VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos IV kurso studentės

Aurelijos CICILIONYTĖS

Bakalaurinis darbas

Bakteriofagų endolizinų aktyvumo tyrimas

Darbo vadovė dr. Aurelija Zajančkauskaitė

Vilnius 2019

Bakteriofagų endolizinų aktyvumo tyrimas

Darbas atliktas Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje

Aurelija CICILIONYTĖ

Darbo vadovė:

Dr. Aurelija ZAJANČKAUSKAITĖ

Katedros vedėja:

Prof. Dr. (HP) Lilija KALĖDIENĖ

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS **5**
ĮVADAS **7**
1. LITERATŪROS APŽVALGA **8**
1.1. Lizinių bakteriofagų ir bakterijų sąveika 8
1.1.1. Lizinių bakteriofagų atakos ir bakterijų apsaugos strategijos 9
1.1.2. Bakteriofagų taikinys: bakterijų apvalkalas 14
1.2. Lizinių bakteriofagųz endolizinai 17
1.2.1. Peptidoglikano hidrolazės 21
1.2.2. Endolizinų pritaikymas ir panaudojimas 22
2. MEDŽIAGOS IR METODAI **25**
2.1. Medžiagos 25
2.1.1. Bakterijų rūšys ir kamienai 25
2.1.2. Bakteriofagai 25
2.1.3. Plazmidiniai vektoriai 25
2.1.4. Mitybinės terpės ir tirpalai 26
2.1.5. Reagentai ir komerciniai rinkiniai 27
2.1.6. Prietaisai 28
2.2. Metodai 28
2.2.1. Bakteriofagų padauginimas 28
2.2.2. DNR fragmentų amplifikavimas *in vitro* 29
2.2.3. DNR fragmentų ir plazmidinių vektorių restrikcija 29
2.2.4. DNR fragmentų ir vektorių ligavimas 29
2.2.5. Ląstelių transformacija 30
2.2.6. Transformantų atranka *in vitro* 30
2.2.7. Mutacijų įvedimas 30
2.2.8. DNR sekoskaita ir sekų analizė 30
2.2.9. Rekombinantinių baltymų indukcija ir gryninimas 31
2.2.10. Baltymų elektroforezė 31
2.2.11. Rekombinantinių baltymų koncentracijos nustatymas 31
2.2.12. Rekombinantinių baltymų pH optimumo nustatymas 32
2.2.13. Rekombinantinių baltymų aktyvumo nustatymas agaro lėkštelių metodu 32
2.2.14. Rekombinantinių baltymų aktyvumo nustatymas fiksuojant bakterijų kolonijas formuojančių vienetų redukciją 32
2.2.15. Rekombinantinių baltymų termostabilumo nustatymas 33
3. REZULTATAI IR APTARIMAS **34**
3.1. Bakteriofagų endolizinų bioinformatinė analizė 34

3.2. Bakteriofagų VpaE1, Vid5 ir PSKM endolizinų genų klonavimas, atranka ir rekombinantinių baltymų raiška bei gryninimas 37
3.3. Rekombinantinių baltymų aktyvumo ir savybių tyrimas 41
3.3.1. Pirminis aktyvumo įvertinimas ir tinkamo pH nustatymas 41
3.3.2. Aktyvumo nustatymas agaro lėkštelių metodu....43
3.3.3. Gyvybingų kolonijų po poveikio rekombinantiniais endolizinais įvertinimas....45
3.3.4. Termostabilumo įvertinimas 46
IŠVADOS....52
SANTRAUKA....53
SUMMARY....54
LITERATŪROS SĄRAŠAS....56

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

ASR – atvirojo skaitymo rėmelis

ATP – adenozintrifosfatas

BLA – bakterinės ląstelės apvalkalas

Bp terpė – Bakto-peptono terpė

CM – citoplazminė membrana

CRISPR (*angl.* Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – taisyklingai pertraukti trumpi susitelkę palindrominiai pasikartojimai

CS – citoplazminė sienelė

DTT – ditiotreitolis

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis

FSB – galutinis baltymų pavyzdžio buferis (*angl.* final sample buffer)

GlcNAc – N-acetilgliukozamininė rūgštis

IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas

KD – katalitinis domenas

KFV – kolonijas formuojantis vienetas

LB terpė – Luria-Bertani terpė

LPS – lipopolisacharidinis sluoksnis

LSPD – ląstelės sienelės prisijungimo domenas

LTA – lipoteichoinė rūgštis

MurNAc – *N*-acetilmuraminė rūgštis

NAM – *N*-acetilmuramoil-L-alanino amidazė

NDS – natrio dodecil sulfatas

OT – optinis tankis

PB – praskiedimo buferis

PG – peptidoglikanas

PGR – polimerazės grandininė reakcija

PJG – protonų judėjimo galia

RE-azė – restrikcijos endonuklеazė

R-M – restrikcijos-modifikacijos sistema

RPB – prie receptoriaus prisijungiantys baltymai

SAR domenas – signalo-sulaikymo-paleidimo domenas (*angl.*signal-anchor-release domain)

TA – toksinas-antitoksinas

TAE buferis – Tris-acetato EDTA buferis

TEMED – tetrametiletilendiaminas

ĮVADAS

Bakteriofagai dažniausiai apibūdinami kaip neląstelinės kilmės mikroorganizmai, infekuojantys bakterijas. Jie yra randami visose ekosistemose ir reikalauja bakterinės ląstelės šeimininko, jog galėtų pasidauginti. Bakteriofagų vystymosi ciklo tyrimai pradėti jau XX amžiaus pirmoje pusėje, kai tik buvo pastebėtas jų lizinis poveikis bakterijoms.

Paskutinė lizinio bakteriofago vystymosi ciklo stadija yra šeimininko ląstelės lizė. Šiam griežtai laike užprogramuotam procesui įvykti bakteriofagai naudoja endolizino ir holino strategiją. Endolizinai – tai ląstelės sienelės peptidoglikaną degraduojantys fermentai, reikalingi lizinio ciklo pabaigoje susiformavusių virionų išėjimui į aplinką. Pastebėjus išgrynintų endolizinų gebėjimą lizuoti bakterijas iš išorės, pradėti intensyviai tyrinėti dėl jų plataus pritaikymo potencialo nuo bakterijų detekcijos iki patogeninių bakterijų naikinimo. Pastaruoju metu ypač išaugo susidomėjimas šiais fermentais, nes didėjant bakterijų atsparumui antibiotikams, ieškoma alternatyvų patogeninių bakterijų naikinimui.

Dar didesnis poreikis kyla Gram-neigiamų bakterijų bakteriofagų tyrimams dėl šių endolizinų specifinės struktūros ir galimos efektyvios Gram-neigiamų bakterijų lizės. Kadangi tik nedidelė dalis šias bakterijas infekuojančių bakteriofagų endolitinių baltymų yra ištirta arba jų aktyvumas nebuvo pastebėtas, svarbu identifikuoti ir ištirti kuo daugiau šių bakteriofagų endolizinų.

Darbo tikslas: sukonstruoti bakteriofagų rekombinantinius endolizinus ir atlikti jų aktyvumo tyrimus.

Šiam tikslui pasiekti buvo iškelti darbo **uždaviniai**:

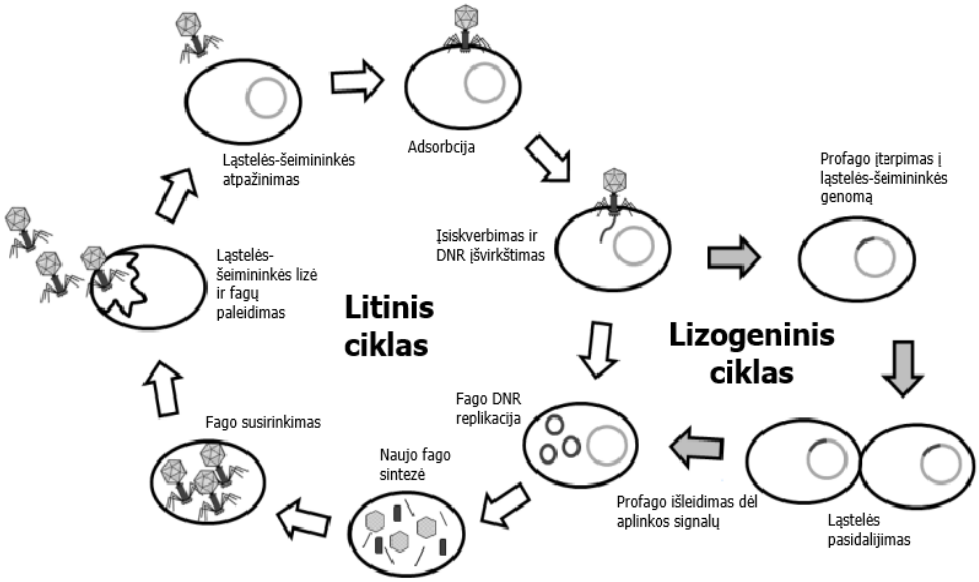
1. Sukonstruoti rekombinantines plazmides, koduojančias bakteriofagų vB_EcoM_VpaE1, vB_PagS_Vid5 ir vB_PagM_PSKM endolizinus, sulietus su histidinų inkaru;
2. Indukuoti rekombinantinių endolizinų raišką ir juos išgryninti;
3. Nustatyti tinkamas pH buferių sąlygas rekombinantiniams endolizinams;
4. Įvertinti Gram-teigiamų ir Gram-neigiamų bakterijų jautrumą endolizinų poveikiui;
5. Atlikti rekombinantinių endolizinų temperatūrinio stabilumo įvertinimą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Lizinių bakteriofagų ir bakterijų sąveika

Bakteriofagai (arba fagai) – maži, apie 20-200 nm dydžio, bakterijas ir archėjas infekuojantys virusai, greičiausiai seniausi ir labiausiai paplitę virusai Žemėje (Doss et al., 2017). Fagų klasifikacija, kurią vykdo Tarptautinis virusų taksonomijos komitetas (*angl*. International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), yra paremta viriono morfologija, nukleorūgščių charakteristika. Fagai skirstomi į uodeguotuosius ir beuodegius. Uodeguotieji fagai, turintys dvigrandę DNR ir priklausantys *Caudovirales* eilei, sudaro pačią gausiausią grupę, apimančią apie 96 % visų žinomų bakteriofagų (Ackermann, 2007, 2009). Pagal uodegėlės tipą ilgą laiką jie buvo skirstomi į tris šeimas *Myoviridae* (susitraukianti uodegėlė), *Siphoviridae* (nesusitraukinti, lanksti arba nelanksti) ir *Podoviridae* (trumpa ir nelanksti) (Ackermann, 2009). Pastaruoju metu GenBank duomenų bazėje vis daugėjant naujų fagų sekoskaitos duomenų, *Caudovirales* eilė pasipildė dar 2 šeimomis – *Ackermannviridae* ir *Hellereviridae* (https://talk.ictvonline.org/).

Pagal vystymosi ciklą uodeguotieji fagai gali būti skirstomi į lizinius ir nuosaikiuosius. Egzistuoja lizinis ir lizogeninis nuosaikiųjų bakteriofagų vystymosi ciklai (**1 pav.**). Lizogeninio ciklo metu virusinis genomas nepradeda kontroliuoti ląstelės-šeimininkės gyvybinių procesų, bet integruojasi į šeimininko ląstelės genomą ir replikuojasi kartu su juo, kad būtų generuojami infekuotų ląstelių klonai. Šie klonai turi pranašumą – geba augti ir replikuotis ilgu laiko periodu. Latentinės virusinio genomo formos vadinamos profagais (Criscuolo et al., 2017)**.** Liziniai bakteriofagai – tai fagų grupė, vykdanti ląstelės-šeimininkės lizę, kuri yra reikalinga naujai susiformavusių virusinių dalelių paleidimui į aplinką. Liziniai fagai, kitaip negu nuosaikieji ir filamentiniai fagai, lizuoja bakterijas jų gyvavimo ciklo pabaigoje, suardydami jų metabolizmą ir išleisdami naujai susiformavusias fagų daleles. Lizinio ciklo metu, įvyksta ekliptinė fazė, kai bakterijos ląstelė dar nepalaiko savyje visiškai surinkto viriono, bet virusas replikuojasi ir egzistuoja tiek ląstelė-šeimininkė, tiek viruso komponentai (Criscuolo et al., 2017).



1 pav. Fago vystymosi ciklas (pagal Doss et al., 2017**)**. Liziniai fagai dauginasi lizinio ciklo metu, kuriame ląstelė-šeimininkė yra lizuojama ir pasidauginę fagai paleidžiami į aplinką. Nuosaikieji fagai gali pasirinkti lizinį ar lizogeninį ciklą. Lizogeninio ciklo metu fago genomas, vadinamas profagu, įterpiamas į ląstelės-šeimininkės genomą. Profago DNR gali būti indukuojama, tada inicijuojamas lizinis ciklas.

1.1.1. Lizinių bakteriofagų atakos ir bakterijų apsaugos strategijos

Liziniai bakteriofagai pasižymi eile etapų, kurie lemia jų prasiskverbimą į bakterines ląsteles ir naujų virionų formavimąsi. Tai ne tik priklauso nuo individualaus fago, bet ir nuo ląstelės sienelės, membranos ir kitų komponentų specifiškumo (Doss et al., 2017).

Virionai – inertiniai subjektai, esantys ne ląstelėje-šeimininkėje, – turi du pagrindinius uždavinius: (1) apsaugo genomą nuo įvairių fizinių pažeidimų judant iš vienos ląstelės į kitą, (2) jie atpažįsta reikiamą šeimininką ir atlieka genomo pristatymo vaidmenį į tam tikrą ląstelę (Poranen ir Bamford, 2002). Strateginiai lizinių bakteriofagų atakos aspektai didžiąja dalimi priklauso nuo bakterijų, tai yra, kokie bus bakterinių ląstelių barjerai, taip virionai gebės išplėsti turimas savybes ir pristatyti virusinį genomą į ląstelę-šeimininkę (Fernandes ir São-José, 2018).

Pagrindinės lizinių bakteriofagų strategijos yra:

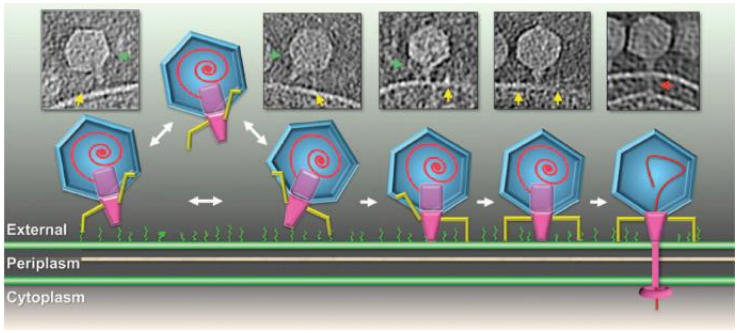
1. Patekti į ląstelės vidų;
2. Replikuotis išvengiant ląstelės-šeimininkės apsaugos mechanizmų;
3. Išeiti į išorę (viriono stadija).

Bakteriofago patekimas į ląstelę

Patekimo strategija yra kritinė, kad bakteriofagas galėtų pasidauginti. Procesą galima išskirti į kelis pagrindinius etapus: (1) judėjimas bakterijos link ir bakterijos išorinėmis

struktūromis (**2 pav.**), (2) adsorbcija prie šeimininko apvalkalo, (3) lizinių molekulių panaudojimas ir genomo įšvirkštimas (Hu et al., 2013).

Pirmojo etapo reiškinys – judėjimas bakterijos link ir „vaikščiojimas“ bakterijos išorinėmis struktūromis – leido paaiškinti fagų adsorbcijos dimensijos redukcijos teoriją, kurią postulavo Gerold Adam ir Max Delbrück (Adam G. ir Delbruck M., 1968). Teorija teigia, jog trijų dimensijų difuzija prie ląstelės paviršiaus yra galima tik esant dviejų dimensijų „atsitiktiniam vaikščiojimui“ per ląstelės membraną ieškant tinkamo receptoriaus (Storms ir Sauvageau, 2015) (**2 pav.**).



2 pav. Schematinis bakteriofago T7 infekcijos modelis (Hu et al., 2013). Tomogramos rodo skirtingą uodegėlių fibrilių orientaciją. Po „pasivaikščiojimo“ po ląstelės paviršių, kad būtų surastas receptorius uodegėlei, visi uodegėlės komponentai pasisuka žemyn, kad prisiristų prie išorinės membranos.

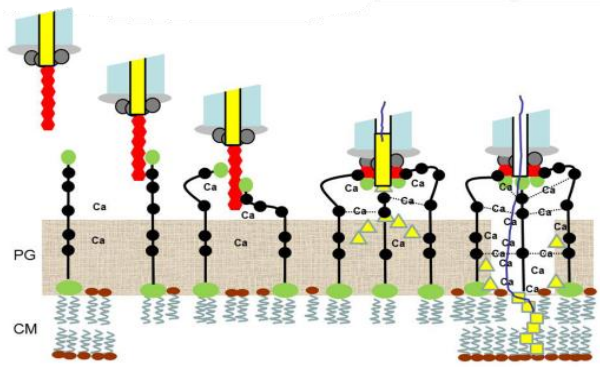
Adsorbcijos etape svarbiausias vaidmuo tenka bakteriofagų uodegėlėms. Jos atlieka du pagrindinius žingsnius: (1) prisijungia (adsorbuojasi) prie bakterinės ląstelės apvalkalo (BLA) ir (2) vykdo BLA perforaciją bei virusinės DNR įleidimą į ląstelės-šeimininkės citoplazmą (Fokine ir Rossmann, 2014; Onodera, 2009).

Bakteriofagų adsorbcija pradėta nagrinėti jau praeito amžiaus viduryje mokslininko Thomas F. Anderson (Anderson, 1949). Tuo metu jis pastebėjo, jog maži elementai, esantys ant viruso dalelės, pasižymi didesniais Brauno judesiais palyginus su ląstelės paviršiumi, todėl sukelia daugybę susidūrimų, kas lemia fago dalelių difuziją per ląstelę-šeimininkę (Anderson, 1949). Nuo to laiko daugybė mokslinių grupių nagrinėjo šį reiškinį detaliau, parodydami skirtingų bakteriofagų prisitaikymą adsorbuotis prie tam tikro šeimininko. Pirmoji svarbi išvada buvo tai, jog būtent dėl adsorbcijos bakteriofagai pasižymi labai dideliu infekcijos specifiškumu net iki bakterijos kamieno lygmens (Braun ir Hantke, 1977).

Adsorbcija apima specifines sąveikas tarp bakteriofago uodegėlės antireceptoriaus, dar vadinamo prie receptoriaus prisijungiančiais baltymais (RPB), ir vieno ar daugiau BLA receptorių (Fernandes ir São-José, 2018). Svarbu ir tai, kad fagai išvystė sistemą, vadinamą įvairovę skatinančiais retroelementais, kurie generuoja iki 10^{14} skirtingų bakteriofago uodegėlės fibrilių variacijų (Doulatov et al., 2004). Kadangi bakteriofagai negali judėti nepriklausomai,

adsorbciją dažniausiai lemia atsitiktiniai susidūrimai tarp bakterijų ir fagų, temperatūra, pH, specifinių jonų ir molekulių buvimas aplinkoje (Rakhuba et al., 2010). Sunku apibendrinti šį procesą, kadangi, kaip ir minėta, dažnai virusas yra specifinis net tam tikram bakteriniam kamienui ir turi specifinius adsorbcijos mechanizmus. Pavyzdžiui, morfologiškai identišką DNR turintys fagai PRD1 (Olsen et al., 1974) ir PM2 (Männistö et al., 2003) panaudoja skirtingus receptorius adsorbcijai, kurie būna koduojami tik konjugacines N, P ar W tipo plazmides turinčiuose *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Salmonella enterica* kamienuose. Galima išskirti tai, jog virionų prisitvirtinimą prie ląstelės paviršiaus dažniausiai sudaro du etapai: grįžtamasis ir negrįžtamasis. Nukleorūgšties įšvirkštimas seka po negrįžtamosios adsorbcijos (Rakhuba et al., 2010).

Lizinių molekulių panaudojimas ir nukleorūgšties įšvirkštimas yra paskutiniai ir svarbiausi etapai bakteriofagui patenkant į ląstelės vidų. Lizinių RPB fermentiškai kerpa arba modifikuoja polimerines receptorių dalis, kaip, pavyzdžiui, lipopolisacharidą, Gram-neigiamų bakterijų kapsulę ar Gram-teigiamų bakterijų sienelės teichoines rūgštis (Fernandes ir São-José, 2018). Prisijungęs prie ląstelės paviršiaus virionas patiria svarbius struktūrinius persitvarkymus, kurie yra kritiniai, kad virusinė genetinė medžiaga būtų pernešta į ląstelę-šeimininkę. Šie struktūriniai pokyčiai patiriami todėl, kad laisvi virionai savyje saugo santykinai pastovią energiją, o sąveika su bakterijos receptoriais (tinkamomis sąlygomis) sukelia perėjimą į žemesnės energinės būsenos struktūrinį išsidėstymą (Raspaud et al., 2007). Toks perėjimas yra esminis tam, kad būtų atidaryta galva-uodegėlė jungtis ir suformuotas kanalas per bakterinės ląstelės apvalkalą DNR įšvirkštimui į ląstelę-šeimininkę (**3 pav.**) (Fokine ir Rossmann, 2014).



