Kvalifikuotas elektroninis parašas
KIPRAS ČEKANAUSKAS
2024-05-27 15:59:26 GMT+3
Paskirtis: Parašas
Powered by Dokobit

VILNIAUS UNIVERSITETAS

GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Kipras Čekanauskas

Molekulinė biotechnologija

Bakalauro baigiamasis darbas

REGIO-SELEKTYVIŲ ESTERAZIŲ TAIKYMAS NUKLEOZIDŲ MODIFIKAVIMUI

Darbas atliktas VU GMC
Biochemijos institutas

Darbo vadovė
dr. Nina Urbelienė

Vilnius, 2024

Kvalifikuotas elektroninis parašas
NINA URBELIENĖ
2024-05-27 11:16:35 GMT+3
Paskirtis: Parašas
Powered by Dokobit

VILNIUS UNIVERSITY

LIFE SCIENCES CENTRE

Kipras Čekanauskas

Molecular biotechnology

Bachelor thesis

APPLICATION OF REGIO-SELECTIVE ESTERASES FOR NUCLEOSIDE MODIFICATION

Scientific adviser
dr. Nina Urbelienė

Vilnius, 2024

TURINYS

ĮVADAS 5
1. LITERATŪROS APŽVALGA 6
1.1 Esterazės 6
1.1.1 Esterazių vykdomos reakcijos 6
1.1.2 α/β hidrolazių superšeima 6
1.1.3 SGNH/GDSL hidrolazių superšeima 7
1.1.4 Esterazių pritaikymas 8
1.2 Nukleotidai ir nukleozidai 11
1.2.1 Uridino biologinė svarba 11
1.3.2 Modifikuotų nukleozidų pritaikymas 12
1.3.3 Esterazių panaudojimas nukleozidų modifikacijai 14
2. PRIETAISAI IR MEDŽIAGOS 16
2.1 Prietaisai 16
2.2 Rinkiniai 16
2.3 Tirpalai ir reagentai 16
2.4 Kamienai 18
2.5 DNR vektoriai 18
2.6 Esterazės 18
2.7 Terpės 19
2.8 Pradmenys 19
3. METODAI 19
3.1 Kompetentinių ląstelių paruošimas 19
3.2 Tikslinio geno padauginimas PGR metodu 19
3.3 DNR Elektroforezė 20
3.4 DNR fragmento gryninimas iš agarozės gelio 20
3.5 DNR fragmento gryninimas iš PGR mišinio 20
3.6 Tikslinio geno ir vektoriaus ligavimas 20
3.7 Elektroporacija 21

3.8 Kolonijų PGR 21
3.9 Plazmidinės DNR gryninimas ir sekoskaita 21
3.10 Plazmidinės DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis 22
3.11 Biomasės auginimas ir genų raiška 22
3.12 Ląstelių ardymas ultragarsu 22
3.13 Tikslinių fermentų gryninimas gimineingumo Ni-NTA chromatografijos būdu..... 22
3.14 Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis (SDS-PAGE) sąlygomis 22
3.15 Baltymo koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu..... 22
3.16 Hidrolizės reakcijos produktų nustatymas plonasluoksnės chromatografijos metodu.... 23
3.17 Hidrolizės reakcijų produktų nustatymas HPLC-MS metodu 23
4. REZULTATAI 23
4.1 Esterazių atranka M9 terpėje 23
4.2 Atrinktų esterazių klonavimas ir biomasės auginimas 25
4.3 Biomasės auginimo sąlygų optimizavimas 26
4.4 Hidrolizės reakcijos 27
5. IŠVADOS 30
6. LITERATŪRA 31
SANTRAUKA 34
SUMMARY 35

ĮVADAS

Esterazės (EC 3.1.1.x., kur x priklauso nuo substrato) yra hidrolazių klasės fermentai, katalizuojantys esterinių jungčių skilimą ir susidarymą. Tikslesnis šių fermentų pavadinimas būtų karboksirūgščių esterių hidrolazės. Šie fermentai yra plačiai pritaikomi įvairiose pramonės bei medicinos srityse dėl jų gebėjimo vykdyti regio- ar enantio-selektyvias reakcijas, kurių metu esterazės gali selektyviai reaguoti su tam tikromis molekulėmis ar junginiais. Tai suteikia galimybę gauti regio- ar enantio-selektyvius produktus, kuriuos sunku ar net neįmanoma gauti cheminės sintezės būdu. Taip pat esterazių pranašumas yra tame, kad jos nereikalauja kofaktorių, be to turi daug įvairių subtratų. Šie faktoriai lemia didelį mokslininkų susidomėjimą esterazėmis bei naujų tyrimų vykdymą, siekiant atrasti naujas esterazes bei jų pritaikymo būdus.

Šio darbo metu naudojamos esterazės, antinkros Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje (VU, GMC) iš žemės mėginių paruošus metogenomines bibliotekas. Tolimesnė esterazių atranka buvo vykdoma uracilo auksotrofiniame kamiene, selektyvioje M9 terpėje, norint atrinkti esterazes, hidrolizuojančias modifikuotus uridino esterius. Toliau tyrime šios atrinktos esterazės buvo naudojamos nukleozidų modifikavimui, šiuo atveju uridino analogų. Kaip substratai naudoti 2‘,3‘,5‘-tri-*O*-acetiluridinas (TAU), 2‘,3‘,5‘-tri-O-heksanoiluridinas (THU). TAU yra vaistas, vartojamas pacientų, gavusių per didelę dozę fluorouracilo arba kapecitabino, arba kuriems pasireiškė toksinis poveikis širdžiai ar centrinei nervų sistemai, arba kitas sunkus šalutinis poveikis. Tuo tarpu THU funkcija nežinoma.

Darbo tikslas:

Įvertinti esterazių regio-selektyvumą uridino esterių atžvilgiu.

Darbo uždaviniai:

1. Atlikti uridino esterius hidrolizuojančių esterazių atranką selektyvioje M9 terpėje *E. coli* uracilo auksotrofo kamiene.
2. Klonuoti dviejų fermentų genus ir optimizuoti šių genų raišką.
3. Optimizuoti trijų fermentų biosintezės sąlygas *E. coli* ląstelėse.
4. Nustatyti esterazių regio-selektyvumą su uridino esteriais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

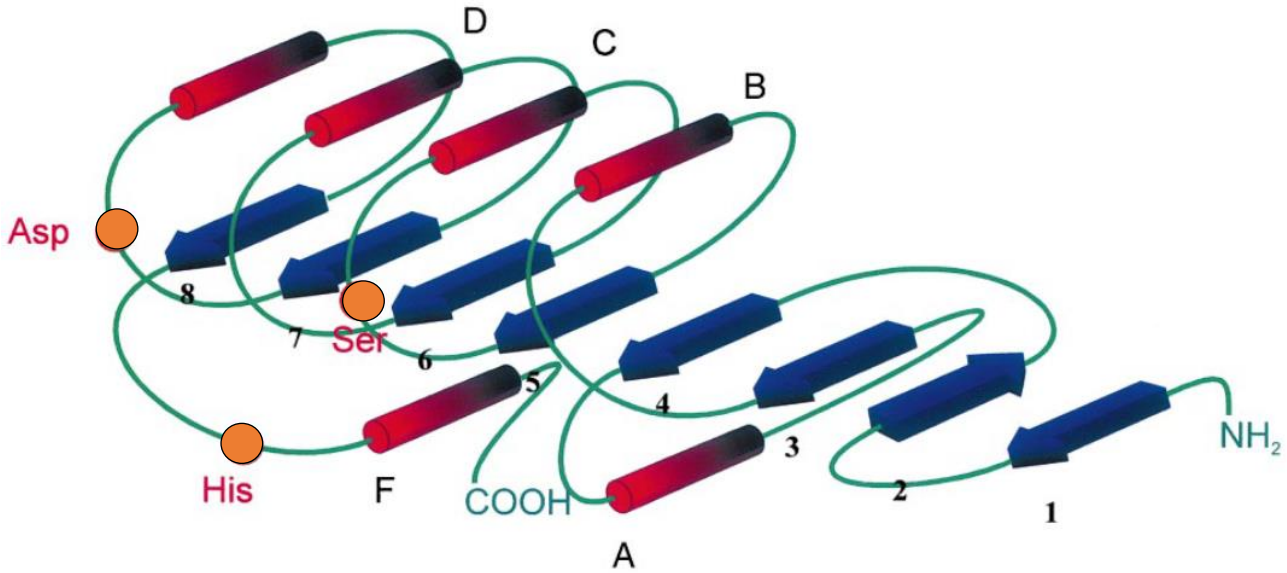
1.1 Esterazės

1.1.1 Esterazių vykdomos reakcijos

Esterazės gali katalizuoti trijų tipų reakcijas: esterifikacijos, interesterifikacijos ir transesterifikacijos reakcijas, bei gali pasižymėti regio- ir (arba) enantio-selektyvumu [1]. Šie fermentai įdomūs ir dėl to, kad jiems nereikia kofaktorių, jie paprastai yra gana stabilūs ir netgi aktyvūs organiniuose tirpikliuose. Pagal hidrolizuojamo substrato alifatinės grandinės ilgį karboksirūgščių esterių hidrolazės sąlyginai skirstomos į esterazes ir lipazes. Esterazės hidrolizuoja trumpos grandinės karboksirūgščių esterius ($C \leq 12$), o lipazės hidrolizuoja netirpius ilgos grandinės ($C \geq 12$) trigliceridus ir antrinius alkoholių esterius [2]. Abi šios klasės turi tam tikrų bendrų bruožų, tačiau taip pat pasižymi ir kai kuriomis unikaliomis savybėmis. Pagal pirminę ir tretines struktūras karboksirūgščių esterių hidrolazės gali priklausyti α/β hidrolazėms arba SGNH/GDSL hidrolazėms.

