VILNIAUS UNIVERSITETAS

GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

NEDA JONUTYTĖ-TREMBO

Mikrobiologijos studijų programa

Magistro baigiamasis darbas

MIELIŲ SUP35NM GENO KLONAVIMAS IR RAIŠKA Escherichia coli LĄSTELĖSE

Darbo vadovė J. asist. Justina Versockienė

.....

(parašas)

Neda Jonutytė-Trembo

.....

(parašas)

Vilnius 2022

| TURINYS |
|---------|
|---------|

| SANTRUMPŲ SĄRAŠAS4 |
|--|
| ĮVADAS6 |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA8 |
| 1.1 Žmonių ląstelinis prioninis baltymas8 |
| 1.2 Mielių Saccharomyces cerevisiae modelinė sistema |
| 1.3 Mielių S. cerevisiae prionai |
| 1.3.1 Prionų domenai |
| 1.3.2 Prionų variantai11 |
| 1.3.3 [PSI ⁺] priono baltymas Sup3512 |
| 1.3.4 [PIN ⁺] priono baltymas Rnq114 |
| 1.4 Amiloidai ir jų struktūra15 |
| 1.5 Eukariotinių baltymų sintezė prokariotinėje sistemoje18 |
| 1.6 Baltymų sintezės optimizacija22 |
| 1.7 Elektroporacija27 |
| 2. MEDŽIAGOS IR METODAI |
| 2.1 Medžiagos |
| 2.1.1 Reagentai |
| 2.1.2 Prietaisai |
| 2.1.3 Kultyvavimo terpės ir jų priedai |
| 2.1.4 Tirpalai |
| 2.1.5 Naudoti kamienai ir plazmidės |
| 2.2 Metodai |
| 2.2.1 Molekulinės biologijos metodai |
| 2.2.2 Mikrobiologijos metodai |
| 2.2.3 Duomenų analizės ir vizualizavimo metodai |
| 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS |
| 3.1 pET-21c(+) ir pNMG plazmidžių bioinformatinė analizė |
| 3.2 pET-21c(+) ir pNMG plazmidžių skyrimas iš <i>E. coli</i> DH5α kamieno ląstelių ir DNR hidrolizė EcoRI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis |
| 3.3 Hidrolizuoto pET-21(+) vektoriaus ir SUP35NM-GFP geno fragmento gryninimas, ligavimas, <i>E. coli</i> DH5α kamieno transformacija gautu ligatu |

| 3.4 pET-21c(+)- <i>SUP35NM-GFP</i> konstrukto perkėlimas į <i>E. coli</i> BL21(DE3) ir <i>E. c</i> raiškos kamienus. Sup35NM-GFP baltymo sintezė ir jos optimizavimas <i>E. coli</i> BL2 Rosetta raiškos kamienuose | <i>oli</i> Rosetta(DE3) 1(DE3) ir <i>E. coli</i> 41 |
|---|---|
| 3.5 <i>E. coli</i> BL21(DE3) kamieno transformacija pRSETB-8xHis- <i>SUP35NM</i> konstr baltymo sintezė ir jos optimizavimas <i>E. coli</i> BL21(DE3) raiškos kamiene | ruktu. Sup35NM |
| 3.6 <i>E. coli</i> BL21(DE3) Star TM kamieno transformacija pRSETB-8xHis-SUP35 Sup35NM baltymo sintezė ir jos optimizavimas <i>E. coli</i> BL21(DE3) Star TM raiškos ka | <i>NM</i> konstruktu. amiene. 46 |
| 3.5 pET-21c(+)-GD25 konstrukto perkėlimas į E. coli BL21(DE3) raiškos kamiena sintezė ir jos optimizavimas E. coli BL21(DE3) raiškos kamiene | ą. Gd25 baltymo 47 |
| IŠVADOS | 51 |
| SANTRAUKA | |
| SUMMARY | 53 |
| LITERATŪROS ŠALTINIAI | 54 |
| PADĖKA | 66 |
| FINANSAVIMAS | 67 |

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- PrP prioninis baltymas, angl. prion protein.
- OPRI papildomi oktapeptidinių pakartojimų įterpimai.
- BMR branduolinio magnetinio rezonanso spektroskopija.
- DNR deokisribonukleorūgštis.
- RNR ribonukleorūgštis.
- PrD prioną formuojantis domenas.
- Sup35 S. cerevisiae transliacijos terminacijos faktorius.
- Ure2 *S. cerevisiae* baltymas dalyvaujantis azoto apykaitoje.
- Rnq1 S. cerevisiae nežinomos funkcijos baltymas.
- [PSI⁺] prioninė Sup35 baltymo forma.
- [Ure3] prioninė Ure2 baltymo forma.
- [PIN⁺] prioninė Rnq1 baltymo forma.
- Hsp104 karščio šoko baltymas.
- ade1-14 mutacija Ade1 baltymo gene lemianti raudono pigmento kaupimąsi ląstelėse.
- TEMED tetrametiletilendiaminas, angl. *tetramethylethylenediamine*.
- NDS natrio dodecilsulfatas.
- NDS-PAGE natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelio elektroforezė.
- APS amoniopersulfatas, angl. ammonium persulfate.
- TRIS tris(hidroksimetil)aminometanas, angl. tris(hydroxymethyl)aminomethane.
- YPD standartinė mielių auginimo terpė, angl. yeast peptone dextrose.
- SC sintetinė pina terpė, angl. synthetic complete medium.
- EDTA dinatrio etilendiamino-tetraacetatas, angl. ethylenediamine tetraacetic acid.

PVDF – polivinilideno difluoridas, angl. polyvinylidene difluoride.

ĮVADAS

Prionai – tai baltyminės infekcinės dalelės, kurios veikia kaip patogenai ir lemia mirtinų neurodegeneracinių ligų išsivystymą žmogaus ir kitų gyvūnų organizmuose. Prionai, skirtingai nei kiti patogenai, tokie kaip bakterijos, virusai ar grybai, yra sudaryti iš baltymų ir savo sudėtyje neturi nukleorūgščių. Šie baltymai yra linkę agreguoti ir yra ypač atsparūs įvairiems fiziniams, cheminiams ir biologiniams veiksniams. Dėl šių unikalių prionų savybių jie yra aktyviai tiriami.

Prioniniai baltymai agreguodami sudaro ilgas baltymines struktūras – amiloidines fibriles. Amiloidinės fibrilės pasižymi struktūros polimorfizmu – jos geba formuoti skirtingos konformacijos fibriles, esant tokiai pačiai polipeptidinės grandinės aminorūgščių sekai. To paties priono skirtingų konformacijų fibrilės paprastai yra vadinamos priono kamienais arba variantais ir lemia skirtingų fenotipų atsiradimą. Vis svarbiau tampa atskirti tokius priono variantus, nes jie gali sukelti patologiškai skirtingas užkrečiamas ligas.

Mielių *Saccharomyces cerevisiae* prionai yra užkrečiami baltymai, dažniausiai savaime plintantys normaliai tirpių baltymų amiloidai. Šie prionai neturi homologų žmogaus organizme, todėl galima saugiai vykdyti prioninių baltymų tyrimus. Mielės *S. cerevisiae* yra plačiai paplitusi modelinė sistema, kurioje ir buvo nustatyti prionų indukcijos, plitimo, agregatų formavimo ir eliminacijos mechanizmai, taip pat skirtingų prioninių baltymų tarpusavio sąveikos.

S. cerevisiae baltymas Sup35 (Sup35p) yra eRF3 šeimos transliacijos pabaigos faktorius. Šios šeimos baltymai turi konservatyvų C-galinį domeną, atsakingą už transliacijos nutraukimą, ir skirtingos struktūros N-galinius plėtinius. Sup35p N-galinis domenas apibrėžia jo gebėjimą pereiti į paveldimą prioną panašų konformacinį perjungimą, kuris pasireiškia kaip citoplazminiu būdu paveldimas [PSI ⁺] determinantas.

Šio darbo tikslas buvo sukurti raiškos sistemą Sup35NM baltymo sintezei *E. coli* ląstelėse. Ši sistema yra reikalinga siekiant gauti natyvios struktūros Sup35NM baltymus, kurie vėliau būtų panaudojami prionizacijos mechanizmo tyrimuose.

Darbo tikslas: Klonuoti *SUP35NM* geną į bakterijų raiškos vektorių ir optimizuoti baltymo Sup35NM sintezę *E. coli* raiškos kamienuose.

Darbo uždaviniai:

- 1. Klonuoti *SUP35NM-GFP* geną į pET-21c(+) raiškos vektorių;
- Įvesti pET-21c(+)-SUP35NM-GFP konstruktą į E. coli BL21(DE3) ir E. coli Rosetta (DE3) raiškos kamienų ląsteles;
- Optimizuoti Sup35NM baltymo sintezę: nustatyti optimalią induktoriaus koncentraciją ir indukcijos laiką;
- 4. Įvertinti baltymų sintezę naudojant kontrolinius rekombinantinius konstruktus *E. coli* raiškos kamienuose.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Žmonių ląstelinis prioninis baltymas

Baltymas, kuris sukelia prionų ligą, vadinamas PrP^C ir yra užkoduotas geno *PRNP* žmogaus 20 chromosomoje (Bagyinszky et al., 2018). Kaip ir visi baltymai, PrP turi būdingą konformaciją, tačiau tam tikromis sąlygomis šis baltymas susilanksto į netaisyklingą formą, kuri po ilgo inkubacinio laikotarpio sukelia mirtinas neurodegeneracines ligas (Geschwind, 2015).

Priono baltymas, PrP^C, yra mažas, ląstelės paviršiaus glikoproteinas, visų pirma pasižymintis lemiamu vaidmeniu neurodegeneracinių sutrikimų, žinomų kaip prionų ligos, patogenezėje. Prioninių ligų požymis yra PrP^C virsmas į neįprastai sulankstytą izoformą kuri yra šablonas tolesnei patogeninio PrP^C baltymo konversijai. Ši savybė leidžia ligai plisti iš ląstelės į ląstelę ir tam tikromis aplinkybėmis pereiti į naują šeimininką. Be neurotoksiškumo, kurį sukelia netinkamai sulankstyta (-os) forma (-os), normalios PrP^C funkcijos praradimas gali būti neatsiejama neurodegeneracinių procesų dalis, todėl didelės mokslinių tyrimų pastangos buvo nukreiptos į PrP^C fiziologines funkcijas (Gill et al., 2018).

Per daugelį tyrimų metų PrP^C buvo siejamas su daugybe skirtingų ląstelių procesų ir buvo nustatyta daug sąveikaujančių ląstelinių baltymų. Tačiau naujausi tyrimai kėlia abejonių dėl anksčiau nusistovėjusių ryšių tarp PrP^C ir procesų, tokių kaip apsauga nuo streso, vario homeostazė ir neuronų sužadinimas. PrP^C funkcijos, kurias geriausiai palaiko dabartinė literatūra, apima mielino palaikymo ir procesų, susijusių su ląstelių diferenciacija, reguliavimą, įskaitant proliferaciją, adheziją ir ląstelių morfologijos kontrolę. Taip pat buvo atrasti ryšiai tarp PrP^C ir cirkadinio ritmo, gliukozės homeostazės, imuniniteto funkcijų ir ląstelių geležies įsisavinimo moduliavimo, tačiau reikalingi tolesni šių sąveikų tyrimai (Castle et al., 2017).

1.2 Mielių Saccharomyces cerevisiae modelinė sistema

Kepimo mielės *Saccharomyces cerevisiae* yra vienaląsčiai eukariotai, plačiai naudojami gyvybės mokslų tyrimuose, kaip aukštesniųjų eukariotų modeliai. Kadangi *S. cerevisiae* yra vienaląstis organizmas, jis turi tam tikrų akivaizdžių apribojimų neuromokslų tyrimuose. Mielių prionai yra plačiai tiriami ir žinoma, kad jie turi tam tikrų bendrų bruožų su žinduolių prionų baltymais (žiūrėti 1.1 pav.) arba kitais amiloidogeniniais baltymais, randamais Alzheimerio, Parkinsono ar Hantingtono ligų patogenezėje (Ishikawa, 2021). Todėl mielės *S. cerevisiae* buvo plačiai naudojamos fundamentiniams baltymų agregacijos, sąveikų ląstelėje ir jų propagacijos

tyrimams. Neseniai mielėmis pagrįstas tyrimas atskleidė, kad kai kurie žinduolių priono baltymo ir amiloido β_{1-42} regionai gali indukuoti ir dauginti mielių prionus. Tai vienas iš pavyzdžių, rodančių, kad evoliuciškai nutolę organizmai turi bendrų prionų baltymų struktūrinės konversijos mechanizmų, todėl mielių ląstelės yra naudinga žinduolių prionų baltymų tyrimo sistema (Chandramowlishwaran et al., 2018).

S. cerevisiae modelinė sistema taip pat buvo naudojama kuriant naujas anti-prioninių junginių atrankos sistemas iš cheminių bibliotekų. Mielių pagrindu atliekami tyrimai yra pigūs ir saugūs tyrėjui, todėl jie yra labai geras pasirinkimas atlikti išankstinį patikrinimą prieš tolesnius tyrimus sistemose, kuriose dalyvauja prionais užkrėstos žinduolių ląstelės (Ishikawa, 2021).



1.1 pav. Bendros žinduolių ir mielių prionų baltymų savybės.

Nepaisant nesusijusių žinduolių ir mielių prionų baltymų molekulinių funkcijų, jie turi bendrų bruožų. Konversija tarp natūralių ir netinkamai sulankstytų struktūrų įvyksta atsitiktinai, o pastarąją dar labiau stabilizuoja agregacija. Ir žinduolių, ir mielių prionai yra savaime besidauginančios dalelės – amiloidai, jie gali priversti natūralų baltymą paversti netinkamai sulankstyta forma, kuri gali būti įtraukta į amiloidus. Jie suskaidomi, kai pasiekia itin didelius matmenis. *S. cerevisiae* Hsp104 šaperonas dalyvauja šio proceso palaikyme. Natūralus PrP arba Sup35 baltymas gali būti paverstas netinkamai sulankstyta forma ir įtrauktas į amiloidus. Taškinės rodyklės rodo hipotetinius (PrP) arba galimus (Sup35 baltymo) procesus, o vientisa rodyklė rodo, kad Hsp104 baltymas yra būtinas [PSI⁺] prionui propaguoti (Ishikawa, 2021).

1.3 Mielių S. cerevisiae prionai

Mielių ir grybelių prionai yra sudaryti iš baltymų, paprastai pakitusios baltymo formos, katalizuojančios baltymo konformacinius pokyčius. Taigi mielių prionai perduodami vertikaliai, ir horizontaliai (kaip infekciniai baltymai arba prionai). Daugumos mielių prionų pagrindas yra amiloidų

susidarymas, o vienas priono baltymas gali turėti bet kurią iš kelių skirtingų savaime besidauginančių amiloido formų (Wickner et al., 2015).

S. cerevisiae genomas koduoja keletą baltymų, kurie laboratoriniuose kamienuose gali įgyti stabilią, perduodamą priono formą. Kiekvienu atveju tam reikia, kad baltymo Q/N turtingas prionus formuojantis domenas (PrD) būtų nepažeistas (Resende et al., 2003).

Daugybė filogenetiškai nesusijusių prionų, kai kurie iš jų gali turėti įtakos daugeliui ląstelių procesų, yra aprašyti *S. cerevisiae* (1.1 lentelė). Šis sąrašas yra negalutinis, nes daugelis mielių baltymų domenų, kurie gali suteikti prionų savybių, susilieję su reporterio konstrukcija, dar nebuvo ištirti dėl jų gebėjimo išlaikyti natyvių baltymų priono būseną (Chernova et al., 2014).

