

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS



ŽYMANČAS VENČKUS

**Lipoksigenazės geno iš *Pseudomonas aeruginosa* raiškos mielėse tyrimas**

**Magistro baigiamasis darbas**

Genetikos studijų programa

**Darbo vadovė**  
dr. Inga Matijošytė

**Darbo konsultantas**  
Jokūbas Krutkevičius

Vilnius 2023

# TURINYS

<b>SANTRAUKA</b> .....	<b>4</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>5</b>
<b>ĮVADAS</b> .....	<b>6</b>
<b>SANTRUMPOS</b> .....	<b>7</b>
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA</b> .....	<b>8</b>
1.1 Lipoksigenazės.....	8
1.2 Heterologinės baltymų ekspresijos sistemos .....	14
<b>2. MEDŽIAGOS IR METODAI</b> .....	<b>19</b>
2.1 Prietaisai ir priemonės.....	19
2.2 Medžiagos .....	19
2.2.1 Reagentai: .....	19
2.2.2 Vektoriai: .....	20
2.2.3 Mikroorganizmai: .....	20
2.2.4 Pradmenys: .....	20
2.2.5 Fermentai ir buferiniai tirpalai:.....	21
2.2.6 Komerciniai DNR paruošimo ir gryninimo rinkiniai: .....	21
2.2.7 DNR elektroforezės tirpalai:.....	21
2.2.8 Kompetentinių ląstelių ruošimo ir transformavimo temperatūriniu šoku tirpalai: .....	21
2.2.9 Kompetentinių ląstelių ruošimo ir transformavimo elektroporacija tirpalai: .....	22
2.2.10 Mitybinės terpės: .....	22
2.2.11 Baltymų elektroforezės tirpalai: .....	23
2.2.12 Lipoksigenazės funkcinės analizės tyrimo tirpalai: .....	24
2.2.13 Kiti tirpalai:.....	24
2.3 Metodai .....	24
2.3.1 DNR koncentracijos nustatymas .....	24
2.3.2 DNR elektroforezė agarozės gelyje.....	25
2.3.3 DNR išskyrimas iš agarozės gelio su „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ („Thermo Scientific“). .....	25
2.3.4 DNR gryninimas naudojant „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ ir „GeneJET PCR Purification Kit“ rinkinius .....	25
2.3.5 DNR išsodinimas etanolinės precipitacijos būdu .....	25
2.3.6 Polimerazės grandininė reakcija (PGR) .....	25
2.3.7 Kolonijų PGR ( <i>bakterijų</i> ) .....	26
2.3.8 Kolonijų PGR ( <i>mielių</i> ).....	27
2.3.9 DNR karpymas su restrikcijos endonukleazėmis .....	27
2.3.10 DNR mutagenezė.....	28
2.3.11 Klonavimas „Golden Gate“ strategija .....	28
2.3.12 Kompetentinių <i>E. coli</i> ląstelių ruošimas transformacijai temperatūriniu šoku.....	29
2.3.13 Kompetentinių mielių <i>P. pastoris</i> ląstelių ruošimas transformacijai elektroporacija .....	29
2.3.14 Kompetentinių mielių <i>S. cerevisiae</i> ląstelių ruošimas transformacijai temperatūriniu šoku .....	30
2.3.15 Kompetentinių <i>E. coli</i> ląstelių transformacija temperatūriniu šoku .....	30
2.3.16 Mielių <i>P. pastoris</i> kompetentinių ląstelių transformacija elektroporacija .....	30
2.3.17 Mielių <i>S. cerevisiae</i> kompetentinių ląstelių transformacija temperatūriniu šoku .....	30

2.3.18 Tikslinių baltymų raiška mielėse <i>P. pastoris</i> .....	31
2.3.19 Tikslinių baltymų raiška mielėse <i>S. cerevisiae</i> .....	31
2.3.20 Mielių ardymas mechaniškai (stiklo rutuliukais) .....	31
2.3.21 Supernatanto baltymų koncentravimas.....	32
2.3.22 Lipoksigenazių funkcinės analizės tyrimas agarizuoto krakmolo šulinėliuose.....	32
2.3.23 NDS-PAGE baltymų elektroforezė .....	32
<b>3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....</b>	<b>34</b>
3.1 LOX raiškos tyrimai nemetilotrofinės <i>S. cerevisiae</i> mielių sistemose. ....	34
3.2 Lipoksigenazės klonavimas ir raiškos tyrimai metilotrofinėse <i>Pichia pastoris</i> .....	36
3.2.1 LOX tyrimai su integraciniu pPIC9K raiškos vektoriumi.....	37
3.2.2 LOX raiškos kontruksto kūrimas paremtas GoldenPiCS strategija.....	45
<b>IŠVADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>PADĖKA.....</b>	<b>50</b>
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS.....</b>	<b>51</b>
<b>PRIEDAS .....</b>	<b>57</b>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Žymantas Venckus

**Lipoksigenazės geno iš *Pseudomonas aeruginosa* raiškos mielėse tyrimas**

Magistro baigiamasis darbas

## **SANTRAUKA**

Bakterinė lipoxygenazė (LOX) yra fermentas, turintis didelį potencialą būti pritaikomas pramonėje. Jis pasižymi unikaliomis katalitinėmis savybėmis ir plačiu substratų specifiskumu, todėl yra laikomas patraukliu įrankiu aukštos pridėtinės vertės produktų gamybai, pavyzdžiui, oleochemikalų, biokuro, skonio ir aromato stipriklių, maisto priedų bei daugelio kitų. Tačiau, šiuo metu yra žinomi tik keli sėkmingi bandymai pagaminti didelį rekombinantinės LOX kiekį. Kol kas ji nėra komerciškai prieinama industrijai reikalingais kiekiais.

Šio tyrimo tikslas buvo ištirti bakterinės LOX iš *Pseudomonas aeruginosa* heterologinę raišką skirtingose mielių gentyse, vykdant baltymo sekreciją už ląstelės ribų. Tyrimas buvo atliktas naudojant nemetilotrofinių *Saccharomyces cerevisiae* ir metilotrofinių *Pichia pastoris* mielių kamienus. LOX ekspresijai *S. cerevisiae* naudotas episominis pFX7αF-LOX šaudyklinis vektorius su kuriuo ištirta skirtingų mutantinių kamienų įtaka LOX sintezei. LOX ekspresijos tyrimams *P. pastoris* atlikti buvo naudojamas integracinis pPIC9K-LOX vektorius, sukonstruotas homologinės rekombinacijos būdu *E. coli*. Naudojant AOX1 promotorių ir metanolį kaip induktorių, pasiekta sėkminga LOX sintezė, o didžioji dalis aktyvaus baltymo buvo supernatante. Paraleliai konstruota nauja ekspresijos plazmidė LOX sintezei *P. pastoris* be induktoriaus. Ši plazmidė su konstitutyviu promotoriumi klonuota naudojant "Golden Gate" klonavimo strategiją.

VILNIUS UNIVERSITY

Life Sciences Center

Žymantas Venckus

**Expression of Lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* in Yeast**

Master Thesis

**SUMMARY**

Bacterial lipoxygenase (LOX) is an enzyme that has the potential to play a significant role in various industrial applications. It exhibits unique catalytic properties and substrate specificity, making it an attractive tool for the production of high-value products such as oleochemicals, biofuels, flavor and aroma compounds, food additives, and many others. However, there are only a few successful attempts to achieve a high recombinant LOX yield and it is not commercially available yet in proper amounts.

The aim of this research was to investigate the heterologous expression of bacterial LOX from *Pseudomonas aeruginosa* in different yeast genera and to construct a system that would allow secretion of the protein into the extracellular space. This study was carried out with non-methylotrophic *Saccharomyces cerevisiae* and methylotrophic *Pichia pastoris* yeast strains. An episomal shuttle pFX7 $\alpha$ F-LOX vector was used for LOX expression in *S. cerevisiae*. The impact of using different mutant strains for LOX production was explored. The integrating pPIC9K-LOX vector for testing the LOX expression in *P. pastoris* was constructed by homologous recombination method in *E.coli*. Using AOX1 promotor and methanol as an inducer a successful active LOX expression was achieved with the majority of the protein located in the culture supernatant. Adjacent to this, for LOX expression in *P. pastoris* without the need of external inducers, a new expression plasmid was constructed using Golden Gate based cloning strategy.

## IVADAS

Lipoksigenazės (LOX) – tai plačiai gamtoje paplitęs oksidoreduktazių klasei priklausantys fermentai, kurie katalizuoja nesočiųjų riebalų rūgščių oksidaciją. Šių fermentų veikimui nereikalingi papildomi kofaktoriai, o reakcijų metu susidariusios hidroperoksidintos riebalų rūgštys gali būti lengvai modifikuojamos. LOX katalizuojamos reakcijos produktai yra naudojami kaip pirmtakai įvairių signalinių molekulių bei kitų gyvybiškai svarbių junginių sintezei. Šiuo metu daugiausiai dėmesio susilaukiančios yra žmogaus kilmės lipoksigenazės. Jos raiškos pakitimai yra siejami su įvairiais sveikatos sutrikimais, tokiais kaip aterosklerozė, astma, alergija bei vėžys.

Tuo tarpu mažiausiai tyrimų atlikta su bakterinės kilmės lipoksigenazėmis. Šie fermentai išskiria plačiausiu substratų spektru ir dideliu stabilumu aukštose temperatūrose, todėl yra laikomi puikiais potencialiais pramoniniais biokatalizatoriais. Unikalios bakterinės LOX savybės leidžia jas pritaikyti oleochemikalų, biokuro, skonio ir kvapo stipriklių gamyboje, bioremediacijoje bei farmacijos ir kosmetikos pramonėje. Šiems procesams užtikrinti yra reikalingi dideli baltymų kiekiai, todėl yra vystomos naujos rekombinantinių LOX baltymų ekspresijos sistemos. Iki šiol didžiausia LOX gamyba yra pasiekta naudojant *E. coli* ląsteles kaip raiškos šeimininką. Tačiau naudojant prokariotines ekspresijos sistemas dažnai susiduriama su baltymų netirpumo ir aktyvumo praradimo problemomis. Tai verčia ieškoti naujų šeimininkų, galinčių vykdyti heterologinės lipoksigenazės sintezę.

Eukariotinių ląstelių sistemos, tokios kaip *Saccharomyces cerevisiae* bei *Pichia pastoris*, galėtų tapti puikia alternatyva, prieš tai minėtiems iššūkiams spręsti. Šios mielės neturi pirogenų ir yra pripažintos kaip GRAS organizmai. Jų savybės, tokios kaip greitas augimas paprastomis sąlygomis bei vykdomos potransliacinės modifikacijos, leidžia šiuos organizmus pritaikyti efektyviai sudėtingų baltymų sintezei dideliais kiekiais. Jose esantis veiksmingas  $\alpha$  faktoriaus signalis peptidas, leidžia užtikrinti rekombinantinių baltymų sekreciją už lątelės ribų, taip palengvinant jų gryninimo procesus. Šios mielės taip pat pasižymi galimybe naudoti episomines ir integracines plazmidas, o tai praplečia tyrimų krypčių ribas. Todėl šio tiriamojo darbo metu buvo siekiama įvertinti *Saccharomyces cerevisiae* bei *Pichia pastoris* organizmų tinkamumą heterologinės lipoksigenazės raiškai.

### **Darbo tikslas:**

Ištirti ir palyginti *Pseudomonas aeruginosa* lipoksigenazės *lox* geno raišką skirtinguose mielių *Saccharomyces* ir *Pichia* genčių kamienuose.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Palyginti heterologinio *lox* geno raišką skirtinguose *Saccharomyces cerevisiae* kamienuose.
2. Sukonstruoti plazmidas *lox* geno raiškai mielėse *Pichia pastoris* ir atlikti raiškos tyrimus.

## SANTRUMPOS

- $\alpha$ F** –  $\alpha$  faktoriaus signalinis peptidas
- AA** – arachidono rūgštis
- AA-BAA** – akrilamidas-bisakrilamidas
- ALA** –  $\alpha$ -linoleno rūgštis
- Amp** – ampicilinas
- APS** – amonio persulfatas
- dH<sub>2</sub>O** – dejonizuotas vanduo
- DTT** – ditioneitolis
- EDTA** – etilendiaminotetraacto rūgštis
- EPA** – eikozapentaeno rūgštis
- EtBr** – etidžio bromidas
- EtOH** – etanolis
- FDH** – formaldehidas
- G418** – geneticinas
- GLA** –  $\gamma$ -linoleno rūgštis
- HEPES** – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfoninė rūgštis
- LA** – linolo rūgštis
- LOX** – lipoksigenazė
- LB terpė** – Luria-Bertani terpė
- MD** – gliukozės/YNB/amonio sulfato mitybinė terpė
- MeOH** – metanolis
- NDS-PAGE** – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinė elektroforezė
- PEG** – polietilenglikolis
- PMSF** – fenilmetilsulfonilfluoridas
- PUFA** – polinesočiosios riebalų rūgščių
- TEMED** – N,N,N',N'-tetrametilen-1,2-diaminas
- Tris** – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiolis
- Tween-20** – polioksietileno-20-sorbitano monolauratas
- YEPD** – mielių ekstrakto/peptono iš sojų pupelių/gliukozės mitybinė terpė
- YEPG** – mielių ekstrakto/peptono iš sojų pupelių/glicerolio mitybinė terpė
- YEPGal** – mielių ekstrakto/peptono iš sojų pupelių/galaktozės indukcinė terpė
- YNB** – mielių azoto bazė

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Lipoksigenazės

Lipoksigenazės (EC. 1.13.11.- LOX) – tai didelė, oksidoreduktazių klasės fermentams, priklausanti monomerinių baltymų šeima, kuri pirmą kartą buvo aptikta 1928 m. Bohn and Haas. Ši tyrėjų komanda pastebėjo balinimo poveikį kvietiniuose miltuose, kuomet į kvietinę tešlą buvo įdedamas nedidelis kiekis sojų miltų. Buvo manoma, kad balinimo efektas įvyko dėl karotino oksidacijos, todėl šis fermentas iš pradžių buvo identifikuotas kaip karotino oksidazė (Singh et al., 2022). Bėgant metams buvo pasiūlyti tokie pavadinimai kaip nesočiųjų lipidų oksidazė, lipoksidazė, riebalų oksidazė bei lipidų oksidazė. 1940 m. visi anksčiau naudoti pavadinimai buvo konsoliduoti ir fermentas buvo oficialiai pavadintas lipoksigenaze (Hayward et al., 2016).

LOX šeimos fermentai priklauso dioksigenazėms (EC.1.13.11), tačiau daugelis jų turi ketvirtą skaitmenį, pagrįstą substrato specifiškumu ir, tam tikrais atvejais, jiems būdingu regio- arba enantio- specifiškumu. Regioselektivumas apibūdinamas anglies atomo padėtimi, kurioje LOX oksiduoja polinesočiąsias riebalų rūgštis. Priklausomai nuo fermento enantioselektivumo, susidariusios hidroperoksidintos riebalų rūgštys gali būti R arba S konfigūracijos, pvz., 15R-LOX arba 15S-LOX. Kai kuriais atvejais yra minimas ir pirminio substrato pavadinimas, pvz., AA 5-LOX (arachidono rūgštis), LA 9-LOX (linoleino rūgštis). Galiausiai, yra išskiriama ir nedidelė lipoksigenazių grupė, kurioms priskiriamas pavadinimas atsižvelgiant į jų specifines charakteristikas, tokias kaip išskirtinai mažas baltymo dydis (mini-LOX), neįprastų kofaktorių naudojimas (Mn-LOX) ar lipoksigenazes, kurios yra susijungusios su kitais fermentais ir pasižymi dvigubu (bifunkciniu) aktyvumu (*angl.* fusion-LOX) (**1.1 lentelė**) (Andreou et al., 2008; Heshof et al., 2014a; Chrisnasari et al., 2022).

**1.1 lentelė.** Lipoksigenazių klasifikacija (adaptuota pagal Shi et al., 2020)

Organizmas	Lipoksigenazės
Augalai	9-LOX, 13-LOX
Gyvūnai	5-LOX, 8-LOX, 12-LOX, 13-LOX
Bakterijos	10-LOX, 9-LOX, 13-LOX, Mini-LOX, 15-LOX
Grybai	Mn-LOX, 15-LOX

Vis dėlto, dėl pastaruoju metu padidėjusio genomo ir baltymų sekų kiekio duomenų bazėse bei gausėjant naujai atrandamų LOX skaičiui, šio fermento klasifikavimas tampa ypatingai sudėtingas. Nustatyta atvejų, kuomet tame pačiame organizme vyrauja daugybė fermento izoformų (Brash et al., 1999; Hayward et al., 2017) arba kai vieno tipo fermentas katalizuoja keletos skirtingų



substratų oksidaciją. Tai apsunkina lipoksigenazės klasifikavimą, todėl iki šiol nėra paprastos, LOX vienijančios nomenklatūros sistemos (Hayward et al., 2016; Chrisnasari et al., 2022).

Nepaisant šių klasifikavimo iššūkių, visos lipoksigenazės savo aktyviajame centre turi neheminę geležį (išskirtiniais atvejais – manganą) ir katalizuoja tą pačią reakciją. LOX vykdo regioselektyvų molekulinio deguonies prijungimą prie polinesočiųjų riebalų rūgščių (PUFA) 1Z,4Z-pentadieno fragmentų, kurio galutinis produktas yra hidroperoksidintos riebalų rūgštys (Kuhn et al., 2018).

Įvairios kilmės LOX skiriasi pagal jų specifiskumą skirtingiems substratams. Žinduolių LOX kaip substratą paprastai naudoja arachidono (AA; C20:4  $\Delta$ 5,8,11,14) ir linolo rūgštis (LA; C18:2  $\Delta$ 9,12). Kai kurios lipoksigenazės taip pat aktyviai vykdo  $\alpha$ -linoleno (ALA; C18:3  $\Delta$ 9,12,15) bei eikozapentaeno (EPA; C20:5  $\Delta$ 5,8,11,14,17) rūgščių hidroperoksidinimą (Chrisnasari et al., 2022). Augalų ir grybų LOX daugiausiai naudoja LA, ALA ir  $\gamma$ -linoleno (GLA; C18:3  $\Delta$ 6,9,12) rūgštis kaip substratą. Tuo tarpu bakterijų kilmės LOX pasižymi plačiausiu substratų spektru (LA, ALA, GLA, AA, EPA, ir DHA) (Chrisnasari et al., 2022).

Lipoksigenazės yra aptinkamos daugelyje eukariotinių organizmų ir yra ypač plačiai tiriamos esančios žmonėse, gyvūnuose, augaluose bei grybuose. Yra žinoma, jog LOX dalyvauja gaminant oksilipinus ir įvairius signalinius junginius eukariotų organizmuose. Jų katalizuojamų reakcijų specifiskumas suteikia galimybę sintetinti įvairių tipų riebalų rūgščių hidroperoksidus, kurie atlieka skirtingas funkcijas (Heshof et al., 2014; Isobe et al., 2018; Kutzner et al., 2020; Park et al., 2020).

LOX egzistavimas daugelyje eukariotinių organizmų pabrėžia jų biologinę svarbą. Tarp plačiausiai ištirtų yra žinduolių kilmės lipoksigenazės, iš kurių šiuo metu daugiausia dėmesio susilaukia žmonėse aptinkamos šio fermento izoformos (Hashem et al., 2020). Žmogaus genome yra šeši funkciniai LOX genai (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOX5 ir ALOXE3), kurių kiekvienas koduoja atskirą LOX fermentą. Išskyrus ALOX5 geną, esantį 10q11.2 chromosomoje, visi LOX genai yra lokalizuoti 17p13 chromosomoje ir koduoja vienos grandinės 75–82 kDa dydžio baltymą (Snodgrass & Brüne, 2019).

LOX paprastai randamos daugelio organų ir audinių ląstelių citozolyje bei submembraninėje dalyje. Jų katalizinės reakcijos produktai yra signalinės molekulės, kurios bendrai vadinamos eikozanoidais (Skrzypczak-Jankun et al., 2012). Šie junginiai dalyvauja daugelyje biologinių procesų, tokių kaip epidermio diferenciacija, odos vystymasis, ląstelių dauginimasis, kancerogenezė, kraujospūdžio reguliavimas, aterosklerozė bei neurodegeneracija (Krieg et al., 2014; Kuhn et al., 2015; Simard-Bisson et al., 2018; Snodgrass & Brüne, 2019). Lipoksigenazės taip pat atlieka svarbų vaidmenį uždegiminiuose procesuose bei yra atsakingos už kai kurių medžiagų apykaitos sutrikimus (Ma et al., 2010).

LOX taip pat plačiai paplitusios ir augaluose. Lipoksigenazės ypač gausiai sutinkamos varpinių javų kultūrose (kviečiuose, kukurūzuose, avižose, rugiuose, miežiuose), ankštiniuose augaluose (šparaginėse ir sojos pupelėse, žirniuose, spindulinėse pupuolėse) bei bulvių gumbuose. Augalų LOX yra svarbūs antrinių metabolitų sintezei, tokių kaip jazmonatai, fitooksilipinai, divinilo eteriai bei lapų aldehidai. Pastarieji augaluose užtikrina gyvybiškai svarbias funkcijas (**1.2 lentelė**) (Wasternack & Hause, 2013; Hassan et al., 2015; Lončarić et al., 2021).