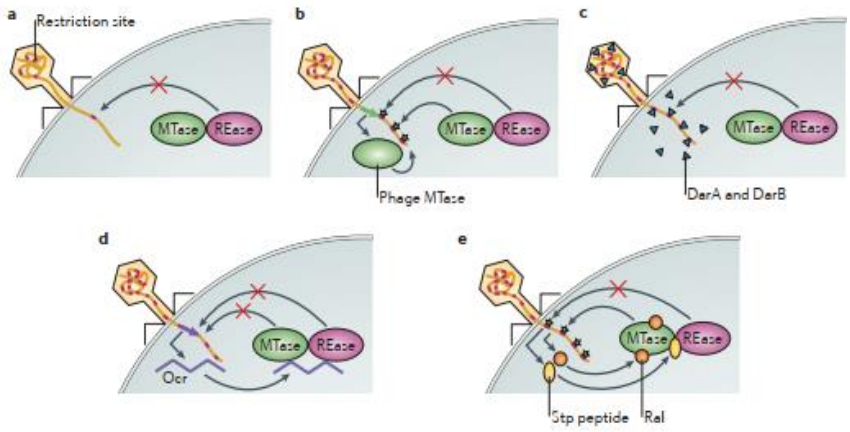
3 pav. Fago LL-H antireceptoriaus ir *Lactobacillus delbrueckii* ssp. lactis ATCC 15808 lipoteichoinės rūgšties (LTA) sąveikos per ekstraląstelinę infekcijos fazę modelis (Munsch-Alatossava ir Alatossava, 2013). Siūloma versija, jog kiekvienas fago antireceptorius, sąveikaudamas su LTA gliukozės liekanomis (žalia) ir fosfatinėmis grupėmis (juoda) tvirtinasi prie šių LTA peptidoglikano (PG) išorėje. Uodegėlė patiria struktūrinius persitvarkymus, išleidžia PG degraduojančias medžiagas (geltona), sukuriančios tunelį, kuriuo toliau bakteriofagas įšvirkščia genetinę medžiagą į bakterijos citoplazmą.

Bakteriofago replikacija ir viduląsteliniai bakterijos apsaugos mechanizmai

Po virusinio genomo patekimo į ląstelę-šeimininkę, sekantis etapas būtų bakterijos apsaugos sistemų išvengimas ir replikacija. Replikacija ir baltymų sintezė vyksta perorganizuojant ląstelės-šeimininkės metabolizmą į fagui naudingą (Drulis-Kawa et al., 2012).

Fago genomą sudarantys genai pagal savo raiškos pobūdį yra skirstomi į ankstyvuosius, viduriniuosius ir vėlyvuosius (Miller et al., 2003). Fago DNR patekus į bakteriją, ląstelės-šeimininkės RNR polimerazė atpažįsta labai stiprius fago promotorius ir vykdo ankstyvųjų genų transkripciją. Vėliau vyksta viduriniųjų genų nurašymas. Šių genų produktai, kurių didžioji dauguma yra mažesni nei 250 aminorūgščių, apsaugo fago genomą ir pajungia bakterijos metabolizmą savo reikmėms, veikdami bakterinės DNR replikaciją, transkripciją, baltymų ekspresiją ir ląstelės dalijimąsi per baltymas-baltymas sąveiką. Tokia sąveika yra esminis bakteriofagų apsaugos mechanizmas ir bakterinės ląstelės išvedimas iš pusiausvyros, jai negalint ekspresuoti baltymus, reikalingus savo apsaugos sistemoms (Drulis-Kawa et al., 2012).

Didžioji dalis baltymas-baltymas sąveikų tarp bakteriofagų ir jų šeimininkų pastebimi ankstyvose infekcijos stadijose, kai įvyksta perėjimas iš ląstelės-šeimininkės į fagą orientuotą metabolizmą, kas būtent lemia didelę ankstyvųjų baltymų svarbą (Roucourt ir Lavigne, 2009). Vienu pirmųjų bakterijos apsaugos mechanizmų, kuriuo ji „pasitinka“ genetinę bakteriofago medžiagą, – tai restrikcijos-modifikacijos (R-M) sistemos. Jas sudaro restrikcijos endonukleazė (REazė), atpažįstanti svetimą DNR ir hidrolizuojanti ją specifinėse vietose. Taip pat modifikacijas vykdančios metiltransferazės, kurios modifikuoja specifinių ląstelės-šeimininkės DNR sekų bazes, taip apsaugodamos bakterijos DNR nuo degradacijos (Labrie et al., 2010; Samson et al., 2013a). Tačiau fagas panaudoja didelį spektrą antirestrikcijos mechanizmų, kurie klasifikuojami į aktyvius ir pasyvius (**4 pav.**). Pasyvieji mechanizmai apima metiltransferazinę fago DNR modifikaciją (**4 pav.**, b), bet dalis bakterijų turi R-M sistemas, kurios atpažįsta net ir modifikuotas bazes (Samson et al., 2013a). Kai kurie fagai savo DNR sekose natūraliai turi mažiau restrikcijos atpažinimo vietų (**4 pav.**, a) arba dėl patirtų mutacijų pasikeičia fago DNR seka, kurios neatpažįsta ląstelės-šeimininkės REazė. Aktyvieji mechanizmai siejami su faginiais baltymais, kurie jungiasi prie fago DNR ir taip maskuoja ją nuo R-M sistemos (**4 pav.**, c) arba kurie struktūriškai atkartoja DNR fosfato struktūrą ir tiesiogiai sąveikauja su REaze (**4 pav.**, d); taip pat fagai geba stimuliuoti ląstelės-šeimininkės modifikuojančius fermentus, kad apsaugotų savo pačių genomą (**4 pav.**, e) (Samson et al., 2013a).



4 pav. Pasyvios ir aktyvios bakteriofagų strategijos išvengti restrikcijos-modifikacijos (R-M) sistemų poveikio (Samson et al., 2013). (a) Kai kurie fagai turi tik keletą restrikcijos vietų savo genome arba šios vietos yra toli, kad būtų atpažintos restrikcijos endonukleazių (REazių). (b) Fagų genomas gali būti modifikuojamas metiltransferazių (MTazių), o pasidauginusio tokio modifikuoto fago DNR bus apsaugota nuo specifinių REazių, kai fagas infekuos kitą bakteriją su tokia pačia R-M sistema. Toks pats procesas įvyks ir su paties fago koduojamomis MTazėmis. (c) Fagas geba kartu su DNR įšvirkšti baltymus (pvz., DarA ir DarB), kurie maskuoja virusinę DNR. (d) Fago baltymas (pvz., T7 fago Ocr baltymas) geba pamėgdžioti taikininę DNR ir slopinti restrikcijos fermentą. (e) Fago baltymas (pvz., fago λ Ral baltymas) geba aktyvuoti Mtazę ir įgalinti fago DNR apsaugą.

Kitas bakterijų apsaugos mechanizmas yra CRISPR-Cas sistemos. Analizuojant bakterinių genomų sekas pastebėta, kad pusė bakterinių genomų koduoja su CRISPR-Cas susijusius genus. CRISPR lokusą sudaro trumpi pasikartojimai, tarp kurių yra įsiterpusios variabilios svetimos kilmės DNR sekos (*angl.* spacer), šalia kurių taip pat yra Cas baltymus koduojantys genai (Makarova et al., 2015). CRISPR-Cas apsauginiai mechanizmai apsaugo bakteriją nuo bakteriofago atakos įterpdami iš fago kilusią seką į CRISPR lokusą šeimininko genome (Barrangou et al., 2007).

Pastaraisiais metais išaiškinta, kad kaip atsaką šioms bakterijų sistemoms fagai išvystė apsauginius mehanizmus. *P. aeruginosa* nuosaikiuosiuose faguose nustatyti anti-CRISPR (*acr*) genai, kurių sintetinami baltymai blokuoja CRISPR-Cas kompleksų formavimąsi arba jų aktyvumą (Bondy-Denomy et al., 2012), *Vibrio cholerae* faguose buvo aptiktos pačių fagų funkcionalios CRISPR-Cas sistemos (Seed et al., 2013). Fago genome esantis klasteris sudarytas iš šešių *cas* genų ir dviejų CRISPR lokusų, tarp kurių esančios sekos (*spacer)* yra komplementarios fago indukuojamoms 18 kb „salelėms“ *V. cholerae* bakterijos chromosomoje. Fago infekcijos metu šie chromosomos elementai iškerpami, kartu yra aktyvuojama antifaginė sistema (Seed et al., 2013). Fago koduojamas CRISPR-Cas kompleksas sąveikauja su chromosomos koduojama CRISPR-Cas bakterijos apsaugos sistema ir ją inaktyvuoja. Šis procesas taip pat leidžia fagui užbaigti jo lizinį ciklą.

Dar viena bakterinė apsaugos sistema, kuriai įveikti bakteriofagas išvystė atsparumo mechanizmus, yra nebaigtos infekcijos mechanizmai (*angl.* abortive infection, Abi). Ši sistema geba sustabdyti įvairius fagų replikacijos ciklo etapus, bet skirtingai nei kitų sistemų atvejais, Abi sukelia ląstelės šeimininkės susinaikinimą, kas leidžia apsaugoti kitas, dar neinfekuotas, ląsteles nuo fago infekcijos. Abi sistemas dažniausiai sudaro baltymas ar baltymų kompleksas ir jie yra randami mobiliuosiuose genetiniuose elementuose kaip profagai ir plazmidės (Rostøl ir Marraffini, 2019). Viena labiausiai paplitusių Abi subgrupių yra toksino-antitoksino (TA) sistema. Šios sistemos yra sudarytos iš toksino ir neutralizuojančio antitoksino, kuris palaiko toksiną neaktyvų esant normaliai ląstelės būsenai. Antitoksinas yra labilesnis nei toksinas, taigi, kai bakterija susiduria su stresinėmis sąlygomis, antitoksinas yra degraduojamas ir toksinas indukuoja ląstelės žūtį (Samson et al., 2013a). Kalbant apie pavyzdžius, net 23 skirtingos Abi sistemos yra rastos *Lactococcus lactis* bakterijose (Chopin et al., 2005; Samson et al., 2013b). Nors daugeliu atvejų tikslus šių sistemų veikimo mechanizmas nėra išaiškintas, tačiau bakteriofagai, kurie gali įveikti šią sistemą, yra aprašyti. Pavyzdžiui, fago bIL66 baltymas ORF1 aktyvuoja AviD1 sistemą, kuri blokuoja fago ORF3 baltymo ekspresiją ir taip paveikia fago dalijimąsi (Bidnenko et al., 1995, 1998).

Viriono stadija

Paskutiniu bakteriofago infekcijos etapu naujos virusinės dalelės lygiai taip pat, kaip patenkant, ir išeinant iš ląstelės turi įveikti fizinius ląstelės-šeimininkės barjerus. Šie barjerai susideda iš citoplazminės membranos, ląstelės sienelės ir Gram-neigiamų bei mikobakterijų atveju – išorinės membranos (Catalão et al., 2013).

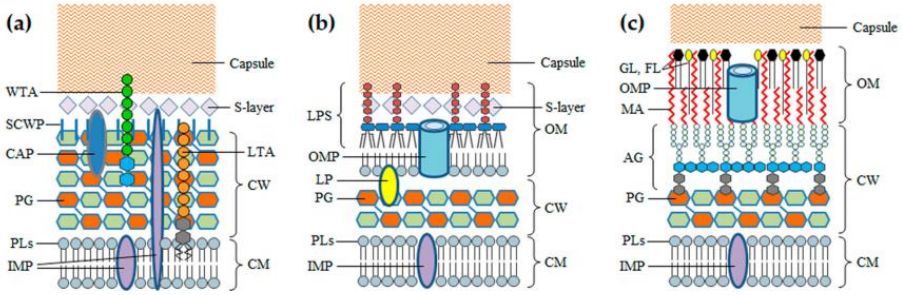
Dvigrandės DNR (dvgDNR) bakteriofagai pasinaudoja pačiu drastiškiausiu būdu įveikti bakterinės sienelės barjerus – jie indukuoja ląstelės mirtį, arba kitaip žinomą lizę. Lizei sukelti reikalingas nemažas kiekis ir įvairių baltymų, kurie veikdami sinergistiškai indukuoja minėtąjį procesą ir nauji virionai yra išleidžiami į išorę (Catalão et al., 2013).

1.1.2. Bakteriofagų taikinys: bakterijų apvalkalas

Pagrindiniai skirtumai tarp Gram-teigiamų ir Gram-neigiamų bakterijų taip pat lemia ir skirtingą bakteriofagų infekcijos eigą joms. Galima išskirti šiuos pagrindinius skirtumus tarp minėtų bakterijų, kurie yra aktualūs kalbant apie bakteriofagus: (1) peptidoglikano sudėtis; (2) išorinės membranos buvimas/nebuvimas; (3) periplazminė erdvė; (4) teichoinių rūgščių buvimas/nebuvimas; (5) pilių buvimas/nebuvimas. Dažniausiai aptariami skirtumai yra susiję su

bakterijos pirmine apsauga – bakterinės ląstelės apvalkalu, kas taip pat yra ir šio darbo pagrindinis objektas iš bakterijų pusės.

Kaip ir žmogaus organizme pirmasis apsaugos lygmuo, kurį sutinka patogenas, yra oda, kaip analogiją galima įžvelgti ir bakterijų lygmeniu. Pirmasis barjeras, su kuriuo susiduria fagai, kaip minėta, yra BLA ir jo komponentai. Šie komponentai varijuoja priklausomai nuo to, ar bakterija yra Gram-teigiama, ar Gram-neigiama. Bakterinės ląstelės apvalkalas yra pirmoji struktūra, apsauganti ląstelę nuo išorės poveikio, palaikanti homeostazę ir leidžianti nenutrūkstamą maisto medžiagų judėjimą į ląstelę ir medžiagų apykaitos produktų pasišalinimą iš ląstelės (Dufresne ir Paradis-Bleau, 2015). Gram-teigiamos bakterijos pasižymi paprasčiausia bakterinės ląstelės apvalkalo struktūra, sudaryta iš citoplazminės membranos (CM) ir standžios ląstelės sienelės (**5 pav.**, a). Gram-neigiamos ir mikobakterijos turi papildomą membraną – išorinę membraną, kuri gaubia CM (**5 pav.**, b ir c). Taip pat be BLA, bakterijos gali turėti baltymingą S-sluoksnį ir polisacharidinę kapsulę (Fernandes ir São-José, 2018). Ši pirminė apsauga kartais būna kritinė, kad fagas nepraeitų į ląstelę, tad ir negalėtų pasidauginti.



5 pav. Schematinis bakterinės ląstelės apvalkalo vaizdas Gram-teigiamose (a), Gram-neigiamose (b) ir mikobakterijose (c) (pagal Fernandes ir São-José, 2018). CM (*angl.* cytoplasmic membrane) – citoplazminė membrana; CW (*angl.* cell wall) – ląstelės sienelė; OM (*angl.* outer membrane) – išorinė membrana; IMP (*angl.* inner membrane proteins) – vidinės membranos baltymai; PLs (*angl.* phospholipids) – fosfolipidai; PG (*angl.* peptidoglycan) – peptidoglikanas; AG (*angl.* arabinogalactan) – arabinogalaktanas; LP (*angl.* lipoprotein)– lipoproteinai; CAP (*angl.* covalently attached protein) – kovalentiškai prijungti baltymai; LTA (*angl.* lipoteichoic acids) – lipoteichoinės rūgštys; SCWAP (*angl.* secondary cell wall polymers) – antrinės ląstelės sienelės baltymai; WTA (*angl.* wall teichoic acids) – sienelės teichoinės rūgštys; OMP (*angl.* outer membrane protein) – išorinės membranos baltymai; LPS (*angl.* lipopolysaccharide) – lipopolisacharidas; MA (*angl.* mycolic acids) – mikolinės rūgštys; GL (*angl.* glycolipids) – glikolipidai; FL (*angl.* free lipids) – laisvieji lipidai; S-layer – S-sluoksnis; Capsule – kapsulė.

Kapsulė

Bakteriofagui infekcijos pradžioje svarbu adsorbuotis prie šeimininko receptoriaus. Labiausiai išorėje esanti bakterijų struktūra – tai kapsulė, kuri visiškai „uždaro“ bakteriją ir paslepia jos receptorius (Scholl et al., 2005). Kapsulę sudaro didelės molekulinės masės (kapsuliniai) polisacharidai. Kapsulės susirinkimas yra sudėtingas procesas, kai aktyvuoti

pirmtakai (nukleotidiniai monofosfo- ir difosfo- angliavandeniai) citoplazmoje surenkami į pirminį polisacharidą veikiant su vidine membrana asocijuotiems fermentams (Whitfield, 2006). Kapsulės polisacharidai yra žinomi kaip bakterijos virulentiškumo faktoriai, evoliucionavę bakterijoje. Evoliucionuojant bakterijai, evoliucionavo ir bakteriofagas, sugebėdamas bakterijos kapsulės polisacharidus panaudoti kaip receptorius adsorbcijai. Būtent tai yra matoma Gram-neigiamų bakterijų faguose, tipiškai turintys vieną ar daugiau uodegėlės pluoštų ar smeigtukų kopijų, kurie kiekvienas gali prisijungti ir degraduoti tam tikrą kapsulės tipą (Pan et al., 2017). Bakteriofagas pasitelkia procesyvines depolimerazes, kurios yra jo uodegėlėse ar smeigtukuose. Jos tarsi gręžia kapsulę, kol pasiekia antrinius receptorius, kurie toliau aktyvuoja virusinės DNR patekimo mechanizmus (Yan et al., 2014). Gram-neigiamose bakterijose praėjus pro kapsulę sutinkama kita struktūra – lipopolisacharidinis sluoksnis (LPS), kurio O-polisacharidinė grandinė taip pat yra receptorius depolimerazei. Būtent prisijungimas prie receptoriaus leidžia bakteriofagui tvirtintis ant išorinės membranos ir taip pat ją atidaryti (Broeker ir Barbirz, 2017).

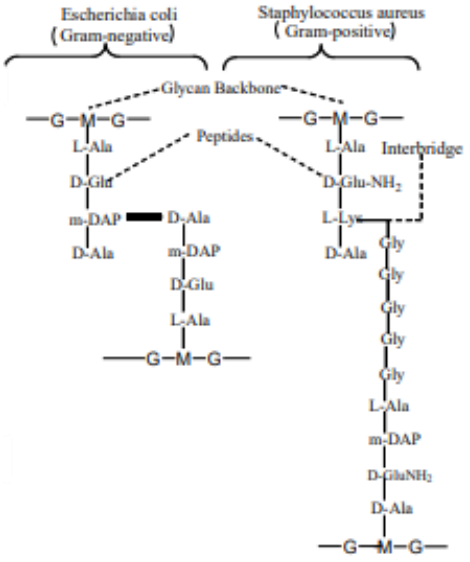
Lipopolisacharidas

LPS – tai išorinės membranos dalis, sudaryta iš glikolipidų lipopolisacharidų. LPS molekulė yra sudaryta iš trijų dalių: lipidinės dalies (lipidas A), nepasikartojančios „kamieninės“ dalies (oligosacharidas) ir labai variabilios dalies (*O*-antigeno polisacharidas) (Ruiz et al., 2006). LPS *O*-antigenas yra vienas iš pagrindinių paviršiaus antigenų, lemiančių serotipinį skirtumą tarp Gram-neigiamų bakterijų ir yra dažniausias receptorius bakteriofagams (Bertozzi Silva et al., 2016).

Peptidoglikanas

Peptidoglikanas (PG) – tai trijų dimensijų grotuota struktūra, sudaryta iš peptidų ir glikano liekanų (**6 pav.**). Polimeras, sudarytas iš *N*-acetilmuraminės rūgšties (MurNAc) ir *N*-acetilgliukozamininės (GlcNAc) rūgšties liekanų, sujungtų β(1→4) ryšiais, yra pagrindinis „glikano“ PG komponentas (Schumann, 2011). Glikano polimeras yra kovalentiškai sujungtas su trumpu kamieniniu peptidu per amidinį ryšį tarp MurNAc ir L-alanino, kuris yra pirmoji amino rūgštis „peptido“ komponente. Kamieninio peptido likutis yra sudarytas iš kintančių L- ir D-formos aminorūgščių, kurios yra gana konservatyvios Gram-neigiamose bakterijose, bet variabilios Gram-teigiamose. Daugeliui Gram-teigiamų organizmų trečioji kamieninio peptido liekana yra L-lizinas, kuris kryžmiškai jungiasi su kito glikano kamieniniu peptidu taip suformuojant tiltą tarp peptidų (Schleifer ir Kandler, 1972). Šie tiltai skirtinguose organizmuose taip pat skiriasi. Nuo to, ar ryšys tarp peptidų egzistuoja bakterijoje, ar ne, priklauso trijų dimensijų grotuota PG struktūra. Svarbu paminėti, jog kai kurie antibiotikai būtent veikia ryšių

tarp peptidų susidarymą, kadangi kryžminė padėtis yra kritinė tinkamam ląstelės sienelės susiformavimui ir bendram integralumui, taigi, ir organizmo išgyvenamumui (Schumann, 2011).



6 pav. Peptidoglikano struktūra (Mayura Ajay Kale ir Sayeed Sk Mohammad, 1970). Peptodoglikano struktūra Gram-teigiamose ir Gram-neigiamose bakterijose.

Citoplazminė membrana

CM yra būdinga visoms bakterijoms, daugeliu atvejų esanti tarsi pusiau pralaidus barjeras, skiriantis ir apsaugantis citoplazmos komponentus nuo išorinio poveikio. Tai simetriškas fosfolipidų dvisluoksnis su įsiterpusiais glikolipidais, lipobaltymais, baltymais ir jų kompleksais, kurie svarbūs ląstelei gaunant maisto medžiagas, išorinių stimulų pojūčiui ir atsakui, ir bendrai bakterinio apvalkalo biogenezei (Dufresne ir Paradis-Bleau, 2015). Dauguma Gram-teigiamų bakterijų turi lipoteichonines rūgštis (LTA), kurios yra CM inkarinės struktūros, besitvirtinančios per glikolipido subvienetą ir turinčios fosfatais turtingą polimerinę liekaną, skrodžiančią citoplazminę sienelę (CS) (Percy ir Gründling, 2014). CM yra svarbi generuojant energiją ląstelei. Elektronų pernešėjai ir transporteriai, esantys CM, yra atsakingi už jonų gradiento formavimąsi per visą membraną (Dufresne ir Paradis-Bleau, 2015).

Visos aptartos struktūros yra pagrindiniai komponentai, su kuriais susiduria bakteriofagų liziniai baltymai, kai bakteriofagas kerta ląstelės sienelės barjerą patenkant į ląstelės vidų arba išeinant į išorę.