Visi mielių prionai turi keletą bendrų savybių. Visų pirma, to paties baltymo tirpios ir amiloidinės būsenos sukelia skirtingus fenotipus. Be to, dauguma prionų gali turėti daugybę amiloidinių konformacijų su skirtingu suskaidymo ir pailgėjimo greičiu. Jie sukuria prionų variantus, kurie turi skirtingą tirpių ir amiloido izoformų santykį, todėl turi skirtingus fenotipus ir dauginimosi galimybes (Chernova et al., 2014).

| Baltymas | Prionas | Baltymo funkcija | Priono fenotipas | Šaltinis |
|----------|-----------|------------------------|----------------------------------|-----------------|
| Ure2 | [URE3] | Reguliuojantis | Prasto azoto šaltinio | (Wickner, |
| | | baltymas azoto | naudojimas | 1994) |
| | | metabolizmo kelyje | | |
| Sup35 | [PSI+] | Transliacijos | Padidėjusi "nonsense" | (Cox, 1965) |
| | | terminacijos faktorius | supresija | |
| Rnq1 | [PIN+]/ | Nežinoma | Padidėjęs de novo kitų prionų | (Derkatch et |
| | [RNQ+] | | susidarymas | al., 1997) |
| Swi1 | [SWI+] | Chromatino | Pakitęs anglies šaltinio | (Du et al., |
| | | remodeliavimo | utilizavimas | 2008) |
| | | komplekso subvienetas | | |
| Cyc8 | [OCT+] | Transkripcijos | Pakitęs anglies šaltinio | (Patel et al., |
| | | korepresorius | utilizavimas, flokuliacija | 2009) |
| Mot3 | [MOT+] | Transkripcijos | Ląstelės sienelės sudėties | (Alberti et |
| | | korepresorius | pasikeitimas | al., 2009) |
| Sfp1 | [ISP+] | Transkripcijos | Antisupresija | (Rogoza et |
| | | aktyvatorius | | al., 2010) |
| Mod5 | [MOD+] | tRNR modifikavimo | Padidėjęs ergosterolio kiekis ir | (Suzuki et al., |
| | | fermentas | atsparumas priešgrybeliniams | 2012) |
| | | | vaistams | |
| Nup100 | [NUP100+] | FG-nukleoporinas | Padidėjęs medžiagų | (Halfmann et |
| | | | transportas į branduolį | al., 2012) |

1.1 Lentelė S. cerevisiae prionai (Chernova et al., 2014).

1.3.1 Prionų domenai

Mielių PrD yra plačiai aprašyta ypač [PSI⁺], [URE3] ir [RNQ⁺]. Bendrai PrD yra būdinga daug Q/N, netvarkingas išsidėstymas modulumas ir galimybė sudaryti amiloido pagrindu pagamintus agregatus, būtinas prionų susidarymui ir perdavimui (Du, 2011).

Ryškiausias mielių PrD sudėtinis bruožas yra Q ir N liekanų gausa, kurių bendras kiekis yra apie 37–49 %, palyginti su vidutiniu mielių proteomo Q/N kiekiu – 10 % Sup35 ir Rnq1 PrD turi daugiau Q nei N, o jų Q ir N liekanos yra gana tolygiai pasiskirsčiusios visuose PrD. Swi1, Sfp1, Mot3 ir Ure2 PrD yra praturtinti tiek Q, tiek N, tačiau juose yra daugiau N liekanų, o jų Q liekanos nėra tolygiai pasiskirstę jų PrD. Taigi mielių PrD gali būti daug N, Q/N arba Q (Du, 2011). Q ir N liekanų reikšmė lemianti prionų susidarymą ir baltymų agregaciją buvo plačiai ištirta (Du, 2011).

Tiek Ure2, tiek Sup35 PrD yra daug Q/N ir iš esmės netvarkingi. Pirminės Ure2 ir Sup35 PrD sekos sumaišymas nepanaikina galimybės formuoti prionus, o tai rodo, kad aminorūgščių sudėtis, o ne pirminė seka, yra daugiausia atsakinga už prionų aktyvumą. Sup35 ir Ure2 PrD turi daug sudėtinių ypatybių, įskaitant nepakankamą įkrautų ir labai hidrofobinių liekanų kiekį, palyginti su mielių proteomu, ir daug polinių aminorūgščių bei glicino (Cascarina et al., 2014).

Remiantis sudėties panašumu į žinomus prionus, buvo nustatyta ir keletas naujų prionų. Kiti sudėties ypatumai, įskaitant polinkį į seriną, tiroziną ir gliciną, matomi tik kai kuriuose PrD pogrupiuose (Cascarina et al., 2014).

1.3.2 Prionų variantai

Mielių prionų baltymai turintys vieną seką gali būti daugelio paveldimų, aiškiai skirtingų prionų, vadinamų "prionų variantais" arba "prionų kamienais", pagrindu. Mielių prionų [PSI⁺] ir [URE3] variantai pirmiausia buvo išskirti kaip "stiprūs" ir "silpni", o tai reiškia priono fenotipo stiprumą, atspindintį normalios baltymo formos trūkumo laipsnį. Prionų variantai taip pat labai skiriasi savo stabilumu, dažnumu, kuriuo jie prarandami dėl mitozinio augimo. Yra tam tikra koreliacija, kai variantas yra stiprus ir stabilus arba silpnas ir nestabilus, paaiškinama tuo, kad pastebėtas trumpesnis stiprių filamentų dydis ir ilgesnis silpnų filamentų ilgis. Manoma, kad didesnis filamentų galų skaičius padeda užfiksuoti didesnę monomerų dalį, taigi ir "stiprų" fenotipą. Panašiai dėl didesnio filamentų skaičiaus stipriame variante yra mažesnė tikimybė, kad dukterinė ląstelė negaus filamentų. Tačiau buvo aprašyti stiprūs nestabilūs ir silpni stabilūs [URE3] priono variantai, todėl šios koreliacijos nėra absoliučios (Wickner et al., 2019).

Jau seniai keliama hipotezė, kad prionų baltymai gali pasiekti ne tik vieną infekcinę amiloido konformacija, bet ir susijusių, tačiau skirtingų, savaime besitesiančių konformacijų, koduojančių skirtingus biologinius fenotipus, rinkinį. Tai buvo įrodyta, transformacijos būdu į mieles įvedus NM amiloidus, turinčius skirtingas fizines savybes, kurios sukūrė skirtingus fenotipus. Šių tyrimų metu nustatyta, kad skirtingos NM amiloido konformacijos gali susidaryti paprasčiausiai surenkant filamentus skirtingomis temperatūromis (žiūrėti 1.2. pav.). Tarp dviejų filamentų populiacijų yra didelių struktūrinių skirtumų, kuriuos rodo skirtingas jų terminis stabilumas (pluoštai, susidarę 4 °C temperatūroje, lydosi žemesnėje temperatūroje nei susidarę 25 °C temperatūroje). Kai amiloidai, susidarę 4 °C temperatūroje, buvo perkelti į mieles, lastelės pasižymėjo prastesniu translacijos terminacijos efektyvumu (stiprus [PSI⁺] fenotipas). Priešingai, mielių transformacija 25 °C temperatūroje susidariusiais amiloidais lėmė didesnį translacijos terminacijos efektyvumą mielių ląstelėse (silpnas [PSI⁺] fenotipas) (Tessier et al., 2009).



1.2 pav. Sup35 baltymo prionų variantai.

Sup35 NM fragmentai esant skirtingomis temperatūromis sukuria unikalias amiloidines konformacijas, kurios, patekusios i S. cerevisiae, sukelia skirtingus prionų fenotipus, vizualizuojamus pagal koloniju spalvos skirtumus (Tessier et al., 2009).

1.3.3 [PSI⁺] priono baltymas Sup35

Mielėse prionai pasireiškia kaip paveldimi genetiniai elementai. Geriausiai ištirti mielių prionai yra [PSI⁺], jis sudarytas iš transliacijos terminacijos faktoriaus eRF3 priono formos, dar žinomo kaip Sup35. Sup35 sudaro trys domenai. N-galo (N) domenas (aminorūgščių liekanos 1–123) yra būtinas ir pakankamas [PSI⁺] plitimui. Vidurinis (M) domenas (124–253 liekanos) saveikauja su Hsp104 šaperonu per 128–148 sritį. Esminis C-galo domenas (254–685 liekanos) dalyvauja transliacijos terminacijoje (Žiūrėti 1.3 pav.).





Sup35p N-galinėje srityje yra tiek glutamino, tiek asparagino (Q/N) turtinga sritis ir oligopeptidų pasikartojimų, reikalingų prionams susidaryti. M sritis sąveikauja su šaperonų mechanizmais ir skatina tam tikrų [PSI+] variantų susidarymą (Lyke et al., 2019).

Ryšį tarp prionų fenotipo ir amiloido struktūros visų pirma lemia Hsp104 šaperonas, padedamas Hsp70 ir Hsp40 šaperonų, skirtingų prionų atžvilgiu. Hsp104 suskaido Sup35 amiloidus į mažesnius fragmentus, taip padaugindamas amiloido galus, kurie gali įtraukti naujas Sup35 molekules į amiloidą. Amiloido struktūra apibrėžia, kaip dažnai jį atpažįsta Hsp104 ir (arba) kaip lengvai Hsp104 gali išskirti protomerą t.y oligomerinio baltymo struktūrinį vienetą, taip suskaidydamas amiloido dalelę į dvi dalis. Dažnesnis skilimas paprastai lemia mažesnes, bet didesnį kiekį amiloido dalelių, greitesnę amiloido konversiją, mažesnį neagreguoto funkcinio Sup35 baltymo lygį, didesnę "nonsense" supresiją ir stabilesnį paveldėjimą. Tokie [PSI⁺] variantai vadinami "stipriais". Retesnis Hsp104 veikimas lemia "silpną" [PSI⁺] variantą, išsiskiriantį vidutine "nonsense" supresija ir didesniu neagreguoto Sup35 baltymo lygiu. Tikrasis alternatyvių Sup35 amiloido struktūrų, pasireiškiančių [PSI⁺] variantais, skaičius yra neaiškus ir gali būti labai didelis, tačiau paprastai ne daugiau kaip keturis [PSI⁺] variantus galima patikimai atskirti pagal "nonsense" supresiją ar kitus fenotipus. Taip pat nėra aišku, ar visus [PSI⁺] variantus galima suskirstyti į dvi skirtingas grupes, tokias kaip stiprus ir silpnas, ar jie yra tęstinumas su palaipsniui besikeičiančių fenotipu (Dergalev et al., 2019).

Keli veiksniai turi įtakos [PSI⁺] priono atsiradimui. Per didelė Sup35 arba tik jo N domeno sintezė sukelia *de novo* [PSI⁺] atsiradimą. Eliminavus [PSI⁺] naudojant GuHCl, kai kurios ląstelės buvo indukuojamos į [PSI⁺] būseną dėl per didelės Sup35 baltymo sintezės, o kitos ląstelės buvo visiškai atsparios [PSI⁺] indukcijai. Genetinė šių skirtumų analizė leido iškelti hipotezę, kad kitas į prionus panašus veiksnys kontroliuoja [PSI⁺] atsiradimą. Šis kontroliuojantis faktorius, vadinamas [PIN⁺],

egzistuoja nepriklausomai nuo [PSI⁺] ir buvo nustatytas kaip Rnq1 baltymo priono forma (Bradley et al., 2003).

1.3.4 [PIN⁺] priono baltymas Rnq1

Rnq1 yra nežinomos funkcijos baltymas ir yra vienas iš kelių žinomų mielių baltymų, turinčių QN turtingą prionų domeną (žiūrėti 1.4 pav.), kurio pavadinimas kilęs iš "daug asparagino (N) ir glutamino (Q)" (angl. rich in asparagine (N) and glutamine (Q). Rnq1 sudaro prioną [PIN⁺] (pavadinimas kilęs iš "[PSI⁺] indukcija"), nes [PIN⁺] reikalingas efektyviai [PSI⁺] priono atsiradimui, bet ne [PSI⁺] priono propagavimui (Kurahashi et al., 2008).



1.4 pav. Rnq1 baltymo struktūra

Rnq1 baltymas turi N-galo sritį ir C-galo domeną, kuriame yra Q/N turtingi regionai, susiję su [PIN⁺] prionų palaikymu ląstelėje (Lyke et al., 2019).

Per didelė Sup35

baltymo sintezė sukelia

de novo [PSI⁺] atsiradimą, o [PSI⁺] *de novo* indukcijos efektyvumas labai padidėja, kai ląstelėje yra [PIN⁺]. Tyrimai patvirtina hipotezę, kad Rnq1 baltymo agregatai [PIN⁺] mielėse suteikia galimybę pradėti [PSI⁺] *de novo* prionizaciją (žiūrėti 1.5 pav.), nors taip pat įmanoma, kad [PIN⁺] agregatai titruoja [PSI⁺] prionų susidarymo inhibitorius. [PIN⁺] gali egzistuoti skirtingų paveldimų fenotipų variantais (pvz., silpnas, vidutinis, stiprus ir labai stiprus [PIN⁺]), kurie skiriasi efektyvumu, kuriuo skatina [PSI⁺] indukciją. Fluorescencinio žymėjimo tyrimai rodo kad, kai Rnq1 baltymas, kurio stiprus [PIN⁺] fenotipas sulietas su -GFP ir per daug ekspresuojamas, daugiausia rodo kelis fluorescencinius taškus, o kituose trijuose variantuose dažniausiai yra vienas taškas vienoje ląstelėje (Patel et al., 2007).



1.5 pav. [PIN⁺] sąveika su Sup35 baltymu.

[PSI⁺] susidarymąs naudojant kryžminio sėjimo mechanizmą, kuriame [PIN⁺] prionas gali paversti Sup35 baltymo tirpią formą į amiloidinį agregatą. Manoma, kad Q/N turtingų regionų sąveika tarpininkauja kryžminio sėjimo mechanizmui (Lyke et al., 2019).

Skirtingi [PIN⁺] variantai neegzistuoja vienoje ląstelėje. Atvirkščiai, kai poruojantis dviejų ląstelių, turinčių skirtingus [PIN⁺] variantus, citozoliai sumaišomi, susidariusios zigotos palikuonys turi tik vieną [PIN⁺] variantą, vadinamą "dominuojančiu" variantu. [PIN⁺] varianto "dominavimas" atvirkščiai koreliuoja su ląstelėje randamu neprionizuoto tirpaus Rnq1 baltymo kiekiu, t.y. kryžminant du [PIN⁺] variantus visada buvo nustatyta, kad mažiau tirpus Rnq1 yra "dominuojantis". Galimas šio reiškinio paaiškinimas yra tas, kad kiekvienas [PIN⁺] variantas pasižymi tam tikru efektyvumu, kuriuo jis prijungia Rnq1 baltymo molekules į prionų agregatus. Kai citozolyje yra du [PIN⁺] variantai, veiksmingesnis "prijungėjas" pasisavins didžiąją dalį tirpaus Rnq1 baltymo, galimo agreguoti, trukdydamas augti prastai prijungiančiam variantui ir galiausiai sukeldamas mažiau efektyvaus varianto praskiedimą ir išnykimą. Pradinis [PSI⁺] indukcijos palengvinimo fenotipas gali būti nesusijęs su visais Rnq1 baltymo priono variantais. Be to, kiti prionai, pvz. [URE3], o tam tikrų į prionus panašių Q/N turtingų baltymų perprodukcija gali palengvinti [PSI⁺] indukciją, kai nėra [PIN⁺]. Teigiama, kad šios ląstelės turi [PIN⁺] fenotipą, nors jos išlieka [pin⁻], nes Rnq1 baltymas nėra priono formos (Liebman et al., 2006).

1.4 Amiloidai ir jų struktūra

Amiloidas yra gijinis baltymų monomerų polimeras, kurio didžioji dalis yra β lakšto struktūros, kurioje β gijos eina statmenai ilgio filamento ašiai. Amiloidas yra labai tvarkingas agregatas, pasižymintis santykiniu atsparumu proteazėms ir specialiomis dažų surišimo savybėmis. Daugelio skirtingų baltymų amiloidinės gijos yra žmonių ligų, įskaitant Alzheimerio ligą, II tipo diabetą, Parkinsono ligą, senatvinę amiloidozę ir prionų ligas priežastis (Wickner et al., 2013). Atominės skiriamosios gebos rentgeno struktūros atskleidžia, kad pagrindinis skersinio β lakšto motyvas susideda iš poros glaudžiai besikartojančių β lakštų (žiūrėti 1.6 pav.)



1.6 pav. Amiloido sudaryto iš β lakštų modelis.

Įvairių amiloidų rentgeno spindulių difrakcijos tyrimai rodo "kryžminį β " modelį, šis modelis yra bendras visiems amiloidams. 4,75 Å yra atstumas tarp vandenilinėmis jungtimis surištų β gijų, o ~ 10 Å atstumas tarp β lakštų (Wickner et al., 2013).

Žvelgiant išilgai protofilamento ašies, du

β lakštai prilimpa dėl besijungiančių klosčių šoninių grandinių, panašiai kaip užtrauktuko dantys. Sudėtingas šoninių grandinių susipynimas rodo, kad fibrilių susidarymas priklauso nuo dalyvaujančių segmentų sekos. Tai yra, segmentai, sudarantys šias struktūras, yra vienas kitą papildantys. Fibrilių stabilumą lemia keli veiksniai. Vienas iš tokių veiksnių yra vandeniliniai ryšiai, susidarantys tarp stuburo amido grupių, kurios eina aukštyn ir žemyn β lakštais. Kadangi kiekviena amido vandenilinė jungtis yra polinė, lygiagrečių vandenilinių jungčių linijos yra nukreiptos į viršų ir žemyn β lakštais. Tokiu būdu vandeniliniai ryšiai poliarizuojasi, o tai sukuria kooperacinę formavimosi energiją (Tsemekhman et al., 2007). Kitas veiksnys yra van der Valso jėgos, susidarančios tarp glaudžiai sąveikaujančių β lakštų, porų. Trečias veiksnys yra vandens molekulių, išsiskiriančių iš dviejų taip glaudžiai susikertančių β lakštų, vidinių paviršių, entropijos padidėjimas. Kitas stabilizuojantis veiksnys yra šoninių grandinių, kurios eina aukštyn ir žemyn β lakštais, sąveika. Sąveikaujančios šoninės grandinės apima Tyr aromatinius žiedus, kurie susikaupia dėl $\pi - \pi$ sąveikos. Šoninės Asn, Gln, Thr ir Ser grandinės sudaro vandenilinius ryšius, žinomus kaip kopėčios, kurios eina aukštyn ir žemyn fibrilėmis (Sawaya et al., 2007).