1.1.2 α/β hidrolazių superšeima

α/β-hidrolazės yra sparčiai auganti fermentų šeima, kuriai būdinga bendra struktūra ir panašus aktyvusis centras. α/β-hidrolazės struktūrą sudaro centrinė β klostė, įsiterpusi tarp dviejų α-spiralių [3]. Katalizinę triadą sudaro nukleofilas (serinas, aspartatas arba cisteinas), histidinas, katalitinė rūgštis (aspartatas arba glutamatas) ir dvi arba trys aminorūgštys, kurios sudaro oksianiono kišenę (1 pav.). Nepaisant didelio struktūrinio šerdies domeno ir katalitinio mechanizmo panašumo, α/β-hidrolazės pasižymi didele sekų įvairove ir apima fermentus, pasižyminčius didele katalizinio aktyvumo įvairove, pavyzdžiui, acetilcholinesterazes, aciltransferazes, amidazes, dehalogenazes, dienlaktono hidrolazes, epoksidų hidrolazes, hidroksinitrilo liazes, lipazes, peroksidazes, proteazes ir tioesterazes [4].

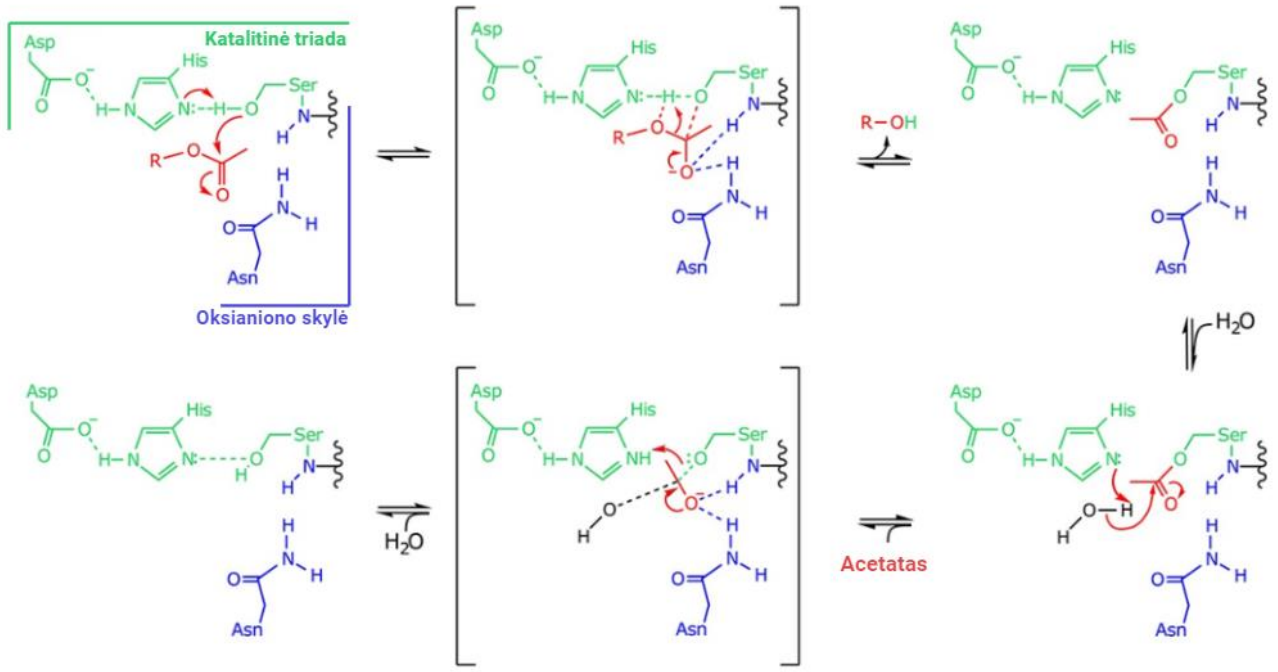


1 pav. Schematiškai pavaizduota α/β hidrolazės struktūra. β-klostės (1-8) pavaizduotos kaip mėlynos rodyklės, α-spiralės (A-F) kaip raudoni stulpeliai. Katalizinės triados aminorūgščių santykinė padėtis pažymėta oranžiniais apskritimais [2].

Viena iš α/β hidrolazių šeimai priklausanti – acetilcholinesterazė (AChE) yra aptinkama žmogaus nervų sistemoje [5]. Tai yra vienas svarbiausių fermentų, lemiančių nervų reakciją ir funkciją. AChE katalizuoja acilcholino esterių hidrolizę, o jos specifiškumas yra susijęs su acetilcholinu. Acetilcholinas yra įprastas neuromediatorius, aptinkamas centrinėje ir periferinėje nervų sistemoje. Kai acetilcholinas išsiskiria iš aksono galo, jis juda per sinapsinį plyšį ir prisijungia prie kitoje sinapsės pusėje esančio receptoriaus. Periferinėje nervų sistemoje acetilcholinas yra "nervų ir raumenų jungtyje", kur jis kontroliuoja raumenų susitraukimą. Acetilcholinas taip pat naudojamas autonominėje nervų sistemoje. Acetylcholino viduląstelinį poveikį sukelia nikotininių ir muskarininių acetilcholino receptorių (AChR) aktyvinimas. AChE nutraukia neuronų impulsų perdavimą, greitai hidrolizuodama acetilcholiną [6].

1.1.3 SGNH/GDSL hidrolazių superšeima

SGNH hidrolazių superšeima buvo atrasta maždaug prieš 20 metų ir iš pradžių pavadinta GDSL šeima, atsižvelgiant į konservatyvų aktyviajame centre esančio serino motyvą [7]. SGNH hidrolazių superšeimai priklauso 16 šeimų ir šiuo metu ji apima daugiau kaip 89 000 narių. Šiai didelei ir įvairiai superšeimai priklauso įvairias funkcijas atliekantys fermentai, paplitę visose gyvybės formose. Pavadinimas "SGNH hidrolazių superšeima" buvo pasiūlytas, atsižvelgiant į griežtai konservatyvias serino (Ser), glicino (Gly), asparagino (Asn) ir histidino (His) amino rūgščių liekanas, esančias atitinkamai I, II, III ir V blokuose, kurie sudaro SGNH hidrolazių katalizinį centrą per konservatyvų vandenilinių ryšių tinklą, jungiantį katalizinę triadą, katalizinio centro liekanas ir aplinkines vandens molekules [8], [9]. Bendrai suprantamas SGNH hidrolazės mechanizmas apima nukleofilinę esterio substrato karbonilo anglies ataką nukleofiline Ser liekana. Susidariusį tetraedrinį oksianiono tarpinį junginį, kuris susidaro šiame mechanizmo etape, stabilizuoja teigiamai įkrauta kišenė, vadinama oksianiono plyšiu, kurią formuoja I bloko Ser ir II bloko Gly liekanų griaučių amidai ir III bloko Asn liekanos šoninės grandinės amidas. Pastebėta, kad susidaro kovalentinis fermentinis tarpinis junginys, kuris paprastai laikomas SGNH hidrolazės mechanizmo požymiu, o susidariusį oksianjono produktą fermentas protonizuoja, tikėtina, per katalizatorių His, ir susidaro alkoholio koproduktas. Kitame etape vandens molekulė laisvai priartėja prie kovalentinio acil-fermento tarpinio junginio ir yra deprotonizuojama bazinio His, pradėdama karbonilo anglies nukleofilinę ataką. Panašiai susidariusį oksianjono tarpinį junginį stabilizuoja oksianjono plyšys ir jis suyra, sudarydamas acilo koproduktą ir laisvą fermentą, taip užbaigdamas katalizės ciklą (2 pav.).



2 pav. SGNH hidrolazės veikimo mechanizmas. Nukleofilinė esterio karbonilo ataka (raudona) įvyksta veikiant Ser-His-Asp triadai (žalia), o susidariusį tarpinį oksianioną stabilizuoja teigiamai įkrauta kišenė, dažnai vadinama oksianiono plyšiu (mėlyna), ir kartu išsiskiria alkoholio koproduktas. Katalizės ciklo metu susidaro kovalentinis acetilo-fermento tarpinis junginys, kurį vėliau atakuoja vandens molekulė, kad susidarytų acetato koproduktas ir laisvas fermentas [9].