1.2. Lizinių bakteriofagų endolizinai

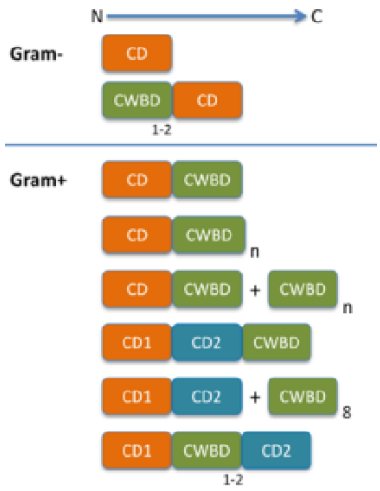
Liziniai bakteriofagų baltymai, arba dažniausiai vadinami lizinais, - tai dar labai plačiai neištyrinėti infekciniai baltymai. Plačiąja prasme lizinius bakteriofagų baltymus galima išskirti į dvi dideles grupes: su virionu asocijuoti lizinai ir endolizinai.

Dvigrandžią DNR turintys uodeguotieji bakteriofagai, kurie sudaro apie 96 % visų bakterijų virusų (Ackermann, 2007), ląstelės lizei naudoja endolizino ir holino strategiją. Endolizinai – tai bakterinės ląstelės sienelės peptidoglikaną degraduojantys fermentai, kurie natūraliai yra reikalingi fago dauginimosi vėlyvojoje stadijoje susiformavusių virionų išėjimui į aplinką. Endolizinai yra kaupiami citozolyje lizinio ciklo vėlyvojoje stadijoje. Holinai yra membraniniai baltymai, kurie telkiasi citoplazminėje membranoje ir formuoja dideles poras, per kurias endolizinas pasiekia peptidoglikaną (Young, 2014). Tiriant lamboidinį fagą 21, buvo išaiškinta kita holinų grupė, pinholinai, kurie formuoja mažas poras (Park et al., 2007). Neseniai buvo nustatyta, kad λ fage pilnai lizei įvykti reikalingas vidinės ir išorinės ląstelės membranų susiliejimas. Šią funkciją atliekantys baltymai buvo pavadinti spaninais (*angl*. spanins). Bioinformatiniais metodais nustatyta, kad šie baltymai yra labai plačiai paplitę gram-neigiamas bakterijas infekuojančiuose faguose (Summer et al., 2007).

Struktūra ir funkcija

Daugumos Gram-neigiamas bakterijas infekuojančių bakteriofagų endolizinai yra nedideli, nuo 15 iki 20 kDa dydžio globuliniai baltymai, kuriuos sudaro vienas N-galinis katalitinis domenas (KD) ir kartais vienas C-terminalinis ląstelės sienelės prisijungimo domenas (LSPD). Gram-teigiamas bakterijas infekuojančių bakteriofagų endolizinai N-galinėje dalyje turi vieną ar kelis KD, sujungtus lanksčia tarpdomenine jungtimi su C-galinėje dalyje esančiu LSPD (**7 pav.**) (São-José, 2018).

Endolizinai atlieka dvi pagrindines funkcijas – atpažinimą ir fermentinį skėlimą. C-galinis LSPD geba specifiškai jungtis prie peptidoglikano ligandų arba antrinių ląstelės sienelės polimerų kaip teichoinės rūgštys ar polisacharidai, kurie dažnai yra saviti tam tikrai bakterijų rūšiai ar net kamienui, todėl endolizinų prisijungimo specifiškumas yra itin didelis (Schuch et al., 2002). N-galinis domenas yra atsakingas už specifinio ryšio peptidoglikane skėlimą ir vykdo fermentinę reakciją.



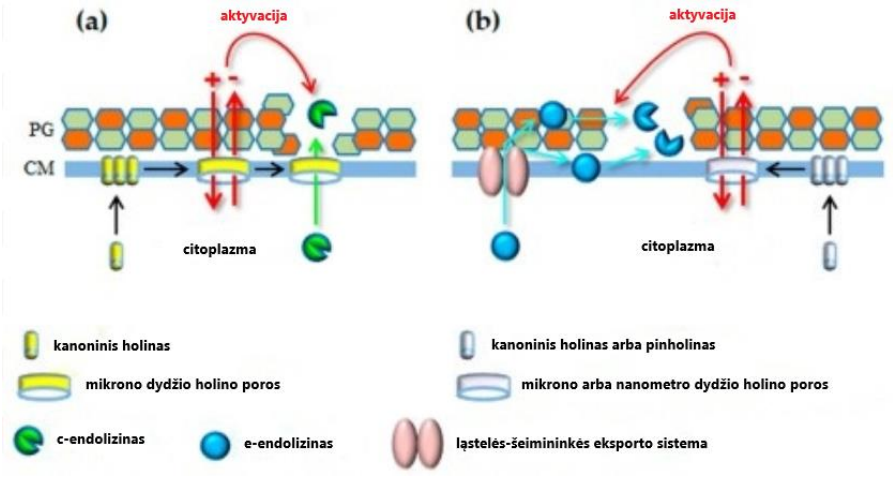
7 pav. Gram-neigiamas ir Gram-teigiamas bakterijas infekuojančių bakteriofagų endolizinų domeninė struktūra (pagal São-José, 2018)**.** CD (*angl.* catalytic domain) – katalitinis domenas; CWBD (*angl.* cell wall binding domain) – ląstelės sienelės prisijungimo domenas. Skaičiai rodo kopijų skaičių ir „n“ parodo, koks skaičius motyvų gali sudaryti dome hetero-oligomerinio endolizino subvienetai atskirti „+“ ženklu.

Veikimo mechanizmai

E. coli λ fago lizės modelis, kuriame veikia holino-endolizino sistema, ilgą laiką buvo geriausiai žinomas ir išnagrinėtas, todėl laikytas kanoniu modeliu (**8 pav.**, a) daugeliui dvgDNR fagų (Young ir Wang, 2006; São-José, 2018). Holinai laikomi fagų infekcijos „laikrodžiu“, kadangi holinams pradedant formuoti poras yra inicijuojamas paskutinis bakteriofago pasidauginimo etapas – viriono stadijos pradžia (Wang et al., 2000). Holinų pagrindinis tikslas – atverti kelią endolizinams iki citoplazminės sienelės arba peptidoglikano. Kol protonų judėjimo galia (PJG) (*angl.* proton-motive force) pasiekia tam tikrą lygį, holinai nepažeisdami ląstelės yra kaupiami citoplazmoje. Kai pasiekiama specifinė kritinė holinų koncentracija, įvyksta staigus jų susikaupimas ir agregacija vienoje vietoje ties CM, kas lemia tarsi plokštelių formavimą ir CM laidumo padidinimą. Dėl šių procesų įvyksta galutiniai struktūriniai CM pokyčiai, sąlygojantys porų susiformavimą (White et al., 2011; Young, 2013). Lambdoidiniai fagai ir kai kurie kiti (pvz., fagas T4) taip pat savo genome koduoja holino antagonistą – antiholiną. Lambdoidinio fago atveju antiholinas nuo holino skiriasi keliomis aminorūgščių liekanomis N-galinėje dalyje, bet tai lemia, jog antiholinas neįsiterpia į CM, o dimerizuojasi su holino molekule ir stabdo jos pradinę funkciją, taip kontroliuodamas holino veikimą (Bläsi and Young, 1996).

Iki pat 2000 metų holino-endolizino modelis, kaip minėta, laikytas kanoniniu lizės modeliu. São-José su bendradarbiais (São-José et al., 2000) parodė, kad gram-teigiamų bakterijų atveju egzistuoja ir kita galimybė endolizinams pasiekti peptidoglikaną. Buvo parodyta, jog

Oenococcus oeni fOg44 fago endolizinas turi Sec tipinį signalinį peptidą (SP), kuris atpažįstant bakterijos sekrecijos Sec sistemai, lemia endolizino transportą iki peptidoglikano (São-José et al., 2004). Gram-neigiamas *E. coli* infekuojančiuose faguose P1 ir 21 taip pat nustatyti sekretuojami endolizinai, N-galinėje dalyje turintys signalinę seką, vadinamą signalo-sulaikymo-paleidimo (*angl.* signal-anchor-release SAR sequence) domeną (Xu et al., 2004). Įdomu tai, kad sekretuojamus endolizinus turintys fagai taip pat koduoja ir holinus, kurie nors ir nedalyvauja endolizinų transporte, tačiau yra svarbūs jų aktyvavimo procese (**8 pav.**, b). Toliau tiriant šį nekanoninį mechanizmą, pastebėta, jog SAR domeną turintys endolizinai pasižymi nedideliu dydžiu, todėl holinų formuojančios poros taip pat yra nedidelės (apie 2 nm). Šiuos holinus pradėta vadinti pinholinais, kad būtų atskirti nuo kanoninių mikrono dydžio holinų (Park et al., 2007).



8 pav. Kanoninis (a) ir nekanoninis (b) lizės modeliai (pagal Fernandes ir São-José, 2018). Kanoniniame modelyje endolizinai (c-endolizinai) ląstelės sienelę gali pasiekti tik per holino poras, kurios turi būti pakankamo dydžio, kad praeitų fermentas. Nekanoniniame lizės modelyje ląstelės-šeimininkės sistemos (pvz., Sec sistema) perkelia lizinį baltymą (e-endoliziną). Svarbus protonų judėjimo galios (PJG) pasikeitimas, kad būtų aktyvuotas e-endolizinas (tai pasiekiama per kanoninio holino ar pinholino poras).

Dar vienas identifikuotas nekanoninis lizės mechanizmas pasižymi tuo, jog *Streptococcus pneumoniae* SV1 fago endolizino C-terminalinis galas turi pasikartojančias choliną prisijungiančias sekas (Frias et al., 2013). Teichoinės rūgštys, esančios ant *S. pneumoniae* peptidoglikano, turi cholino liekanų, todėl jos pasitarnauja endolizinams kaip ligandai. Teigiama, jog endolizinas ir pneumokokinis autolizinas jungiasi prie teichoinių rūgščių pirmtakų, kurie taip pat turi cholino, ir taip yra ko-transportuojamos per CM iki peptidoglikano (Frias et al., 2013).

Paskutiniai liziniai baltymai, užbaigiantys ląstelės lizę, – kaip parodė tyrimai – yra spaninai, reikalingi įveikti paskutinį ląstelinį barjerą – išorinę membraną ir jos komponentus. Nors šie baltymai vadinami „pagalbiniais“, vis labiau įrodomas jų būtinumas, ypač Gram-

neigiamų bakterijų lizėje. Spaninai sujungia išorinę membraną ir peptidoglikaną per visą ląstelės sienelės ilgį ir suardo išorinę membraną (Summer et al., 2007).

1.2.1. Peptidoglikano hidrolazės

Bakteriofagų endolizinai – tai gana gerai ir plačiai išnagrinėta PG hidrolazių grupė, kuri būdinga būtent bakteriofagams. Įprastai PG hidrolazės bakteriofagams pasitarnauja kaip įrankis, kuris leidžia paskutinėje viruso pasidauginimo stadijoje išleisti virusines daleles į išorę. Visgi dar 1940 metais buvo parodyta, jog egzistuoja „lizė iš išorės“ – terminas, panaudotas apibūdinti bakterijų lizę nesant pilnam litiniam infekcijos ciklui (Delbrück, 1940). Panaudojant išgrynintus rekombinantinius lizinus pakankamai neseniai buvo pademonstruotas šis efektas prieš taikinines bakterijas (Fischetti et al., 2006).

Struktūra ir funkcija

PG hidrolazės pasižymi tokia pat struktūrine organizacija kaip ir likę endolizinai. Lygiai taip pat, kaip ir jų, taip ir PG hidrolazių įvairovė ir domeninė organziacija yra didelė. Svarbu paminėti, kad hidrolazių aktyvumas yra specifiškas tam tikram peptidoglikano tipui, antrinių modifikacijų kiekiui ar molekulinei masei (Vollmer, 2008). Dažniausiai katalitiniai domenai būna trumpi (apie 100-200 aminorūgščių ilgio) ir kiekvienas pasižymi skirtingais fermentiniais aktyvumais, pavyzdžiui, stafilokoko Φ11 endolizinas turi tiek N-acetilmuramoil-L-alanino amidazinį aktyvumą, tiek D-alanil-glicil endopeptidazinį aktyvumą (Navarre et al., 1999).

Kaip paaiškėja, egzituoja kelių fermentinių aktyvumų PG hidrolazės. Pagal C-terminalinį domeną šie endolizinai yra skirstomi į 3 pagrindines grupes pagal tai, kokį ryšį skelia.

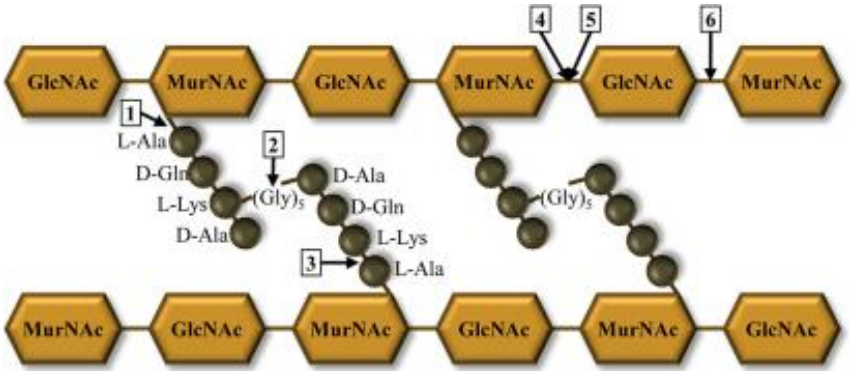
Fermentiniai aktyvumai

Peptido glikaną degraduojantys endolizinai gali būti suskirstyti į tris pagrindines grupes: glikozidazių, amidazių ir peptidazių (**9 pav.**). Glikozidazės skelia vieną iš dviejų glikozidinių ryšių glikano grandinėje ir yra skirstomos į *N*-acetil-*β*-D-gliukozaminidazes (gliukozaminidazės), *N*-acetil- *β*-D-muramidazes (muramidazės arba lizocimai) ir litines transglikozilazes (Alcorlo et al., 2017). Peptidoglikano amidazės hidrolizuoja amidinį ryšį tarp pirmosios peptidinio kamieno aminorūgšties liekanos ir *N*-acetilmuramoil-L-alanino amidazės (NAM). Peptidazės skelia ryšius viduje arba tarp peptidinių grandinių. Peptidazės dar skiriamos į karboksipeptidazes, kurios pašalina C-terminalinio galo amino rūgšties liekanas, ir į

endopeptidazes, kurios skelia ryšius peptido viduje. Visi šie fermentai, išskyrus litines transglikozilazes, skelia PG hidrolizės būdu (Alcorlo et al., 2017).

Minėti fermentiniai aktyvumai kol kas yra pagrindiniai. Šiuo metu pasinaudojant duomenų bazėmis yra išskiriama dar daugiau klasių.

Peptidoglikano hidrolazės, kaip sako pavadinimas, hidrolizuoja peptidinį ryšį, prie substrato prijungdamas vandenį ir atskeldamas specifinius ryšius.



9 pav. Schematinė peptidoglikano struktūra su galimais hidrolazių fermentiniais aktyvumais ir jų skeliamais ryšiais (pagal Gutiérrez et al., 2018). 1 žymi N-Acetilmuramoil-Lalanino amidazinį aktyvumo skėlimą; 2 žymi tarppeptidinio ryšio endopeptidazinio aktyvumo skėlimą; 3 žymi L-alanoil-D-glutamato endopeptidazinis aktyvumas; 4 – N-acetil-D-muramidazinis aktyvumas; 5 žymi litinį transglikozilazinį aktyvumą; 6 – N-acetyl-D-gliukozaminidazinis aktyvumas.

1.2.2. Endolizinų pritaikymas ir panaudojimas

Pastebėjus išgrynintų rekombinantinių endolizinų gebėjimą lizuoti bakterijas, įvertintas milžiniškas jų, kaip antimikrobinių junginių, potencialas.

Endolizinais paremti antibakteriniai junginiai geba labai efektyviai nužudyti Gram-teigiamas bakterijas dėl jų specifinio veikimo į peptidoglikaną ir gebą hidrolizuoti ląstelės sienelę (Fischetti et al., 2006). Visgi problema iškilo ties endolizinų poveikiu Gram-neigiamoms ląstelėms, mat per jų tvirtą ir nelaidų lipopolisacharidinį sluoksnį, kuris gaubia ląstelę, endolizinai labai sunkiai praeina (Harada et al., 2018). Tačiau Briers su komanda (Briers et al., 2014) išvystė technologiją, kuri leido panaudoti endolizinus kaip antibakterinę priemonę net ir prieš Gram-neigiamas bakterijas. Šiuo metu taip pat atsiranda daugiau tyrimų su Gram-neigiamomis bakterijomis ir jų natūraliai esančių bakteriofagų endolizinų identifikavimu (Gerstmans et al., 2018; Lukacik et al., 2012). Visgi platesni tyrimai kol kas atliekami su Gram-teigiamomis bakterijomis, nors egzistuoja ir nemažai mokslininkų grupių, dirbančių ties abiejų tipų bakterijomis.

Kaip antimikrobinius junginius, lizinus nuo antibiotikų, skiria tai, jog lizinai (1) yra staigūs bakteriocidiniu aktyvumu prieš tiek stacionarios, tiek eksponentinės fazės bakterijas pasižymintys junginiai, gebantys per kelias minutes nuo kontakto pradžios ardyti aukšto konservatyvumo peptidoglikano substratus; (2) jie taip pat geba veikti prieš bioplėveles; (3) pasižymi sinergistiniu poveikiu su antibiotikais; (4) lizinas geba bakteriją padaryti vėl jautrią antibiotikams (Daniel et al., 2010).

Terminas „enzibiotikai“ būtent apibūdina šią naują antibakterinių junginių klasę, į kurią įtraukiami tiek endolizinai, tiek su virionu asocijuoti lizinai. Visgi pastarieji dėl savo savybių nusileidžia endolizinų potencialui (São-José, 2018). Enzibiotikų pagrindinis potencialas – tai antibiotikų pakeitimas, kadangi kasmet Pasaulio sveikatos organizacijai (PSO) paskelbiant rezultatus apie fiksuojamą naujų atsparumų atsiradimą padidėja dešimtimis kartų (https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/), taigi antibiotikų alternatyvos paieška yra būtina. Aktualu yra tai, jog kol kas nėra užfiksuota atvejų, kad egzogeniškai bakterijas paveikiant bakteriofagų endolizinais, jos būtų išvysčiusios atsparumą, nors kitaip yra panaudojant, pavyzdžiui, pačius bakteriofagus. Svarbi sritis, reikalaujanti antibiotikų alternatyvų, yra medicina. Atliekama daugybė tyrimų, siekiant gauti aktyvius endolizinus ir pritaikyti juos terapiniais tikslais – jau atlikti sėkmingi tyrimai su streptokokais pelėse (Jado, 2003). Taip pat endolizinai yra nagrinėjami kaip galimi vakcinų pernešėjai, kadangi pasitarnauja jų gebėjimas sukelti ląstelės mirtį ir išleisti citoplazminį turinį (Panthel et al., 2003).

Jau pastarąjį dešimtmetį ir kiek anksčiau yra ieškoma galimybė bakteriofagų endolizinus pritaikyti maisto pramonei kovojant prieš *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Clostridium* ir *Staphylococcus aureus* bakterijas. Vienas svarbiausių aspektų yra nepageidaujamų bakterijų detekcijos vystymas. Būtent dėl savo didelio konervatyvumo ląstelės sienelę prisijungiančiame domene, endolizinai galėtų būti potencialus įrankis naujiems detekcijos mechanizmams kurti (Schmelcher ir Loessner, 2016). Taip pat pasitelkiant endolizinus bandoma didinti augalų atsparumą bakterijoms žemės ūkyje (Schmelcher ir Loessner, 2016).

Bendrai, yra labai svarbu ieškoti būdų kovojant su bakterijų sudaromomis bioplėvelėmis, tad nemaža dalis mokslininkų jėgas ir laiką skiria faginių medžiagų identifikavimui prieš bioplėveles. Todėl čia svarbų vaidmenį gali atlikti endolizinai. Pavyzdžiui, Sass ir Bierbaum (Sass ir Bierbaum, 2007) bei Son su komanda (Son et al., 2010) parodė, jog rekombinantiniai bakteriofago phi11 endolizinai gebėjo pašalinti *S. aureus* bioplėveles, suformuotas ant polistireno paviršiaus. Taip pat Domenech su komanda skelbė, jog endolizinai Cpl-1 ir Cpl-7 buvo efektyvūs prieš *Streptococcus pneumoniae* bioplėveles.

Kadangi, kaip minėta, bakteriofagų endolizinai pasižymi dideliu konservatyvumu, būtina kaip įmanoma daugiau ieškoti ir gryninti šiuos baltymus, ieškoti jų savybių ir jas aprašyti. Be abejo, susiduriama su daug iššūkių, kuriuos būtina spręsti: endolizinų panaudojimas prieš Gram-neigiamas bakterijas, endolizinų tikslinis nukreipimas, jų aktyvumo išlaikymas *in vivo* ir kt. Visgi, neabejojama šių baltymų potencialiomis savybėmis ir pritaikymu.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Bakterijų rūšys ir kamienai

1 lentelė. Darbe panaudotos bakterijų rūšys ir kamienai.

Bakterijos rūšis	Kamienas	Panaudojimas	Šaltinis
Escherichia coli	DH10B	Plazmidės DNR padauginimas	Pharmacia
	BL21(DE3)	Baltymo raiška	Novagen
	BL21	Baltymų aktyvumo patikrinimas	Stratagene
Geobacillus stearothermophilus	Gamtinis izoliatas	Baltymų aktyvumo patikrinimas	Skyriaus kolekcija
Micrococcus lysodeikticus	ATCC 4698	Baltymų aktyvumo patikrinimas	Sigma-Aldrich

2.1.2. Bakteriofagai

2 lentelė. Darbe panaudoti bakteriofagai.

Bakteriofagas	Apibūdinimas	Šaltinis
vB_EcoM_VpaE1 (VpaE1)	Laukinis tipas	E.Šimoliūnas ir kt. (2015)
vB_PagS_Vid5 (Vid5)	Laukinis tipas	E.Šimoliūnas ir kt. (2018)
vB_PagM_PSKM (PSKM)	Laukinis tipas	Skyriaus kolekcija

2.1.3. Plazmidiniai vektoriai

3 lentelė. Darbe panaudoti plazmidiniai vektoriai.