Visi amiloido segmento mikrokristalai rodo, kad kryžminio β lakšto motyvas susideda iš dviejų, beveik begalinių, β lakštų su steriniu užtrauktuko šoninės grandinės sąsaja. Tačiau įvairios kryžminės β lakštų struktūros gali būti skirstomos į kategorijas pagal kelis kriterijus: ar jų β gijos lygiagrečios, ar antilygiagrečios; ar jų β lakštų paviršiai supakuoti su tais pačiais paviršiais (pakavimas akis į akį), ar skirtingi paviršiai (pakavimas vienas šalia kito); ir ar du glaudžiai supakuoti β lakštai yra nukreipti ta pačia kryptimi (aukštyn – aukštyn), ar priešinga kryptimi (aukštyn – žemyn). Šių trijų struktūrinių išdėstymų deriniai suteikia aštuonias teoriškai galimas sterinių užtrauktukų klases, iš kurių septynios dabar buvo matomos rentgeno struktūrose (žiūrėti 1.6 pav.) (Landreh et al., 2016). Lygiagrečiame β lakšte kiekviena β grandinė yra tiksliai virš β grandinės žemiau, o antilygiagrečiame β lakšte kiekviena β grandinė yra tiksliai virš β grandinės, kuri yra dviem klostėmis žemiau (Soriaga et al., 2016). Amiloidinio peptido kristalų struktūros rodo kryžminio β lakšto motyvo su sterinio užtrauktuko tipo šoninės grandinės sąveika paplitimą peptidų komplementacijoje ir oligomerizacijoje amiloidinėse fibrilėse. Tačiau svarbu atsižvelgti į tai, kokiu mastu amiloidinių fibrilių, susidarančių iš amiloidą formuojančių baltymų segmentų, struktūros atspindi fibrilių struktūras, kurias sudaro jų viso ilgio pirminiai baltymai (Wel et al., 2007).



1.7 pav. Amiloidinių protofilamentų, sudarytų iš trumpų amiloidą formuojančių baltymų segmentų, atominės skiriamosios gebos rentgeno spindulių difrakcijos sterinės-užtrauktukų struktūros (Riek et al., 2016).

Kiekviena struktūra iliustruoja vieną iš galimų sterinių užtrauktukų simetrijos klasių su vaizdais išilgai (viršuje) ir statmenai (apačiai) protofilamento ašiai. Vienas β lapas rodomas juodai, o kitas – pilkas. Pažymėtina, kad vandens molekulės (šviesiai mėlynos sferos) neįtraukiamos į glaudžią sąsają tarp β lakštų. Pavaizduoti azoto atomai (mėlyna), deguonies atomai (raudona), sieros atomai (geltona) ir β -klostės (rodyklės). Kiekvienai klasei pateikiama reprezentatyvaus segmento aminorūgščių seka, pirminis baltymas, iš kurio buvo pasirinktas segmentas, ir baltymų duomenų banko (PDB) prisijungimo kodas (skliausteliuose) struktūros koordinatėms. 1, 2 ir 4 klasės (viršutinė eilutė) apibūdina lygiagrečius β lakštus, o 5–8 klasės (apatinė eilutė) apibūdina antilygiagrečius β lakštus. Taip pat rodomos Asn ir Tyr kopėčios (viršuje dešinėje). 3 klasė eksperimentiškai dar nebuvo pastebėta. Kiekviena klasė apibrėžiama remiantis keliomis savybėmis: ar jų β -klostės yra lygiagrečios, ar antilygiagrečios; ar jų β lakštų paviršius yra vienodas (priešais veidas) arba skirtingas (priešais veidas į nugarą) vienas šalia kito; ir ar du glaudžiai supakuoti β lakštai yra nukreipti ta pačia kryptimi (aukštyn – aukštyn), ar priešinga (aukštyn – žemyn)

kryptimi. Apibendrinant: 1 klasėje yra lygiagrečių, akis į akį, aukštyn ir aukštyn struktūros; 2 klasėje yra lygiagrečios, viena kitai nukreiptos, aukštyn-aukštyn struktūros; 3 klasėje yra lygiagrečios, akis į akį, aukštyn-žemyn struktūros; 4 klasėje yra lygiagrečios, veidas į nugarą, aukštyn-žemyn struktūros; 5 klasėje yra antilygiagrečios, akis į akį, aukštyn ir aukštyn struktūros. 6 klasėje yra antilygiagrečios, veidas į nugarą, aukštyn ir aukštyn struktūros; 7 klasėje yra antilygiagrečios, akis į akį nukreiptos aukštyn-žemyn struktūros; ir 8 klasėje yra antilygiagrečios, akis į akį, aukštyn-žemyn struktūros.

Biologinį amiloidų poveikį lemia dvi bendros biocheminės savybės. Pirma, amiloidą formuojantys baltymai gali pereiti nuo tirpių monomerų į netirpias fibriles. Šis fazės pasikeitimas gali sutrikdyti ląstelių ir organų funkciją, prarandant esminę funkciją arba padidinant toksinę funkciją (Ano Bom et al., 2012). Antroji savybė yra pasikartojanti amiloidų struktūra. Kadangi kryžminė β lakštų struktūra daugiausia sudaryta iš tarpmolekulinių kontaktų, pradinį amiloido susidarymą lemia didelė amiloido baltymo koncentracija, o suaktyvėjus agregacijai, amiloidai gali išlikti neribotą laiką. Dėl subnanometrinio struktūros pasikartojimo nespecifinis aktyvumas, pvz., (netinkamas) ligandų surišimas, gali būti sustiprintas iki stipraus poveikio per avidiškumą. Jo pasikartojanti konfigūracija taip pat suteikia amiloidams galimybę jungtis prie kitų pasikartojančių biomolekulių, tokių kaip RNR, DNR, glikozaminoglikanai ir lipidų membranos, turinčios santykinai didelį afiniškumą (Geoghegan et al., 2007; Wang et al., 2010). Struktūrinis amiloidinio pluošto pasikartojimas yra idealus šablonas replikacijai, todėl gali būti perduodamas tarp ląstelių arba netgi užkrečiamas prioninių ligų atveju (Prusiner, 1998).

1.5 Eukariotinių baltymų sintezė prokariotinėje sistemoje

Bakterinė ekspresija yra labiausiai paplitusi ekspresijos sistema, naudojama rekombinantiniams baltymams gaminti. Organizmas *Escherichia coli* (*E. coli*), yra lengvai valdomas, nebrangus kultivuoti ir greitai generuoja rekombinantinį baltymą. Tačiau, kadangi tai yra prokariotų pagrindu sukurta sistema, ekspresuojami heterologiniai eukariotų baltymai nėra tinkamai modifikuojami, taip pat gali būti sunku palengvinti ekspresuoto baltymo sekreciją dideliais kiekiais. Be to, baltymai, išreikšti dideliais kiekiais, gali sudaryti inkliuzinius kūnus, o didelius sudėtingus baltymus gali būti sunku sintetinti (Jana et al., 2005).

1. Kodono naudojimas / šališkumas

Dauguma aminorūgščių buvo užkoduotos daugiau nei vienu kodonu, o visi turimi aminorūgščių kodonai yra šališki, kuriuos naudoja kiekvienas organizmas (žiūrėti 1.2 Lentelė). Ląstelių transportinė RNR (tRNR) atspindi jos mRNR kodono paklaidą. Kodono naudojimo *E. coli* tyrimai atskleidžia, kad labai išreikšti genai turi didesnę kodono paklaidą nei silpnai išreikšti, o naudojamų sinoniminių kodonų dažnis atspindi jų giminingų tRNR gausą. Tai gali reikšti, kad heterologiniai genai su gausiais kodonais,

retai naudojami *E. coli*, gali būti neefektyviai ekspresuojami *E. coli* ir gali sukelti transliacijos klaidą. Kodonų šališkumas tampa labai paplitusiomis problemomis, kai reti kodonai transkriptuose sudaro grupes, tokias kaip dupletai arba tripletai, kurių kiekis yra didelis. Transliacijos klaida, atsirandanti dėl reto kodono paklaidos, apima klaidingus aminorūgščių pakeitimus, rėmelio poslinkius arba priešlaikinį transliacijos nutraukimą (Khow et al., 2012).

1.2 Lentelė. Rečiausiai naudojami kodonai *E. coli*, mielėse, *drosophila*, *dictyostelium* ir primatuose (Sahdev et al., 2007).

| E. coli | Mielės | Drosophila | Dictyostelium | Primatai | Amino rūgštis |
|-----------|-----------|------------|---------------|----------|------------------|
| | | | | CGA, | |
| AGG, AGA, | AGG, CGA, | AGA, CGA, | AGG, CGA, | CGG, | Argining |
| CGA, CGG | CGG, CGC | CGG | CGG, CGC | CGC, | Arginnias |
| | | | | CGU | |
| AUA | | AUA | | | Izoleucinas |
| CUA | CUC | UUA | CUG | | Leucinas |
| CCC | CCG | | CCG | CCG | Prolinas |
| UCG | | AGU | UCG | UCG | Serinas |
| | GCG | | GCG | GCG | Alaninas |
| | ACG | | ACG | ACG | Treoninas |
| | | GGG | GGG | | Glicinas |
| | | UGU | | | Cisteinas |
| | | | CAG | | Gliutaminas |
| | | | GUG | | Valinas |

2. Baltymų susilankstymas

Rekombinantinių baltymų ekspresija *E. coli* daugiausia nukreipiama į tris skirtingas vietas, t.y. citoplazmą, periplazmą ir augimo terpę (per sekreciją). Pirmenybė teikiama ekspresijai citoplazmoje, nes gamybos išeiga paprastai yra didelė. Citoplazminis susilankstymas dažnai sustiprėja esant žemai temperatūrai, todėl šaltu indukuojamų promotorių naudojimas gali palengvinti šį procesą. Tačiau tai dažnai lydi klaidingas susilankstymas ir atsiskyrimas į netirpius agregatus, vadinamus inkliuziniais kūnais. Agregaciją galima sumažinti iki minimumo kontroliuojant tokius parametrus kaip temperatūra, ekspresijos greitis ir šeimininko metabolizmas. Nors inkliuzinio kūno susidarymas palengvina baltymų išgryninimą, nėra garantijos, kad *in vitro* perlankstymas sukurs didelius biologiškai aktyvių produktų kiekius. Norint išleisti rekombinantinius baltymus į periplazmą ir auginimo terpę, buvo ištirta daug

sistemų. Kadangi toks metodas yra sudėtingas, sistemos nebuvo komercializuojamos (Cabrita et al., 2006; Yin et al., 2007).

3. Baltymų fosforilinimas ir glikozilinimas

E. coli turi ribotą eukariotų posttransliacinio mechanizmo funkciją, kuri laikoma pagrindiniu eukariotinių fosfoproteinų, ty serino/treonino/tirozino proteinkinazių, gamybos

1.3 Lentelė. Biotechnologinai sprendimai gaminant biologiškai aktyvius baltymus naudojant *E. coli* ląsteles (Sahdev et al., 2007).

| E. coli ekspresijos sistemos iššūkiai | | Problemų sprendimo | Šaltiniai | |
|---------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------|--|
| | | būdai | | |
| Kodono šališkumas | 1. Retų tRNR genų | 1. pRIG, pRARE, | (Brinkmann et al., | |
| | kombinacijos; | pACYC, pSC101; | 1989; Cinquin et al., | |
| | | | 2001; Rosenberg et | |
| | | | al., 1993; Sharp et al., | |
| | | | 1989; Yu & Jin, 2007) | |
| | 2. Heterologinių GC | 2. BL21-CodonPlus | (Kirienko et al., 2004; | |
| | turtingų genų | (DE3)-RIPL ląstelės; | Sørensen et al., 2003; | |
| | transliacija; | | Trundova et al., 2007) | |
| | 3. Ląstelės su | 3. Rosetta-gami | (Neubauer et al., | |
| | papildomomis retų | kamienas. | 2007; Peti et al., | |
| | tRNR kopijomis. | | 2007) | |
| Disulfidinių jungčių | 1. Disulfidinių | 1. Dsb sistema; | (Andersen et al., | |
| formavimasis | jungčių susidarymas | | 1997; Kurokawa et | |
| | E. coli periplazmoje; | | al., 2001; Liu et al., | |
| | | | 2001) | |
| | 2. Disulfidinių | 2. Šeimininko <i>trxB</i> ir | (Bessette et al., 1999; | |
| | jungčių susidarymas | gor genų sutrikimai; | Jurado et al., 2006; | |
| | E. coli citoplazmoje; | | Levy et al., 2001; | |
| | | | Lilie et al., 1994) | |
| | | 3. Baltymų disulfido | | |
| | 3. <i>In vitro</i> disulfidinių | izomerazė (PDI) kaip | | |
| | jungčių susidarymas; | katalizatorius; | | |

| | | 4. S-sulfonavimas, | (Chew et al., 1995; |
|----------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | 4. Nespecifinio | Glutationas arba | Klappa et al., 1997; |
| | disulfidinio ryšio | Cisteamino-cistamino | Winter et al., 2002) |
| | susidarymas. | redukuojantis buferis. | (Masuda et al., 1996; |
| | | | Mukhopadhyay, |
| | | | 2000) |
| Baltymų | 1. Trūksta eukariotų | 1. Kinazės ir jos | (Gosse et al., 1993; |
| fosforilinimas | post-transliacijos | substrato koekspresija | Yue et al., 2000) |
| | mašinos; | per | |
| | | atskirus arba vienos | |
| | | plazmidės vektorius; | |
| | 2. Endogeninis | 2. Rekombinantinio | (Mijakovic et al., |
| | fosforilinimas. | baltymo | 2006) |
| | | fosforilinimas | |
| | | naudojant | |
| | | endogenines | |
| | | proteinkinazes. | |
| Baltymų | 1. Trūksta ląstelės | 1. Nefermentinis | (Mironova et al., |
| perlankstymas | organelių, reikalingų | glikozilinimas, dėl | 2005) |
| | glikozilinimui; | kurio atsiranda | |
| | | pažangus glikacijos | |
| | | galutinis produktas; | |
| | 2. Didelio masto | 2. Kotransliacinė | (Zhang et al., 2004) |
| | gamyba su specifinės | sintezė naudojant | |
| | vietos | genetiškai | |
| | glikozilinimu. | užkoduotas | |
| | | modifikuotas | |
| | | aminorūgštis. | |

trūkumu. Norint įveikti šias kliūtis, kartu ekspresuojant modifikuotus žinduolių fermentus, tokius kaip baltymų metilazės ir acetilazės bei jų substratai iš vieno arba dviejų atskirų plazmidės vektorių toje pačioje *E. coli*, gali susidaryti rekombinantiniai baltymai, labai panašūs į vietinius eukariotų baltymus (Cabrita et al., 2006). Glikozilinimas yra dar vienas sudėtingas posttransliacinio modifikavimo procesas.

Jis yra atsakingas už ląstelių glikanų, kurie dažnai yra prijungti prie baltymų ir lipidų, susidarymą. Glikoziltransferazė ir glikozidazės yra fermentai, atsakingi už daugelio baltymų glikozilinimą. Glikoproteinai, kurie dažniausiai pasiskirsto eukariotinėse ląstelėse, retai būna prokariotiniuose organizmuose, nes šiuose organizmuose trūksta glikozilinti būtinų ląstelių organelių (Demain et al., 2009; Sahdev et al., 2007)

4. mRNR stabilumas

mRNR stabilumas turi įtakos ekspresijos greičiui. Vidutinis mRNR pusinės eliminacijos laikas *E. coli* esant 37 °C svyruoja nuo sekundžių iki maksimumo 20 min., o ekspresijos greitis tiesiogiai priklauso nuo būdingo mRNR stabilumo. mRNR skaidymas RNazėse gali būti apsaugotas RNR sulankstymu, ribosomomis ir stabilumo moduliavimu poliadenilinant. Rekombinantinės ekspresijos sistemos su mRNR stabilumo didinimu yra parduodamos, pavyzdžiui, Invitrogen BL21 starTM kamienas, turintis mutaciją geno, koduojančio RNaseE (Jana et al., 2005; Makino et al., 2011).

5. Promotoriaus stiprumas

Rekombinantinėms ekspresijos plazmidėms reikalingas stiprus transkripcijos promotorius, kad būtų galima aukšto lygio genų ekspresija. Promotorius turi būti indukuojamas naudojant termines arba chemines priemones, o labiausiai paplitęs induktorius yra cukraus molekulinis izopil-beta-Dtiogalaktopiranozidas (IPTG). Tačiau IPTG netinka didelio masto žmogaus gydomųjų baltymų gamybai, nes yra toksiškas ir brangus (Cabrita et al., 2006; Samuelson, 2011; Sørensen et al., 2005).