**1.2 lentelė.** *Arabidopsis thaliana* lox geno funkcijos (adaptuota pagal Singh et al., 2022)

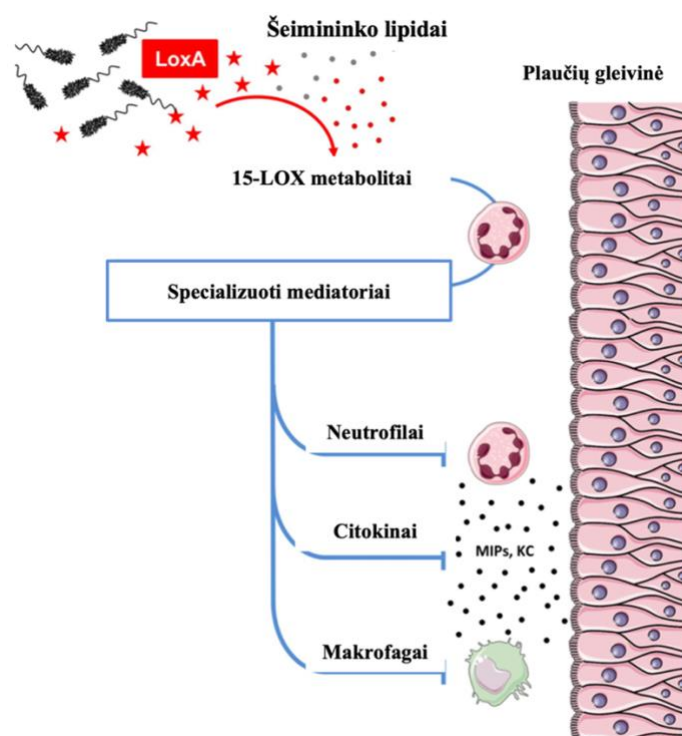
Geno lokusas	Gene pavadinimas	Geno funkcija	Aminorūgščių skaičius
AT1G55020	<i>LOX1</i>	Atparumas prieš patogenus	859
AT3G45140	<i>LOX2</i>	Jazmonatų biosintezė	896
AT1G17420	<i>LOX3</i>	Žiedų vystymasis	919
AT1G72520	<i>LOX4</i>	Žiedų vystymasis, atsako formavimas į abiotinį stresą	926
AT3G22400	<i>LOX5</i>	Apsaugos mechanizmai	886
AT1G67560	<i>LOX6</i>	Jazmonatų biosintezė	917

Augaluose lipoksigenazės atlieka svarbų vaidmenį gynybiniuose procesuose bei dalyvauja formuojant augalų atsaką į biotinį ir abiotinį stresą. Pastebėta, kad faktoriai, tokie kaip UV spinduliai, ekstremali temperatūra, deguonies ir vandens trūkumas bei vabzdžių ir patogenų atakos, sukelia padidintą LOX geno raišką. (Singh et al., 2022). Lipoksigenazės taip pat yra atsakingos už žaizdų gijimą, augalo vystymąsi, atsako į patogenus, vabdžius, žolėdžius gyvūnus formavimą, bei yra ypatingai svarbūs sėklų daiginimo procese, kuomet padeda skaidyti sukauptas lipidų atsargas (Hassan et al., 2015; Singh et al., 2022). Dėl šių priežasčių LOX aktyvumas yra laikomas puikiu biožymeniu augalų fiziologijos srityje (Singh et al., 2022).

Nors šių fermentų egzistavimas prokariotiniuose organizmuose yra žinomas, jų struktūra, biocheminės savybės ir fiziologinis vaidmuo iki šiol nėra detalai ištirti (Chrisnasari et al., 2022). Ilgą laiką prokariotinės kilmės LOX tyrimams buvo skiriama mažai dėmesio. Iki 2013m. buvo nustatyti tik 38 bakterijų genai, kurie koduoja lipoksigenazes (Hansen et al., 2013). Vis dėlto, dėl pastaruoju metu išaugusio susidėmavimo bakterijų lipoksigenazėmis ir jų galimo panaudojimo industriniuose procesuose, situacija ženkliai pasikeitė. Šiuo metu yra nustatyta daugiau nei 4700 bakterijų baltymų sekų iš 1100 skirtingų bakterijų rūšių, kurios anotuojamos kaip LOX arba turi konservatyvius domenus būdingus lipoksigenazėms, Nepaisant to, iki šiol tik nedidelė dalis jų yra

išsamiai aprašytos ir kol kas mažai žinoma apie pačios lipoksigenazės atliekamą funkciją bakterijose (Chrisnasari et al., 2022).

Viena daugiausiai apibūdintų bakterijų lipoksigenazių yra iš *Pseudomonas aeruginosa*. Šios lipoksigenazės yra lokalizuotos periplazmoje ir manoma, kad jos pagrinde yra atsakingos už patogenezę (Hashem et al., 2020). Pastarųjų metų tyrimai atskleidė, kad bakterinės lipoksigenazės sukelia raudonųjų kraujo kūnelių hemolizę bei atlieka svarbų vaidmenį bakterijų kolonizacijos ir bioplėvelių formavimo procesuose žmogaus plaučių audiniuose (Banthiya et al., 2016; Deschamps et al., 2016; Morello et al., 2019). *In vitro* tyrimai parodė, kad *P. aeruginosa* LOX taip pat padeda sintetinti ir lipoksinus – priešuždegiminius mediatorius, kurie slopina šeimininko imuninį atsaką į patogeną (Banthiya et al., 2016, Kurakin et al., 2020) (**1.1 pav.**).

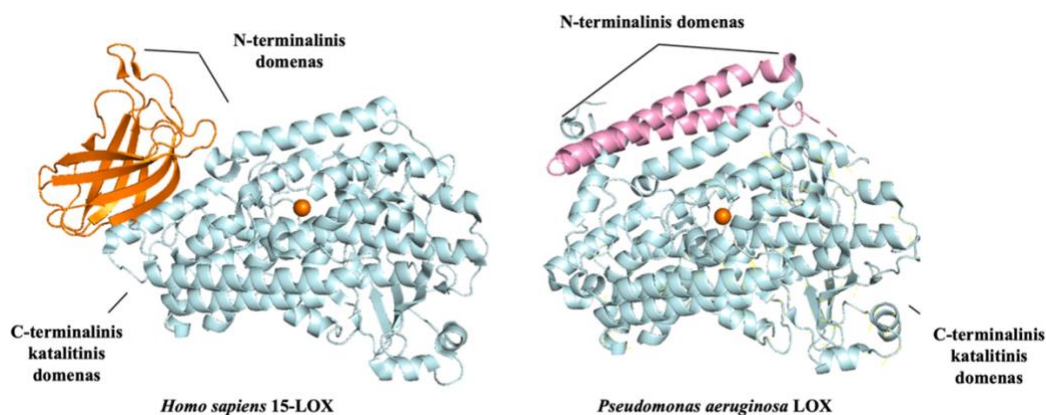


**1.1 pav.** Schema nurodanti *P. aeruginosa* LOX patogenezės procesus plaučių audiniuose (adaptuota pagal Morello et al., 2019)

### Biocheminės lipoksigenazių charakteristikos

Lipoksigenazės pasižymi didele molekulių masių variacija tarp skirtingų LOX šeimos narių. Ilgiausiomis polipeptidinėmis grandinėmis išsiskiria sausumos augaluose sutinkamos lipoksigenazės (90-110 kDa), o pačios mažiausios ir kompaktišiausios lipoksigenazės yra randamos bakterijose (45-75 kDa). Be to, yra pastebimas ir didelis amirorūgščių sekų variabilumas tarp skirtingos kilmės LOX, kurių panašumas siekia tik 20-25 % (Newie et al., 2016; Singh et al., 2022). Nepaisant šių skirtumų, visi LOX turi konservatyvų WXXAK motyvą, vienodą aminorūgščių seką kataliziniame centre bei panašią erdvinę struktūrą (Chrisnasari et al., 2022).

Paprastai eukariotinės kilmės LOX susideda iš vienos polipeptidinės grandinės, kuri susilanksto į du domenų. C-terminalinis domenas, dar kitaip vadinamas kataliziniu domenu, didžiaja dalimi yra sudarytas iš  $\alpha$ -spiralių ir pasižymi didele molekuline mase (45-65 kDa) (1.2 pav.). Šiame domene yra lokalizuotas fermento aktyvusis centras, kuriame kofaktorių (neheminė geležis arba manganas) yra palaikomas vandens molekulių ir penkių konservatyvių aminorūgščių: trijų histidinių, ketvirtos – asparagino arba histidino, bei penktos C-terminalinės aminorūgšties, kuri dažniausiai yra izoleucinas (Newie et al., 2016; Chrisnasari et al., 2022).



1.2 pav. Žmogaus 15-LOX ir bakterinės LOX kristalinės struktūros (Chrisnasari et al., 2022)

N-terminalinis domenas yra sudarytas iš  $\beta$ -klosčių ir pasižymi sąlyginai nedideliu dydžiu (25-30 kDa) (Singh et al., 2022). Yra nustatyta, jog N-terminalinė LOX dalis yra svarbi fermento termostabilumui užtikrinti bei veikia kaip membraną surišantis domenas (Walther et al., 2011).

Kiek mažiau yra žinoma apie bakterinės kilmės LOX struktūras. Iki šiol plačiausiai ištirta ir aprašyta yra *Pseudomonas aeruginosa* priklausanti lipoksigenazė. Šių LOX struktūroje yra randamas tik vienas domenas (C-terminalinis-katalitinis) (Banthiya et al., 2016). Vietoje N-terminalinio domeno sudaryto iš  $\beta$ -klosčių, *P. aeruginosa* LOX turi apie 100 aminorūgščių liekanų pratęsimą, kuris nulemia fermento tirpumą (Hansen et al., 2013; Lu et al., 2016).

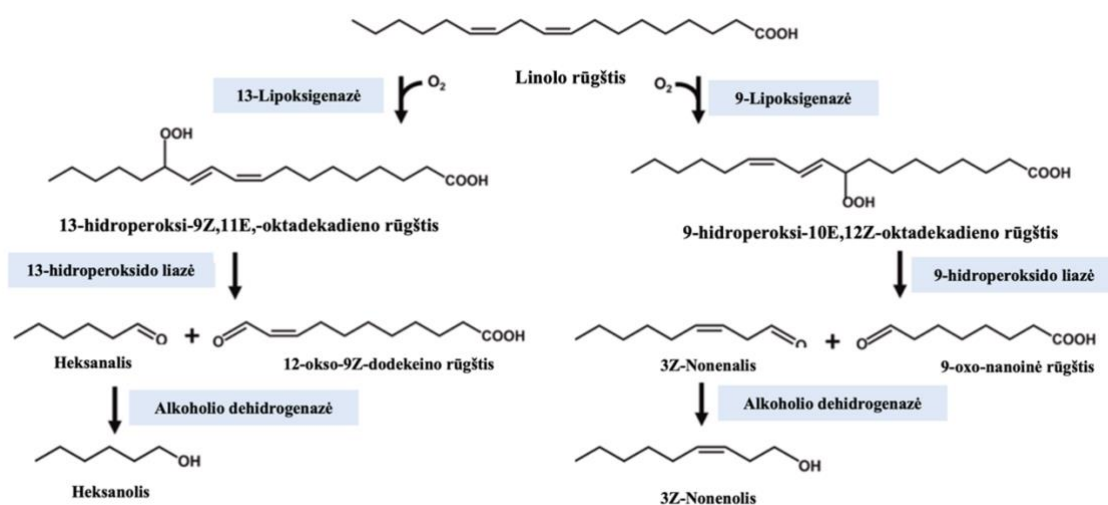
Kaip ir kiti fermentai, lipoksigenazės turi specifinį pH intervalą, kuriame veikia efektyviausiai. Daugumai eukariotinių LOX tinkamiausias yra fiziologinis, neutralus pH (6,5–7,5) (Kuhn et al., 1993). Didesniu optimalaus pH variabilumu pasižymi bakterinės kilmės lipoksigenazės. Pavyzdžiui, 11S-LOX iš *M. xanthus* DK 1622 yra stabiliausias esant pH 6, o didžiausias fermento aktyvumas yra pastebimas labiau rūgštinėje aplinkoje (pH 3). Taip pat yra nustatyta ir lipoksigenazių, kurių optimalus pH siekia 11-12, bei LOX, kuriems priskiriami keli pH optimumai (Hall et al., 2007; Qian et al., 2017; Ernst et al., 2022).

Lipoksigenazėms taip pat yra būdingas ir pakankamai platus optimalios temperatūros diapazonas. Didžioji dalis lipoksigenazių yra aktyviausios 20-40 °C temperatūroje, tačiau yra nustatyta ir atvejų, kuomet LOX efektyviausiai dirba ir ekstremalesnėmis sąlygomis. Pavyzdžiui, *Myxococcus fulvus* lipoksigenazės didžiausiu efektyvumu pasižymi žemose temperatūrose (5-10

°C), o iš *P. aeruginosa* PR3 išskirtos LOX temperatūros optimumas siekia net 60 °C (Bae et al., 2010; Goloshchapova et al., 2018). Dėl visų šių išskirtinių savybių, prokariotinės lipoksigenazės, pastaruoju metu, susilaukia ypač daug dėmesio kaip potencialūs pramoniniai biokatalizatoriai (Chrisnasari et al., 2022).

LOX katalizuojamas regioselektyvus riebalų rūgščių hidroperoksidinimas turi daugybę pritaikymų gaminant oleochemikalus. Lipoksigenazių sintetinami riebalų rūgščių hidroperoksidai, gali būti paverčiami hemiacetaliais, kurie tarnauja kaip pirmataikai formuojantis trumpų grandinių polimerams, tokiems kaip epoksidai, dioliai arba  $\omega$ -hidroksiriebalų rūgštys. Lipoksigenazių katalizuojamos reakcijos dariniai taip pat gali būti naudojami kosmetikos gamyboje kaip paviršiaus aktyviosios medžiagos (Liu et al., 2012; Zhang et al., 2012; Hu et al., 2014). Toks LOX produktų panaudojimas pramonėje yra laikomas tvaria, išteklius tausojančia bei aplinkai nekenksminga alternatyva šiuo metu plačiai naudojamiems procesams, kurie yra paremti chemine sinteze.

LOX pamažu taip pat gali tapti nieatsiejama maisto ir gėrimų pramonės dalimi, ir yra dažnai naudojami kaip sąlyginai nebrangūs biokatalizatoriai sintetinant įvairius malonaus kvapo ir skonio aromatinius junginius (Shi et al., 2020). Pavyzdžiui 2E-heksenolis, pasižymintis vaisių skoniu, bei 3Z-heksenolis, suteikiantis stiprų žalios žolės kvapą yra plačiai naudojami kaip alkoholinių gėrimų skonio stiprikliai (**1.3 pav.**) (Gigot et al., 2010).



**1.3 pav.** Lipoksigenazių katalizuojamų reakcijų pritaikymas aromatinių junginių ir skonio stipriklių gamybai (adaptuota pagal Chrisnasari et al., 2022)

LOX turi didelį potencialą būti panaudojamas kaip maisto priedas ir miltų apdorojimo proceso metu. Tyrimais įrodyta, kad aktyvūs LOX sojų miltai gali būti naudojami kvietiniams miltams sustiprinti, tokiu būdu atsisakant šiuo metu dažnai naudojamų kalio bromato ir benzoilo peroksido junginių (Hayward et al., 2016). Nors šiuo metu pramonėje dažniausiai yra naudojami augalinės kilmės LOX, vis daugiau dėmesio yra skiriama ir bakterinėms lipoksigenazėms dėl jų plataus substratų spektro bei gebėjimo sintetinti didelio grynumo junginius (Shi et al., 2020).

Nepaisant daugybės galimų lipoksigenazės panaudojimo sričių industrijoje, dalis jų susilaukia dėmesio medicinoje, dėl jų neigiamas pasekmes sukeliančių reakcijų. Kai kurios lipoksigenazės vaidina svarbų vaidmenį skatinant uždegimines reakcijas ir yra siejamos su ligų vystymusi. Todėl pastarųjų slopinimas laikomas vienu iš esminių ligos prevencijos žingsnių (Srivastava et al., 2016). Pastarąjį dešimtmetį ypač intensyviai tiriamos dvi žmogaus lipoksigenazės, tai 5-lipoksigenazė (5-LOX) ir 15-lipoksigenazė (15-LOX). 5-LOX arachidono rūgštį paverčia leukotrienais ir yra siejamas su keletu uždegiminių sutrikimų, tokių kaip astma, alergija bei aterosklerozė. Todėl šis fermentas laikomas potencialiu vaistų taikinių kovojant prieš šiuos sutrikimus. Dėl farmakokinetinių iššūkių bei sunkaus sukeliama šalutinio poveikio, dauguma 5-LOX inhibitorių nepraeidavo klinikinių stadijų. Kol kas šiuo metu vienintelis komercinis 5-LOX inhibuojantis vaistas yra Zileuton. Tačiau dėl jo trumpo galiojimo laiko bei retkarčiais pasitaikančių hepatoksiškumo atvejų, jo vartojimas yra ribojamas. Todėl dabar yra skiriama ypač daug dėmesio vystant naujus inhibitorius, tokius kaip AA-861, BWA4C, C06, CJ-13,610, nordihidroguareto rūgštis (NDGA) bei siekiant išsiaiškinti jų veikimo mechanizmus žmogaus ląstelėse bei audiniuose (Steinhilber & Hofmann, 2014; Sinha et al., 2019; Kahnt et al., 2022).

Kitas potencialus vaistų taikinytis yra 15-LOX, kuris priklausomai nuo vėžio tipo, gali sukelti pronavikinį arba priešnavikinį poveikį (Souza et al., 2020). Šiuo metu mažų molekulinį inhibitorių, galinčių slopinti 15-LOX metabolinį kelią, naudojimas yra viena iš pagrindinių tikslinės vėžio terapijos strategijų (Han et al., 2021). Plačiausiai ištirti ir daugiausiai potencialo turintys junginiai yra kvercetas, pirazolų orto-hidroksi analogai bei fitokanabinoidai, tokie kaip kanabidiolis (Armstrong et al., 2016, Kashyap et al., 2016, Sadeghian & Jabbari, 2016). Nors nustatyta, kad visi šie junginiai pasižymi antiproliferaciniu ir citotoksiniu poveikiu prieš krūties vėžio ląsteles, tačiau jų terapinis panaudojimas nėra tinkamai išnagrinėtas ir yra reikalingi detalesni tyrimai klinikinėse stadijose (Vaezi et al., 2021).

## **1.2 Heterologinės baltymų ekspresijos sistemos**

Siekiant fermentus panaudoti pramoniniuose procesuose yra reikalinga efektyvi raiškos sistema, kuri užtikrintų didelę aktyvaus fermento produkciją. Natyviai organizmuose gaminamas baltymo kiekis yra per mažas šiems reikalavimams patenkinti. Todėl šiai problemai išspręsti yra kuriamos ir nuolatos vystomos naujos rekombinantinių baltymų raiškos sistemos, kurios leistų greitai bei mažais kaštais sintetinti pakankamus kiekius tikslinių baltymų (Lestari & Novientri, 2021). Standartinės raiškos sistemos susideda iš keletos pagrindinių komponentų: (1) ląstelės arba ląstelių ekstraktų, kurie suteikia energiją ir reikalingus komponentus tikslinio baltymo sintezės procesų užtikrinimui; (2) vektoriaus, reikalingo genetinės medžiagos pernešimui į ląsteles ir jos palaikymui; (3) raiškos kasetės, turinčios tikslinį baltymą koduojančias sekas bei kitus genetinius

elementus, tokius kaip promotorius ir terminatorius, užtikrinančius baltymų transkripciją ir transliaciją (Fisher et al., 2014).

Baltymų gamybai galima pritakyti daugybę skirtingų organizmų – nuo paprasčiausių bakterijų iki transgeninių gyvūnų (Fisher et al., 2014). Tačiau renkantis tinkamiausią raiškos sistemą yra svarbu atsižvelgti į tikslinio produkto baltymo panaudojimą bei jo specifines savybes, tokias kaip molekulinė masė, potransliacinės modifikacijos ir lokalizacija (Madhavan et al., 2021).

Bakterijos yra vienos iš plačiausiai naudojamų raiškos sistemų heterologinių baltymų gamybai. Iki 2013 m. daugiau nei 66 tūkstančiai skirtingų polipeptidinių grandinių buvo sintetintos pasitelkiant bakterijas kaip raiškos šeiminką, tai sudaro apie 88 % visų heterologinių baltymų, pateiktų baltymų duomenų banke (*angl.* Protein Data Bank) (Francisco J Fernandez & M Cristina Vega, 2013). Bakterijų ekspresijos sistemos dažnai naudojamos dėl jų gebėjimo sparčiai augti minimalios sudėties terpėse bei galimybės su jomis atlikti paprastas genetines manipuliacijas. (Pang et al., 2022). Iki šiol, rekombinantinių baltymų gamybai plačiausiai naudojamos yra gram-neigiamos *Escherichia coli* bakterijos. *E. coli* savybės, tokios kaip greitas dauginimasis, didelė gaminamų baltymų išeiga bei jų lengvas ir nebrangus grynimimas, leidžia šias sistemas lengvai pritaikyti skirtinguose biotechnologiniuose procesuose (Lestari & Novientri, 2021).

Rekombinantinio geno integracija į *E. coli* genomą pasižymi pakankamai dideliu nestabilumu, todėl dažniausia transkripcija yra vykdoma tiesiogiai nuo episominės plazmidės (Francisco J Fernandez & M Cristina Vega, 2013). Plazmidės kopijų skaičius ląstelėje gali svyruoti nuo vieno iki kelių šimtų, priklausomai nuo replikono, esančio plazmidėje, pačios ląstelės, bei jos metabolinės būsenos. Vieni plačiausiai naudojamų replikonų priskiriami ColE1 šeimai. Pastarieji randami populiariausiose vektorių sistemose, tokiose kaip pET (pMB1, 15–60 kopijų ląstelėje) bei pUC (modifikuotas pMB1 variantas, 500–700 kopijų ląstelėje) (Gustafsson et al., 2012; Fisher et al., 2016). Tačiau pernelyg didelis plazmidės kopijų skaičius ir aukštas transkripcijos lygis gali apsunkinti ląstelės dauginimąsi, sukelti medžiagų apykaitos sutrikimus bei turėti negiamos įtakos tikslinio baltymo translacijai. Todėl, priklausomai nuo gaminamo baltymo savybių, bakterinės raiškos sistemos yra nuolat vystomos bei modifikuojamos ir nėra vienos universalios visiems baltymams tinkamos sistemos (Fisher et al., 2016).