Vektorius	Panaudojimas	Šaltinis
pET16b	Fragmento klonavimas, suliejimas su His inkaru baltymo N-gale	Novagen
pET21a(+)	Fragmento klonavimas,	Novagen

	suliejimas su His inkaru baltymo C-gale

2.1.4. Mitybinės terpės ir tirpalai

4 lentelė. Darbe panaudotos mitybinės terpės ir tirpalai.

Pavadinimas	Sudėtis	Paskirtis
LB terpė	Bakto-triptonas 10 g, bakto-mielių ekstraktas 5 g, NaCl 10 g, NaOH 1 N 0,2 mL, vanduo – iki 1 L.	*E. coli* auginimui
Agarizuota LB terpė (1,7 %)	Bakto-triptonas 10 g, bakto-mielių ekstraktas 5 g, NaCl 10 g, agaras 12 g, NaOH 1 N 0,2 mL, vanduo – iki 1 L.	*E. coli* auginimui
Minkštas LB agaras (0,5 %)	Bakto-triptonas 0,75 g, bakto-mielių ekstraktas 0,37 g, NaCl 0,75 g, NaOH 1 N 0,15 mL, agaras 0,375 g, vanduo – iki 75 mL.	*E. coli* bakterijų gazono sukūrimui, fagų dauginimui ir titravimui
Bp terpė	Bakto-peptonas 5 g, bulvių peptonas 5 g, mielių ekstraktas 1 g, NaOH 1 N, vanduo – iki 1 L.	*G. stearothermophilus* auginimui
Agarizuota Bp terpė (1,7 %)	Bakto-peptonas 5 g, bulvių peptonas 5 g, mielių ekstraktas 1 g, agaras 12 g, NaOH 1 N, vanduo – iki 1 L	*G. stearothermophilus* auginimui
Minkštas Bp agaras (0,5 %)	Bakto-peptonas 0.38 g, bulvių peptonas 0.38 g, mielių ekstraktas 0.08 g, agaras 0,375 g, NaOH 1 N, vanduo – iki 75 ml.	*G. stearothermophilus* bakterijų gazono sukūrimui, fagų titravimui
DNR elektroforezės gelis (0,9 %)	Agarozė ~0,465 mg, TAE buferis 50 mL, etidžio bromidas ~1 µL.	DNR elektroforezei
TAE buferis	40 mM Tris-acetatas, 2 mM EDTA.	DNR elektroforezei
Ligazės buferis (1x)	50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl2 , 1 mM ATP, 1 mM DTT, 25% (w/v) PPG-8000	DNR fragmentų ir vektorių ligavimui
His surišimo buferis pH 7,7	50 mM natrio fosfato buferis (pH 7,7), 300 mM NaCl, 10 mM imidazolas, 0,03%	Baltymų gryninimui

	Triton X-100	
Galutinis baltymų pavyzdžio buferis (FSB)	0,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% NDS, 1% 2 merkaptoetanolis, 10% glicerolis, 0,01% bromfenolio mėlynasis tirpalas.	Baltymų mėginio įnešimui į poliakrilamidinį gelį
Baltymų elektroforezės buferis	3,0 g Tris, 14,4 g glicino, 1,0 g NDS, vandens – iki 1 L.	Baltymų elektroforezei
Poliakrilamidinis gelis	Skirstomasis (14%): 2,1 mL akrilamido (40%), 1,5 mL 1,5 M Tris-HCl buferio (pH 8,8), 60 µL NDS (30%), 2,25 mL vandens, 6 µL TEMED, 60 µL APS. Koncentruojamasis (4,5%): 562 µL akrilamido (40%), 1,25 mL 0,5 M Tris-HCl buferio (pH 6,8), 50 µL NDS (30%), 3,1 mL vandens, 6 µL TEMED, 50 µL APS.	Baltymų elektroforezei
Coomassie Brilliant Blue baltymų gelių dažas	5 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 100 mL ledinės acto rūgšties, 50 mL metanolio, 425 mL etanolio, 425 mL vandens.	Baltymų elektroforezei
Baltyminio dažo atplaunamasis tirpalas	70 mL ledinės acto rūgšties, vandens – iki 1 L.	Baltymų elektroforezei
Baltymų dializės buferis I	20 mL 0,1 mM Tris-HCl (reikiamo pH), 12 mL 0,3 mM NaCl, vandens – iki 100 mL.	Baltymų gryninimui ir saugojimui
Baltymų dializės buferis II	50 mL 0,1 mM Tris-HCl (reikiamo pH), vandens – iki 100 mL, 30 % glicerolis.	Baltymų gryninimui ir saugojimui
PB (praskiedimo buferis)	NA_2HPO_4 7 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 4 g, $MgSO_4$ x $7H_2O$ 0,2 g, vandens – iki 1 L.	Bakteriofagų saugojimui

2.1.5. Reagentai ir komerciniai rinkiniai

Darbo metu naudoti reagentai: agarozė, chloroformas, ampicilinas, etidžio bromidas, IPTG, kalcio chloridas, natrio chloridas, SDS, Tris-HCl.

DNR elektroforezės agarozės gelyje molekulinės masės žymenys.

Darbo metu naudoti fermentai: *Taq* DNR polimerazės 2× Master Mix; *Phusion* DNR polimerazės 2× Master Mix; restrikcijos endonukleazės NdeI, XhoI, BamHI; T4 DNR ligazė.

Darbo metu naudoti komerciniai rinkiniai:

- Thermo Fisher Scietific: plazmidžių skyrimo rinkinys GeneJET Plasmid Miniprep Kit; DNR skyrimo iš agarozinio gelio ir produktų išgryninimo po PGR rinkinys GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit; baltymų koncentracijos nustatymo Bradfordo metodu rinkinys Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit.
- Zymo Research: baltymų skyrimo rinkinys His-Spin Protein Miniprep.

2.1.6. Prietaisai

Darbo metu panaudoti prietaisai: vandeninė purtyklė *OLS 200* (Grant), orinė purtyklė *KS 4000 ic control* (IKA), šildoma mėgintuvėlių purtyklė *Thermomixer compact* (Eppendorf), centrifuga *Centrifuge 5804 R , Centrifuge 5424* (Eppendorf), ultracentrifuga *Beckman* (rotorius SW40), PGR cikleris *Mastercycler gradient* (Eppendorf), spektrofotometras *BioPhotometer* (Eppendorf), maišyklė *Mixer 5432* (Eppendorf), ultragarsinis ląstelių dezintegratorius *Sonopuls HD 2070* su galvute *UW 2070* (Bandelin), elektroforezės srovės šaltinis *EV231* (Consort), laminarinis boksas *Biowizard Standard Std-130* (Kojair), mėgintuvėlių šildytuvas *Tb2 Thermoblock* (Biometra), UV transliuminatorius *UVT-28 ME* (Herolab).

2.2. Metodai

2.2.1. Bakteriofagų padauginimas

Bakteriofagų dauginimas vykdomas pagal aprašytą metodiką (Adams et al., 1959).

10 mL LB terpėje E. coli bakterijų kultūra auginama iki OT_{600} yra 0,55. Esant tokiam optiniam tankiui, bakterijos užkrečiamos vienos fago lizės zonos suspensija, kuri gaunama fagų lizės zoną nuo lėkštutės suspenduojant į 10 µL LB terpės. Užkrėstos bakterijos auginamos, kol kultūra tampa skaidri, tai yra, įvyksta pilnoji lizė. Lizuota bakterijų kultūra toliau centrifuguojama šaldančioje centrifugoje esant 4 ºC, 12000 x g 1 val. Gautos nuosėdos užpilamos 1 mL PB, įdedama 1/10 dalis $CHCl_3$ ir 2 µL DNazėsI (1 u/µL). Mišinys gerai išmaišomas ir inkubuojamas ne mažiau 1 val. 30 min. 30 ºC. Po inkubacijos mišinys supilamas į atskirą mėgintuvėlį ir centrifuguojama 2500 x g 8 min. Nusiurbiamas supernatantas ir saugomas 4 ºC.

2.2.2. DNR fragmentų amplifikavimas *in vitro*

DNR fragmentai amplifikuoti pasinaudojant polimerazės grandinine reakcija (PGR) *in vitro*. Kaip matrica pasitarnavo fago genominė DNR iš suspensijos. Panaudoti sintetiniai pradmenys (**6 lentelė**). Reakcijoms naudota *Taq* arba *Phusion* DNR polimerazių 2x Master Mix mišiniai. PGR reakcijos mišinys: 60 µL 2x *Taq* arba *Phusion* DNR Master Mix, po 1 µL tiesioginio ir atvirkštinio pradmens (100 pmol), 1 µL fago DNR suspensijos, vandens iki 120 µL. Panaudota įprastinė termociklerio programa, pritaikant programą pagal pradmenų lydymosi temperatūrą ir fragmento ilgį. Pasibaigus reakcijai, mišinys gryninamas pagal Thermo Fisher Scientific GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit rinkinio protokolą, skirtą gryninimui po PGR reakcijos. Gautų fragmentų dydis bei koncentracija įvertinama juos agaroziniame elektroforezės gelyje paleidžiant pagal GeneRuler DNA Ladder Mix markerį.

2.2.3. DNR fragmentų ir plazmidinių vektorių restrikcija

DNR fragmentų ir plazmidinių vektorių restrikcija vykdyta siekiant tolimesniame žingnyje įgyvendinti šių vienetų ligavimą. Atitinkamai tiek DNR fragmentai, tiek plazmidinės DNR buvo kirptos atitinkamomis endonukleazėmis sukuriant „lipnius“ ar „bukus“ galus. Restrikcijos reakcijos mišinys: 8-10 µL DNR fragmento arba plazmidinės DNR, 1,5 FD buferio, 1 µL atitinkamos restriktazės, vandens iki 15 µL. Reakcija vykdoma 45 min 37 ºC termostate. Po 45 min įdedama dar restriktazės. Po 30 min mišinys papildomas iki 20 µL: 0,5 µL FD buferio, 1 µL atitinkamos kitos restriktazės, vandens iki 20 µL. Po 30 min įdedama dar restriktazės. Po 15 min fragmentas ir vektorius gryninami pasinaudojant Thermo Fisher Scientific GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit rinkinio protokolu, skirtu gryninimui iš agarozinio gelio. Fragmentų ir vektorių dydis bei koncentracija vertinami elektroforetiškai.

2.2.4. DNR fragmentų ir vektorių ligavimas

Paruošti DNR fragmentai ir atitinkami vektoriai liguojami tolimesnei transformacijai. Bendrame reakcijos mišinyje DNR fragmentas ir vektorius maišomi santykiu 1:3. Bendras reakcijos mišinys: 1 µL 1x ligazės buferio, 1 µL fago T4 ligazės, 1 µL vektoriaus, 3 µL fragmento, vandens iki 10 µL. Reakcija vykdoma termocikleryje esant 22 ºC, 1 val. Reakcijos mišinys panaudojamas ląstelių transformacijoje.

2.2.5. Ląstelių transformacija

Tiek klonavimo, tiek raiškos kamienai buvo transformuojami cheminės transformacijos būdu. Kompetentinės ląstelės ruošiamos pagal Mendel ir Higa aprašytą metodiką (Mandel and Higa, 1970). Bakterijų kultūros auginamos LB terpėje iki optinis tankis (A_{600}) pasiekia ~0,5. 100 µL paruoštų kompetentinių ląstelių *E. coli* DH10B, BL21(DE3), Transformacija vykdoma ne mažiau 45 min ledo vonelėje. Vėliau ląstelėms atliekamas temperatūrinis šokas 42 ºC, ~1 min ir vėl atšaldoma. Mišinys išsėjamas ant agarizuotos LB terpės su reikiamu antibiotiku. Lėkštelės inkubuojamos 37 ºC, 18 - 20 valandų.

2.2.6. Transformantų atranka *in vitro*

Transformantų atranka vykdoma pasinaudojant PGR metodika. Išaugusios kolonijos suspenduojamos 5 µL skystos LB terpės. Į PGR mišinį dedama 1 µL suspenduotos LB terpės. Panaudojami plazmidei specifiniai pradmenys, kurie riboja klonavimo sritį. PGR vykdomas su pailgintu pradiniu etapu tam, kad būtų suardytos ląstelės. Gautas PGR produktas tikrinamas elektroforetiškai. Tinkami transformantai užsėjami į 5 mL skystos LB terpės su reikiamu antibiotiku ir auginama 37 ºC, 18 - 20 valandų. Vėliau iš ląstelių skiriama plazmidinė DNR. Gauto įklonuoto geno seka tikrinama sekoskaitos būdu.

2.2.7. Mutacijų įvedimas

Vietai specifinė mutacija į DNR seką buvo įvesta kuriant sintetinius pradmenis su mutacija, kuri 5‘ sekos galinėje dalyje CTC tripletą keičia į TGG, dėl to baltymo N-gale trečioje pozicijoje esanti amino rūgštis leucinas pakeičiama triptofanu (L3W). Mutantinis pradmuo buvo kuriamas remiantis bendraisiais pradmenų kūrimo principais ir SnapGene® programa (https://www.snapgene.com/). Pradmenys buvo gauti iš Metabion, Vokietija.

2.2.8. DNR sekoskaita ir sekų analizė

Fragmentų DNR sekos nustatytos Macrogen kompanijoje (Olandija). Sekų analizei naudotos NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) duomenų bazėje esantis įrankis BLASTP, EMBL-EBI (https://www.ebi.ac.uk/) esantys Fasta-Nucleotide, Fasta-Protein ir Fasta-genome įrankiai. Sekos buvo palyginamos naudojant ClustalW palyginį. Baltymų pI ir molekulinė masė nustatyta naudojantis ExPASy Compute pI/Mw įrankiu (https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool), o aminorūgščių sudėtis ProtParam įrankiu

(https://web.expasy.org/protparam/) . Domeninė organizacija nagrinėta su InterProScan. Baltymų tretinė struktūra gauta nauojantis I-TASSER programa. Filogenetinė analizė atlikta su Mega X programa.

2.2.9. Rekombinantinių baltymų indukcija ir gryninimas

Gauta rekombinantine plazmide transformuotas *E. coli* BL21(DE3) kamienas auginamas iki OT_{600} ~ 0,6 su ampicilinu (50 µg/mL). Pasiekus reikiamą OT, baltymų raiška indukuojama IPTG (0,1 mM), 20 val., 16ºC temperatūroje. Pirminė baltymų indukcija patikrinama ląstelių suspensijos pavyzdį suspenduojant galutinio pavyzdžio buferyje (FSB) ir tikrinama elektroforetiškai. Likusios ląstelės surenkamos ir centrifuguojamos šaldančioje centrifugoje (5 min, 6000 x g, 6 ºC). Ląstelės nupilamos ir suspenduojamos 600 µL His surišimo buferio (pH 7,7). Suspensija dedama į ledo vonelę ir vykdomas ląstelių ardymas ultragarsiniu sonopulso aparatu. Vykdomi 6 ciklai po 30 s, tarp kiekvieno ciklo – 30 s pertrauka esant 30% galingumui. Suardžius ląsteles, suspensija centrifuguojama šaldančioje centrifugoje (15 min, 11000 x g, 4 ºC). Supernatantas surenkamas baltymų gryninimui, nuosėdos pasiliekamos NDS-PAAG analizei. Baltymas gryninanmas afininės chromatografijos būdu su tirpius His inkarą turinčius baltymus surišančias kolonėles (Zymo Research His-Spin Protein Miniprep) pagal gamintojo pateiktą gryninimo protokolą. Baltymų saugojimui žemoje temperatūroje ir galutiniam nereikalingų medžiagų pašalinimui, juos išgryninus vykdoma dializė atitinkamame **6 lentelėje** pateiktame I arba II dializės buferyje. Po dializės paimami mėginiai (dializuotas baltymas, tirpi frakcija po ląstelių suardymo ultragarsu, netirpi frakcija po ląstelių suardymo ultragarsu, ląstelių suspensija po indukcijos), suspenduojami FSB buferyje ir analizuojami elektroforezės būdu poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis.

2.2.10. Baltymų elektroforezė

Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje atliekama pagal standartinę metodiką denatūruojančiomis sąlygomis. Baltymai dažomi Coomassie Brilliant Blue baltymų gelių dažu. Naudojamas 4,5% koncentruojamasis ir 14% skirstomasis geliai. Gelis atplaunamas 7 % vandeniniu acto tirpalu.

2.2.11. Rekombinantinių baltymų koncentracijos nustatymas

Išgryinintų baltymų koncentracija nustatoma pasinaudojant dvejais metodais rezultatui patvirtinti. Pirmiausia buvo pasinaudota Bradfordo metodu (Pierce™ Coomassie (Bradford)

Protein Assay Kit), kuris buvo atliktas pagal standartinę aprašytą metodiką (Bradford, 1976). Pagal gautą OT_{595} pasinaudojant standartine kreive buvo nustatyta baltymo koncentracija.

Taip pat koncentracija nustatyta Lowry metodu, kuris buvo atliktas pagal standartinę aprašytą metodiką (Lowry et al., 1951). Pagal gautą OT_{750} pasinaudojant standartine kreive buvo nustatyta baltymo koncentracija.

2.2.12. Rekombinantinių baltymų pH optimumo nustatymas

Rekombinantinių baltymų pH optimumo nustatymas buvo atliktas įvertinant lizinį baltymų aktyvumą prieš *Micrococcus lysodeikticus* bakterijas. Pasirinkti keturi skirtingų pH 0,1 M Tris-HCl buferiai ir 0,1 M NaOAc pH 5,2 buferiai. *M. lysodeikticus* liofilizuotos ląstelės suspenduojamos į pasirinktą tūrį (ne maženSį nei 700 µL) atitinkamo buferio iki OT_{600} ~0,7. Ląstelės padalijamos į du mėgintuvėlius po 350 µL suspensijos. Į vieną iš mėgintuvėlių įdedama endolizino (10 µg) , į kitą toks pat kiekis buferio kontrolei. Mėgintuvėliai dedami į termostatą su 37 ºC. Optinis tankis (A_{600}) matuojamas po 30 min, 60 min, 120 min ir 240 min.

2.2.13. Rekombinantinių baltymų aktyvumo nustatymas agaro lėkštelių metodu

Agaro lėkštelių metodu (Gosnell et al., 1975) buvo vizualizuojamas ir identifikuojamas rekombinantinių baltymų aktyvumas. *Geobacillus stearothermophilus*, *E. coli* BL21 bakterijos užauginamos iki OT_{600} ~0,6 - 0,8. Paruošiamos agarizuotos Bp arba LB terpės lėkštelės. Bakterijų gazonas paruošiamas tokiomis proporcijomis: 1,9 mL minkštojo Bp arba LB agaro (0,5 %), 0,8 mL kietojo Bp arba LB agaro (1,7 %), 0,6 mL bakterijų ląstelių. Bakterijų gazonas tolygiai paskirstomas ant gerai išdžiūvusios agarizuotos lėkštelės. Padžiovinus lėkštelę, ant jos lašinama skirtingų koncentracijų (10 µg, 1 µg, 0,1 µg) rekombinantinio baltymo. Lėkštelės dedamos į 37 ºC termostatą ir inkubuojama pernakt. Ryte stebimos lizės zonos.

2.2.14. Rekombinantinių baltymų aktyvumo nustatymas fiksuojant bakterijų kolonijas formuojančių vienetų redukciją

Kolonijas formuojančių vienetų redukcijos fiksavimas (Rodríguez et al., 2011) po poveikio rekombinantiniu baltymu buvo atliktas analizuojant *Geobacillus stearothermophilus* bakterijų redukciją. *G. stearothermophilus* bakterijos užauginamos iki OT_{600} ~0,6. 1 mL bakterijų centrifuguojama (1 min, 7000 x g), keletą kartų praplaunama tokiu pat tūriu rekombinantiniam baltymui tinkamu buferiu. Ląstelės padalijamos į du mėgintuvėlius po 350 µL suspensijos.

Pamatavus suspensijos optinį tankį, į vieną iš mėgintuvėlių pridedama rekombinantinio baltymo (10 µg), o kitas tarnauja kaip kontrolė, į kurį pridedamas toks pat kiekis buferio. Mėgintuvėliai dedami į 37 ºC termostatą, 1 val. Toliau vykdomi atitinkami skiedimai (10^2, 10^3, 10^4) tiek mėginio, tiek kontrolės, po kurių 100 µL yra išglaistoma ant agarizuotos lėkštelės su Bp terpe. Lėkštelės dedamos į 37 ºC termostatą ir inkubuojama pernakt. Ryte stebima ir analizuojama kolonijų redukcija.

2.2.15. Rekombinantinių baltymų termostabilumo nustatymas

Rekombinantinių baltymų termostabilumas buvo nustatomas kombinuojant inaktyvacijos ir matavimo *M. lysodeicticus* suspensijoje metodus. Pagal minėtą eigą buvo paruoštos *M. lysodeicticus* suspensijos su atitinkamais buferiais. Baltymai buvo inaktyvuojami termocikleryje prie atitinkamų temperatūrų (50 ºC, 55 ºC, 60 ºC) esant tam tikrai trukmei (15 min arba 30 min). Šiais baltymais (10 µg) buvo paveiktos *M. lysodeicticus* suspensijos. Parengtos dvi kontrolės – kontrolė su aktyviu baltymu ir kontrolė be baltymo. Mėginiai dėti į 37 ºC termostatą. Optinis tankis (A_{600}) matuojamas po 30 min, 60 min ir 120 min.

2.2.16. Statistinis duomenų apdorojimas

Gauti matavimų duomenys buvo apdoroti OriginPro 9.1 grafikos ir analizės įrankiu. Duomenų statistiniam reikšmingumui patvirtinti buvo atliktas t-testas. Paklaidoms tarp pakartojimų apskaičiuoti buvo naudota standartinių paklaidų formulė.