1.1.4 Esterazių pritaikymas

Istoriškai esterazių pavadinimai kilo pagal jų naudojamą substratą. Yra daug skirtingų esterazių su savitais substratais, todėl pramonėje yra įvairių jų pritaikymo būdų (1 lentelė). Vienas iš pagrindinių pavyzdžių – platus naudojimas maisto pramonėje. Esterazės atlieka svarbų vaidmenį maisto produktų perdirbimo procese. Jos naudojamos įvairių maisto produktų skoniui reguliuoti, aromatui sustiprinti ir tekstūrai pagerinti. Siekiant mažos vertės riebalus ir aliejus paversti vertingesniais, esterazės ir lipazės naudojamos kaip transesterifikacijos katalizatoriai. Pavyzdžiui, *Lactobacillus casei* CL96 esterazės ir lipazės yra plačiai naudojamos pieno riebalų hidrolizei, siekiant pagerinti skonį gaminant su sūriu susijusius produktus [10]. Jos taip pat naudojamos perdirbant vaisių sultis, kad išskiriant lakiuosius esterius pagerintų aromatą ir skonį. Vaisinis braškių aromatas buvo sukurtas naudojant esterazes ir lipazes, gautas iš *Pseudomonas fragi* [11]. Dideli kiekiai fruktozės kukurūzų sirupo saldiklio gaminami iš kukurūzų krakmolo, naudojant hidrolizinius fermentus. Taip pat nustatyta, kad mielių esterazė atlieka svarbų vaidmenį nustatant galutinį esterio kiekį tokiuose produktuose, kaip membranomis filtruotas alus ir buteliuose fermentuotas alus [12]. Be acetiltransferazės, *Saccharomyces cerevisiae* esterazė atlieka svarbų vaidmenį gaminant izoamilo acetatą, kuris turi didelę reikšmę nustatant sakės skonį [13]. Šiose pramonės šakose polimerų junginiai taip pat naudojami kaip pakuotės arba kaip sudedamoji dalis jų gamyboje. Taip susidaro kai kurie žmogaus sukurti teršalai, t. y. plastikai, poliuretanas, poliesteriai, polietilenglikolio adipatas ir kt. Tokiems komponentams skaidyti plačiai naudojamos cholesterolio esterazė ir poliuretanazė [14]. Poliuretanazės iš *Pseudomonas chlororophis* ir *Pseudomonas aeruginosa*, plačiai naudojamos poliesteriams skaidyti, yra panašios į karboksilesterazes ir acetilcholinesterazes [15].

Kitas svarbus esterazių pritaikymo būdas yra vaistų pramonėje. Esterazė atlieka svarbų vaidmenį sintetinant chiralinius vaistus, kurie yra labai naudingi gydant tam tikras ligas [2]. Pavyzdžiui, esterazė iš *Trichosporon brassicae* buvo plačiai naudojama optiškai gryno (*S*)- ir (*R*)-ketoprofeno [2(3-benzoilfenil) propiono rūgšties] gamybai, kuris labai veiksmingai mažina uždegimą ir malšina skausmą, atsirandantį dėl artrito, nudegimo saulėje, menstruacijų ir karščiavimo [16]. Taip pat *Pseudomonas* rūšies esterazės gamina komerciškai prieinamus nesteroidinius priešuždegiminius vaistus, tokius kaip ibuprofenas [(*R, S*)-2(4-izobutilfenil) propiono rūgštis] [17]. Žmogaus serumo esterazė (karboksilesterazė) naudojama provaistui etopozidui hidrolizuoti ir jo toksiškumui mažinti. Etopozido dariniai plačiai naudojami kaip labai veiksmingi priešvėžiniai vaistai nuo plataus spektro navikų, įskaitant vaikų vėžį, pavyzdžiui, ūmines limfomas, rabdomiosarkomas ir neuroblastomas. [18].

Esterazės gali būti pritaikomos ir žemės ūkyje. Fosfotriesteriai, pavyzdžiui, sintetiniai fosforo organiniai junginiai, tokie kaip kumafosas ir jo oksono darinys kroksonas, plačiai naudojami kaip insekticidai ir nematicidai. Šių junginių likučiai toksiškai veikia aplinką ir gali patekti į maisto produktus. Todėl fosfotriesterazės iš *Brevundimonas diminuta* ir *Alteromonas* rūšių buvo plačiai naudojamos šiems fosforo organiniams junginiams detoksikuoti ir (arba) skaidyti [19]. Esterių turintys organofosfatų, karbamatų ir piretroidų pesticidai naudojami visame pasaulyje siekiant sumažinti kenkėjų poveikį ir padidinti žemės ūkio produkcijos derlingumą. Apie šių cheminių medžiagų toksiškumą žmonėms ir kitiems organizmams buvo plačiai deklaruojama [20]. Cheminiu požiūriu šių pesticidų pirminės struktūros jungtis yra esterinė, kurią gali hidrolizuoti tam tikros esterazės, dėl ko pagreitinamas minėtų pesticidų galutinis skilimas [21].

Esterazės plačiai naudojamos ir kitose pramonės šakose, pavyzdžiui, celiuliozės, popieriaus, tekstilės ir odos pramonėje. Sterolių esterazė iš *Ophiostoma piceae* naudojama popieriaus gamyboje, nes ji veiksmingai hidrolizuoja trigliceridus ir sterolių esterius. Be to, sterilo esterazė ir cholesterilo esterazė iš *Pseudomonas, Chromobacterium viscosum* ir *Candida rugosa* taip pat atlieka svarbų vaidmenį mažinant dervos problemas popieriaus gamybos metu. Dervų nuosėdos, darančios neigiamą poveikį popieriaus mašinų našumui ir popieriaus kokybei, susidaro gaminant spygliuočių ir kietmedžio popieriaus masę [22].

1 lentelė Esterazių pritaikymo pavyzdžiai [23]

Esterazės tipas	Pritaikymo būdas	Kilmė
Acetilcholinesterazė	Naujų vaistų nuo šistosomozės kūrimas, organofosfatų biomarkeriai jūros aplinkoje, pesticidų ir sunkiųjų metalų sukeltų apsinuodijimų nustatymas.	*Schistosoma* rūšių, *Mytilus edulis, Drawida willsi* kraujas
Acetilo esterazė, metilo esterazė, acetilgliukomanano esterazė ir acetil-ksilano esterazė	Acetilo ir metilo liekanų išsiskyrimas iš ląstelės sienelės, celiuliozės skilimas, acto rūgšties gamyba iš *O*-acetil-galaktogliukomanano ir *O*-acetil-4-*O*-metilgliukoronoksilano	*Aspergillus, Trichoderma* rūšys

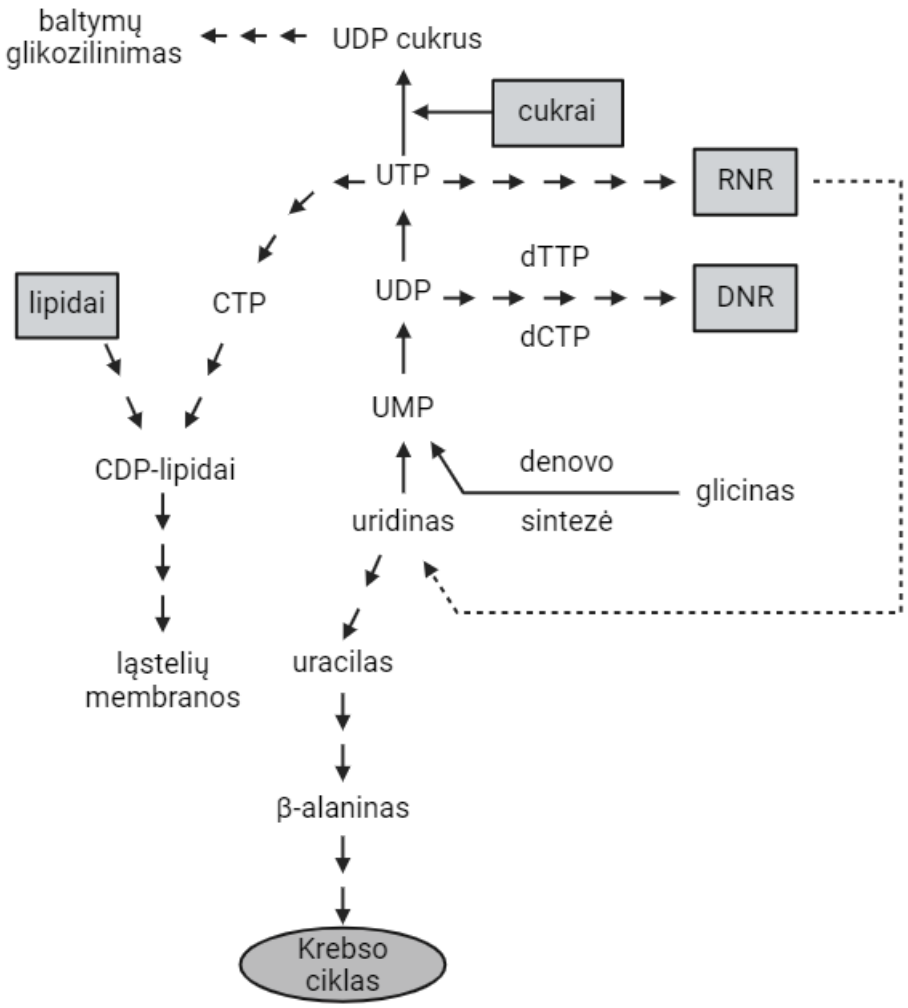
Esterazės tipas	Pritaikymo būdas	Kilmė
Arilo esterazė	Skirtas maisto produktų ir alkoholinių gėrimų aromatui kurti	*Saccharomyces cerevisiae*
Karboksilesterazės	Etilenglikolio dibenzoato esterio skaidymas, malationo toksiškumo mažinimas, aspirino ir fosforo organinių insekticidų hidrolizė, metabolinio atsparumo pireteroidiniams insekticidams nustatymas, 1,2-*O*-izopropilidenegliceroliо esterių racematų sintezė	*Streptomyces lividans*, žiurkių ir jūrų kiaulytės kepenys, *Lucilia cuprina*, *Pediculus capitis*, *Bacillus coagulans*
Cefalosporino acetilo esterazė	Cefalosporino darinių acetilo grupių nustatymas	*Burkholderia gladioli*
Cholesterolio esterazė ir pseudocholinesterazė, cholinesterazė	Poli(eterio-uretano) skaidymas, būtinas natrio pompos veikimui įvairiuose audiniuose	Žiurkių kepenys ir kiti šaltiniai
Cinamoloilo esterio hidrolazė	Augalų ląstelių sienelių skaidymas	*Piromyces equi*
Eritromicino esterazė	Žmonių, paukščių ir žuvų klinikinė medicina	*Pseudomonas* rūšys
Ferulo rūgšties esterazė	Ferulo rūgšties išsiskyrimas iš augalų ląstelių sienelių	*Aspergillus niger*, *Pencillium* rūšys
Feruloilolio esterazė	Kosmetikos ir kvepalų pramonėje naudojamo pentilferulato esterio sintezėje, popieriaus fabriko nuotekų nukenksminimui	*Aspergillus niger*, *Streptomyces avermitilis*
Esterazės žmogaus organizme	Retinilo palmitato virtimas retinoliu, prieš uždegimo ląsteles atsparūs lizosominiai fermentai, dantų kompozitų biodegradacija, aspirino ir nenarkotinių analgetikų metabolizmas, proparacetamolio virtimas paracetamoliu, acetilsalicilato hidrolizė iki salicilo rūgšties plazmoje, oseltamiviro fosfato virtimas oseltamiviro karboksilatu, etopozido provaistų aktyvinimas, sukcinilcholino ir prokaino hidrolizė.	