Egzistuoja ir daugybė alternatyvių prokariotų raiškos sistemų, kurios yra sėkmingai naudojamos heterologinių baltymų gamybai. Dėl didelio G + C kiekio (60,5 - 66,6%) gram-neigiamos *Pseudomonas* genties bakterijos yra laikomos vienu iš tinkamiausių organizmų gaminant specifines restrikcijos endonukleazes, tokias kaip HsaD (Lack et al., 2008). Įrodyta, kad kitaip nei didžioji dalis kitų bakterinių sistemų, *Pseudomonas fluorescens* ir *Lactococcus lactis* gali efektyviai sekretuoti baltymus į periplazminę ir ekstraląstelinę erdvę bei yra tinkamos didelio tankio fermentacijoms vykdyti (Retallack et al. 2012; Villatoro-Hernandez et al., 2012; Hoffmann et al.,

2021). Pastaraisiais keliais dešimčiais auga susidomėjimas ir gram-teigiamomis bakterijomis. Skirtingai nei *E. coli* bei kitos gram-neigiamos bakterijos, gram-teigiamos negamina endotoksinų – lipopolisicharidų, kurie sukelia imuninį atsaką gyvūnuose ir žmonėse. Todėl dalis šių bakterijų yra priskiriamos GRAS organizmams (Fisher et al., 2016). Šiuo metu *Bacillus* genčiai priklausančios rūšys yra plačiai taikomos hidrolazių, lipazių, proteazių, bakteriofagų DNR polimerazių bei virulentiškumo faktorių sintezei (Pruitt et al., 2012, Francisco J Fernandez & M Cristina Vega, 2013, de Souza et al., 2021).

Vis dėlto, nepaisant visų bakterinės raiškos sistemos suteikiamų privalumų, jos turi ir savus trūkumus. *E. coli* ir kiti prokariotai nevykdo potransliacinių modifikacijų, tokių kaip glikozilinimas, miristolinimas, izoprenilinimas ir amidinimas (Fisher et al., 2016). Nustatyta, kad bakterijų citoplazma pasižymi redukcine aplinka, kuri limituoja disulfidinių ryšių formavimąsi. Taip pat bakterinėse raiškos sistemose dažnai yra pastebimi viduląsteliniai agregatai, vadinami inkluziniais kūnais (*angl.* inclusion bodies), kurie apsunkina tikslinių baltymų gryninimo procesus (Fisher et al., 2016; Lestari & Novientri, 2021).

Kitos, ypač plačiai naudojamos genų raiškos sistemos yra mielių ląstelės. Šios eukariotinės ląstelės, ekstensyviai taikomos rekombinantinių baltymų sintezei nuo 1996 m., kuomet pirmą kartą buvo nusekvenotas visas *Saccharomyces cerevisiae* genomas (Goffeau et al., 1996). Paprastai mielės skirstomos į dvi grupes - nemetilotrofines ir metilotrofines mieles (Lestari & Novientri, 2021). Šiuo metu plačiausiai naudojamos nemetilotrofinės mielės yra *S. cerevisiae*. Joms būdingas platus pH toleravimo diapazonas, vykdomos potransliacinės modifikacijos ir tinkamas baltymų sulankstymas. Šios mielės neturi endotoksinų ir leidžia nedideliais kaštais pasiekti aukštus rekombinantinių baltymų ekspresijos lygius (Baghban et al., 2019; Lestari & Novientri, 2021). Heterologinio baltymo ekspresijai *S. cerevisiae* yra naudojami tiek integraciniai, tiek episominiai vektoriai. Juose taikomi įvairūs konstitutyviniai (dažniausiai iš glikolizinio kelio) arba indukuojami (PGAL1/PGAL10) promotoriai. Episominiai vektoriai yra paremti 2µm *S. cerevisiae* būdingų plazmidžių pagrindu ir leidžia ląstelės branduolyje ekstrachromosomiškai palaikyti iki 50–100 plazmidžių kopijų (Fisher et al., 2016).

Iš metilotrofinių mielių daugiausiai dėmesio susilaukia *Pichia pastoris*. Lyginant su *S. cerevisiae*, šiems organizmams būdingas iki 10 kartų didesnis biomasės prieaugis (iki 120 g sausos masės litre) bei tinkamesnis baltymų N-glikozilinimo lygis, sintetinant aukštesniųjų eukariotų baltymus (Fisher et al., 2016; Tran et al., 2017; Lestari & Novientri, 2021). Šios mielės pasižymi mažais sekretuojamų endogeninių baltymų kiekiais, todėl yra ypač tinkamos užląstelinė rekombinantinių baltymų sintezei (Karbalaei et al., 2020). *P. pastoris* ekspresijos sistemos yra pagrįstos stipriais promotoriais, kurių indukcija dažnai vykdoma metanolio (Gellissen et al., 2005). Naudojant alkoholio oksidazės (AOX1) promotorių galima pasiekti ypač didelę (iki kelių gramų



litre) baltymų ekspresiją. Šiose mielėse yra naudojami integraciniai vektoriai, kurie homologinės rekombinacijos būdu integruojami į chromosominę DNR (Fisher et al., 2016).

Renkantis kurias raiškos sistemas naudoti, taip pat svarbu atkreipti dėmesį ir į naudojamą plazmidę. Nustatyta, kad aukštesnių temperatūrų sukeliama papildoma metabolinė apkrova ir plazmidės nestabilumas nulemia sumažėjusius rekombinantinių baltymų ekspresijos lygius (Pang et al., 2020). Todėl skirtinguose organizmuose yra nuolatos vystomos naujos plazmidinės sistemos, kurios leistų subalansuoti ląstelių augimo procesus su vykdoma tikslių baltymų ekspresija (Silva et al., 2012).

### **Bakterinės lipoksigenazės baltymų ekspresijos sistemos**

Iki šiol nėra atlikta daug tyrimų, siekiant įvykdyti heterologinę bakterijų *lox* raišką. Tačiau per pastaruosius 10 metų šis skaičius pradėjo augti. Dažniausiai rekombinantiniai prokariotinės kilmės LOX baltymai yra sintetinami *E.coli*. Būtent su šia sistema šiuo metu yra pasiektas didžiausias ekspresuoto *P. aeurinosa* LOX (Pa-LOX) kiekis - 264 mg/L (Lu et al., 2020). Tačiau dėl padidintos ląstelių apkrovos ir netinkamo baltymų susilankstymo, LOX baltymai agreguojasi ir sudaro inkliuzinius kūnelius. Nustatyta, kad inkliuziniai kūnai ne tik apsunkina rekombinantinių baltymų gryninimo procesus, bet ir paveikia organizmų fiziologines funkcijas bei dažnai yra toksiški pačioms ląstelėms (Ramon et al., 2014; Mamipour et al., 2017). Todėl nemažai tyrimų su bakterinės kilmės LOX yra orientuoti į baltymų tirpumo didinimą ir technologijų vystymą, siekiant paprastesnio baltymo gryninimo proceso (Pang et al., 2022). Tyrimais įrodyta, kad autoindukcinių terpių naudojimas, padidina Pa-LOX baltymų aktyvumą ir koncentraciją 9-10 kartus, lyginant su standartiniu induktorių, pvz. IPTG, naudojimu (Pang et al., 2020). Nustatyta, kad vykdant kontroliuojamą ląstelių lizę su Tween20, gali iki 33% padidinti ekstraląstelinio LOX baltymo aktyvumą, tuo pačiu nesukeldama sunkumų *E. coli* augimui. Iširta, jog programuojama ląstelių autolizė, naudojant bakteriofagų kilmės genus, tokius kaip ΦX174-E, taip pat gali padidinti tirpaus rekombinantinio baltymo kiekį (Pang et al., 2022).

Buvo atlikti tyrimai ir su kitomis prokariotinėmis lipoksigenazėmis, priklausančioms *Burkholderia thailandensis*, *Nostoc* sp. bei *Myxococcus xanthus* organizmas (An et al., 2015; An et al., 2018). Tačiau šių lipoksigenazių ekspresija buvo vykdyta esant žemesnei nei aplinkos temperatūra (15 °C), o tai gali iškelti pramoninės gamybos kaštus (Pang et al., 2020).

Mažai tyrimų yra atlikta siekiant bakterinės LOX raišką vykdyti eukariotinėse sistemose. Pirmą kartą atlikta Pa-LOX raiška *P. pastoris* sistemoje buvo Hashem et al. (2020) mokslininkų grupės. Šių tyrimų metu naudojant *CATI* ir *AOXI* promotorius pasiekta nedidelė užląstelinio baltymo ekspresija. Jų metu taip pat buvo nustatyta, kad nors glicerolio naudojimas nulėmė mažesnę baltymo koncentraciją, jo aktyvumas buvo iki 4 kartų didesnis, lyginant su raiškos indukcija

naudojant metanolį. Vis dėlto, gautas baltymo kiekis nebuvo pakankamas jų pritaikymui industriniams procesams, todėl yra reikalingi detalesni tyrimai bandant Pa-LOX sintezę optimizuoti mielėse. Tokio pobūdžio tyrimai buvo atlikti ir šio magistrinio darbo metu.

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Prietaisai ir priemonės

Prietaisas/įrankis	Gamintojas
Analitinės svarstyklės	Kern ABJ
Automatinės pipetės	Eppendorf, Gilson, Tipor-V
Baltymų koncentravimo mėgintuvėliai	Amicon® Ultra 30K
Centrifūgos	Eppendorf 5424“ (rotorius r = 84 mm); MIKRO 220R (rotorius r = 98 mm); PRISM R (rotorius r = 84 mm)
Horizontalios elektroforezės kamera	BioRad
Laminarinė traukos spinta	Flow Fast H
Maišyklės	Biosan MMS-3000, IKA MS3 Basic, Thermo Fisher Scientific, Vortex-Genie 2,
Mikrobangų krosnelės	Scarlett, Daewoo
pH-metras	Mettler Toledo
Plokštelė su mikrošulinėliais	TPP Tissue Culture Testplate
Precizinės svarstyklės	Kern E6
Purtyklė	Vibramax 100
Spektrofotometrai	Spekol 2000, Nanodrop 2000
Skenavimo įrenginys	Epson syngene
Termoblokas	Thermo Fisher Scientific
Termocikleris	BioRad iCycler
Termostatai	Binder, Biosan, IKA KS 4000, Stuart Orbital Incubator
Transiliuminatorius	Ultra-Lum
Vandens dejonizatorius	Crystal
Vertikalios elektroforezės sistema	Biometra

### 2.2 Medžiagos

#### 2.2.1 Reagentai:

Gamintojas	Reagentai
Acros Organics	Acto rūgštis 99,5 %, galaktozė, agaras, linoleino rūgštis, kalio jodidas
BioRad laboratories, Inc.	Akrilamidas, „Coomassie Brilliant Blue G-250“ dažas, bromfenolio mėlis
Fisher Bioreagents	Geneticinas
Merck & Co., Inc.	Agarozė, glicerolis (85 %), magnio chlorido heksahidratas, tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris), mielių ekstraktas, natrio acetatas
Reachim	Kalio dihidrofosfatas, sorbitolis
Reanal	Ksilolcianolis
Riedel-de Haën	Izopropanolis
Roth	Peptonas, etidžio bromidas, natrio chloridas, kalcio chloridas, amonio persulfatas (APS), natrio hidroksidas, N,N,N',N'- tetrametiletildiaminas (TEMED), ličio

	chloridas, „Coomassie Brialliant Blue R-250“, natrio dodecilsulfatas (NDS), PCI, CI, 2-merkaptioetanolis
Mavis, UAB	Etanolis 99,8 %
Sigma	Fenilmetilsulfonilo fluoridas (PMSF), gliukozė, kalio acetatas, PEG 3350/8000, TMB, formaldehydas
Spolchim	Kraskmolas
Thermo Scientific	LB terpė, GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ampicilinas, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, HEPES, glicinas, fosforo rūgštis, 6×koncentruotas elektroforetinis dažas, triptonas

### 2.2.2 Vektoriai:

- pFX7 $\alpha$ F-LOX;
- pPIC9K
- BB3aZ\_14\*

### 2.2.3 Mikroorganizmai:

- *Escherichia coli*, kamienas DH5 $\alpha$ ;
- *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffi*), kamienas GS115;
- *Saccharomyces cerevisiae*, kamienai GCN2 ir AH22;

### 2.2.4 Pradmenys:

Pradmuo	Seka
P407	5'- TTGCCGCTGCCGATCACTTCG
P516	5'- AAATTGACGATCAGCTCGACG
P517	5'- ATTTTCGTCGCCTCGTTGC
P529	5'- TCCCCTTTCAAAGTTATTCTCTACTC
P530	5'- TCGGATAAGAAAGCAACACCTG
P593	5'- GGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTACAATGACTCGA TATTCTTTTCACC
P594	5'- GGAACAGTCATGTCTAAGGTTAGATATTGGTGCTCGCCG
P652	5'- CCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGG
P653	5'- GGAGCAAGCTCGTACGAGAAG
P705	5' - CAAGCAGCAGATTACGCGCAG
P706	5' - GAAGCTATGGTGTGTGGTACCGATC
P727	5'- TTGAAGACGCCATGAGATTTCTTCAATTTTACTGC
P728	5'- TTGAAGACCGAAGCTTAGATATTGGTGCTCGCC
P729	5'- CTGTTGAAAACCGCTGGGGTGATCGTCG
P730	5'- AGCGGTTTTCAACAGCCAGTCGACATTCG

### 2.2.5 Fermentai ir buferiniai tirpalai:

- Buferinis tirpalas „Fast Digest” („Thermo Fisher Scientific”);
- Egzonukleazė ExoIII („Thermo Fisher Scientific”);
- DNR ligazė („Thermo Fisher Scientific”);
- DNR polimerazių mišiniai:
  - „DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) („Thermo Fisher Scientific”);
  - „Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (2x) („Thermo Fisher Scientific”);
- Restrikcijos endonukleazės: *BglIII*, *BpiI*, *DpnI*, *EcoRI*, *NotI*, *SacI* („Thermo Fisher Scientific”);

### 2.2.6 Komerciniai DNR paruošimo ir gryninimo rinkiniai:

- „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ („Thermo Fisher Scientific”);
- „GeneJET PCR Purification Kit“ („Thermo Fisher Scientific”);
- „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ („Thermo Fisher Scientific”).

### 2.2.7 DNR elektroforezės tirpalai:

- DNR fragmentų dydžių standartas: „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ („Thermo Fisher Scientific”);
- Elektroforetinis dažas (6×koncentruotas): 0,04 % bromfenolio mėlio, 0,04 % ksilolcianolio, 30 % glicerolio.
- Etidžio bromido tirpalas (1 mg/mL): 0,01 g etidžio bromido tirpinama 10 mL dH<sub>2</sub>O (naudojimui skiedžiamas 1000 kartų);
- 10×TAE buferinis tirpalas: 48,4 g Tris, 3,72 g EDTA, 11,42 mL 99,5 % acto rūgšties, (pH 8,0). Tirpinama 140 mL dH<sub>2</sub>O ir skiedžiama iki 200 mL;

### 2.2.8 Kompetentinių ląstelių ruošimo ir transformavimo temperatūriniu šoku tirpalai:

*Bakterijų (E. coli):*

CaCl<sub>2</sub> tirpalas: 3,33 g CaCl<sub>2</sub>, 0,303 g MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O ir 0,183 g Tris ištirpinama 250 mL dH<sub>2</sub>O. Privedamas pH iki 8,0 ir mišinys skiedžiamas dH<sub>2</sub>O iki 300 mL bendro tūrio.

Tirpalas autoklavuojamas 0,8/30' ir laikomas 4 °C temperatūroje;

- NaCl tirpalas: 1,752 g NaCl, 0,303 g MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O ir 0,183 g Tris ištirpinama 250 mL dH<sub>2</sub>O. Privedamas pH iki 8,0 ir mišinys skiedžiamas dH<sub>2</sub>O iki 300 mL bendro tūrio. Tirpalas autoklavuojamas 0,8/30' ir laikomas 4 °C temperatūroje;

*Mielių (Saccharomyces cerevisiae):*

- Buferinis TE tirpalas: 8,766 g EDTA ir 0,366 g Tris ištirpinama 250 mL dH<sub>2</sub>O. Privedamas pH iki 8,0 ir mišinys skiedžiamas dH<sub>2</sub>O iki 300 mL bendro tūrio. Tirpalas autoklavuojamas 1/20' ir laikomas kambario temperatūroje;
- LiCl tirpalas (0,1 M): 0,848 g LiCl ištirpinama 180 mL TE buferinio ir privedama iki 200 mL bendro tūrio. Tirpalas autoklavuojamas 1/20' ir laikomas kambario temperatūroje;
- PEG 3350 50 % (w/v) tirpalas: 10 g PEG 3350 ištirpinama 15 mL TE buferinio tirpalo ir privedama iki 20 mL bendro tūrio. Tirpalas autoklavuojamas 1/20' ir laikomas kambario temperatūroje;

### 2.2.9 Kompetentinių ląstelių ruošimo ir transformavimo elektroporacija tirpalai:

*Mielių (Pichia pastoris):*

- Ditiotreitolio (DTT) 1M tirpalas: 0,272 g DTT ištirpinama 1,8 mL dH<sub>2</sub>O. Tirpalas laikomas -20 °C temperatūroje;
- HEPES 1M buferinis tirpalas (pH 8,0): 11,92 g HEPES ištirpinama 35 mL dH<sub>2</sub>O, pH privedamas su NaOH. Privedamas pH iki 8,0 ir mišinys skiedžiamas dH<sub>2</sub>O iki 300 mL bendro tūrio.
- Sorbitolio 1M tirpalas: 18,2 g sorbitolio ištirpinama 80 mL dH<sub>2</sub>O ir privedama iki 100 mL bendro tūrio. Tirpalas autoklavuojamas 1/20' ir laikomas 4 °C temperatūroje;

### 2.2.10 Mitybinės terpės:

- LB terpė (agarizuota): 20 g agaro ištirpinama 1 L skystos LB terpės (2,5 %). Autoklavuojama 1/20'.
- LB terpė su ampicilinu (agarizuota): 20 g agaro ištirpinama 1 L skystos LB terpės (2,5 %). Autoklavuojama 1/20'. Antibiotikas įdedamas į atvėsusią (~50 °C temperatūros) terpę. Galutinė koncentracija 100 µg/ml;
- LB terpė su zeocinu (agarizuota): 20 g agaro ištirpinama 1 L skystos LB terpės (2,5 %). Autoklavuojama 1/20'. Antibiotikas įdedamas į atvėsusią (~50 °C temperatūros) terpę. Galutinė koncentracija 50 µg/ml;
- LB terpė (skysta - 2,5 %): 25 g LB terpės ištirpinama 1 L dH<sub>2</sub>O. Autoklavuojama 1/20';
- MD terpė (agarizuota): ruošiama terpė kurios sudedamųjų dalių galutinės koncentracijos yra: 1,34 % YNB,  $4 \times 10^{-5}$  % biotino, 2 % dekstrozės, 1,5 % agaro. Autoklavuojama 0,8/30' ir laikoma kambario temperatūroje;
- YEPD terpė (agarizuota): 6 g agaro ištirpinama 300 mL skystos YEPD terpės. Autoklavuojama 0,8/30' ir laikoma kambario temperatūroje;

- YEED terpė su formaldehidu (agarizuota): 6 g agaro ištirpinama 300 mL skystos YEED terpės. Autoklavuojama 0,8/30'. Į atvėsusią (~50 °C temperatūros) terpę įpilama 60 µl 37 % formaldehido santykiu - 60 µL formaldehido : 100 mL terpės;
- YEED terpė su geneticinu G418 (agarizuota): 6 g agaro ištirpinama 300 mL skystos YEED terpės. Autoklavuojama 0,8/30'. Į atvėsusią (~50 °C temperatūros) terpę įpilama antibiotiku santykiu - 1 mg G418 : 1 ml terpės
- YEED terpė (skysta): 6 g gliukozės, 6 g peptono ir 3 g mielių ekstrakto ištirpinama 300 mL dH<sub>2</sub>O. Autoklavuojama 0,8/30' ir laikoma kambario temperatūroje;
- YEED terpė (skysta) su HEPES buferiu: 6 g gliukozės, 6 g peptono, 3 g mielių ekstrakto ištirpinama 300 mL dH<sub>2</sub>O. Autoklavuojama 0,8/30'. Į 100 mL YEED įpilama 75 mL sterilaus 1 M HEPES (pH 8,0) buferio;
- YEGal terpė (skysta): 30 g galaktozės, 20 g peptono ir 10 g mielių ekstrakto ištirpinama 1 L dH<sub>2</sub>O. Autoklavuojama 0,8/30'.