3. REZULTATAI IR APTARIMAS

3.1. Bakteriofagų endolizinų bioinformatinė analizė

Bakteriofagai vB_EcoM_VpaE1 (VpaE1), vB_PagS_Vid5 (Vid5) ir vB_PagM_PSKM (PSKM) yra *Caudovirales* eilės atstovai, bet priklauso skirtingoms šeimoms. VpaE1 ir PSKM yra *Myoviridae* šeimos atstovai, o Vid5 priklauso *Siphoviridae* šeimai. *E. coli* VpaE1 (Šimoliūnas et al., 2015) bei *Pantoea agglomerans* infekuojantys fagai Vid5 (Šimoliūnas et al., 2018) ir PSKM buvo išskirti iš gamtinių šaltinių, pilnai išanalizuoti genomai pateikti į NCBI GenBank duomenų bazę (VpaE1 prieigos Nr. KM657822 , Vid5 – Nr. MG948468). Bakteriofago PSKM genomas taip pat buvo nustatytas, išanalizuotas ir pateiktas į NCBI GenBank duomenų bazę, tačiau kol kas dar nėra paskelbtas. Bioinfomatinė šių fagų genomų analizė parodė, kad šiuose faguose yra potencialūs endolizinus koduojantys genai – VpaE1 fago ASR038 (atviras skaitymo rėmelis 038), Vid5 ASR97 ir PSKM ASR78. Siekiant bioinformatinės analizės metodais patikrinti, ar turimos šios DNR sekos gali koduoti bakteriofagų endolizinų baltymus ir surasti panašumų su kitų bakteriofagų baltymais, sudarytas BLAST palyginys (**5 lentelė**). Analizė parodė, jog VpaE1Lys pasižymi arčiausia homologija su *Salmonella* fago ST11 lizinu (ASR76695.1; 98,70 % identiškumas) ir *Salmonella* fago FSL SP-010 lizinu (NP_944846.1; 98,70 % identiškumas). Taip pat rasta dar 18 baltymų, su kuriais panašumas siekė daugiau nei 95 %. Vid5Lys BLAST analizė atskleidė, jog nebuvo rasta daugiau nei 55 % identiškumo sekų, kurios būtų dokumentuotos anksčiau. Didžiausias identiškumas (50,51 %) rastas *Klebsiella* fago SopranoGao endolizinui (ASV45028.1). PSKMLys atveju rasta arčiausia homologija yra *Xanthomonas* vB_XveM_DIBBI lizinui (ASV45028.1; 100 % identiškumas), tačiau homologija su kitais baltymais nebuvo aukštesnė negu 65 %. Pagal atliktą analizę galima teigti, jog Vid5Lys galėtų būti klasifikuojamas kaip naujo tipo *P. agglomerans* endolizinas, o VpaE1Lys ir PSKMLys buvo rasta artimų homologų.

5 lentelė. Potencialių endolizinų domenų ir funkcinė anotacija.

ASR	Numanoma molekulinė funkcija (pagal I-TASSER)	Ilgis[a]	Teorinis pI/Mw	InteProScan rezultatai (domenai)	BLASTP geriausi sutapimai	Įvertis	% Identiškumas

VpaE 1_38c	1,4-N-acetilmuramidazė	153	9.25 / 16997.58	Endolizinas/ autolizinas (IPR033907)	*Salmonella* fago ST11 lizinas *Salmonella* fago FelixO1 lizinas	2e-107 5e-107	98,70 98,70
Vid5_97	β-1,4-poli-N-acetil glukozamidinazė	200	9.05 / 21830.61	N-acetylmuramidazė (IPR024408)	*Klebsiella* fago SopranoGao endolizinas	2e-63	50,51
PSKM_78	1,4-N-acetilmuramidazė	161	8.80 / 17771.35	Neidentifikuota	*Xanthomonas* vB_XveM_DIBBI lizinas	3e-115	100

[a] – aminorūgštys

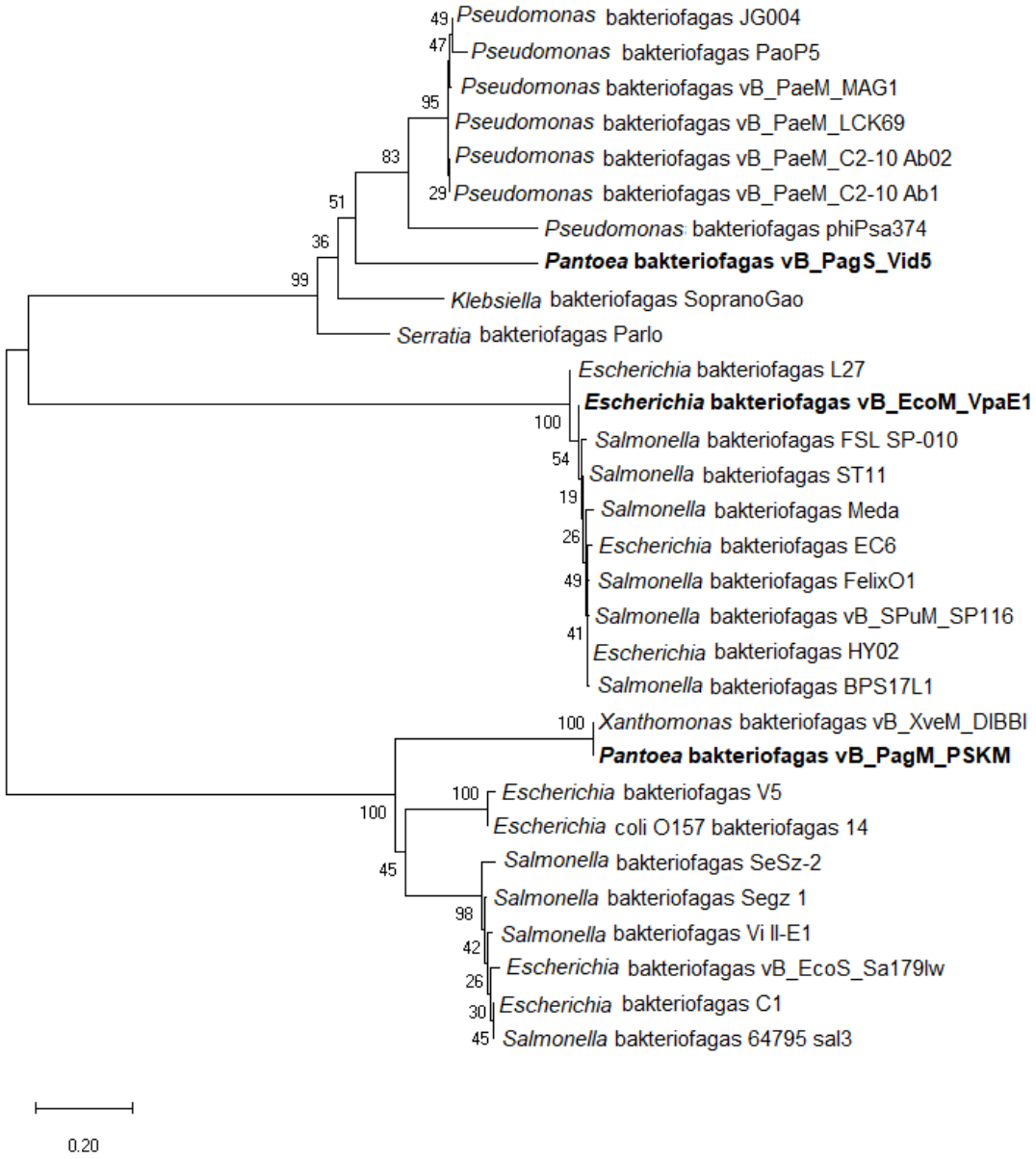
Remiantis I-TASSER programos pateiktais rezultatais, nustatyta, jog VpaE1 ir PSKM endolizinai pasižymi 1,4-N-acetilmuramidaziniu aktyvumu (skelia β(1→4) ryšius tarp GlcNAc ir MurNAc), o Vid5 endolizinas β-1,4-poli-N-acetil glukozamidinaziniu aktyvumu (skelia β(1→4) ryšius GlcNAc chitino polimere) (**5 lentelė**). Tarpusavyje baltymų sekos buvo palygintos su ClustalO programa. Rezultatas parodė, jog sekos tarpusavyje pasižymi tik 3,78 % panašumu, todėl daroma prielaida, jog rekombinantiniai baltymai tarpusavyje nėra panašūs pagal aminorūgščių seką, todėl jų aktyvumai taip pat skirsis. Tretinė baltymų struktūrinė organizacija taip pat patvirtina tokią hipotezę (**10 pav.**).



VpaELys **Vid5Lys** **PSKMLys**

10 pav. VpaELys, Vid5Lys, PSKMLys tretinių struktūrų modeliai, gauti I-TASSER programa.

Evoliucinė analizė, atlikta Mega X programa artimiausių grupių apjungimo metodu, patvirtina, jog nagrinėjamos sekos išsiskiria į tris skirtingas grupes (**11 pav.**). Vid5 bakteriofago endolizinas pasižymi artimiausiu panašumu su *Pseudomonas* genties bakterijų endolizinais, VpaE1 endolizinas – su *Escherichia* ir *Samonella* fagų endolizinais, o PSKM – su *Xanthomonas* fagų endolizinais.



11 pav. Filogenetinė bakteriofagų endolizinų diagrama. Diagrama sudaryta artimiausių grupių apjungimo metodu su įkėlos analize (500 pasikartojimų). Skaičiai simbolizuoja įkėlos procentinę išraišką. Mastelis atitinka pakitusių amino rūgščių skaičių, tenkantį vienai pozicijai.

3.2. Bakteriofagų VpaE1, Vid5 ir PSKM endolizinų genų klonavimas, atranka ir rekombinantinių baltymų raiška bei gryninimas

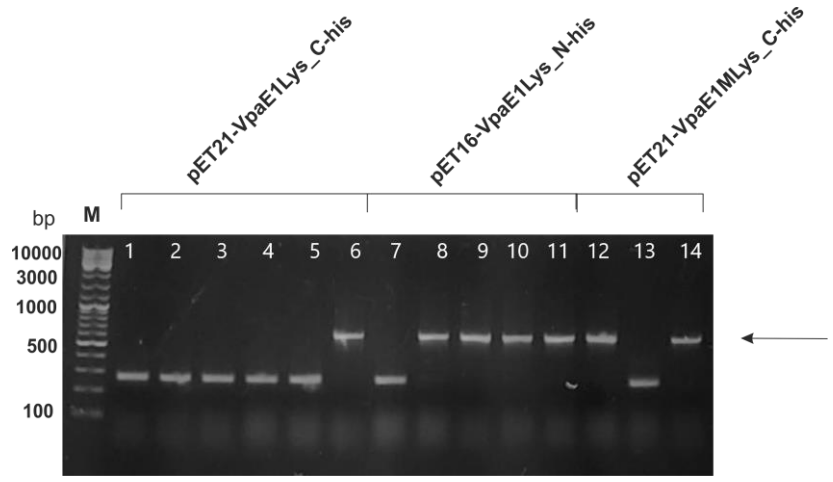
Siekiant gauti bakteriofagų VpaE1, Vid5 ir PSKM potencialius endolizinus koduojančius genus, pirmiausia buvo kuriami sintetiniai oligonukleotidiniai pradmenys, turintys restrikcijos endonukleazių atpažinimo vietas (**6 lentelė**).

6 lentelė. Darbe panaudoti sintetiniai DNR pradmenys. Paryškintos RE-azių atpažinimo sekos, mutantinio pradmens atveju pabrauktas pakeistasis kodonų tripletas.

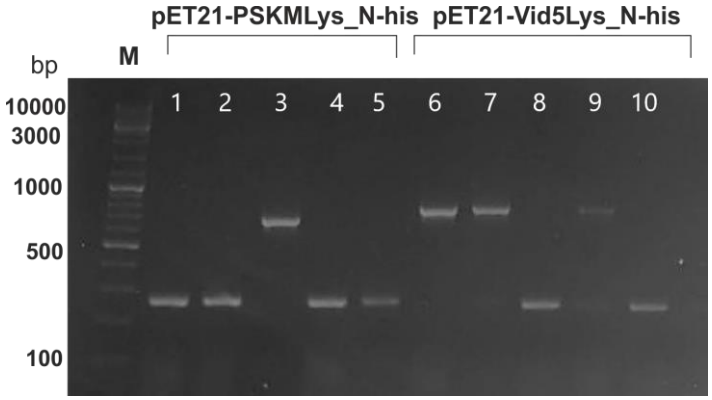
Nr.	Pradmuo	Oligonukleotidinė seka (5‘→3‘)
1	VPLys_NdeI_F1	AGG**CATATG**CAACTCTCAAGAAAAG
2	VPLys_XhoI_R1	AAG**CTCGAG**CTTTGGGTATACACTGTC
3	VPLys_BamHI_R1	GAA**GGATCC**TATGAAGATATTAC
4	VPLysM1_NdeI_F1	GG**CATATG**CAATGGTCAAGAAAAGGTTTAG
5	Vid5Lys_NdeI_F1	TGA**CATATG**GCATTAACCGAGAAG
6	Vid5Lys_XhoI_R1	CCT**CTCGAG**CTTGCCACCGTTCTCAGTG
7	PSKMLys_NdeI_F1	AAA**CATATG**AATATTGCAACTGGAATC
8	PSKMLys_XhoI_R1	CAAA**CTCGAG**TAAATCCCCATGCTCGAC

PGR reakcijos metu nuo atitinkamų fagų suspensijos naudojant pradmenis ir *Phusion* DNR polimerazę buvo gauti reikiamo dydžio DNR fragmentai, kurie patikrinti elektroforetiškai. Fago VpaE1 0,46 kb DNR fragmentas su potencialiu endolizino genu klonavimui į pET21(+) buvo gautas naudojant specifinius pradmenis Pr. 1 ir Pr. 2, o klonavimui į pET16b – Pr. 1 ir Pr. 3. Vid5 0,6 kb DNR fragmentas su genu gautas naudojant pradmenis Nr. 5 ir Nr. 6, o fago PSKM atveju 0,5 kb genui gauti naudoti Pr. 7 ir Pr. 8 pradmenys. VpaE1 mutantinis endolizino genas padaugintas naudojant Pr. 1 ir Pr. 4 (CTC pakeista į TGG).

Rekombinantinių plazmidžių kūrimui buvo pasirinktos pET-21a(+) ir pET-16b vektorinės plazmidės. Toliau vykdyta fragmentų ir vektorinių plazmidžių restrikcija. pET-21a(+) buvo panaudotos XhoI ir NdeI restrikcijos endonukleazės, o pET-16b – BamHI ir NdeI. Fragmentai atitinkamai restriktuoti su tokiomis pačiomis endonukleazėmis per įterptas restrikcijos atpažinimo sekas. Gavus reikiamus DNR fragmentus, jie liguoti pagal metoduose minėtą protokolą. Ligatas transformuotas į *E. coli* DH10B kamieną, siekiant išsiaiškinti, ar įvyko fragmentų susiligavimas su plazmidiniu vektoriumi. Būtent užaugusios bakterijų kolonijos leidžia identifikuoti transformantus. Atskiros kolonijos buvo suspenduotos LB terpėje ir vykdyta PGR reakcija pasinaudojant *Taq* DNR polimeraze bei T7 promotoriaus ir T7 terminatoriaus pradmenimis, padauginant tikslinį geną. PGR produktai analizuojami elektroforetiškai (12, 13 pav.), kas rodo, jog tinkami transformantai atsiskiria nuo nepavykusio ligavimo fragmentų pagal dydį.



12 pav. Tinkamų kolonijų su VpaE endolizino genu atrankos PGR būdu elektroforezės agarozės gelyje nuotrauka. 1-6 takeliai rodo į pET21a(+); 7-11 - į pET16b klonuoto geno rezultatus; 12-14 – į pET21a(+) klonuoto mutantinio geno rezultatą. 6, 8-12 ir 14 takeliai – DNR fragmentai su endolizino genu, 1-5, 7 ir 13 takeliai – DNR fragmentai be geno, M – markerio žymuo.



13 pav. Tinkamų kolonijų su PSKM ir Vid5 endolizinais atrankos PGR būdu elektroforezės agarozės gelyje nuotrauka. Į pET21a(+) klonuotų PSKM (1-5 takeliai) ir Vid5 (6-10 takeliai) genų rezultatai. 3, 6-7 ir 9 takeliai – DNR fragmentai su endolizino genu; 1, 2, 4, 5, 8 ir 10 – DNR fragmentai be geno, M – markerio žymuo.

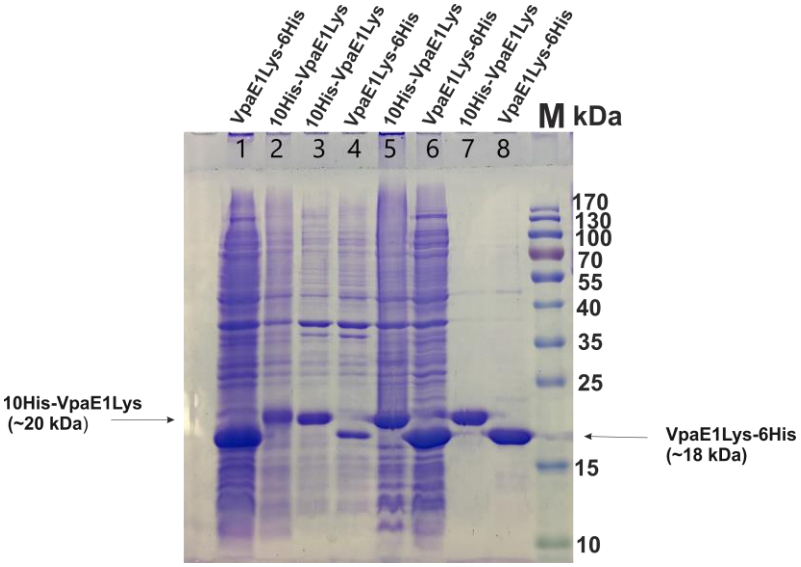
Atsirinkus tinkamus transformantus jie užauginti LB su ampicilinu (50 μg/ml), išskirtos rekombinantinės plazmidės. Tikslinių genų sekos buvo patikrintos sekoskaitos būdu ir pasirinktos plazmidės, kuriose PGR metu nebuvo įsivėlusios klaidos ar įvykę kitų netinkamų pokyčių (pvz., atvirojo skaitymo rėmelio poslinkio). Sukurtos plazmidės pavadinamos p16b-VPLys, p21a-VPLys, p21a-VPLysM1, p21a-Vid5Lys ir p21a-PSKMLys (**7 lentelė**). Nuo pET21(+) pagrindu sukonstruotų plazmidžių indukuojami tiksliniai baltymai C-galinėje dalyje sulieti su 6 histidinais, o pET16b plazmidėje klonuotas VpaE1 endolizinas N-gale sulietas su 10 histidinų. Mutantinis VpaE1 baltymas trečioje amino rūgščių pozicijoje turi leucino pokytį į

triptofaną (L3W).

7 lentelė. Darbe sukonstruotos plazmidės.

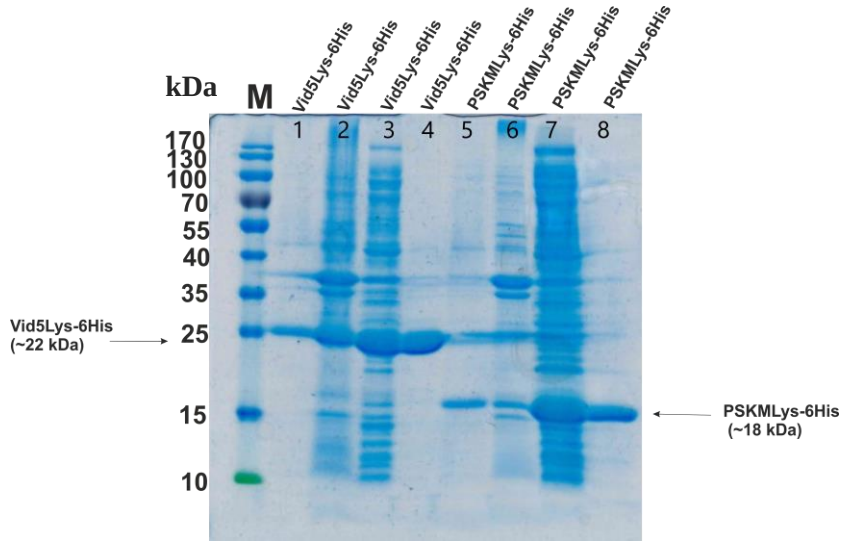
Plazmidė	Vektorius	Panaudoti PGR pradmenys	Baltymas
p16b-VPLys	pET16b NdeI/BamHI	VPLys_NdeI_F1, VPLys_BamHI_R1	VpaE1 endolizinas
p21a-VPLys	pET21a NdeI/XhoI	VPLys_NdeI_F1, VPLys_XhoI_R1	VpaE1 endolizinas
p21a-VPLysM1	pET21a NdeI/XhoI	VPLysM1_NdeI_F1, VPLys_XhoI_R1	VpaE1 modifikuotas endolizinas
p21a-Vid5Lys	pET21a NdeI/XhoI	Vid5Lys_NdeI_F1, Vid5Lys_XhoI_R1	Vid5 endolizinas
p21a-PSKMLys	pET21a NdeI/XhoI	PSKMLys_NdeI_F1, PSKMLys_XhoI_R1	PSKM endolizinas

Gautomis plazmidėmis transformuotas *E. coli* BL21DE3 baltymo raiškos kamienas. Ląstelėms užaugus iki OT_{600} = 0,6 rekombinantinio baltymo raiška indukuota 0,1 mM IPTG. Pasibaigus indukcijai, surinktos ląstelės nusodintos, suardomytos ultragarsu, surenkta gauta tirpioji ir netirpioji frakcijos. Iš tirpiosios frakcijos baltymas gryninimas afininės chromatografijos būdu, vėliau dializuojamas I arba II dializės buferyje, priklausomai nuo baltymo, ir saugomas - 20 ºC. Indukcijos rezultatas ir baltymų grynumas įvertinami baltymų poliakrilamidiniame gelyje (**14, 15 pav.**).