Nors dabar yra daug alternatyvių organizmų ir ekspresijos sistemų, skirtų rekombinantiniams baltymams gaminti, bakterijos, tokios kaip *E. coli*, ir toliau yra patraukliausia šeimininkė heterologinių baltymų gamybai. Šiuo metu tam tikros potransliacinės modifikacijos *E. coli* negalima pasiekti. Netolimoje ateityje gali atsirasti naujų metodų, kaip gaminti sudėtingus eukariotų baltymus prokariotinėje ekspresijos sistemoje (Khow et al., 2012).

1.6 Baltymų sintezės optimizacija

Rekombinantinių baltymų ekspresija pakeitė visus biologijos mokslų aspektus. Svarbiausia, kad jis žymiai padidino baltymų, kuriuos galima ištirti tiek biochemiškai, tiek struktūriškai, skaičių. Anksčiau baltymų gamyba buvo ekspertų sritis, nes gryninimas iš natūralaus šaltinio (t.y. augalų, triušių, galvijų) dažnai buvo sunkus ir atimdavo daug laiko. Tačiau naujų komercinių rekombinantinių baltymų ekspresijos sistemų prieinamumas kartu su pažangiomis baltymų gryninimo technikomis padarė baltymų gamybą paplitusia visuose biologijos ir biomedicinos moksluose. Tai leido mokslininkų bendruomenei

ištirti tūkstančius mažo gausumo ir naujų baltymų iš įvairių organizmų. Didėjant rekombinantiniu būdu gaminamų baltymų skaičiui, didėja ir šio proceso sunkumų bei apribojimų įvertinimas. Nepaisant daugelio nebakterinių rekombinantinių ekspresijos sistemų sukūrimo per pastaruosius tris dešimtmečius (mielės, bakulovirusai, žinduolių ląstelės, sistemos nenaudojant ląstelių), *E. coli* yra tinkamiausias šeimininkas rekombinantinių baltymų ekspresijai (Yin. et al., 2007). Loginis pagrindas yra aiškus: *E. coli* yra lengva genetiškai manipuliuoti, ją auginti nėra finansiškai brangu, o ekspresija greita, baltymai paprastai gaminami per vieną dieną. Be to, BMR spektroskopijos izotopų žymėjimo ir rentgeno kristalografijos selenometionino įtraukimo protokolai yra gerai žinomi, todėl jie labai tinka struktūriniams baltymų tyrimams. Taigi, *E. coli* turi daug reikšmingų pranašumų, palyginti su kitomis ekspresijos sistemomis, įskaitant kainą, naudojimo paprastumą ir mastą (Francis et al., 2010).

Ekspresijai *E. coli* ląstelėse reikia keturių elementų: dominančio baltymo, bakterinės ekspresijos vektoriaus, ekspresijos ląstelių linijos ir įrangos ir (arba) medžiagų, skirtų bakterijų ląstelių kultūrai auginti. Yra keli parametrai, kuriuos galima keisti optimizuojant ekspresijos protokolą – nuo vektoriaus su atitinkamu promotoriumi parinkimo iki tinkamos indukcijos temperatūros pasirinkimo. Kiekviena atranka turi įtakos baltyminio produkto tirpumui ir aktyvumui. Tačiau dešimtmečius trukęs mokslininkų darbas, kartu su naujausia didelio našumo struktūrinės genomikos pastangų patirtimi, leido nustatyti protokolą, leidžiantį sėkmingai išreikšti įvairius baltymus (žiūrėti 1.8 pav.) (Francis et al., 2010).



1.8 pav. Baltymų sintezės bendrasis protokolas (Francis et al., 2010).

Protokolas susideda iš devynių žingsnių. Pirmiausia nustatomos optimalios norimo baltyminio produkto, "tikslinio baltymo", ribos. Tada tikslinis genas subklonuojamas į bakterinės ekspresijos vektorių, kuris naudoja T7 *lacO* promotoriaus sistemą (t.y. naudojamą pET sistemoje) ir turi N-galo heksahistadino (his₆) žymą ir tabako viruso (TEV) proteazės skėlimo "vietą" (Peti et al., 2007). T7 promotoriaus sistema užtikrina stiprią, tvirtą ekspresiją, his6 žymė palengvina gryninimą, o proteazės vieta leidžia (his₆) žymę proteolitiškai pašalinti iš išgryninto tikslinio baltymo. Trečiajame etape

ekspresijos vektorius transformuojamas į BL21 (DE3) kamieną, pvz., BL21 (DE3)-RIL ląsteles. Šiose ląstelėse, kurios yra suderinamos su T7 promotoriaus sistema, yra plazmidžių, koduojančių arginino, izoleucino ir leucino tRNR, kurios yra retos *E. coli*, ir jose trūksta *lon* ir *ompT* proteazių, o tai sumažina tikslinio baltymo skaidymą *in vivo*. Po to, kai didelės apimties kultūrai pasėti naudojama vienos nakties pradinė kultūra (5 veiksmas), ląstelės auginamos iki vidutinės log fazės (OD₆₀₀ nuo 0,6 iki 0,9) LB terpėje maišomos purtyklės kolbose (tai padidina aeraciją) ir tokiu būdu išeigą 37°C temperatūroje nuolat kratant. Tada kultūros perkeliamos į žemesnę temperatūrą (18 °C), o atvėsus baltymų ekspresija sužadinama naudojant izopropil-β-tio-galaktozidą (IPTG). Ekspresija tęsiama per naktį intensyviai kratant (200–250 aps./min.) 18 °C temperatūroje. Žemesnė ekspresijos temperatūra palengvina sulankstyto, tirpaus baltymo gamybą. Galiausiai ląstelės apdorojamos centrifuguojant ir laikomos –80 °C temperatūroje, kol prireiks.

Šis protokolas yra skirtas kaip pradinis taškas kuriant ekspresijos strategiją *E. coli*. Tačiau kadangi gali prireikti modifikuoti kelias baltymo, vektoriaus, šeimininko kamieno charakteristikas ir (arba) ekspresijos sąlygas, kad susidarytų sulankstytas aktyvus baltymas, neretai pasitaiko sudėtingesnių protokolų, kuriais šie kintamieji tikrinami lygiagrečiai. Daugelis veiksnių, gali turėti įtakos rekombinantinių baltymų, pagamintų *E. coli*, tirpumui. Atitinkamai, norint sėkmingai ekspresuoti tirpų baltymą, dažnai reikia pakeisti vieną ar kelis ekspresijos protokolo elementus (1.9 pav.). Tai gali reikšti daugybės išraiškos protokolų testavimą, o tai atima daug laiko ir yra brangu. Taigi, norint pasirinkti optimalią konstrukciją ir raiškos sąlygas, prieš didinant mastelį, naudinga naudoti mažo masto raiškos testus (Francis et al., 2010).



1.9 pav. Problemos ir galimi sprendimai kiekvienam baltymų ekspresijos etapui *E. coli* ląstelėse (Francis et al., 2010).

Kairiajame stulpelyje pateikiami pagrindiniai rekombinantinio baltymo ekspresijos žingsniai su pagrindiniais kintamaisiais, į kuriuos reikia atsižvelgti. Vidurinėje skiltyje pateikiamos dažniausios kliūtys, su kuriomis susiduriama kiekviename žingsnyje, o galimi kiekvienos kliūties sprendimai pateikiami dešiniajame stulpelyje.

1.7 Elektroporacija

Elektroporacija reiškia trumpų aukštos įtampos impulsų naudojimą ląstelės membranos barjerui įveikti. Taikant išorinį elektrinį lauką, kuris tiesiog pranoksta ląstelės membranos talpą, gali būti sukeltas trumpalaikis ir grįžtamasis membranos skilimas. Ši trumpalaikė, pralaidi būsena gali būti naudojama apkrauti ląsteles įvairiomis skirtingomis molekulėmis arba per paprastą difuziją, kai molekulės yra mažos, arba per elektroforetiškai valdomus procesus, leidžiančius prasiskverbti per destabilizuotą membraną – kaip ir DNR perkėlimo atveju (žiūrėti 1.10 pav.). Iš pradžių sukurta genų perdavimui, elektroporacija dabar naudojama daugybei molekulių pristatymui: nuo jonų iki vaistų, dažų, atsekamųjų medžiagų, antikūnų ir oligonukleotidų iki RNR ir DNR. Elektroporacija pasirodė naudinga tiek *in vitro*, tiek *in vivo*. (Luft et al., 2015).



1.10 pav. Ląstelių elektroporacija (Luft et al., 2015)

Elektroporacija vyksta keturiais pagrindiniais etapais: (1) ląstelės poliarizacija, (2) membranos susitraukimas, sukuriantis nanoporas, (3) makromolekulių patekimas ir (4) membranos pakartotinis uždarymas. (1) Taikant trumpus elektros impulsus, membrana įkraunama, sukuriamas elektrinis laukas ir ląstelės poliarizacija. Stiprus elektrinis laukas sukels struktūrinius membranos pertvarkymus, vandens užpildytų membranų struktūrų ("vandeninių porų") ir "nanoporų", kurių dydis didesnis nei 1 nm, o tai leidžia jonams pereiti membraną. (2) Membranoje susidaro didesnės poros, kurios leidžia patekti makromolekulėms, tokioms kaip DNR arba RNR. Paprastai toje vietoje, kuri yra nukreipta į neigiamą

elektrodą, susidaro daugiau porų dėl druskų koncentracijų skirtumo ląstelėje ir naudojamo buferio. (3) Į ląstelę gali patekti didelės makromolekulės. Neigiamas DNR / RNR krūvis gali veikti kaip stabdis, skatinantis įsisavinimą, nors, kita vertus, teigiami jonai, tokie kaip kalcis, gali padidinti artumą prie neigiamo krūvio membranos prieš įsisavinimą. (4) Elektroporacija yra grįžtama, o kai elektrinis laukas išjungiamas, membrana gali vėl užsandarinti ir išlaikyti makromolekules ląstelės viduje. Užsandarinimas vyksta daug ilgiau (nuo minučių iki valandų), o poros gali susidaryti per milisekundes. Žema temperatūra gali sustiprinti pakartotinį sandarumą, nors kai kuriais atvejais tai gali būti nepraktiška eukariotų ląstelėms.

Transmembraninis potencialas, kurį ląstelėje sukelia išorinis laukas, paprastai apibūdinamas lygtimi:

$\Delta V_m = f E_{ext} r \cos \Phi (1)$

V_m yra transmembraninis potencialas, f - ląstelės formos faktorius, apibūdinantis ląstelės poveikį tarplastelinio lauko pasiskirstymui, E_{ext} - taikomas elektrinis laukas, r - lastelės spindulys ir Φ - polinis kampas išorinio lauko atžvilgiu. Daugelio autorių faktoriaus f reikšmė yra 1,5; tačiau šis veiksnys priklauso nuo daugelio skirtingų veiksnių. Elektroporacija pasiekiama, kai ΔV_m ramybės transmembraninio potencialo yra didesnis nei slenkstinis, ΔV kadangi dvisluoksnė membrana yra bendra įvairių tipų ląstelių savybė, ΔV yra panašios įvairių tipų ląstelėse. Paprastai pranešama, kad ΔV įtampa yra 1 V (Kinosita et al., 1977), nors eksperimentinis ir teorinis tyrimas vėliau apibūdino kaip 200 mV (Teissié et al., 1993). Kuo mažesnis ląstelės spindulys, tuo didesnis išorinis laukas, reikalingas pralaidumui pasiekti. Dėl šios priežasties elektriniai laukai, reikalingi žinduolių ląstelėms pralaidinti, yra žymiai mažesni nei tie, kurių reikia pralaidumui bakterijoms. Taip pat akivaizdu, kad pvz., mitochondrijos ar kitos tarplastelinės organelės nebus pralaidžios elektriniam laukui, kurio pakanka ląstelės membranos pralaidumui. Ramybės transmembraninis potencialas yra svarbus ne tik pralaidumo slenksčiui, bet ir įvykių sekai. Pralaidumas iš pradžių įvyks elemento poliuje, nukreiptame į teigiamą elektrodą, nes dėl neigiamo elemento vidaus čia pirmiausia viršijama membranos talpa, kai veikia išorinis laukas. Antrasis įvykis yra elemento poliaus, nukreipto į neigiamą elektrodą, pralaidumas. Į teigiamą elektrodą nukreipto poliaus pralaidumo laipsnį (pralaidžios membranos plotą) galima valdyti impulso amplitude t.y. kuo didesnė impulso amplitudė, tuo didesnis plotas, per kurį gali vykti difuzija (Gabriel et al.,1997). Pralaidumo laipsnį galima valdyti pagal impulso trukmę (taip pat ir impulsų skaičių), t.y. kuo ilgesnis impulsas, tuo didesnis membranos trikdymas tam tikroje srityje (Gabriel et al., 1997). Įrodyta, kad membranos plotas yra didesnis poliuje, nukreiptame į teigiamą elektrodą, tačiau pralaidumo laipsnis yra didesnis lastelės poliuje, nukreiptame į neigiama elektroda (Tekle et al., 1990). Taigi didesnės molekulės galės difunduoti į ląstelę ties poliumi, nukreiptu į neigiamą elektrodą, tačiau plotas, kuriame gali vykti difuzija, yra didesnis teigiamo elektrodo pusėje (Tekle et al., 1990).

Elektrodų geometrija lems elektrinį lauką, taikomą ląstelių vienasluoksnei arba trimatei struktūrai, todėl ji yra labai svarbi sėkmingam genų pristatymui. Pagrindiniai parametrai, lemiantys elektros laidumą, yra šie: ląstelių faktoriai, tokie kaip ląstelių tankis, ląstelių architektūra ir ląstelių biochemija, fizikiniai ir cheminiai veiksniai, tokie kaip temperatūra, pH, osmoliariškumas ir naudojamo buferio jonų koncentracija ir elektriniai parametrai, tokie kaip elektrinio lauko stiprumas, įtampa, impulso ilgis, impulsų skaičius ir elektrodo geometrija. Tinkamų elektroporacijai naudojamų buferių parinkimas taip pat turės įtakos genų pristatymo efektyvumui. Pagrindiniai tinkamo buferio parinkimo parametrai yra osmoliariškumas ir jonų stiprumas, išlaikant didžiausią įmanomą išgyvenamumą. Paprastai buvo rekomenduojami buferiai, imituojantys tarpląstelinį jonų stiprumą, bet apskritai dauguma standartinių terpių veikia pakankamai gerai. Terpės kompozicijų patobulinimais siekiama padidinti ląstelių išgyvenimą po elektroporacijos, kad būtų galima naudoti griežtesnius elektroporacijos parametrus. Todėl kiekvieno tipo ląstelių elektroporacijos sąlygos šiek tiek skirsis (Luft et al., 2015).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

2.1.1 Reagentai

| Applichem, Vokietija | Glicerolis |
|--------------------------------------|--|
| Carl Roth, Vokietija | D-sorbitolis, D(+)-gliukozės monohidratas, mielių ekstraktas, NDS, peptonas, TRIS, akrilamidas, bis-akrilamidas, TEMED, agarozė, agaras |
| BioRad, JAV | Glicinas |
| Merck, Vokietija | Etanolis, NaOH, HCl, amoniopersulfatas, NaCl |
| Sigma, JAV | Histidinas |
| Sigma Aldrich, Vokietija | etidžio bromidas, EDTA |
| TPP, Šveicarija | Švirkštiniai filtrai PVDF membrana, porų dydis 0,22 μm |
| Reanal, Vengrija | Bromfenolio mėlis |
| Thermo Fisher Scientific, Lietuva | PageBlue baltymų dažas, PageRuler Plus Prestained, baltymų molekulinės masės dydžių standartas, MassRuler DNR molekulinės masių |
| | standartas, GeneRuler 1 kb Plus DNR masių standartas, fermentai – restrikcijos endonukleazės FastDigest: EcoRI, XhoI, NdeI, NotI, GeneJET Plasmid Miniprep Kit, GeneJET Gel Extraction Kit, T4 DNR ligazė. |

2.1.2 Prietaisai

| Binder | Termostatas |
|----------------------|--|
| Eppendorf | Biofotometras, stalinė centrifuga |
| Amersham Biosciences | Elektroforezės srovės šaltinis (EPS 601) |

| B. Braun Biotech Inc | Rotacinė purtyklė | |
|------------------------|---|--|
| VGTU | Mikrosekundinio pulsuojančio elektrinio lauko generatorius | |
| Velp Scientifica | Vorteksas | |
| Thermo Scientific | Didelio tūrio centrifuga – Jouan KR25i | |
| DNR Bio-Imaging System | Elektroforezės rezultatų vizualizavimo sistema – MiniBIS Pro | |
| Bio-Rad | Elektropernašos sistema baltymų elektroforezėms | |
| Consort | Elektros srovės šaltinis – E865 | |
| Biosan | Gelių vartyklė – 3D Sunflower, terminė purtyklė | |
| ScanLAF | Laminarinis boksas – MARS 1200, | |
| Radelkis | pH matuoklis – OP-211/1 | |
| Vibra-Cell (Sonics) | Ultragarsinis dezintegratorius | |

2.1.3 Kultyvavimo terpės ir jų priedai

| LB | peptonas | 10 g/l |
|-----|-------------------|----------|
| | mielių ekstraktas | 5 g/l |
| | natrio chloridas | 5 g/l |
| | agaras | 20 g/l |
| SOC | gliukozė | 20 g/l |
| | peptonas | 20 g/l |
| | mielių ekstraktas | 5 g/l |
| | NaCl | 0,5 g/l |
| | KCl | 0,186g/l |

| | MgSO ₄ | 2,4 g/l |
|-------------------|---------------------------|----------|
| GYT | glicerolis | 100 ml/l |
| | mielių ekstraktas | 1,25 g/l |
| | triptonas | 2,5 g/l |
| LB terpės priedai | ampicilino tirpalas | 1 ml/l |
| | chloramfenikolio tirpalas | 30 mg/ml |

Skystų terpių gamybai nenaudojamas agaras.

