. 59(1):53–61.
117. Olson, D.G., McBride, J.E., Shaw, A.J., Lynd, L.R., 2012. Recent progress in consolidated bioprocessing. *Curr Opin Biotechnol.* 23(3):396–405.
118. Omokoko, B., Jäntges, U.K., Zimmermann, M., Reiss, M., Hartmeier, W., 2008. Isolation of the phe-operon from *G. stearothermophilus* comprising the phenol degradative meta-pathway genes and a novel transcriptional regulator. *BMC Microbiol.* 8, 197. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-8-197>.
119. Oskam, L., Hillenga, D.J., Venema, G., Bron, S., 1991. The large *Bacillus* plasmid pTB19 contains two integrated rolling-circle plasmids carrying mobilization functions. *Plasmid.* 26(1):30–9.
120. Oskam, L., Hillenga, D.J., Venema, G., Bron, S., 1992a. The integrated state of the rolling-circle plasmid pTB913 in the composite *Bacillus* plasmid pTB19. *Mol Gen Genet.* 233(3):462–8.
121. Oskam, L., Venema, G., Bron, S., 1992b. Plasmid maintenance in *Bacillus stearothermophilus* is strain-dependent. *FEMS Microbiol Lett.* 72(3):203–8.
122. Parini, C., Guglielmetti, S., Mora, D., Ricci, G., 2004. Complete sequence and structural organization of pFL5 and pFL7, two cryptic plasmids from *Bacillus licheniformis*. *Plasmid* 51, 192–202.
123. Pavlostathis, S.G., Marchant, R., Banat, I.M., Ternan, N.G., McMullan, G., 2006. High growth rate and substrate exhaustion results in rapid cell death and lysis in the thermophilic bacterium *Geobacillus thermoleovorans*. *Biotechnol Bioeng.* 95(1):84–95.
124. Peng, D., Luo, Y., Guo, S., Zeng, H., Ju, S., Yu, Z., Sun, M., 2009. Elaboration of an electroporation protocol for large plasmids and wild-type strains of *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol.* 106(6):1849–58.
125. Peteranderl, R., Shotts, E.B.Jr, Wiegel J., 1990. Stability of antibiotics under growth conditions for thermophilic anaerobes. *Appl Environ Microbiol.* 56(6): 1981–3.
126. Pourmira, A., Johannes, T.W., 2012. Directed evolution: selection of the host organism. *Comput Struct Biotechnol J.* 2012; 2: e201209012. doi:10.5936/csbj.201209012.
127. Rhee, M.S., Kim, J.W., Qian, Y., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T., 2007. Development of plasmid vector and electroporation condition for gene transfer in sporogenic lactic acid bacterium,

- Bacillus coagulans*.58:13–22.
128. Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D. REBASE – a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 43: D298-D299 (2015).
 129. Rodríguez, M.C., Alegre, M.T., Mesas, J.M., 2007. Optimization of technical conditions for the transformation of *Pediococcus acidilactici* P60 by electroporation. *Plasmid.* 58(1):44–50.
 130. Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014, 5:172. doi:10.3389/fmicb.2014.00172.
 131. Ruiz-Masó, J.A., Machón, C., Bordanaba-Ruiseco, L., Espinosa, M., Coll, M., del Solar, G., 2015. Plasmid rolling-circle replication. *Microbiol Spectrum* 3(1):PLAS-0035-2014. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0035-2014.
 132. Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 133. San Millan, A., Peña-Miller, R., Toll-Riera, M., Halbert, Zoe., McLean, A., Cooper B., MacLean, C., 2014. Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids. *Nature Communications*, Vol. 5, No. 5208. doi:10.1038/ncomms6208.
 134. Schreiter, E.R., Drennan, L., 2007. Ribbon–helix–helix transcription factors: variations on a theme. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 710–20.
 135. Schweizer, H., 2008. Bacterial genetics: past achievements, present state of the field, and future challenges. *Biotechniques.* 44(5):633-4, 636–41.
 136. Schweizer, H.P., 1991. *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene* 97, 109–12.
 137. Seery, L.T., Nolan, N.C., Sharp, P.M., Devine, K.M., 1993. Comparative analysis of the pC194 group of rolling circle plasmids. *Plasmid.* 30(3):185–96.
 138. Shen, X., Chen, Y., Liu, T., Hu, X., Gu, Z., 2013. Development of a high-efficient transformation system of *Bacillus pumilus* strain DX01 to facilitate gene isolation via gfp-tagged insertional mutagenesis and visualize bacterial colonization of rice roots. *Folia Microbiol (Praha).* 58(5):409–17.
 139. Shintani, M., Sanchez, Z.K., Kimbara, K., 2015. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front Microbiol.* 6:242. doi:10.3389/fmicb.2015.00242.
 140. Skulj, M., Okrslar, V., Jalen, S., Jevsevar, S., Slanc, P., Strukelj, B., Menart, V., 2008. Improved determination of plasmid copy number using quantitative real-time PCR for monitoring fermentation processes. *Microb. Cell Fact.* 7, 6.