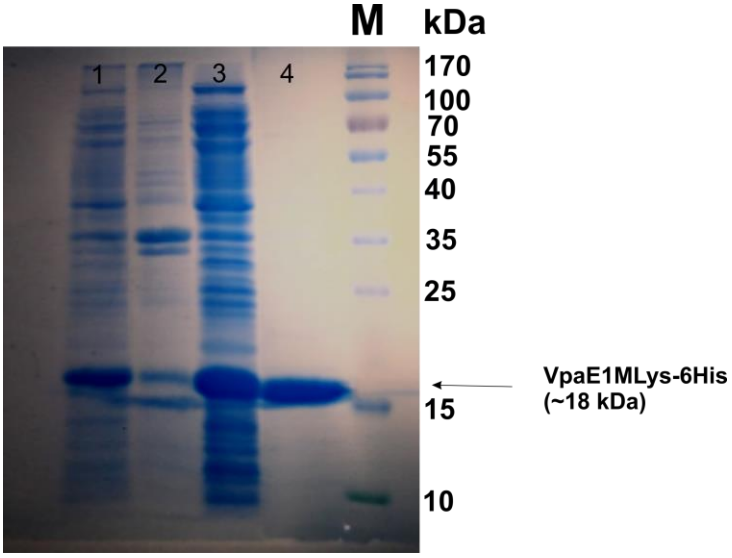


14 pav. Bakteriofago VpaE1 rekombinantinio endolizino indukcijos *E. coli* BL21 (DE3) kamieno ląstelėse denatūruojančiomis sąlygomis NDS-PAAG nuotrauka. Rodyklės žymi išgrynintus rekombinantinius endolizinus. 1, 2 – tirpi baltymų frakcija, gauta suardžius ląsteles; 3, 4 – netirpi baltymų frakcija, gauta suardžius ląsteles; 5, 6 – ląstelių suspensija po indukcijos; 7, 8 – išgryninti baltymai afininės chromatografijos būdu; M – baltymų molekulinės masės žymuo.

14, 15 ir 16 pav. rodo, kad visų bakteriofagų endolizinai buvo indukuoti, didžioji dalis baltymų buvo tirpioje frakcijoje. Baltymai buvo išgryninti afininės chromatografijos būdu. Gauti šie baltymai: VpaE1Lys-6His apie 22 kDa dydžio, 10His-VpaE1Lys apie 18 kDa dydžio, Vid5Lys-6His apie 22 kDa dydžio, PSKMLys-6His apie 18 kDa dydžio, VpaE1Mlys-6His apie 18 kDa dydžio. Koncentracija, matoma iš elektroforezės, įvertinama kaip tinkama tolimesniam darbui. Tiksli koncentracija nustatoma Bradfordo ir Lowry metodais.



15 pav. Bakteriofagų Vid5 ir PSKM rekombinantinių endolizinų indukcijos E. coli BL21 (DE3) kamieno ląstelėse denatūruojančiomis sąlygomis NDS-PAAG nuotrauka. 1-4 takeliai žymi Vid5Lys-6His, 5-8 takeliai – PSKMLys-6His. Rodyklės žymi išgrynintus rekombinantinius endolizinus. 1, 5 – ląstelių suspensija po indukcijos; 2,6 – netirpi baltymų frakcija, gauta suardžius ląsteles; 3, 7 – tirpi baltymų frakcija, gauta suardžius ląsteles; 4, 8 – išgryninti baltymai afininės chromatografijos būdu; M – baltymų molekulinės masės žymuo.

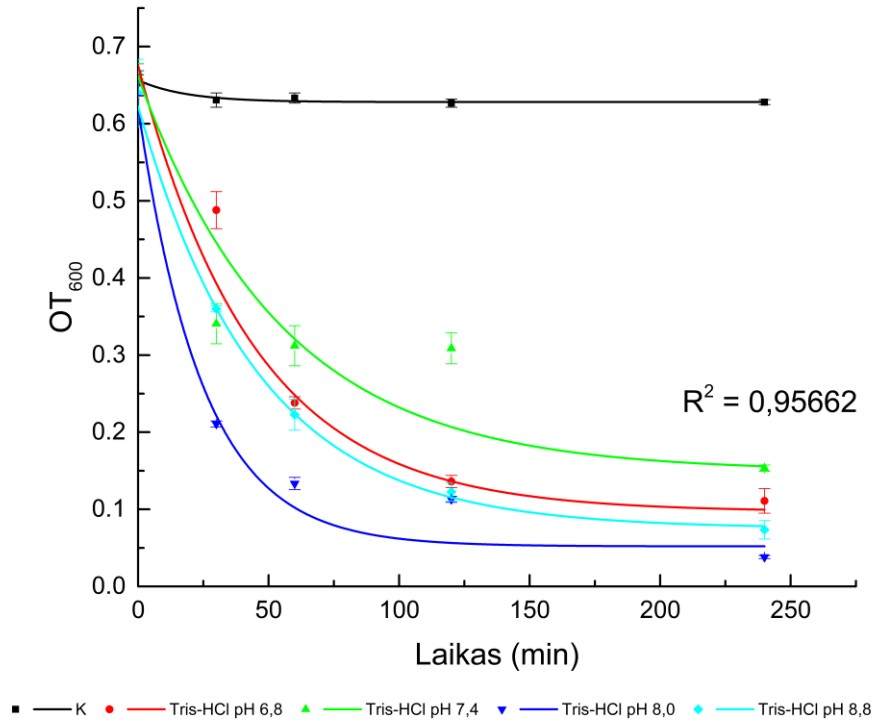


16 pav. Bakteriofago VpaE1 mutantinio rekombinantinio endolizino indukcijos *E. coli* BL21 (DE3) kamieno ląstelėse denatūruojančiomis sąlygomis NDS-PAAG nuotrauka. Rodyklė žymi išgrynintą rekombinantinį endoliziną. 1 – ląstelių suspensija po indukcijos; 2 – netirpi baltymų frakcija, gauta suardžius ląsteles; 3 – tirpi baltymų frakcija, gauta suardžius ląsteles; 4 – išgrynintas baltymas afininės chromatografijos būdu; M – baltymų molekulinės masės žymuo.

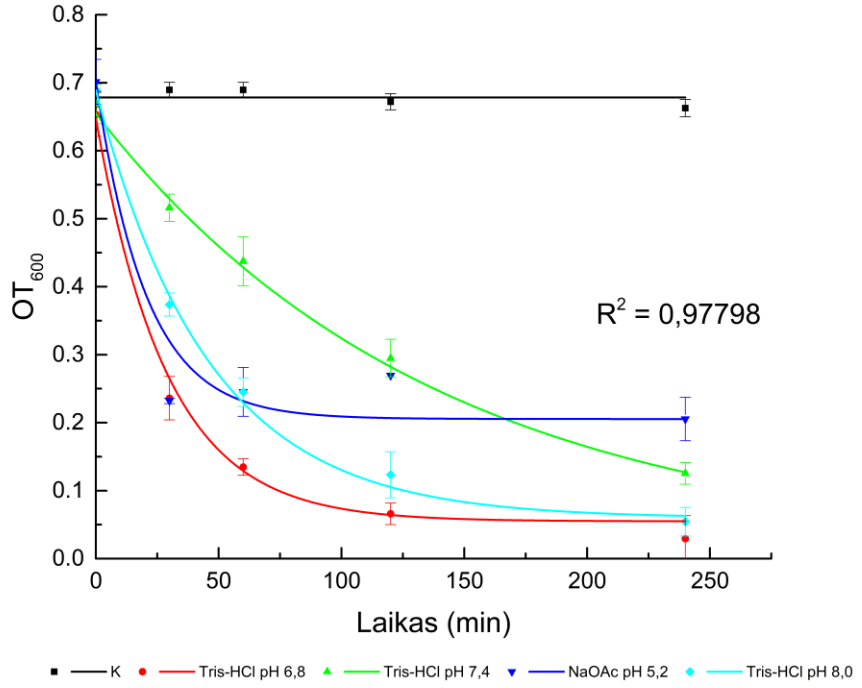
3.3. Rekombinantinių baltymų aktyvumo ir savybių tyrimas

3.3.1. Pirminis aktyvumo įvertinimas ir tinkamo pH nustatymas

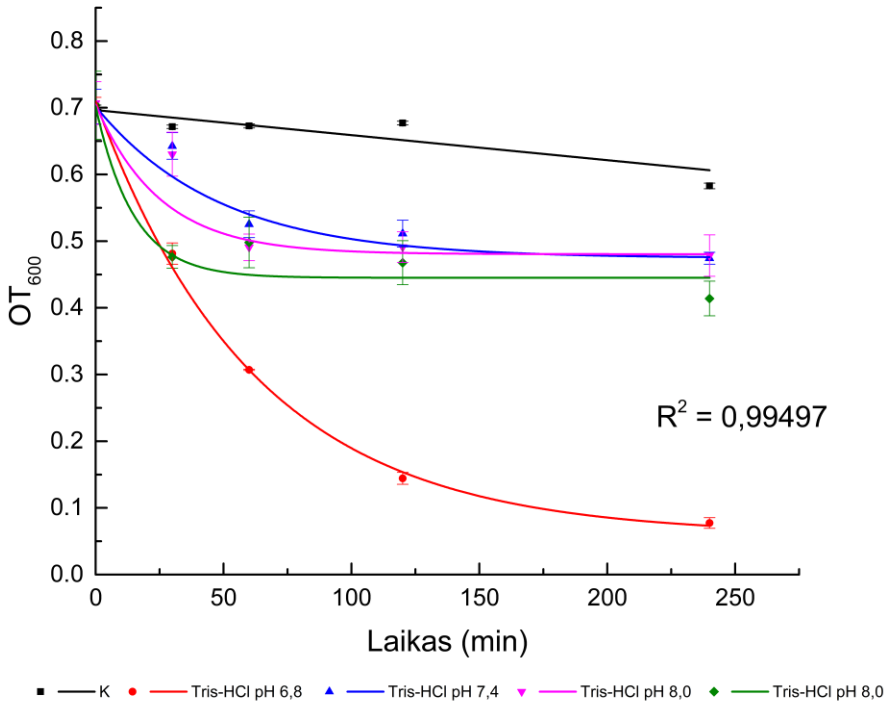
Išgryninus rekombinantinius baltymus, pirmiausia reikėjo įrodyti, kad šie baltymai pasižymi liziniu aktyvumu. Šiam uždaviniui pasiekti pasirinktos plačiai lizocimų aktyvumo įvertinimui naudojamos Gram-teigiamos bakterijos *Micrococcus lysodeikticus*. Lizocimai gali veikti skirtingą pH turinčiuose buferiuose, todėl buvo svarbu nustatyti jų veikimo pH optimumą. Šiam uždaviniui pasiekti, pasirinkti skirtingų pH Tris-HCl buferiai (pH 6,8; pH 7,4; pH 8; pH 8,4) bei NaOAc (natrio acetatinis) pH 5,2. Yra žinoma, jog Tris-HCl buferio pH, ties 37 ºC didėja dėl nutrūkusių ryšių tarp protonų, todėl buvo pasirinktas ir NaOAc buferis, kuris yra stabilesnis. Suspendavus *M. lysodeikticus* liofilizuotas ląsteles atitinkamuose buferiuose ir pasiekus vienodą optinį tankį, ląstelės buvo paveiktos rekombinantiniais potencialių endolizinų baltymais (10 µg). Kontroliniuose pavyzdžiuose naudotos bakterijų ląstelės tik su atitinkamu buferiu. Buvo atlikti optinio tankio matavimai po 30, 60, 120 ir 240 minučių inkubacijos 37^{o}C temperatūroje, o rezultatai pavaizduoti linijine diagrama (**16, 17, 18 pav.**). Rezultatai pateikiami iš 4 bandymų pakartojimų. Atliktas t-testas OriginPro 9.1 programa patvirtino, jog gauti rezultatai yra statistiškai patikimi ($p < 0,05$).



16 pav. Rekombinantinio baltymo VpaE1Lys-6His poveikis *M. lysodeikticus* bakterijų suspensijos optiniam tankiui esant skirtingiems buferių pH (n=4).



17 pav. Rekombinantinių baltymų Vid5Lys-6His poveikis *M. lysodeikticus* bakterijų suspensijos optiniam tankiui esant skirtingiems buferių pH (n=4).



18 pav. Rekombinantinių baltymų PSKMLys-6His poveikis *M. lysodeikticus* bakterijų suspensijos optiniam tankiui esant skirtingiems buferių pH (n=4).

Grafikas sudarytas randant 4 bandymų vidurkius ir juos pritaikant eksponentiškai

mažėjančiai funkcijai. Dydis R^2 nusako, kiek iš visų turimų duomenų aprašo panaudota funkcija (R^2 idealiomis sąlygomis lygus 1). Apskaičiuotos standartinės paklaidos, diagramoje išreikštos kaip pasikliauties intervalai, nurodo nukrypimus tarp bandymų pakartojimų. Iš gautų rezultatų matyti, kaip kinta rekombinantinių baltymų poveikis bakterijoms fiksuojant optinio tankio pokyčius.

VpaE1-6His (**16 pav.**) baltymo atveju stebima gana staigi ir laike didėjanti bakterijų lizė Tris-HCl pH 8,0 buferyje. Lyginant ląstelių optinio tankio sumažėjimą šiuose buferiuose bei kontrolę, galima teigti, jog Tris-HCl pH 8,0 buferis yra tinkamiausias VpaE1Lys-6His rekombinantiniam baltymui, kadangi pasiekiama didžiausias optinio tankio sumažėjimas.

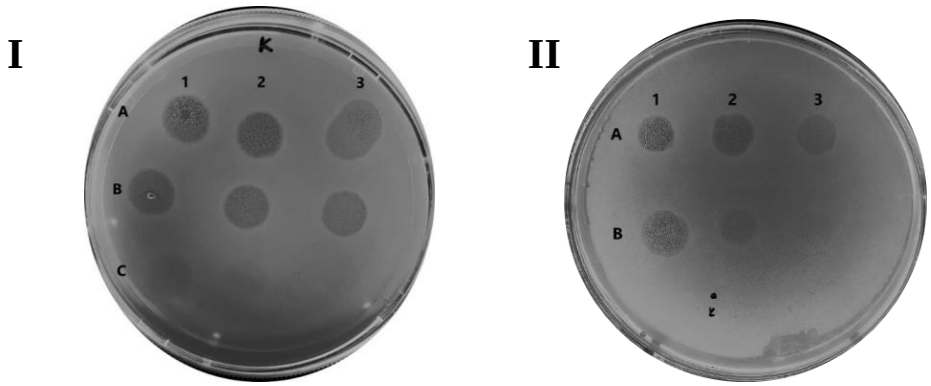
Vid5-6His (**17 pav.**) baltymo atveju didžiausias optinio tankio sumažėjimas matomas baltymui esant Tris-HCl pH 6,8 buferyje – bakterijų OT sumažėja apie 6 kartus. PSKM-6His (**18 pav.)** taip pat pasižymi didžiausiu aktyvumu Tris-HCl pH 6,8 buferyje.

Vertinant bendrai pirminį lizinį rekombinantinių baltymų aktyvumą, matyti, jog baltymai pasižymi staigiu poveikiu pirmąjį pusvalandį ir bakterijų optinis tankis sumažėja apie 3 kartus. Laiko perspektyvoje matyti, jog optinis tankis mažėja per maždaug 0,1 padalos. Svarbu atkreipti dėmesį, jog baltymai yra aktyvūs skirtinguose pH. Tai yra ypač svarbus aspektas antimikrobiniams baltymams.

Taigi, fiksuojant *M. lysodeikticus* bakterijų optinio tankio pokyčius suspensijoje veikiant endoliziniams rekombinantiniams baltymams buvo parodyta, kad šie baltymai yra lizinai, ir nustatytas tinkamas jų pH optimumas.

3.3.2. Aktyvumo nustatymas agaro lėkštelių metodu

Agaro lėkštelių metodu siekta vizualizuoti ir parodyti rekombinantinių baltymų poveikį bakterijoms. Poveikis stebėtas tiek prieš Gram-teigiamas *Geobacillus stearothermophilus* bakterijas, tiek prieš Gram-neigiamas *E. coli* bakterijas. Užaugintos iki reikiamo OT bakterijos sumaišytos su 0,5 % agarizuota Bp (pH 6,0) terpe ir paskleistos ant agarizuotos lėkštutės formuojant bakterijų gazoną. Ant suformuoto bakterijų gazono palašinti skirtingos koncentracijos rekombinantiniai endolizinai (10 µg; 1 µg; 0,1 µg). Gautos lizės zonos analizuotos vizualiai (**19, 20 pav.**).



19 pav. endolizinų gebėjimo lizuoti Gram(+) *G. stearothermophilus* patikrinimas Rekombinantinių agaro lėkštelių metodu esant skirtingoms baltymo koncentracijoms. I žymi VpaE1Lys-6His (A), VpaE1LysM-6His (B) ir 10His-VpaE1Lys (C) lizės zonas; II žymi Vid5Lys-6His (A) ir PSKMLys-6His (B); K – jaučio serumo albuminas. 1 – 10 µg, 2 – 1 µg, 3 – 0,1 µg panaudotus baltymų kiekius.

19 pav., I parodo VpaE1Lys-6His (A), VpaE1LysM-6His (B) ir 10His-VpaE1Lys (C) sukeltą *G. stearothermophilus* lizę esant skirtingoms baltymų koncentracijoms (1 – 10 µg, 2 – 1 µg, 3 – 0,1 µg). Kontrole pasirinktas jaučio serumo albuminas, kuris nepasižymi liziniu aktyvumu. Matyti, jog A ir B lizės zonos (**19 pav.**, I) yra aiškiai išreikštos. Net ir mažinant koncentraciją 10 ir 100 kartų (**19 pav.**, A ir B, 2, 3 lizės zonos), baltymo aktyvumas išlieka didelis, nes lizės zonos yra tik nežymiai blankesnės. Tuo tarpu 10His-VpaE1Lys (**19 pav.**, I, C) lizės zonos nėra aiškiai išreikštos, todėl gali būti, jog baltymo N-galinėje dalyje esantis histidinų inkaras neleidžia susidaryti tinkamai baltymo konformacijai ir slopina lizinį aktyvumą.

19 pav., II parodo baltymų Vid5Lys-6His (A) ir PSKMLys-6His (B) aktyvumą esant taip pat skirtingoms koncentracijoms. A ir B lizės zonos yra aiškiai išreikštos, mažinant koncentraciją B atveju lizės zonos taip pat blankesnės.

Kaip jau minėta literatūros apžvalgoje, vis daugiau koncentruojamasi į paiešką endolizinų, kurie gebėtų lizuoti Gram-neigiamas bakterijas. Iššūkį keliančią šių bakterijų išorinę membraną endolizinams dažnai neįmanoma įveikti, tad bandoma jas „apardyti“ denatūruojančiomis medžiagomis (pvz., EDTA) ir tuomet paveikti liziniais baltymais (Antonova et al., 2018) arba kuriami chimeriniai baltymai, kur būtų sustiprinamas endolizinis poveikis (Haddad Kashani et al., 2017). Be abejo, toks būdas yra gana neekonomiškas ir reikalaujantis daug pastangų. Todėl ieškoti natūraliai gamtoje esančių bakteriofagų ir jų aktyvių endolizinų yra labai aktualu. Daug žadantys yra Gram-neigiamų bakterijų bakteriofagai ir jų liziniai baltymais, kurie ir yra šio darbo objektas. Šie endolizinai dažnai mažos molekulės, turinčios viendomeninę globulinę struktūrą, su kai kuriomis išimtimis jos taip pat neturi ir LSPD (Rodríguez-Rubio et al., 2013; Walmagh et al., 2012). Tokia struktūra, manoma, lemia mažesnį Gram-neigiamų bakterijų bakteriofagų endolizinų specifiškumą, todėl potencialiai jie yra susidomėjimo objektas.

Baltymais VpaE1Lys-6His, VpaE1LysM-6His, Vid5Lys-6His ir PSKMLys-6His paveiktos Gram-neigiamos *E. coli* BL21^{-} bakterijos (20 µg) (**20 pav.**). Kontrole pasirinktas jaučio serumo albuminas, kuris nepasižymi liziniu aktyvumu. Matomu didžiausiu aktyvumu pasižymi Vid5Lys-6His (A). PSKMLys-6His (B) ir VpaE1Lys-6His (C) pasižymėjo ryškiai mažesniu aktyvumu. Sukonstruotas mutantinis VpaE1MLys-6His baltymas lyginant su natyviu VpaE1Lys-6His formavo ryškesnę lizės zoną bakterijų pasėlyje. Triptofanas, kaip patvirtina Shang ir komanda (Shang et al., 2016), padidina mažų peptidų sąveiką su bakteriniu paviršiumi ir leidžia jam prasiskverbti pro storą Gram-neigiamų bakterijų apvalkalą. Aminorūgšties pakeitimas (L3W) galėjo lemti mūsų tikslinio baltymo prasiskverbimą pro Gram-neigiamų bakterijų apvalkalą.



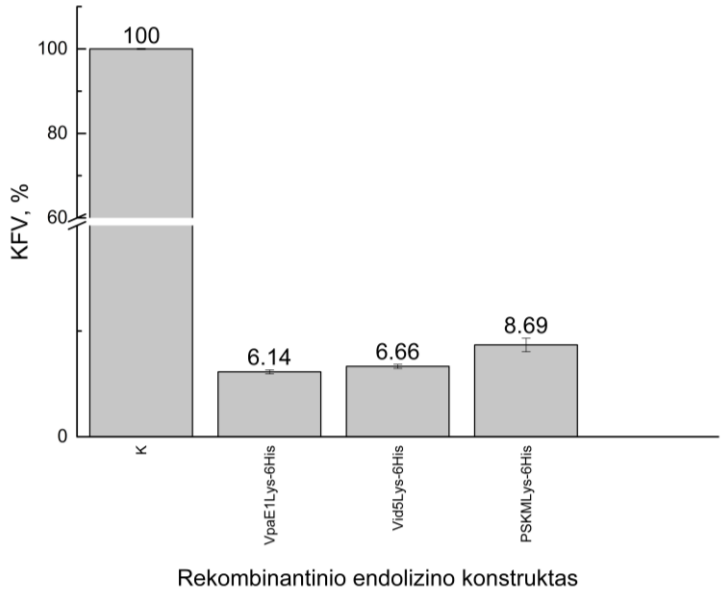
20 pav. Rekombinantinių endolizinų gebėjimo lizuoti Gram(-) *E. coli* BL21^{-} patikrinimas agaro lėkštelių metodu. A – Vid5Lys-6His; B – PSKMLys-6His; C –VpaE1Lys-6His; D – VpaE1MLys-6His; K – jaučio serumo albuminas. Panaudotas baltymų kiekis 20 µg.