2.1.4 Tirpalai

| Apicilino tirpalas | ampicilinas | 1g/l |
|---------------------------|------------------|---------|
| Chloramfenikolio tirpalas | chloramfenikolis | 30mg/ml |

NDS-PAGE elektroforezėje naudojami buferiai, tirpalai ir geliai

| Akrilamido mišinys | akrilamidas | 290 g/l |
|-------------------------|--------------------|----------|
| | bis-akrilamidas | 10 g/l |
| Skirstomasis gelis | dH ₂ O | 7,9 ml |
| | akrilamido mišinys | 6,7 ml |
| | 1,5 M TRIS pH 8,8 | 5 ml |
| | 10 % NDS | 0,2 ml |
| | 10 % APS | 0,2 ml |
| | TEMED | 0,008 ml |
| Koncentruojamasis gelis | dH ₂ O | 4,1 ml |

| | akrilamido mišinys | 1 ml |
|------------------------------|--------------------|------------|
| | 1 M TRIS pH 6,8 | 0,75 ml |
| | 10 % NDS | 0,06 ml |
| | 10 % APS | 0,06 ml |
| | TEMED | 0,006 ml |
| 10× glicino buferis | TRIS | 30,3 g/l |
| | glicinas | 144,2 g/l |
| 4× užnešimo buferis | NDS | 80 g/l |
| | 1 M TRIS pH 6,8 | 250 ml/l |
| | bromfenolio mėlis | kruopelė |
| | glicerolis | 320 ml/l |
| | 1 M ditiotreitolis | 400 ml/l |
| Anodo buferis | 0,1 M TRIS pH 8,9 | 12,114 g/l |
| Katodo buferis | 0,1 M tricinas | 17,917 g/l |
| | 0,1 M TRIS pH 8,25 | 12,114 g/l |
| | 0,1 % NDS | 1 g/l |
| Gelio buferis 3× | 3 M TRIS pH 8,45 | 363,42 g/l |
| | 0,3 % NDS | 3 g/l |
| AB – 3 tirpalas | akrilamidas | 480 g/l |
| | bis-akrilamidas | 15 g/l |
| 4 % tricino koncetruojamasis | AB – 3 tirpalas | 0,333 ml |
| gelis (4 ml) | Gelio buferis | 1 ml |

| 10 % tricino skirstomasis gelis (10 ml) | APS | 30 µl |
|--|-------------------|----------|
| | TEMED | 3 µl |
| | dH ₂ O | 2,634 ml |
| | AB – 3 tirpalas | 2 ml |
| | Gelio buferis | 3,333 ml |
| | Glicerolis | 1 g |
| | APS | 50 µl |
| | TEMED | 5 µl |
| | dH ₂ O | 3,612 ml |

Ląstelių kultyvavimo terpės yra autoklavuojamos 0,5 atm 112 °C sąlygomis, terpių priedai filtruojami ir toliau steriliai įdedami į terpes po autoklavavimo.

2.1.5 Naudoti kamienai ir plazmidės

Darbe naudotos plazmidės pateiktos 2.1 lentelėje.

| Plazmidė | Atrankos žymuo | Šaltinis |
|----------------------|----------------|----------------------|
| pET21c(+)-GD25sign- | Ampicilinas | VU GMC MBK kolekcija |
| pET21c(+) | Ampicilinas | VU GMC MBK kolekcija |
| pET21c(+)SUP35NM-GFP | Ampicilinas | Šis darbas |
| pNMG* | Ampicilinas | (True et al., 2004) |
| pRSETB-8xHis-SUP35NM | Ampicilinas | VU GMC BTI kolekcija |

2.1 lentelė Darbe naudotos plazmidės

*pNMG plazmidė sudaryta iš pRS306 vektoriaus, kuriame įterpti SUP35NM ir GFP genai.

Darbe naudoti E. coli kamienai pateikti 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė Darbe naudoti kamienai

| Kamienas | Genotipas | Šaltinis |
|------------------------|--|---------------|
| <i>E. coli</i> DH5α | F^- endA1 glnV44 thi- | VU GMC |
| | <i>1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 | MBK kolekcija |
| | $\Delta(lacZYA-argF)$ U169, hsdR17($r_{K}^{-}m_{K}^{+}$), λ^{-} | |
| E. coli BL21 | F^- ompT gal dcm lon hsdS _B ($r_B^-m_B^-$) λ (DE3) | VU GMC |
| (DE3) | | MBK kolekcija |
| <i>E. coli</i> Rosetta | F^{-} ompT hsdSB ($r_{B}^{-} m_{B}^{-}$) gal dcm (DE3) pRARE (Cam ^R) | VU GMC |
| (DE3) | | MBK kolekcija |

| E. coli BL21 | F- $ompT$ hsdSB (r_B - m_B -) gal dcm rne131 (DE3) | VU GMC BTI |
|--------------------------|---|------------|
| Star TM (DE3) | | kolekcija |

2.2 Metodai

2.2.1 Molekulinės biologijos metodai

Plazmidžių skyrimas iš *E. coli* ląstelių atliekamas naudojant Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit, pagal gamintojo protokolą;

Plazmidžių hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis atliekama naudojant Thermo Scientific FastDigest restriktazes, pagal gamintojo protokolus;

DNR gryninimas iš agarozės gelio atliekamas naudojant Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit, pagal gamintojo protokolą;

DNR ligavimas atliekamas naudojant Thermo Scientific T4 DNR ligazę, pagal gamintojo protokolą pasirenkant kelis skirtingus inserto ir vektoriaus santykius;

DNR vizualizacija atliekama elektroforezės būdu 1 % agarozės gelyje, parametrai – 7 V/cm, 45 min.; Glicininė NDS-PAGE: paruošiamas 10 % skirstomasis ir koncentruojamasis geliai ir užpilami Tris-Glicino buferiu. Elektroforezė vykdoma palaikant 15 mA, 180 V, 10 W kontentruojamajame gelyje ir 30 mA, 180 V, 10 W skirstomajame gelyje. Geliai dažomi CoomasieBlue dažu (Thermo Scientific);

Tricininė NDS-PAGE: paruošiamas 8 % skirstomasis ir koncentruojamasis geliai ir užpilami buferiais – anodui ir katodui. Elektroforezė vykdoma palaikant 15 mA, 180 V, 10 W kontentruojamajame gelyje ir 30 mA, 180 V, 10 W skirstomajame gelyje. Geliai dažomi CoomasieBlue dažu (Thermo Scientific);

SupNM35-GFP baltymo sintezė buvo atlikta LB+amp terpėje, naudojant darbe sukurtą pET21c(+)-SUP35NM-GFP konstruktą, naudojant skirtingas IPTG koncentracijas ir indukcijos laiką;

Sup35NM baltymo sintezė buvo atlikta LB+amp terpėje, naudojant kontrolinį pRSETB8xHis-*SUP35NM* konstruktą, naudojant skirtingas IPTG koncentracijas ir indukcijos laiką;

Elektroporacija atliekama naudojant impulsinį elektrinį lauką (IEL), sąlygos: Bakterijų transformacija plazmidėmis – 8 kV/cm, 5 kartai po 1 ms.

NDS-PAGE mėginiai paruošiami: paimamas 1 OT atitinkantis ląstelių tūris augančios ląstelių kultūros, ląstelės nucentrifuguojamos 30 s 13000 × g, supernatantas nupilamas ir ant ląstelių užpilama 20 µl 4x redukuojančio NDS-PAGE užnešimo buferinio tirpalo. Mėgintuvėliai su mėginiais patalpinami į terminę purtyklę 95 °C ir inkubuojami 10 min.

2.2.2 Mikrobiologijos metodai

Ląstelių kultivacija vykdoma LB/LB+amp/LB+apm+chloramp. Elektrokompetentinių ląstelių ruošimas: Bakterijų ląstelių ruošimas: ląstelės auginamos iki vidurinės-vėlyvos eksponentinės fazės, atšaldomos, praplaunamos su dejonizuotu steriliu vandeniu, praplaunamos su steriliu 10 % glicerolio tirpalu, elektroporacijos terpe GYT (glicerolis-mielių ekstraktas-triptonas) ir elektroporuojamos, po elektroporacijos ląstelės inkubuojamos SOC terpėje 1 val., 37 °C, tada užsėjamos ant LB terpės su atitinkamais antibiotikais.

2.2.3 Duomenų analizės ir vizualizavimo metodai

Bioinformatinė plazmidžių analizė, retriktazių parinkimas – naudojama SnapGene programinė įranga. Elektroforezės gelių vizualizacija ir analizė – naudojama elektroforezės gelių vizualizavimo kamera. NDS-PAGE gelių analizei naudojama Image Lab 6.1 programinė įranga.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 pET-21c(+) ir pNMG plazmidžių bioinformatinė analizė

Atlikta pET-21c(+) ir pNMG plazmidžių bioinformatinė analizė norint parinkti restrikcijos endonukleazes, kuriomis būtų hidrolizuota pET-21c(+) ir pNMG plazmidžių DNR, taip, kad iš pNMG plazmidės būtų iškirptas tikslinis *SUP35NM-GFP* genas ir pET-21c(+) plazmidėje hidrolizė vyktų multikloniniame regione (angl. Multiple cloning site) (žiūrėti 3.1 – 3.2 pav.).



3.1 pav. pNMG plazmidės bioinformatinės analizės rezultatai.

pNMG plazmidės genolapis, pažymėtos restrikcijos endonukleazių atpažinimo vietos XhoI (3918) ir EcoRI (2427), esančios aplink *SUP35NM-GFP* geną.



3.2 pav. pET-21c(+) plazmidės bioinformatinės analizės rezultatai.
 pET-21c(+) plazmidės genolapis, pažymėtos restrikcijos endonukleazių atpažinimo vietos XhoI (158) ir EcoRI (192), esančios multikloniniame regione.

Pasirinktos dvi restrikcijos endonukleazės: EcoRI ir XhoI. EcoRI restrikcijos endonukleazė plazmidėje pNMG hidrolizuoja DNR seką, esančią *SUP35NM-GFP* geno skaitymo rėmelio pradžioje, kitų hidrolizės vietų nėra. XhoI hidrolizuoja DNR seką, esančią *SUP35NM-GFP* geno skaitymo rėmelio pabaigoje, kitų hidrolizės vietų nėra. EcoRI ir XhoI restrikcijos endonukleazės hidrolizuoja DNR seką, esančią pET-21c(+) plazmidės multikloniniame regione, kitų hidrolizės vietų, naudojant minėtas restrikcijos endonukleazes, plazmidėje nėra.

3.2 pET-21c(+) ir pNMG plazmidžių skyrimas iš *E. coli* DH5α kamieno ląstelių ir DNR hidrolizė EcoRI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis

Pirmiausiai buvo atliktas plazmidžių skyrimas iš *E. coli* DH5α kamieno ląstelių turinčių plazmidę pET-21c(+) ir pNMG, išskirtos plazmidės vizualizuotos agarozės gelyje (3.3 pav.). Išskirtos pET-21c(+) ir pNMG plazmidės atskiromis reakcijomis buvo hidrolizuotos parinktomis EcoRI ir XhoI restrikcijos

endonukleazėmis, gauti fragmentai – pET-21c(+) plazmidė ± 5,3 kB ir pNMG plazmidės fragmentai 1,5 kB (*SUP35NM-GFP* genas) ir 4,7 kB (likusi plazmidės dalis) (3.4 pav.).



fragmentai (1,5 kB) (apibraukti mėlyna spalva).

3.3 pav. pET-21c(+) ir pNMG plazmidžių vizualizacija agarozės gelyje.

M – MassRuler DNR masių standartas; 2 – pNMG plazmidė (apibraukta mėlyna spalva); 3 – pET-21c(+) plazmidė (apibraukta raudona spalva).

3.4 pav. pET-21c(+) ir pNMG plazmidžių, hidrolizuotų EcoRI ir XhoI vizualizacija agarozės gelyje.

M – GeneRuler 1 kb Plus DNR masių standartas; 1–5 – hidrolizuota pET-21c(+) plazmidė (apibraukta raudonai), 7–11 – hidrolizuota pNMG plazmidė, matoma dalis be *SUP35NM-GFP* geno (4,7 kB) ir *SUP35NM-GFP* geno

3.3 Hidrolizuoto pET-21(+) vektoriaus ir SUP35NM-GFP geno fragmento gryninimas, ligavimas, *E. coli* DH5α kamieno transformacija gautu ligatu.

Atliktas pET-21c(+) vektoriaus ir *SUP35NM-GFP* geno gryninimas iš agarozės gelio, fragmentai buvo sukoncentruoti, vizualizuoti agarozės gelyje (3.5 pav.), jų koncentracija nustatoma naudojant MassRuler DNR masių standartą. Toliau vykdoma ligavimo reakcija, pasirinktus vektoriaus (pET-21c(+)) ir inserto (*SUP35NM-GFP*) santykius galima matyti 3.1 lentelėje. Gautas ligatas buvo pagausintas *E. coli* DH5α klonavimo kamieno ląstelėse, ligatas į ląsteles įvestas elektroporacijos metodu.



3.5 pav. Išgrynintų ir sukoncentruotųpET-21c(+) plazmidės ir SUP35NM-GFP geno vizualizacija agarozėsgelyje.

M – MassRuler DNR masių standartas; 2, 4 – išgrynintas hidrolizuotas pET-21c(+) vektorius, 6, 8 – išgrynintas *SUP35NM-GFP* geno fragmentas.

3.1 lentelė Ligavimo metu naudoti inserto ir vektoriaus molinės masės

 Insertas : vektorius
 Užaugusių kolonijų skaičius

 1:1
 1

 2:1
 1

 3:1
 1

 5:1
 1

 7:1
 14

santykiai bei po transformacijos užaugusių kolonijas formuojančių vienetų (KFV) skaičius.

Daugiausia kolonijų po transformacijos užaugo naudojant 7:1 inserto ir vektoriaus santykio ligatą. Tai galėjo įvykti dėl to, kad vektorius paprastai yra didelė molekulė ir turi du restrikcijos fermentais hidrolizuotus galus. Todėl vektorius turi didesnę tikimybę pakartotinai susigįžti į žiedinę konformaciją. Tuo tarpu insertai paprastai yra maži, todėl tikimybė, kad insertas bus įterptas tarp dviejų vektoriaus galų, priklausys nuo inserto molekulių skaičiaus ligavimo mišinyje. Kuo daugiau insertų, tuo didesnė susidūrimo su vektoriumi tikimybė, todėl didesnė ir sėkmingos ligavimo reakcijos tikimybė (Revie et al., 1988).

Iš 18 transformacijos metu gautų kolonijų tolimesniems tyrimams buvo atsitiktinai pasirinkta 10 kolonijas formuojančių vienetų. Transformantai buvo patikrinti išskiriant plazmidinę DNR ir hidrolizuojant DNR seką EcoRI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis, gauti \pm 5,4 kB ir \pm 1,5 kB dydžio fragmentai atitinka tikslinio geno – *SUP35NM-GFP* ir pET-21c(+) vektoriaus fragmentus (3.6 pav.), todėl galima teigti, kad transformacija pavyko. Iš *E. coli* DH5 α kamieno ląstelių išskirtas pagausintas konstruktas naudojamas tolimesniuose tyrimuose.



3.6 pav. Iš E. coli DH5a transformantų kolonijų išskirtos plazmidinės DNR, hidrolizuotos naudojant EcoRI ir XhoI restrikcijos endonukleazes. vizualizacija agarozės gelyje. M – GeneRuler 1 kb Plus DNR masių standartas; 1-10 - iš skirtingų kolonijų išskirtų ir hidrolizuotu plazmidžių fragmentai. Raudonai pET-21c(+) pažymėtas vektorius ± 5,4 kB dydžio, mėlynai SUP35NM-GFP geno fragmentas \pm 1,5 kB dydžio.