Esterazės tipas	Pritaikymo būdas	Kilmė
Metiljasmonato esterazė	Abscizo rūgšties, indolo-3-acto rūgšties ir riebalų rūgščių metilo esterių hidrolizė	*Lycopersicon esculetum*
Fosfotriesterazė	Hidrolizuotas kumafoso ir kroksono produktas	*Pseudomonas monteilli*
Kiaulių kepenų esterazė ir rekombinantinė kiaulių kepenų esterazė	Centrosimetrinio cikloheksanediacetato desimetrizacija, enantioselektyvi levofloksacino gamyba iš ofloksacino butilo esterio	
Poliuretanazė	Poliesterio poliuretano ir polieterio poliuretano degradacija	*Comamonas acidovorans*, *Pseudomonas chlororaphis*
Rekombinantinė esterazė (PF1-K)	(S)-flurbiprofeno paruošimas	*Pseudomonas* rūšys
Sterolio esterazė, sterilo esterazė ir cholesterilo esterazė	Popieriaus gamyba, siekiant sumažinti dervos sukeliamas problemas gaminant popierių	*Ophiostoma piceae*, *Pseudomonas* rūšys, *Chromobacterium*

1.2 Nukleotidai ir nukleozidai

1.2.1 Uridino biologinė svarba

Uridinas kaip ir citidinas ar timidinas yra *N*-glikozilintas pirimidinas ir atlieka daug svarbių funkcijų žmogaus organizme. Uridino biologinis prieinamumas ypač svarbus RNR ir biomembranų sintezei, susidarant pirimidino nukleotidų ir lipidų konjugatams, todėl yra būtinas ląstelių funkcijoms ir augimui. Pirimidinai, gimininigi purinams, gali būti sintetinami *de novo* visuose organizmuose. Eukariotuose uridino 5‘-monofosfatas (UMP) sintetinamas *de novo* iš glicino arba fosforilinant uridiną uridinkinaze. Anabolizavus uridiną, susidaro uridino 5‘-difosfatas (UDP), kuris gali būti konjuguotas su įvairiais cukrais, pavyzdžiui, UDP-gliukoze ir UDP-galaktoze, kurie yra svarbūs baltymų glikozilinimui taip pat UDP gali būti paverčiamas deoksipirimidinais, kurie prisideda prie DNR sintezės. Pridėjus trečią fosfatinę grupę, susidaro uridino 5‘-trifosfatas (UTP). UTP gali būti naudojamas RNR sintezei. UTP taip pat gali būti paverčiamas į citidino 5‘-trifosfatą (CTP), kuris konjugavęs su įvairiais lipidais sudaro citidino 5‘-difosfato (CDP)-lipidus, pavyzdžiui, CDP-etanolaminą, iš kurių susidaro ląstelių membranų sudedamosios dalys. Uridino katabolizmo metu susidaro uracilas ir beta-alaninas, kurie gali patekti į Krebso ciklą [24] (3 pav.).

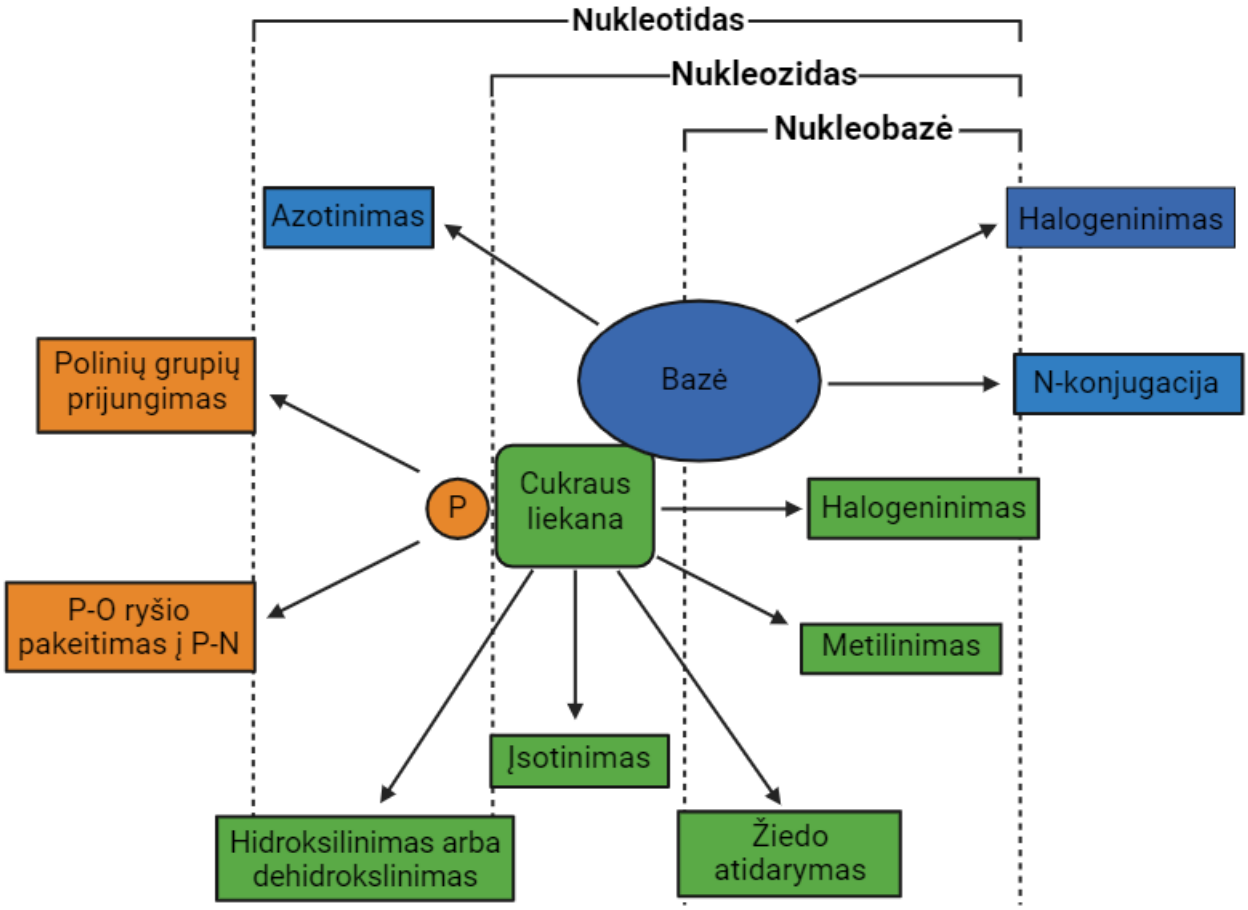


3 pav. Schema, vaizduojanti uridino ir kai kurių jo darinių metabolizmą. Kelios rodyklės žymi kelis fermentinius procesus, o pavienės rodyklės - pavienes fermentines reakcijas [24].

