



**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

Viktorija JUKNEVIČIŪTĖ

Mikrobiologijos studijų programa

Magistro baigiamasis darbas

**Termofilinės bakterijos *Geobacillus lituanicus* N-3 hipotetinio kolageno tipo baltymo (GclB)
tyrimas**

Darbo vadovė:

Dr. Rūta Kananavičiūtė

Vilnius, 2024

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1 Kolageno tyrimų pradžia	7
1.2 Kolageno struktūra	7
1.3 Į kolageną panašių baltymų atradimas virusuose ir bakterijose	9
1.4 Bakterijų į kolagenus panašių baltymų funkcijos	10
1.5 Bakterijų į kolagenus panašių baltymų paplitimas	11
1.6 Bakterijų į kolagenus panašių baltymų aminorūgščių sudėtis	11
1.7 Prokariotinių į kolagenus panašių baltymų trigubos spiralės stabilizavimas	12
1.8 Bakterijų į kolageną panašių baltymų domenų struktūra ir organizacija	13
1.9 Į kolageną panašių baltymų kilmė	16
1.10 Bakterijų į kolageną panašių baltymų potransliacinės modifikacijos	16
1.11 Rekombinantiniai į kolageną panašūs baltymai ir jų gryninimas	17
1.12 Rekombinantinių bakterijų į kolageną panašių baltymų biotechnologinis panaudojimas	19
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI	20
2.1 Darbe naudotos medžiagos ir prietaisai	20
2.1.1 Darbe naudoti prietaisai	20
2.1.2 Darbe naudotos medžiagos (rinkiniai, antibiotikai, fermentai, cheminiai reagentai)	20
2.1.3 Mitybinės terpės	21
2.1.4 Darbe naudoti bakterijų kamienai ir vektoriai	21
2.1.5 Darbe naudoti pradmenys	21
2.2 Darbo metodai	22
2.2.1 <i>Geobacillus lituanicus</i> augimo kreivės sudarymas	22
2.2.2 <i>Geobacillus lituanicus</i> GclB geno raiškos tyrimai	23
2.2.3 Endosporų dažymas Šeferio – Fultono metodu	23
2.2.4 Genominės DNR skyrimas	23
2.2.5 Plazmidinės DNR skyrimas	23
2.2.6 RNR skyrimas	23
2.2.7 DNR kiekio nustatymas spektrofotometriškai	24
2.2.8 Plazmidžių restrikcija	24
2.2.9 Agarozės gelio elektroforezė	24
2.2.10 Polimerazės grandininė reakcija	24
2.2.11 Kolonijų PGR	25
2.2.12 DNR valymas iš agarozės gelio	25

2.2.13 Glikoziltransferazės geno klonavimas į pET-Duet-1 homologiniu klonavimo metodu ..	25
2.2.14 GclB geno klonavimas	26
2.2.15 Elektrokompentinių <i>Escherichia coli</i> DH5α ląstelių paruošimas	26
2.2.16 Rekombinantinės DNR perkėlimas į <i>Escherichia coli</i> elektrokompentines ląsteles elektrotransformacijos būdu.....	26
2.2.17 Rekombinantinio konstrukto sekoskaita ir sekoskaitos analizė.....	27
2.2.18 Genų raiška <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) kamiene.....	27
2.2.19 Baltymų elektroforezė.....	27
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	29
3.1 <i>Geobacillus lituanicus</i> rūšies identifikavimas	29
3.2 GclB geno raiškos nustatymas <i>Geobacillus lituanicus</i> N-3 kamiene.....	30
3.3 Glikoziltransferazės ir GclB genų klonavimas į pET-Duet-1 vektorių	32
3.4 Genų raiškos indukcija <i>E. coli</i> BL21 (DE3) kamiene.....	34
IŠVADOS	36
SANTRAUKA	37
SUMMARY	38
PADĖKA	39
LITERATŪROS SĄRAŠAS	40

SANTRUMPOS

Amp – ampicilinas;

APS – amonio persulfatas;

Aps/min – apsisukimai per minutę;

a. r. – aminorūgštis;

CL – kolageno tipo domenas (*angl.* Collagen-like domain);

CTD – C-galinis nekolageninis domenas (*angl.* C-terminal non-collagen domain);

DMSO – dimetilsulfoksidas;

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis;

EHEC – enterohemoraginis *Escherichia coli* kamienas;

EtBr – etidžio bromidas;

GalNAc – N-acetilgalaktozaminas (*angl.* N-Acetylchondrosamine);

His – histidinas;

Hyp – hidroksiprolinas;

IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas;

LB terpė – Luria-Bertani terpė;

MCS – multikloninė sritis (*angl.* multiple cloning site);

NCBI – nacionalinis biotechnologijos informacijos centras (*angl.* National Center for Biotechnology Information);

NB terpė – maistinių medžiagų sultinio terpė (*angl.* Nutrient broth);

NTD – N-galinis nekolageninis domenas (*angl.* N-terminal non-collagen domain);

OT – optinis tankis;

NDS – natrio dodecilsulfatas;

NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinė elektroforezė;

SOC terpė – optimali mitybinė terpė (*angl.* Super Optimal broth with Catabolite repression);

T_m – baltymo denatūracijos temperatūra;

TAE – Tris/Acto rūgštis/EDTA buferinis tirpalas;

TEMED – tetrametiletildiaminas;

Tris – 2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diolis;

TSB – mitybinė terpė (*angl.* Tryptic Soy Broth);

V – trimerizacijos domenai.

IVADAS

Kolagenas yra baltymas, aptinkamas visuose gyvūnuose – pradedant nuo pirmųjų daugialasčių gyvūnų (kempinių) ir baigiant žmonėmis. Struktūrinis bruožas būdingas visiems kolagenams – unikali trigubos spiralės struktūra, sudaryta iš trijų kairiojo poliprolino II tipo polipeptidinių grandinių, kurios yra susuktos į dešiniojo posūkio trigubą spiralę (Brodsky, Ramshaw, 1997). Polipeptidinei grandinei būdingas $(\text{Gly} - \text{X a.r} - \text{Y a.r})_n$ a.r pasikartojančios sekos, kur X a.r ir Y a.r pozicijas gyvūniniame kolagene dažnai užima prolinas ir hidroksiprolinas, atitinkamai (Brodsky, Persikov, 2005).

Hidroksiprolinas gaunamas po potransliacinės prolino modifikacijos, kurią atlieka prolil-4-hidroksilazė (P4H). Hyp liekana yra svarbi trigubos spiralės susiformavimui ir stabilizavimui (Bella *et al.*, 1994; Bella, 2016; Bretscher *et al.*, 2001; Perret *et al.*, 2001; Ramshaw, Werkmeister, 2017). Gyvūninės kilmės kolagenai plačiai naudojami biomedicinoje dėl jų biologinio suderinamumo, tačiau jų platesnį naudojimą stabdo mažas pagaminamų baltymų kiekis, rizika dėl galvijų platinamos spongiforminės encefalopatijos (*angl.* BSE), alerginių reakcijų žmonėms ir gamybos standartizacijos iššūkių (Wang *et al.*, 2021).

Per pastaruosius dvidešimt metų, bakterijose taip pat identifikuoti baltymai, turintys $(\text{Gly} - \text{X a.r} - \text{Y a.r})_n$ pasikartojimus (Yu *et al.*, 2014). Skirtingai nei gyvūnų kolagenuose, šiuose bakterijų baltymuose nėra hidroksiprolino, kuris, stabilizuoja trigubos spiralės struktūrą. Nepaisant to, kad kolagenas nėra hidroksilintas, tirtų bakterijų į kolagenus panašių baltymų trigubos spiralės struktūros pasižymi dideliu terminiu stabilumu (35 – 39 °C), artimu žinduolių kolagenų stabilumui (Brodsky, Ramshaw, 2017; Yu *et al.*, 2014). Tai rodo, kad bakterijose veikia alternatyvūs trigubos spiralės stabilizavimo būdai. Šių unikalių bakterijų į kolagenus panašių baltymų struktūros išaiškinimas yra svarbus biotechnologiniam pritaikymui, gaminant rekombinantinius į kolageną panašius bakterijų baltymus.

Gyvūnų kolagenų heterologinė sintezė yra sudėtinga, dėl jiems būtinų potransliacinių modifikacijų. Tuo tarpu bakterijų į kolagenus panašūs baltymai gali būti, palyginus, lengvai išgaunami dideliais kiekiais bakterinėse raiškos sistemose (Yu *et al.*, 2014). Žinoma, kad mezofilinių bakterijų į kolagenus panašių baltymų terminis stabilumas yra panašus žinduolių kolagenui (Yu *et al.*, 2014), tačiau termofilinės bakterijos, augdamos aukštesnėje temperatūroje, manoma, ekspresuoja termostablesnius baltymus, kurie galėtų būti naudojami gaminant rekombinantinius į kolageną panašius baltymus.

Ankstesnių darbų, VU GMC Prokariotų molekulinės mikrobiologijos ir taksonomijos laboratorijoje metu, nustatyta, kad termofilinių bakterijų *Geobacillus lituanicus* N-3 kamienas koduoja baltymą turintį kolagenams būdingą Gly – X a.r. – Y a.r. pasikartojantį motyvą (A. Drutelis, 2015, magistrinis darbas), pasižymintį dideliu panašumu į *Bacillus anthracis* BclB baltymą (K.

Grigaitytė, 2020, bakalauro darbas). Norint įrodyti, kad *G. lituanicus* GclB baltymas taip pat formuoja kolageninę spiralę, šis baltymas turi būti susintetinamas rekombinantiškai. Tačiau ankstesnių darbų metu naudojant skirtingas *E. coli* raiškos sistemas, šio baltymo heterologiškai susintetinti nepavyko (K. Grigaitytė, 2020, bakalauro darbas). Tuo tarpu pasitelkus mielių raiškos sistemą, šis baltymas gautas tik netirpioje formoje (I. Skaringaitė, 2021, magistro darbas)

Kadangi yra žinoma, kad *B. anthracis* BclB baltymas yra glikozilinamas (Thompson *et al.*, 2007), šiame darbe nuspręsta GclB geną ekspresuoti kartu su šalio jo išsidėstančiu genu, koduojančiu numanomą glikoziltransferazę.

Magistro darbo tikslas ir uždaviniai:

Tikslas: gauti rekombinantinį *Geobacillus lituanicus* N-3 kamieno į kolageną panašų GclB baltymą.

Uždaviniai:

1. Patikrinti *G. lituanicus* N-3 kamieną su šiam kamieniui identifikuoti skirtais pradmenimis;
2. Įvertinti GclB geno raišką *G. lituanicus* N-3 ląstelėse;
3. *E. coli* BL21(DE3) ląstelėse ekspresuoti *G. lituanicus* N-3 kamieno Gclb geną kartu su glikoziltransferazės genu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Kolageno tyrimų pradžia

Kolageno tyrinėjimai prasidėjo nustatant jo struktūrą 1954 metais (Ramachandran, Kartha, 1955). Nuo to laiko atlikti tyrimai padėjo geriau suprasti kolagenų struktūrinės savybės – kolagenams būdingą trigubą spiralinę struktūrą bei aminorūgščių sudėtį.

Kolagenas yra gausiausias žinduolių struktūrinis baltymas, sudarantis trečdalį suaugusio žinduolio sausos masės. Kolagenas atlieka svarbų vaidmenį ekstraląstelinio matrikso struktūros palaikymui ir signalų perdavimui ląstelėse. Gyvūnams ekstraląstelinis matriksas yra itin svarbus vystymuisi, audinių formos palaikymui (Brodsky, Ramshaw, 1997; Kielty *et al.*, 2002; Screen *et al.*, 2015). Dėl atliekamos funkcijos žinduoliuose, įskaitant žmones, kolagenas yra vienas geriausiai ištirtų baltymų (Shoulders, Raines, 2009). Gyvūniniame kolagene, trigubos spiralės kolageno molekulės gali susijungti į įvairias supermolekulinės struktūras, iš kurių susidaro skaidulos ir tinklai, aptinkami žinduolių audiniuose. Pagal supermolekulinę struktūrą ir junginius kolageną galima suskirstyti į skirtingas klases: fibriliniai kolagenai, inkarinės fibrilės, pluoštus formuojantys kolagenai, tinklą formuojantys kolagenai, su fibrilėmis susiję kolagenai su nutrūkusiomis trigubomis spiralėmis (FACIT), su membranomis susijęs kolagenas su nutrūkusiomis trigubomis spiralėmis (MACIT), multipleksiniai ir neklasifikuoti kolagenai (Ottani *et al.*, 2002; Kielty, Grant 2002; Birk, Peter, 2010; Ricard-Blum, 2011).

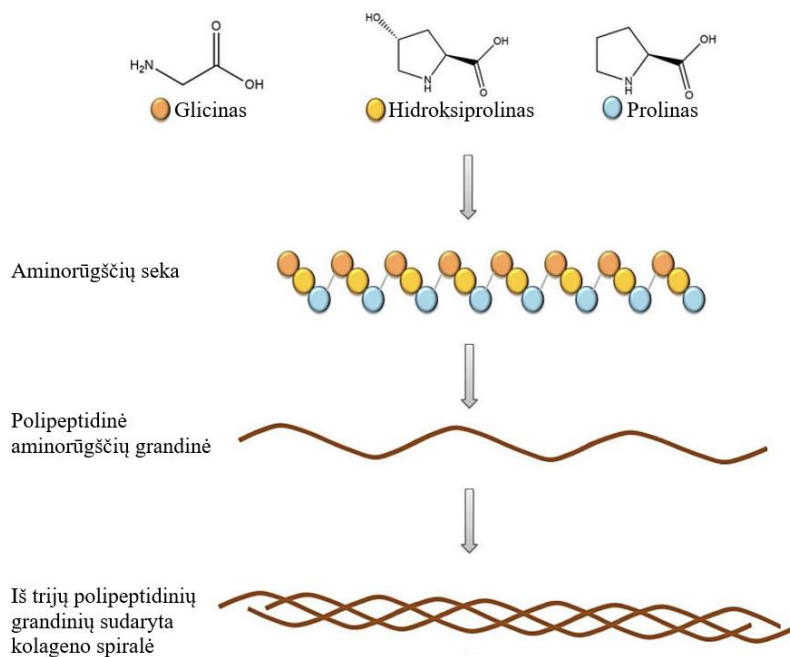
Didžiąją XX a. dalį buvo manoma, kad šie baltymai būdingi tik gyvūnams (Frantz *et al.*, 2010). Tačiau didėjantis nuskaitytų genomų ir genų sekų skaičius duomenų bazėse atskleidė, kad į kolagenus panašių koduojamų sekų motyvų yra virusuose (Bamford *et al.*, 1990) ir bakterijose (Lukomski *et al.*, 2000).

Triguba spiralė yra būdinga visų tipų kolagenams ir yra svarbiausia kolagenus apibūdinanti savybė (Persikov *et al.*, 2000). Lyginant bakterijų į kolageną panašius baltymus su žinduolių kolageno baltymais, reikšmingiausias bruožas yra trigubos spiralės Gly – X a.r – Y a.r. polipeptidiniai a.r. pasikartojimai. Kitas panašumas yra tai, kad žinduolių kolagenai yra atsparūs tripsinui. Bakterijų į kolageną panašių rekombinantinių baltymų, kurie sugebėjo suformuoti trigubą spiralę, tyrimai parodė, kad šie baltymai taip pat yra atsparūs tripsinui. Kalbant apie terminį stabilumą, bakterijų į kolageną panašūs baltymai pasižymi panašiu terminiu stabilumu žinduolių kolagenui: bakterijų į kolageną panašių baltymų T_m yra $\sim 35 - 39$ °C, o žinduolių kolagenų $T_m - 37$ °C. Taip pat, tiek žinduolių kolagenai, tiek bakterijų į kolagenus panašūs baltymai turi trimerizacijos domeną (Yu *et al.*, 2014).

1.2 Kolageno struktūra

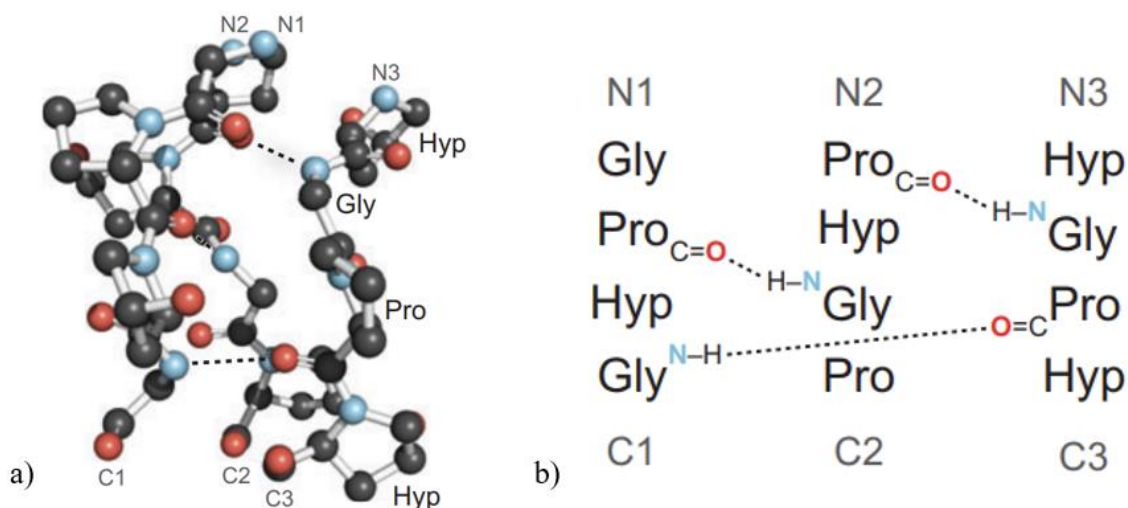
Kolageno molekulės gali būti sudarytos iš trijų vienodų arba iš dviejų ar trijų skirtingų polipeptidinių grandinių. Kiekviena polipeptidinė grandinė turi kairiojo poliprolino II tipo spiralės

struktūrą. Šios trys polipeptidinės grandinės kartu formuoja 1,5 nm skersmens dešiniojo posūkio spiralę. Kolagenams yra būdingas unikalus $(\text{Gly} - \text{X} - \text{a.r.} - \text{Y a.r.})_n$ polipeptidinis pasikartojimas, kur X a.r. – dažniausiai yra prolinas, o Y a.r. – hidroksiprolinas (1.1 pav.).