3.4 pET-21c(+)-*SUP35NM-GFP* konstrukto perkėlimas į *E. coli* BL21(DE3) ir *E. coli* Rosetta(DE3) raiškos kamienus. Sup35NM-GFP baltymo sintezė ir jos optimizavimas *E. coli* BL21(DE3) ir *E. coli* Rosetta raiškos kamienuose.

Gautu konstruktu pET-21c(+)-*SUP35NM-GFP* buvo transformuotas *E. coli* BL21(DE3) raiškos kamienas, po transformacijos užaugusios kolonijos buvo atsitiktinai pasirinktos ir patikrintos išskiriant plazmidinę DNR ir hidrolizuojant DNR seką su EcoRI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis (3.7. pav.).



3.7 pav. Iš *E. coli* BL21(DE3) transformantų kolonijų išskirto pET-21c(+)-*SUP35NM-GFP* konstrukto, hidrolizuoto naudojant EcoRI ir XhoI restrikcijos endonukleazes, vizualizacija agarozės gelyje.

M – GeneRuler 1 kb Plus DNR masių standartas; 1–9 – iš skirtingų kolonijų išskirtų ir hidrolizuotų plazmidžių fragmentai.

Po transformacijos pasirinktų kolonijų plazmidinė DNR buvo hidrolizuota į du fragmentus: ±

5,4 kB dydžio, kuris atitinka teorinį pET-21c(+) vektoriaus dydį ir ± 1,5 kB dydžio fragmentą, kuris

atitinka teorinį *SUP35NM-GFP* geno dydį, todėl galima teigti, kad *E. coli* BL21(DE3) kamieno ląstelių transformacija pavyko.

Toliau buvo pasirinktos kolonijos, turinčios pET-21c(+)-*SUP35NM-GFP* konstruktą ir vykdomas Sup35NM-GFP baltymo sintezės optimizavimas *E. coli* BL21(DE3) raiškos kamiene. Baltymo sintezės induktorius – IPTG, optimizavimui naudojamos galutinės induktoriaus koncentracijos: 0,5 mM, 1 mM, 2 mM ir inkubacijos laikas po induktoriaus pridėjimo: 2 val., 4 val., 6 val. (3.8 pav.). Gauti baltymų profiliai toliau buvo analizuojami naudojant glicininės NDS-PAGE metodą.



3.8 pav. *E. coli* BL21(DE3) pET-21c(+)-*SUP35NM-GFP* ląstelių baltymų profiliai vizualizuoti glicininės NDS-PAGE būdu.

M – PageRuler Plus Prestained baltymų masių standartas.

Teorinis Sup35NM-GFP baltymo dydis yra 55,7 kDa, 3.8 pav. NDS-PAGE nuotraukoje skirtumų tarp neindukuotos kontrolės su 0 mM IPTG ir indukuotų IPTG ląstelių baltymų profilių, nepriklausomai nuo koncentracijos ir indukcijos laiko, nėra – Sup35NM-GFP baltymo sintezė nebuvo gauta. Toliau buvo nuspręsta vykdyti baltymo sintezę *E. coli* Rosetta kamiene. Šis kamienas turi papildomą pRARE plazmidę, kuri koduoja retesnes tRNR molekules, šių tRNR molekulių nėra *E. coli* BL21(DE3) kamiene.

Konstruktu pET-21c(+)-*SUP35NM-GFP* buvo transformuotas *E. coli* Rosetta(DE3) raiškos kamienas, po transformacijos užaugusios kolonijos buvo pasirinktos ir patikrintos išskiriant plazmidinę DNR ir hidrolizuojant DNR seką su EcoRI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis (3.9 pav.).



3.9 pav. Iš *E. coli* Rosetta(DE3) transformantų kolonijų išskirto pET-21c(+)-*SUP35NM-GFP* konstrukto ir pRARE plazmidės, hidrolizuotų naudojant EcoRI ir XhoI restrikcijos endonukleazes, vizualizacija agarozės gelyje.

M – GeneRuler 1 kb Plus DNR masių standartas; 1–4 – iš skirtingų kolonijų išskirtų ir hidrolizuotų plazmidžių fragmentai.

Visų po transformacijos pasirinktų 4 kolonijų plazmidinė DNR buvo hidrolizuota į keturis fragmentus: ± 5,4 kB dydžio, kuris atitinka teorinį pET-

21c(+) vektoriaus dydį ir ± 1,5 kB dydžio fragmentą, kuris atitinka teorinį *SUP35NM-GFP* geno dydį ir du papildomus fragmentus: ± 4,7 kB dydžio ir ± 4,3 kB dydžio. Papildomi fragmentai gauti dėl to kad E. coli Rosetta kamiene yra papildoma pRARE plazmidė jos dydis yra apie ± 4,7 kB dydžio, restrikcijos endonukleazės galėjo dalinai hidrolizuoti pRARE plazmidę todėl matomi keli fragmentai – linearizuotos ir superspiralizuotos formos pRARE plazmidė. Kadangi yra teorinius pET-21c(+) vektoriaus ir SUP35NM-GFP geno dydžius atitinkantys fragmentai elektroforezės gelyje, tai galima teigti, kad *E. coli* Rosetta(DE3) kamieno ląstelių transformacija pavyko.

Toliau buvo pasirinktos kolonijos, turinčios pET-21c(+)-*SUP35NM-GFP* konstruktą ir vykdomas Sup35NM-GFP baltymo sintezės optimizavimas *E. coli* Rosetta(DE3) raiškos kamiene. Baltymo sintezės induktorius – IPTG, optimizavimui naudojamos galutinės induktoriaus koncentracijos: 0,5 mM, 1 mM, 2 mM ir inkubacijos laikas po induktoriaus pridėjimo: 2 val., 4 val., 6 val. (3.10 pav.). Gauti baltymų profiliai toliau buvo analizuojami naudojant glicininės NDS-PAGE metodą.



3.10 pav. *E. coli* Rosetta(DE3) pET-21c(+)-*SUP35NM-GFP* ląstelių baltymų profiliai vizualizuoti glicininės NDS-PAGE būdu.

M – PageRuler Plus Prestained baltymų masių standartas.

Teorinis Sup35NM-GFP baltymo dydis yra 55,7 kDa, 3.10 pav. NDS-PAGE nuotraukoje skirtumų tarp neindukuotos kontrolės su 0 mM IPTG ir indukuotų IPTG ląstelių baltymų profilių nepriklausomai nuo koncentracijos ir indukcijos laiko nėra – Sup35NM-GFP baltymo sintezė *E. coli* Rosetta(DE3) raiškos kamiene nebuvo gauta. Norint nustatyti kodėl Sup35NM-GFP baltymo sintezė nėra gaunama buvo iškeltos dvi hipotezės: 1) įvyko klaida vykdant Sup35NM-GFP geno klonavimo eksperimentus; 2) įvyko klaida indukuojant baltymo sintezę ir/ar vykdant NDS-PAGE. Tolimesniems darbams buvo nuspręsta patikrinti ar tinkamai vykdoma baltymo sintezė ir NDS-PAGE, todėl buvo pasirinktas kontrolinis pRSETB-8xHisSUP35NM konstruktas (gautas iš Amiloidų tyrimų grupės, Biotechnologijų institutas, Vilniaus Universitetas).

3.5 *E. coli* BL21(DE3) kamieno transformacija pRSETB-8xHis-*SUP35NM* konstruktu. Sup35NM baltymo sintezė ir jos optimizavimas *E. coli* BL21(DE3) raiškos kamiene.

Naudojant pRSETB-8xHis-SUP35NM konstruktą buvo transformuotos E. coli BL21(DE3) kamieno ląstelės (3.11 pav.).



3.11 pav. Iš *E. coli* BL21(DE3) transformantų kolonijų išskirto pRSETB-8xHis-*SUP35NM* konstrukto vizualizacija agarozės gelyje.

M – GeneRuler 1 kb Plus DNR masių standartas; 1– 5 – iš skirtingų kolonijų išskirtos plazmidės.

Agarozės gelio nuotraukoje fiksuoti fragmentai ± 3,9 kB dydžio, kuris atitinka teorinį pRSETB-8xHis-*SUP35NM* plazmidės dydį, todėl galima teigti, kad *E. coli* BL21(DE3) kamieno transformacija pRSETB-8xHis-*SUP35NM* konstruktu pavyko.

Kadangi plazmidėje įklonuotas *SUP35NM* genas koduoja nedidelį ± 30,2 kDa dydžio baltymą, Sup35NM baltymo sintezės optimizacijai vizualizuoti buvo pasirinktas tricinininės NDS-PAGE metodas (3.12 pav.). Šis metodas leidžia paprasčiau, su didesne rezoliucija nei glicininė NDS-PAGE atskirti mažos molekulinės masės baltymus.



3.12 pav. *E. coli* BL21(DE3) pRSETB-8xHis-*SUP35NM* ląstelių baltymų profiliai vizuolizuoti tricino NDS-PAGE būdu.

M – PageRuler Plus Prestained baltymų masių standartas.

Teorinis 8xHis-Sup35NM baltymo dydis yra 30,2 kDa, šioje tricininės NDS-PAGE nuotraukoje skirtumų tarp neindukuotos kontrolės su 0 mM IPTG ir indukuotų IPTG ląstelių baltymų profilių nepriklausomai nuo koncentracijos ir indukcijos laiko nėra – 8xHis-Sup35NM baltymo sintezė *E. coli* BL21(DE3) raiškos kamiene nebuvo gauta.

Yra žinoma, kad šio konstrukto raiška tikrai vyksta *E. coli* BL21(DE3) kamieno ląstelėse, tačiau šio eksperimento metu baltymo sintezė nebuvo gauta (žiūrėti 1 Priedas). Todėl buvo pasirinktas *E. coli*

BL21(DE3) StarTM kamienas, kuris yra skirtas tyrimams, kuriems reikalinga didelės išeigos netoksiškų rekombinantinių baltymų ekspresija (Chin et al., 2016). Yra žinoma, kad naudojant šį kamieną yra sėkmingai susintetinamas SupNM baltymas mokslininkų iš Biotechnologijų instituto, VU.

3.6 *E. coli* BL21(DE3) StarTM kamieno transformacija pRSETB-8xHis-*SUP35NM* konstruktu. Sup35NM baltymo sintezė ir jos optimizavimas *E. coli* BL21(DE3) StarTM raiškos kamiene.

Konstruktas pRSETB-8xHis-*SUP35NM* buvo transformuotas į *E. coli* BL21(DE3) StarTM raiškos kamieną, gautą iš Biotechnologijų Instituto, po transformacijos užaugusios kolonijos buvo atsitiktinai pasirinktos ir patikrintos išskiriant plazmidinę DNR ir hidrolizuojant DNR seką su XhoI ir NdeI restrikcijos endonukleazėmis (3.13 pav.).



3.13 pav. Iš *E. coli* BL21(DE3) StarTM transformantų kolonijos išskirto pRSETB-8xHis-*SUP35NM* konstrukto hidrolizuoto XhoI ir NdeI resitrikcijos endonukleazėmis vizualizacija agarozės gelyje.

 $M-GeneRuler 1\ kb$ Plus DNR masių standartas; 1 iš transformantų kolonijos išskirta ir hidrolizuota plazmidė.

Po transformacijos pasirinktos kolonijos plazmidinė DNR buvo hidrolizuota į du fragmentus: \pm 3,2 kB dydžio, kuris atitinka teorinį hidrolizuoto XhoI ir NdeI restrikcijos nukleazėmis pRSETB vektoriaus dydį ir \pm 0,8 kB dydžio fragmentą, kuris atitinka teorinį 8xHis-*SUP35NM* geno dydį. Kadangi yra teorinius pRSETB vektoriaus ir 8xHis-SUP35NM geno dydžius atitinkantys fragmentai elektroforezės gelyje, tai galima teigti, kad *E. coli* BL21(DE3) StarTM kamieno ląstelių transformacija pavyko.

Toliau buvo pasirinktos kolonijos, turinčios pRSETB-8xHis-*SUP35NM* konstruktą ir vykdomas 8xHis-Sup35NM baltymo sintezės optimizavimas *E. coli* BL21(DE3) StarTM raiškos kamiene. Baltymo sintezės induktorius – IPTG, optimizavimui naudojamos galutinės induktoriaus koncentracijos: 0,5 mM, 1 mM, 2 mM ir inkubacijos laikas po induktoriaus pridėjimo: 2 val., 4 val., 6 val. (3.14 pav.). Gauti baltymų profiliai toliau buvo analizuojami naudojant glicininės NDS-PAGE metodą.



3.14 pav. *E. coli* BL21(DE3) Star[™] pRSETB-8xHis-*SUP35NM* ląstelių baltymų profiliai vizuolizuoti glicino NDS-PAGE būdu.

M – PageRuler Plus Prestained baltymų masių standartas.

Teorinis 8xHis-Sup35NM baltymo dydis yra 30,2 kDa, šioje glicininės NDS-PAGE nuotraukoje skirtumų tarp neindukuotos kontrolės su 0 mM IPTG ir indukuotų IPTG ląstelių baltymų profilių nepriklausomai nuo koncentracijos ir indukcijos laiko nėra – 8xHis-Sup35NM baltymo sintezė *E. coli* BL21(DE3) Star TM raiškos kamiene nebuvo gauta (žiūrėti 2 Priedas).

Kadangi raiška nevyko naudojant tiek mokslinio tyrimo metu sukonstruotą pET-21c(+)-SUP35NM-GFP vektorių bei gautą pRSETB-8xHis-SUP35NM vektorių naudojant įvairius raiškos kamienus, buvo nuspręsta patikrinti ar nebuvo padaryta klaida vykdant baltymų sintezę ir/ar leidžiant NDS-PAGE. Buvo pasirinktas pET-21c(+)-GD25 konstruktas, turintis Gd25 lipazės geną, kuris koduoja 43 kDa dydžio baltymą. GD25 geno raiškos sąlygos buvo tokios pačios kaip ir praeituose prioninio baltymo sintezės tyrimuose. Yra žinoma, kad šio baltymo sintezė vyksta keliuose raiškos kamienuose, tačiau buvo pasirinktas *E. coli* BL21(DE3), todėl kad būtent šis kamienas buvo naudojamas prioninio baltymo sintezės tyrimuose naudojant pET-21c(+)-SUP35NM-GFP ir pRSETB-8xHis-SUP35NM plazmides.

3.5 pET-21c(+)-GD25 konstrukto perkėlimas į *E. coli* BL21(DE3) raiškos kamieną. Gd25 baltymo sintezė ir jos optimizavimas *E. coli* BL21(DE3) raiškos kamiene.

Iš VU GMC MBK kolekcijos gautas konstruktas pET-21c(+)-GD25 buvo transformuotas į *E. coli* BL21(DE3) raiškos kamieną, po transformacijos užaugusios kolonijos buvo atsitiktinai pasirinktos ir patikrintos išskiriant plazmidinę DNR ir hidrolizuojant DNR seką su NotI ir NdeI restrikcijos endonukleazėmis (3.15 pav.).



3.15 pav. Iš *E. coli* BL21(DE3) transformantų kolonijų išskirto pET-21c(+)-*GD25* konstrukto, hidrolizuoto naudojant NotI ir NdeI restrikcijos endonukleazes, vizualizacija agarozės gelyje.

M – GeneRuler 1 kb Plus DNR masių standartas; 1 – iš kolonijos išskirtos ir hidrolizuotos plazmidės fragmentai.

Po transformacijos pasirinktos kolonijos plazmidinė DNR buvo hidrolizuota į du fragmentus: \pm 5,4 kB dydžio, kuris atitinka teorinį pET-21c(+) vektoriaus dydį ir \pm 1,5 kB dydžio fragmentą, kuris atitinka teorinį *GD25* geno dydį, todėl galima teigti, kad *E. coli* BL21(DE3) kamieno ląstelių transformacija pavyko. Taip pat matomas fragmentas \pm 7 kB dydžio, tai galima teigti yra nepilnai hidrolizuotas,

linearizuotas pET-21c(+)-*GD25* konstruktas, nes teorinis pET-21c(+)-*GD25* konstrukto dydis yra 6,9 kB, o tai atitinka fragmentą matomą agarozės gelyje.

Toliau buvo pasirinktos kolonijos, turinčios pET-21c(+)-*GD25* konstruktą ir vykdomas Gd25 baltymo sintezės optimizavimas *E. coli* BL21(DE3) raiškos kamiene. Baltymo sintezės induktorius – IPTG, optimizavimui naudojamos galutinės induktoriaus koncentracijos: 0,5 mM, 1 mM, 2 mM ir inkubacijos laikas po induktoriaus pridėjimo: 2 val., 4 val., 6 val. (3.16 pav.). Gauti baltymų profiliai toliau buvo analizuojami naudojant glicininės NDS-PAGE metodą.