### 2.2.11 Baltymų elektroforezės tirpalai:

- 10×Koncentruotas baltymų elektroforezės buferinis tirpalas: ruošiami trys tirpalai atskirai – 7,5 g Tris ištirpinama 25 mL dH<sub>2</sub>O; 36 g glicino ištirpinama 190 mL dH<sub>2</sub>O (tirpumui padidinti kaitinama ant magnetinės maišyklės), 2,5 g NDS ištirpinama 10 mL dH<sub>2</sub>O. Paruošti tirpalai sumaišomi ir skiedžiami su dH<sub>2</sub>O iki 250 mL (pH 8,3 – 8,6);
- 2×Elektroforetinio dažo tirpalas: 0,394 g Tris-HCl ištirpinama 30 mL dH<sub>2</sub>O. Privedamas pH iki 6,8 ir mišinys skiedžiamas dH<sub>2</sub>O iki 40 mL bendro tūrio. 11,76 mL glicerolio (85 %), 4 g NDS ir 0,008 g bromfenolio mėlynojo dažo ištirpinama 20 mL Tris-HCl buferiniame tirpale. Privedama iki 40 mL bendro tūrio. Laikoma kambario temperatūroje. Dažą naudojant NDS-PAGE denatūruojančiomis sąlygomis, į 1,9 mL 2×elektroforetinio dažo tirpalo ir įdedama 100 µL 2-merkaptoetanolio. Laikoma -20 °C temperatūroje.
- AA/BAA 30 % tirpalas: 29,2 g akrilamido (AA) ir 0,8 g bis-akrilamido (BAA) ištirpinama 70 mL dH<sub>2</sub>O. Privedama iki 100 mL bendro tūrio ir filtruojama. Laikomas +4 °C temperatūroje, saugomas nuo šviesos;
- Amonio persulfato (APS) 10 % tirpalas: 1 g APS ištirpinama 10 mL dH<sub>2</sub>O. Išpilstoma į 1,5 mL tūrio mėgintuvėlius. Laikomas -20 °C temperatūroje;
- „Coomassie R-250“ dažo tirpalas: 0,62 g dažo ištirpinama 109 mL 99,8 % etanolyje ir įpilama 23 mL 99,5 % acto rūgšties. Su dH<sub>2</sub>O privedama iki 100 mL bendro tūrio ir filtruojama. Laikoma kambario temperatūroje, saugomas nuo šviesos;
- Natrio dodecilsulfato (NDS) 10 % tirpalas: 10 g NDS ištirpinama 80 mL dH<sub>2</sub>O. Su dH<sub>2</sub>O privedama iki 100 mL bendro tūrio. Laikoma kambario temperatūroje;

- Tris-HCl 1 M buferinis tirpalas (pH 6,8): 12,10 g Tris ištirpinama 70 mL dH<sub>2</sub>O. Privedamas pH iki 6,8 ir mišinys skiedžiamas dH<sub>2</sub>O iki 100 mL bendro tūrio. Laikomas +4 °C temperatūroje, saugomas nuo šviesos;
- Tris-HCl 1,5 M buferinis tirpalas (pH 8,8): 18,15 g Tris tirpinama 80 mL dH<sub>2</sub>O. Privedamas pH iki 8,8 ir mišinys skiedžiamas dH<sub>2</sub>O iki 100 mL bendro tūrio. Laikomas +4 °C temperatūroje, saugomas nuo šviesos;

### 2.2.12 Lipoksigenazės funkcinės analizės tyrimo tirpalai:

- Acto rūgštis 75 % tirpalas: į 1507 µL 99,5 % acto rūgštis įpilama 493 µL dH<sub>2</sub>O;
- Agarizuotas krakmolo šulinėlis: 2 g krakmolo ir 1 g agaro ištirpinama 50 mL dH<sub>2</sub>O. Kaitinama mikrobangų krosnelėje, kol mišinys pasidaro homogeniškas. Greitai išpilstomas į mikroploštelės šulinėlius;
- Kalio jodido tirpalas: 2,88 g kalio jodido ištirpinama 2 mL dH<sub>2</sub>O. Tirpalas saugomas nuo šviesos;
- Substratinis tirpalas: į 1166 µL 60 % linoleino rūgštis įpilama 700 µL Tween20 ir skiedžiama su dH<sub>2</sub>O iki 5 mL. Tirpalas papildomas 1 mL 1 M NaOH ir atsargiai sumaišomas. Privedama su dH<sub>2</sub>O iki 25 mL bendro tūrio;

### 2.2.13 Kiti tirpalai:

- Ampicilino (100 mg/mL) tirpalas: 1 g ampicilino ištirpinama 10 mL dH<sub>2</sub>O. Išpilstoma į 1,5 mL tūrio mėgintuvėlius ir laikoma -20 °C temperatūroje;
- HEPES 0,05 M buferinis tirpalas (pH 8,2): 5,96 g ištirpinama 400 mL dH<sub>2</sub>O. Privedamas pH iki 8,2 ir mišinys skiedžiamas dH<sub>2</sub>O iki 500 mL bendro tūrio. Laikomas +4 °C temperatūroje;
- Fenilmetilsulfonilchlorido (PMSF) 100 mM tirpalas: 0,3484 g PMSF ištirpinama 20 mL izopropanolio. Išpilstoma į 1,5 mL tūrio mėgintuvėlius ir laikoma -20 °C temperatūroje;

## 2.3 Metodai

### 2.3.1 DNR koncentracijos nustatymas

Apytikslus DNR koncentracijos nustatymas gali būti vykdomas agaroziniuose geliuose, lyginant DNR mėginį su DNR dydžių standartais („GeneRuler™ DNA Ladder Mix“).

Tikslus DNR koncentracijos nustatymas vykdomas su spektrofotometru “Nanodrop 2000” pagal gamintojo „Thermo Scientific” rekomendacijas.



### **2.3.2 DNR elektroforezė agarozės gelyje**

DNR elektroforezė atliekama 0,7-1,3 % agarozės geliuose. Geliai paruošiami ištirpinus atitinkamas agarozės kiekius buferiniame 1×TAE tirpale. Pakaitinama mikrobangų krosnelėje ir 5 atvėsusį gelį įpilama etidžio bromido tirpalo (galutinė koncentracija – 0,5 µg/mL).

Tikrinami DNR mėginiai sumaišomi su 6× DNR elektroforetiniu dažu santykiu 5:1 (DNR mėginys : dažas). Į suformuotus agarozės gelio šulinėlius leidžiama 5-20 µL paruošto mišinio Mėginių analizavimui į greta esantį šulinėlį įpilama 2,5 µL DNR fragmentų dydžio standarto „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“. Elektroforezė vykdoma horizontalioje elektroforezės kameroje, kuri pripildyta 1×TAE buferinio tirpalo. Naudojamas elektrinio lauko stipris 6-7 V/cm. Geliai analizuojami „Ultra-Lum“ transiliumatoriuje.

Preparatyvinei elektroforezei naudojamas 1 % agarozė, ištirpinta 1×TAE buferiniame tirpale. Elektroforezė vykdoma horizontalioje elektroforezės kameroje, kuri pripildyta 1×TAE buferinio tirpalo. Naudojamas elektrinio lauko stipris 3-5 V/cm.

### **2.3.3 DNR išskyrimas iš agarozės gelio su „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ („Thermo Scientific“)**

Mėginys frakcionuojamas preparatyvine elektroforeze agroziniame gelyje (2.3.3) ir tikslinis fragmentas išpjaunamas iš gelio. Gelis pernašamas į žinomo svorio 1,5 mL mėgintuvėlį ir yra pasveriamas. Tolimesni darbai vykdomi pagal gamintojo „Thermo Scientific“ rekomendacijas.

### **2.3.4 DNR gryninimas naudojant „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ ir „GeneJET PCR Purification Kit“ rinkinius**

Plazmidės DNR gryninimas atliekamas pagal gamintojo „Thermo Scientific“ pateiktas rekomendacijas.

### **2.3.5 DNR išsodinimas etanolinės precipitacijos būdu**

Į DNR mėginį įpilama dvigubas tūris ledinio 96 % etanolio ir inkubuojama -20 °C per naktį. Po nakties vykdomas centrifugavimas 20000 × g 20 min 4 °C temperatūroje. Supernatantas pašalinamas ir užpilama 0,5 mL 70 % etanolio. Centrifuguojama 20000 × g 4 °C temperatūroje 10 min. Supernatantas pašalinamas ir kartojamas plovimas su 70 % etanoliu. Po centrifugavimo etanolis pašalinamas ir mėginiai išdžiovinami 45 °C temperatūroje 1 min. Gauta DNR resuspenduojama 200 – 50 µL H<sub>2</sub>O.

### **2.3.6 Polimerazės grandininė reakcija (PGR)**

Naudojamas „Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (2x)“ mišinys („Thermo Scientific“). Polimerazės grandininė reakcija atliekama pagal gamintojo rekomendacijas. Reakcijos mišinys (20 µL):

Medžiaga	Tūris, $\mu\text{L}$
Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (2x)	10
10 $\mu\text{M}$ pradmuo Nr. 1	1
10 $\mu\text{M}$ pradmuo Nr. 2	1
1 pg – 20 ng plazmidinės DNR	1
H <sub>2</sub> O	7

PGR reakcija vykdoma termocikleryje „iCycler“ (“BioRad”), pagal nustatytą programą:

Etapas	Temperatūra	Laikas	Ciklai
Pradinė denatūracija	98 °C	30 s	1
Denatūracija	98 °C	10 s	30
Pradmenų prilydymas	X °C	30 s	
DNR Prailginimas	72 °C	Y s	
Galutinis prailginimas	72 °C	5 min	1
Palaikymas	4 °C	$\infty$	1

X – temperatūra parenkama pagal pradmenų sudėtį;

Y – laikas parenkamas pagal sekos ilgį ir matricos prigimtį: gDNR – 30 sec/kb, pDNR – 15 sec/kb.

### 2.3.7 Kolonijų PGR (*bakterijų*)

Naudojamas „DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)” mišinys („Thermo Scientific”).

Polimerazės grandininė reakcija atliekama pagal gamintojo rekomendacijas.

Reakcijos mišinys (20  $\mu\text{L}$ ):

Medžiaga	Tūris, $\mu\text{L}$
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	10
10 $\mu\text{M}$ pradmuo Nr. 1	1
10 $\mu\text{M}$ pradmuo Nr. 2	1
H <sub>2</sub> O	8

Steriliu automatinės pipetės antgaliu paimama biomasė iš šviežių kolonijų ir įnešama į paruoštą PGR mišinį. Kolonijos turėtų būti ne senesnės nei 2 dienos. PGR reakcija vykdoma termocikleryje „iCycler“ (“BioRad”), pagal nustatytą programą:

<b>Etapas</b>	<b>Temperatūra</b>	<b>Laikas</b>	<b>Ciklai</b>
Pradinė denatūracija	95 °C	3 min	1
Denatūracija	95 °C	30 s	30
Pradmenų prilydymas	<b>X</b> °C	30 s	
DNR Prailginimas	72 °C	<b>Y</b> s	
Galutinis prailginimas	72 °C	5 min	1
Palaikymas	4 °C	∞	1

X – temperatūra parenkama pagal pradmenų sudėtį;

Y – laikas parenkamas pagal sekos ilgį ir matricos prigimtį: gDNR – 30 sec/kb, pDNR – 15 sec/kb.

### 2.3.8 Kolonijų PGR (*mielių*)

Naudojamas „DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)” mišinys („Thermo Scientific”).

Polimerazės grandininė reakcija atliekama pagal gamintojo rekomendacijas.

Reakcijos mišinys (20 µL):

<b>Medžiaga</b>	<b>Tūris, µL</b>
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	10
10 µM pradmuo Nr. 1	1
10 µM pradmuo Nr. 2	1
H <sub>2</sub> O	7,5

Steriliu automatinės pipetės antgaliu paimama biomasė iš šviežių kolonijų ir įnešama į 50 µL sterilios H<sub>2</sub>O. Ląstelės kaitinamos termobloke 98 °C temperatūroje 5 min ir 0,5 µL ląstelių tirpalo pernešama į reakcijos mišinį. PGR reakcija vykdoma termocikleryje „iCycler“ („BioRad”), pagal nustatytą programą:

<b>Etapas</b>	<b>Temperatūra</b>	<b>Laikas</b>	<b>Ciklai</b>
Pradinė denatūracija	95 °C	3 min	1
Denatūracija	95 °C	30 s	30
Pradmenų prilydymas	<b>X</b> °C	30 s	
DNR Prailginimas	72 °C	<b>Y</b> s	
Galutinis prailginimas	72 °C	5 min	1
Palaikymas	4 °C	∞	1

X – temperatūra parenkama pagal pradmenų sudėtį;

Y – laikas parenkamas pagal sekos ilgį ir matricos prigimtį: gDNR – 30 sec/kb, pDNR – 15 sec/kb.

### 2.3.9 DNR karpymas su restrikcijos endonukleazėmis

DNR restrikcija vykdoma pagal gamintojo „Thermo Scientific” rekomendacijas. Reakcijos mišinys (20-iesiems µL):

Medžiaga	Tūris, $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	15
10× FastDigest® buferinis tirpalas	2
DNR	2 (iki 1 $\mu\text{g}$ )
FastDigest® restrikcijos endonuklezė	1

Priklausomai nuo restrikcijos endonukleazės, reakcijos mišinys inkubuojamas gamintojo rekomenduojamoje temperatūroje. Po inkubacijos vykdoma fermento inaktyvacija pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas.

### 2.3.10 DNR mutagenezė

Mutagenezė vykdyta remiantis mokslinė publikacija (Edelheit et al., 2009). Vykdomas asimetrinis PGR. Dviejuose mėgintuvėlius supilama po vieną prademenį ir vykdomas PGR pagal metodiką (2.3.6). PGR reakcijai naudojama 500 ng plazmidinės DNR. Po įvykusios PGR reakcijos abu mėginiai sumaišomi tarpusavyje ir vykdomas produktų suliejimas temperatūros gradientu:

Temperatūra	Laikas
95 °C	5 min
90 °C	1 min
80 °C	1 min
70 °C	30 s
60 °C	30 s
50 °C	30 s
40 °C	30 s
37 °C	$\infty$

Į mėginius įdedama *DpnI* ir vykdoma restrikcija (2.3.9). 5  $\mu\text{L}$  mišinio naudojama kompetentinių *E.coli* ląstelių transformacijai (2.3.15)

### 2.3.11 Klonavimas “Golden Gate” strategija

Klonavimas vykdytas remiantis mokslinėmis publikacijomis (Prielhofer., 2017; Marillonnet & Grütznert, 2020). Detalūs reakcijos metu naudoti medžiagų kiekiai nurodyti priede (žr. priedas 1). Reakcija vykdoma termocikleryje:

Temperatūra	Laikas	Ciklai
37 °C	2 min	30
16 °C	2 min	
37 °C	10 min	1
55 °C	30 min	
80 °C	10 min	

Į atitinkamus mėginius papildomai įdedama *BpiI* ir *BpiI/ExoIII*. Inkubuojama 15 min 37 °C temperatūroje. Vykdoma inaktyvacija 20 min 65 °C temperatūroje. 5 µL reakcijos mišinio naudojama *E. coli* transformacijai (2.3.15).

### 2.3.12 Kompetentinių *E. coli* ląstelių ruošimas transformacijai temperatūriniu šoku

Šviežios *E. coli* DH5α ląstelės inokuliuojamos 5 mL skystos (2,5 %) LB terpės. Auginama per naktį (16-18 val) 37 °C temperatūroje, purtant 220 aps/min greičiu. Po inkubacijos 50 µL naktinės kultūros persėjama į 5 mL sterilios skystos (2,5 %) LB terpės ir toliau auginama tomis pačiomis sąlygomis 2 val 40 min., kol pasiekiamas 0,4 - 0,6 optinis tankis (bangos ilgis 600 nm).

*E. coli* ląstelės 15 min šaldomos ledo vonelėje ir toliau visos procedūros atliekamos 4 °C temperatūroje. Ląstelės perkeliama į sterilius 2 mL mėgintuvėlius ir centrifuguojamos 30 sec 7000 aps/min. Supernatantas pašalinamas ir centrifugavimas kartojamas, kol yra surenkamos visos ląstelės. Ląstelės švelniai suspenduojamos 1,5 mL atšaldytame NaCl tirpale ir centrifuguojamos 30 sec 7000 aps/min. Supernatantas pašalinamas ir ląstelės suspenduojamos 1,5 mL atšaldytame CaCl<sub>2</sub> tirpale. Centrifuguojama 30 sec 7000 aps/min. Supernatantas pašalinamas, ląstelės suspenduojamos atšaldytame CaCl<sub>2</sub> tirpale ir inkubuojamos ledo voniėje 1 val 30 min. Po inkubacijos centrifuguojama 1 min 7000 aps/min. Supernatantas pašalinamas ir ląstelės suspenduojamos 50 µL atšaldytame CaCl<sub>2</sub> tirpale.

### 2.3.13 Kompetentinių mielių *P. pastoris* ląstelių ruošimas transformacijai elektroporacija

Šviežios *P.pastoris* ląstelės inokuliuojamos 20 mL skystos sterilios YEPD terpės ir auginamos per naktį (16-18 val) 30 °C temperatūroje, purtant 220 aps/min greičiu. 1 mL naktinės kultūros persėjama į 20 mL skystos naujos YEPD terpės auginama 4 val 30 °C temperatūroje, purtant 220 aps/min greičiu. Toliau visos procedūros vykdomos kambario temperatūroje.

Kultūra perkeliama į sterilų konusinį 50 mL mėgintuvėlį. Centrifuguojama 3 min 3000×g. Gautas supernatantas pašalinamas. Ląstelės suspenduojamos 10 mL skystos YEPD su HEPES ir įdedama 250 µL 1M DTT tirpalo. Inkubuojama 15 min 30 °C temperatūroje (nepurtant). Ant ląstelių užpilama 40 mL sterilaus dH<sub>2</sub>O. Centrifuguojama 3 min 3000×g. Supernatantas pašalinamas ir ląstelės perkeliama į ledo vonelę. Ląstelės suspenduojamos 1 mL šalto 1 M sorbitolio tirpalo ir perkeliama į 1,5 mL tūrio mėgintuvėlius. Centrifuguojamos 4 °C temperatūroje

3000xg greičiu. Dalis supernatanto pašalinama ir ląstelės suspenduojamos likusioje supernatanto dalyje.

#### **2.3.14 Kompetentinių mielių *S. cerevisiae* ląstelių ruošimas transformacijai temperatūriniu šoku**

Šviežios *S. cerevisiae* ląstelės inokuliuojamos 5 mL skystos sterilios YEPD terpės ir auginamos per naktį (16-18 val) 30 °C temperatūroje, purtant 220 aps/min greičiu. 1 mL naktinės kultūros persėjama į 5 mL skystos YEPD terpės auginama 3 val 30 °C temperatūroje, purtant 220 aps/min greičiu. Toliau visos procedūros vykdomos kambario temperatūroje.

Kultūra perkeliama į sterilų konusinį 50 mL mėgintuvėlį. Centrifuguojama 3 min 3000xg. Gautas supernatantas pašalinamas, o ląstelės suspenduojamos 10 mL TE buferinio tirpalo. Centrifuguojama 3 min 3000xg. Supernatantas pašalinamas ir ląstelės suspenduojamos 2,5 mL 0,1 M LiCl tirpalo. Inkubuojama 1 val 30 °C temperatūroje be purtymo. Ląstelės centrifuguojamos 3 min 3000xg ir pašalinamas supernatantas. Ląstelės suspenduojamos supernatanto likučiuose.

#### **2.3.15 Kompetentinių *E. coli* ląstelių transformacija temperatūriniu šoku**

Į paruoštos kompetentines ląsteles (2.3.10) įpilama 2-6 µL transformavimo mišinio ir inkubuojama ledo vonelėje 1 val 30 min. Temperatūrinis šokas vykdomas vandens vonelėje 45 s 42 °C temperatūroje. Ląstelės inkubuojamas ledo vonelėje 2 min. Ląstelės užpilamos 1 mL skystos (2,5 %) LB terpės ir inkubuojamos 50 min 37 °C temperatūroje, purtant 220 aps/min greičiu. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 30 s 7000 aps/min greičiu ir išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu/zeocinu. Auginama 37 °C temperatūroje per naktį. Po 18-20 val stebimi transformantai.

#### **2.3.16 Mielių *P. pastoris* kompetentinių ląstelių transformacija elektroporacija**

Į 40 µL kompetentinių *P.pastoris* ląstelių (2.3.13) įdedama 100 ng DNR. Inkubuojama ledo vonelėje 5 min. Mišinys perkiamas į elektroporacijos kiuvetę. Kiuvetė įstatoma į elektroporatorių tarp dviejų elektrodų ir ląstekės elektroporuojamos naudojant 1,5 V įtampą. Ant ląstelių skubiai užpilama šalto 1 mL 1 M sorbitolio tirpalo ir atsargiai supipetuojama. Mišinys perkiamas į 1,5 mL tūrio mėgintuvėlius ir 100 µL transformuotų ląstelių yra užsėjama ant agarizuotos MD terpės. Auginama 72-96 val 30 °C temperatūroje.

#### **2.3.17 Mielių *S. cerevisiae* kompetentinių ląstelių transformacija temperatūriniu šoku**

20 µL paruoštų kompetentinių mielių ląstelių (2.3.13) sumaišomos su 5 µL transformuojamos DNR. Inkubuojama 20 min kambario temperatūroje. Mišinys atsargiai papildomas 40 µL 50% PEG 3350 tirpalo ir inkubuojamas 50 min 30°C temperatūroje. Temperatūrinis šokas vykdomas mėginius inkubuojant vandens vonelėje 35 min 42 °C temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės suspenduojamos TE buferiniu tirpalu. Centrifuguojama

30 sec 7000×g greičiu. Supernatantas pašalinamas, o ląstelės užpilamos 1mL skystos YEPD terpės. Inkubuojama 30 °C temperatūroje per naktį (16-18 val). Ląstelės išsėjamos ant agarizuotos YEPD terpės su formaldehidu ir auginamos 48 val 30 °C temperatūroje.

### **2.3.18 Tikslinių baltymų raiška mielėse *P. pastoris***

*P.pastoris* kolonija steriliai užsėjama į 5 mL skystos BMGY ir auginama per naktį (16-18 val) 30 °C temperatūroje purtant 200 aps/min greičiu. Po auginimo 2 mL ląstelių yra surenkama centrifuguojant 5 min kambario temperatūroje 3000xg greičiu. Supernatantas pašalinamas, o ląstelių biomasė praplaunama BMMY terpe ir vėl centrifuguojama. Supernatantas pašalinamas, o ląstelės resuspenduojamos 20 mL BMMY terpės kolboje ir auginamos 72 val 30 °C temperatūroje, purtant 200 aps/min. greičiu. Kas 24 val terpė yra papildoma metanolio iki 0,5 % koncentracijos. Toliau atliktos tos pačios procedūros kaip su *S. cerevisiae* (2.3.19-2.3.21).

### **2.3.19 Tikslinių baltymų raiška mielėse *S. cerevisiae***

*S. cerevisiae* kolonijos inokuliuojamos 20 mL skystos YEPD terpės su 0,011% FDH. Ląstelės auginamos 24 val 30 °C temperatūroje purtant 200 aps/min greičiu. Kultūra centrifuguojama 5 min 2000 aps/min greičiu kambario temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, o biomasė perkeliama į 20 mL indukcinės YEPGal terpės su 0,011% FDH. Auginama 18 val 30 °C temperatūroje purtant 200 aps/min greičiu. Po inkubacijos ląstelės atšaldomos ledo vonelėje. Ląstelės centrifuguojamos 20 min 13 °C temperatūroje 3000×g greičiu. Gautas supernatantas supilamas į perkiamas į švarų mėgintuvėlį ir įdedama PMSF (galutinė koncentracija 0.1mM). Užląstelinų baltymų raiškos tyrimui supernatantas yra koncentruojamas pagal metodiką 2.3.21. Ląstelių biomasė suspenduojama 30 mL 50 mM HEPES pH 8.2. Centrifuguojama 20 min 13 °C temperatūroje 3000×g greičiu. Supernatantas pašalinamas ir pasveriamos ląstelės. Ląstelės suspenduojamos HEPES buferiniame tirpale pagal santykį 4 mL HEPES : 1 g biomasės. Papildomai įpilama PMSF (galutinė koncentracija 1 mM). Ląstelės toliau ardamos mechaniniu būdu, pagal metodiką 2.3.20.