<http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-7-6>.

141. Smillie, C., Garcillán-Barcia, M.P., Francia, M.V., Rocha, E.P., de la Cruz, F., 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74(3):434–52.
142. Sorek, R., Lawrence, C.M., Wiedenheft, B., 2013. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Biochem.* 82:237–66.
143. Spath, K., Heinl, S., Grabherr, R., 2012. Direct cloning in *Lactobacillus plantarum*: electroporation with non-methylated plasmid DNA enhances transformation efficiency and makes shuttle vectors obsolete. *Microb. Cell Fact.* 11:141. doi:10.1186/1475-2859-11-141.
144. Studholme, D.J., Jackson R.A., Leak, D.J., 1999. Phylogenetic analysis of transformable strains of thermophilic *Bacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 172:85–90.
145. Suzuki H., Murakami A., Yoshida K. 2012 Counterselection system for *Geobacillus kaustophilus* HTA426 through disruption of *pyrF* and *pyrR*. *Appl Environ Microbiol.* Oct;78(20):7376–83.
146. Suzuki, H., Yoshida, K., 2012. Genetic transformation of *Geobacillus kaustophilus* HTA426 by conjugative transfer of host-mimicking plasmids. *J Microbiol Biotechnol.* 22(9):1279–87.
147. Suzuki, H., Yoshida, K., Ohshima, T., 2013a. Polysaccharide-degrading thermophiles generated by heterologous gene expression in *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Appl Environ Microbiol.* 79(17):5151–8.
148. Suzuki, H., Kobayashi, J., Wada, K., Furukawa, M., Doi, K., 2014. Generation of thermostable enzyme genes using spontaneous mutations in thermophile *Geobacillus kaustophilus* HTA426. In: Méndez-Vilas A. (Eds), *Industrial, medical and environmental applications of microorganisms: Current status and trends*. Wageningen Academic Publishers, p.p. 441–7. doi:10.3920/978-90-8686-795-0.
149. Suzuki, H., Kobayashi, J., Wada, K., Furukawa, M., Doi, K., 2014. Generation of thermostable enzyme genes using spontaneous mutations in thermophile *Geobacillus kaustophilus* HTA426. In: Méndez-Vilas A. (Eds), *Industrial, medical and environmental applications of microorganisms: Current status and trends*. Wageningen Academic Publishers, p.p. 441–7.
150. Suzuki, H., Wada, K., Furukawa, M., Doi, K., Ohshima, T., 2013b. A Ternary Conjugation System for the Construction of DNA Libraries for *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Biosci Biotechnol Biochem.* 77(11):2316–8.
151. Taylor, M.P., Esteban C.D., Leak D.J., 2008. Development of a versatile shuttle vector for gene expression in *Geobacillus* spp. *Plasmid.* 60(1):45–52.
152. Taylor, M.P., van Zyl, L., Tuffin, I.M., Leak, D.J., Cowan, D.A.,