Apibendrinant metodo rezultatus matyti, jog aktyvumu pasižymi VpaE1Lys-6His, VpaE1LysM-6His, Vid5Lys-6His ir PSKMLys-6His baltymai prieš *G. stearothermophilus* Gram-teigiamas bakterijas. Kadangi 10His-VpaE1Lys nepasižymėjo išreikštu aktyvumu, toliau su juo dirbama nebuvo. Svarbu pažymėti, kad šie baltymai geba lizuoti Gram-teigiamas ir Gram-neigiamas bakterijas mūsų tirtoje sistemoje. Didžiausiu aktyvumu pasižymėjo Vid5Lys-6His, o PSKM ir VpaE1 endolizinai daug silpniau lizavo *E. coli* BL21^{-}. Mutantinis VpaE1MLys-6His baltymas lyginant su natyviu VpaE1Lys-6His, parodė didesnį aktyvumą ir patvirtino, jog triptofanų kiekio padidinimas mažuose peptiduose padidina prasiskverbimą pro Gram-neigiamų bakterijų apvalkalą.

3.3.3. Gyvybingų kolonijų po poveikio rekombinantiniais endolizinais įvertinimas

Siekiant įvertinti bakteriofagų rekombinantinių endolizinų poveikio efektyvumą, buvo atliekamas kolonijas formuojančių vienetų (KFV) redukcijos skaičiavimas prieš *G.*

stearothermophilus. Užaugintos iki reikiamo optinio tankio bakterijos ir praplautos reikiamame buferyje buvo paveikiamos rekombinantiniais baltymais (10 µg). Po valandos mišinys išsklaidytas ant agarizuotos lėkštelės esant skirtingiems jo skiedimams (10^3 CFU/mL, 10^4 CFU/mL skiedimai). Sekančią dieną lėkštelės analizuotos ir vykdytas KFV skaičiavimas. Duomenys vizualizuoti ir apibendrinti stulpeline diagrama (**21 pav.**).



21 pav. Gyvybingų *G. stearothemophilus* ląstelių sumažėjimo procentinė išraiška paveikus skirtingų fagų rekombinantiniais endolizinais. Skaičiai nurodo išlikusių KFV skaičių (%) (n=4).

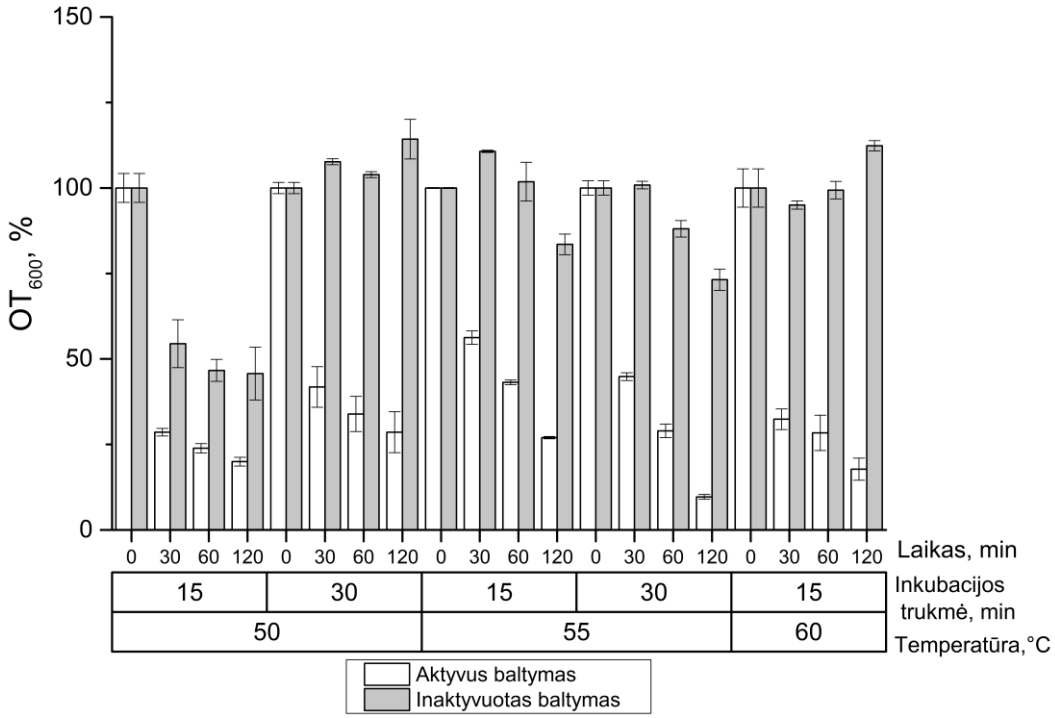
Diagrama apibendrina išlikusių gyvybingų ląstelių procentą po poveikio rekombinantiniais endolizinais. Bandymas kartotas 4 kartus, diagrama atspindi visų bandymų vidurkio procentinę dalį. Apskaičiuotos standartinės paklaidos, diagramoje išreikštos kaip pasikliauties intervalai, nurodo nukrypimus tarp bandymų pakartojimų. Visi baltymai vidutiniškai palieka apie 7 % gyvybingų ląstelių. Geriausią lizę parodo VpaE1Lys-6His – išlieka 6,14 % gyvybingų bakterijų. Panašus rezultatas gaunamas bakterijas veikiant Vid5Lys-6His – išlieka 6,66 % gyvybingų bakterijų. Kiek prastesnį rezultatą parodo VpaE1LysM-6His (8,17 % gyvybingų bakterijų likutis) bei PSKMLys-6His (8,69 % gyvybingų bakterijų likutis).

Apibendrinant visų bakteriofagų lizinis efektyvumas yra panašus, nėra reikšmingo skirtumo, o geriausiu liziniu aktyvumu pasižymi VpaE1Lys-6His.

3.3.4. Termostabilumo įvertinimas

Terminis stabilumas yra vienas iš reikšmingų baltymų kinetinių parametrų. Siekiant endolizinus pritaikyti medicinoje, maisto ar kitoje pramonėje, temperatūrinis aspektas yra ypač svarbus. Rengiami atskiri tyrimai temperatūriniam stabilumui rasti / patvirtinti (Bustamante et al., 2012; Filatova et al., 2010; Linden et al., 2015).

Baltymų termostabilumo įvertinimui buvo pasirinkta liofilizuotų *M. lysodeikticus* bakterijų suspensija paveikiant ją rekombinantiniais endolizinų baltymais. Užaugintos ląstelės iki reikiamo optinio tankio buvo paveiktos skirtingose temperatūrose – 50 ºC, 55 ºC ir 60 ºC – inaktyvuotais baltymais (10 µg). Kontrolei buvo pasirinkta bakterijų suspensija be baltymo ir bakterijų suspensija su aktyviu baltymu. Optinis tankis matuotas po 30, 60 ir 120 min. Rezultatai pavaizduoti stulpeline diagrama (**22, 23, 24 pav.**).



22 pav. Rekombinantinio aktyvaus ir inaktyvuoto endolizino VpaE1Lys-6His įtakos *M. lysodeikticus* palyginimas. Inaktyvacija atlikta 15 ir 30 min, 50, 55 ir 60 ºC temperatūrose. Inaktyvuoto ir aktyvaus endolizinų aktyvumo matavimai atlikti 37 ºC temperatūroje po 0, 30, 60 ir 120 min, (n=2).

Diagrama atspindi apskaičiuotą santykį kontrolės be baltymo (OT) su aktyviu baltymu (OT) bei kontrolės be baltymo (OT) su inaktyvuotu baltymu (OT). Santykis skačiuojamas randant matavimų vidurkį ir išreiškiamas procentine išraiška:

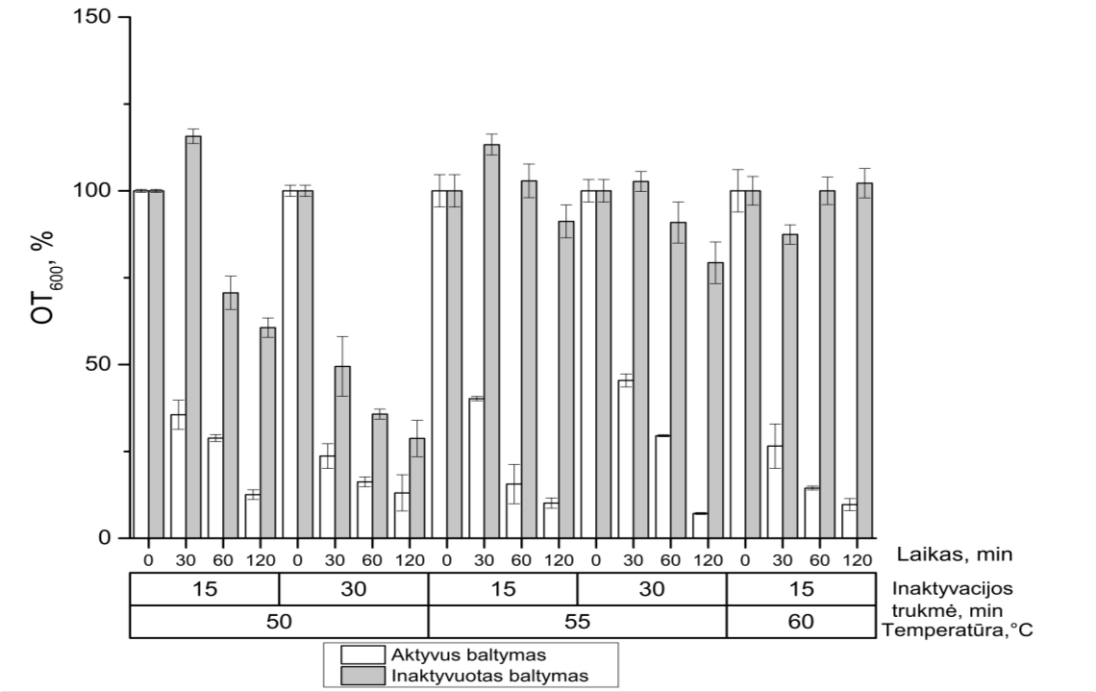
$$\frac{vid(OT_{akt/inakt})}{vid(OT_K)} \times 100\%$$

Diagramoje 100 % atitinka kiekvieno nepriklausomo bandymo atskaitos tašką – ląstelių optinį tankį bandymo pradžioje. Apskaičiuotos standartinės paklaidos, diagramoje išreikštos kaip pasikliauties intervalai, nurodo nukrypimus tarp bandymų pakartojimų. Atliktas t-testas OriginPro 9.1 programa patvirtino, jog gauti rezultatai tarp grupių yra statistiškai patikimi ($p < 0,05$).

Žinant, jog nagrinėjamų endolizinų bakteriofagai yra plataus temperatūrinio spektro (Šimoliūnas et al., 2015, 2018), buvo svarbu nustatyti, ar baltymai taip pat pasižymės termostabilumu. **22 paveikslėlyje** esantis grafikas vaizduoja VpaE1

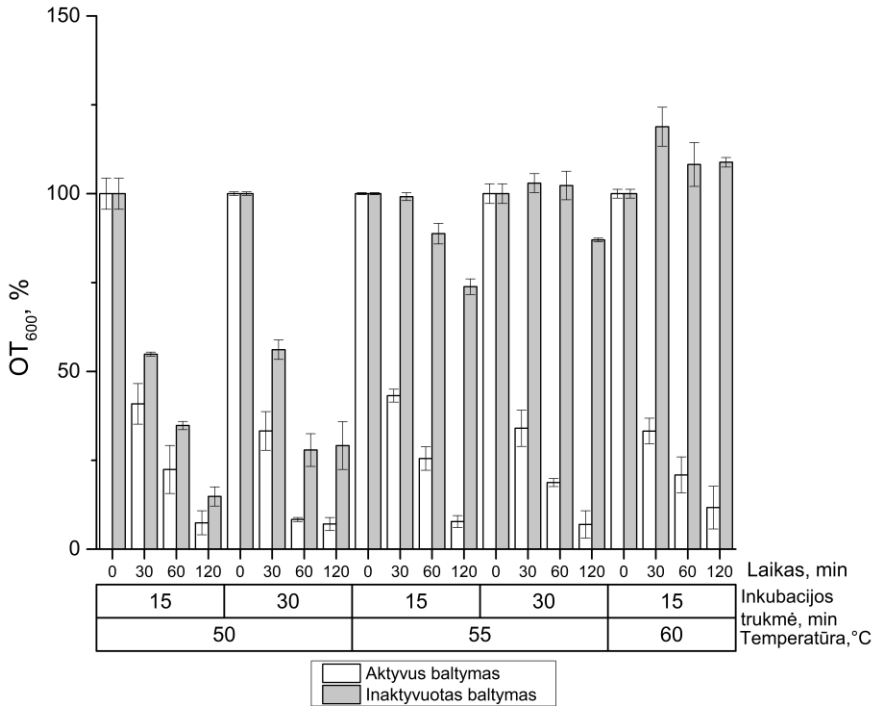
Lys-6His aktyvumo pokyčius. Baltymą inkubavus 15 min, 50 ºC aktyvumas išlieka santykinai stabilus, visgi po 30 min inkubacijos toje pačioje temperatūroje jis sumažėja beveik dvigubai ir nebeatgauna buvusio aktyvumo. Inkubavus 55 ºC tiek po 15 min, tiek po 30 min stebima baltymo inaktyvacija, bet 60-tą minutę baltymas atgauna savo aktyvumą (renatūruoja) abejose temperatūrose. Yra žinoma, jog kai kurie endolizinai geba atgauti savo aktyvumą net po ilgo inkubacinio laikotarpio. Ilgu yra laikomas 10 min ir didesnis inaktyvavimas. Pavyzdžiui, *Pseudomonas* fago endolizinai KZ144 ir EL188 išlieka aktyvūs po 10 min inaktyvacijos 50 ºC (Briers et al., 2007), o T4 fago lizocimas išlieka mažai aktyvus po 5 min, 65 ºC (Nakagawa et al., 1985). Taigi lyginant duomenis su literatūroje esančiais, nagrinėjami endolizinai parodo gana aukštą inaktyvacijos laipsnį. Po 15 min inkubacijos 60 ºC stebima visiška baltymo inaktyvacija, kadangi bakterijų OT skirtingais matavimo laikais nemažėja. Temperatūrinė priklausomybė parodo, jog baltymas yra jautrus temperatūriniams pokyčiams ir didėjant temperatūrai savo aktyvumą praranda.

23 paveikslėlyje esantis grafikas rodo PSKMLys-6His temperatūrinio stabilumo analizės rezultatus. Šiuo atveju stebima ryški pradinė inaktyvacija po 15 min trukmės inkubacijos 50 ºC, visgi aktyvumas atgaunamas po 60 min. Inkubavus baltymą pusvalandį toje pačioje temperatūroje, aktyvumas išlaikomas panašus lyginant su aktyviu baltymu. Inaktyvuojant baltymą 55 ºC tiek 30 min, tiek 15 min stebimas ryškus baltymo aktyvumo praradimas, tačiau abejais atvejais 60 minutę baltymas atgauna aktyvumą. Visgi jis yra kelis kartus mažesnis nei aktyvaus baltymo. Inkubuojant baltymą 60 ºC 30 min dar stebimas nedidelis aktyvumas, tačiau praėjus pusvalandžiui ir toliau baltymas neberodo aktyvumo.



23 pav. Rekombinantinio aktyvaus ir inaktyvuoto endolizino PSKMLys-6His įtakos *M. lysodeikticus* palyginimas. Inaktyvacija atlikta 15 ir 30 min, 50, 55 ir 60 ºC temperatūrose. Inaktyvuoto ir aktyvaus endolizinų aktyvumo matavimai atlikti 37 ºC temperatūroje po 0, 30, 60 ir 120 min, (n=2).

Rekombinantinio baltymo Vid5Lys-6His atveju (**24 pav.**) jis išlaiko aktyvumą po inkubacijos laikotarpio 50 ºC, nors aktyvumas sumažėja, bet pokyčiai nėra ryškūs. Po inkubacijos 55 ºC 15 min baltymo aktyvumas ryškiai sumažėja, tačiau pradedamas atgauti po 60 min. Inkubuojant toje pačioje temperatūroje pusvalandį, baltymas aktyvuma praranda ir jo neatgauna. Esant 60 ºC, kaip ir VpaE1Lys-6His atveju, stebima visiška baltymo inaktyvacija.



24 pav. Rekombinantinio aktyvaus ir inaktyvuoto endolizino Vid5Lys-6His įtakos *M. lysodeikticus* palyginimas. Inaktyvacija atlikta 15 ir 30 min, 50, 55 ir 60 ºC temperatūrose. Inaktyvuoto ir aktyvaus endolizinų aktyvumo matavimai atlikti 37 ºC temperatūroje po 0, 30, 60 ir 120 min, (n=2).

Sunku pasakyti, kas lemia, jog baltymas atgauna dalį savo aktyvumo po terminio poveikio. Teigiama, jog baltymai gali būti stabilizuojami mažinant jų išsivyniojimo entropiją (Matthews et al., 1987). Būtent prolinas pasižymi žemiausia konformacijos entropija išsivyniojusioje baltymo būsenoje, kas, manoma, galiausiai lemia, jog baltymas būna stabilizuojamas (Vieille and Zeikus, 2001). Pasinaudojus bioinformatinių įrankių svetainėje ExPASy esančiu įrankiu ProtParam, nustatyta, jog baltymą VpaE1Lys-6His prolinas sudaro 2,6 %, Vid5Lys-6His sudaro 2,0 %, o PSKMLys-6His 3,7%. Lyginant duomenis su Plotka ir komandos (Plotka et al., 2014) aprašytu termostabiliu baltymu Ph2119, kurio prolino kiekis yra 9 %, nagrinėjamų baltymų prolino kiekis yra santykinai mažas. Visgi Plotka ir komanda, lygindami Ph2119 su kitu nustatytu *P. aeruginosa* fago ϕKMV termostabiliu baltymu gp36C (Lavigne et al., 2004), kurio prolino kiekis sudaro 2,1 % , siūlo, jog greičiausiai ir kiti faktoriai lemia termostabilumą. Vertinant mūsų gautus rezultatus, matyti, jog jie patvirtina prolino teoriją, kadangi didesniu termostabilumu pasižymėjo VpaE1Lys-6His ir PSKMLys-6His, nors aktyvumo skirtumas tarp VpaE1Lys-6His ir Vid5Lys-6His yra labai mažas.

Taigi, matyti, jog esant 50 ºC inkubacijos laikotarpiui, baltymai išsaugo savo aktyvumą arba yra linkę renatūruoti. Baltymus inkubuojant 55 ºC stebimas ryškus aktyvumo praradimas,

bet PSKMLys-6His ir VpaE1Lys-6His greitai atgauna savo aktyvumą (renatūruoja), o Vid5Lys-6His yra mažiau stabilus aukštesnėse temperatūrose. Ties 60 ºC inkubacija stebima visiška baltymų inaktyvacija.

Šiame darbe buvo sėkmingai klonuoti skirtingų fagų VpaE1, Vid5 ir PSKM endolizinų genai, indukuota jų raiška ir išgryninti afininės chromatografijos būdu. Rekombinantinių endolizinų aktyvumas buvo parodytas skirtingais metodais – matuojant bakterijų ląstelių suspensijų optinį tankį, stebint lizės zonų susidarymą bakterijų pasėlyje kietoje terpėje bei nustatant išlikusių gyvybingų bakterijų skaičių paveikus endolizinu. Apibendrinus endolizinų aktyvumo tyrimą, galima teigti, jog jie pasižymi ryškiu poveikiu prieš Gram-teigiamas bakterijas (vidutinis gyvybingų KFV skaičius po poveikio endolizinu sudaro 6-9 %). Parodyta, kad Vid5 fago endolizinas gana efektyviai lizuoja Gram-neigiamas bakterijas, o sukonstruotas mutantinis VpaE1 fago endolizinas buvo aktyvesnis negu natyvus. Taip pat nustatytas visų rekombinantinių endolizinų optimalus veikimo pH bei įvertintas baltymų termostabilumas.

IŠVADOS

1. Sukonstruoti bakteriofagų vB_EcoM_VpaE1, vB_PagS_Vid5 ir vB_PagM_PSKM rekombinantiniai endolizinai yra tirpūs baltymai, pasižymintys bakterijų lizės fermentiniu aktyvumu.
2. Rekombinantinio endolizino VpaE1Lys veikimo pH optimumas yra 8,0, o Vid5Lys ir PSKMLys – 6,8.
3. Rekombinantiniai endolizinai pasižymi lizės iš išorės poveikiu Gram-teigiamoms *Geobacillus stearotermophilus* bakterijoms, kurių gyvybingumas po Vid5Lys poveikio išlieka 6,66 %, po VpaE1Lys poveikio – 6,14 %, o po PSKMLys – 8,69 %.
4. Gram-neigiamų *E. coli* BL21- bakterijų atžvilgiu didžiausiu aktyvumu pasižymi Vid5Lys. Mutantinis VpaE1MLys (L3W) bakterijų pasėlyje formuoja ryškesnę lizės lyginant su laukinio tipo baltymu.
5. Tirti rekombinantiniai endolizinai praranda gebėjimą lizuoti *Micrococcus lysodeikticus* inkubavus juos 60 °C 15 min.

VILNIAUS UNIVERSITETAS

GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Aurelija CICILIONYTĖ

Bakteriofagų endolizinų aktyvumo tyrimas

SANTRAUKA

Didėjant bakterijų atsparumui antibiotikams, svarbu ieškoti naujų ir efektyvių būdų juos pakeisti. Žinant šią problemą, šiuo darbu buvo siekiama nustatyti bakteriofagų endolizinų aktyvumą. Bioinformatinė analizė atskleidė, jog nagrinėjamų bakteriofagų VpaE1 ir PSKM endolizinai pasižymi muramidaziniu aktyvumu, o Vid5 – gliukozamidaziniu ir priklauso hidrolazių šeimai.