### **2.3.20 Mielių ardymas mechaniškai (stiklo rutuliukais)**

Į 2 mL tūrio mėgintuvėlius įpilama 0,5 mL stiklo rutuliukų ir 1 mL ląstelių suspensijos. Ląstelių ardymas vykdomas ciklais: 30 s inkubuojant ledo vonelėje ir 30 s purtant maišyklė-mikseriu „Vortex-Genie 2“. Ardymas vykdomas 8 min. Skystis esantis virš stiklo rutuliukų automatinės pipetės pagalba perkiamas į naujus mėgintuvėlius ir centrifuguojamas 20 min 4 °C temperatūroje 13500 aps/min greičiu. Tirpi frakcija perkeliama į švarų mėgintuvėlį, o netirpi frakcija 2 kartus plaunama jas suspenduojant 1 mL 50 mM HEPES buferiniame tirpale. Po plovimų, netirpi frakcija suspenduojama 1 mL 50 mM HEPES buferiniame tirpale. Papildomai įpilama PMSF (galutinė koncentracija 1 mM).

### 2.3.21 Supernatanto baltymų koncentravimas

Supernatanto baltymų koncentravimas vykdomas pagal koncentravimo mėgintuvėlių „Amicon® Ultra 30K“ gamintojo „Merck Millipore“ rekomendacijas.

### 2.3.22 Lipoksigenazių funkcinės analizės tyrimas agarizuoto krakmolo šulinėliuose

Suformuotame agarizuoto krakmolo šulinėliuje (2.2.12) sumaišoma 100 µL substratinio tirpalo (2.2.12) su 100 µL baltymų frakcijos. Inkubuojama 15 min 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos įpilama 100 µL KI tirpalo ir 75 µL 75 % acto rūgšties. Stebimas krakmolo šulinėlių spalvos pokytis. Visi naudoti tirpalai turi būti švieži.

### 2.3.23 NDS-PAGE baltymų elektroforezė

Į paruoštą baltymų elektroforezės gelio rėmelį supilamas paruoštas 12 % skiriamasis gelis (pateiktas tūris vienam geliui):

Medžiaga	Tūris, µL
30 % AA/BAA	2000
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1250
10 % NDS	50
dH <sub>2</sub> O	1585
10 % APS	25
TEMED	2,5

Polimerizacijos reakcija inicijuojantis TEMED įpilamas paskutinis, todėl mišinys yra gerai ir greitai sumaišomas, ir iš karto pilamas į paruoštą gelio rėmelį (apie ¾ viso rėmelio tūrio). Atsargiai užpilama dH<sub>2</sub>O ant skiriamąjo gelio. Gelis paliekamas stingti 40 min. Tuomet yra nupilamas vanduo ir gaminamas 4 % koncentruojamasis gelis (pateiktas tūris vienam geliui):

Medžiaga	Tūris, µL
30 % AA/BAA	335
1,5 M Tris-HCl pH 6,8	625
10 % NDS	25
dH <sub>2</sub> O	1500
10 % APS	12,5
TEMED	2,5

Įdėjus TEMED mišinys yra gerai ir greitai sumaišomas, ir užpilamas ant 12 % skiriamąjo gelio. Įstatomos šulinėlius formuojančios šukutės ir gelis paliekamas stingti 20 min. Po įvykusios polimerizacijos išimamos šukutės ir rėmelis su geliu įstatomi į vertikalią elektroforezės sistemą. Talpa užpildoma 1×elektroforezės buferiniu tirpalu.



Analizuojami baltymų mėginiai paruošiami su 2× koncentruotu elektroforetiniu dažu papildytu 5% 2-merkaptoetanoliu (santykiu 1:1). Inkubuojama 5 min 95 °C temperatūroje. Į gelio šulinėlius suleidžiama 5-20 μL mėginių ir 4 μL molekulinų masių standarto. Elektroforezė vykdoma esant 150 V įtampai. Po elektroforezės geliai perkeliama į indelius ir plaunami su dH<sub>2</sub>O. Po plovimo geliai dažomi su „Coomasie Blue R-250“ tirpalu, juos purtant 30 min uždaruose indeliuose (geliai saugomi nuo šviesos). Vėliau geliai blukinami 2-3 val. juos purtant dH<sub>2</sub>O .

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

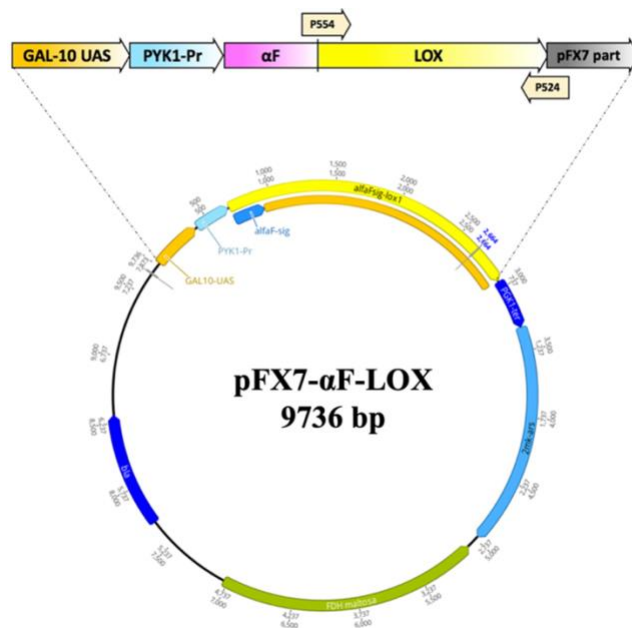
Šiame darbe aptariami rezultatai gauti vykdant *lox* geno klonavimą bei raišką skirtingose metilotrofinėse ir nemetilotrofinėse mielių sistemose. Remiantis skirtingomis molekulinio klonavimo strategijomis buvo sukontruotos kasetės, turinčios bakterinės lipoksigenazės geną sujungtą su signaline peptidine seka. Darbo metu atlikti tyrimai su skirtingo tipo vektoriais – episominiais (pFX7) ir integraciniais (pPIC9K, BB3). Visuose eksperimentuose naudojamas gram-neigiamos *Pseudomonas aeruginosa* bakterijos *lox* genas, kuris buvo identifikuotas ir iškirtas Mildos Šulčienės (BTI TBS).

#### 3.1 LOX raiškos tyrimai nemetilotrofinės *S. cerevisiae* mielių sistemose.

Pirminiai lipoksigenazės raiškos tyrimai atlikti bakalaurnio darbo metu atskleidė, kad baltymo sintezė *S. cerevisiae* mielėse vyksta neefektyviai (Venckus Ž., 2018). Literatūroje randama daug pavydžių, kuriuose kalbama apie skirtingų mutantinių kamienų įtaką baltymo raiškai ir aktyvumui (Gast et al., 2022; Rosano et al., 2019). Todėl magistrinio darbo metu buvo nuspręsta išbandyti kitus *S. cerevisiae* priklausančius kamienus lipoksigenazės baltymo sintezei.

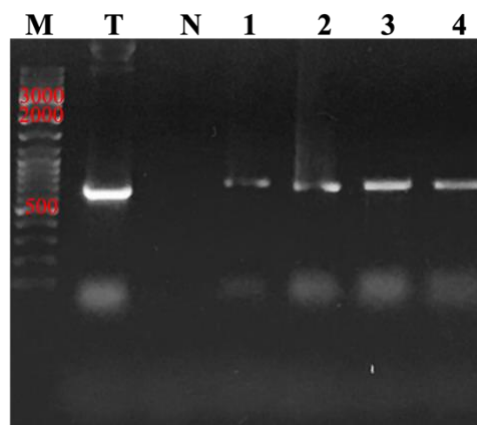
#### LOX ekspresijos tyrimai skirtinguose *S. cerevisiae* kamieniuose

Darbui su *S. cerevisiae* mielėmis naudotas šaudyklis (*angl. shuttle*) daugiakopijinis episominis pFX7- $\alpha$ F-LOX vektorius, kurio konstravimo darbai buvo atlikti bakalaurnio metu (Venckus Ž., 2018) (**3.1 pav.**). Šiame konstrukte yra lokalizuotos dvi *ori* sekos, skirtos plazmidės replikacijai bakterijų ir mielių sistemose. Taip pat randami du selektyvumo žymenys, kurie leidžia vykdyti klonų atranką skirtinguose organizmuose: 1)  $\beta$ -laktamazę koduojantis genas (*bla*), skirtas ampicilino atsparumui *E. coli* ir 2) formaldehidrogenazę koduojantis genas (*FDH1*), skirtas formaldehido atsparumui mielėse. Tikslinio geno raiškai yra naudojamas *S. cerevisiae* būdingas piruvatkinazės promotorius - PYK1, kurio indukcija vykdoma galaktoze. Siekiant palengvinti baltymų gryninimo procesus, prie *lox* geno buvo prijungtas alfa faktoriaus ( $\alpha$ F) signalinis peptidas, kuris nukreipia tikslinį baltymą už ląstelės ribų.



**3.1 pav.** pFX7- $\alpha$ F-LOX konstruktas *lox* geno raiškai *S. cerevisiae* mielėse

Ekperimentams buvo pasirinkti trys mielių kamieniai: 1) **AH22** (a *leu2-3 leu2-112 his4-519 can1*) 2) **214 $\Delta$ pep4** (a *ura3 leu2 his3  $\Delta$ pep4*) ir 3) **GCN2** (laukinis genotipas). Kompetentinės mielių ląstelės (2.3.14) buvo transformuotos temperatūrinium šoku (2.3.17). Transformatai buvo gauti tik su AH22 ir GCN2 kamienais. Teigiamų klonų pirminė atranka vykdyta ant agarizuotos YEPD terpės papildytos 0,022% formaldehidu (FHD). Išaugę klonai analizuoti kolonijų PGR (2.3.8) su *lox* genui specifiniais P516/P529 pradmenimis (**3.2 pav.**). Lauktas 694 bp fragmentas buvo aptiktas visuose tikrintuose transformantuose.

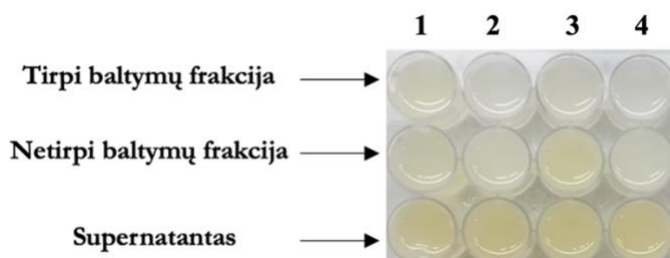


**3.2 pav.** Mielių transformantų analizė kolonijų PGR metodu. **M** – DNR dydžio standartas; **T** – teigiama kontrolė; **N** – neigiama kontrolė; **1-2 takeliai** – GCN2 transformantai; **3-4 takeliai** – AH22 transformantai. Naudoti pradmenys P516/P529. Teorinis lauktas dydis 694 bp

Su pasirinktais klonais (**Nr. 2** ir **Nr. 3**) buvo atlikti pirminiai rekombinantinės lipoksigenazės raiškos tyrimai (2.3.19). Transformantai auginti skystoje YEPD terpėje su 0,011% FDH (24 val 30 °C temperatūroje, purtant 220 aps/min greičiu. Po inkubacijos buvo inicijuojama tikslinio baltymo

syntezė, ląsteles perkialiant į indukcinę, galaktoze praturtintą, terpę. Dėl konstrukte naudoto  $\alpha$  faktoriaus, buvo tikėtasi, kad tikslinis baltymas bus sekretuojamas už ląstelės ribų. Po kultivavimo, nuo ląstelių buvo atskirtas ir su 30 kDa pralaidumo membrana sukonzentruotas supernatantas (2.3.21), o likusi biomasė - suardyta stiklo rutuliukais, atskiriant tirpias ir netirpias baltymų frakcijas (2.3.20).

Gauti mėginiai analizuoti atliekant LOX funkcinės analizės tyrimą agarizuoto krakmolo šulinėliuose (2.3.22). Šis metodas yra paremtas LOX reakcijos produktų vykdoma jodido jonų oksidacija, kurie reaguodami su krakmolu sukelia spalvos pakitimus. Tikrinant skirtingas frakcijas labai nedidelis aktyvumas buvo užfiksuotas tik GCN2 kamieno netirpioje frakcijoje, tačiau užląstelinių lipoksigenazės baltymų aktyvumo nebuvo pastebėta (**3.3 pav.**). Atlikus papildomą baltymų sintezės analizę NDS-PAGE metodu, nei viename mėginyje nebuvo rastas lipoksigenazės baltymas (rezultatai nepateikti). Manoma, kad *lox* raiška mielėse nevyko arba buvo sintetinami itin maži rekombinantinio baltymo kiekiai.



**3.3 pav.** LOX funkcinės analizės tyrimas krakmolo šulinėliuose. **1** – pFX7- $\alpha$ F-LOX iš AH22; **2** – pFX7 iš AH22; **3** – pFX7- $\alpha$ F-LOX iš GCN2; **4** – pFX7 iš GCN2

Šie tyrimai sutapo su bakalauro darbu metu gautais rezultatais. Šio tyrimo metu nustatyta, kad skirtingų mutantinių kamienų panaudojimas neturėjo reikšmingos įtakos lipoksigenazės raiškai. Vis dėlto, yra reikalingi detalesni tyrimai, siekiant išsiaiškinti neveiksmingo konstrukto priežastį.

## 3.2 Lipoksigenazės klonavimas ir raiškos tyrimai metilotrofinėse *Pichia pastoris*

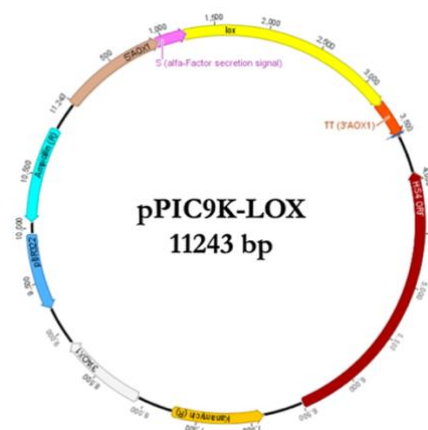
Įvertinus ir nustačius nepakankamą *lox* geno raišką ir nedidelį baltymo aktyvumą *S. cerevisiae* bei *K. lactis* organizmuose, toliau heterologinės lipoksigenazės raiškai buvo nupręsta išbandyti kitą mielių sistemą – *P. pastoris*. Dėl šių metilotrofinių mielių išskirtinių savybių, pastarąjį dešimtmetį jų panaudojimas sparčiai auga. *P. pastoris* sistemos privalumai yra paprastos kultivavimo sąlygos, greitas dauginimasis, atliekamos potransliacinės modifikacijos bei gebėjimas panaudoti C-1 junginius (pvz., metanolį) energijai gauti. Tyrimais įrodyta, kad rekombinantinio baltymo sekrecija į kultūros supernatantą yra veiksminga, o pačiai mieliai priklausančių natyvių (endogeninių) baltymų sekrecijos lygis yra žemas. Tai palengvina tikslinio baltymo gryninimą (Hashem et al., 2020, Karbalaei et al., 2020, Lestari & Novientri, 2021).

Šio darbo metu sukurtos dvi skirtingos konstrukcijos turinčios lipoksigenazės geną. Pirmojoje sistemoje buvo naudojamas pPIC9K vektorius su įterptu *lox* genu (pPIC9K-LOX). Konstruktas tyrimo metu surinktas naudojant klonavimo strategiją, paremtą homologine rekombinacija. Šis molekulinio klonavimo būdas, nenaudojant papildomų fermentų (pvz., ligazių ir restrikcijos endonukleazių) leidžia greitai ir paprastai atlikti tikslinio geno įterpimą į daugybinių klonavimo vietą (*angl.* Multiple Clonign Site). Vietoje to, plazmidės ir tikslinio geno tarpusavio ligavimui yra pritaikoma *E. coli* (Bubeck et al., 1993).

Antrojo konstrukto suformavimui pasitelkta „GoldenPiCS“ molekulinio klonavimo sistema, paremta „Golden Gate“ principu. Vietoje indukuojamo AOX1 promotoriaus, naudojamo pirmajame pPIC9K-LOX konstrukte, šioje sistemoje buvo integruotas konstitutyvus GAP promotorius, kuris leistu atsikratyti toksiško metanolio panaudojimo.

### 3.2.1 LOX tyrimai su integraciniu pPIC9K raiškos vektoriumi

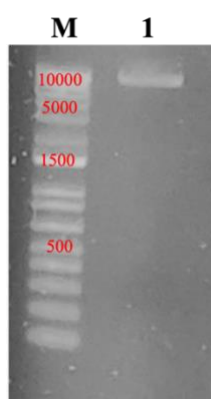
Šio tyrimo metu buvo pasirinktas šaudyklinis (*angl.* shuttle) pPIC9K vektorius, kuris mielėse leidžia vykdyti stabilią tikslinio geno integraciją į genomą (**3.4 pav.**). Šis vektorius yra sukurtas populiarios pBR322 plazmidės pagrindu ir turi *ori* seką, svarbią plazmidės kopijų skaičiaus pagausinimui bakterijose. Vektoriuje lokalizuotas *bla* genas leidžiantis vykdyti teigiamų klonų atranką *E. coli*, pagal atsparumą ampicilinui. Atrankai yra skirti du žymenys – *kanR* ir *his*. Šiame darbe buvo naudojamas *his*- mutantinis kamienas GS115, kurio išgyvenamumui yra svarbus išorinis histidino aminorūgščių šaltinis. pPIC9K vektoriuje koduojamas *his* genas, leidžia vykdyti pirminę mielių transformantų atranką, juos auginant ant minimalios MD terpės, kurioje nėra aminorūgščių. Tokiu atveju užauga tik klonai savyje turintys pPIC9K plazmidę. Tuo tarpu *kanR* genas, koduojantis aminoglikozido 3'-fosfotransferazę, užtikrina tolimesnę mielių klonų atranką, panaudojant geneticiną. Vienas išskirtinių šio vektoriaus bruožų yra koduojamas alfa (αF) signalinis peptidas, kuris užtikrina tikslinio baltymo sekreciją į užląstelinę terpę. Pati baltymo raiška yra inicijuojama priklausomai nuo metanolio indukuojamo alkoholoksidazės promotoriaus – AOX1.



**3.4 pav.** pPIC9K-LOX integracinis vektorius *lox* geno raiškai *P. pastoris* mielėse

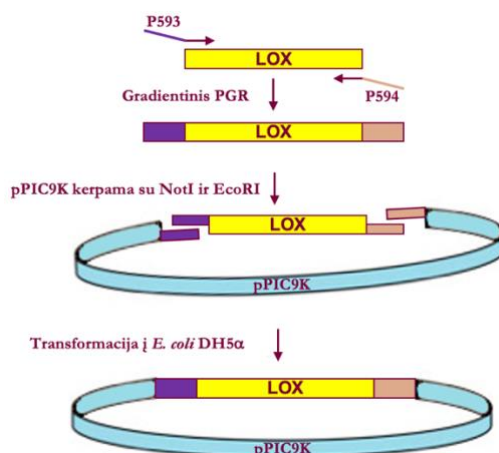
## LOX geno klonavimas

Vektoriaus pagausinimo darbai buvo atliekami *E. coli*. Iš pradžių pPIC9K buvo transfekuojamas į *E. coli* DH5 $\alpha$  kamieną temperatūrinio šoko būdu (2.3.15). Ląstelės užsėtos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu ir augintos per naktį (16-18 val) 37 °C temperatūroje. Ampicilino sukeltas selektyvinis spaudimas užtikrina tegiamų klonų atranką, turinčių transfekuotą pPIC9K vektorių, todėl tolimesnė transformantų atranka nėra būtina. Siekiant plazmidę išskirti, klonai persėti į 5 mL skystos LB terpės su ampicilinu ir auginti per naktį (16-18 val) 37 °C temperatūroje, purtant 220 aps/min greičiu. pPIC9K gryninimo darbai buvo atlikti su komerciniu *GeneJET<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit* rinkiniu (2.3.4). Tikslinio geno klonavimui, vektorius buvo linearizuotas su dvejomis *NotI* ir *EcoRI* restrikcijos endonukleazėmis (2.3.9), siekiant išvengti plazmidės recirkuliarizacijos. Šio tyrimo metu buvo pasirinktos *FastDigest<sup>TM</sup>* tipo restriktažės, leidžiantis reakciją įvykdyti naudojant vieną universalų buferinį tirpalą, tokiu būdu išvengiant papildomų gryninimo etapų. Gauta restrikuota DNR buvo analizuojama DNR elektroforezės metodu (2.3.2) (**3.5 pav.**). Gelyje buvo matoma, kad visos plazmidės buvo atkliaustos ir yra tinkamos tolimesniems klonavimo darbams.