2011. Genetic tool development underpins recent advances in thermophilic whole-cell biocatalysts. *Microb Biotechnol.* 4(4), 438–48.
153. Tang, Y.J., Sapro, R., Joyner, D., Hazen, T.C., Myers, S., Reichmuth, D., Blanch, H., Keasling, J.D., 2009. Analysis of metabolic pathways and fluxes in a newly discovered thermophilic and ethanol-tolerant *Geobacillus* strain. *Biotechnol Bioeng.* 102(5):1377–86.
 154. Te Riele, H., Michel, B., Ehrlich, S.D., 1986. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 2541–5.
 155. Thompson, A.H., Studholme, D.J., Green, E.M., Leak, D.J., 2008. Heterologous expression of pyruvate decarboxylase in *Geobacillus thermoglucosidasius*. *Biotechnol. Lett.* 30 (8), 1359–65.
 156. Trevors, J.T., Chassy, B.M., Dowe, W.J. and Blaschek, H.P., 1992. Electroporation of bacteria by plasmid DNA. In: Chang, D.C., Chassy, B.M., Saunders, J.A., Sowers A.E (Eds.), *Guide to electroporation and electrofusion*. Academic Press, p.p. 265–90.
 157. Turgeon, N., Laflamme, C., Ho, J., Duchaine, C., 2006. Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* ATCC 14579. *J Microbiol Methods.* 67(3):543–8.
 158. Turner, P., Mamo, G., Karlsson, E.N., 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb. Cell Factories* 6, 9. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-6-9>.
 159. Vallier, H., Welker, N.E., 1990. Genetic map of the *Bacillus stearothermophilus* NUB36 chromosome. *J. Bacteriol.* 172 (2), 793–801.
 160. Van Den Ent, F., Löwe, J, 2006. RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J Biochem Biophys Methods* 67:67–74.
 161. Van Mansfeld, A. D., van Teeffelen, H. A., Baas, P. D., & Jansz, H. S. (1986). Two juxtaposed tyrosyl-OH groups participate in phi X174 gene A protein catalysed cleavage and ligation of DNA. *Nucleic Acids Research*, 14(10), 4229–38.
 162. Van Passel, M.W., Bart,A., Luyf, A.C., van Kampen, A.H., van der Ende, A., 2006. Compositional discordance between prokaryotic plasmids and host chromosomes. *BMC Genomics.* 15;7:26.
 163. Van Zyl, L.J., Taylor, M.P., Eley, K., Tuffin, M., Cowan, D.A., 2013. Engineering pyruvate decarboxylase-mediated ethanol production in the thermophilic host *Geobacillus thermoglucosidasius*. *Appl Microbiol Biotechnol.* doi:10.1007/s00253-013-5380-1.
 164. Vasu K., Nagaraja V. Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2013;77:53–72.

165. Vellore, J., Moretz, S.E., Lampson, B.C., 2004. A group II intron-type openreading frame from the thermophile *Bacillus* (*Geobacillus*) *stearothermophilus* encodes a heatstable reverse transcriptase. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7140–7.
166. Vojcic, L., Despotovic, D., Martinez, R., Maurer, K.H., Schwaneberg, U., 2012. An efficient transformation method for *Bacillus subtilis* DB104. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94 (2), 487–93.
167. Wada, K., Kobayashi, J., Furukawa, M., Doi, K., Ohshiro, T., Suzuki, H., 2015. A thiostrepton resistance gene and its mutants serve as selectable markers in *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Biosci Biotechnol Biochem.* 3:1–8.
168. Welker, N.E., 1988. Transduction in *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 170 (8), 3761–4.
169. Wiegand, S., Rabausch, U., Chow, J., Daniel, R., Streit, W.R., Liesegang, H., 2013. Complete genome sequence of *Geobacillus* sp. strain GHH01, a thermophilic lipase-secreting bacterium. *Genome Announc.* 1 (2). <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00092-13> (25).
170. Woolston, B.M., Edgar, S., Stephanopoulos, G., 2013. Metabolic engineering: past and future. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 4:259–88.
171. Wu, L.J., Welker, N.E., 1989. Protoplast transformation of *Bacillus stearothermophilus* NUB36 by plasmid DNA. *J Gen Microbiol.* 135(5):1315–24.
172. Xiao, Z., Wang, X., Huang, Y., Huo, F., Zhu, X., Xi, L., Lu, J.R., 2012. Thermophilic fermentation of acetoin and 2,3-butanediol by a novel *Geobacillus* strain. *Biotechnol Biofuels.* 5(1):88. doi:10.1186/1754-6834-5-88.
173. Xue, G.P., Johnson, J.S., Dalrymple, B.P., 1999. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *J. Microbiol. Methods* 34, 183–91.
174. Zeigler, D.R., 2001. *Bacillus* Genetic Stock Center Catalog of Strains, seventh ed., vol. 3, The Genus *Geobacillus*. www.bgsc.org/_catalogs/Catpart3.pdf (2015 11 19).
175. Zeigler, D.R., 2014. The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? *Microbiology* 160 (1), 1–11.
176. Zhang, G.Q., Bao, P., Zhang, Y., Deng, A.H., Chen, N., Wen, T.Y., 2011. Enhancing electro-transformation competency of recalcitrant *Bacillus amyloliquefaciens* by combining cell-wall weakening and cell-membrane fluidity disturbing. *Anal Biochem.* 409(1):130–7.
177. Zhang, M., Nakai, H., Imanaka, T., 1988. Useful Host-Vector Systems in *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol.* 54(12):3162–4.