1.1 pav. Schematinė kolageno struktūros reprezentacija (Sobczak-Kupiec *et al.*, 2021)

Hidroksiprolinas yra būtinas eukariotų kolagenams, nes stabilizuoja trigubos spiralės formavimąsi (Picker *et al.*, 2022; Qiu *et al.*, 2021). Dėl glaudaus trijų polipeptidinių grandinių išsidėstymo triguboje spiralėje, kas trečia liekana, pasikartojančioje $(\text{Gly} - \text{X a.r.} - \text{Y a.r.})_n$ aminorūgščių sekoje, turi būti glicinas. Tuo tarpu X ir Y pozicijose esančios aminorūgščių liekanos išsidėsto trigubos spiralės polipeptidinės grandinės išorėje. Toks išsidėstymas, kai polipeptidinė grandinė pasisuka taip, kad glicinas liktų centrinėje trigubos spiralės ašies dalyje yra ypač svarbus, kadangi bet kokia didesnė, nei centre esanti glicino liekana, dėl sterinių kliūčių netilptų į trimerinę spiralę (Chen *et al.*, 2011). Be to, pakeičiant gliciną bet kuria kita a.r liekana, trigubos spiralės grandinė taptų mažiau stabili. X ir Y pozicijose gali būti įvairios aminorūgštys, tačiau norint, kad ši triguba spiralė būtų stabili, apie 20 % šiose pozicijose esančių aminorūgščių turi būti imino grupės rūgštys, kurios stabilizuoja polipeptidines grandines. Biosintezės metu prolino liekanos įterpiamos į X ir Y pozicijas, o po to vyksta potransliacinis Y pozicijose esančių prolinų hidroksilinimas, kurio metu susidaro hidroksiprolinas. Gly – Pro – Hyp aminorūgščių pasikartojimai yra labiausiai stabilizuojantys kolageno trigubą spiralę, taip pat, tai yra dažniausiai sutinkama aminorūgščių pasikartojimų seka kolagenuose. Trys polipeptidinės grandinės, sudarančios trigubą spiralę, taip pat yra sujungtos $\text{NH} \cdots \text{CO}$ vandenilniais ryšiais (1.2 pav.).



1.2 pav. Molekulinė kolageno trigubos spiralės struktūra. a) ir b) paveiksle matomos punktyrinės linijos atvaizduoja vandenilinius ryšius tarp skirtingų polipeptidinių grandinių NH...CO atomų kolageno trigubos spiralės molekulėje (Shoulders, Raines, 2009)

Didelės skiriamosios gebos kristalinės struktūros ir šiuolaikiniai biofizikiniai metodai leido išsamiai ištirti kolageno trigubų spiralių struktūrą ir stabilumą. Šiose kristalinėse struktūrose pastebėti vandeniliniai ryšiai yra labai svarbūs trigubos spiralės stabilumui, o jų nebuvimas gyvūniniame kolagene lemia įvairias patologines būkles (Shoulders, Raines, 2009).

1.3 Į kolageną panašių baltymų atradimas virusuose ir bakterijose

1990 m. buvo nustatyta, kad į kolageną panašių baltymų sekos yra koduojamos virusų genomuose, tarp kurių daugiausia bakteriofaguose (Bamford *et al.*, 1990; Rasmussen *et al.*, 2003). Kolagenai gali būti produkuojami taip pat kai kurių milžiniškų eukariotinės ląstelės infekuojančių virusų. Tokių virusų kolagenai yra modifikuojami po translacijos pasitelkiant ląstelės šeimininkės koduojamas hidroksilazes ir glikozilazes. Vienas iš tokių virusų yra mimivirusas (skersmuo 0,75 μm), kuris užkrečia amebas (Luther *et al.*, 2011; Yamada, 2011).

2000 m. įrodyta, kad į kolageną panašių baltymų yra ir bakterijose ir kad jie gali formuoti trigubos spiralės struktūras (Lukomski *et al.*, 2000). Anksčiau manyta, kad į kolageną panašiams baltymams būdinga triguba spiralė negali susidaryti be potransliacinės prolino modifikacijos į hidroksiproliną, t. y. potransliacinio mechanizmo būdingo eukariotams. 2000 m. Atliktuose tyrimuose nustatyta, kad gramteigiamos bakterijos *Streptococcus pyogenes* gamina į kolageną panašų baltymą – SclA (*angl.* Streptococcal collagen-like protein A) (Lukomski *et al.*, 2000). Tolimesni tyrimai parodė, kad *S. pyogenes* koduoja dar vieną kolageno tipo baltymą, SclB (Whatmore, 2001). Vėliau šie baltymai buvo pervadinti ir šiandien žinomi kaip Sc11 ir Sc12 (Humtsoe *et al.*, 2005). Naudojant žiedinio dichroizmo (*angl.* circular dichroism (CD)) spektroskopiją buvo patvirtinta, kad bakterijų į kolagenus panašūs Sc11 ir Sc12 baltymai formuoja trigubos spiralės struktūrą (Xu *et al.*, 2002) ir kad

šie Scl1 ir Scl2 yra ekspresuojami A grupės streptokokų ląstelių paviršiuje (Lukomski *et al.*, 2000; Lukomski *et al.*, 2001; Myllyharju, 2004).

Įrodyta, kad ir kitos bakterijų rūšys: *Bacillus anthracis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Legionella pneumophila* ir *Burkholderia* genties bakterijos gamina į kolageną panašius baltymus (Bachert *et al.*, 2015; Ellison *et al.*, 2020; Rasmussen *et al.*, 2003; Schnicker, Dey 2016; Yu *et al.*, 2014). Prie pastarųjų gretos prisideda tiek patogeninės, tiek nepatogeninės dirvožemio bakterijos (Yu *et al.*, 2014). Įdomu tai, kad kai kuriose patogeninėse bakterijose aptiktos į kolageną panašių baltymų sekos yra virusinės kilmės, t.y. genetinė medžiaga įgyta fagų infekcijos metu (Muniesa *et al.*, 2003; Muniesa *et al.*, 2004). Pavyzdžiui *E. coli* O157:H7 ir kitų EHEC kamienų genomuose esantys atviri skaitymo rėmeliai su į kolageną panašiomis sekomis automatiškai anotuojami kaip „hipotetiniai uodegos pluošto baltymai“. Šios į kolageną panašios sekos, atrodo, yra išskirtinis EHEC kamienų ir kelių bakteriofagų bruožas ir nebuvo aptiktos K-12 ar kituose nepatogeniniuose *E. coli* kamienuose. Daugelio patogeninių kamienų genomai yra 0,9 Mb didesni nei nepatogeninių kamienų, o papildoma genetinė medžiaga, atsirado dėl horizontalaus genų perdavimo (Ghosh *et al.*, 2012). Taigi šie, į kolageną panašūs baltymai, kaip manoma, dalyvauja fagų morfogenezeje profagų indukcijos metu. Todėl galima daryti prielaidą, kad į kolageną panašūs baltymai EHEC *E. coli* genomuose atsirado dėl bakteriofagų infekuojančių šias bakterijas (Bansal *et al.*, 2007; Bergholz *et al.*, 2007; Herold *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007).

Į kolageną panašūs bakterijų baltymai rasti ir tarp termofilinių bakterijų. Iš visų tirtų termofilinių *Bacillota* bakterijų, baltymai, turintys į kolageną panašią sritį buvo užkoduoti mažiau nei pusėje genomų. Keletas domenu, kurie turėjo į kolageną panašią sritį, buvo būdingi žinomiems gramteigiamų bakterijų endosporų baltymams. Kolageno tipo baltymai yra identifikuoti ir *Bacillus* genčiai giminingų termofilinių *Geobacillus* genties bakterijų genomuose. Publikuotame tyrime, buvo analizuojami 22 genomai priklausantys *Geobacillus* genčiai, iš kurių net devyni genomai turėjo į kolageną panašių baltymų sekas (Kananavičiūtė *et al.*, 2020). Žinoma, kad *Geobacillus* genties bakterijos auga esant 55 – 70 °C temperatūrai. Todėl šios genties bakterijos yra biotechnologiškai svarbios į kolageną panašių baltymų tyrimuose, dėl šių bakterijų aukštesnėje temperatūroje sintetinamų baltymų, kurie manoma, yra termostabilesni, palyginti su kitų bakterijų, kurios auga žemesnėje temperatūroje, sintetinamais baltymais (Hussein *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2023; Novik *et al.*, 2018).

1.4 Bakterijų į kolagenus panašių baltymų funkcijos

Į kolageną panašūs bakterijų baltymai gali atlikti labai skirtingas funkcijas. Kai kurios funkcijos yra ne kolageniniuose domenuose, o kitos priklauso nuo į kolageną panašioje srityje esančių motyvų. Pavyzdžiui, *S. pyogenes* M1 serotipo Scl1 ir Scl2 baltymai gali susipinti su sužeisto audinio kolagenu ir taip vykdyti invaziją ir prilipti prie sužeistos vietos, infekcijos proceso metu (Ellison *et*

al., 2020). Be to, Scl1 baltymas jungiasi su fibronektinu ir integriniais ($\alpha 2\beta 1$ ir $\alpha 11\beta 1$) ir tarpininkauja bakterijų prilipimui prie žaizdos mikroaplinkos, yra svarbus viduląstelinei invazijai ir imuninės sistemos apėjimui (Caswell *et al.*, 2008; Oliver-Kozup *et al.*, 2011; Oliver-Kozup *et al.*, 2013; Lukomski *et al.*, 2017). Nustatyta, kad *S. pneumoniae* PclA baltymas vaidina svarbų vaidmenį sukibimo su šeimininko ląstelėmis ir invazijos į jas procese (Paterson *et al.*, 2008). BclA1 iš *C. difficile* reikalingas gyvūnų kolonizacijai ir infekcijai (Pizarro-Guajardo *et al.*, 2016). Žinoma, kad *B. anthracis* BclA baltymas atlieka sporų egzosporiumo stabilizavimo vaidmenį, o dėl labai stabilaus C-galinio nekolageninio domeno jo lydymosi temperatūra siekia 95 °C (Boydston *et al.*, 2005). Į kolageną panašus baltymas, kuris yra ekspresuojamas *B. amyloliquefaciens*, dirvožemyje gyvenančios bakterijos, leidžia joms prilipti prie augalų šaknų, kur jos skatina augalų augimą (Zhao *et al.*, 2015). Taip pat nustatyta, kad du iš keturių į kolageną panašių *B. amyloliquefaciens* baltymų yra ląstelės žiuželiuose ir jie prisideda prie ląstelės mobilumo (Zhao *et al.*, 2016).

1.5 Bakterijų į kolagenus panašių baltymų paplitimas

Qiu *et al.*, (2021) tyrime buvo analizuojamas bakterijų į kolagenus panašių baltymų sekų paplitimas tarp duomenų bazėje esančių aminorūgščių sekų. Iš NCBI duomenų bazės buvo analizuojamos 60 789 a.r. sekos, kurios buvo anotuotos kaip į kolageną panašūs baltymai. Tarp šių sekų buvo 14 bakterijų tipų: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Bacillota*, *Fusobacteria*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* ir *Verrucomicrobia*. Tyrėjų atlikta bioinformacinė analizė atskleidė, kad ~ 98,9 % į kolageną panašių baltymų yra paplitę tarp *Bacillota*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ir *Bacteroides* tipams priklausančių bakterijų. *Bacillota* tipą sudarė didžioji dalis, net 68.1 %. Tarp *Bacillota* tipo, rasta 23 959 (39,4 %) į kolageną panašių a.r. sekų, kurios priklauso *Bacillus* genčiai. Panašus baltymų, turinčių į kolageną panašią sritį, paplitimas nustatytas *Bacillota* tipui priklausančių bakterijų genomuose tarp 165 ekstremofilinių bakterijų (Qiu *et al.*, 2021).

1.6 Bakterijų į kolagenus panašių baltymų aminorūgščių sudėtis

Literatūroje aprašyti bakteriniai kolagenai pasižymi a.r. įvairove X a.r. ir Y a.r. pozicijose, polipeptidinėje Gly – X a.r. – Y a.r. pasikartojimų sekoje. Bakterijų kolagenuose X a.r. pozicijoje dažniausiai pasitaikanti a.r. yra prolinas, panašiai kaip stuburinių gyvūnų kolagenuose, o Y a.r. pozicijoje vyrauja treoninas (Ghosh *et al.*, 2012; Rasmussen *et al.*, 2003). Visuose bakterijų kolageno domenuose pastebimas didelis Pro a.r. kiekis – daugiau kaip 20 % (Yu *et al.*, 2014). *Bacillota* tipui, kuriam priklauso *Bacillus* ir *Streptococcus*, į kolageną panašių baltymų srityse yra maždaug 16,42 % treonino, 10,09 % prolino, 9,17 % alanino ir 7,89 % glutamino a.r. liekanų (Qiu *et al.*, 2021). Kitų bakterijų tipų kolageninėse srityse yra didesnis alanino arba prolino a.r. procentas (Qiu *et al.*, 2021).

Daugiausiai, bakterijų į kolagenus panašiuose baltymuose randama polinių a.r. liekanų. Pavyzdžiui į kolageną panašioje *S. pyogenes* Scl baltymų srityje yra daug polinių arba įkrautų a.r.

liekanų X ir Y pozicijose (Mohs *et al.*, 2007). Vienas pagrindinių į kolagenus panašių bakterinių baltymų bruožų, kuris niekada nepasitaiko gyvūnų kolagenuose, yra dažnas pasikartojančių aminorūgščių sekų modelis, pavyzdžiui, GKDGKDGQNGKDGLP *S. pyogenes* Scl2 baltyme, (GPKGEP)_n *Methylobacterium* sp. 4 – 46 bakterijoje ir pasikartojanti (GPT)₅GDTGTT seka *B. anthracis* BclA baltyme (Yu *et al.*, 2014).

1.7 Prokariotinių į kolagenus panašių baltymų trigubos spiralės stabilizavimas

Prokariotai sukūrė skirtingas trigubos spiralės stabilizavimo molekulinės strategijas, kurias skiriasi ne tik nuo eukariotų, bet ir tarp skirtingų bakterijų (Boydston *et al.*, 2005; Han *et al.* 2006; Rasmussen *et al.*, 2003). Tinkamas trigubos spiralės sulankstymas yra būtinas kolageno funkcionalumui. Bakterijų į kolageną panašūs baltymai trigubos spiralės stabilizavimui naudoja hidratacijos sukeltus vandenilinių ryšių tinklus, elektrostazines sąveikas tarp šoninių grandinių ir specifinius stabilizuojančius polipeptidinius pasikartojimus (Mohs *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2010).

Teoriškai bakterijos galėtų naudoti Gly – Pro – Pro polipeptidinius pasikartojimus, kurie yra labai stabilizuojančios sekos (pvz., (Gly – Pro – Pro)₁₄ T_m yra 40 °C), tačiau Gly – Pro – Pro polipeptidai bakterijų kolageno tipo baltymuose randami retai, todėl gali būti, kad tokios sekos bakterijoms kelia toksiškumo problemų (Han *et al.*, 2006). Imino rūgščių neturinčios polipeptidų sekos su polinėmis a.r. liekanomis, pavyzdžiui, Gly – Gln – Asn, daug mažiau destabilizuoja Scl2 seką nei Pro – Hyp turtingoje aplinkoje. Kai ilgis viršija 40 polipeptidų sekų, Scl2 baltymas naudoja įvairias elektrostazines sąveikas, tarp grandinių esančius vandenilinius ryšius ir hidratacijos sąlygojamą vandenilinių ryšių tinklą kaip alternatyvą Hyp stabilizavimui gyvūnų kolagenuose (Mohs *et al.*, 2007). Toks stabilizavimo būdas galimas, nes Scl baltymas, turi polinių a.r. liekanų, kurios sąveikauja su vandens molekulėmis ir sukuria platų vandenilinių ryšių tinklą, atkartojantį hidrosiprolino vaidmenį eukariotų kolagene. Tokie tinklai vadinami hidratacijos tinklais ir jie stabilizuoja trigubą spiralę bei suteikia Scl baltymui aukštesnę terminio lydymosi temperatūrą ~ 36 °C (Mohs *et al.*, 2007).

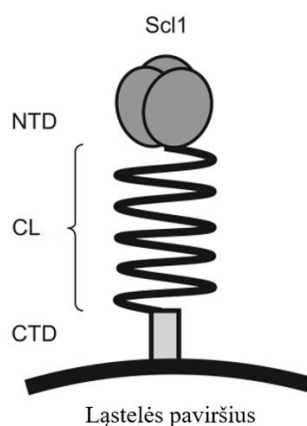
Rekombinantinis Scl2 baltymas ir jo modifikuoti variantai gali sudaryti trigubą spiralę, kurios stabilumas panašus į žinduolių kolagenų stabilumą (T_m ~ 37 °C). Kadangi Scl2 yra ląstelių paviršiaus baltymas, tikėtina, kad jo biologinei funkcijai atlikti nebūtina savaiminė asociacija į supermolekulinę struktūrą. Gali būti, kad Hyp yra reikalingas visiems į kolageną panašiams baltymams, kurie savime jungiasi į aukštesnės eilės struktūras, tačiau į tokias struktūras bakterijų kolagenai nesijungia (Mohs *et al.*, 2007).

Bakterijų kolageno tipo baltymai gali būti rekombinantiškai ekspresuojami *E. coli*. Galimybė gauti trigubos spiralės rekombinantinius baltymus, pasižyminčius tokiu pat stabilumu kaip žinduolių kolagenai, bet neturinčius Hyp, suteikia galimybę panaudoti išreikštus bakterijų kolageninius baltymus naujoms biomedžiagoms kurti (Chan *et al.*, 2012; Kaplan, Brodsky, 2014).

1.8 Bakterijų į kolageną panašių baltymų domenų struktūra ir organizacija

Skirtingai nuo daugumos žinduolių kolagenų, žinios apie bakterijų kolagenų struktūrą ir funkcijas yra kur kas menkesnės. Visų pirma, tik nedaugelis aprašytų bakterijų kolagenų buvo apibūdinti struktūriniu požiūriu. Didžioji dali duomenų gauti tiriant vos kelias rūšis, daugiausia *Bacillota* tipo atstovų. Patogeninėse bakterijų rūšyse aptikti į kolageną panašūs baltymai paprastai yra susiję su ląstelių paviršiumi ir todėl manoma, yra svarbūs bakterijų patogeniškumui – adhezijai prie šeimininko ląstelių, invazijai į šeimininko ląsteles bei imuninės sistemos vengimui (Bachert *et al.*, 2015; Rasmussen *et al.*, 2000).