Siekiant įgyvendinti iškeltą tikslą, į plazmidinius raiškos vektorius klonuoti nagrinėjamų endolizinų genai ir išgryninti rekombinantiniai baltymai, atitinkamai C- arba N- galinėje dalyje sulieti su 6 arba 10 histidinų (His) inkaru. Nustatytas tinkamas rekombinantinių baltymų pH veikimo optimumas, identifikuojant lizinį aktyvumą prieš Gram-teigiamas *Micrococcus lysodeikticus* bakterijas. Norint patvirtinti lizinį aktyvumą, endolizinais paveiktos Gram-teigiamos *Geobacillus stearothermophilus* bakterijos. Nustatyta, jog po poveikio endolizinu gyvybingų kolonijas formuojančių vienetų išlieka 6-9 %. Pastebėta, jog baltymas, N-galinėje dalyje surištas su 10 histidinų, yra mažai aktyvus. Patikrinus rekombinantinių endolizinų poveikį Gram-neigiamoms *Escherichia coli* $BL21^{-}$ ląstelėms, nustatyta, jog endolizinai pasižymi mažu aktyvumu, o ryškiausią lizės zoną palieka Vid5 bakteriofago endolizinas. Siekiant padidinti endolizinų gebą prasiskverbti pro Gram-neigiamų bakterijų išorinę membraną, sukonstruotas mutantinis rekombinantinis endolizinas, kurio N- galinėje dalyje leucinas yra pakeistas triptofanu (L3W). Pastebėtas šio mutanto lizinis aktyvumas prieš Gram-neigiamas bakterijas buvo didesnis nei natyvaus baltymo. Vertinant tirtų endolizinų temperatūrinį stabilumą, nustatyta, jog visi rekombinantiniai baltymai po inkubacijos 60°C 15 min praranda gebėjimą lizuoti bakterijas.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Aurelija CICILIONYTĖ

Investigation of Bacteriophage Endolysins Activity

SUMMARY

Because of rapid growth of bacterial resistance to various antibiotics, it is necessary to discover alternatives to kill bacteria. Bacteriophages were considered as an opportunity for long time, but since bacteria also became resistant to them, attention turned to viral enzymes called endolysins.

Considering the upcoming threat, the aim of this study was to investigate a research on activity of viral endolysins. Three recombinant and one mutant endolysin with his affinity tag were purified from bacteriophages VpaE, Vid5 and PSKM during this examination. Measuring the pH optimum for enzyme activity, the lytic activity against Gram-positive *Micrococcus lysodeikticus* bacteria was identified. Endolytic activity against Gram-positive bacteria was confirmed using *Geobacillus stearothermophilus* bacteria, where only around 6-9 % of viable colony forming units was left after effect of endolysins. Lytic activity was also performed on Gram-negative *Escherichia coli* BL21^{-}. It showed a low activity against these bacteria and only endolysin of Vid5 bacteriophage showed a significant activity. Aiming to increase the endolytic activity against Gram-negative bacteria, a mutant recombinant endolysins of bacteriophage VpaE1 was constructed, which had a replaced amino acid leucine to tryptophan in the third position of N-terminus (L3W). Successfully, lytic activity of this mutant enzyme was identified higher than of a native enzyme. Estimating the thermostability of recombinant endolysins, it was established that recombinant enzymes are being inactivated at the 60 ºC after 15 min of incubation.

Padėka

Esu be galo dėkinga savo darbo vadovei dr. Aurelijai Zajančkauskaitei už kantrumą, mokymą, suteiktas žinias, laiką bei pasitikėjimą vykdant tyrimą ir rengiant darbą.

Esu dėkinga dr. Lidijai Truncaitei už nuoširdžią pagalbą ir patarimus.

Dėkoju laboratorijos doktorantams ir darbuotojams už palaikymą.

Ačiū prof. dr. Rolandui Meškiui už suteiktą galimybę atlikti darbą VU BchI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje bei visiems skyriaus darbuotojams už puikią darbo atmosferą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ackermann, H.-W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. Arch Virol *152*, 227–243.

2. Ackermann, H.-W. (2009). Phage Classification and Characterization. In Bacteriophages, M.R.J. Clokie, and A.M. Kropinski, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 127–140.

3. Adam G. and Delbruck M. (1968). Adam G, Delbruck M (1968) Reduction of dimensionality in biological diffusion processes. In: Rich A, Davidson N, editors. Structural chemistry and molecular biology: W. H. Freeman and Co. San Francisco. pp. 198–215.

4. Alcorlo, M., Martínez-Caballero, S., Molina, R., and Hermoso, J.A. (2017). Carbohydrate recognition and lysis by bacterial peptidoglycan hydrolases. Current Opinion in Structural Biology *44*, 87–100.

5. Anderson, T.F. (1949). The reactions of bacterial viruses with their host cells. The Botanical Review *15*, 464–505.

6. Antonova, N.P., Balabanyan, V.Yu., Tkachuk, A.P., Makarov, V.V., and Gushchin, V.A. (2018). PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF RECOMBINANT KPP10 PHAGE LYSINS AND THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST PSEUDOMONAS AERUGINOSA. BRSMU 21–27.

7. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. Science *315*, 1709–1712.

8. Bertozzi Silva, J., Storms, Z., and Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. FEMS Microbiology Letters *363*, fnw002.

9. Bidnenko, E., Ehrlich, D., and Chopin, M.C. (1995). Phage operon involved in sensitivity to the Lactococcus lactis abortive infection mechanism AbiD1. J. Bacteriol. *177*, 3824–3829.

10. Bidnenko, E., Ehrlich, S.D., and Chopin, M.C. (1998). Lactococcus lactis phage operon coding for an endonuclease homologous to RuvC. Mol. Microbiol. *28*, 823–834.

11. Bläsi, U., and Young, R. (1996). Two beginnings for a single purpose: the dual-start holins in the regulation of phage lysis. Mol. Microbiol. *21*, 675–682.

12. Bondy-Denomy, J., Pawluk, A., Maxwell, K.L., and Davidson, A.R. (2012). Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. Nature *493*, 429–432.

13. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry *72*, 248–254.

14. Braun, V., and Hantke, K. (1977). Bacterial Receptors for Phages and Colicins as Constituents of Specific Transport Systems. In Microbial Interactions, J.L. Reissig, ed. (Boston,

MA: Springer US), pp. 99–137.

15. Briers, Y., Volckaert, G., Cornelissen, A., Lagaert, S., Michiels, C.W., Hertveldt, K., and Lavigne, R. (2007). Muralytic activity and modular structure of the endolysins of Pseudomonas aeruginosa bacteriophages ?KZ and EL. Mol Microbiol *65*, 1334–1344.

16. Briers, Y., Walmagh, M., Van Puyenbroeck, V., Cornelissen, A., Cenens, W., Aertsen, A., Oliveira, H., Azeredo, J., Verween, G., Pirnay, J.-P., et al. (2014). Engineered Endolysin-Based "Artilysins" To Combat Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. MBio *5*, e01379-14.

17. Broeker, N.K., and Barbirz, S. (2017). Not a barrier but a key: How bacteriophages exploit host's O-antigen as an essential receptor to initiate infection. Mol. Microbiol. *105*, 353–357.

18. Brouns, S.J.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J.H., Snijders, A.P.L., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V., and van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. Science *321*, 960–964.

19. Bustamante, N., Rico-Lastres, P., García, E., García, P., and Menéndez, M. (2012). Thermal Stability of Cpl-7 Endolysin from the Streptococcus pneumoniae Bacteriophage Cp-7; Cell Wall-Targeting of Its CW_7 Motifs. PLoS ONE *7*, e46654.

20. Catalão, M.J., Gil, F., Moniz-Pereira, J., São-José, C., and Pimentel, M. (2013). Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way. FEMS Microbiology Reviews *37*, 554–571.

21. Chopin, M.-C., Chopin, A., and Bidnenko, E. (2005). Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. Current Opinion in Microbiology *8*, 473–479.

22. Criscuolo, E., Spadini, S., Lamanna, J., Ferro, M., and Burioni, R. (2017). Bacteriophages and Their Immunological Applications against Infectious Threats. Journal of Immunology Research *2017*, 1–13.

23. Daniel, A., Euler, C., Collin, M., Chahales, P., Gorelick, K.J., and Fischetti, V.A. (2010). Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. *54*, 1603–1612.

24. Delbrück, M. (1940). THE GROWTH OF BACTERIOPHAGE AND LYSIS OF THE HOST. J. Gen. Physiol. *23*, 643–660.

25. Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., and Barekzi, N. (2017). A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. Viruses *9*, 50.

26. Doulatov, S., Hodes, A., Dai, L., Mandhana, N., Liu, M., Deora, R., Simons, R.W., Zimmerly, S., and Miller, J.F. (2004). Tropism switching in Bordetella bacteriophage defines a family of diversity-generating retroelements. Nature *431*, 476.

27. Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., Maciejewska, B., Delattre, A.-S., and Lavigne, R. (2012). Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. Current Protein and Peptide Science *13*, 699–722.

28. Dufresne, K., and Paradis-Bleau, C. (2015). Biology and Assembly of the Bacterial Envelope. In Prokaryotic Systems Biology, N.J. Krogan, PhD, and M. Babu, PhD, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 41–76.

29. Fernandes, S., and São-José, C. (2018). Enzymes and Mechanisms Employed by Tailed Bacteriophages to Breach the Bacterial Cell Barriers. Viruses *10*, 396.

30. Filatova, L.Yu., Becker, S.C., Donovan, D.M., Gladilin, A.K., and Klyachko, N.L. (2010). LysK, the enzyme lysing Staphylococcus aureus cells: Specific kinetic features and approaches towards stabilization. Biochimie *92*, 507–513.

31. Fischetti, V.A., Nelson, D., and Schuch, R. (2006). Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? Nature Biotechnology *24*, 1508–1511.

32. Fokine, A., and Rossmann, M.G. (2014). Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. Bacteriophage *4*, e28281.

33. Frias, M.J., Melo-Cristino, J., and Ramirez, M. (2013). Export of the pneumococcal phage SV1 lysin requires choline-containing teichoic acids and is holin-independent: Export mechanism of pneumococcal phage lysins. Molecular Microbiology *87*, 430–445.

34. Gerstmans, H., Criel, B., and Briers, Y. (2018). Synthetic biology of modular endolysins. Biotechnology Advances *36*, 624–640.

35. Gosnell, W.W., Kroger, M., and Katz, F. (1975). Improvements on the Agar Plate Method to Determine Lysozyme. Journal of Milk and Food Technology *38*, 457–460.

36. Haddad Kashani, H., Fahimi, H., Dasteh Goli, Y., and Moniri, R. (2017). A Novel Chimeric Endolysin with Antibacterial Activity against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Front. Cell. Infect. Microbiol. *7*, 290.

37. Harada, L.K., Silva, E.C., Campos, W.F., Del Fiol, F.S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V.N., and Balcão, V.M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. Microbiological Research *212–213*, 38–58.

38. Hu, B., Margolin, W., Molineux, I.J., and Liu, J. (2013). The Bacteriophage T7 Virion Undergoes Extensive Structural Remodeling During Infection. Science *339*, 576–579.

39. Jado, I. (2003). Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant Streptococcus pneumoniae infection in a murine sepsis model. Journal of Antimicrobial Chemotherapy *52*, 967–973.

40. Labrie, S.J., Samson, J.E., and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. Nat Rev Microbiol *8*, 317–327.

41. Lavigne, R., Briers, Y., Hertveldt, K., Robben, J., and Volckaert, G. (2004). Identification and characterization of a highly thermostable bacteriophage lysozyme. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. *61*, 2753–2759.

42. Linden, S.B., Zhang, H., Heselpoth, R.D., Shen, Y., Schmelcher, M., Eichenseher, F., and Nelson, D.C. (2015). Biochemical and biophysical characterization of PlyGRCS, a bacteriophage endolysin active against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Applied Microbiology and Biotechnology *99*, 741–752.

43. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. *193*, 265–275.

44. Lukacik, P., Barnard, T.J., Keller, P.W., Chaturvedi, K.S., Seddiki, N., Fairman, J.W., Noinaj,

N., Kirby, T.L., Henderson, J.P., Steven, A.C., et al. (2012). Structural engineering of a phage lysin that targets gram-negative pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *109*, 9857–9862.

45. Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Alkhnbashi, O.S., Costa, F., Shah, S.A., Saunders, S.J., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Haft, D.H., et al. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. Nature Reviews Microbiology *13*, 722–736.

46. Mandel, M., and Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. *53*, 159–162.

47. Männistö, R.H., Grahn, A.M., Bamford, D.H., and Bamford, J.K.H. (2003). Transcription of bacteriophage PM2 involves phage-encoded regulators of heterologous origin. J. Bacteriol. *185*, 3278–3287.

48. Matthews, B.W., Nicholson, H., and Becktel, W.J. (1987). Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. Proceedings of the National Academy of Sciences *84*, 6663–6667.

49. Miller, E.S., Kutter, E., Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa, T., and Rüger, W. (2003). Bacteriophage T4 genome. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *67*, 86–156, table of contents.

50. Nakagawa, H., Arisaka, F., and Ishii, S. (1985). Isolation and characterization of the bacteriophage T4 tail-associated lysozyme. J. Virol. *54*, 460–466.

51. Navarre, W.W., Ton-That, H., Faull, K.F., and Schneewind, O. (1999). Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage phi11. Identification of a D-alanyl-glycine endopeptidase activity. J. Biol. Chem. *274*, 15847–15856.

52. Olsen, R.H., Siak, J.S., and Gray, R.H. (1974). Characteristics of PRD1, a plasmid-dependent broad host range DNA bacteriophage. J. Virol. *14*, 689–699.

53. Onodera, K. (2009). Molecular Biology and Biotechnology of Bacteriophage. In Nano/Micro Biotechnology, I. Endo, and T. Nagamune, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 17–43.

54. Pan, Y.-J., Lin, T.-L., Chen, C.-C., Tsai, Y.-T., Cheng, Y.-H., Chen, Y.-Y., Hsieh, P.-F., Lin, Y.-T., and Wang, J.-T. (2017). Klebsiella Phage ΦK64-1 Encodes Multiple Depolymerases for Multiple Host Capsular Types. J. Virol. *91*.

55. Panthel, K., Jechlinger, W., Matis, A., Rohde, M., Szostak, M., Lubitz, W., and Haas, R. (2003). Generation of Helicobacter pylori Ghosts by PhiX Protein E-Mediated Inactivation and Their Evaluation as Vaccine Candidates. Infection and Immunity *71*, 109–116.

56. Park, T., Struck, D.K., Dankenbring, C.A., and Young, R. (2007). The Pinholin of Lambdoid Phage 21: Control of Lysis by Membrane Depolarization. Journal of Bacteriology *189*, 9135–9139.

57. Percy, M.G., and Gründling, A. (2014). Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria. Annu. Rev. Microbiol. *68*, 81–100.

58. Plotka, M., Kaczorowska, A.-K., Stefanska, A., Morzywolek, A., Fridjonsson, O.H., Dunin-Horkawicz, S., Kozlowski, L., Hreggvidsson, G.O., Kristjansson, J.K., Dabrowski, S., et al. (2014). Novel Highly Thermostable Endolysin from Thermus scotoductus MAT2119

59. Bacteriophage Ph2119 with Amino Acid Sequence Similarity to Eukaryotic Peptidoglycan Recognition Proteins. Appl. Environ. Microbiol. *80*, 886–895.

60. Poranen, M.M., and Bamford, D.H. (2002). Common Principles in Viral Entry. Annual Review of Microbiology *56*, 521–538.

61. Rakhuba, D.V., Kolomiets, E.I., Dey, E.S., and Novik, G.I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. Pol. J. Microbiol. *59*, 145–155.

62. Raspaud, E., Forth, T., São-José, C., Tavares, P., and de Frutos, M. (2007). A Kinetic Analysis of DNA Ejection from Tailed Phages Revealing the Prerequisite Activation Energy. Biophysical Journal *93*, 3999–4005.

63. Rodríguez, L., Martínez, B., Zhou, Y., Rodríguez, A., Donovan, D.M., and García, P. (2011). Lytic activity of the virion-associated peptidoglycan hydrolase HydH5 of Staphylococcus aureus bacteriophage vB_SauS-phiIPLA88. BMC Microbiol *11*, 138.

64. Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Donovan, D.M., Rodríguez, A., and García, P. (2013). Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzybiotics. Critical Reviews in Microbiology *39*, 427–434.

65. Rostøl, J.T., and Marraffini, L. (2019). (Ph)ighting Phages: How Bacteria Resist Their Parasites. Cell Host & Microbe *25*, 184–194.

66. Roucourt, B., and Lavigne, R. (2009). The role of interactions between phage and bacterial proteins within the infected cell: a diverse and puzzling interactome. Environmental Microbiology *11*, 2789–2805.

67. Ruiz, N., Kahne, D., and Silhavy, T.J. (2006). Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. Nat Rev Microbiol *4*, 57–66.

68. Samson, J.E., Magadán, A.H., Sabri, M., and Moineau, S. (2013a). Revenge of the phages: defeating bacterial defences. Nature Reviews Microbiology *11*, 675–687.

69. Samson, J.E., Spinelli, S., Cambillau, C., and Moineau, S. (2013b). Structure and activity of AbiQ, a lactococcal endoribonuclease belonging to the type III toxin-antitoxin system: AbiQ, a type III toxin-antitoxin system. Molecular Microbiology *87*, 756–768.

70. São-José, C. (2018). Engineering of Phage-Derived Lytic Enzymes: Improving Their Potential as Antimicrobials. Antibiotics *7*, 29.

71. São-José, C., Parreira, R., Vieira, G., and Santos, M.A. (2000). The N-terminal region of the Oenococcus oeni bacteriophage fOg44 lysin behaves as a bona fide signal peptide in Escherichia coli and as a cis-inhibitory element, preventing lytic activity on oenococcal cells. J. Bacteriol. *182*, 5823–5831.

72. São-José, C., Santos, S., Nascimento, J., Brito-Madurro, A.G., Parreira, R., and Santos, M.A. (2004). Diversity in the lysis-integration region of oenophage genomes and evidence for multiple tRNA loci, as targets for prophage integration in Oenococcus oeni. Virology *325*, 82–95.

73. Sass, P., and Bierbaum, G. (2007). Lytic Activity of Recombinant Bacteriophage 11 and 12 Endolysins on Whole Cells and Biofilms of Staphylococcus aureus. Applied and Environmental Microbiology *73*, 347–352.

74. Schleifer, K.H., and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol Rev *36*, 407–477.

75. Schmelcher, M., and Loessner, M.J. (2016). Bacteriophage endolysins: applications for food safety. Current Opinion in Biotechnology *37*, 76–87.

76. Scholl, D., Adhya, S., and Merril, C. (2005). Escherichia coli K1's Capsule Is a Barrier to Bacteriophage T7. Applied and Environmental Microbiology *71*, 4872–4874.

77. Schuch, R., Nelson, D., and Fischetti, V.A. (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills Bacillus anthracis. Nature *418*, 884–889.

78. Schumann, P. (2011). Peptidoglycan Structure. In Methods in Microbiology, (Elsevier), pp. 101–129.

79. Seed, K.D., Lazinski, D.W., Calderwood, S.B., and Camilli, A. (2013). A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. Nature *494*, 489–491.

80. Shang, D., Zhang, Q., Dong, W., Liang, H., and Bi, X. (2016). The effects of LPS on the activity of Trp-containing antimicrobial peptides against Gram-negative bacteria and endotoxin neutralization. Acta Biomaterialia *33*, 153–165.

81. Šimoliūnas, E., Vilkaitytė, M., Kaliniene, L., Zajančkauskaitė, A., Kaupinis, A., Staniulis, J., Valius, M., Meškys, R., and Truncaitė, L. (2015). Incomplete LPS Core-Specific Felix01-LikeVirus vB_EcoM_VpaE1. Viruses *7*, 6163–6181.

82. Šimoliūnas, E., Šimoliūnienė, M., Kaliniene, L., Zajančkauskaitė, A., Skapas, M., Meškys, R., Kaupinis, A., Valius, M., and Truncaitė, L. (2018). Pantoea Bacteriophage vB_PagS_Vid5: A Low-Temperature Siphovirus That Harbors a Cluster of Genes Involved in the Biosynthesis of Archaeosine. Viruses *10*, 583.

83. Son, J.-S., Lee, S.-J., Jun, S.Y., Yoon, S.J., Kang, S.H., Paik, H.R., Kang, J.O., and Choi, Y.-J. (2010). Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae Staphylococcus aureus bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme. Appl Microbiol Biotechnol *86*, 1439–1449.

84. Storms, Z.J., and Sauvageau, D. (2015). Modeling tailed bacteriophage adsorption: Insight into mechanisms. Virology *485*, 355–362.

85. Summer, E.J., Berry, J., Tran, T.A.T., Niu, L., Struck, D.K., and Young, R. (2007). Rz/Rz1 Lysis Gene Equivalents in Phages of Gram-negative Hosts. Journal of Molecular Biology *373*, 1098–1112.

86. Vieille, C., and Zeikus, G.J. (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. Microbiology and Molecular Biology Reviews *65*, 1–43.

87. Vollmer, W. (2008). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. FEMS Microbiol Rev *32*, 287–306.

88. Walmagh, M., Briers, Y., Santos, S.B. dos, Azeredo, J., and Lavigne, R. (2012). Characterization of Modular Bacteriophage Endolysins from Myoviridae Phages OBP, 201φ2-1 and PVP-SE1. PLoS ONE *7*, e36991.

89. Wang, I.-N., Smith, D.L., and Young, R. (2000). Holins: The Protein Clocks of Bacteriophage Infections. Annu. Rev. Microbiol. *54*, 799–825.

90. White, R., Chiba, S., Pang, T., Dewey, J.S., Savva, C.G., Holzenburg, A., Pogliano, K., and Young, R. (2011). Holin triggering in real time. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 798–803.

91. Whitfield, C. (2006). Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Biochem. *75*, 39–68.

92. Xu, M., Struck, D.K., Deaton, J., Wang, I.-N., and Young, R. (2004). A signal-arrest-release sequence mediates export and control of the phage P1 endolysin. Proceedings of the National Academy of Sciences *101*, 6415–6420.

93. Yan, J., Mao, J., Mao, J., and Xie, J. (2014). Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications. BioDrugs *28*, 265–274.

94. Young, R. (2013). Phage lysis: do we have the hole story yet? Current Opinion in Microbiology *16*, 790–797.

95. Young, R. (2014). Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome. J Microbiol. *52*, 243–258.(2009). Bacteriophages (Totowa, NJ: Humana Press).