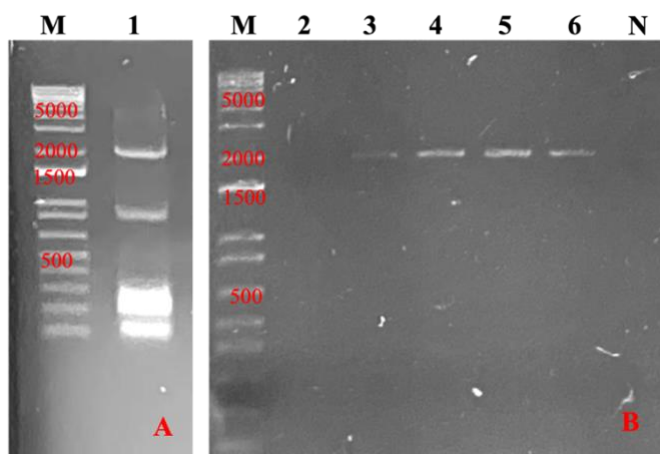
**3.5 pav.** Linearizuota pPIC9K plazmidė. **M** – DNR dydžio standartas; **1** – pPIC9K plazmidė

Tikslinio geno klonavimui į pPIC9K buvo pasirinkta metodika paremta homologine rekombinacija, kurios metu yra naudojami *E. coli* molekuliniai mechanizmai konstrukto sutvarkymui (Bubeck et al., 1993). Lipoksigenazės geno amplifikacijai atlikti buvo naudoti specifiniai P593 ir P594 pradmenys (2.3.6). Šiais pradmenimis buvo pridėtos papildomos 20-25 bp ilgio sekos abiejuose geno galuose, kurios yra komplementarios paruošto pPIC9K vektoriaus galams MCS. Pastarosios užtikrina homologinę rekombinaciją tarp tikslinio geno ir vektoriaus (**3.6 pav.**). Literatūroje pateikiama daugybė pavyzdžių, kuriose nustatyta, kad 15-20 bp ilgio homologija tarp sekų užtikrina sėkmingą rekombinaciją (Jacobus ir Gross, 2015, Watson ir García-Nafria, 2019). Kaip matrica buvo naudota pFX7-  $\alpha$ F-LOX plazmidė, sukonstruota bakalaurinio darbo metu (BTI TBS).



**3.6 pav.** LOX klonavimo homologne rekombinacija į pPIC9K vektorių schema.

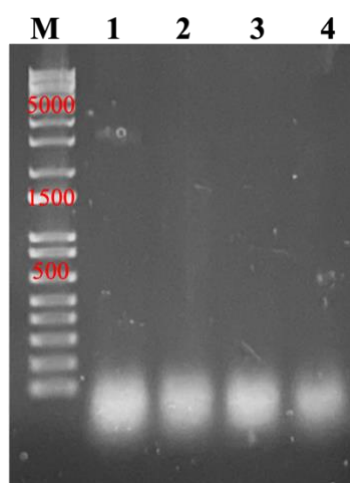
Lipoksigenazės amplifikacija atlikta PGR metodu (2.3.6) ir rezultatai analizuoti DNR agarozės gelyje. Pastebėta, kad nors *lox* pagausinimas įvyko sėkmingai, susidarė didelis kiekis nespecifinių fragmentų (**3.7 pav. A**). Manoma, kad taip atsitiko dėl didelio pradmenų ilgio, kurie pasižymi aukšta tikimybe sudaryti antrines struktūras. Siekiant išvengti pradmenų tarpusavio susijungimų bei jų prisijungimo netinkamose vietose, buvo išbandytas gradientinis PGR metodas (2.3.6). Jo metu naudota 12,2 °C laipsnių didesnė pradmenų lydymosi temperatūra (72 °C) nei siūloma teorinė (59,8 °C). Gauti produktai analizuoti DNR elektroforezės gelyje (**3.7 pav. B**). Nustatyta, kad tinkamiausia pradmenų lydymosi temperatūra buvo tarp 63,5 – 72,0 °C (mėginys Nr.2-5), o didžiausias efektyvumas pastebėtas 69,3 °C temperatūroje (mėginys Nr.4), kuri yra beveik 10 °C didesnė už teorinę. Remiantis panašiais tyrimais moksliniuose straipsniuose, nustatyta, kad pradmenų lydymosi temperatūros padidinimas, tam tikrais atvejais net iki 12 °C, padidina pradmenų prisijungimo specifiškumą (Lorenz, 2012). Gauti pavykę produktai buvo sumaišyti tarpusavyje ir išvalyti su *GeneJET PCR Purification Kit* rinkiniu (2.3.4). DNR koncentracija išmatuota “NanoDrop 2000” spektrofotometru (2.3.1).



**3.7 pav.** Tikslinio *lox* geno DNR pagausinimas: (A) – klasikinis PGR; (B) – gradientinis PGR. M – DNR dydžio standartas; N – neigiama kontrolė; 1 –  $T_m$  59,8 °C; 2 –  $T_m$  58 °C; 3 –  $T_m$  63,5 °C; 4 –  $T_m$  66,8 °C; 5 –  $T_m$  69,3 °C; 6 –  $T_m$  72 °C. Naudojami pradmenys P593/P594.

Homologinei rekombinacijai vykdyti buvo paruoštas reakcijos mišinys su linearizuotu pPIC9K vektoriumi ir specifinius prailgintus galus turinčiu *lox* genu. Renkantis tinkamą naudojamo vektoriaus ir intarpo santykį, literatūroje nepateikta vieno optimalaus sprendimo. Plačiausi tyrimuose naudojami santykiai yra 1:2 ir 1:3 (vektorius : genas) (Jacobus & Gross, 2015; Watson & García-Nafria, 2019). Tačiau nustatyta ir atveju, kuomet aukštesnis 1:5 santykis nulemia didesnį rekombinantinių klonų skaičių (Kostylev et al., 2015).

Šio eksperimento metu ligavimui naudotas 1:3 (vektorius : genas) molinis santykis. Mišinys perneštas į paruoštas *E. coli* kompetentinės ląstelės (2.3.12) ir vykdoma transformacija temperatūriniu šoku (2.3.15). Pirminė rekombinantinių klonų atranka buvo vykdoma ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu (galutinė koncentracija 100 µg/ml), kuris palaiko selektyvinį spaudimą. Po inkubacijos buvo aptikti tik 4 transformantai, kurie toliau patikrinti kolonijų PGR metodu (2.3.7). Šis būdas leidžia tiesiogiai patikrinti didelį klonų skaičių, išvengiant pavienių kolonijų ardymo. PGR vykdytas su P516/P652 pradmenimis, kurie jungiasi prie *lox* geno ir AOX1 promotoriaus. Lauktas teorinis 756 bp dydžio fragmentas nebuvo pastebėtas nei viename iš 4 tirtų klonų. Tai rodo, kad transformavosi tuščios pPIC9K plazmidės (**3.8 pav.**). Manoma, kad taip galėjo nutikti dėl nepilnai įvykusios plazmidžių restrikcijos, kurios metu dalis plazmidžių liko žiedinės struktūros.

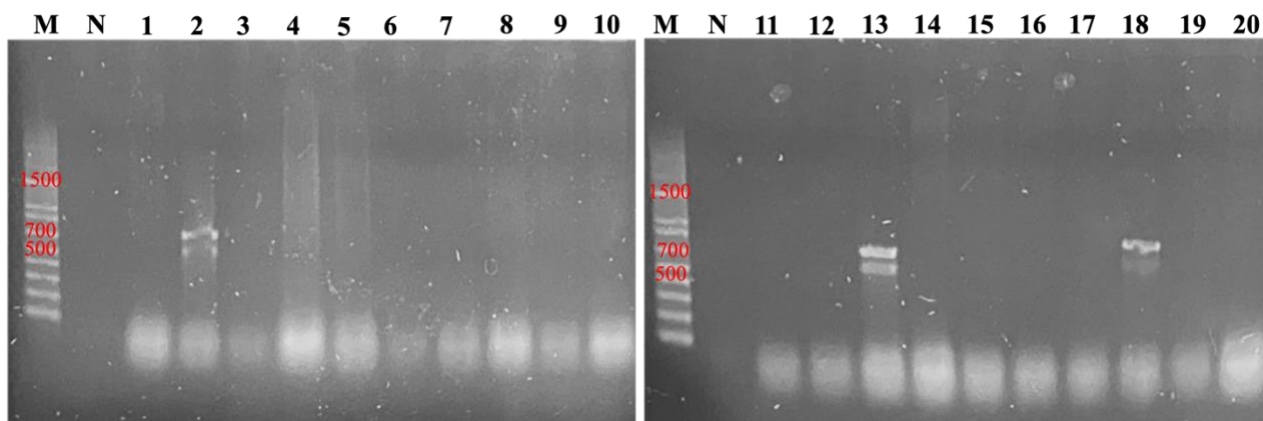


**3.8 pav.** *E. coli* transformantų analizė kolonijų PGR metodu su pradmenimis P516/P652. **M** – DNR dydžio standartas; **1-4 takeliai** – pPIC9K-LOX transformantai. Naudoti pradmenys P516/P652. Teorinis lauktas dydis 756 bp

Vis dėlto, mažas transformantų skaičius rodo, kad homologinė rekombinacija įvyko neefektyviai. To priežastis galėjo būti nepakankamai švirių naudotų konstrukų panaudojimas, kuriuose gryninimo metu galimai likę etanolio ar kiti, DNR gryninimo metu naudotų tirpalų likučiai, slopino reakciją. Todėl mėginiai buvo papildomai išvalyti, vykdant DNR fragmentų etanolinę precipitaciją (*išsodinimą*) (2.3.5). Su gautais produktais įvykdytas pakartotinis klonavimas ir *E. coli* transformacija (2.3.15). Pastebėtas iki 20 kartų didesnis išaugusių klonų skaičius lyginant

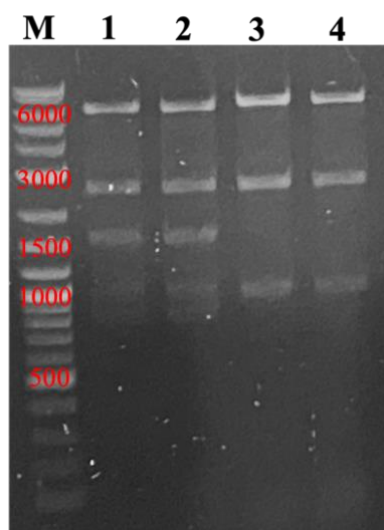


su pirmajame etape vykdyta reakcija. Tačiau iš 20-ies patikrintų transformantų, tik 3-juose buvo rastas lipoksigenazės genas (**3.9 pav.** mėginys **Nr. 2**, **Nr. 13**, **Nr. 18**).



**3.9 pav.** *E. coli* transformantų analizė kolonijų PGR metodu. **M** – DNR dydžio standartas; **N** – neigiama kontrolė; **1-20 takeliai** – pPIC9K-LOX transformantai. Naudoti pradmenys P516/P652. Teorinis lauktas dydis 756 bp

Nepaisant to, juose buvo matomas ir netikėtas apie 500 bp dydžio fragmentas, kuris galimai galėjo atsirasti dėl pradmenų nespecificos. Siekiant įsitikinti ar homologinės rekombinacijos metu tikslinis *lox* genas įstatytas teisingai, plazmidės iš klonų **Nr. 2**, **Nr. 13**, **Nr. 18** buvo išgrynintos ir įvykdyta jų restrikcinė analizė (2.3.9) (**3.10 pav.**).



**3.10 pav.** Plazmidžių, išskirtų iš *E. coli* transformantų, restrikcinė analizė su *Bgl*III ir *Bam*HI restrikcijos endonukleazėmis. **M** – DNR dydžio standartas; **1** – klonas Nr.2; **2** – klonas Nr. **13**; **3** – klonas Nr. **18**; **4** – kontrolinis pPIC9K

Teoriniai laukti dydžiai:

***Bgl*III ir *Bam*HI**

pPIC9K: 5936 / 2403 / 937

pPIC9K-LOX: 5647 / 2403 / 1488 / 937 / 768

Atlikus analizę agaroziniame gelyje, tinkamas plazmidės sukarpymas pastebėtas tik mėginiuose **Nr. 2** ir **13**. Šie konstruktai buvo sekvenuojami su parinktais P652/P653 pradmenimis.

Sekvenavimas atliktas VU GMC DNR sekoskaitos centre. Nustačius, jog geno klonavimas įvyko be klaidų, tolimesniems darbams atlikti buvo pasirinktas vienas konstruktas – **Nr. 13**.

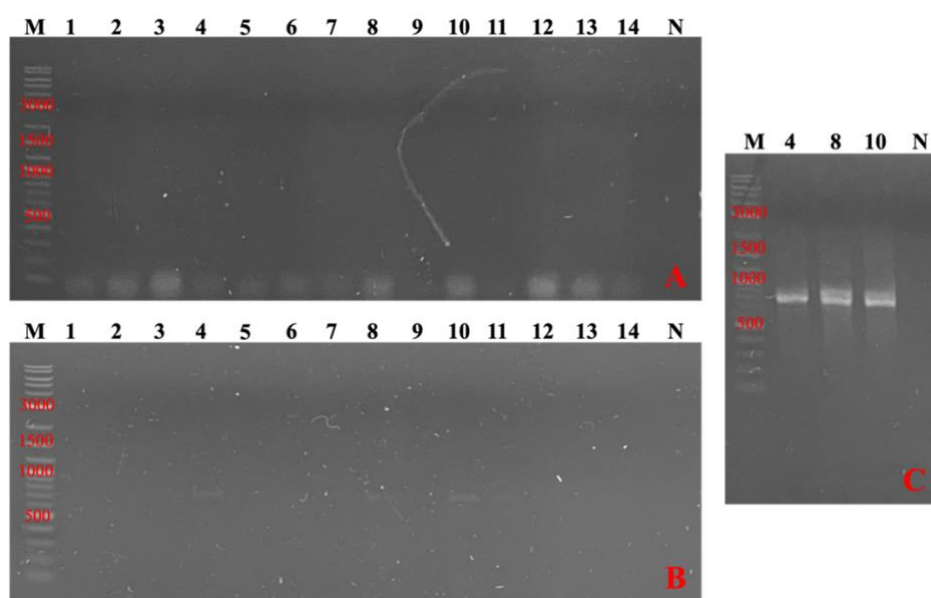
### **LOX geno raiška *P. pastoris* mielių sistemoje**

Lipoksigenazės geno integracija į *P. pastoris* genomą buvo vykdoma naudojant pPIC9K vektorių. Buvo atliekama geno integracija į du skirtingus lokusus mielių genome. Vektoriaus buvo liniarizuojamas restrikcijos endonukleazėmis skirtingose vietose, taip sukuriant skirtingas homologines sritis. Pirmoje reakcijoje naudotas *SacI* fermentas, dėl kurios kasetės integracija vyksta natyvaus AOX1 geno 5' regione. Tokiu būdu susidaro His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup> fenotipą turinčios mutanantinės mielės. Tuo tarpu, antroje reakcijoje buvo naudojamas *BglIII* - integracija vyksta pačiame AOX1 lokuse, kas nulemia His<sup>+</sup> Mut<sup>S</sup> arba His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup> klonų susiformavimą. Mut<sup>S</sup> fenotipą (*angl.* Methanol utilization slow) turintys mutantai, dėl sumažėjusio alkoholio oksidazės aktyvumo, pasižymi lėtesniu augimu terpeje su metanoliu. Literatūroje nurodoma, kad yra naudinga vienu metu išbandyti ir Mut<sup>+</sup>, ir Mut<sup>S</sup> klonus, nes priklausomai nuo siekiamo gaminti tikslinio baltymo, raiškos efektyvumas gali varijuoti („Pichia expression kit. A manual for methods for expression of recombinant proteins in Pichia pastoris“ 2014, Invitrogen).

Linearizuotos plazmidės buvo išgrynintos ir išmatuotos jų koncentracijos. Paruoštos kompetentinės *P. pastoris* ląstelės (2.3.13) sumaišytos su 100 ng konstrukto ir vykdyta transformacija elektroporacijos būdu (2.3.16). Šis metodas yra ypač greitas ir pasižymi ženkliai didesniu efektyvumu, lyginant su tradicine temperatūriniu šoku paremta transformacija (Froger & Hall, 2007; Kant et al., 2019). Pirmininė His<sup>+</sup> klonų atranka vykdyta ant agarizuotos MD terpės. Ląstelės augintos 3 dienas 30 °C temperatūroje ir toliau užaugę klonai persėti ant agarizuotos YEPD terpės, kurioje selektyvus spaudimas yra palaikomas genocidiniu. Siekiant palyginti genomuose integravusių geno kopijų skaičių tarp transformantų, buvo naudotos skirtingos genocidino koncentracijos (0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL). Pastebėta, kad ląstelės transformuotos su pPIC9K-LOX-*BglIII* konstruktais neaugo net ant mažiausią antibiotiko koncentraciją turinčios YEPD terpės. Galimai taip nutiko dėl nedidelio integravusių geno kopijų skaičiaus, kuris nulėmė pakankamą histidino sintezės lygį ląstelių augimui, tačiau per mažą aminoglikozido 3'-fosfotransferazę gamybą atspurumui prieš genocidiną užtikrinti. Tuo tarpu, transformantai paruošti su pPIC9K-LOX-*SacI* konstruktais augo sėkmingai terpeje praturtintoje genocidinu. Taip pat buvo atrinkti ir pavieniai klonai, kurie augo prie didelės 2 mg/mL genocidino koncentracijos.

Siekiant patikrinti ar šiuose transformantuose sėkmingai integrovosi *lox* genas, buvo atliktas kolonijų PGR (2.3.8). Dėl storos, iš β-gliukano ir chitino sudarytos mielių sienelės, kolonijų PGR dažnai vyksta neefektyviai. Todėl moksliniuose straipsniuose minimi papildomi ląstelių apdorojimo

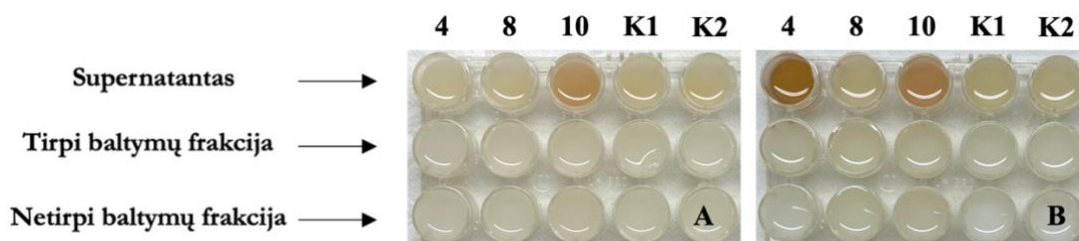
žingsniai, tokie kaip ardymas skystu azotu arba fermentais (litikazė, zimolazė), kurie pažeidžia mielių sienelėje esantį  $\beta$ -gliukano sluoksnį (Linder et al., 1996; Kamarrthapu et al., 2013; Mohammadzadeh et al., 2021). Šio tyrimo metu buvo pasirinktas ardymas karščiu, kolonijas pakaitinant 5 min 98 °C temperatūroje 50  $\mu$ L sterilaus H<sub>2</sub>O. Kolonijų PGR mėginius išanalizavus agaroziniame gelyje, amplifikuotas 756 bp ilgio fragmentas nebuvo pastebėtas nei viename iš tirtų klonų (3.11 pav. A). Taip galėjo nutikti dėl nepakankamai suardytų ląstelių arba pernelyg mažo geno kopijų skaičiaus. Šie PGR produktai buvo toliau panaudoti kaip matrica pakartotinei amplifikacijai. Iš 11-os tirtų klonų, 3-uose buvo pastebėti neryškūs laukiamo dydžio fragmentai (3.11 pav. B - mėginiai Nr.4, Nr.8, Nr.10). Pastarieji buvo panaudoti dar kartą atliekant PGR reakciją (3.11 pav. C). Patvirtini teigiami klonai buvo naudoti tolimesniuose tyrimuose.



**3.11 pav.** *P. pastoris* transformantų analizė mielių kolonijų PGR metodu: (A) – pirmasis PGR; (B) – antrasis PGR; (C) – trečiasis PGR. M – DNR dydžio standartas; N – neigiama kontrolė; 1-14 takeliai – pPIC9K-LOX mielių transformantai. Naudoti pradmenys P516/P652. Teorinis lauktas dydis 756 bp

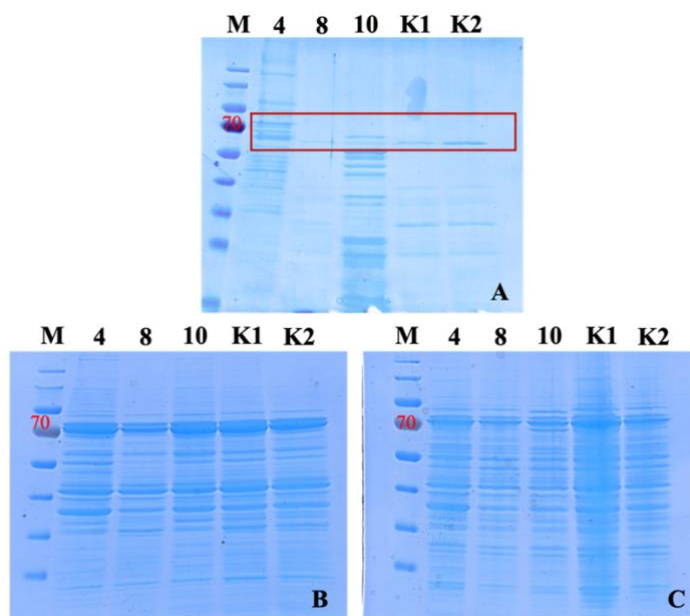
Lipoksigenazės baltymo raiškos tyrimams atlikti buvo papildomai pasirinkti ir du kontroliniai klonai: i) *P. pastoris* su transformuotu tuščiu pPIC9K vektorium ir ii) natyvos nemodifikuotos GS115 ląstelės. Rekombinantiniai ir kontroliniai klonai buvo inokuliuoti skystoje BMGY terpėje ir auginti 18 val 30 °C temperatūroje, purtant 220 aps/min greičiu (2.3.18). Ląstelės perkeltos į indukcinę skystą BMMY terpę su 0,5 % (v/v) metanoliu ir augintos 72 valandas. Kas 24 val terpė buvo papildoma 0,5 % metanoliu, kad išlaikyti pastovesnę metanolio koncentraciją. Eksperimentų metu naudotų BMGY/BMMY terpių sudėtyje yra naudojamas peptonas ir mielių ekstraktas. Šios medžiagos ne tik paskatina mielių augimą, bet ir galimai padeda stabilizuoti sekretuojamus baltymus bei sumažina jų proteolizę („Pichia expression kit. A manual for methods for expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*“ 2014, Invitrogen).

Po kultivavimo, supernatantas buvo atskirtas nuo ląstelių ir sukonzentruotas 20 kartų (2.3.21), o biomasė suardyta mechaniniu būdu, atskiriant tirpią ir netirpią baltymų frakcijas (2.3.20). Su gautais mėginiais atliktas kokybinis lipoksigenazių aktyvumo nustatymo tyrimas agarizuoto krakmolo šulinėliuose (2.3.22) (**3.12 pav.**). Išanalizavus gautus rezultatus, pakankamai didelis LOX aktyvumas buvo pastebėtas tik **Nr. 4** mėginio supernatante.