Streptokokų į kolageną panašių baltymų aptinkama daugelyje patogeninių rūšių, įskaitant *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* ir *Streptococcus equi* (Karlström *et al.*, 2004; Paterson *et al.* 2008; Xu *et al.*, 2002). Visiems Scl baltymams būdingi skirtingi konservatyvūs bruožai ir panaši domenų organizacija. Šiuos baltymus sudaro N-galinis nekolageninis (NTD) domenas, centrinis į kolageną panašus (CL) domenas, su būdingais Gly – X a.r. – Y a.r. pasikartojimais ir su ląstelių sienelėmis susijęs C-galinis nekolageninis domenas (CTD), kuriame yra LPXTG inkaro motyvas (gramteigiamas inkaras), reikalingais ląstelės sienelės įtvirtinimui (1.3 pav.). Skirtingų Scl baltymų CL domenai yra sudaryti iš įvairių tipų Gly – X a.r. – Y a.r. polipeptidinių pasikartojimų. Pavyzdžiui, *S. pyogenes* M1 serotipo Scl1 baltyme yra 50 Gly – X a.r. – Y a.r. pasikartojimų, o M28 serotipo Scl2 baltyme yra 79 Gly – X a.r. – Y a.r. pasikartojimai (Lukomski *et al.*, 2017; Qiu *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2002).

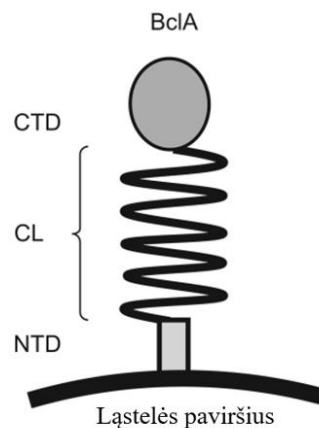


1.3 pav. Į kolageną panašaus baltymo Scl sudėtis. Subrendęs Scl1.1 baltymas iš *Streptococcus pyogenes* (UniProt: J7M2P0). Scl baltymas sudarytas iš N-galinio nekolageninio domeno (NTD), į kolageną panašios srities (CL) ir C-galinio nekolageninio domeno (CTD) (Qiu *et al.*, 2021)

Manoma, kad NTD domenas yra svarbus veiksmingam trigubos spiralės surinkimui. Be to, priklausomai nuo serotipų, Scl1 NTD domenas pasižymėjo specifiškumu jungiantis su įvairiais šeimininkų baltymais, pavyzdžiui, plazmos lipoproteinais LDL/HDL (LDL – mažo tankio

lipoproteinai; HDL – didelio tankio lipoproteinai), komplemento H faktoriumi (CFH), su H faktoriumi susijusiu 1 baltymu (CFHR1) arba ekstraląstelinio matrikso komponentais – fibronektinu ir lamininu (Xu *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2014). Stiebų konformaciją sudarantys Sc11 CL domenai gali tiesiogiai jungtis prie žmogaus kolageno receptorių, integrinų $\alpha 2\beta 1$ ir $\alpha 11\beta 1$, esančių šeimininko ląstelių paviršiuje, taip palengvindami *S. pyogenes* internalizaciją į žmogaus ląsteles ir pakartotinį išėjimą iš šeimininko ląstelių į ekstraląstelinę aplinką (Caswell *et al.*, 2007).

Bacillus genties bakterijose nustatyta didesnė į kolageną panašių baltymų įvairovė (Kailas *et al.*, Leski *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2021). Jie vadinami Bcl baltymais su atitinkama raide pabaigoje, pavyzdžiui, BclA, BclB (Parenteau-Bareil *et al.*, 2010; Sylvestre *et al.*, 2003). Bcl baltymus sudaro N-galinis nekolageninis domenas, į kolageną panaši sritis (CL), kurią sudaro nuo 27 iki 1158 a.r liekanų, ir galiausiai C-galinis nekolageninis domenas. Juodligę sukeliančios *B. anthracis* sporų paviršiuje yra BclA baltymas, turintis N-galinį nekolageninį domeną (NTD) ir C-galinį nekolageninį domeną (CTD), kuriuos skiria ištempta į kolageną panaši centrinė sritis (CL) (1.4 pav.) (Boydston *et al.*, 2005).

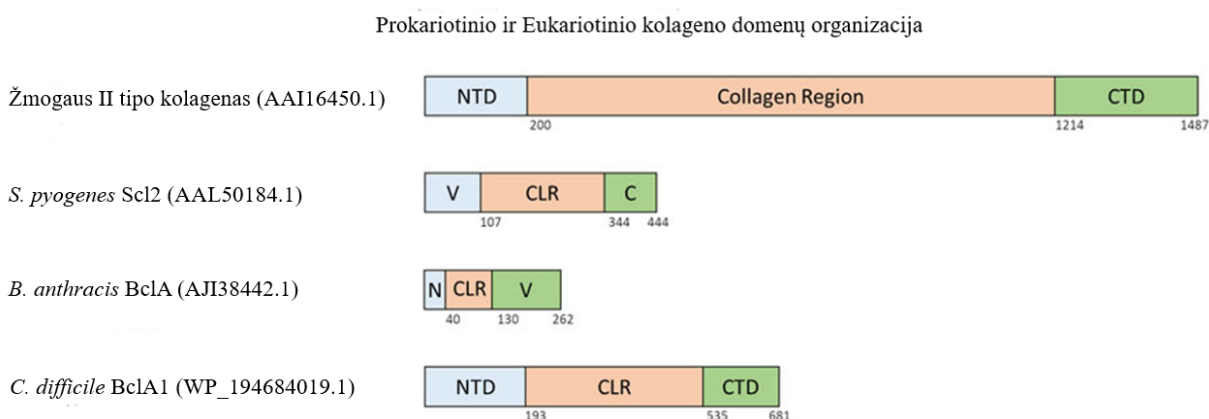


1.4 pav. Į kolageną panašaus baltymo BclA struktūra. BclA baltymas iš *Bacillus anthracis* (UniProt: Q81JD7). BclA baltymą sudaro trys domenai: N-galinis nekolageninis domenas (NTD), susijęs su baltymo nukreipimu ir įtvirtinimu egzosporiume; CL – į kolageną panaši sritis; C-galinis nekolageninis domenas (CTD), kuris lemia trimerizaciją ir sudaro BclA filamentinius galus egzosporiume (Qiu *et al.*, 2021)

B. anthracis bakterijų į kolageną panašus baltymas yra pagrindinis endosporų paviršiaus baltymas ir randamas visuose *Bacillus cereus* grupės nariuose. Antrasis į kolageną panašus baltymas, pavadintas BclB, buvo identifikuotas kaip *B. anthracis* egzosporiomo komponentas (Leski *et al.*, 2009). Didelė dalis rūšių, įskaitant *B. cereus* grupės rūšis ir *Bacillus megaterium* turi struktūrą, vadinamą egzosporiomu (McKenney *et al.*, 2010; McKenney *et al.*, 2013; Steichen *et al.*, 2003).

Egzosporiumą nuo apvalkalo nesunku atskirti aiškiu tarpu, vadinamu tarpfluoksniumi, o egzosporiumo struktūra taip pat skiriasi tarp skirtingų rūšių (Henriques *et al.*, 2007). Egzosporiumas leidžia gramteigiamiesiems patogenams tiesiogiai sąveikauti su aplinka, ypač su šeimininko imuninės sistemos ląstelėmis (Ball *et al.*, 2008; Fazzini *et al.*, 2010; Manetsberger, 2015; Stewart, 2015).

Be BclA ir BclB, *B. cereus* grupės kamienuose buvo identifikuoti keli kiti į kolageną panašūs baltymai, įskaitant BclC, BclD ir BclE. Tačiau įrodyta, kad tik BclA ir BclB integruojasi į egzosporiumą. Dėl BclA į kolageną panašios srities (CLR) ilgio skiriasi egzosporiumo gijų ilgis (Leski *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2008). *C. difficile* aptinkami kolageno tipo baltymai, kurių domenų sudėtis ir išsidėstymas yra panašus į *Bacillus* genties bakterijų baltymų (Leski *et al.*, 2009; Permpoonpattana *et al.*, 2011; Pizarro-Guajardo *et al.*, 2014). Yra keli skirtingi į prokariotų kolageną panašių baltymų domenų organizavimo formatai (1.5 pav.).



1.5 pav. Įvairių eukariotinių ir prokariotinių kolagenų domenų organizacija. Visi skaičiai skliausteliuose po rūšies pavadinimo ir baltymo pavadinimo yra baltymo prisijungimo numeris, nurodytas NCBI baltymų duomenų bazėje. Po domenais esantys skaičiai nurodo paskutinę to domeno a.r. liekaną. Toliau pateiktos santrumpos: N-galinis nekolageninis domenas (NTD), C-galinis nekolageninis domenas (CTD), trimerizacijos domenas (V), C-galinis nekolageninis domenas (C) ir inkaras prie ląstelės membranos, N-galinis nekolageninis domenas (N) ir inkaras prie ląstelės membranos, į kolageną panaši sritis (CLR) (Picker *et al.*, 2022)

Į kolageną panašūs prokariotų baltymai be kolageninių pasikartojimų domenų savo sudėtyje gali turėti skirtingomis savybėmis (funkcijomis) pasižyminčius juos supančius domenus. Pavyzdžiui, į kolageną panašūs baltymai Bocl3 ir Bocl8 iš *Burkholderia* bakterijų turi Talin-1 domeną, skirtą prisijungimui prie integrinų (Bachert *et al.*, 2015; Grund *et al.*, 2020). *S. pneumoniae* baltymas PclA turi į kolageną panašią sritį, kurioje taip pat yra nekolageninis domenas bei didelis C-galinis nekolageninis domenas, kuriame yra LPXTG motyvas (Paterson *et al.*, 2008).

1.9 Į kolageną panašių baltymų kilmė

Yra iškeltos dvi hipotezės apie į kolageną panašių sekų kilmę prokariotuose: manoma, kad kolageninės sekos galėjo būti horizontaliai perkeltos iš eukariotų į bakterijas (Rasmussen *et al.*, 2003; Koonin *et al.*, 2001) arba į kolageną panašūs pasikartojimai bakterijose galėjo atsirasti *de novo* būdu dėl spontaninių mutacijų ar paprastų pasikartojančių sekų duplikacijos (Lukomski *et al.*, 2017; McElroy *et al.*, 2011). Virusų ar bakteriofagų tarpininkaujamas lateralinis genų perdavimas galėjo dar labiau paskatinti kolageninių sekų plitimą tarp bakterijų, todėl Gly – X a.r. – Y a.r. pasikartojimai bakterijų genomuose pasiskirstė netolygiai (Ghosh *et al.*, 2012; Singh, Tripathi, 2020).

1.10 Bakterijų į kolageną panašių baltymų potransliacinės modifikacijos

Mokslininkai, siekia geriau suprasti prokariotinių į kolageną panašių baltymų struktūrą ir kaip šie baltymai yra stabilizuojami be hindroksiprolino (Meskauskas *et al.*, 2008). Sylvestre *et al.*, (2002) parengtame tyrime, pirmą kartą buvo išskirtas ir apibūdintas *B. anthracis* sporų egzosporiumo struktūrinis baltymas BclA. BclA, yra glikozilintas ir turi į kolageną panašų regioną. Kadangi sporuliuojančiose ląstelėse BclA aptikta tik subrendusi glikozilinta forma, tikėtina, kad BclA sintezė ir glikozilinimas yra glaudžiai susiję (Sylvestre *et al.*, 2002). Fermentai, atsakingi už BclA glikozilinimą, yra motininės ląstelės kompartimente. Glikoproteinai, esantys išoriniame *B. anthracis* sporų paviršiuje sąveikauja su šeimininko ląstelėmis (Sylvestre *et al.*, 2002). Žinoma, kad glikoproteinas BclA sudaro išorinį *B. anthracis* sporų paviršių, kuris tiesiogiai sąveikauja su dirvožemio aplinka ir žinduolių šeimininkų gynybinėmis sistemomis. Tikėtina, kad šios sąveikos yra svarbios sporų išlikimui ir patogenezei. Daubenspeck *et al.*, (2004) tyrime nustatyti du BclA angliavandenių komponentai: 715 Da tetrasacharidas ir 324 Da disacharidas. Su BclA susiję oligosacharidai sudaro didžiąją dalį egzosporiumo angliavandenių, ir jie, matyt, nėra susiję su kitais sporų baltymais. Taip pat, Daubenspeck *et al.*, (2004) tyrime išsiaiškinta, kad prie BclA yra prisijungęs N-acetilgalaktozaminas (GalNAc), nors šis cukrus nėra tetrasacharido ar disacharido sudedamoji dalis. Galėtų būti, kad GalNAc yra BclA ir dviejų oligosacharidų jungiamoji grandis. Nustatyta, kad daugybė glikoziltransferazių yra išreiškiamos IV sporuliacijos fazėje, kai ląstelei trūkstant maistinių medžiagų sintetinamas egzosporiumas (Daubenspeck *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004).

Nors bakterijų baltymų glikozilinimas yra retas, palyginti su eukariotinėmis sistemomis, tačiau bakterijose šiai modifikacijai priskiriamos kelios svarbios funkcijos. Tai baltymų konformacijos ir stabilumo palaikymas, apsauga nuo proteolitinio aktyvumo, paviršiaus atpažinimas ir ląstelių adhezija (Moens, Vanderleyden, 1997). Glikoproteinus sintetina svarbūs patogenai, įskaitant *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Streptococcus* ir *Campylobacter* gentis (Dobos *et al.*, 1996; Stimson *et al.*, 1995; Szymanski *et al.*, 1999). Pavyzdžiui *B. anthracis* BclA baltymas yra glikozilinamas C-galiniame nekolageniniame domene, todėl manoma, kad glikozilo dalys gali

apsaugoti nuo proteolitinio aktyvumo maskuodamos pirminius aminorūgščių komponentus (Maes *et al.*, 2016).

1.11 Rekombinantiniai į kolageną panašūs baltymai ir jų gryninimas

Didėjanti rekombinantinių baltymų paklausa biomedicininiam tyrimams, terapijai, diagnostikai ir vakcinų kūrimui paskatino tobulinti baltymų ekspresijos ir gryninimo technologijas. Žmogaus kolageno sekoje yra daugiau kaip 40 prisijungimo vietų, kurios sąveikauja su kitomis biologiškai funkcionaliomis molekulėmis, įskaitant ląstelių receptorių, kitus ekstraląstelinio matrikso baltymus ir kolagenazes (Kadler, 1994). Ištyrus rekombinantinį baltymą Scl2 paaiškėjo, kad šiame bakterijų į kolageną panašiam baltyme nėra jokių žinomų biologiškai aktyvių vietų, todėl jis yra tinkamas žmogaus kolageno ligandų prisijungimo vietoms įterpti (Caswell *et al.*, 2008). Į Scl2 kolageno domeną buvo įterptos įvairios žmogaus kolageno trumposios aminorūgščių sekos (2 – 6 tripletų) su nustatytomis biologiškai aktyviomis vietomis, įskaitant integrino $\alpha 2\beta 1$ (Seo *et al.*, 2010), fibronektino (An *et al.*, 2014), heparino (Peng *et al.*, 2014) surišimo vietas. Įterptos sekos suteikė Scl2 baltymui biologinį aktyvumą, pagrįstą *in vitro* ląstelių kultūrų tyrimais. Scl2 seka akivaizdžiai sulanksto trumpą žmogaus kolageno intarpą į trigubą spiralę, o teisingai sulankstyta žmogaus kolageno seka chimeriniam baltymui suteikia atitinkamą biologinę funkciją.

Geriausiai struktūriškai apibūdinti streptokokų kolagenai yra *S. pyogenes* Scl1 ir Scl2. Šie baltymai, išreikšti kaip rekombinantiniai (rScl) polipeptidai, sudarantys stabilias trigubos spiralės struktūras (Mohs *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2002). Nokolageninė V sritis sudaro trimerizacijos domeną, kuris padidina tinkamą kolageno surinkimą, kad dėl pasikartojančios struktūros būtų išvengta neteisingo trigubos spiralės sulankstymo. Tačiau Scl V sritis nėra būtina trigubos spiralės formavimuisi *in vivo*, nes Scl1 CL sritis gali būti išreikšta *E. coli* be V srities kaip rekombinantinis baltymas sulankstytos trigubos spiralės būsenos; vis dėlto, šis rScl-CL konstruktas negalėjo vėl susilankstyti po terminio denatūravimo *in vitro* (Xu *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2010). Nors kolageno trigubos spiralės molekulės susilankstymas, palyginti su globulinių baltymų susilankstymu, atrodo paprastesnis, dėl daugelio veiksnių, trigubos spiralės teisingas susilankstymas yra sudėtingas, daugiapakopis ir lėtas procesas, kuriam skatinti reikia ir nekolageninės srities.

Kitame tyrime heterologinė V-CL Scl2 baltymo raiška atlikta *E. coli* bakterijoje, klonuojant geną, koduojantį šį baltymą į pColdIII vektorius (Peng *et al.*, 2012). Įrodyta, kad pCold vektoriai yra labai naudingi įvairių rūšių bakteriniams kolagenams išreikšti (Xu *et al.*, 2010). Tačiau gali būti, kad naudojant kitus vektorius būtų galima gauti geresnius rezultatus, nei pastebėta naudojant pCold sistemą. Kultivuojant *E. coli* su pCold vektoriuje ekspresuojamu į kolageną panašiu baltymu, gaunama maža rekombinantinio produkto išeiga – < 1 g/l. Didesnę išeigą – apie 1 g/l galima gauti, kai ląstelių kultūra iš kolbos yra perkeliama į bioreaktorių. Naudojant didelio ląstelių tankio partijų (*angl.* high cell density fed-batch) procesą ir tinkamai paruoštą mitybinę terpę, galima gauti apie 10

g/l didesnę išeigą (Peng *et al.*, 2012). Naudojant šią didelio ląstelių tankio strategiją ir pailginus gamybos trukmę iki 24 val., gaunama išeiga, kuri siekia iki 19 g/l. Tačiau, didesnę fermentacijos išeigą taip pat reikia suderinti su gryninimo protokolu. Nors 6× His inkarą turinčių baltymų gryninimo protokolas yra veiksmingas laboratoriniam gryninimui (Peng *et al.*, 2010; Yoshizumi *et al.*, 2009), kartu su kitais metodais, pavyzdžiui, gelio pralaidumo chromatografija, jis netinkamas didelio masto komerciniams preparatams.

