

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Botanikos ir genetikos katedra

Milda Šimėnaitė

Magistrinis darbas

**DNR metilinimo funkcijos panaudojimas baltymų tirpumo
įvertinimui ir tirpesnių baltymų variantų atrankai**

Darbas atliktas UAB „Fermentas“ Mokslinių tyrimų centre

Darbo vadovai:

J. Lubienė

dr. A. Lubys

Vilnius 2007

SANTRAUKA

Struktūrinės genomikos tyrimams reikalingi gausiai mikroorganizmuose sintetinami rekombinantiniai baltymai dažnai būna netirpūs. Tradiciniai tirpių ir teisingos struktūros baltymų gavimo metodai – sintezė žemoje temperatūroje, skirtingo stiprumo promotoriai, tirpumą didinantys priedai, netirpaus baltymo suliejimas su tirpiu baltymu ar paraleli tikslinio baltymo ir įvairių šaperonų sintezė ne visada padeda. Šios priemonės nepakeičia baltymo vidinio gebėjimo susiklostyti į tirpią ir stabilią struktūrą, ir net pavykus tokį baltymą ištirpinti pradiniuose sintezės ar gryninimo bandymuose jis gali vėl agreguotis. Galingas tirpesnių baltymų variantų kūrimo metodas yra jų evoliucija *in vitro*, kurios metu iš mutantinių baltymų kolekcijos tirpesni baltymų variantai atrankami pagal prie jų prijungto reporterinio baltymo funkciją. Baltymams būdinga didžiulė struktūros ir savybių įvairovė, todėl tokiems eksperimentams yra labai svarbu parinkti tinkamomis atrankai savybės pasižymintį reporterį. Kelių ar net keliolikos alternatyvių reporterių bei su jais susijusių atrankos sistemų lygiagretus panaudojimas baltymų evoliucijos eksperimentuose padidintų sėkmės tikimybę.

Šiame darbe buvo kuriama tirpesnių baltymų atrankos sistema, kaip reporterinius baltymus naudojanti DNR metiltransferazės. Realizuojant šią užduotį eksperimentiniam patikrinimui buvo pasirinktos penkios skirtingoms klasėms priklausančios DNR metiltransferazės. Įvertinus jų tirpumą bei veiklumą atitinkami genai per lanksčią jungtį buvo sujungti su netirpaus tikslinio baltymo genu. Patikrinus sulietų baltymų sintezės lygį, tirpumą ir gebėjimą metilinti DNR paaiškėjo, kad praktiškai visi sulieti baltymai buvo netirpūs, tačiau iš producentų ląstelių iškirta plazmidinė DNR buvo pilnai metilinta. Buvo padaryta prielaida, kad didelio metiltransferazių specifinio aktyvumo dėka minorinė tirpių sulietų baltymų frakcija pilnai metilina genominius taikinius, todėl būtina šį aktyvumą sumažinti. Tolesniems tyrimams buvo atrinktas gausiausiai po indukcijos sintetinamas sulietas baltymas, pasižymintis mažiausiu sulietos metiltransferazės aktyvumu. Atlikus šio metiltransferazės geno mutagenezę iš mutantų kolekcijos buvo atrinkti du mutantai su ženkliai sumažintu specifiniu aktyvumu, kuriuos sujungus per lanksčią jungtį su tiksliniu netirpiu baltymu gauti chimeriniai baltymai buvo netirpūs ir tik silpnai metilino DNR. Magistriniame darbe sukurta sistema gali būti panaudota tirpesnių tikslinio baltymo variantų atrankai.