**3.12 pav.** LOX funkcinės analizės tyrimas krakmolo šulinėliuose: (A) – prieš LOX įdėjimą; (B) – 10 min po LOX įdėjimo. **Nr. 4, 8 ir 10** – pPIC9K-LOX mielių klonai; **K1** – kontrolinis pPIC9K mielių klonas; **K2** – kontrolis natyvus *P. pastoris* klonas

Kitose tirtuose klonuose LOX aktyvumas nebuvo matomas galimai dėl mažo *lox* geno kopijų skaičiaus arba neaktyvios formos fermento sintezės. Toliau buvo atliekama baltymų sintezės analizė NDS-PAGE metodu (2.3.23) (**3.13 pav.**). Rezultatai atskleidė, kad vienintelis **Nr. 4** klonas sintetino tikslinį baltymą, kuris visas buvo išskiriamas į užląstelinę terpę. Tai įrodo, kad tyrimuose naudotas signalinis peptidas ( $\alpha$  faktorius) *P. pastoris* mielėse efektyviai vykdo produkujamo baltymo sekreciją į užląstelinę erdvę.



**3.13 pav.** LOX baltymų ekspresijos *P. pastoris* analizė NDS-PAGE gelyje: (A) – koncentruotas supernatantas; (B) – tirpi baltymų frakcija; (C) – netirpi baltymų frakcija. **Nr. 4, 8 ir 10** – pPIC9K-LOX mielių klonai; **K1** – kontrolinis pPIC9K mielių klonas; **K2** – kontrolis natyvus *P. pastoris* klonas; **M** – baltymų molekulinės masės standartas, kDa

Įdomu tai, kad lipoksigenazė gelyje matoma ties ~70 kDa riba, nors literatūroje pateikiamas natyvaus *P. aeruginosa* fermento dydis yra ~45 kDa (Busquets et al., 2004). Tačiau gauti rezultatai sutampa su kituose moksliniuose straipsniuose publikuojama informacija (Vidal-Mas et al., 2005; Hashem et al., 2020). Manoma, kad dydžio pasikeitimus nulemia *P. pastoris* vykdomas baltymų glikozilinimas ir kitos potransliacinės modifikacijos, skirtos baltymų stabilimui užtikrinti ir sekrecijos paruošimui (Heiss et al., 2013; Karbalaei et al., 2020). Vis dėlto, yra reikalingi detalesni tyrimai, siekiant išsiaiškinti lipoksigenazės molekulinio dydžio padidėjimą bei optimizuoti rekombinantinio baltymo gamybą.

### 3.2.2 LOX raiškos kontruksto kūrimas paremtas GoldenPiCS strategija

Šio eksperimento metu, buvo siekiama sukurti konstrukta, kuris vietoje metanolio indukuojamo promotoriaus turėtų konstitutyvų promotorių lipoksigenazės raiškai. Tam tikslui pasirinkta GoldenPiCS strategija. Šis molekulinio klonavimo būdas paremtas „Golden Gate Assembly“ sistema ir yra tikslingai optimizuotas darbams *P. pastoris* mielėse (Prielhofer et al., 2017).. Naudotame komerciniame GoldenPiCS plazmidžių rinkinyje yra 20 skirtingų promotorių, 10 terminatorių, 5 atrankumo žymenys ir 5 lokusai, tikslinei integracijai į genomą arba episominės plazmidės palaikymui. Tokiu būdu yra suteikiama galimybė paprastai ir greitai išbandyti skirtingas genetinių elementų kombinacijas ir iširti jų įtaką tikslinio rekombinantinio baltymo raiškai (Weber et al, 2011; Prielhofer et al., 2017).

GoldenPiCS strategija susideda iš 2-3 etapų, priklausomai nuo naudojamų transkripcijos vienetų skaičiaus (Weber et al, 2011). Jų metu naudojamos II-tipo restrikcijos endonukleazės (*BsaI* ir *BpiI*), kerpančios DNR už atpažinimo sekų, leidžia greitai ir efektyviai vienos reakcijos metu įvykdyti keletos genų suliejimą, tuo pačiu išvengiant papildomų nukleotidų įterpimo. Vis dėlto, specifinių/pavienių restriktazių naudojimas turi ir savų trūkumų. Atvejai, kuomet tiksliniuose genuose randamos *BsaI* arba *BpiI* atpažinimo sekos, reikalauja papildomų geno modifikacijos žingsnių, kurie prailgina bendrą klonavimo trukmę.

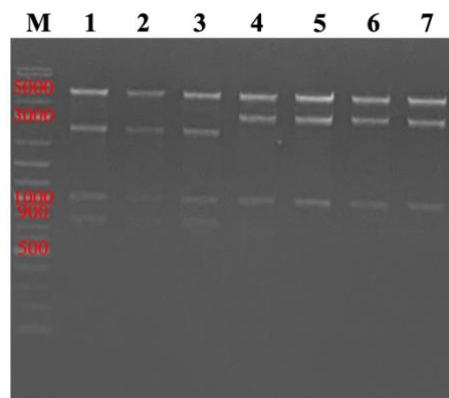
#### ***Lipoksigenazės mutagenezė***

Bioinformatinių įrankių pagalba, bakterinės *P. pseudomonas lox* gene buvo nustatyta viena *BpiI* restrikcijos endonukleazės atpažinimo vieta (5'-GAAGAC-3'). Siekiant ją pašalinti, vykdyta tikslinė mutagenezė (*angl.* site-directed mutagenesis by PCR) PGR metodu. Pastaroji buvo atlikta dviem būdais.

Pirmuoju būdu vykdytos mutagenezės metu atliktas PGR su pradmenimis P729/P730 (2.3.6). Pradmenyse buvo įvestas liziną koduojančio kodono (AAA) pakeitimas į alternatyvų, *P. pastoris* organizme dažnai naudojamą kodoną (AAG), tokiu būdu nepakeičiant baltymo aminorūgščių sekos.

Amplifikacijai pasirinktas matricinis pFX7- $\alpha$ F-LOX konstruktas. Siekiant sumažinti klonų skaičių su neįvykusia mutacija, po PGR mėginiai buvo papildomai paveikti *DpnI* restrikcijos endonukleaze, kuri hidrolizuoja metilintą matricinę plazmidę. Reakcijos mišinys naudotas transformuoti *E. coli* DH5 $\alpha$  kompetentines ląsteles temperatūriniu šoku (2.3.15).

Vienas iš pagrindinių šios metodikos trūkumų yra dažnai pastebimas pradmenų dimerų susidarymas bei tandeminių sekų atsiradimas mutagenezės vietoje. To priežastis yra komplementarių pradmenų porų naudojimas. Būtent šie veiksniai nulemia mažesnę transformacijos išeią (Edelheit et al., 2009). Siekiant išvengti šios galimos problemos, buvo pasirinktas ir antras mutagenezės būdas, kurio metu pradmenys P729 ir P730 naudoti atskirose PGR reakcijose. Šio asimetrinio PGR metu amplifikuojama viena DNR grandinė ir yra sintetinama tik viena nauja kopija per ciklą. Todėl naudotos matricos kiekis buvo 20 kartų didesnis (500 ng), nei vykdant konvencinę, t.y. eksponentinę PGR. Pasibaigus reakcijai, produktai sumaišyti tarpusavyje ir vykdytas denatūruotų plazmidžių sujungimas temperatūros gradiento pagalba (2.3.10). Mėginai apdoroti *DpnI* ir perkelti į *E. coli*. Iš išaugusių klonų išskirta ir išvalyta (2.3.4) mutuota plazmidė, kuri toliau buvo analizuojama su *BpiI* restriktaze (2.3.9) (**3.14 pav.**).



**3.14 pav.** Mutagenizuotų pFX7- $\alpha$ F-LOX plazmidžių restrikcinė analizė su *BpiI* restrikcijos endonukleaze. **M** – DNR dydžio standartas; **1-3** – mutagenezė vykdyta asimetrine PGR reakcija; **4-7** – mutagenezė vykdyta eksponentine PGR reakcija

#### Teoriniai laukti dydžiai:

##### ***BpiI*:**

pPIC9K: 5209 / 2533 / 1040 / 815 / 147 / 10

pPIC9K-LOX: 5209 / 3348 / 1040 / 147 / 10

Remiantis restrikcine analize, tinkamai įvykusi mutagenezė nustatyta tik pirmuoju tradiciniu būdu vykdyta reakcija (**Nr. 4-7**). Šios plazmidės buvo paruoštos sekvenavimui su P407/P517/P529/P530 pradmenimis, kurie leidžia atlikti viso *lox* geno sekoskaitą. Rezultatai parodė, kad tikslinė mutacija įvyko tinkamai ir pačiame tiksliniame gene nebuvo klaidų.

Vis dėlto, abejais metodais vykdytos mutagenezės metu buvo pastebėtas nedidelis transformantų skaičius. Taip galėjo nutikti dėl didelio pFX7- $\alpha$ F-LOX plazmidės dydžio (9754 bp),

kuri buvo naudojama kaip matrica. Literatūroje nėra pateikiama daug sėkmingų atvejų, kai naudojamos didelės apimties plazmidės (Liu et al., 2015). Nustatyta, kad efektyviausia reakcija vyksta su plazmidėmis, kurios yra iki 3-6 kb dyžio (Ling & Robinson, 1997; Edelheit et al., 2009). Dirbant su didesniais konstruktais (>8 kb) paprastai yra taikomos specifinės, dideliu aktyvumu pasižyminčios DNR polimerazės (pvz. Q5 polimerazė) arba atliekami papildomi subklonavimo žingsniai, konstruktus perkeliant į mažesnio dydžio vektorius (Hallak et al., 2017; Zhang et al., 2021). Įrodyta, jog tikslinei mutagenezėi yra galimas ir didelių (~10 kb) plazmidžių panaudojimas, tačiau reakcija nepasižymi didele išeiga.

### ***LOX klonavimos „Golden Gate Assembly“***

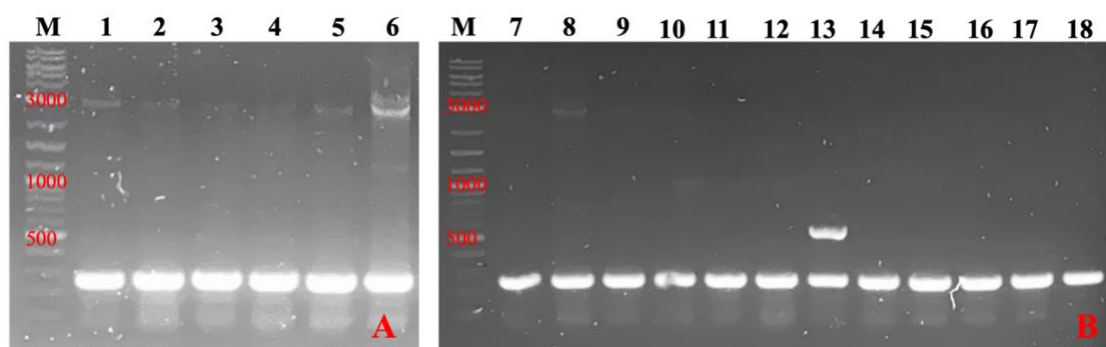
Darbai su lipoksigenaze buvo atliekami dviem etapais. Pirmajame žingsnyje atlikta *lox* geno amplifikacija (2.3.6). Jos metu, P727/P728 pradmenimis geno galuose buvo įvestos *BpiI* restriktazės atpažinimo sekos bei specifinės susijungimo vietos (*angl.* fusion site), per kurias įvyksta skirtingų genetinių elementų sujungimas. Gauti produktai išvalyti (2.3.4) ir išmatuotos jų koncentracijos (2.3.1). Antrajame žingsnyje buvo vykdoma plazmidės surinkimo reakcija „Golden Gate Assembly“ (GGA) būdu. Jos metu naudotas BB3 vektorius ir tikslinio geno transkripciją užtikrinantys elementai: stiprus konstitutyvus glicerinaldehido-3-fosfato dehidrogenazės (GAP) promotorius bei *S. cerevisiae* būdingas CYC1 terminatorius.

Literatūroje yra randamos įvairios metodikos GGA reakcijai atlikti. Jose yra naudojami skirtingi raiškos plazmidės kiekiai – nuo 20 fmol (Marillonnet & Grütznert, 2020) iki 800 fmol ir daugiau (Prielhofer et al., 2017). Tačiau pastaraisiais kolegų atliktais eksperimentais (BTI TBS), buvo pastebėta, kad transformacijos pasižymi pakankamai mažu efektyvumu ir didžioji dalis plazmidžių transformuojasi be tikslinio geno. Todėl buvo bandyta šį procesą optimizuoti, naudojant skirtingas DNR koncentracijas bei papildomus fermentus, leidžiančius sumažinti recirkuliarizuotų plazmidžių skaičių (Prielhofer et al., 2017; Marillonnet et al., 2020). Detalus reakcijų aprašas nurodytas priede (*žr. 1 priedas*).

Eksperimentuose buvo naudotos dvi skirtingos raiškos plazmidės koncentracijos – 40 fmol ir 800 fmol. Dalis jų, prieš vykdomą GGA reakciją, buvo linearizuotos su *BglI* restriktaze ir preparatyvinės eletroferezės būdu atskirtos nuo iškirpto DNR fragmento (2.3.2). Buvo išmatuotos išgrynintų ir išvalytų plazmidžių koncentracijos. GGA reakcijos vykdytos termocikleryje (2.3.11). Po inaktyvacijos žingsnio, dalis mėginių buvo papildomai paveikti *BpiI* arba *BpiI/ExoIII* fermentais, siekiant eliminuoti tuščias žiedinės struktūros plazmidės. Vienodas reakcijos produktų tūris buvo naudotas transformuoti kompetentines *E. coli* ląsteles temperatūriniu šoku. Teigiamų klonų atranka vykdyta LB terpėje su 50 µg/ml zeocino.

Pirminiam įvertinimui buvo atliekamas skirtingais GGA reakcijos mišiniais transformuotų kolonijų skaičiavimas (žr. 1 priedą). Buvo pastebėta, kad išankstinis vektoriaus linearizavimas leido sumažinti išaugusių klonų skaičių daugiau nei 10 kartų, o papildomų *BpiI/ExoIII* fermentų naudojimas šį skaičių sumažino dar 3 kartus. Galima daryti prielaidą, jog klonų skaičiaus sumažėjimą lėmė tai, kad išaugo mažiau klonų turinčių tuščias BB3 plazmidės, t.y., be tikslio geno. Reikia pažymėti, kad naudojant nerestriktuotą vektorių, kuris po GGA reakcijos buvo paveiktas *BpiI* restriktaze, nulėmė daugiau nei 1,5 kartų didesnę išaugusių klonų skaičių. Nėra aiški šio pakitimo priežastis. Manoma, kad taip galėjo nutikti dėl įvykusios tik dalinės plazmidžių restrikcijos, kuri lėmė plazmidžių recirkuliarizaciją. Tačiau, papildomai naudotos *ExoIII* poveikis užaugių klonų skaičių sumažino daugiau nei dvigubai. Reakcijoje naudotas *ExoIII*, pasižymintis egzozonukleaziniu aktyvumu, pašalino linearizuotas plazmidės. Tokiu būdu buvo sumažintas klonų su tuščiu vektoriumi skaičius. Ekperimento metu naudotas *FastDigest* buferinis tirpalas, kuriame *ExoIII* pasižymi labai nedideliu aktyvumu (iki 25 %). Visgi, jis buvo pakankamas užtikrinti neigiamų klonų skaičiaus sumažinimą.

Tolimesnei analizei buvo pasirinkti klonai paruošti su *ExoIII* egzozonukleaze. Analizė vykdyta kolonijų PGR metodu (2.3.7) su BB3 vektoriumi specifiniais P705/706 pradmenimis (3.15 pav.). Nustatyta, kad visuose tirtuose klonuose, kuriuose vektorius buvo iš anksto linearizuotas, yra *lox* genas (3.15 pav. A). Tuo tarpu, naudojant nerestriktuotas plazmidės, didžioji dalis transformantų turėjo tuščius vektorius.



**3.15 pav.** BB3-LOX konstrukto analizė *E. coli* transformantuose kolonijų PGR metodu: (A) – iš anksto linearizuotas ir paveiktas *ExoIII* vektorius; (B) – nelinearizuotas vektorius papildomai paveiktas *ExoIII*. M – DNR dydžio standartas; 1-18 takeliai – skirtingi *E. coli* klonai

Plazmidės iš klonų Nr. 6 ir Nr. 8 buvo išgrynintos, išvalytos ir pradėta jų sekoskaita. Gauti rezultatai bus analizuojami tolimesniuose tyrimuose.

Šių eksperimentų metu išbandyti įvairūs sprendimai, kurie gali palengvinti teigiamų klonų atranką. Vis dėlto, papildomų žingsnių ir reagentų panaudojimas, gali prailginti reakcijos trukmę bei padidinti reakcijai vykdyti reikalingus kaštus. Todėl reikalingi išsamesni tyrimai, siekiant šį procesą optimizuoti.



## IŠVADOS

1. Atlikus *Pseudomonas aeruginosa* lipoksigenazės geno *lox* raišką *Saccharomyces cerevisiae* kamienuose (AH22, GCN2) nustatyta, kad skirtingų mutantinių kamienų panaudojimas reikšmingos įtakos lipoksigenazės raiškai neturi.
2. Naudojant pPIC9K-LOX raiškos sistemą *P. pastoris* mielėse pavyko gauti aktyvaus užląstelinio LOX baltymo sintezę. Taip pat buvo optimizuojamas „Golden Gate“ klonavimo metodas konstruojant sistemą konstitutyviai LOX raiškai *P. pastoris* mielėse. Papildomų fermentų (*BpiI*, *ExoIII*) naudojimas sumažina neigiamų transformantų skaičių.

## **PADĖKA**

Nuoširdžiai noriu padėkoti visiems VU Biotechnologijos instituto Taikomosios biokatalizės sektoriaus darbuotojams už suteiktas puikias darbo sąlygas ir draugišką atmosferą. Esu ypač dėkingas darbo vadovei Dr. Ingai Matijošytei už jos parodytą didelį supratingumą, nuoširdumą bei palaikymą visais, net ir gyvenimiškais klausimais, ir suteiktą galimybę tapti šio nuostabaus skyriaus dalimi.

Didelis ačiū visam TBS kolektyvui už pagalbą rengiant mokslinį darbą bei už linksmas ir įdomias suorganizuotas laisvalaikio veiklas.

## LITERATŪROS SARAŠAS

- Aanangi, R., Kotapati, K. V., Palaka, B. K., Kedam, T., Kanika, N. D., & Ampasala, D. R. (2016). Purification and characterization of lipoxygenase from mung bean (*Vigna radiata* L.) germinating seedlings. *3 Biotech*, *6*(1), 113. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0427-5>
- Alcántara, A. R., Domínguez De María, P., Littlechild, J. A., Schürmann, M., Sheldon, R. A., & Wohlgemuth, R. (2022). Biocatalysis as key to sustainable industrial chemistry. *ChemSusChem*, *15*(9). <https://doi.org/10.1002/cssc.202102709>
- An, J. U., Hong, S. H., & Oh, D. K. (2018). Regiospecificity of a novel bacterial lipoxygenase from *Myxococcus xanthus* for polyunsaturated fatty acids. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1863*(8), 823–833. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2018.04.014>
- An, J. U., Kim, B. J., Hong, S. H., & Oh, D. K. (2015). Characterization of an omega-6 linoleate lipoxygenase from *Burkholderia thailandensis* and its application in the production of 13-hydroxyoctadecadienoic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(13), 5487–5497. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6353-8>
- Armstrong, M. M., Freedman, C. J., Jung, J. E., Zheng, Y., Kalyanaraman, C., Jacobson, M. P., Simeonov, A., Maloney, D. J., Van Leyen, K., Jadhav, A., & Holman, T. R. (2016). A potent and selective inhibitor targeting human and murine 12/15-LOX. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *24*(6), 1183–1190. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.01.042>
- Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A., Hoseinpoor, R., Rahbarnia, L., & Aria, M. (2019). Yeast expression systems: overview and recent advances. *Molecular Biotechnology*, *61*(5), 365–384. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00164-8>
- Bai, J., Swartz, D. J., Protasevich, I. I., Brouillette, C. G., Harrell, P. M., Hildebrandt, E., Gasser, B., Mattanovich, D., Ward, A., Chang, G., & Urbatsch, I. L. (2011). A gene optimization strategy that enhances production of fully functional P-glycoprotein in *Pichia pastoris*. *PLoS ONE*, *6*(8), e22577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022577>
- Bertero, A., Brown, S., & Vallier, L. (2017). Methods of cloning. In M. Jalali, F. Y. L. Saldanha, & M. Jalali (Eds.), *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 19–39). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00002-3>
- Brash, A. R. (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of Substrate. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(34), 23679–23682. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.23679>
- Bubeck, P., Winkler, M., & Bautsch, W. (1993). Rapid cloning by homologous recombination in vivo. *Nucleic Acids Research*, *21*(15), 3601–3602.
- Busquets, M., Deroncelé, V., Vidal-Mas, J., Rodríguez, E., Guerrero, A., & Manresa, A. (2004). Isolation and characterization of a lipoxygenase from *Pseudomonas* 42A2 responsible for the biotransformation of oleic acid into (S)-(E)-10-hydroxy-8-octadecenoic acid. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *85*(2), 129–139. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020152.15440.65>
- Cao, S., Chen, H., Zhang, C., Tang, Y., Liu, J., Qi, H. (2016) Heterologous expression and biochemical characterization of two lipoxygenases in oriental melon, *Cucumis melo* var. *makuwa* Makino. *PLoS ONE* *11*(4), e0153801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153801>
- Chedea, V. S., & Jisaka, M. (2013). Lipoxygenase and carotenoids: A co-oxidation story. *African Journal of Biotechnology*, *12*(20), 20. <https://doi.org/10.4314/ajb.v12i20>
- Chen, Z., Chen, X., Yan, H., Li, W., Li, Y., Cai, R., & Xiang, Y. (2015). The lipoxygenase gene family in poplar: identification, classification, and expression in response to MeJA treatment. *PLoS ONE*, *10*(4), e0125526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125526>
- Chrisnasari, R., Hennebelle, M., Vincken, J. P., van Berkel, W. J. H., & Ewing, T. A. (2022). Bacterial lipoxygenases: biochemical characteristics, molecular structure and potential applications. *Biotechnology Advances*, *61*, 108046. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108046>
- de Souza, C. C., Guimarães, J. M., Pereira, S. dos S., & Mariúba, L. A. M. (2021). The multifunctionality of expression systems in *Bacillus subtilis*: emerging devices for the production of recombinant proteins. *Experimental Biology and Medicine*, *246*(23), 2443–2453. <https://doi.org/10.1177/15353702211030189>
- Dev, A., Srivastava, A. K., & Karmakar, S. (2018). New generation hybrid nanobiocatalysts. In C. M. Hussain (Ed.), *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications* (pp. 217–231). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813351-4.00013-4>