Naujesniuose tyrimuose, rekombinantiniai Scl baltymų konstruktai ekspresuojami *E. coli* periplazmoje, ekstrahuojami ir gryninami afinitine chromatografija švelniomis, beveik fiziologinėmis sąlygomis. Sukurti rekombinantiniai Scl baltymai, rScls, buvo ekspresuojami *E. coli* bakterijoje dideliais kiekiais keliose laboratorijose (Cosgriff-Hernandez *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2014; Yoshizumi *et al.*, 2011). Rekombinantinių Scl baltymų produktų raiška ir gryninimas atliekamas naudojant Strep-tag II sistemą, skirtą scl genams, klonuotiems į pASK-IBA2 vektorių (IBA Lifesciences) (Maier *et al.*, 1998). Šioje sistemoje rScl koduojanti seka sujungiama su OmpA signaliniu peptidu, todėl rekombinantinis baltymas kaupiasi *E. coli* periplazmoje (naudojamas BL21 kamienas, kuris neturi Lon proteazės); be periplazminės frakcijos, nemažai rScl baltymų galima išgauti ir iš kultūros supernatanto. rScl konstruktai taip pat gali būti gaminami viduląstelinu būdu, jei scl genas buvo klonuotas pASK-IBA3 vektoriuje. Išskirtiems į kolageną panašiams baltymams iš supernatanto frakcijos, gryninti naudojama giminingumo chromatografija naudojant Strep-Tactin® sefarozės kolonėlę. Galutiniam baltymų gryninimui atliekama dializė (Lukomski, McNitt, 2020).

Siekiant patikrinti ar išgrynintas baltymas formuoja kolagenams būdingą trigubą spiralę yra atliekama žiedinio dichroizmo spektroskopija (*angl.* Circular dichroism (CD)) (Greenfield *et al.*, 2006). Be CD spektroskopijos, rScl baltymai charakterizuojami elektroninės mikroskopijos būdu, naudojant sukamuojų šešėliu padengtus baltymų mėginius. Rotacinis šešėliavimas yra metodas, kuriuo parodoma baltymų domenų organizacija (Lukomski, McNitt, 2020).

Šiame darbe buvo pasirinkta klonuoti tikslinį geną šalia C-galo prijungus 6× histidino inkarą. Tokių rekombinantinių baltymų, turinčių 6× histidino inkarą, gryninimas gali būti atliekamas naudojant imobilizuotų metalų jonų giminingumo chromatografijos metodą (*angl.* Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)). 6× histidino inkaras ypač tinka gryninti baltymams, kurie dažnai kaupiasi kaip netirpūs agregatai (inkliuziniai kūneliai) citoplazmoje, kai yra perteklinai ekspresuojami *E. coli*, ir kuriuos reikia tirpinti ir gryninti denatūravimo sąlygomis. Dėl santykinai mažo dydžio ir krūvio bei mažo antigeniškumo, 6× His inkaras retai daro poveikį tikslinių baltymų struktūrai ir funkcijai. Todėl 6× His inkarą iš sintezės baltymų ne visada būtina pašalinti, kai šie baltymai naudojami praktiniam pritaikymui, pavyzdžiui kuriant rekombinantinių baltymų vakcinas ar atliekant imunofermentinius tyrimus bei baltymų charakterizavimą ir struktūros nustatymą (Dan *et al.*, 2009).

1.12 Rekombinantinių bakterijų į kolageną panašių baltymų biotechnologinis panaudojimas

Rekombinantiniai į kolageną panašūs baltymai galėtų būti vertingi biomedicinos ir regeneracinės medicinos srityse (Werkmeister, Ramshaw, 2012). Iki šiol dauguma kolageno produktų, naudojamų biomedžiagoms ar biomedicininiais prietaisams gaminti, yra išgaunami iš gyvūninių šaltinių. Tačiau gyvūninių kolagenų naudojimas yra rizikingas, dėl užteršimo patogenais ar prionais bei galimybe sukelti žmonėms alergiją. Kitos problemos susijusios su gyvūniniais kolagenais yra gamybos standartizacijos trūkumas išgaunant šiuos kolagenus ir negalėjimas lengvai modifikuoti gyvūninių kolagenų sekų, kad būtų pasiekti įvairūs biologiniai tikslai. Lyginant su kolagenais, išgaunamais iš gyvūnų audinių, rekombinantiniai bakterijų kolagenai yra labai švarūs, neplatinantys ligų, yra vienodi tarp atskirų gaminamų partijų bei juos galima lengvai modifikuoti ir gaminti dideliais kiekiais (Werkmeister ir Ramshaw, 2012).

Vienas iš panaudojimų, bakterijų į kolageną panašių baltymų yra hidrogeliai. Hidrogeliai yra labai svarbios biologinės medžiagos, kurioms dėl didelio vandens kiekio ir galimo biomedicininio pritaikymo skiriama vis daugiau dėmesio. Hidrogelis yra polimerų tinklas, sujungtas įvairių tipų cheminiais junginiais – tai dirbtinai sukurta hidrofilinė (vandenį pritraukianti) medžiaga. Todėl audinių inžinerijoje, pavyzdžiui, kaulinio audinio, kremzlinio audinio, kraujagyslių sistemos ir ragenos stromos regeneracijai, naudojami hidrogeliai. Naudojant žinduolių kolageną, anksčiau išvardintos rizikos lieka didele problema, todėl daug dėmesio skiriama rekombinantinių bakterijų į kolageną panašių baltymų, tokių kaip Sc12 naudojimas, kuriuos galima lengvai modifikuoti ir išgryninti, gamybai. Šie į kolageną panašūs baltymai, palyginti su tradiciniais kolageno hidrogeliais, turi keletą privalumų hidrogeliams gaminti. Tai didelis grynumas ir geras biologinis suderinamumas, biologinis skaidumas ir neužterštumas gyvūninės kilmės ligomis (Buwalda *et al.*, 2014; Łabowska *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022).

Tikėtina, kad išgautas galvijų kolagenas ir toliau išliks pagrindiniu biomedžiagų konstravimo elementu dėl savo nedidelės kainos, tačiau standartizacijos iššūkiai ir susirūpinimas dėl biologinio užterštumo, taip pat noras keisti kolageno seką ir funkciją skatins nuolatinį susidomėjimą moksliniais tyrimais ir rekombinantinių kolagenų taikymu. Nors tyrimuose daugiausia dėmesio skirta Sc12 baltymui, šį metodą galima taikyti ir kitiems į kolageną panašioms bakterijų, kurie gali suteikti naujų savybių ir variacijų, naudingų biomedžiagoms. Fundamentalūs Sc12 ir kitų bakterijų kolagenų tyrimai ir toliau padės išsiaiškinti pagrindines bakterijų į kolagenus panašių baltymų savybes, daugiausia dėmesio skiriant cheminei sudėčiai, sekai, biologiniam aktyvumui ir savaiminiam surinkimui (An *et al.*, 2014).

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

2.1 Darbe naudotos medžiagos ir prietaisai

2.1.1 Darbe naudoti prietaisai

- Autoklavas (Grida icanclave);
- Elektroforezės gelių dokumentavimo sistema (MiniBIS Pro DNR Bio-Imaging System);
- Elektroporatorius (Eppendorf);
- Fotometras (Eppendorf);
- Horizontalus agarozės gelio elektroforezės aparatas (Bio-Rad);
- Laminaras (ScanLaf Mars);
- NDS-PAGE elektroforezės aparatas (Bio-Rad);
- Purtyklė (BioSan ES-20/60)
- Stalinė centrifuga (Eppendorf);
- Stalinė šaldanti centrifuga (HERMLE);
- Svarstyklės (KERN EW620-3NM);
- Termocikleris (Eppendorf);
- Termomikseris (Eppendorf Thermomixer confort);
- Termostatas (Binder);
- Maišyklė (IKA MS 3 digital).

2.1.2 Darbe naudotos medžiagos (rinkiniai, antibiotikai, fermentai, cheminiai reagentai)

Thermo Scientific™: GeneJET Genomic DNA Purification Kit; dažas DNR mėginių užnešimui ant agarozės gelio (6X Loading Dye); DNR dydžio žymuo – MassRuler DNA Ladder Mix; GeneJET Gel Extraction Kit; plazmidės restrikcija – EcoRI, HindIII endonukleazė; FastDigest Buffer (10X); Phusion High-Fidelity DNR polimerazė (2 U/μL); TAE 50x buferis; DreamTaq PCR Master Mix (2X); T4 DNR ligazė; DMSO; PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder; GeneJET RNA Purification Kit.

New England Biolabs: NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix.

Carl Roth: agarozė; EtBr; LB terpė; bakteriologinis agaras; lizocimas; akrilamidas; N,N-metilenbisakrilamidas; TEMED; mėsos ekstraktas.

MERCK: peptonas; NaCl; etanolis; APS; KCl;

Zymo Research: Plasmid Miniprep (Classic).

AppliChem: glicerolis; triptonas; EDTA; Tris-HCl; karbenicilinas; ampicilinas; Triton X-100; IPTG; NDS; mielių ekstraktas; MgCl₂; gliukozė.

2.1.3 Mitybinės terpės

Mitybinės terpės (2.1 lentelė) ruošiamos naudojant dejonizuotą vandenį. Norint paruošti standžią terpę, terpė papildoma 1,5 % agaro. Terpės sterilinamos autoklavuojant 121 °C, 1 atm.

2.1 lentelė. Mitybinės terpės ir jų sudėtis

Mitybinė terpė	Sudėtis	Paskirtis
NB (<i>angl.</i> Nutrient Broth)	NaCl: 5 g/L Mėsos ekstraktas: 5 g/L Tryptonas: 10 g/L	<i>G. lituanicus</i> auginimui
TSB (<i>angl.</i> Tryptic Soy Broth)	Komercinė terpė (AppliChem)	<i>G. lituanicus</i> auginimui
LB (<i>angl.</i> Lysogeny broth)	Mielių ekstraktas: 5 g/L NaCl: 10 g/L Tryptonas: 10 g/L	<i>E. coli</i> ląstelių auginimui
SOC (<i>angl.</i> Super Optimal broth with Catabolite repression)	Tryptonas: 20 g/L Mielių ekstraktas: 5 g/L NaCl: 0,5 g/L KCl: 0,186 g/L MgCl ₂ : 0,95 g/L Gliukozės: 3,6 g/L	<i>E. coli</i> kompetentinių ląstelių gaivinimui po elektroporacijos
GYT (<i>angl.</i> glycerol-yeast extract-tryptone)	Glicerolis: 10 % Mielių ekstraktas: 1,25 g/L Tryptonas: 2,5 g/L	<i>E. coli DH5α</i> elektrokompentinių ląstelių plovimui

Esant poreikiui LB terpė papildoma antibiotiku ampicilinu (100 µg/mL) arba karbenicilinu 50 µg/mL).

2.1.4 Darbe naudoti bakterijų kamienai ir vektoriai

1. Klonavimo ir genų raiškos darbams buvo naudoti *E. coli* DH5α ir BL21(DE3) kamienai;
2. *Geobacillus lithuanicus* N-3 kamienas naudotas darbe klonuotų genu šaltiniu;
3. Genų klonavimui naudotas *E. coli* raiškos vektorius pET-Duet-1, kurį sudaro dvi multikloninės klonavimo sritys (MCS), kurių kiekvieną kontroliuoja T7 promotorius ir lac operonas. Vektorius turi atsparumo ampicilinui geną (bla).

2.1.5 Darbe naudoti pradmenys

Darbe naudoti pradmenys pateikti 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Darbe naudoti pradmenys ir jų sekos

Pavadinimas	Paskirtis	Seka (5' → 3')	Šaltinis
GT-F GT-R	Glikoziltransferazės geno pagausinimas	5'- ATGATGCATATAGTGAAACAGC AACATGG-3'	Šis darbas

		5'- TCACGATTCATCGGTTTGGTGG -3'	
MSC2-F-2 MSC2-R-2	<i>E. coli</i> pET-Duet-1 plazmidės pagausinimas	5'- ATGTATATCTCCTTCTTATACTT AACTAATATACTAAGATGG-3' 5'- TTAATTAACCTAGGCTGCTGCC AC-3'	Šis darbas
Collike-F Collike-R	GclB geno amplifikacija	5'- GGTAGGCATATGTCTGACCGAC GT-3' 5'- GACAAGCTTCTAACTAATCGCC ACTCC-3'	A. Drutelis, 2015, magistrinis darbas
GEOBAC-F GEOBAC-R	<i>Geobacillus</i> genties bakterijų rūšies identifikavimas	5'-TAAGCGTGAGGT CGGTGGTTC-3' 5'-GCGCTCTCGGCT TCT TCC TT-3'	Kuisienė <i>et al.</i> , 2004
Duet_up_2 T7-t	Kolonijų PGR	5'-TTGTACACGGCCGCATAATC- 3' 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG- 3'	Komerciniai pradmenys
E_GclB GclB_H	GclB geno pagausinimui nuo <i>G. lithuanicus</i> genomo	5'- TATGAATTCGTCTGACCGACGT CCTATTC-3' 5'- GCTAAGCTTCTAACTAATCGCC- 3'	Šis darbas

2.2 Darbo metodai

2.2.1 *Geobacillus lithuanicus* augimo kreivės sudarymas

G. lithuanicus užauginta ant agarizuotos TSB terpės kilpele paimama ir įdedama į 5 ml skystos TSB terpės į mėgintuvėlį naktinės kultūros auginimui. Naktinė kultūra auginama 14 val. Po 14 valandų auginimo, 0,5 ml naktinės kultūros perkeliama į kolbutę, su 50 ml skystos TSB terpės. Kolbutė su naktine kultūra perkeliama į purtyklę, ir auginama 55 °C temperatūroje, 180 aps/min. Augimo kreivės sudarymas prasideda nuo 0 valandos, iškart tik perkėlus naktinę kultūrą į kolbutę.

Nuo nulinės valandos, tolimesni matavimai atliekami kas valandą. Absorbicija (260 nm) matuojama fotometru.

2.2.2 *Geobacillus lituanicus* GclB geno raiškos tyrimai

Siekiant nustatyti, *G. lituanicus* sporuliacijos pradžią, ląstelės auginamos 55 °C temperatūroje skystoje ir agarizuotoje terpėje, iš kurių skirtingomis valandomis paimami mėginai endosporų dažymui, metodu aprašytu 2.2.3 skyriuje.

2.2.3 Endosporų dažymas Šeferio – Fultono metodu

Pirmiausia paruošiamas preparatas dažymui – skystoje terpėje auginta kultūra užlašinama ant objektyvinio stikliuko ir paskleidžiama nedideliame plote. Toliau, preparatas fiksuojamas karščiu virš spiritinės lemputės, kelis kartus perbraukiant objektyvinio stikliuko apatinę dalį virš liepsnos, kol vanduo išgaruoja ir ant objektyvinio stikliuko lieka sausa, fiksuota bakterijų kultūra. Fiksuotas preparatas, uždengiamas specialiu popierėliu ir ant jo užlašinama malachito žaliojo. Užlašinus dažo, preparatas kaitinamas virš liepsnelės 10 minučių, ir stengiamasi, kad jis neišsausėtų. Praėjus dešimčiai minučių, užgesinama liepsna ir leidžiama preparatui atvėsti. Atvėšęs objektyvinis stikliukas su malachito žaliojo dažu, gerai nuplaunamas po švelniai bėgančia vandens srove. Po to, nusausinus objektyvinį stikliuką, užlašinama safranino. Safranino dažas laikomas 30 s. Po to, švelniai nuplaunamas po vandens srove. Nusausintą stikliuką galima mikroskopuoti, užlašinus imersinio aliejaus, naudojant 1000x padidinimą (Oktari *et al.*, 2017).

2.2.4 Genominės DNR skyrimas

Genominė DNR buvo išskirta iš *G. lituanicus* N-3 kamieno ląstelių užaugintų esant 55 °C. gDNR skyrimas atliktas naudojant „GeneJET Genomic DNA Purification Kit“, pagal gamintojo rekomendacijas. Prieš skyrimą, pasigamintas lizės buferis (1 ml): 20 mM Tris-HCl (pH 8), 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100, dH₂O. Lizocimas (20 mg/ml) įdedamas prieš pat naudojimą. gDNR tikrinama 1 % agarozės gelio elektroforezės metodu, aprašytu 2.2.9 skyriuje.

2.2.5 Plazmidinės DNR skyrimas

Plazmidžių skyrimui buvo naudojama *Escherichia coli* DH5α kultūra, auginta 16 valandų per naktį. *E. Coli* DH5α ląsteles buvo išskiriamos naudojant komercinį rinkinį „ZR Plasmid Miniprep™ Classic“ pagal gamintojo rekomendacijas, išskyrus eliacija, kuri vykdoma steriliu dejonizuotu vandeniu. Plazmidžių skyrimas atliekamas kambario temperatūroje (20 – 22 °C). Visi centrifugavimo etapai atliekami 13 000 × g.

2.2.6 RNR skyrimas

iRNR buvo skiriama iš *G. Lituanicus* kultūros, naudojant „GeneJET RNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific)“, pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas.

2.2.7 DNR kiekio nustatymas spektrofotometriškai

Išskirtos plazmidės koncentracija nustatoma spektrofotometriškai, kai $\lambda = 260$ nm. Mėginio švarumo įvertinimui svarbus santykis A260/A280: jei $A_{260}/A_{280} > 1,7$, mėginys yra švarus jei $A_{260}/A_{280} < 1,6$, mėginyje yra baltymų priemaišų.

2.2.8 Plazmidžių restrikcija

Plazmidžių restrikcija buvo atliekama siekiant įvertinti plazmidžių dydį, bei atliekant klonavimą tradiciniu restrikcijos – ligavimo metodu. Restrikcija atlikta remiantis gamintojo rekomendacijomis.

2.2.9 Agarozės gelio elektroforezė

Nukleorūgščių produktai analizuojami 1 % agarozės gelyje. Agarozės gelis paruoštas naudojant 1x TAE buferinį tirpalą (40 mM Tris, 20 mM acto rūgšties, 1 mM EDTA), kuriame ištirpinamas reikiamas kiekis agarozės. Ištirpinus agarozę, tirpalas papildomas EtBr, kurio koncentracija tirpale – 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Paruoštas agarozės gelis pilamas į gelio formavimo rėmelį, į kurį įstatomos šulinėlius formuojančios šukos. Sustingęs gelis perkeliamas į agarozės gelio elektroforezės aparato vonelę ir užpilamas 1x TAE buferiniu tirpalu. Analizuojami mėginiai sumaišomi su 2 μl užnešimo dažu (6 \times Loading Dye, ThermoFisher Scientific) ir suleidžiami į agarozės gelio šulinėlius (10 μl). Į vieną iš šulinėlių suleidžiami 5 μl DNR fragmentų dydžio standarto „MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use“. Elektroforezė vykdoma nustačius 100 V įtampą, 1 valandą.

2.2.10 Polimerazės grandininė reakcija

Tikslinių genų bei plazmidinės DNR pagausinimui buvo naudojama „Phusion“ polimerazė. Reakcijos mišiniai supilstyti vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis. Tikslinių genų pagausinimui, PGR reakcijos mišinyje naudotas „5X Phusion GC“ buferis, o plazmidinės DNR pagausinimui, PGR reakcijos mišiniui naudotas „5X Phusion HF“ buferis. Galutinė tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų koncentracija PGR reakcijos mišinyje – 20 μM .