3.16 pav. *E. coli* BL21(DE3) pET-21c(+)-GD25 ląstelių baltymų profiliai vizuolizuoti glicino NDS-PAGE būdu.

M – PageRuler Plus Prestained baltymų masių standartas.

Teorinis Gd25 baltymo dydis yra 43 kDa, šioje glicininės NDS-PAGE nuotraukoje matomas baltymas, kurio dydis \pm 43 kDa, kas ir atitinka, teorinį Gd25 baltymo dydį. NDS-PAGE gelis buvo analizuotas naudojant Image Lab 6.1 gelių analizės programą, buvo matuojami \pm 43 kDa dydžio baltymo fragementų intesyvumai (žiūrėti 3.17 pav.).

| Takelio . numeris | Koreguotas fragmento intensyvumas | Fragmento intensyvumas |
|----------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| 0 mM IPTG 2 | 4,553,384 | 34,388,386 |
| 0,5 mM IPTG 3 | 7,249,212 | 39,740,158 |
| 1 mM IPTG 4 | 7,794,962 | 58,695,796 |
| 2 mM IPTG 5 | 14,298,532 | 70,907,498 |
| 6 | N/A | N/A |
| 0 mM IPTG 7 | 1,647,280 | 27,348,742 |
| 0,5 mM IPTG 8 | 2,456,170 | 28,882,506 |
| 1 mM IPTG 9 | 3,314,620 | 38,761,466 |
| 2 mM IPTG 10 | 6,142,844 | 29,297,512 |

| Takelio numeris | Koreguotas fragmento intensyvumas | Fragmento intensyvumas |
|--------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| 0 mM IPTG 2 | 87,584 | 10,451,728 |
| 0,5 mM IPTG 3 | 340,424 | 13,818,952 |
| 1 mM IPTG 4 | 400,680 | 15,937,152 |
| 2 mM IPTG 5 | 103,768 | 16,640,120 |

3.17 pav. NDS-PAGE matomo ± 43 kDa baltymo fragmento analizė naudojant Image Lab 6.1 programinę įrangą.

Dešinėje esančiame paveiksle matoma: 1 – PageRuler Plus Prestained baltymų masių standartas, takeliai 2-5 po 2 val. nuo indukcijos IPTG imti mėginiai, takeliai 7-10 po 4 val. nuo indukcijos imti mėginai. Kairėje esančiame paveiksle matoma: 1 – PageRuler Plus Prestained baltymų masių standartas, takeliai 2-5 po 6 val. nuo indukcijos imti mėginiai. Koreguotas fragmento intesyvumas – fragmento intesyvumas pašalinus gelio foną.

Išanalizavus NDS-PAGE matomus \pm 43 kDa dydžio fragmentus matyti, kad indukuotų ląstelių \pm 43 kDa fragmento intesyvumas yra didesnis nei neidukuotos kontrolės bazinės raiškos nepriklausomai nuo laiko, kada imti mėginiai, todėl galima teigti, kad Gd25 baltymo raiška *E. coli* BL21(DE3) kamiene vyksta, tad nebuvo padaryta klaidų vykdant baltymų sintezę ir leidžiant NDS-PAGE.

Sup35NM-GFP ir 8xHis-Sup35NM baltymų sintezė *E. coli* ląstelėse galėjo nevykti dėl kelių priežasčių įvardintų literatūroje:

1. Pakankama rekombinantinių baltymų ekspresija gali nevykti dėl baltymų degradacijos ląstelėje:

E. coli yra dvi pagrindinės fiziologinės proteolitinio skaidymo funkcijos. Pirmasis yra trumpalaikių reguliuojančių baltymų inaktyvavimas, o antrasis yra nepageidaujamų, neteisingai susintetintų, netinkamai susilankstytų baltymų degradacija. Šie nepageidaujami baltymai greičiausiai neturi biologinės funkcijos ir netgi gali būti toksiški ląstelei. Į šią kategoriją taip pat gali patekti rekombinantiniai baltymai, kuriuos ląstelė dažnai laiko nepageidaujamais (Rozkov et al., 2004).

2. Neveiksminga transliacija (mRNR gali likti antrinėje struktūroje ir transliacija gali būti apsunkinta):

Rekombinantinių genų mRNR linkusi kauptis ląstelėje, o *E. coli* mRNR yra gana nestabilios. Kai kurios mRNR savybės turi įtakos jos stabilumui pvz: kai kurie kodonų deriniai gali sukurti į Shine – Dalgarno panašias struktūras, kurios sukelia transliacijos pauzę hibridizuojant tikslinę mRNR ir verčiančios ribosomos 16S rRNR (Rosano et al., 2014)

3. Eukariotų specifinės aminorūgšties kodono seka skiriasi nuo prokariotinės *E. coli*. Šis reiškinys žinomas kaip "kodono šališkumas", kuris labai trukdo baltymų sintezei ir genų ekspresijai *E. coli*:

Kodono šališkumas atsiranda, kai svetimoje koduojančioje DNR sinoniminių kodonų atsiradimo dažnis labai skiriasi nuo šeimininko. Pilnos rekombinantinio baltymo sintezės momentu įvyksta tRNR išeikvojimas. Dėl šio trūkumo gali prasidėti aminorūgščių įsisavinimas ir (arba) polipeptido sutrumpinimas, taip paveikdamas heterologinio baltymo ekspresijos lygius (kuris geriausiu atveju bus žemas) ir (arba) jo aktyvumą (Rosano et al., 2014).

IŠVADOS

1. *SUP35NM-GFP* genas sėkmingai klonuotas į pET-21c(+) raiškos vektorių, gautas konstrukto dydis – 7,1 kB.

2. Naudojant pET-21c(+)-SUP35GFP konstruktą gauti transformantai:

- *E. coli* BL21(DE3) pET-21c(+)-*SUP35NM-GFP*;
- *E. coli* Rosetta(DE3) pET-21c(+)-*SUP35NM-GFP*;

3. Sup35 baltymo sintezė ir optimizavimas atliktas šiuose raiškos kamienuose:

- *E. coli* BL21 (DE3) pET-21c(+)-*SUP35NM-GFP*
- *E. coli* Rosetta (DE3) pET-21c(+)-*SUP35NM-GFP*
- E. coli BL21 (DE3) pRSETB-8xHis-SUP35NM

Naudojant 0,5, 1 ir 2 mM IPTG koncentraciją ir indukciją vykdant 2, 4 ir 6 valandas Sup35NM baltymo sintezė nebuvo gauta.

4. Įvertinta baltymų sintezę naudojant šiuos kontrolinius rekombinantinius konstruktus ir raiškos kamienus:

- E. coli BL21(DE3) StarTM pRSETB-8xHis-SUP35NM
- *E. coli* BL21(DE3) pET-21c(+)-*GD25*

Rekombinantinio baltymo sintezė buvo gauta tik *E. coli* BL21(DE3) pET-21c(+)-GD25 raiškos sistemoje.

Vilniaus universitetas Gyvybės mokslų centras Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra Neda Jonutytė-Trembo Mielių SUP35NM geno klonavimas ir raiška Escherichia coli ląstelėse

Mikrobiologijos magistro studijų baigiamasis darbas

Darbas atliktas

VU GMC mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje

SANTRAUKA

Baigiamojo darbo tikslas buvo klonuoti *SUP35NM* geną į bakterijų raiškos vektorių ir optimizuoti baltymo Sup35 sintezę *E. coli* raiškos kamienuose. Tyrimo metu buvo naudojami molekulinio klonavimo, rekombinantinių baltymų sintezės ir proceso optimizavimo, transformacijos naudojant pulsuojantį elektrinį lauką, mikroorganizmų kultyvavimo, baltymų profilių vizualizavimo metodai.

Sėkmingai atlikus bioinformatinę analizę, pasirinkus restrikcijos endonukleazes, atlikus DNR išskyrimą ir DNR fragmentų ligavimą buvo sėkmingai klonuotas *SUP35NM-GFP* genas į pET-21c(+) raiškos vektorių. pET-21c(+)-*SUP35NM-GFP* konstruktas buvo įvestas į *E. coli* BL21(DE3) ir *E. coli* Rosetta (DE3) raiškos kamienus. Toliau buvo atliekama Sup35NM baltymo sintezė ir optimizavimas naudojant šias raiškos sistemas. Baltymo sintezė nebuvo gauta.

Atlikus *E. coli* BL21(DE3) ląstelių elektrotransformacija konstruktu – pRSETB-8xHis-*SUP35NM* buvo vykdoma 8xHis-Sup35NM baltymo sintezė ir jos optimizavimas, išanalizavus NDS-PAGE matyti, kad baltymo sintezė nevyko. Toliau buvo pasirinktos dvi kontrolinės raiškos sistemos: *E. coli* BL21(DE3) StarTM pRSETB-8xHis-*SUP35NM* ir *E. coli* BL21(DE3) pET-21c(+)-*GD25* įvykdžius baltymų sintezę ir optimizavimą, NDS-PAGE geliuose buvo matyti, kad 8xHis-Sup35NM baltymo sintezė nevyko naudojant BL21(DE3) StarTM pRSETB-8xHis-*SUP35NM* raiškos sistemą, o Gd25 baltymo sintezė vyko, NDS-PAGE geliuose matomas 43 kDa baltymas, kuris ir atitinka teorinį lipazės Gd25 dydį.

VILNIUS UNIVERSITY

Life sciences center

Department of Microbiology and biotechnology

Neda Jonutytė-Trembo

Cloning and Expression of Yeast SUP35NM Gene in Escherichia coli Cells

Master Thesis

SUMMARY

The aim of this thesis was to clone the *SUP35NM* gene into a bacterial expression vector and to optimize the synthesis of the Sup35 protein in *E. coli* expression strains. Methods of molecular cloning, optimization of recombinant protein synthesis, transformation using a pulsating electric field, cultivation of microorganisms, and visualization of protein profiles were performed during the research.

The *SUP35NM-GFP* gene was successfully cloned into the pET-21c (+) expression vector after successful bioinformatics analysis, restriction endonuclease selection, DNA isolation, and ligation of DNA fragments. The pET-21c (+) - *SUP35NM-GFP* construct was introduced into *E. coli* BL21 (DE3) and *E. coli* Rosetta (DE3) expression strains. Synthesis and optimization of the Sup35NM protein using these expression systems continued. Protein synthesis was not obtained.

After the electrotransformation of *E. coli* BL21 (DE3) cells using the construct - pRSETB-8xHis-*SUP35NM*, the synthesis and its optimization of 8xHis-Sup35NM protein was performed, SDS-PAGE analysis showed that no protein synthesis took place. Two control expression systems were then selected: *E. coli* BL21 (DE3) StarTM pRSETB-8xHis-*SUP35NM* and *E. coli* BL21 (DE3) pET-21c (+)-*GD25* After protein synthesis and optimization, NDS-PAGE gels showed that 8xHis-Sup35NM protein synthesis did not occur using the BL21 (DE3) StarTM pRSETB-8xHis-*SUP35NM* expression system although, Gd25 protein synthesis occurred using *E. coli* BL21 (DE3) pET-21c (+)-*GD25* expression strain, NDS-PAGE gels show a 43 kDa protein that corresponds to the theoretical size of lipase Gd25.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

- Alberti, S., Halfmann, R., King, O., Kapila, A., & Lindquist, S. (2009). A Systematic Survey Identifies Prions and Illuminates Sequence Features of Prionogenic Proteins. *Cell*, 137(1), 146–158. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.044
- Andersen, C. L., Matthey-Dupraz, A., Missiakas, D., & Raina, S. (1997). A new Escherichia coli gene, dsbG, encodes a periplasmic protein involved in disulphide bond formation, required for recycling DsbA/DsbB and DsbC redox proteins. *Molecular Microbiology*, 26(1), 121–132. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5581925.x
- Ano Bom, A. P. D., Rangel, L. P., Costa, D. C. F., de Oliveira, G. A. P., Sanches, D., Braga, C. A., Gava, L. M., Ramos, C. H. I., Cepeda, A. O. T., Stumbo, A. C., De Moura Gallo, C. V., Cordeiro, Y., & Silva, J. L. (2012). Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: Implications for cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(33), 28152–28162. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.340638
- Bagyinszky, E., Giau, V. V., Youn, Y. C., An, S. S. A., & Kim, S. (2018). Characterization of mutations in PRNP (prion) gene and their possible roles in neurodegenerative diseases. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 14, 2067–2085. https://doi.org/10.2147/NDT.S165445
- Bessette, P. H., Aslund, F., Beckwith, J., & Georgiou, G. (1999). Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proceedings of the National Academy* of Sciences of the United States of America, 96(24), 13703–13708. https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13703
- Bradley, M. E., & Liebman, S. W. (2003). Destabilizing Interactions Among [PSI +] and [PIN +] Yeast Prion Variants. *Genetics*, *165*(4), 1675–1685. https://doi.org/10.1093/genetics/165.4.1675

- Brinkmann, U., Mattes, R. E., & Buckel, P. (1989). High-level expression of recombinant genes in Escherichia coli is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene*, 85(1), 109–114. https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90470-8
- Cabrita, L. D., Dai, W., & Bottomley, S. P. (2006). A family of E. coli expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production. *BMC Biotechnology*, 6, 12. https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-12
- Cascarina, S., & Ross, E. D. (2014). Yeast Prions and Human Prion-like Proteins: Sequence Features and Prediction Methods. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(11), 2047–2063. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1543-6
- Castle, A. R., & Gill, A. C. (2017). Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2017.00019
- Chandramowlishwaran, P., Sun, M., Casey, K. L., Romanyuk, A. V., Grizel, A. V., Sopova, J. V., Rubel,
 A. A., Nussbaum-Krammer, C., Vorberg, I. M., & Chernoff, Y. O. (2018). Mammalian amyloidogenic proteins promote prion nucleation in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(9), 3436–3450. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.809004
- Chernova, T. A., Wilkinson, K. D., & Chernoff, Y. O. (2014). Physiological and environmental control of yeast prions. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2), 326–344. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12053
- Chew, C. C., Magallon, T., Martinat, N., Lecompte, F., Combarnous, Y., & Gosling, J. P. (1995). The relative protein disulphide isomerase (PDI) activities of gonadotrophins, thioredoxin and PDI. *Biochemical Society Transactions*, 23(2), 394S. https://doi.org/10.1042/bst023394s
- Chin, Y.-W., Seo, N., Kim, J.-H., & Seo, J.-H. (2016). Metabolic engineering of Escherichia coli to produce 2'-fucosyllactose via salvage pathway of guanosine 5'-diphosphate (GDP)-l-fucose. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(11), 2443–2452. https://doi.org/10.1002/bit.26015

- Cinquin, O., Christopherson, R. I., & Menz, R. I. (2001). A hybrid plasmid for expression of toxic malarial proteins in Escherichia coli. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *117*(2), 245–247. https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00354-1
- Cox, B. S. (1965). Ψ, A cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast. *Heredity*, 20(4), 505–521. https://doi.org/10.1038/hdy.1965.65
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008
- Dergalev, A. A., Alexandrov, A. I., Ivannikov, R. I., Ter-Avanesyan, M. D., & Kushnirov, V. V. (2019). Yeast Sup35 Prion Structure: Two Types, Four Parts, Many Variants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), 2633. https://doi.org/10.3390/ijms20112633
- Derkatch, I. L., Bradley, M. E., Zhou, P., Chernoff, Y. O., & Liebman, S. W. (1997). Genetic and Environmental Factors Affecting the de novo Appearance of the [PSI +] Prion in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, 147(2), 507–519. https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.507
- Du, Z. (2011). The complexity and implications of yeast prion domains. *Prion*, 5(4), 311–316. https://doi.org/10.4161/pri.5.4.18304
- Du, Z., Park, K.-W., Yu, H., Fan, Q., & Li, L. (2008). Newly identified prion linked to the chromatinremodeling factor Swi1 in Saccharomyces cerevisiae. *Nature Genetics*, 40(4), 460–465. https://doi.org/10.1038/ng.112
- Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to Optimize Protein Expression in E. coli. *Current Protocols in Protein Science*, *61*(1), 5241. https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0524s61

- Gabriel, B., & Teissié, J. (1997). Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane. *Biophysical Journal*, 73(5), 2630–2637. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78292-4
- Geoghegan, J. C., Valdes, P. A., Orem, N. R., Deleault, N. R., Williamson, R. A., Harris, B. T., & Supattapone, S. (2007). Selective incorporation of polyanionic molecules into hamster prions.
 The Journal of Biological Chemistry, 282(50), 36341–36353. https://doi.org/10.1074/jbc.M704447200
- Geschwind, M. D. (2015). Prion Diseases: *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 21, 1612–1638. https://doi.org/10.1212/CON.00000000000251
- Gill, A. C., & Castle, A. R. (2018). Chapter 2—The cellular and pathologic prion protein. In M. Pocchiari
 & J. Manson (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 153, pp. 21–44). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63945-5.00002-7
- Gosse, M. E., Padmanabhan, A., Fleischmann, R. D., & Gottesman, M. M. (1993). Expression of Chinese hamster cAMP-dependent protein kinase in Escherichia coli results in growth inhibition of bacterial cells: A model system for the rapid screening of mutant type I regulatory subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 8159– 8163. https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.8159
- Halfmann, R., Wright, J. R., Alberti, S., Lindquist, S., & Rexach, M. (2012). Prion formation by a yeast GLFG nucleoporin. *Prion*, *6*(4), 391–399. https://doi.org/10.4161/pri.20199
- Ishikawa, T. (2021). Saccharomyces cerevisiae in neuroscience: How unicellular organism helps to better understand prion protein? *Neural Regeneration Research*, *16*(3), 489–495. https://doi.org/10.4103/1673-5374.293137