178. Zhang, Z., Ding, Z.T., Shu, D., Luo, D., Tan, H., 2015. Development of an efficient electroporation method for iturin A-producing *Bacillus subtilis* ZK. *Int J Mol Sci.* 16(4):7334–51.
179. Zhang, G., Wang, W., Deng, A., Sun, Z., Zhang, Y., Liang, Y., 2012. A Mimicking-of-DNA-Methylation-Patterns Pipeline for Overcoming the Restriction Barrier of Bacteria. *PLoS Genet* 8(9): e1002987. doi:10.1371/journal.pgen.1002987.
180. Zhong, C., Peng, D., Ye, W., Chai, L., Qi, J., Yu, Z., Ruan, L., Sun, M., 2011. Determination of plasmid copy number reveals the total plasmid DNA amount is greater than the chromosomal DNA amount in *Bacillus thuringiensis* YBT-1520. *PLoS One* 6 (1), e16025. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016025>.
181. Zhou, L., Zhou, M.X., Sun, C.M., Han, J., Lu, Q.H., Zhou, J., Xiang, H., 2008. Precise determination, cross-recognition, and functional analysis of the double-strand origins of the rolling-circle replication plasmids in haloarchaea. *J Bacteriol* 190:5710–9.
182. Zhou, M., Xiang, H., Sun, C., Li, Y., Liu, J., Tan, H., 2004. Complete sequence and molecular characterization of pNB101, a rolling-circle replicating plasmid from the haloalkaliphilic archaeon *Natronobacterium* sp. strain AS7091. *Extremophiles* 8, 91–8.

PRIEDAI

1 lentelė. *Geobacillus* genties sekvenuotos plazmidės

Nr.	Plazmidė	Identifikacinis numeris	Dydis, bp	Šeimnininkas	Nuorodos į publikuotus darbus, arba sekų įkėlimo į duomenų bazę metai
1	pSTK1	NC_002062.1	1 883	<i>G. stearothermophilus</i> TK015	Nakayama et al.,1993
2	pHTA426	NC_006509.1	47 890	<i>G. kaustophilus</i> HTA426	Takami et al., 2004
3	pLW1071	NC_009329.1	57 693	<i>G. thermodenitrificans</i> NG80-2	Feng et al., 2007
4	pGS18	NC_010420.1	62 830	<i>G. stearothermophilus</i>	Stuknyte et al., 2008
5	pWCH7001	NC_012794.1	33 899	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70	2009
6	pGYMC6101	NC_013412.1	45 057	<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC61	2009
7	pWCH7002	NC_012790.1	10 287	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70	2009
9	pGY4MC101	NC_014651.1	71 617	<i>Geobacillus</i> sp. Y4.1MC1	2010
11	pGEOTH02	NC_015661.1	19 638	<i>G. thermoglucosidasius</i> C56-YS93	2011
10	pGEOTH01	NC_015665.1	80 849	<i>G.thermoglucosidasius</i> C56-YS93	2011
12	pGYMC5201	NC_014916.1	45 057	<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC52	2011
13	pBt40	NC_022092.1	39 678	<i>Geobacillus</i> sp. JF8	Shintani et al.,2014
14	pGTD7	NC_022993.1	3 279	<i>Geobacillus</i> sp. 610	Kananavičiūtė et al., 2014
15	pGTG5	NC_022994.1	1 540	<i>Geobacillus</i> sp. 1121	Kananavičiūtė et al., 2014
16	pGC56T2_1 ^A (Contig254.2)	B	41 319	<i>Geobacillus</i> sp. C56-T2	2011
17	pGC56T2_2 ^A (Contig255.3)	B	55 173	<i>Geobacillus</i> sp. C56-T2	2011