Naudojant šią polimerazę, PGR reakcijos metu nuo *G. lituanicus* gDNR pagausinti glikoziltransferazės ir GclB genai bei *E.coli* pET-Duet-1 plazmidės. Tiksliniams genams pagausinti naudota GT-F ir GT-R (glikoziltransferazės genas) bei E_GclB ir GclB_H (GclB genas) pradmenų poros. *E. coli* pET-Duet-1 plazmidinės DNR pagausinimui naudota MSC2-F-2 ir MSC2-R-2 pradmenų pora.

PGR sąlygos tiksliniams DNR fragmentams bei plazmidinei DNR pagausinti (tripakopė sintezė):

- 1) Pirminė denatūracija: 98 °C, 1 min;
- 2) Denatūracija: 98 °C, 10 s;
- 3) Pradmenų prilydymas: 66 °C – glikoziltransferazės genas; 57,3 °C – GclB genas; 65 °C – pET-Duet-1 plazmidinė DNR, 20 s;

4) DNR sintezė: 72 °C, 20 s/kb;

5) Galutinis ilginimas: 72 °C, 3 min. (glikoziltransferazės ir GclB genai); 72 °C, 1,5 min (s/kb) (pET-Duet-1 plazmidinė DNR);

2 – 4 stadijos kartojamos 30 kartų. Gauti PGR produktai analizuojami agarozės elektroforezės gelyje metodu, pateiktu (2.2.9 skyriuje).

2.2.11 Kolonijų PGR

Kolonijų PGR buvo atliekamas naudojant „DreamTaq PCR Master Mix (2X)“. Reakcijos mišiniai supilstyti vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis. Kolonijų PGR buvo atliekamas siekiant patikrinti ar tiksliniai genai yra transformuotose kolonijose. Kolonijų PGR reakcijai, buvo naudota užaugusių kolonijų biomasė. Pradmenys skirtingiems tiksliniams fragmentas įvertinti pateikti 2.2 lentelėje. PGR atliekama nurodytomis sąlygomis:

1) Pirminė denatūracija: 95 °C, 3 min;

2) Denatūracija: 95 °C, 30 s;

3) Pradmenų prilydymas: 66 °C – GT-F ir GT-R pradmenų porai; 57,3 °C – E_GclB ir GclB_H; 54,6 °C – Duet_up_2 ir T7-t; 30 s;

4) DNR sintezė: 72 °C, 1 min;

5) Galutinis ilginimas: 72 °C, 10 min.

2 – 4 stadijos kartojamos 30 kartų. Gauti PGR produktai analizuojami agarozės elektroforezės gelyje metodu, pateiktu (2.2.9 skyriuje).

2.2.12 DNR valymas iš agarozės gelio

Pagausinti PGR produktai po elektroforezės, UV šviesoje buvo išpjauti iš agarozės gelio ir išgryninti naudojant „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ rinkinį. Valymas iš gelio atliktas pagal gamintojo pateiktą protokolą.

2.2.13 Glikoziltransferazės geno klonavimas į pET-Duet-1 homologiniu klonavimo metodu

Klonavimui naudojami „Phusion“ polimerazės susintetinti glikoziltransferazės ir pET-Duet-1 PGR produktai (2.2.10 skyrius), paveikiami DpnI restrikcijos fermentu ir inkubuojami 37°C temperatūroje, ~ 1 val. termomikseryje. DpnI fermento inaktyvacija atliekama inkubuojant 80 °C, 20 min. PGR produktai, po DpnI restrikcijos fermento paveikimo ir inaktyvacijos gryninimi iš gelio naudojant „GeneJET™ Gel Extraction Kit“.

Po PGR produktų gryninimo iš gelio atliekamas klonavimas naudojant „NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix“ klonavimo rinkinį. Klonavimas atliktas remiantis gamintojo rekomendacijomis. Supilstytas reakcijos mišinys inkubuojamas termocikleryje 50 °C, 15 min. Po klonavimo, gauta rekombinantinė plazmidė, pavadinta pET-Duet-1_Gltr, transformuojama į elektrokompentinės ląstelės, 2.2.16 skyriuje aprašytu metodu.

2.2.14 GclB geno klonavimas

GclB genas klonuotas į pET-Duet-1 vektorių tradiciniu restrikcijos – ligavimo metodu. GclB genas buvo pagausintas nuo *G. lituanicus* gDNR naudojantis pradmenų pora pateikta 2.2 lentelėje. EcoRI ir HindIII restrikcijos endonukleazių atpažįstamos nukleotidų sekos taip pat yra įterptos į GclB geno PGR produkto galus. PGR reakcijos metu pagausintas GclB genas ir pET-Duet-1_Gltr vektorius naudojami klonavimui, juos paveikiant EcoRI ir HindIII restrikcijos endonukleazėmis. Reakcija vyksta 2 val., 37 °C temperatūroje. Po reakcijos restrikcijos endonukleazės inaktyvuojamos palaikius mišinį 20 min, 80 °C temperatūroje. Gauti restrikcijos fragmentai išvalomi iš gelio ir naudojami ligavimui.

Ligavimas atliekamas naudojant T4 DNR ligazę, kuri katalizuoja fosfodiesterinę jungtį tarp gretimų 5'-fosfato ir 3'-hidroksilo galų dvigrandėje DNR. Ligavimo reakcija vyksta 1 val., 22 °C temperatūroje. T4 DNR ligazės inaktyvavimas karščiu vyksta 70 °C temperatūroje, 5 min. Po DNR ligavimo, gauta rekombinantinė plazmidė, pavadinta pET-Duet-1_Gltr_GclB, transformuojama į elektrokompentinės ląstelės, 2.2.16 skyriuje aprašytu metodu.

2.2.15 Elektrokompentinė *Escherichia coli* DH5α ląstelių paruošimas

Nuo agarizuotos lėkštelės paimama viena šviežia kolonija ir ja inokuliuojama 25 ml LB terpės. Inkubuojama 16 val. 37 °C temperatūroje maišant (250 aps/min). Gauta kultūra inokuliuojama 500 ml naujos LB terpės. Auginimas toliau vykdomas, esant 37 °C, maišant (300 aps/min). OT_{600} matuojamas kas 20 minučių. Kai $OT_{600} \approx 0,4$ kultūra perkeliama į ledo vonelę 15 – 20 minučių, retkarčiais pamaišant bakterijų kultūra perkeliama į šaldytus centrifuginius mėgintuvėlius. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 4 °C, 15 min., 1000 × g. Supernatantas nupilamas, o ląstelės resuspenduojamos 250 ml šalto vandens. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 4 °C temperatūroje 20 min., 1000 × g. Supernatantas nupilamas, o ląstelės resuspenduojamos 125 ml šaldyto 10 % glicerolio. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 4 °C temperatūroje 20 min., 1000 × g. Supernatantas nupilamas, o ląstelės resuspenduojamos 5 ml šaldyto 10 % glicerolio. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 4 °C temperatūroje 20 min., 1000 × g. Atsargiai nupilamas supernatantas, siekiant pašalinti buferio likučius. Sekančiame žingsnyje ląstelės resuspenduojamos 1 ml GYT terpės. Paruoštos ląstelės naudojamos iškart elektrotransformacijai, arba iki panaudojimo laikomos -70 °C temperatūroje (Sambrook *et al.*, 2001).

2.2.16 Rekombinantinės DNR perkėlimas į *Escherichia coli* elektrokompentinės ląstelės elektrotransformacijos būdu

Plazmidinė DNR (ligavimo mišinys arba išskirta plazmidinė DNR) buvo perkeliama į elektrokompentinės ląstelės (paruoštas pagal 2.2.15 skyriuje pateiktą aprašymą). *E. Coli* kompetentinės ląstelės (DH5α paimtos iš -70 °C) ir perkeliama ant ledo. Į 40 μl kompetentinių ląstelių pridedama 1 μl DNR mišinio. Tada kompetentinės ląstelės sumaišomos su DNR perkeliama

į iš anksto atšaldytą elektroporacijos kiuvetę. Elektroporacija vykdoma taikant 1,7 kV/cm elektrinio lauko stiprį. Po elektroporacijos ląstelės perkeliamos į 950 µl SOC terpės ir inkubuojamos 37 °C, 250 aps/min. Po inkubacijos, transformuotos ląstelės išsėjamos ant agarizuotos LB terpės, papildytos karbenicilino antibiotiku. Ląstelės inkubuojamos 37 °C, 16 valandų.

2.2.17 Rekombinantinio konstrukto sekoskaita ir sekoskaitos analizė

Išskirtos rekombinantinės plazmidės pET-Duet-1_Gltr_GclB mėginys buvo išsiųstas viso ilgio plazmidės sekoskaitai, kurią atliko MB „SEQVISION“ įmonė. Gavus sekoskaitos rezultatus, buvo atliktas daugybinis sekų palyginimas Benchling platformoje (<https://www.benchling.com>), pasitelkiant sekų palyginimui sudaryti skirtą MAFFT 7 programos versijos algoritmą, kuriame sekoskaitos duomenys buvo lyginami su *in sillico* sukurtu vektoriaus ir geno konstruktu.

2.2.18 Genų raiška *Escherichia coli* BL21 (DE3) kamiene

E. Coli pET-Duet-1_Gltr_GclB rekombinantinė plazmidė perkeliama į *E. Coli* BL21 (DE3) kamieną elektrotransformacijos metodu, aprašytu 2.2.16 skyriuje. Iš užaugusių transformuotų kolonijų atrenkama viena kolonija ir perkeliama į kolbą su 5 ml LB terpės, papildytos ampicilino antibiotiku. Ląstelės auginamos per naktį 37°C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu. Ryte į kolbą su 50 ml LB terpės pridedama antibiotikų bei įpilama 0,5 ml per naktį augintos bakterijų kultūros ir auginama purtant 220 aps/min, kol kultūra pasiekia 0,4 – 0,6 optinį tankį. Išsaugoma neindukuota ląstelių kultūra. Centrifuguojamos kambario temperatūroje, supernatantas pašalinamas. Laikoma -20 °C. Kai $OT_{600} \approx 0,4$, kultūra indukuojama 1 mM IPTG. Baltymo sintezė vykdoma 4 val. Po to ląstelės surenkamos. Laikoma -20 °C. Likęs ląstelių tūris surenkamas ir yra centrifuguojamas 4 °C temperatūroje 15 min., 7000 × g. Laikoma -20 °C.

Kadangi surinktų neindukuotų ląstelių ir indukuotų ląstelių kiekis turi būti vienodas. Jis yra atvirkščiai proporcingas išmatuotam optiniam tankiui po indukcijos, todėl ląstelių suspensijos kiekį galima apskaičiuoti pagal žemiau pavaizduotą formulę: $y = \frac{x \times OD_1}{OD_2}$, kur x – ląstelių lizato kiekis prieš indukciją, y – ląstelių lizato kiekis po indukcijos, OT_1 – optinis tankis prieš indukciją, OT_2 – po indukcijos. Mėginiai baltymų elektroforezei centrifuguojami 1 min 13000 aps/min.

Mėginiai prieš baltymų elektroforezę sumaišomi su dH₂O ir 4x LB buferiu. Tada mėginiai 5 min pakaitinami 85 °C temperatūroje.

2.2.19 Baltymų elektroforezė

Paruoštų mėginių NDS-PAGE baltymų elektroforezė vykdoma „BioRad Mini Protean“ elektroforezės aparatu. Pirmiausia paruošiamas skiriamasis gelis (12,5 %), kurį sudaro dH₂O; 1 M Tris-HCl (pH 8,8); akrilamidas 29,2 %; N, N – metilenbisakrilamidas 0,8 %; 10 % NDS, 10 % APS, TEMED. APS ir TEMED sudedami prieš pat gelio supylimą tarp stiklinių elektroforezės

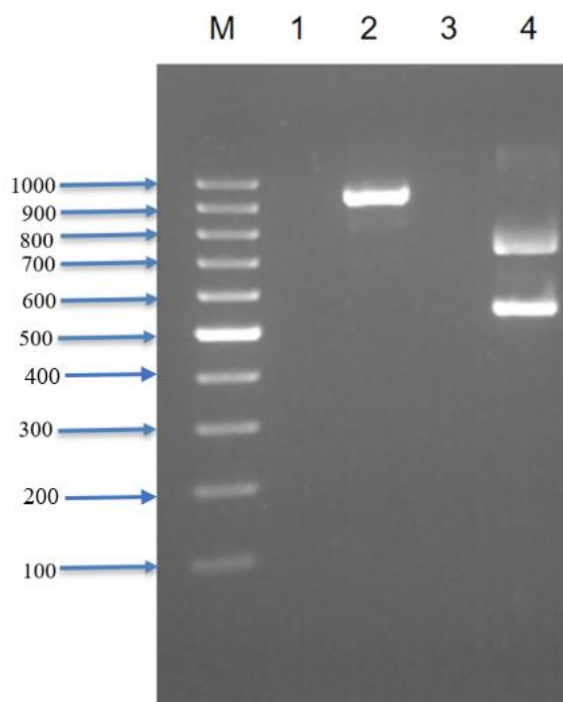
plokštelių, nes APS sukelia polimerizacijos reakciją, o TEMED yra reakcijos katalizatorius. Gelį supylus, šis padengiamas keliais mililitrais dH₂O ir leidžiama sustingti (~ 30 min); tada vanduo nupilamas, o ant viršaus polimerinamas koncentruojamasis poliakrilamido gelis, kurį sudaro: dH₂O; akrilamidas 29,2 %; N, N – metilenbisakrilamidas 0,8 %; 1 M Tris-HCl (pH 6,8); 10 % NDS; 10 % APS; TEMED. Į užpiltą koncentruojamąjį gelį įstatomos „šukos“ ir vėl leidžiama sustingti (apie 30 min), o geliui sustingus, plokšteles galima įstatyti į elektroforezės aparatą. Elektroforezės aparatas užpildomas elektroforezės buferiniu tirpalu ir išimamos „šukos“, į atskirus gelio takelius perkeliama mėginiai (5 µl molekulinės masės žymens bei po 15 µl kiekvieno mėginio (prieš ir po indukcijos)). Elektroforezė vykdoma esant nekintamam elektros srovės stiprumui (20 mA), įtampa ~ 150 V. Dažui pasiekus skiriamąjį gelio apačią, srovė išjungiama. Gelis kelis kartus plaunamas dH₂O, o po to dažomas „PageRuler Unstained Protein Ladder“ elektroforezės gelių dažų per naktį, kambario temperatūroje. Sekančią dieną gelis blukinamas dH₂O ir analizuojamas gautas baltymų vaizdas.

3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 *Geobacillus lituanicus* rūšies identifikavimas

Pirmiausia buvo siekiama patvirtinti, kad turimas kamienas yra tikrai priskiriamas *G. lituanicus* rūšiai. Tuo tikslu buvo atliekamas PGR naudojant GEOBAC pradmenis, skirtus *Geobacillus* rūšių identifikavimui (Kuisienė *et al.*, 2004). Tuo tarpu siekiant įsitikinti, kad kamienas tikrai koduoja kolageninį pasikartojimą turintį baltymą, pavadintą GclB, buvo naudota Collike pradmenų pora, skirta pagausinti *Geobacillus* genties bakterijose aptinkamą BclB baltymo homologą. Atlikus gautų PGR produktų elektroforetinę analizę agaroziniame gelyje, parodyta kad abiejų pradmenų porų atveju buvo gauti reikiamo dydžio DNR fragmentai (3.1 pav.).

Straipsnyje, kuriame buvo naudojami GEOBAC pradmenys skirti *Geobacillus* genčiai identifikuoti, buvo atlikta PGR produktų agarozės gelio elektroforezė, kurioje atvaizduoti du fragmentai priskyre tiriamą rūšį *G. lituanicus* bakterijai (Kuisienė *et al.*, 2004). Šiame darbe, naudojant tuos pačius GEOBAC pradmenis, PGR produktų elektroforezės gelio rezultatai, kuriuose matosi du fragmentai, sutapo su straipsnyje publikuotais rezultatais šiai rūšiai identifikuoti. PGR rezultatai taip pat patvirtino, kad GclB genas, kurio dydis ~ 930 bp yra koduojamas šiame, *G. lituanicus* N-3 kamiene (3.1 pav.).



3.1 pav. *G. lituanicus* rūšies ir GclB geno PGR produktų elektroforezė 1 % agarozės gelyje. M – 100 bp markeris; 1 – kontrolė be matricinės DNR; 2 – pagausinta *G. lituanicus* gDNR su Collike pradmenimis; 3 – kontrolė be matricinės DNR; 4 – pagausinta *G. lituanicus* gDNR su GEOBAC pradmenimis.

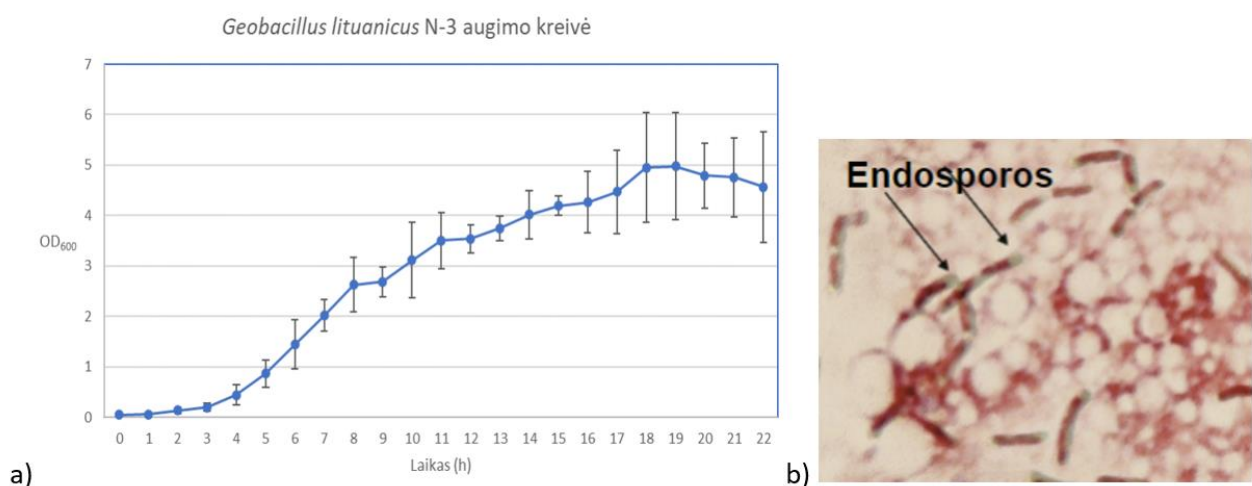
Įdomu tai, kad nors Collike pradmenų pagalba buvo parodyta, kad šis kamienas koduoja GclB baltymą (A. Drutelis, 2015, magistrinis darbas), NCBI duomenų bazėje patalpinto *G. lituanicus* N-3

genomo sekoje (GenBank ID: CP017692.1) tokios genų sekos, koduojančios GclB baltymą nėra. Gali būti, kad sekvenuojant *G. lituanicus* N-3 kamieną įvyko sekvenavimo klaidos. Viena iš priežasčių yra tai, kad *G. lituanicus* pasižymi dideliu GC procentu – 52,5. Didesnis GC kiekis rodo santykinai aukštesnę lydymosi temperatūrą, todėl daugelis sekoskaitos technologijų, pavyzdžiui, „Illumina“ sekoskaita, sunkiai nuskaito didelės GC sudėties sekas (Benjamini *et al.*, 2012). Galbūt dėl šios priežasties GclB geno sekoskaitos rezultatuose nebuvo.