1.3.2 Modifikuotų nukleozidų pritaikymas

Nukleozido darinį sudaro nukleobazė, sujungta su cukraus žiedu, kurio modifikacijos skiriasi nuo natūralių nukleozidų modifikacijų. Nukleobazės modifikacijos apima acilinimą, halogeninimą ir azido grupių pridėjimą, o cukraus modifikacijos apima žiedo atidarymą, halogeninimą, acilinimą ir hidroksilinimą arba dehidroksilinimą [25],[26],[27] (4 pav.). Cukraus komponento modifikacijos daugiausia yra nukleozidų ribofuranozės arba deoksiribofuranozės, įskaitant cukraus komponento kitimą, deguonies pakeitimą kitu atomu, heteroatomų įterpimą į cukraus molekulę, žiedo dydžio pakeitimus ir pakeitimą acikliniais komponentais [28]. Dėl cheminių ir fizikinių savybių šios variacijos lemia reikšmingus molekulių funkcinius pasikeitimus [29]. Nustatyta, kad modifikuoti uridino dariniai yra farmakologiškai plačiai panaudojami, kuriems priklauso citotoksiniai junginiai, antibakteriniai ir priešgrybeliniai vaistai bei imunitetą slopinančios molekulės [30],[31]. Nukleozidų, analogų modifikacijos kelia ilgalaikį susidomėjimą dėl svarbios mokslinės reikšmės ir įvairių taikymo sričių. Chemiškai modifikuoti nukleozidų analogai klinikinėje praktikoje dažnai naudojami kaip priešvėžiniai ir antivirusiniai vaistai [32], skirti vėžiui ir virusų sukeltoms ligoms, pavyzdžiui, herpeso virusui, hepatito virusui ar AIDS gydyti. Struktūriškai naujų ir įvairių nukleozidų analogų junginių bibliotekų sukūrimas selektyviai modifikuojant natūralius nukleozidus gali paspartinti inovatyvių

vaistų kūrimo ir atradimo procesą. Ir šiam procesui labai svarbūs selektyvūs fermentai, tame tarpe ir esterazės.



4 pav. Nukleozidų ir nukleotidų analogų bendrosios struktūrinės ir cheminės modifikacijos [32].

Koronavirusas (SARS-CoV-2; šeima: *Coronaviridae*) yra atsakingas už neseniai įvykusią COVID-19 pandemiją. Nuo 2019 m. gruodžio mėn. buvo užregistruota daugiau kaip 676 mln. koronaviruso atvejų. Be to, XXI amžiuje atsirado vis daugiau naujų arba vėl pasikartojančių virusinių infekcijų, kurios taip pat toliau daro negatyvų poveikį žmonių sveikatai. Pavyzdžiui, dengė virusas (DENV; šeima: Flaviviridae) sukelia didelio masto epidemijas Azijoje, kasmet pasaulyje užregistruojama 390 mln. atvejų [33]. Šių virusų genomus sudaro teigiamo poveikio viengrandė RNR (ssRNA+). Nors buvo atlikta daug tyrimų, skirtų vaistų nuo šių virusų atradimui, tačiau dar nėra patvirtintas nė vienas virusams būdingas ir visiškai veiksmingas gydymas. Kalbant apie SARS-CoV-2, neatidėliotino naudojimo leidimo suteikimas neutralizuojantiems antikūnams labai padėjo sumažinti ligos sunkumą, tačiau jie yra brangūs ir veiksmingi tik SARS-CoV-2 infekcijos susiliejimo etape. Todėl būtina kurti naujus veiksmingus terapinius preparatus, visų pirma mažų molekulių junginius, skirtus kovai su COVID-19 ir daugeliu kitų virusinių ligų.

Teigiamos viengrandės RNR (ssRNA+) virusai, tokie kaip Dengė virusas (DENV) ir koronavirusas 2 (SARS-CoV-2) turi nuo RNR priklausomą RNR polimerazę, kuri yra perspektyvus taikinys plataus spektro antivirusiniams vaistams. Vienas iš tų vaistų yra 2-tiouridas, kurio veiksmingumas buvo nustatytas prieš ssRNA+ virusus, įskaitant Zikos virusą, geltonosios karštinės

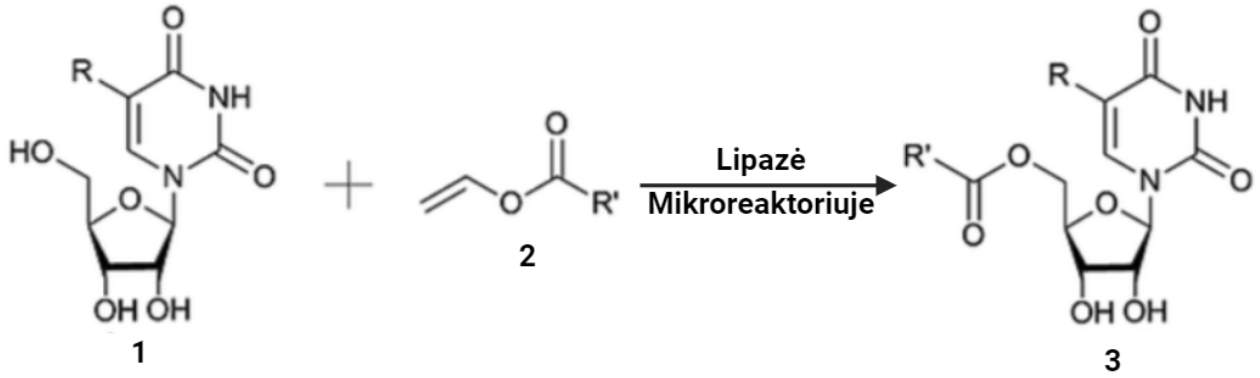
virusą, japoniškojo encefalito virusą, Vakarų Nilo virusą, Čikungunijos virusą ir kitus žmogaus koronavirusus. Buvo nustatyta, kad 2-tiouridinas kaip plataus spektro antivirusinis ribonukleozido analogas, pasižymi antivirusiniu aktyvumu prieš DENV. Be to, 2-tiouridinas slopino SARS-CoV-2 infekciją, įskaitant šiuo metu cirkuliuojančius Omicron subvariantus. Taip pat atliktas tyrimas, kuriame DENV arba SARS-CoV-2 užkrėstų pelių organizmas buvo gydymas 2-tiouridinu, kuris žymiai sumažino viruso dauginimąsi bei pagerino išgyvenamumą [34].

Nukleozidų analogų panaudojimų pavyzdžių, gydant vėžiu sergančius pacientus, yra nedaug. Citarabinas, kuris klinikinėje praktikoje vartojamas jau daugelį metų, padeda išgydyti mažiau nei 30 % visų suaugusių pacientų, o 6-merkaptopurinas, vartojamas gydant ūminę limfoblastinę leukemiją, padeda išgydyti šią ligą. Kiti citotoksiniai nukleozidų analogai suteikia laikiną atsaką arba prailgina išgyvenamumą, tačiau visiškai neišgydo. Todėl labai reikia pagerinti šiuo metu turimų citotoksinių nukleozidų analogų veiksmingumą. Kai kurių naujų nukleozidų analogų citotoksiškumo mechanizmai yra originalūs, palyginti su įprastais nukleozidų analogais. CNDAC ((1-(2-C-ciano-2-deoksibeta-d-arabino-pentofuranozil) citozinas) iš pradžių buvo susintetintas kaip citarabino analogas, galintis sukelti DNR grandinės lūžius po inkorporavimo į DNR dėl cianogrupių nukleofilinės atakos. Tiek CNDAC, tiek geriamasis CNDAC darinys sapacitabinas pasižymėjo geru poveikiu *in vivo* žmogaus vėžio ksenografams [35]. Atliekami keli I ir II fazės klinikiniai sapacitabino tyrimai su pacientais, pavieniui arba kartu su kitais priešvėžiniais vaistais, sergančiais lėtine limfocitine leukemija, ūmine mieloidine leukemija (ŪML) [36], nesmulkialąsteliniu plaučių vėžiu ir kitais pažengusiais kietaisiais navikais, taip pat pradėtas pagrindinis III fazės sapacitabino tyrimas su pagyvenusiais pacientais, kuriems naujai diagnozuota ŪML. Dar vienas vaistas, plačiai naudojamas vėžiniams susirgimams gydyti, yra kapecitabinas. Kapecitabinas buvo sukurtas kaip fluorouracilo provaistas, siekiant pagerinti vaisto toleravimą bei koncentraciją naviko viduje. Fluorouracilas yra antimetabolitas, pasižymintis aktyvumu prieš daugelio rūšių navikus, įskaitant krūties, stemplės, gerklų, virškinamojo trakto ir šlapimo takų navikus. Dėl citotoksinio neselektyvumo dažnai pasireiškia sisteminis toksiškumas, įskaitant nentropeniją, stomatitą ir diarėją [37].

