

Santrauka

Saccharomyces cerevisiae mielės yra vienas plačiausiai rekombinantinių baltymų gamybai, todėl šio darbo metu buvo kuriamos mielių *S. cerevisiae* raiškos sistemos, skirtos sintetinti tioredoksino geną arba gliukozės dehidrogenazės geną sujungtą su Abeta peptidu. Atrinkus stabilius hibridinių baltymų producentus, jie buvo auginami įvairiose kultyvavimo terpėse, keičiant temperatūrą bei indukcijos laiką. Tokiu būdu parenkamos optimalios kultūrų auginimo sąlygos, užtikrinančios didžiausias gaminamo baltymo kiekius.

Šio darbo metu sukonstruoti mielių raiškos vektoriai, kuriuose hibridinių baltymų - tioredoksino sujungto su Abeta peptidu (Trx-ab) bei ir gliukozės dehidrogenazės sujungtos su Abeta peptidu (GDH-ab) - raiška yra reguliuojama galaktoze indukuojamu GAL-CYC1 promotoriumi. Atlikus sėkmingą *Saccharomyces cerevisiae* 21PMR mielių kamieno transformaciją rekombinantinėmis plazmidėmis, atrinkti optimalūs heterologinių baltymų gamintojai. Ištyrus sukonstruotas DNR plazmidės, nustatytas didelis (90-95%) auksotrofinių markerių stabilumas ir tik apie 50% Trx-ab arba GDH-ab genų išsilaikymas mielėse.

Sukonstruotos viduląstelinės ir ekstraląstelinės mielių ekspresijos sistemos, užtikrinančios tioredoksino sujungto su Abeta peptidu sintezę. Optimizuotos mielių auginimo sąlygos bei baltymų gryninimo procedūros ir nustatyta, kad didžiausias hibridinio darinio lygis stebimas viduląstelinio gamintojo citoplazminėje frakcijoje.

Ištirti gliukozės dehidrogenazės geno bei hibridinio darinio, turinčio papildomą Abeta peptido seką, raiškos ypatumai *S. cerevisiae* mielėse, naudojant konstitutyvų ADH1 ir galaktoze indukuojamą GAL-CYC1 promotorius. Nustatyta, kad optimaliausia bakterinės GDH ir sulieto GDH-ab darinio raiška mielėse pasiekama tik naudojant indukuojamą raiškos sistemą. Iš gautų duomenų matyti, kad transformantų kultūros dėl plazmidžių genetinio nestabilumo sukaupia mažesnius norimų baltymų kiekius.

Tikslinių baltymų raiška ir pirminis Trx-ab bei GDH-ab gryninimas buvo sėkmingai atliktas pasinaudojant mielių *S. cerevisiae* raiškos sistema. Optimizavus kultūrų auginimo sąlygas, pasiekta ~20-25 µg tioredoksino-Abeta bei GDH-Abeta gamyba iš 1g mielių biomasės.

Summary

The principal advantages of *S. cerevisiae* yeast to express recombinant proteins was used to study expression peculiarities of the fused bacterial thioredoxin or glucose dehydrogenase genes with Abeta peptide sequence. In the next step of this work we investigated the growth conditions of stably persisting yeast transformants in order to achieve a maximal production of the hybrid proteins.

In the present work yeast expression vectors bearing either thioredoxin-encoding gene fused with Abeta peptide (Trx-ab) or its mutant sequence or glucose dehydrogenase gene fused with Abeta (GDH-ab) under the control of galactose-inducible GAL-CYC1 promoter were constructed. After successful transformation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain 21PMR the eukaryotic products of the hybrid proteins were isolated. Analysis of stability of heterologous expression plasmids indicated 90-95% maintenance of auxotrophic markers and only 50% - that of Trx-ab or GDH-ab genes.

Intracellular and extracellular yeast expression system were designed to ensure synthesis of thioredoxin fused with Abeta peptide. Optimization of yeast cultivation conditions and purification procedures showed that the highest level of hybrid protein is observed in the cytoplasmic fraction of intracellular product.

Expression peculiarities of the glucose dehydrogenase gene and its hybrid, bearing an additional Abeta peptide sequence, controlled by constitutive ADH1 and galactose-inducible GAL-CYC1 promoters in yeast *S. cerevisiae* were investigated. It was found that the optimal expression level of bacterial GDH and GDH-ab is achieved only by the using of inducible expression system. The obtained data suggest, the plasmid genetic instability of yeast transformants leads to accumulation lower quantities of the desired protein.

Expression and primary purification of both Trx-ab and GDH-ab proteins is successfully performed using yeast *S. cerevisiae*. The yield from 1 g of yeast culture reached about 20-25 µg of the target proteins.