3.2 GclB geno raiškos nustatymas *Geobacillus lituanicus* N-3 kamiene

GclB geno raiškos tyrimai buvo atliekami siekiant nustatyti ar GclB genas yra ekspresuojamas formuojantis endosporoms, kadangi yra žinoma, kad GclB yra egzosporio išorinio sluoksnio baltymas. Siekiant nustatyti ar GclB genas yra ekspresuojamas, pirmiausia buvo nustatoma sporuliacijos pradžia.

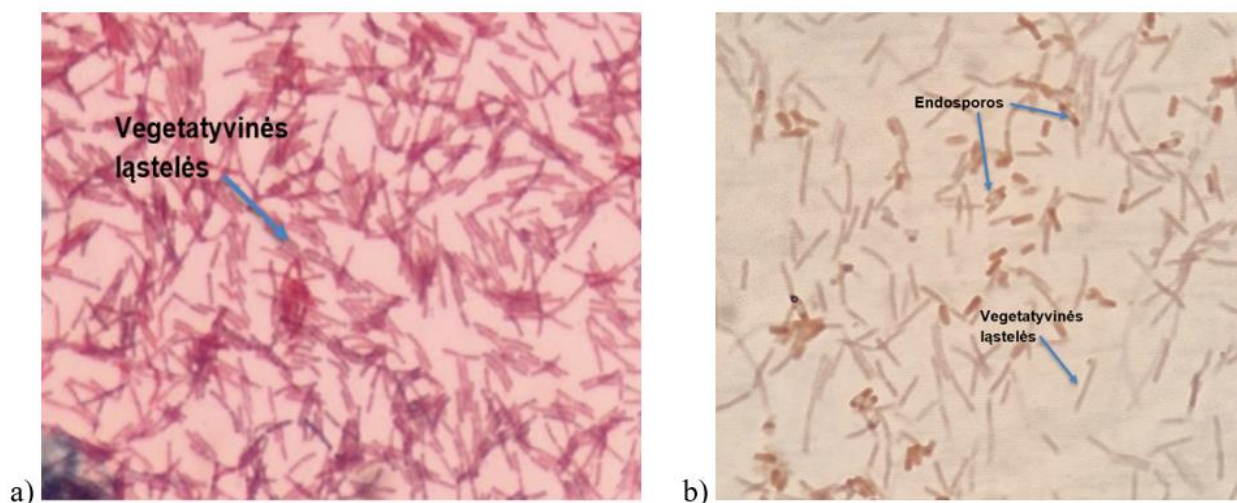
Augimo kreivės sudarymas, atliekamas siekiant nustatyti, kada *G. lituanicus* ląstelės pasiekia stacionarią augimo fazę. Šiam žingsniui įgyvendinti buvo atliekami optinio tankio matavimai, auginant ląstelių kultūrą nuo nulinės valandos t.y. nuo 0,5 ml naktinės kultūros perkėlimo į skystą TSB terpę. Sudarant augimo kreivę taip pat buvo nustatomas sporuliacijos pradžios taškas – ant mikroskopinio stikliuko karščiu fiksuojama ląstelių kultūra iš kiekvienos augimo valandos, dažoma Šeferio – Fultono metodu ir mikroskopuojama. Po 18 valandų auginimo, pastebėta, kad terminalinėje ląstelės pusėje išryškėja žalsvai nusidažantys fragmentai vegetatyvinėje ląstelėje. Buvo daroma prielaida, kad tai galėtų būti besiformuojančios endosporos. Ląstelės buvo auginamos iki eksponentinio mažėjimo fazės.



3.2 pav. *G. lituanicus* augimo kreivė ir sporuliacijos pradžios nustatymas. a) *Geobacillus lituanicus* N-3 kamieno augimo kreivė. Brūkšneliai nurodo 95 % pasikliautinąjį intervalą (*angl.* confidence interval) b) Numanomai susiformavusios endosporos 18 auginimo valandą

Nustačius, kad ląstelės formuoja endosporas 18 augimo valandą, augimas buvo pakartojamas ir prieš surenkant mėginius dar kartą atliekamas endosporų dažymas. Tačiau šiuo atveju, endosporos nebuvo pastebėtos. Po keletos nesėkmingų bandymų surinkti sporuliuojančias ląsteles, buvo nuspręsta pakeisti mitybinę terpę į turinčią mažiau maistinių medžiagų.

Toliau *G. lituanicus* N-3 kamienas buvo auginamas ant agarizuotos NB terpės, 55 °C temperatūroje. Skirtingomis valandomis fiksuojami ir dažomi preparatai (pagal aprašymą pateiktą 2.2.3 skyriuje) sporuliacijos pradžiai nustatyti pasirinktomis auginimo valandomis (pateikta 3.1 lentelėje).



3.3 pav. *G. Lituanicus* sporuliacijos pradžios taško nustatymas skirtingomis valandomis mikroskopuojant 1000x padidiniu. a) Ląstelių vaizdas mikroskopuojant stebimas 12 – 34 valandomis. b) Ląstelių vaizdas stebimas 48 – 50 valandomis

Nuo 12 iki 34 valandos buvo matomos tik vegetatyvinės ląstelės. Ties 48 – 50 valandomis stebimos endosporos manoma yra ne *G. lituanicus*, o *Bacillus subtilis* sporos, kurios užkrėtė *G. lituanicus* ląstelių kultūrą endosporų dažymo metu.

Nepavykus nustatyti, kurią valandą prasideda sporuliacija, RNR buvo skiriama iš *G. Lituanicus* kultūros 26 ir 50 valandų auginimo. Atlikus išskirtos RNR agarozės gelio elektroforezę, RNR gelyje nepastebėta. Toliau RNR būtų buvusi naudojama kDNR sintezei RT-PGR metodu, siekiant amplifikuoti išskirtą RNR bei nustatyti ar GclB baltymas yra ekspresuojamas prieš sporuliaciją.

Thompson *et al.*, (2012) tyrime, siekiant patikrinti, kada BclB baltymas sintetinas sporuliacijos metu ir kada inkorporuojasi į sporos paviršių, buvo atlikta sporuliuojančių *B. anthracis* ląstelių imunofluorescencinė mikroskopija (*angl.* immunofluorescence microscopy (IFM)), naudojant anti-rBclB antikūnus. BclB lokalizacija buvo nustatyta motininės ląstelės citoplazmoje. Atlikta sporuliuojančių ląstelių Western blot (WB) analizė, taip pat patvirtino, kad BclB baltymas

buvo pradėtas ekspresuoti ties ketvirta valanda ir intensyviai buvo ekspresuojamas iki septintos valandos (Thompson *et al.*, 2012).

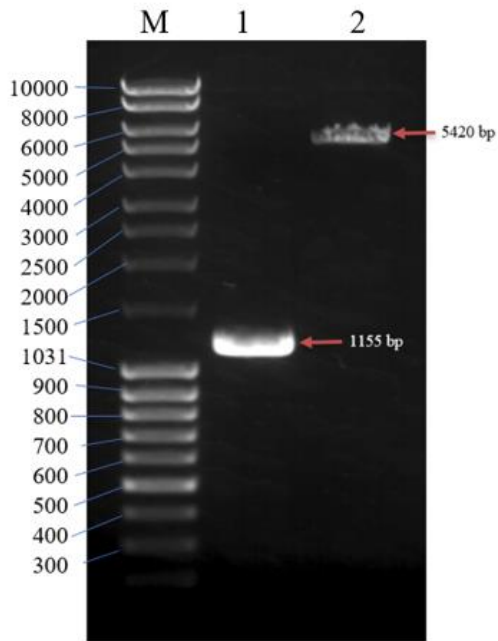
Kadangi nustatyti sporuliacijos pradžios taško nepavyko, ateityje būtų galima pakartoti šį tyrimą. Kartojant tyrimą, būtų galima optimizuojant endosporų dažymą malachito žaliuoju, prailginant dažymo laiką, taip padidinant tikimybę, kad dažas įsiskverbs į endosporos vidų. Taip pat, reiktų pakartoti RNR skyrimą, kuris, galbūt, šiame darbe nepavyko dėl skyrimui panaudotos per didelės ląstelių biomasės.

3.3 Glikoziltransferazės ir GclB genų klonavimas į pET-Duet-1 vektorių

BclB yra glikozilintas *B. anthracis* (Thompson *et al.*, 2012). Manoma, kad toks BclB baltymo glikozilinimas pagerina hidratacijos tinklo formavimąsi ir sąveiką, nes glikozilinta dalis gali sąveikauti su keliomis vandens molekulėmis tirpale, taip suteikiant baltymui didesnę stabilumą (Boydston *et al.*, 2005; Sylvestre *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2014). Dėl šios priežasties buvo tikimasi, kad ekspresuojant GclB geną kartu su glikoziltransferazės genu, pavyks gauti teisingai susilanksčiusį GclB baltymą.

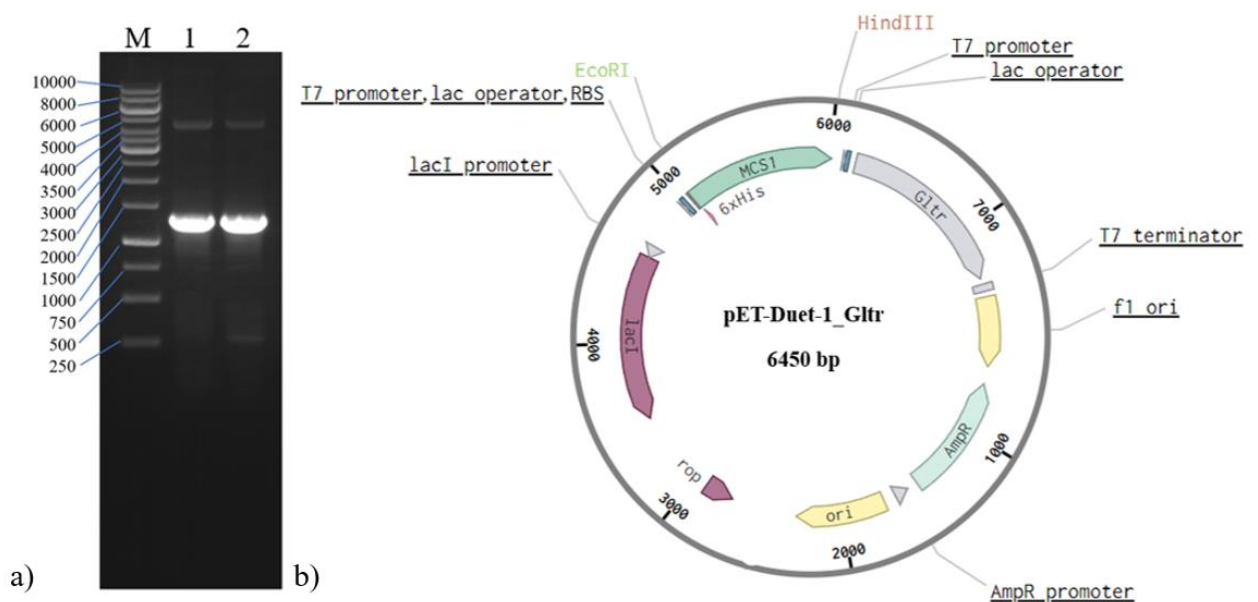
pET vektorių sistema yra plačiai naudojama rekombinantiniams baltymams išreikšti *E. coli* bakterijose. Šiame darbe genų klonavimui naudojamas pET-Duet-1 vektorius yra skirtas dviejų tikslinių genų klonavimui ir ekspresijai bei turi atsparumo ampicilinui geną (bla). Vektorių sudaro du raiškos vienetai, kurių kiekvieną kontroliuoja T7lac promotorius (Studier *et al.*, 1990). Po dviejų T7lac promotorių eina optimalios ribosomų surišimo sekos ir dvi multikloninės klonavimo sritys (MCS). pET-Duet-1 kopijų skaičius ląstelėje ~ 40.

Į vieną iš klonavimui skirtų MCS sričių buvo įklonuotas glikoziltransferazės genas. Glikoziltransferazės genas ir pET-Duet-1 vektorius pagausinti PGR metodu. Glikoziltransferazės klonavimui į pET-Duet-1 vektorių, pradmenys buvo kuriami taip, kad dalis pradmens fragmentų persidengtų su vektoriaus sritimi. Gauti PGR produktai analizuoti atlikus agarozės gelio elektroforezę (3.2 pav.). Gautas elektroforezės vaizdas, patvirtino sėkmingą glikoziltransferazės geno, kurio dydis ~ 1155 bp ir pET-Duet-1 plazmidės, kurios dydis ~ 5420 bp pagausinimą PGR metodu. Glikoziltransferazės genas klonuotas į pET-Duet-1 vektorių, naudojant homologinį klonavimo metodą.



3.4 pav. Nuo *G. lituanicus* gDNR pagausinto glikoziltransferazės geno ir *E.coli* pET-Duet-1 vektoriaus PGR produktų elektroforezė 1 % agarozės gelyje. M – MassRuller markeris; 1 takelis – glikoziltransferazės genas; 2 takelis – linearizuota pET-Duet-1 plazmidė

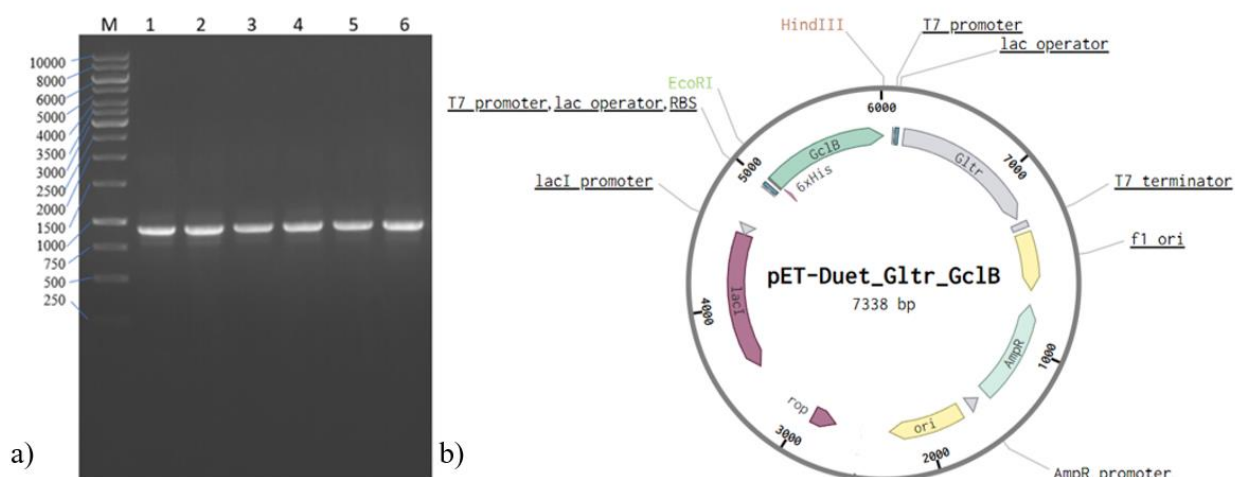
Siekiant patvirtinti, kad glikoziltransferazės genas buvo įklonuotas į vektorių, buvo atlikta dviejų pasirinktų kolonijų PGR. Gauti PGR produktų elektroforezės rezultatai patvirtino glikoziltransferazės geno buvimą vektoriuje ir buvo gautas pET-Duet-1_Gltr vektoriaus produktas (3.3 pav. b)). pET-Duet-1_Gltr vektoriaus produktas taip pat buvo išsiųstas viso dydžio plazmidės sekoskaitai, kuri patvirtino, kad glikoziltransferazės genas įklonuotas į plazmidę teisingai.



3.5 pav. Glikoziltransferazės geno kolonijų PGR ir *E. coli* DH5α pET-Duet-1_Gltr konstrukto schema. a) Po transformacijos išskirtų kolonijų su į pET-Duet-1 įterptu glikoziltransferazės genu elektroforezė 1 % agarozės gelyje. M – 1 kb markeris; 1 – pirma kolonija; 2 – trečia kolonija. b) *E. coli* DH5α pET-Duet-1_Gltr konstrukto schema

GlbB genas buvo klonuotas į likusią laisvą multikloninę sritį (MSC1) restrikcijos-ligavimo metodu. Restrikcijos vietos pasirinktos ties EcoRI ir HindIII restrikcijos endonukleazių kirpimo vietomis. EcoRI restrikcijos endonukleazė pasirinkta todėl, kad GclB baltymo C-gale būtų prikabinamas 6× histidino inkaras. Klonavimo proceso metu GclB geno ir vektoriaus galai turi būti modifikuojami, kad būtų komplementarūs sujungimui, veikiant DNR ligazei.

Atlikus GclB geno ligavimą į pETDuet-1_Gltr vektoriaus konstrukta, vektorius buvo transformuojamas į elektrokompentines ląsteles. Atlikus, šešių atsitiktinai pasirinktų užaugusių kolonijų PGR, patvirtinta, kad visose šešiose kolonijose yra GclB genas (3.4 pav. a)).