1.3.3 Esterazių panaudojimas nukleozidų modifikacijai

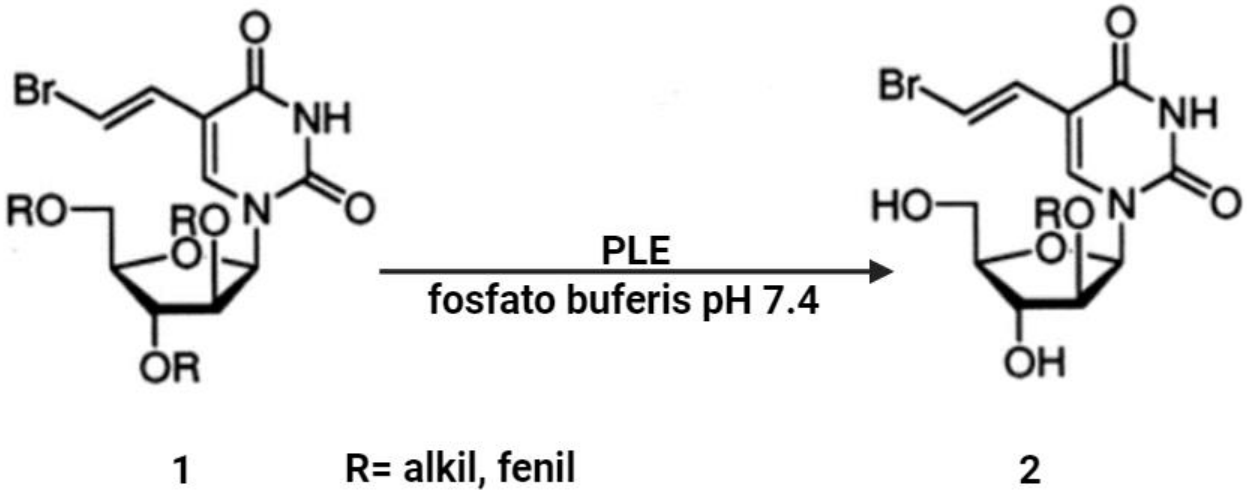
Nukleozidų analogai dažniausiai sintetinami cheminiais metodais, kuriems reikia naudoti organinius tirpiklius, kelis reakcijos etapus ir papildomai pašalinti chemines grupes, todėl susidaro nepageidaujami raceminiai mišiniai, kurie pasunkina tolimesnį gryninimą [38]. Todėl dėl didelio katalizinio efektyvumo, būdingo selektyvumo ir paprasto tolesnio apdorojimo, alternatyva tapo fermentų naudojimas šių nukleozidų sintezei. Biokatalizės naudojimo privalumai yra labai švelnios reakcijos sąlygos, didelis regio- ar enantio-selektyvumas ir nekenksminga aplinkai [39], [40].

Per pastarąjį laiką buvo paskelbta keletas tyrimų apie fermentais katalizuojamą uridino esterių sintezę [41], [42]. Kai kurios lipazės, pavyzdžiui, CAL-B22 ir *Pseudomonas Cepacia* lipazė, buvo naudojamos uridino esterių sintezei, tačiau norimam rezultatui pasiekti reikia ilgesnio reakcijos laiko (24 val.). Nepetraukiama katalizatoriaus ir substrato sąveika srauto sistemose, gali padidinti reaktyvumą ir selektyvumą [43]. Mokslininkai siekdami sukurti labai veiksmingą uridino esterių sintezės metodą, sugalvojo panaudoti, nepertraukiamo srauto mikroreaktorius uridino esterių sintezei. Kaip katalizatorius naudotas *Thermomyces lanuginosus* lipazė TL IM (5 pav.) [44].



5 pav. Fermentinė uridino esterių (3) sintezė iš uridino darinių (1) ir vinilo esterių (2) nepertraukiamo srauto mikroreaktoriuose [44].

Taip pat buvo atlikta regio selektyvi tri-*O*-acetilintų esterių hidrolizė, naudojant kiaulių kepenų esterazę (PLE) fosfatiniame buferiniame tirpale su etanoliu kaip papildomu tirpikliu, todėl buvo gauta 2‘-*O*-monoacetilinti nukleozidai (6 pav.). Šių arabinonukleozidų 2‘-*O*-acetilo esterių hidrolizės greitis yra labai sulėtėjęs, todėl galima manyti, kad jie gali veikti kaip lėtai išsiskiriantys lipofiliniai pro-vaistai, kurių gyvavimo trukmė serume yra ilga. Tačiau jų tirpumas vandenyje yra didesnis nei triesterių, o farmakokinetinės savybės stabilesnės nei visiškai deproteinuotų arabinonukleozidų [45].



6 pav. tri-*O*-acetilintų esterių hidrolizė naudojant kiaulių kepenų esterazę (PLE). 1 – tri-*O*-acetilintas nukleozidas, 2 – 2‘-*O*-monoacetilinti nukleozidas [45].

2. PRIETAISAI IR MEDŽIAGOS

2.1 Prietaisai

- Centrifugos „Centrifuge 5415C“, „Centrifuge 5810P“, „Centrifuge 5420“, „Centrifuge 5415R“, „Centrifuge 5415D“ (Eppendorf).
- Elektroporatorius „Electroporator 2510“ (Eppenforf).
- Kratyklės kompleksas „Orbital Shaker-Incubator ES-20“ (Biosan).
- Džiovinimo spinta „Incubator Plus“ (Gallenkamph).
- Spektrofotometras „BioPhotometer“ (Eppendorf).
- UV lempa „ENF-260C/FE“ (Spectroline).
- Plonasluoksnės chromatografijos plokštelės „TLC Silica Gel 60“ (Merck Milipore).
- Termocikleris „Thermal Cycler T100TM“ (Bio-Rad).
- Mažo tūrio spektrofotometras „NanoPhotometer NP80“ (Implen).
- Termopurtyklės „Thermomixer comfort“ (Eppenford), „Thermo-Shaker“ (BioSan).
- Horizontaliosios elektroforezės aparatas „Scientific Ltd – NanoPAC – 300P“ (Cleaver).
- Transiliuminatorius „UVT-28 ME“ (Herolab).
- Centrifuga su vorteksu „FVL – 2400N“ (BioSan).
- pHmetras „ Orion 320 Perphect LogR“ (ThermoFisher Scientific“).
- Svarstyklės „KERN ABT“, „KERN PLJ“ (Kern and Sohn).
- Vertikaliosios elektroforezės aparatas „Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell“ (Bio-Rad).
- Mikroplokštelių skaitytuvas „PowerWave XS“ (BioTek).
- Inkubatorius-kratyklė „InnovaTM“ (Eppendorf).
- Ultragarsinis dezintegratorius „UZDN-2T“ (22000 Hz dažnis).
- Chromatografijos sistema „AKTApurifier“ (GE Healthcare Life Sciences).
- Baltymo gryninimo kolonėlė su nikeliu „HiTrapTM Chelating HP“ (GE Healthcare Life Sciences).
- Vaizdinimo kompleksas „Azure C280“ (Azure Biosystems).
- Aukšto slėgio skysčių chromatografas (CBM-20A, Shimadzu).
- Masių spektrofotometras (LCMS-2020, Schimadzu).

2.2 Rinkiniai

- PGR fragmento gryninimo rinkiniai „GeneJet PCR Purification Kit“ ir „GeneJET Gel Extraction Kit“ (ThermoFisher Scientific).
- Plazmidžių gryninimo rinkinys „ZR Plasmid MiniprepTM – Classic“ (Zymo Research).
- Baltymų koncentracijos nustatymo rinkinys „ PierceTM Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit“ (ThermoFisher Scientific).
- Ligavimo rinkinys „ aLICator LIC Cloning and Expression Kit 3“ (ThermoFisher Scientific).
- Baltymų koncentravimo rinkinys „Amicon Ultra – 0.5 mL“ (Merk Milipore)

2.3 Tirpalai ir reagentai

• **50 mM kalio fosfatinis buferis** – 1 M fosforo rūgštis 20 kartų praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu, tada palaipsniui įpilamas sotus NaOH tirpalas, kad pH pasiektų 7,5.

• **TAE buferis** – 500 mL distiliuoto vandens ištirpinkite 121 g Tris (Roth), 28,5 mL acto rūgšties ir EDTA (Sigma-Aldrich).

• **DNR elektroforezės buferis** – TAE buferis 50 kartų praskiedžiamas distiliuotu vandeniu.

• **Baltymų elektroforezės buferis** – 2000 mL distiliuoto vandens ištirpinkite 6 g Tris (Roth), 2 g natrio dodecilsulfato (Roth) ir 28,8 g glicino (Merck).

• **0,5 M imidazolo buferis** – 50 ml kalio fosfatiniame buferyje ištirpinamas imidazolas, pH 7,5.

• **Ampicilinas** – vandeninis tirpalas, koncentracija 100 mg/mL (Carl Roth).

• **IPTG** – vandeninis tirpalas, koncentracija 100 mM (Thermo Scientific).

• **Ramnozės 20 % tirpalas** – vandeninis tirpalas, autoklavuota 30 min. 0,5 atm. slėgyje.

• **Agarozės gelis** - „TopVision Agarose Tablets“ (Thermo Scientific).

• **Baltymų elektroforezės gelis** – vieno gelio sudėtis pateikta 2-oje lentelėje.

2 lentelė. Baltymų elektroforezės gelio sudėtinės dalys.

Koncentruojamasis gelis (4,5 %) 2 ml	
Distiliuotas vanduo	1233 µL
40 % Akrilamidas/bisakrilamidas (29:1)	225 µL
0,5 M Tris buferinis tirpalas (pH 6,8)	500 µL
10 % Natrio dodecilsulfatas (SDS)	20 µL
10 % Amonio persulfatas (APS)	20 µL
Tetrametiletilendiaminas (TEMED)	2 µL
Skirstomasis gelis (14 %) 4 ml	
Skirstomasis gelis (14 %) 4 ml	1516 µL
40 % Akrilamidas/bisakrilamidas (29:1)	1400 µL
0,5 M Tris buferinis tirpalas (pH 6,8)	1000 µL
10 % Natrio dodecilsulfatas (SDS)	40 µL
10 % Amonio persulfatas (APS)	40 µL
Tetrametiletilendiaminas (TEMED)	4 µL

• **6X pavyzdžio buferis DNR elektroforezei** - „DNA Gel Loading Dye“ (ThermoFisher Scientific).