- Jana, S., & Deb, J. K. (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(3), 289–298. https://doi.org/10.1007/s00253-004-1814-0
- Jurado, P., de Lorenzo, V., & Fernández, L. A. (2006). Thioredoxin fusions increase folding of single chain Fv antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli: Evidence that chaperone activity is the prime effect of thioredoxin. *Journal of Molecular Biology*, 357(1), 49–61. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.058
- Khow, O., & Suntrarachun, S. (2012). Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(2), 159–162. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60213-X
- Kinosita, K., & Tsong, T. T. (1977). Hemolysis of human erythrocytes by transient electric field. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(5), 1923–1927. https://doi.org/10.1073/pnas.74.5.1923
- Kirienko, N. V., Lepikhov, K. A., Zheleznaya, L. A., & Matvienko, N. I. (2004). Significance of Codon Usage and Irregularities of Rare Codon Distribution in Genes for Expression of BspLU11III Methyltransferases. *Biochemistry* (*Moscow*), 69(5), 527–535. https://doi.org/10.1023/B:BIRY.0000029851.96180.92
- Klappa, P., Hawkins, H. C., & Freedman, R. B. (1997). Interactions between protein disulphide isomerase and peptides. *European Journal of Biochemistry*, 248(1), 37–42. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00037.x
- Kurahashi, H., Ishiwata, M., Shibata, S., & Nakamura, Y. (2008). A Regulatory Role of the Rnq1 Nonprion Domain for Prion Propagation and Polyglutamine Aggregates. *Molecular and Cellular Biology*. https://doi.org/10.1128/MCB.01900-07

- Kurokawa, Y., Yanagi, H., & Yura, T. (2000). Overexpression of protein disulfide isomerase DsbC stabilizes multiple-disulfide-bonded recombinant protein produced and transported to the periplasm in Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3960–3965. https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3960-3965.2000
- Kurokawa, Y., Yanagi, H., & Yura, T. (2001). Overproduction of bacterial protein disulfide isomerase (DsbC) and its modulator (DsbD) markedly enhances periplasmic production of human nerve growth factor in Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(17), 14393–14399. https://doi.org/10.1074/jbc.M100132200
- Landreh, M., Sawaya, M. R., Hipp, M. S., Eisenberg, D. S., Wüthrich, K., & Hartl, F. U. (2016). The formation, function and regulation of amyloids: Insights from structural biology. *Journal of Internal Medicine*, 280(2), 164–176. https://doi.org/10.1111/joim.12500
- Levy, R., Weiss, R., Chen, G., Iverson, B. L., & Georgiou, G. (2001). Production of correctly folded Fab antibody fragment in the cytoplasm of Escherichia coli trxB gor mutants via the coexpression of molecular chaperones. *Protein Expression and Purification*, 23(2), 338–347. https://doi.org/10.1006/prep.2001.1520
- Liebman, S. W., Bagriantsev, S. N., & Derkatch, I. L. (2006). Biochemical and genetic methods for characterization of [PIN+] prions in yeast. *Methods*, 39(1), 23–34. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.04.010
- Lilie, H., McLaughlin, S., Freedman, R., & Buchner, J. (1994). Influence of protein disulfide isomerase (PDI) on antibody folding in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(19), 14290–14296.
- Liu, X., & Wang, C. C. (2001). Disulfide-dependent folding and export of Escherichia coli DsbC. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 1146–1151. https://doi.org/10.1074/jbc.M004929200
- Luft, C., & Ketteler, R. (2015). Electroporation Knows No Boundaries. *Journal of Biomolecular Screening*, 20(8), 932–942. https://doi.org/10.1177/1087057115579638

- Lyke, D. R., Dorweiler, J. E., & Manogaran, A. L. (2019). The Three Faces of Sup35. *Yeast (Chichester, England)*, *36*(8), 465–472. https://doi.org/10.1002/yea.3392
- Makino, T., Skretas, G., & Georgiou, G. (2011). Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. *Microbial Cell Factories*, 10, 32. https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-32
- Masuda, K., Kamimura, T., Kanesaki, M., Ishii, K., Imaizumi, A., Sugiyama, T., Suzuki, Y., & Ohtsuka,
 E. (1996). Efficient production of the C-terminal domain of secretory leukoprotease inhibitor as
 a thrombin-cleavable fusion protein in Escherichia coli. *Protein Engineering*, 9(1), 101–106.
 https://doi.org/10.1093/protein/9.1.101
- Mijakovic, I., Petranovic, D., Macek, B., Cepo, T., Mann, M., Davies, J., Jensen, P. R., & Vujaklija, D.
 (2006). Bacterial single-stranded DNA-binding proteins are phosphorylated on tyrosine. *Nucleic Acids Research*, 34(5), 1588–1596. https://doi.org/10.1093/nar/gkj514
- Mironova, R., Niwa, T., Handzhiyski, Y., Sredovska, A., & Ivanov, I. (2005). Evidence for nonenzymatic glycosylation of Escherichia coli chromosomal DNA. *Molecular Microbiology*, 55(6), 1801–1811. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04504.x
- Mukhopadhyay, A. (2000). Reversible protection of disulfide bonds followed by oxidative folding render recombinant hCGbeta highly immunogenic. Vaccine, 18(17), 1802–1810. https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00482-x
- Neubauer, A., Soini, J., Bollok, M., Zenker, M., Sandqvist, J., Myllyharju, J., & Neubauer, P. (2007).
 Fermentation process for tetrameric human collagen prolyl 4-hydroxylase in Escherichia coli: Improvement by gene optimisation of the PDI/beta subunit and repeated addition of the inducer anhydrotetracycline. *Journal of Biotechnology*, *128*(2), 308–321. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.10.017

- Patel, B. K., Gavin-Smyth, J., & Liebman, S. W. (2009). The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. *Nature Cell Biology*, 11(3), 344–349. https://doi.org/10.1038/ncb1843
- Patel, B. K., & Liebman, S. W. (2007). 'Prion-proof' for [PIN+]: Infection with in vitro-made amyloid aggregates of Rnq1p-(132–405) induces [PIN+]. *Journal of Molecular Biology*, 365(3), 773–782. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.069
- Peti, W., & Page, R. (2007). Strategies to maximize heterologous protein expression in Escherichia coli with minimal cost. *Protein Expression and Purification*, 51(1), 1–10. https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.06.024
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(23), 13363–13383. https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13363
- Resende, C. G., Outeiro, T. F., Sands, L., Lindquist, S., & Tuite, M. F. (2003). Prion protein gene polymorphisms in Saccharomyces cerevisiae: Yeast prion gene polymorphisms. *Molecular Microbiology*, 49(4), 1005–1017. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03608.x
- Revie, D., Smith, D. W., & Yee, T. W. (1988). Kinetic analysis for optimization of DNA ligation reactions. *Nucleic Acids Research*, 16(21), 10301–10321.
- Riek, R., & Eisenberg, D. S. (2016). The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature*, *539*(7628), 227–235. https://doi.org/10.1038/nature20416
- Rogoza, T., Goginashvili, A., Rodionova, S., Ivanov, M., Viktorovskaya, O., Rubel, A., Volkov, K., & Mironova, L. (2010). Non-Mendelian determinant [ISP+] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(23), 10573–10577. https://doi.org/10.1073/pnas.1005949107
- 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

- Rosenberg, A. H., Goldman, E., Dunn, J. J., Studier, F. W., & Zubay, G. (1993). Effects of consecutive AGG codons on translation in Escherichia coli, demonstrated with a versatile codon test system. *Journal of Bacteriology*, 175(3), 716–722. https://doi.org/10.1128/jb.175.3.716-722.1993
- Rozkov, A., & Enfors, S.-O. (2004). Analysis and Control of Proteolysis of Recombinant Proteins in Escherichia coli. In *Physiological Stress Responses in Bioprocesses: -/-* (pp. 163–195). Springer. https://doi.org/10.1007/b95567
- Sahdev, S., Khattar, S. K., & Saini, K. S. (2007). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307(1–2), 249–264. https://doi.org/10.1007/s11010-007-9603-6
- Samuelson, J. C. (2011). Recent developments in difficult protein expression: A guide to E. coli strains, promoters, and relevant host mutations. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 705, 195– 209. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-967-3_11
- Sawaya, M. R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M. I., Sievers, S. A., Apostol, M. I., Thompson, M. J., Balbirnie, M., Wiltzius, J. J. W., McFarlane, H. T., Madsen, A. Ø., Riekel, C., & Eisenberg, D. (2007). Atomic structures of amyloid cross-β spines reveal varied steric zippers. *Nature*, 447(7143), 453–457. https://doi.org/10.1038/nature05695
- Sharp, P. M., & Devine, K. M. (1989). Codon usage and gene expression level in Dictyostelium discoideum: Highly expressed genes do "prefer" optimal codons. *Nucleic Acids Research*, 17(13), 5029–5039. https://doi.org/10.1093/nar/17.13.5029
- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113–128. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.08.004
- Sørensen, H. P., Sperling-Petersen, H. U., & Mortensen, K. K. (2003). Production of recombinant thermostable proteins expressed in Escherichia coli: Completion of protein synthesis is the

bottleneck. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 786(1–2), 207–214. https://doi.org/10.1016/s1570-0232(02)00689-x

- Soriaga, A. B., Sangwan, S., Macdonald, R., Sawaya, M. R., & Eisenberg, D. (2016). Crystal Structures of IAPP Amyloidogenic Segments Reveal a Novel Packing Motif of Out-of-Register Beta Sheets. *The Journal of Physical Chemistry*. B, 120(26), 5810–5816. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.5b09981
- Suzuki, G., Shimazu, N., & Tanaka, M. (2012). A Yeast Prion, Mod5, Promotes Acquired Drug Resistance and Cell Survival Under Environmental Stress. Science. https://doi.org/10.1126/science.1219491
- Teissié, J., & Rols, M. P. (1993). An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophysical Journal*, 65(1), 409–413. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81052-X
- Tekle, E., Astumian, R. D., & Chock, P. B. (1990). Electro-permeabilization of cell membranes: Effect of the resting membrane potential. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 172(1), 282–287. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(05)80206-2
- Tessier, P. M., & Lindquist, S. (2009). Unraveling infectious structures, strain variants and species barriers for the yeast prion [PSI+]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), 598–605. https://doi.org/10.1038/nsmb.1617
- True, H. L., Berlin, I., & Lindquist, S. L. (2004). Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature*, 431(7005), 184–187. https://doi.org/10.1038/nature02885
- Trundova, M., & Celer, V. (2007). Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized E. coli cells. *Virus Genes*, 34(2), 199–204. https://doi.org/10.1007/s11262-006-0043-2

- Tsemekhman, K., Goldschmidt, L., Eisenberg, D., & Baker, D. (2007). Cooperative hydrogen bonding in amyloid formation. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 16(4), 761–764. https://doi.org/10.1110/ps.062609607
- van der Wel, P. C. A., Lewandowski, J. R., & Griffin, R. G. (2007). Solid-state NMR study of amyloid nanocrystals and fibrils formed by the peptide GNNQQNY from yeast prion protein Sup35p. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(16), 5117–5130. https://doi.org/10.1021/ja068633m
- Wang, L., Schubert, D., Sawaya, M. R., Eisenberg, D., & Riek, R. (2010). Multidimensional Structure– Activity Relationship of a Protein in Its Aggregated States. *Angewandte Chemie*, 122(23), 3996– 4000. https://doi.org/10.1002/ange.201000068
- Wickner, R. B. (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: Evidence for a prion analog in Saccharomyces cerevisiae. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5158), 566–569. https://doi.org/10.1126/science.7909170
- Wickner, R. B., Edskes, H. K., Bateman, D. A., Kelly, A. C., Gorkovskiy, A., Dayani, Y., & Zhou, A. (2013). Amyloids and Yeast Prion Biology. *Biochemistry*, 52(9), 1514–1527. https://doi.org/10.1021/bi301686a
- Wickner, R. B., Shewmaker, F. P., Bateman, D. A., Edskes, H. K., Gorkovskiy, A., Dayani, Y., & Bezsonov, E. E. (2015). Yeast Prions: Structure, Biology, and Prion-Handling Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 79(1), 1–17. https://doi.org/10.1128/MMBR.00041-14
- Wickner, R. B., Son, M., & Edskes, H. K. (2019). Prion Variants of Yeast are Numerous, Mutable, and Segregate on Growth, Affecting Prion Pathogenesis, Transmission Barriers, and Sensitivity to Anti-Prion Systems. *Viruses*, 11(3), 238. https://doi.org/10.3390/v11030238

- Winter, J., Klappa, P., Freedman, R. B., Lilie, H., & Rudolph, R. (2002). Catalytic activity and chaperone function of human protein-disulfide isomerase are required for the efficient refolding of proinsulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 310–317. https://doi.org/10.1074/jbc.M107832200
- Yin, J., Li, G., Ren, X., & Herrler, G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127(3), 335–347. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.012
- Yu, Z.-B., & Jin, J.-P. (2007). Removing the regulatory N-terminal domain of cardiac troponin I diminishes incompatibility during bacterial expression. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 461(1), 138–145. https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.01.011
- Yue, B. G., Ajuh, P., Akusjärvi, G., Lamond, A. I., & Kreivi, J. P. (2000). Functional coexpression of serine protein kinase SRPK1 and its substrate ASF/SF2 in Escherichia coli. *Nucleic Acids Research*, 28(5), E14. https://doi.org/10.1093/nar/28.5.e14
- Zhang, Z., Gildersleeve, J., Yang, Y.-Y., Xu, R., Loo, J. A., Uryu, S., Wong, C.-H., & Schultz, P. G. (2004). A new strategy for the synthesis of glycoproteins. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5656), 371–373. https://doi.org/10.1126/science.1089509

PADĖKA

Esu labai dėkinga savo darbo vadovei j. asist. Justinai Versockienei už nuolatinę pagalbą, draugiškumą, paskatinimą ir palaikymą reikalingu metu. Taip pat noriu padėkoti prof. Eglei Lastauskienei už galimybę atlikti praktiką Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje. Ačiū doc. Ingridai Prigodinai Lukošienei už pagalbą sunkiu laikotarpiu.

Begalo dėkinga esu savo vyrui Lukui Trembo, kuris buvo šalia pačiais sudėtingiausiais studijų ir gyvenimo momentais. Ir žinoma noriu padėkoti Astai Jarašiūtei, kurios jau dėja nebėra su mumis, ačiū tau už šiuos beveik 6 metus, už visada gerą žodį, optimizmą, rūpestį ir nuostabią draugystę.

FINANSAVIMAS

Baigiamasis darbas dalinai finansuotas Europos socialinio fondo lėšomis pagal priemonę Nr. 09.3.3.-LMT-K-712-24-0037 2 "Mokslininkų, kitų tyrėjų, studentų mokslinės kompetencijos ugdymas per praktinę mokslinę veiklą "veiklos "Studentų gebėjimų vykdyti MTEP (meno tyrimų) veiklas ugdymas" poveiklę "Studentų gebėjimų ugdymas dalyvaujant mokslinėse (meno tiriamosiose) vasaros praktikose" įgyvendinant projektą (tyrimą) [PSI] priono variantų įtaka *Saccharomyces cerevisiae* ląstelių fenotipui.

Sup35NM baltymo sintezė ir optimizavimas *E. coli* BL21(DE3) pRSETB-8xHis-*SUP35NM* raiškos sistemoje NDS-PAGE rezultatai analizuoti Image LAB 6.1 programinę įranga.



tricino NDS-PAGE būdu. M – PageRuler Plus Prestained baltymų masių standartas.

Gelis analizuotas naudojant Image Lab 6.1 programinę įrangą. 2-10 takeliuose rusvai pažymeta 8xHis-SUP35NM baltymo teorinė vieta gelyje.

2 Priedas

Sup35NM baltymo sintezė ir optimizavimo *E. coli* BL21(DE3) StarTM pRSETB-8xHis-*SUP35NM* raiškos sistemoje NDS-PAGE rezultatai analizuoti Image LAB 6.1 programinę įranga.



Gelis analizuotas naudojant Image Lab 6.1 programinę įrangą. 2-10 takeliuose rusvai pažymeta 8xHis-SUP35NM baltymo teorinė vieta gelyje.