3.6 pav. Kolonijų PGR produktų elektroforezė 1 % agarozės gelyje ir pETDuet-1_Gltr_GclB konstrukto schema. a) Transformuotų kolonijų PGR su įterptu GclB genu; b) pETDuet-1_Gltr_GclB konstrukto schema

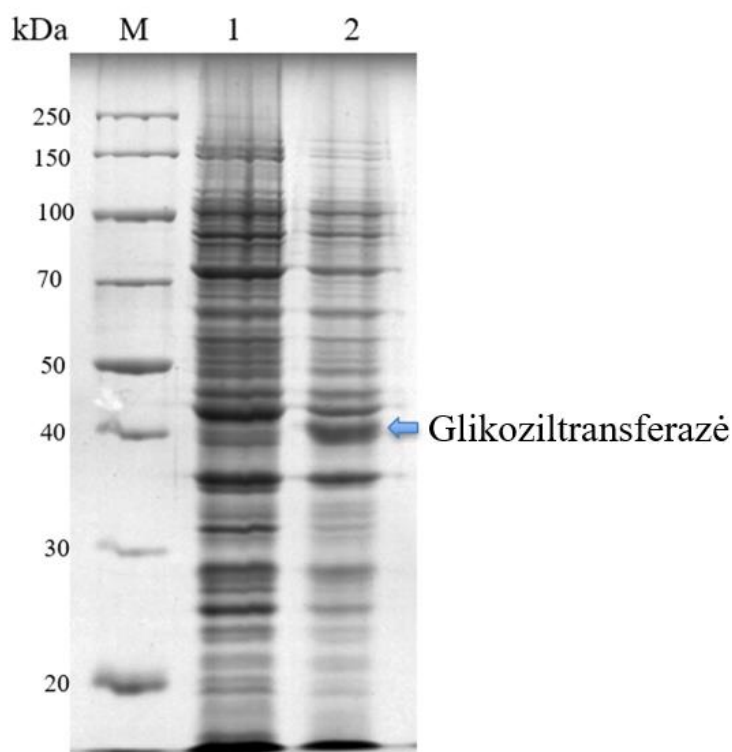
Įvertinus daugybinio sekų palyginimo rezultatus sekoskaitos rezultatai parodė, jog rekombinantiniame konstrukte klaidų nebuvo, geno seka įterpta teisingai, todėl nuspręsta toliau pET-Duet-1_Gltr_GclB konstrukta raiškos tyrimuose.

3.4 Genų raiškos indukcija *E. coli* B121 (DE3) kamiene

Gautas pET-Duet-1_Gltr_GclB rekombinantinis vektoriaus konstruktas buvo transformuojamas į *E. coli* B121 (DE3) kamieną. Literatūroje nurodoma, kad *E. coli* augimui saugi 0 – 1 mM IPTG koncentracija (Li *et al.*, 2022). Todėl šiame darbe pasirinkta IPTG koncentracija – 1 mM. Indukcija vykdyta 37 °C temperatūroje, 4 valandas.

Raiškos mėginiai (paruošti kaip aprašyta 2.2.18 skyriuje) buvo analizuojami atliekant NDS-PAGE, siekiant įvertinti glikoziltransferazės ir GclB baltymų ekspresiją raiškos kamiene. Po indukcijos GclB baltymo, kurio dydis ~ 33 kDa, raiška nepastebėta, tačiau glikoziltransferazės baltymas, kurio dydis ~ 41 kDa, buvo matomas baltymų elektroforezės gelyje po indukcijos (3.5 pav.).

Viena iš priežasčių, kodėl atlikus baltymų elektroforezę GclB baltymas po 4 valandų indukcijos nebuvo pastebėtas, yra trumpas indukcijos laikas, per kurį GclB baltymas nebuvo ekspresuojamas. Tokiu atveju, reiktų optimizuoti indukcijos parametrus – laiką ir temperatūrą.



3.7 pav. pET-Duet-1_Gltr_GclB konstrukto raiška *E.coli* BL21 (DE3) kamiene. M – molekulinės masės standartas „PageRuler Unstained Broad Protein Ladder“; 1 – neindukuota ląstelių frakcija; 2 – IPTG indukuota ląstelių frakcija

Literatūroje nurodoma, kad esant mažesnei ląstelės baltymų koncentracijai, pagerėja jų susilankstymas. Todėl siekiant sulėtinti ląstelės baltymų sintezę, reiktų ląsteles inkubuoti žemesnėje temperatūroje (Rosano *et al.*, 2014). Kita priežastis galėtų būti tai, kad GclB baltymas yra ekspresuojamas nedideliu kiekiu, todėl baltymų elektroforezės gelyje baltymas nėra matomas.

IŠVADOS

1. Specifiniais pradmenimis PGR metodu patvirtintas tyrime naudojamas *Geobacillus lituanicus* kamienas, koduojantis GclB geną;
2. Sporuliacijos pradžios nustatyti nepavyko;
3. Po GclB ir glikoziltransferazės genų klonavimų, pastebėta tik glikoziltransferazės geno raiška *E. coli* B121 (DE3) kamiene.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Viktorija Juknevičiūtė
Magistro baigiamasis darbas

**Termofilinės bakterijos *Geobacillus lituanicus* N-3 hipotetinio kolageno tipo baltymo (GclB)
tyrimas**

SANTRAUKA

Kolagenas yra baltymas, aptinkamas visuose gyvūnuose. Šis baltymas yra pagrindinis ekstraląstelinio matrikso komponentas. Struktūrinis bruožas būdingas visiems kolagenams – unikali trigubos spiralės struktūra, kuriai būdingas pasikartojantis a.r. modelis (Gly – X a.r – Y a.r)_n. Tačiau per pastaruosius dvidešimt metų, tiriant bakterijų genomus, buvo identifikuota daug sekų turinčių (Gly – X a.r. – Y a.r.)_n pasikartojimus. Rekombinantiniai, į kolagenus panašūs baltymai galėtų pakeisti žinduolių kolagenus, kurių platesnį panaudojimą stabdo atskirų gaminamų partijų kintamumas, platinamos ligos, alerginės reakcijos žmonėms bei brangus gamybos didinimas. Termofilinės bakterijos galėtų tapti alternatyva žinduolių kolagenams, nes auga aukštesnėje temperatūroje ir jų į kolageną panašūs baltymai galėtų pasižymėti terminiu stabilumu aukštesnėje temperatūroje.

Ankstesnių darbų laboratorijoje metu, nustatyta, kad tarp laboratorijoje esančių bakterijų kamienų, *Geobacillus lituanicus* bakterijos N-3 kamienas koduoja į *Bacillus anthracis* BclB panašų baltymą, pavadintą GclB. *B. anthracis* bakterijos BclB baltymas, formuojantis į kolageną panašią struktūrą – trigubą spiralę. Šiame darbe tiriamas *G. lituanicus* bakterijos N-3 kamieno GclB baltymas, siekiant įvertinti šio baltymo raišką *E. coli* bakterijoje. Šalia GclB geno, buvo įklonuotas ir glikoziltransferazės genas, kuris taip pat yra ekspresuojamas *B. anthracis* bakterijoje šalia BclB baltymo. Manoma, kad glikoziltransferazės geno ekspresija šalia GclB, suteiktų stabilumo šiam baltymui, kas lemtų teisingą šio baltymo susilankstymą atlikus raišką.

Darbų metu glikoziltransferazės ir GclB genai buvo sėkmingai klonuoti į pET-Duet-1 vektorių. Po klonavimo, buvo atlikta raiška *E. coli* BL21 (DE3) kamieno, indukuojant ląsteles 0,1 mM IPTG 37 °C, 4 valandas. Po indukcijos, atlikus NDS-PAGE baltymų elektroforezę, gelyje buvo matomas glikoziltransferazės genas, tačiau GclB geno raiška neįvyko.

Viktorija Juknevičiūtė

Master thesis

**Investigation of a Hypothetical Collagen-like Protein (GclB) of the Thermophilic Bacterium
Geobacillus lituanicus N-3**

SUMMARY

Collagen is a protein found in all animals. It is the main component of the extracellular matrix. A structural feature common to all collagens is a unique triple helix structure characterised by a repeating a.r. pattern (Gly – X a.r – Ya.r)_n. However, over the last twenty years, the study of bacterial genomes has led to the identification of a large number of sequences with (Gly – X a.r. – Y a.r.)_n repeats. Recombinant collagen-like proteins could replace mammalian collagens, the wider use of which has been hampered by batch-to-batch variability, widespread disease, allergic reactions in humans, and costly scale-up. Thermophilic bacteria could provide an alternative to mammalian collagens as they grow at higher temperatures and their collagen-like proteins could have thermal stability at higher temperatures.

Previous work in the laboratory has shown that, among the bacterial strains present in the laboratory, the N-3 strain of *Geobacillus lituanicus* encodes a *Bacillus anthracis* BclB-like protein, named GclB. The BclB protein of *B. anthracis* forms a collagen-like structure – a triple helix. In the present work, the GclB protein of the N-3 strain of *G. lituanicus* is investigated in order to assess the expression of this protein in *E. coli*. In addition to the GclB gene, a glycosyltransferase gene, which is also expressed in *B. anthracis*, was cloned alongside the BclB protein. The expression of the glycosyltransferase gene next to GclB is thought to confer stability to this protein, which would lead to correct folding of this protein after expression.

The results obtained showed that the glycosyltransferase gene and the GclB gene could be successfully cloned into the pET-Duet-1 vector. After cloning, expression was performed in *E. coli* BL21 (DE3) strain by inducing the cells with 0,1 mM IPTG at 37 °C for 4 hours. After induction, NDS-PAGE protein electrophoresis showed the glycosyltransferase gene in the gel, but no expression of the GclB gene.

PADĖKA

Nuoširdžiai noriu padėkoti savo darbo vadovei dr. Rūtai Kananavičiūtei už skirtą laiką bei pagalbą viso eksperimentinio darbo metu, suteiktas praktines žinias ir patarimus, tobulinant laboratorinius įgūdžius. Ačiū už galimybę atlikti magistro baigiamąjį darbą Prokariotų molekulinės mikrobiologijos ir taksonomijos laboratorijoje.

LITERATŪROS ŠARĀŠAS

1. An, B., Kaplan, D. L., & Brodsky, B. (2014). Engineered recombinant bacterial collagen as an alternative collagen-based biomaterial for tissue engineering. *Frontiers in chemistry*, 2, 40. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00040>
2. Bachert, B. A., Choi, S. J., Snyder, A. K., Rio, R. V., Durney, B. C., Holland, L. A., Amemiya, K., Welkos, S. L., Bozue, J. A., Cote, C. K., Berisio, R., & Lukomski, S. (2015). A Unique Set of the Burkholderia Collagen-Like Proteins Provides Insight into Pathogenesis, Genome Evolution and Niche Adaptation, and Infection Detection. *PloS one*, 10(9), e0137578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137578>
3. Ball, D. A., Taylor, R., Todd, S. J., Redmond, C., Couture-Tosi, E., Sylvestre, P., Moir, A., & Bullough, P. A. (2008). Structure of the exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. *Molecular microbiology*, 68(4), 947–958. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06206.x>
4. Bamford, J. K., & Bamford, D. H. (1990). Capsomer proteins of bacteriophage PRD1, a bacterial virus with a membrane. *Virology*, 177(2), 445–451. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90508-o](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90508-o)
5. Bansal, T., Englert, D., Lee, J., Hegde, M., Wood, T. K., & Jayaraman, A. (2007). Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infection and immunity*, 75(9), 4597–4607. <https://doi.org/10.1128/IAI.00630-07>
6. Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B., & Berman, H. M. (1994). Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5182), 75–81. <https://doi.org/10.1126/science.7695699>
7. Bella J. (2016). Collagen structure: new tricks from a very old dog. *The Biochemical journal*, 473(8), 1001–1025. <https://doi.org/10.1042/BJ20151169>
8. Benjamini, Y., & Speed, T. P. (2012). Summarizing and correcting the GC content bias in high-throughput sequencing. *Nucleic acids research*, 40(10), e72. <https://doi.org/10.1093/nar/gks001>
9. Bergholz, T. M., Wick, L. M., Qi, W., Riordan, J. T., Ouellette, L. M., & Whittam, T. S. (2007). Global transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to growth transitions in glucose minimal medium. *BMC microbiology*, 7, 97. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-97>
10. Birk, D. E., & Brückner, P. (2010). Collagens, Suprastructures, and Collagen Fibril Assembly. *The Extracellular Matrix: An Overview*, 77–115. doi:10.1007/978-3-642-16555-9_3
11. Boydston, J. A., Chen, P., Steichen, C. T., & Turnbough, C. L., Jr (2005). Orientation within the exosporium and structural stability of the collagen-like glycoprotein BclA of *Bacillus*

- anthracis. *Journal of bacteriology*, 187(15), 5310–5317.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5310-5317.2005>
12. Brodsky, B., & Ramshaw, J. A. (1997). The collagen triple-helix structure. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 15(8-9), 545–554.
[https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(97\)90030-5](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(97)90030-5)
 13. Brodsky, B., & Persikov, A. V. (2005). Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in protein chemistry*, 70, 301–339. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70009-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70009-7)
 14. Bretscher, L. E., Jenkins, C. L., Taylor, K. M., DeRider, M. L., & Raines, R. T. (2001). Conformational stability of collagen relies on a stereoelectronic effect. *Journal of the American Chemical Society*, 123(4), 777–778. <https://doi.org/10.1021/ja005542v>
 15. Buwalda, S. J., Boere, K. W., Dijkstra, P. J., Feijen, J., Vermonden, T., & Hennink, W. E. (2014). Hydrogels in a historical perspective: from simple networks to smart materials. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 190, 254–273. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.052>
 16. Caswell, C. C., Lukomska, E., Seo, N. S., Höök, M., & Lukomski, S. (2007). Sc11-dependent internalization of group A Streptococcus via direct interactions with the alpha2beta(1) integrin enhances pathogen survival and re-emergence. *Molecular microbiology*, 64(5), 1319–1331. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05741.x>
 17. Caswell, C. C., Barczyk, M., Keene, D. R., Lukomska, E., Gullberg, D. E., & Lukomski, S. (2008). Identification of the first prokaryotic collagen sequence motif that mediates binding to human collagen receptors, integrins alpha2beta1 and alpha11beta1. *The Journal of biological chemistry*, 283(52), 36168–36175. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806865200>
 18. Chan, S. W., Greaves, J., Da Silva, N. A., & Wang, S. W. (2012). Assaying proline hydroxylation in recombinant collagen variants by liquid chromatography-mass spectrometry. *BMC biotechnology*, 12, 51. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-51>
 19. Chen, Y. S., Chen, C. C., & Horng, J. C. (2011). Thermodynamic and kinetic consequences of substituting glycine at different positions in a Pro-Hyp-Gly repeat collagen model peptide. *Biopolymers*, 96(1), 60–68. <https://doi.org/10.1002/bip.21470>
 20. Cosgriff-Hernandez, E., Hahn, M. S., Russell, B., Wilems, T., Munoz-Pinto, D., Browning, M. B., Rivera, J., & Höök, M. (2010). Bioactive hydrogels based on Designer Collagens. *Acta biomaterialia*, 6(10), 3969–3977. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.05.002>
 21. Dan, H., Balachandran, A., & Lin, M. (2009). A pair of ligation-independent Escherichia coli expression vectors for rapid addition of a polyhistidine affinity tag to the N- or C-termini of recombinant proteins. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 20(5), 241–248

22. Daubenspeck, J. M., Zeng, H., Chen, P., Dong, S., Steichen, C. T., Krishna, N. R., Pritchard, D. G., & Turnbough, C. L., Jr (2004). Novel oligosaccharide side chains of the collagen-like region of BclA, the major glycoprotein of the *Bacillus anthracis* exosporium. *The Journal of biological chemistry*, 279(30), 30945–30953. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401613200>
23. Dobos, K. M., Khoo, K. H., Swiderek, K. M., Brennan, P. J., & Belisle, J. T. (1996). Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*, 178(9), 2498–2506. <https://doi.org/10.1128/jb.178.9.2498-2506.1996>
24. Ellison, A. J., Dempwolff, F., Kearns, D. B., & Raines, R. T. (2020). Role for Cell-Surface Collagen of *Streptococcus pyogenes* in Infections. *ACS infectious diseases*, 6(7), 1836–1843. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00073>
25. Fazzini, M. M., Schuch, R., & Fischetti, V. A. (2010). A novel spore protein, ExsM, regulates formation of the exosporium in *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* and affects spore size and shape. *Journal of bacteriology*, 192(15), 4012–4021. <https://doi.org/10.1128/JB.00197-10>
26. Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*, 123(Pt 24), 4195–4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>
27. Ghosh, N., McKillop, T. J., Jowitt, T. A., Howard, M., Davies, H., Holmes, D. F., Roberts, I. S., & Bella, J. (2012). Collagen-like proteins in pathogenic *E. coli* strains. *PloS one*, 7(6), e37872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037872>
28. Greenfield N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*, 1(6), 2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>
29. Grigaitytė K., 2020. Termofilinių *Geobacillus lituanicus* N-3 bakterijų kolageno tipo baltymo heterologinė raiška. Bakalaurinis darbas. Vilniaus universitetas, Vilnius.
30. Grund, M. E., Choi, S. J., McNitt, D. H., Barbier, M., Hu, G., LaSala, P. R., Cote, C. K., Berisio, R., & Lukomski, S. (2020). *Burkholderia* collagen-like protein 8, Bucl8, is a unique outer membrane component of a putative tetrapartite efflux pump in *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *PloS one*, 15(11), e0242593. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242593>
31. Han, R., Zwiefka, A., Caswell, C. C., Xu, Y., Keene, D. R., Lukomska, E., Zhao, Z., Höök, M., & Lukomski, S. (2006). Assessment of prokaryotic collagen-like sequences derived from streptococcal Sc11 and Sc12 proteins as a source of recombinant GXY polymers. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(1), 109–115. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0387-5>

32. Henriques, A. O., & Moran, C. P., Jr (2007). Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annual review of microbiology*, 61, 555–588. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093224>
33. Herold, S., Siebert, J., Huber, A., & Schmidt, H. (2005). Global expression of prophage genes in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933 in response to norfloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(3), 931–944. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.3.931-944.2005>
34. Humtsoe, J. O., Kim, J. K., Xu, Y., Keene, D. R., Höök, M., Lukomski, S., & Wary, K. K. (2005). A streptococcal collagen-like protein interacts with the alpha2beta1 integrin and induces intracellular signaling. *The Journal of biological chemistry*, 280(14), 13848–13857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410605200>
35. Kailas, L., Terry, C., Abbott, N., Taylor, R., Mullin, N., Tzokov, S. B., Todd, S. J., Wallace, B. A., Hobbs, J. K., Moir, A., & Bullough, P. A. (2011). Surface architecture of endospores of the *Bacillus cereus*/*anthracis*/*thuringiensis* family at the subnanometer scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), 16014–16019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109419108>
36. Kananavičiūtė, R., Kvederavičiūtė, K., Dabkevičienė, D., Mackevičius, G., & Kuisienė, N. (2020). Collagen-like sequences encoded by extremophilic and extremotolerant bacteria. *Genomics*, 112(3), 2271–2281. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.12.023>
37. Karlström, A., Jacobsson, K., Flock, M., Flock, J. I., & Guss, B. (2004). Identification of a novel collagen-like protein, Sc1C, in *Streptococcus equi* using signal sequence phage display. *Veterinary microbiology*, 104(3-4), 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.014>
38. Kielty, C. M., & Grant, M. E. (2002). The Collagen Family: Structure, Assembly, and Organization in the Extracellular Matrix. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*, 159–221. doi:10.1002/0471221929.ch2
39. Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Aravind, L. (2001). Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annual review of microbiology*, 55, 709–742. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.709>
40. Kuisiene, N., Raugalas, J., & Chitavichius, D. (2004). *Geobacillus lituanicus* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(Pt 6), 1991–1995. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02976-0>
41. Łabowska, M. B., Cierluk, K., Jankowska, A. M., Kulbacka, J., Detyna, J., & Michalak, I. (2021). A Review on the Adaption of Alginate-Gelatin Hydrogels for 3D Cultures and Bioprinting. *Materials (Basel, Switzerland)*, 14(4), 858. <https://doi.org/10.3390/ma14040858>