• **DNR molekulinės masės standartas** - „GeneRuler 1 kb DNA ladder“ (ThermoFisher Scientific).

• **Restrikcijos endonukleazės** - XbaI, Eco147I (Thermo Scientific).

• **Restrikcijos endonukleazių buferis** - „10X FastDigest buffer“ (ThermoFisher Scientific).

• **Pavyzdžio buferis baltymų elektroforezei** – į 1 ml „Loading Dye Solution“ (Sorpo) įpilama 57 µL 2-merkaptoetanolio ir 230 µL 10 % SDS tirpalo.

• **Baltymų molekulinės masės standartas** - „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific).

• **Bradfordo reagentas** - „Coomasie Protein Assay Reagent“ (Thermo Scientific).

• **Fermentai ir jų buferiai** – T4 polinukleotidkinazė (T4PNK) 10 U/µL (ThermoFisher Scientific), T4PNK buferis „10X reaction buffer A for T4 polynucleotide kinase“ (ThermoFisher

Scientific), T4 DNR ligazė 5 U/μL (ThermoFisher Scientific), T4 DNR ligazės buferis „10X T4 DNA Ligase Buffer“ (ThermoFisher Scientific).

• **Mastermiksai** – „2X PhusionTM Plus Master Mix“ (Thermo Fisher Scientific), „2X DreamTaq Green PCR Master Mix“ (Thermo Fisher Scientific).

• **Uridinas** – vandenins tirpalas, koncentracija 20 mg/ml

• **Triacetiluridinas**

• **Triheksanoiluridinas**

• **Glicerolis** (Chempur).

• **DMSO** (Serva).

• **Chloroformas** (Honeywell).

• **Metanolis** (Chempur).

2.4 Kamienai

• ***Escherichia coli* KRX**: F´, *traD36*, *DompP*, *proA+B+*, *lacIq*, D(*lacZ*)M15] *Omp*T, *endA1*, *recA1*, *gyrA96* (*Nalr*), *thi-1*, *hsdR17* (rK–, mK+), *e14*– (*McrA*–), *relA1*, *supE44*, D(*lac-proAB*), D(*rhaBAD*)::T7 RNR polimerazė (Promega); mutantas KRX*ΔpyrF*::Km ruoštas Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos (MMB) skyriuje

• ***Escherichia coli* HMS174(DE3)**: F^{-}*recA1 hsdR*(r_{K12}^{-} m_{K12}^{+}) (DE3) (Rif ^{R}) (Novagen); mutantas HMS174*ΔpyrΔcdd* ruoštas MMB skyriuje..

• ***Escherichia coli* LOBSTR:** *fhuA2* [*lon*] *ompT gal* (λ DE3) [*dcm*] Δ*hsdS* λ DE3 = λ *sBamHIo* Δ*EcoRI-B* int::(*lacI::PlacUV5::T7 gene1*) *i21*Δ*nin5* arnA(*H359S, H361S, H592S, H593S*)slyD(1-150)

2.5 DNR vektoriai

Raiškos vektorius pLATE11 iš „aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System“ rinkinio (Thermo Scientific).

2.6 Esterazės

- **PCLD420CE1** (Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus (Bchi, GMC, VU) darbuotojų paruošta) genas yra vektoriuje – PLATE11
- **PCLD1E1** (Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus (Bchi, GMC, VU) darbuotojų paruošta) genas yra vektoriuje – PLATE11
- **PETase075** (Addgene) genas yra vektoriuje – pET21 (pEE075 padovanojo Greggas Beckhamas (Addgene plazmidė Nr. 176832 ; http://n2t.net/addgene:176832 ; RRID:Addgene_176832).)
- **PCLD3E2** (Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus (Bchi, GMC, VU) darbuotojų paruošta) genas yra vektoriuje – PLATE11
- **PCLDK29_3** (Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus (Bchi, GMC, VU) darbuotojų paruošta) genas yra vektoriuje – PLATE11
- **PCLD5BE1** (Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus (Bchi, GMC, VU) darbuotojų paruošta genas yra vektoriuje – PLATE11

2.7 Terpės

• **Luria – Bertami (LB) terpė** – pH 7,2-7,3, 0,3 % mielių ekstrakto, 0,5 % peptono ir 0,5 % NaCl. Viskas ištirpinama distiliuotame vandenyje, 30 min. autoklavuojama 121 °C temperatūroje 1 atm slėgyje.

• **SOC terpė** – 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 0,5 % mielių ekstrakto ir 2 % triptono. Viskas ištirpinama distiliuotame vandenyje, 30 min. autoklavuojama 121 °C temperatūroje 1 atm slėgyje. Po autoklavavimo į terpę pridedama 20 mM gliukozės.

• **M9 agarizuota mineralinė terpė** – 33,9 g/l Na_2HPO_4, 15 g/l KH_2PO_4, 5 g/l NH_4Cl, 2,5 g/l NaCl, 1 mM $MgSO_4$, 0,1 mM $CaCl_2$, 0,2 % (w/v) gliukozės, 0,2 % kazamino rūgščių, 1 mM IPTG, 15 g/l agaro, 0,2 mg/ml uridino arba jo analogo ir 0,1 mg/ml ampicilino. Ištirpinus agarą, $MgSO_4$ ir $CaCl_2$ mišinį distiliuotame vandenyje, terpė 30 min. autoklavuojama 121 °C temperatūroje 1 atm slėgyje. Likusios druskos autoklavuojamos bei pridedamos į terpę prieš naudojimą, jos gaminamos atskirai kaip 5x druskų mišinys. Prieš naudojant terpę reikia sumaišyti su aminorūgštimis, antibiotikais, IPTG ir uridinu arba jo analogu.

• **Pusiau sintetinė terpė** – pH 7, 1 % glicerolio, 0,268 % $(NH_4)_2SO_4$, 0,15 % NH_4Cl, 0,6 % K_2HPO_4, 1 % triptono ir 0,5 % mielių ekstrakto. Viskas ištirpinama distiliuotame vandenyje, 30 min. autoklavuojama 121 °C temperatūroje 1 atm slėgyje.

2.8 Pradmenys

3 lentelė. Tiesioginių ir atvirkštinių pradmenų sekos.

Pradmuo	**Seka**
pPCLD1E1_F	AGAAGGAGATATAACTATGGCCAGCGAAC
P420CE1_F	AGAAGGAGATATAACTATGCTCCGCAACC
pPCLD1E1_His_R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCTGCGCCGAAGC
P420CE1_His_R	GGAGATGGGAAGTCATTAGCGATGTTTCTC

3. METODAI

3.1 Kompetentinių ląstelių paruošimas

E. coli bakterijos auginamos 50 ml BHI arba LB terpės 37ºC temperatūroje, kol jų optinis tankis, esant 600 nm bangos ilgiui, pasiekia 0,5-0,7. Ląstelės centrifuguojamos 4000*g greičiu 4 ºC temperatūroje 10 min. Nucentrifuguotos ląstelės resuspenduojamos tame pačiame kiekyje šalto 10 % glicerolio tirpalo, kuriame jos buvo auginamos. Po resuspensijos 10 minučių centrifuguojamos 4000*g 4 ºC temperatūroje. Šis veiksmas atliekamas mažiausiai tris kartus. Ląstelės resuspenduojamos 1 ml šalto 10 % glicerolio tirpalo ir į atskirus mėgintuvėlius išpilstoma po 95 µl. Kompetentinės ląstelės gali būti panaudotos iš karto arba užšaldytos -80 ºC temperatūroje vėlesniam naudojimui.

3.2 Tikslinio geno padauginimas PGR metodu

Mėginio tūris - 25 µl. PGR mišinį sudaro: ,,2X PhusionTM Plus Master Mix“, 0,5 µM tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų (sekos pateiktos 2-oje lentelėje), 30-100 ng plazmidinės DNR. Likęs tūris užpildomas vandeniu. PGR ciklų trukmė ir temperatūra:

1) Pradinė denatūracija: 98ºC 30 sekundžių;

2) Pakartotinė denatūracija: 98ºC 10 sekundžių;

3) Pradmenų prilydymas: 60ºC 20 sekundžių;

4) Ilginimas: 72ºC 15 sekundžių/kilobazei;

Galų ilginimas (sutvarkymas): 72ºC 3 minutės.

2-5 etapai kartojami 30 ciklų.

3.3 DNR Elektroforezė

DNR fragmento elektroforezė atliekama 1 % agarozės gelyje TAE buferiniame tirpale 120 V įtampoje. Mėginiai gaunami sumaišius juos su 6X mėginių buferiu. Į kiekvieną šulinėlį įterpiama po 0,1-0,5 µg DNR. Supylus mėginius, pridedamas DNR molekulinės masės standartas. Po elektroforezės gelis maždaug 5 min. dažomas etidžio bromido tirpalu. Rezultatai analizuojami transiliuminatoriuje, naudojant ultravioletinę šviesą.