- Villatoro-Hernández, J., Kuipers, O. P., Saucedo-Cárdenas, O., & Montes-de-Oca-Luna, R. (2012). Heterologous protein expression by *Lactococcus lactis*. In A. Lorence (Ed.), *Recombinant Gene Expression* (Vol. 824, pp. 155–165). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9_8)
- Edelheit, O., Hanukoglu, A., & Hanukoglu, I. (2009). Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnology*, 9(1), 61. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-61>
- Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS ONE*, 3(11), e3647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>
- Fernández, F. J., & Vega, M. C. (2013). Technologies to keep an eye on: Alternative hosts for protein production in structural biology. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(3), 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.02.002>
- Fisher, D. I., Mayr, L. M., & Roth, R. G. (2016). Expression Systems. In R. A. Bradshaw, P. D. Stahl (Eds), *Encyclopedia of Cell Biology* (pp. 54–65). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.10009-4>
- Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 6, 253. <https://doi.org/10.3791/253>
- Gaffney, B. J. (2014). Connecting lipoxygenase function to structure by electron paramagnetic resonance. *Accounts of Chemical Research*, 47(12), 3588–3595. <https://doi.org/10.1021/ar500290r>
- Gast, V., Sandegren, A., Dunås, F., Ekblad, S., Güler, R., Thorén, S., Tous Mohedano, M., Molin, M., Engqvist, M. K. M., & Siewers, V. (2022). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for the production and secretion of Affibody molecules. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01761-0>
- Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J. M., Berardi, E., Veenhuis, M., & van der Klei, I. (2005). New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – A comparison. *FEMS Yeast Research*, 5(11), 1079–1096. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.06.004>
- Goloshchapova, K., Stehling, S., Heydeck, D., Blum, M., & Kuhn, H. (2019). Functional characterization of a novel arachidonic acid 12S-lipoxygenase in the halotolerant bacterium *Myxococcus fulvus* exhibiting complex social living patterns. *MicrobiologyOpen*, 8(7), e00775. <https://doi.org/10.1002/mbo3.775>
- Gustafsson, C., Minshull, J., Govindarajan, S., Ness, J., Villalobos, A., & Welch, M. (2012). Engineering genes for predictable protein expression. *Protein Expression and Purification*, 83(1), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.02.013>
- Hallak, L. K., Berger, K., Kaspar, R., Kwilas, A. R., Montanaro, F., & Peeples, M. E. (2017). Efficient method for site-directed mutagenesis in large plasmids without subcloning. *PLoS ONE*, 12(6), e0177788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177788>
- Han, J., Liu, Y., Yang, S., Wu, X., Li, H., & Wang, Q. (2021). MEK inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 14, 1. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-01025-7>
- Hansen, J., Garreta, A., Benincasa, M., Fusté, M. C., Busquets, M., & Manresa, A. (2013). Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(11), 4737–4747. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4887-9>
- Hashem, C., Stolterfoht, H., Rinnofner, C., Steinberger, S., Winkler, M., & Pichler, H. (2020). Secretion of *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase by *Pichia pastoris* upon glycerol feed. *Biotechnology Journal*, 15(11), 2000089. <https://doi.org/10.1002/biot.202000089>
- Hayward, S., Cilliers, T., & Swart, P. (2017). Lipoxygenases: from isolation to application. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 199–211. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12239>
- Heiss, S., Maurer, M., Hahn, R., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2013). Identification and deletion of the major secreted protein of *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 1241–1249. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4260-4>
- Heshof, R., van Schayck, J. P., Tamayo-Ramos, J. A., & de Graaff, L. H. (2014). Heterologous expression of *Gaeumannomyces graminis* lipoxygenase in *Aspergillus nidulans*. *AMB Express*, 4, 65. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0065-4>
- Hoffmann, L., Sugue, M. F., & Brüser, T. (2021). A tunable anthranilate-inducible gene expression system for *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(1), 247–258. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11034-8>

- Jacobus, A. P., & Gross, J. (2015). Optimal Cloning of PCR Fragments by homologous recombination in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, *10*(3), e0119221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119221>
- Kahnt, A. S., Angioni, C., Göbel, T., Hofmann, B., Roos, J., Steinbrink, S. D., Rörsch, F., Thomas, D., Geisslinger, G., Zacharowski, K., Grösch, S., Steinhilber, D., & Maier, T. J. (2022). Inhibitors of human 5-lipoxygenase potentially interfere with prostaglandin transport. *Frontiers in Pharmacology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.782584>
- Kamarthapu, V., Ragampeta, S., Rao, K. V., & Reddy, V. D. (2013). Engineered *Pichia pastoris* for enhanced production of S-adenosylmethionine. *AMB Express*, *3*, 40. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-40>
- Kant, R., Bhatt, G., Patel, V. K., Ganguli, A., Singh, D., Nayak, M., Mishra, K., Gupta, A., Gangopadhyay, K., Gangopadhyay, S., Ramanathan, G., & Bhattacharya, S. (2019). Synchronized electromechanical shock wave-induced bacterial transformation. *ACS Omega*, *4*(5), 8512–8521. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00202>
- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*, *235*(9), 5867–5881. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>
- Kashyap, D., Mittal, S., Sak, K., Singhal, P., & Tuli, H. S. (2016). Molecular mechanisms of action of quercetin in cancer: Recent advances. *Tumor Biology*, *37*(10), 12927–12939. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5184-x>
- Kostylev, M., Otwell, A. E., Richardson, R. E., & Suzuki, Y. (2015). Cloning should be simple: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -mediated assembly of multiple DNA fragments with short end homologies. *PLoS ONE*, *10*(9), e0137466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137466>
- Lack, N., Lowe, E. D., Liu, J., Eltis, L. D., Noble, M. E. M., Sim, E., & Westwood, I. M. (2008). Structure of HsaD, a steroid-degrading hydrolase, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, *64*(Pt 1), 2–7. <https://doi.org/10.1107/S1744309107065931>
- Lee, N. Y., Choi, D. H., Kim, M. G., Jeong, M. J., Kwon, H. J., Kim, D. H., Kim, Y. G., Luccio, E. di, Arioka, M., Yoon, H. J., & Kim, J. G. (2020). Biosynthesis of (R)-(-)-1-Octen-3-ol in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with lipoxygenase-1 and hydroperoxide lyase genes from *Tricholoma matsutake*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(2), 296–305. <https://doi.org/10.4014/jmb.2001.01049>
- Lestari, C. S. W., & Novientri, G. (2021). Advantages of yeast-based recombinant protein technology as vaccine products against infectious diseases. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *913*(1), 012099. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/913/1/012099>
- Linder, S., Schliwa, M., & Kube-Granderath, E. (1996). Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones. *BioTechniques*, *20*(6), 980–982. <https://doi.org/10.2144/96206bm08>
- Ling, M. M., & Robinson, B. H. (1997). Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Analytical Biochemistry*, *254*(2), 157–178. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2428>
- Liu, H., Ye, R., & Wang, Y. Y. (2015). Highly efficient one-step PCR-based mutagenesis technique for large plasmids using high-fidelity DNA polymerase. *Genetics and Molecular Research*, *14*(2), 3466–3473. <https://doi.org/10.4238/2015.April.15.10>
- Lončarić, M., Strelec, I., Moslavac, T., Šubarić, D., Pavić, V., & Molnar, M. (2021). Lipoxygenase inhibition by plant extracts. *Biomolecules*, *11*(2), 152. <https://doi.org/10.3390/biom11020152>
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *63*, 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R. A., Martínez Vivancos, A., Cánovas Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2021). Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 682001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001>
- Lu, J., Zhang, C., Leong, H. Y., Show, P. L., Lu, F., & Lu, Z. (2020). Overproduction of lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* by auto-induction expression and its application in triphenylmethane dyes degradation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *129*(3), 327–332. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.09.006>
- Ma, K., Nunemaker, C. S., Wu, R., Chakrabarti, S. K., Taylor-Fishwick, D. A., & Nadler, J. L. (2010). 12-lipoxygenase products reduce insulin secretion and  $\beta$ -cell viability in human islets. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *95*(2), 887–893. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1102>
- Madhavan, A., Arun, K. B., Sindhu, R., Krishnamoorthy, J., Reshmy, R., Sirohi, R., Pugazhendi, A., Awasthi, M. K., Szakacs, G., & Binod, P. (2021). Customized yeast cell factories for biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up. *Microbial Cell Factories*, *20*(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01617-z>

- Mamipour, M., Yousefi, M., & Hasanzadeh, M. (2017). An overview on molecular chaperones enhancing solubility of expressed recombinant proteins with correct folding. *International Journal of Biological Macromolecules*, *102*, 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.025>
- Marillonnet, S., & Grütznér, R. (2020). Synthetic DNA assembly using Golden Gate Cloning and the Hierarchical Modular Cloning Pipeline. *Current Protocols in Molecular Biology*, *130*(1), e115. <https://doi.org/10.1002/cpmb.115>
- Marvian-Hosseini, Z., & Asoodeh, A. (2017). Biochemical characterization of purified lipoxygenase from sesame (*Sesamum indicum*). *International Journal of Food Properties*, *20*(sup1), S948–S958. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1318291>
- Mashima, R., & Okuyama, T. (2015). The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox Biology*, *6*, 297–310. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.006>
- Maynard, D., Chibani, K., Schmidtrott, S., Seidel, T., Spross, J., Viehhauser, A., & Dietz, K.-J. (2021). Biochemical characterization of 13-lipoxygenases of *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19), 10237. <https://doi.org/10.3390/ijms221910237>
- Mohammadzadeh, R., Karbalaei, M., Soleimanpour, S., Mosavat, A., Rezaee, S. A., Ghazvini, K., & Farsiani, H. (2021). Practical methods for expression of recombinant protein in the *Pichia pastoris* system. *Current Protocols*, *1*(6), e155. <https://doi.org/10.1002/cpz1.155>
- Morello, E., Pérez-Berezo, T., Boisseau, C., Baranek, T., Guillon, A., Bréa, D., Lanotte, P., Carpena, X., Pietrancosta, N., Hervé, V., Ramphal, R., Cenac, N., & Si-Tahar, M. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase LoxA contributes to lung infection by altering the host immune lipid signaling. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01826>
- Newcomer, M. E., & Brash, A. R. (2015). The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, *24*(3), 298–309. <https://doi.org/10.1002/pro.2626>
- Oliw, E. H. (2022). Iron and manganese lipoxygenases of plant pathogenic fungi and their role in biosynthesis of jasmonates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *722*, 109169. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109169>
- Pang, C., Liu, S., Zhang, G., Zhou, J., Du, G., & Li, J. (2020). Combinatorial strategy towards the efficient expression of lipoxygenase in *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(23), 10047–10057. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10941-0>
- Pang, C., Liu, S., Zhang, G., Zhou, J., Du, G., & Li, J. (2022). Enhancing extracellular production of lipoxygenase in *Escherichia coli* by signal peptides and autolysis system. *Microbial Cell Factories*, *21*, 42. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01772-x>
- Pang, C., Zhang, G., Liu, S., Zhou, J., Li, J., & Du, G. (2022). Engineering sigma factors and chaperones for enhanced heterologous lipoxygenase production in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, *15*(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02206-x>
- Park, J. Y., Kim, C. H., Choi, Y., Park, K. M., & Chang, P.-S. (2020). Catalytic characterization of heterodimeric linoleate 13S-lipoxygenase from black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Enzyme and Microbial Technology*, *139*, 109595. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109595>
- Prielhofer, R., Barrero, J. J., Steuer, S., Gassler, T., Zahrl, R., Baumann, K., Sauer, M., Mattanovich, D., Gasser, B., & Marx, H. (2017). GoldenPiCS: A Golden Gate-derived modular cloning system for applied synthetic biology in the yeast *Pichia pastoris*. *BMC Systems Biology*, *11*(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s12918-017-0492-3>
- Pruitt, R. N., Chumblér, N. M., Rutherford, S. A., Farrow, M. A., Friedman, D. B., Spiller, B., & Lacy, D. B. (2012). Structural determinants of *Clostridium difficile* toxin A glucosyltransferase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(11), 8013–8020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.298414>
- Pyser, J. B., Chakrabarty, S., Romero, E. O., & Narayan, A. R. H. (2021). State-of-the-art biocatalysis. *ACS Central Science*, *7*(7), 1105–1116. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00273>
- Ramón, A., Señorale-Pose, M., & Marín, M. (2014). Inclusion bodies: not that bad.... *Frontiers in Microbiology*, *5*, 56. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00056>
- Retallack, D. M., Jin, H., & Chew, L. (2012). Reliable protein production in a *Pseudomonas fluorescens* expression system. *Protein Expression and Purification*, *81*(2), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.09.010>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: a 5-year update. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 28(8), 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Sadeghian, H., & Jabbari, A. (2016). 15-Lipoxygenase inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(1), 65–88. <https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1113259>
- Sathesh-Prabu, C., Tiwari, R., Kim, D., & Lee, S. K. (2021). Inducible and tunable gene expression systems for *Pseudomonas putida* KT2440. *Scientific Reports*, 11(1), 18079. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97550-7>
- Seo, M. J., Shin, K. C., & Oh, D. K. (2014). Production of 5,8-dihydroxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid from linoleic acid by whole recombinant *Escherichia coli* cells expressing diol synthase from *Aspergillus nidulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(17), 7447–7456. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5709-4>
- Shi, Y., Mandal, R., Singh, A., & Pratap Singh, A. (2020). Legume lipoxygenase: Strategies for application in food industry. *Legume Science*, 2(3), e44. <https://doi.org/10.1002/leg3.44>
- Silva, F., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. (2012). Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 30(3), 691–708. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.12.005>
- Simard-Bisson, C., Parent, L. A., Moulin, V. J., & Fruteau de Laclos, B. (2018). Characterization of epidermal lipoxygenase expression in normal human skin and tissue-engineered skin substitutes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 66(11), 813–824. <https://doi.org/10.1369/0022155418788117>
- Singh, P., Arif, Y., Miszczuk, E., Bajguz, A., & Hayat, S. (2022). Specific roles of lipoxygenases in development and responses to stress in plants. *Plants*, 11(7), 979. <https://doi.org/10.3390/plants11070979>
- Sinha, S., Doble, M., & Manju, S. L. (2019). 5-Lipoxygenase as a drug target: a review on trends in inhibitors structural design, SAR and mechanism based approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(17), 3745–3759. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.06.040>
- Skrzypczak-Jankun, E., Jankun, J., & Al-Senaidy, A. (2012). Human lipoxygenase: developments in its structure, function, relevance to diseases and challenges in drug development. *Current Medicinal Chemistry*, 19(30), 5122–5127. <https://doi.org/10.2174/092986712803530520>
- Snodgrass, R. G., & Brüne, B. (2019). Regulation and functions of 15-Lipoxygenases in human macrophages. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 719. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00719>
- Souza, F. da C., Ferreira, M. T., & Colquhoun, A. (2020). Influence of lipoxygenase inhibition on glioblastoma cell biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8395. <https://doi.org/10.3390/ijms21218395>
- Srivastava, P., Vyas, V. K., Variya, B., Patel, P., Qureshi, G., & Ghate, M. (2016). Synthesis, anti-inflammatory, analgesic, 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibition activities, and molecular docking study of 7-substituted coumarin derivatives. *Bioorganic Chemistry*, 67, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.06.004>
- Tamulaitiene, G., Jovaisaite, V., Tamulaitis, G., Songailiene, I., Manakova, E., Zaremba, M., Grazulis, S., Xu, S.-Y., & Siksnys, V. (2017). Restriction endonuclease AgeI is a monomer which dimerizes to cleave DNA. *Nucleic Acids Research*, 45(6), 3547–3558. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1310>
- Tran, A. M., Nguyen, T. T., Nguyen, C. T., Huynh-Thi, X. M., Nguyen, C. T., Trinh, M. T., Tran, L. T., Cartwright, S. P., Bill, R. M., & Tran-Van, H. (2017). *Pichia pastoris* versus *Saccharomyces cerevisiae*: a case study on the recombinant production of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *BMC Research Notes*, 10, 148. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2471-6>
- Using gradient PCR to determine the optimum annealing temperature.* (n.d.). Retrieved May 26, 2023, from <https://www.drugdiscoveryonline.com/doc/using-gradient-pcr-to-determine-the-optimum-a-0002>
- Venckus Ž. Bakterinės lipoksigenazės raiškos mielėse *Saccharomyces cerevisiae* tyrimas [bakalaurinis darbas]. Vilnius: Vilniaus universitetas; 2018.
- Vaezi, M. A., Safizadeh, B., Eghtedari, A. R., Ghorbanhosseini, S. S., Rastegar, M., Salimi, V., & Tavakoli-Yaraki, M. (2021). 15-Lipoxygenase and its metabolites in the pathogenesis of breast cancer: a double-edged sword. *Lipids in Health and Disease*, 20(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01599-2>
- Vidal-Mas, J., Busquets, M., & Manresa, A. (2005). Cloning and expression of a lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87(3), 245–251. <https://doi.org/10.1007/s10482-004-4021-1>

- Villatoro-Hernández, J., Kuipers, O. P., Saucedo-Cárdenas, O., & Montes-de-Oca-Luna, R. (2012). Heterologous protein expression by *Lactococcus lactis*. In A. Lorence (Ed.), *Recombinant Gene Expression* (Vol. 824, pp. 155–165). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9_8)
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., & Marillonnet, S. (2011). A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS ONE*, *6*(2), e16765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>
- Weinacker, D., Rabert, C., Zepeda, A. B., Figueroa, C. A., Pessoa, A., & Fariás, J. G.. (2013). Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(4), 1043–1048. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000400004>
- Weis, R., Luiten, R., Skranc, W., Schwab, H., Wubbolts, M., & Glieder, A. (2004). Reliable high-throughput screening with *Pichia pastoris* by limiting yeast cell death phenomena. *FEMS Yeast Research*, *5*(2), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.06.016>
- Xu, S., Mueser, T. C., Marnett, L. J., & Funk, M. O. (2012). Crystal structure of 12-lipoxygenase catalytic-domain-inhibitor complex identifies a substrate-binding channel for catalysis. *Structure*, *20*(9), 1490–1497. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.06.003>
- Zhang, C., Cao, S., Jin, Y., Ju, L., Chen, Q., Xing, Q., & Qi, H. (2017). Melon13-lipoxygenase CmLOX18 may be involved in C6 volatiles biosynthesis in fruit. *Scientific Reports*, *7*(1), 2816. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02559-6>
- Zhang, K., Yin, X., Shi, K., Zhang, S., Wang, J., Zhao, S., Deng, H., Zhang, C., Wu, Z., Li, Y., Zhou, X., & Deng, W. (2021). A high-efficiency method for site-directed mutagenesis of large plasmids based on large DNA fragment amplification and recombinational ligation. *Scientific Reports*, *11*(1), 10454. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89884-z>
- Zhu, J., Wang, X., Guo, L., Xu, Q., Zhao, S., Li, F., Yan, X., Liu, S., & Wei, C. (2018a). Characterization and alternative splicing profiles of the lipoxygenase gene family in tea plant (*Camellia sinensis*). *Plant and Cell Physiology*, *59*(9), 1765–1781. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy091>



## PRIEDAS

*I priedas*  
 “Golden Gate Assembly” reakcijos mišiniai (tūris pateiktas µl):

	Restrikuotas vektorius 40 fmol				Nerestrikuotas vektorius 40 fmol				Nerestrikuotas vektorius 800 fmol					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Medžiaga	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
BB3aZ_14* (restrikuotas)	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BB3aZ_14* (nerestrikuotas)	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X
GAP promotorius	X	X	-	-	X	X	X	X	-	-	X	X	X	-
CYC terminatorius	X	X	-	-	X	X	X	X	-	-	X	X	X	-
Tikslinė DNR (lox genas)	X	X	-	-	X	X	X	X	-	-	X	X	X	-
<i>FastDigest</i> buferinis tirpalas	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ATP	2	2	2	-	2	2	2	2	-	-	2	2	2	-
T4 DNR ligazė	1	1	1	-	1	1	1	1	-	-	1	1	1	-
<i>BpiI</i>	1	1	-	-	1	1	1	1	1	-	1	1	1	-
H <sub>2</sub> O	iki 20	iki 20	iki 20	iki 20	iki 20	iki 20	iki 20	iki 20	iki 20	iki 20	iki 20	iki 20	iki 20	iki 20
<b>GGA reakcija - Inkubacija termocikleryje</b>														
<i>BpiI</i> (papildomas karpymas)	-	0,5	-	-	0,5	-	0,5	0,5	-	-	-	0,5	0,5	-
Egzonukleazė III	-	-	-	-	0,5	-	-	0,5	-	-	-	-	0,5	-
<b>Išaugusių klonų skaičius</b>	<b>63</b>	<b>22</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>&gt;500</b>	<b>&gt;850</b>	<b>400</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>&gt;1000</b>	<b>&gt;1000</b>	<b>&gt;1000</b>	<b>0</b>

X – kiekvienos DNR kiekis apskaičiuojamas pagal formulę: Y (fmol) × dydis (bp) / koncentracija (ng/µl) / 1520  
 Y – 40 arba 800 fmol