42. Lee, J., Bansal, T., Jayaraman, A., Bentley, W. E., & Wood, T. K. (2007). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* biofilms are inhibited by 7-hydroxyindole and stimulated by isatin. *Applied and environmental microbiology*, 73(13), 4100–4109. <https://doi.org/10.1128/AEM.00360-07>
43. Leski, T. A., Caswell, C. C., Pawlowski, M., Klinke, D. J., Bujnicki, J. M., Hart, S. J., & Lukomski, S. (2009). Identification and classification of *bcl* genes and proteins of *Bacillus cereus* group organisms and their application in *Bacillus anthracis* detection and fingerprinting. *Applied and environmental microbiology*, 75(22), 7163–7172. <https://doi.org/10.1128/AEM.01069-09>
44. Li, L., Li, H., Tian, Q. et al. Expression and purification of soluble recombinant β -lactamases using *Escherichia coli* as expression host and pET-28a as cloning vector. *Microb Cell Fact* 21, 244 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01972-5>
45. Liu, H., Bergman, N. H., Thomason, B., Shallom, S., Hazen, A., Crossno, J., Rasko, D. A., Ravel, J., Read, T. D., Peterson, S. N., Yates, J., 3rd, & Hanna, P. C. (2004). Formation and composition of the *Bacillus anthracis* endospore. *Journal of bacteriology*, 186(1), 164–178. <https://doi.org/10.1128/JB.186.1.164-178.2004>
46. Lukomski, S., Nakashima, K., Abdi, I., Cipriano, V. J., Ireland, R. M., Reid, S. D., Adams, G. G., & Musser, J. M. (2000). Identification and characterization of the *scl* gene encoding a group A *Streptococcus* extracellular protein virulence factor with similarity to human collagen. *Infection and immunity*, 68(12), 6542–6553. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6542-6553.2000>
47. Lukomski, S., Nakashima, K., Abdi, I., Cipriano, V. J., Shelvin, B. J., Graviss, E. A. (2001). Identification and characterization of a second extracellular collagen-like protein made by group A *Streptococcus*: control of production at the level of translation. *Infect. Immun.* 69, 1729–1738. doi:10.1128/IAI.69.3.1729-1738.2001
48. Lukomski, S., Bachert, B. A., Squeglia, F., & Berisio, R. (2017). Collagen-like proteins of pathogenic streptococci. *Molecular microbiology*, 103(6), 919–930. <https://doi.org/10.1111/mmi.13604>
49. Lukomski, S., & McNitt, D. H. (2020). Expression and Purification of Collagen-Like Proteins of Group A *Streptococcus*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2136, 163–179. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0467-0_12
50. Luther, K. B., Hülsmeier, A. J., Schegg, B., Deuber, S. A., Raoult, D., & Hennet, T. (2011). Mimivirus collagen is modified by bifunctional lysyl hydroxylase and glycosyltransferase enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 286(51), 43701–43709. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.309096>

51. Maes, E., Krzewinski, F., Garenaux, E., Lequette, Y., Coddeville, B., Trivelli, X., Ronse, A., Faille, C., & Guerardel, Y. (2016). Glycosylation of BclA Glycoprotein from *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* Exosporium Is Domain-specific. *The Journal of biological chemistry*, 291(18), 9666–9677. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.718171>
52. Maier, T., Drapal, N., Thanbichler, M., & Böck, A. (1998). Strep-tag II affinity purification: an approach to study intermediates of metalloenzyme biosynthesis. *Analytical biochemistry*, 259(1), 68–73. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2649>
53. Manetsberger, J., Hall, E. A., & Christie, G. (2015). Plasmid-encoded genes influence exosporium assembly and morphology in *Bacillus megaterium* QM B1551 spores. *FEMS microbiology letters*, 362(18), fnv147. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv147>
54. McElroy, K., Mouton, L., Du Pasquier, L., Qi, W., & Ebert, D. (2011). Characterisation of a large family of polymorphic collagen-like proteins in the endospore-forming bacterium *Pasteuria ramosa*. *Research in microbiology*, 162(7), 701–714. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.06.009>
55. McKenney, P. T., Driks, A., Eskandarian, H. A., Grabowski, P., Guberman, J., Wang, K. H., Gitai, Z., & Eichenberger, P. (2010). A distance-weighted interaction map reveals a previously uncharacterized layer of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Current biology : CB*, 20(10), 934–938. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.060>
56. McKenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature reviews. Microbiology*, 11(1), 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
57. Meskauskas, A., Russ, J. R., & Dinman, J. D. (2008). Structure/function analysis of yeast ribosomal protein L2. *Nucleic acids research*, 36(6), 1826–1835. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn034>
58. Moens, S., & Vanderleyden, J. (1997). Glycoproteins in prokaryotes. *Archives of microbiology*, 168(3), 169–175. <https://doi.org/10.1007/s002030050484>
59. Mohs, A., Silva, T., Yoshida, T., Amin, R., Lukomski, S., Inouye, M., & Brodsky, B. (2007). Mechanism of stabilization of a bacterial collagen triple helix in the absence of hydroxyproline. *The Journal of biological chemistry*, 282(41), 29757–29765. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703991200>
60. Muniesa, M., de Simon, M., Prats, G., Ferrer, D., Pañella, H., & Jofre, J. (2003). Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. *Infection and immunity*, 71(8), 4554–4562. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.8.4554-4562.2003>

61. Muniesa, M., Blanco, J. E., de Simón, M., Serra-Moreno, R., Blanch, A. R., & Jofre, J. (2004). Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 9), 2959–2971. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27188-0>
62. Myllyharju, J., & Kivirikko, K. I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends in genetics : TIG*, 20(1), 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.11.004>
63. Oktari, A., Supriatin, Y., Kamal, M., & Syafrullah, H. (2017). The Bacterial Endospore Stain on Schaeffer Fulton using Variation of Methylene Blue Solution. *Journal of Physics: Conference Series*, 812, 012066. doi:10.1088/1742-6596/812/1/012066
64. Oliver-Kozup, H., Martin, K. H., Martin, K. H., Schwegler-Berry, D., Green, B. J., Betts, C., et al. (2013). The Group A Streptococcal Collagen-like Protein-1, Sc11, Mediates Biofilm Formation by Targeting the Extra Domain A-Containing Variant of Cellular Fibronectin Expressed in Wounded Tissue. *Mol. Microbiol.* 87 (3), 672–689. doi:10.1111/mmi.12125
65. Oliver-Kozup, H. A., Elliott, M., Bachert, B. A., Martin, K. H., Reid, S. D., Schwegler-Berry, D. E., et al. (2011). The Streptococcal Collagen-like Protein-1 (Sc11) Is a Significant Determinant for Biofilm Formation by Group a Streptococcus. *BMC Microbiol.* 11 (1), 262. doi:10.1186/1471-2180-11-262
66. Ottani, V., Martini, D., Franchi, M., Ruggeri, A., & Raspanti, M. (2002). Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 33(7-8), 587–596. [https://doi.org/10.1016/s0968-4328\(02\)00033-1](https://doi.org/10.1016/s0968-4328(02)00033-1)
67. Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., & Berthod, F. (2010). Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*, 3(3), 1863–1887. <https://doi.org/10.3390/ma3031863>
68. Paterson, G. K., Nieminen, L., Jefferies, J. M., & Mitchell, T. J. (2008). PclA, a pneumococcal collagen-like protein with selected strain distribution, contributes to adherence and invasion of host cells. *FEMS microbiology letters*, 285(2), 170–176. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01217.x>
69. Peng, Y. Y., Yoshizumi, A., Danon, S. J., Glattauer, V., Prokopenko, O., Mirochnitchenko, O., Yu, Z., Inouye, M., Werkmeister, J. A., Brodsky, B., & Ramshaw, J. A. (2010). A *Streptococcus pyogenes* derived collagen-like protein as a non-cytotoxic and non-immunogenic cross-linkable biomaterial. *Biomaterials*, 31(10), 2755–2761. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.040>
70. Peng, Y. Y., Howell, L., Stoichevska, V., Werkmeister, J. A., Dumsday, G. J., & Ramshaw, J. A. (2012). Towards scalable production of a collagen-like protein from *Streptococcus*

- pyogenes for biomedical applications. *Microbial cell factories*, 11, 146. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-146>
71. Peng, Y. Y., Stoichevska, V., Schacht, K., Werkmeister, J. A., & Ramshaw, J. A. (2014). Engineering multiple biological functional motifs into a blank collagen-like protein template from *Streptococcus pyogenes*. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 102(7), 2189–2196. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34898>
72. Permpoonpattana, P., Tolls, E. H., Nadem, R., Tan, S., Brisson, A., & Cutting, S. M. (2011). Surface layers of *Clostridium difficile* endospores. *Journal of bacteriology*, 193(23), 6461–6470. <https://doi.org/10.1128/JB.05182-11>
73. Perret, S., Merle, C., Bernocco, S., Berland, P., Garrone, R., Hulmes, D. J., Theisen, M., & Ruggiero, F. (2001). Unhydroxylated triple helical collagen I produced in transgenic plants provides new clues on the role of hydroxyproline in collagen folding and fibril formation. *The Journal of biological chemistry*, 276(47), 43693–43698. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105507200>
74. Persikov, A. V., Ramshaw, J. A., Kirkpatrick, A., & Brodsky, B. (2000). Amino acid propensities for the collagen triple-helix. *Biochemistry*, 39(48), 14960–14967. <https://doi.org/10.1021/bi001560d>
75. Picker, J., Lan, Z., Arora, S., Green, M., Hahn, M., Cosgriff-Hernandez, E., & Hook, M. (2022). Prokaryotic Collagen-Like Proteins as Novel Biomaterials. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 840939. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.840939>
76. Pizarro-Guajardo, M., Olguín-Araneda, V., Barra-Carrasco, J., Brito-Silva, C., Sarker, M. R., & Paredes-Sabja, D. (2014). Characterization of the collagen-like exosporium protein, BclA1, of *Clostridium difficile* spores. *Anaerobe*, 25, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.11.003>
77. Qiu, Y., Zhai, C., Chen, L., Liu, X., & Yeo, J. (2023). Current Insights on the Diverse Structures and Functions in Bacterial Collagen-like Proteins. *ACS biomaterials science & engineering*, 9(7), 3778–3795. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.1c00018>
78. Ramachandran, G. N., & Kartha, G. (1955). Structure of Collagen. *Nature*, 176(4482), 593–595. doi:10.1038/176593a0
79. Ramshaw, J. A. M., & Werkmeister, J. A. (2017). 2.23 Recombinant Proteins as Emerging Biomaterials. *Comprehensive Biomaterials II*, 512–531. doi:10.1016/b978-0-12-803581-8.09330-9
80. Rasmussen, M., Edén, A., & Björck, L. (2000). SclA, a novel collagen-like surface protein of *Streptococcus pyogenes*. *Infection and immunity*, 68(11), 6370–6377. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.11.6370-6377.2000>

81. Rasmussen, M., Jacobsson, M., & Björck, L. (2003). Genome-based identification and analysis of collagen-related structural motifs in bacterial and viral proteins. *The Journal of biological chemistry*, 278(34), 32313–32316. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304709200>
82. Ricard-Blum S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1), a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
83. Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
84. Sambrook, J., and Russell, R.W.(2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, N.Y.
85. Screen, H. R., Berk, D. E., Kadler, K. E., Ramirez, F., & Young, M. F. (2015). Tendon functional extracellular matrix. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 33(6), 793–799. <https://doi.org/10.1002/jor.22818>
86. Schnicker, N. J., & Dey, M. (2016). *Bacillus anthracis* Prolyl 4-Hydroxylase Modifies Collagen-like Substrates in Asymmetric Patterns. *The Journal of biological chemistry*, 291(25), 13360–13374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.725432>
87. Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*, 78, 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>
88. Singh, S.K., & Tripathi, T. (2020). Presence of Collagen-like Repeats in Bacteriophage–encoded Hyaluronate Lyase. *Journal of Scientific Research*, 64, 193-197
89. Skaringaitė I., 2021. Termofilinių *Geobacillus lituanicus* N-3 bakterijų kolageno tipo GclB baltymo heterologinė raiška mielėse *Saccharomyces cerevisiae*. Magistro darbas. Vilniaus universitetas, Vilnius.
90. Sobczak-Kupiec, A., Drabczyk, A., Florkiewicz, W., Głąb, M., Kudłacik-Kramarczyk, S., Słota, D., Tomala, A., & Tyliszczak, B. (2021). Review of the Applications of Biomedical Compositions Containing Hydroxyapatite and Collagen Modified by Bioactive Components. *Materials (Basel, Switzerland)*, 14(9), 2096. <https://doi.org/10.3390/ma14092096>
91. Steichen, C., Chen, P., Kearney, J. F., & Turnbough, C. L., Jr (2003). Identification of the immunodominant protein and other proteins of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Journal of bacteriology*, 185(6), 1903–1910. <https://doi.org/10.1128/JB.185.6.1903-1910.2003>
92. Stewart G. C. (2015). The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 79(4), 437–457. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-15>
93. Stimson, E., Virji, M., Makepeace, K., Dell, A., Morris, H. R., Payne, G., Saunders, J. R., Jennings, M. P., Barker, S., & Panico, M. (1995). Meningococcal pilin: a glycoprotein

- substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose. *Molecular microbiology*, 17(6), 1201–1214. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17061201.x
94. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., & Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in enzymology*, 185, 60–89. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85008-c](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85008-c)
95. Sylvestre, P., Couture-Tosi, E., & Mock, M. (2002). A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Molecular microbiology*, 45(1), 169–178. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.03000.x>
96. Sylvestre, P., Couture-Tosi, E., & Mock, M. (2003). Polymorphism in the collagen-like region of the *Bacillus anthracis* BclA protein leads to variation in exosporium filament length. *Journal of bacteriology*, 185(5), 1555–1563. <https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1555-1563.2003>
97. Szymanski, C. M., Yao, R., Ewing, C. P., Trust, T. J., & Guerry, P. (1999). Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Molecular microbiology*, 32(5), 1022–1030. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01415.x>
98. Thompson, B. M., Waller, L. N., Fox, K. F., Fox, A., & Stewart, G. C. (2007). The BclB glycoprotein of *Bacillus anthracis* is involved in exosporium integrity. *Journal of bacteriology*, 189(18), 6704–6713. <https://doi.org/10.1128/JB.00762-07>
99. Thompson, B. M., & Stewart, G. C. (2008). Targeting of the BclA and BclB proteins to the *Bacillus anthracis* spore surface. *Molecular microbiology*, 70(2), 421–434. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06420.x>
100. Thompson, B. M., Hoelscher, B. C., Driks, A., & Stewart, G. C. (2012). Assembly of the BclB glycoprotein into the exosporium and evidence for its role in the formation of the exosporium 'cap' structure in *Bacillus anthracis*. *Molecular microbiology*, 86(5), 1073–1084. <https://doi.org/10.1111/mmi.12042>
101. Wang H. (2021). A Review of the Effects of Collagen Treatment in Clinical Studies. *Polymers*, 13(22), 3868. <https://doi.org/10.3390/polym13223868>
102. Wang, J., Hu, J., Yuan, X., Li, Y., Song, L., & Xu, F. (2022). Recombinant collagen hydrogels induced by disulfide bonds. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 110(11), 1774–1785. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37427>
103. Werkmeister, J. A., & Ramshaw, J. A. (2012). Recombinant protein scaffolds for tissue engineering. *Biomedical materials (Bristol, England)*, 7(1), 012002. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/7/1/012002>

104. Whatmore A. M. (2001). *Streptococcus pyogenes* sclB encodes a putative hypervariable surface protein with a collagen-like repetitive structure. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 2), 419–429. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-2-419>
105. Xu, Y., Keene, D. R., Bujnicki, J. M., Höök, M., & Lukomski, S. (2002). Streptococcal Scl1 and Scl2 proteins form collagen-like triple helices. *The Journal of biological chemistry*, 277(30), 27312–27318. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201163200>
106. Xu, X., Gan, Q., Clough, R. C., Pappu, K. M., Howard, J. A., Baez, J. A., & Wang, K. (2010). Hydroxylation of recombinant human collagen type I alpha 1 in transgenic maize co-expressed with a recombinant human prolyl 4-hydroxylase. *BMC Biotechnology*, 11(1), 69. [doi:10.1186/1472-6750-11-69](https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-69)
107. Yamada, T. (2011). Giant viruses in the environment: their origins and evolution. *Current Opinion in Virology*, 1(1), 58–62. [doi:10.1016/j.coviro.2011.05](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.05)
108. Yoshizumi, A., Yu, Z., Silva, T., Thiagarajan, G., Ramshaw, J. A., Inouye, M., & Brodsky, B. (2009). Self-association of streptococcus pyogenes collagen-like constructs into higher order structures. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 18(6), 1241–1251. <https://doi.org/10.1002/pro.134>
109. Yoshizumi, A., Fletcher, J. M., Yu, Z., Persikov, A. V., Bartlett, G. J., Boyle, A. L., Vincent, T. L., Woolfson, D. N., & Brodsky, B. (2011). Designed coiled coils promote folding of a recombinant bacterial collagen. *The Journal of biological chemistry*, 286(20), 17512–17520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.217364>
110. Yu, Z., An, B., Ramshaw, J. A., & Brodsky, B. (2014). Bacterial collagen-like proteins that form triple-helical structures. *Journal of structural biology*, 186(3), 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.01.003>
111. Zhao, X., Wang, R., Shang, Q., Hao, H., Li, Y., Zhang, Y., et al. (2016). The New Flagella-Associated Collagen-like Proteins ClpB and ClpC of *Bacillus Amyloliquefaciens* FZB42 Are Involved in Bacterial Motility. *Microbiol. Res.* 184 (March), 25–31. [doi:10.1016/j.micres.2015.12.004](https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.004)
112. Zhao, X., Wang, Y., Shang, Q., Li, Y., Hao, H., Zhang, Y., et al. (2015). Collagen-Like Proteins (ClpA, ClpB, ClpC, and ClpD) Are Required for Biofilm Formation and Adhesion to Plant Roots by *Bacillus Amyloliquefaciens* FZB42. *PLOS ONE* 10 (2), e0117414. [doi:10.1371/journal.pone.0117414](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117414)