Dalinai sekvenuotos plazmidės

pTB19	<u>M63891.1</u>	11 887 ^C	<i>G. stearothermophilus</i>	van der Lelie, D. et al, 1989, Oskam et al., 1991
pGGO1	<u>DQ146476.2</u>	20 171	<i>G. stearothermophilus</i> DSMZ 6285	Omokoko et al., 2008
pBST1	<u>EU547236.2</u>	837 ^D	<i>G. stearothermophilus</i> NRTL 1102	Taylor et al., 2008

^AŠiame darbe naudotas plazmidės pavadinimas, kadangi duomenų bazėje plazmidės vardas nenurodytas.

^BPlazmidžių sekos patalpintos https://gold.jgi-psf.org/analysis_projects?id=Ga0024922 duomenų bazėje.

^CVisas plazmidės ilgis ~27 kb

^DVisas plazmidės ilgis ~80 kb

2 lentelė. Transformuoti *Geobacillus* genties kamieniai

Kamienas	Transformacijos metodas	Plazmidė (replikonas funkcionuojantis geobacilose, termostabilus žymuo)	Transformacijos efektyvumas, KSV/ μ g plazmidinės DNR; nebent nurodyta kitaip	Nuoroda
<i>G. stearothermophilus</i>				
ATCC 12980 ir jo dariniai (CU21)	Protoplastų transformacija	pUB110	1,6·10 ⁵ b	Imanaka et al., 1982
		pTB90	5,9·10 ^{5g} 2,2·10 ⁴ b	
		pTHT15	1,3·10 ^{7g} 2,5·10 ⁻⁴ transformantai/regenerantui ^b 6,1·10 ⁻² transformantai/regenerantui ^g	
NRLL 1174 ¹	Protoplastų transformacija	pBST22	~3,0·10 ⁵	Liao & Kanikula, 1990
BR219 (DSMZ 6285)	Konjugacija	pAM120	2,6·10 ⁻⁷ recipientui ⁻¹	Natarajan & Oriol, 1991
NUB36 and its derivatives (NUB3621 and NUB3621R)	Protoplastų transformacija	pTHT15	4·10 ^{8g}	Wu & Welker., 1989
		pLW05 *	2·10 ⁷ g	
		pRP9	4–6·10 ⁵	
		pSTE12	–	
	Elektroporacija	pNW33N	–	Couñago & Shamoo, 2005
		pUCG18	1,4·10 ²	Blanchard et al., 2014 Kananavičiūtė et al., 2014
<i>G. thermodenitrificans</i>				
K1041	Elektroporacija	pUB110	5,8·10 ⁵ b	Narumi et al., 1992
		pIH41	7,2·10 ⁴ b	
		pSTE12	4,9·10 ^{1e} 5,1·10 ^{4g}	
		pSTE33	0,2·10 ^{1 e}	
			2,8·10 ^{6g}	

ET 144-2	Elektroporacija	pNW33N	6	Bosma ir kt., 2015
ET 251	Elektroporacija	pNW33N	4	Bosma ir kt., 2015
<i>G. thermoglucosidasius</i>				
TN	Elektroporacija	pBST22 ^{eh}	$3,0 \cdot 10^2$	Thompson et al., 2008
DL33 and its derivatives	Elektroporacija	pBST22	$3,9 \cdot 10^3$	Tylor et al., 2008
		pUCG18	$9,8 \cdot 10^3$	
NCIMB 11955 (DSM 2542 ^T) and its derivatives	Elektroporacija	pTMO19	–	Cripps et al., 2009
		pTMO31	–	Cripps et al., 2009
		pUCG3.8	$2,8 \cdot 10^5$	Bartosiak-Jentys et al., 2013
		pNW33N	–	Lin et al., 2014
<i>G. kaustophilus</i>				
HTA426 and its derivatives	Konjugacija	pUCG18 carrying <i>oriT</i>	10^{-5} – 10^{-3} recipientui ⁻¹	Suzuki & Yoshida, 2012
		pSTE33 carrying <i>oriT</i>	10^{-7} – 10^{-6} recipientui ⁻¹	
		pGAM46	–	Suzuki et al., 2012