3.4 DNR fragmento gryninimas iš agarozės gelio

DNR fragmentas iš agarozės gelio gryninamas naudojant "GeneJET Gel Extraction Kit" rinkinį. Reikiamo dydžio fragmentas išpjaunamas iš agarozės gelio ir užpilamas surišimo buferiu („Binding Buffer“) tokiu santykiu: 100 mg agarozės gelio ir 100 µL tirpalo. Inkubuojama 50-60ºC temperatūroje, kol gelis ištirpsta. Tirpalas perkeliamas į "GeneJET" gryninimo kolonėlę ir 1 min. centrifuguojama >12000*g. Pašalinę skystį, į kolonėlę įpilama 700 µL plovimo buferio („Wash Buffer“) ir centrifuguojama 1 minutę esant >12000*g. Išpylus nuotekas, centrifuguojama dar 1 min. Kolonėlė perkeliama į švarų 1,5 mL mėgintuvėlį, tada įpilama 50 µL eliucijos buferio („Elution Bufer“). Centrifuguoti 1 min., >12000*g. Po gryninimo koncentracija nustatoma naudojant mažo tūrio spektrofotometrą.

3.5 DNR fragmento gryninimas iš PGR mišinio

Naudojant "GeneJET PCR Purification KIT", iš PGR mišinio išskiriamas DNR fragmentas. Tada į PGR mišinį įpilama surišimo buferio („Binding Buffer“) santykiu 1:1. Mišinys perkeliamas į "GeneJET" gryninimo kolonėlę ir centrifuguojamas 1 min., >12000*g. Išleidus skystį, į kolonėlę įpilama 700 µl plovimo buferio („Wash Buffer“) centrifuguojama 1 min., >12000*g. išpylus nutekėjusį skystį, centrifuguoti dar 1 min. Perkėlus kolonėlę į sterilų 1,5 ml mėgintuvėlį, įpilama 50 µL eliucijos buferio („Elution Bufer“). centrifuguojama 1 min., >12000*g. Po gryninimo koncentracija nustatoma naudojant mažo tūrio spektrofotometrą.

3.6 Tikslinio geno ir vektoriaus ligavimas

"aLICator LIC Cloning and Expression Kit 3" rinkinys naudojamas PGR amplifikuotam ir išgrynintam DNR fragmentui klonuoti į pLATE31. Sumaišomas reakcijos mišinys, kurio sudedamosios dalys pateiktos 4-oje lentelėje. Mišinys sumaišomas ir centrifuguojamas 3-5 s >12000*g. 5 min. inkubuojama kambario temperatūroje (20-25ºC). Įpilama 0,6 µl EDTA, kad reakcija sustotų, įpilama 1 µl pLATE31 vektoriaus ir 5 min. inkubuojama kambario temperatūroje. Gautas liginimo mišinys naudojamas transformacijai.

4 lentelė. Fragmento paruošimo ligavimui reakcijos mišinio sudėtis.

Reagentas	**Tūris, µL**
5X LIC buferis	2
Išgrynintas PGR produktas (koncentracija 20-35 ng/µL)	4
T4 DNR polimerazė, 1U/µL	1
Vanduo	Iki 10

3.7 Elektroporacija

Elektroporacijai skirtoje kiuvetėje sumaišoma 95 µL kompetentingų ląstelių su 2 µL liginimo mišinio arba 0,5 µL plazmidinės DNR, dedama į elektroporatorių. Elektroporacija atliekama naudojant 4-5,8 ms trukmės impulsą ir 1800 mV/cm įtampą. Ląstelės elektroporuojamos, tada atgaivinamos 1 ml SOC terpės ir maždaug 30 min. inkubuojamos 37 °C. Po gaivinimo ląstelės nucentrifuguojamos, resuspenduojamos maždaug 200 µL supernatanto ir išsėjamos agarizuotoje LB terpėje, papildytoje ampicilinu.

3.8 Kolonijų PGR

Vieno mėginio tūris – 10 µL. PGR mišinio sudėtinės dalys – Nedidelis kiekis pasirinktos atitinkamos kolonijos, „2X DreamTaq Green PCR Master Mix“, po 0,5 µL LIC tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų ir likęs tūris, užpildomas vandeniu. PGR reakcijos ciklų trukmės ir temperatūros:

1) Pradinė denatūracija: 95ºC 3 min.

2) Pakartotinė denatūracija: 94ºC 30 s.

3) Pradmenų prilydymas: 58ºC 30 s.

4) Ilginimas: 72ºC 30 s.

2-5 etapai kartojami 25 ciklus. PGR rezultatai analizuojami elektroforezės metu.

3.9 Plazmidinės DNR gryninimas ir sekoskaita

Iš lėkštelių atrenkami reikiami transformantai, tada kiekvienas jų persėjamas į 5 ml skystos LB terpės su ampicilinu. Inkubacija vykdoma per naktį 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos per naktį ląstelės nucentrifuguojamos, o plazmidinei DNR atskirti naudojamas "ZymoPURE II Plasmid Miniprep Kit" rinkinys. Nucentrifuguota biomasė resuspenduojama 200 µL P1 buferio. Švelniai išmaišoma su 200 µL P2 buferinės terpės ir paliekama inkubuotis 2 min. kambario temperatūroje (15-30 ºC). Įpilama 400 µL P3 buferio, švelniai išmaišoma ir inkubuojama 2 min. kambario temperatūroje. Pasibaigus inkubavimo laikui, maždaug 4 min. centrifuguojama >11000*g. Perkėlus supernatantą į "Zymo-SpinTM IIN" kolonėlę įstatytą į surinkimo mėgintuvėlį, 30 sekundžių centrifuguojama >11000*g. Ištekėjęs skystis išpilamas ir į kolonėlę įpilama 180 µl plovimo buferio ("Endo-Wash Buffer"). 30 s centrifuguojama >11000*g. Kolonėlė pripildoma 400 µL plazmidės plovimo buferio („Plasmid Wash Buffer“) ir centrifuguojama 1 min. >11000*g. Kolonėlė perkeliama į švarų 1,5 ml mėgintuvėlį ir įpilama 30 µL DNR eliucijos buferio („DNA Elution Buffer“). Po 1 min. inkubacijos kambario temperatūroje 30 s. centrifuguokite >11000*g greičiu. Po gryninimo DNR tirpalo koncentracijai matuoti naudojamas mažo tūrio spektrofotometras. Plazmidžių sekoskaita atlikta naudojant pradmenis pateiktus 2.8 skyrelyje "Azenta" (Vokietija) kompanijoje.

3.10 Plazmidinės DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis

Ruošiamas bendras reakcijos mišinys įpilant „10X FastDigest“ buferį, po 1 µl XbaI ir Eco147I restrikcijos endonukleazių ir likusį kiekį vandens. Į atskirus mėgintuvėlius išpilstoma po 9 µl ir įpilama po 1 µl atitinkamos plazmidės. Hidrolizuojamų plazmidžių kiekis lemia, bendrą reakcijos mišinio tūrį. Mėginiai inkubuojami 15 min. 37 °C. Po inkubacijos atliekama DNR elektroforezė ir analizuojami rezultatai.

3.11 Biomasės auginimas ir genų raiška

Tiksliniai *E. coli* klonai iš standžios LB terpės perkeliami į 20 mililitrų skystos LB terpės su ampicilinu. 18-24 valandas kultivuojami aeruojant 37 °C. Kitą dieną 2 ml išaugintų ląstelių (terpėje) įpilama į 200 ml skystos LB terpės su ampicilinu. Auginama 37 °C, kol optinis tankis esant 600 nm bangos ilgiui tampa 0,6-0,8. Genų raiška indukuojama 0,25 mM IPTG (HMS174(DE3), KRXΔpyrF ir LOBSTR kamienams), išauginus iki reikiamo optinio tankio, o T7 RNR polimerazės raiška skatinama 0,1 % ramnoze KRXΔpyrF kamiene. Po indukcijos ląstelės auginamos 18-24 valandas 30 °C temperatūroje.

3.12 Ląstelių ardymas ultragarsu

E. Coli ląstelių biomasė buvo centrifuguojama 10 min. 4 ºC, 4000*g. Išpylus supernatantą, biomasė vėl suspenduota 50 mM kalio fosfato buferiniame tirpale pH 7,5, masės santykis - 1 g biomasės ir 20 ml buferinio tirpalo. Ardymui naudojamas ultragarsinis dezintegratorius ledo vandens vonelėje, procesas kartojamas penkis kartus po 20 s. ardant ir po 20 s. atvėsinant. Suardytos ląstelės 7 min. centrifuguojamos 10 000*g 4 ºC. Netirpūs baltymai, likę ant dugno po centrifugavimo, išsaugomi patikrinti baltymų elektroforezės metodu, o supernatantas panaudojamas tolesniems gryninimo procesams.

3.13 Tikslinių fermentų gryninimas gimiringumo Ni-NTA chromatografijos būdu

Fermentams gryninti gimiringumo chromatografijos metodu naudojama nikelio sorbento gryninimo kolonėlė ir "AKTApurifier" chromatografijos sistema. Kalio fosfato buferinis tirpalas 50 mM, kurio pH 7,5, naudojamas prie sorbento neprisijungusiems baltymams iš kolonėlės išplauti. Po plovimo į kolonėlę įšvirkščiama 0,5 M imidazolo buferinio tirpalo pH 7,5, kad būtų įvykdyta tikslinio fermento eliucija. Gryniausios frakcijos su dominančiu baltymu apjungiamos, atsižvelgiant į aparato rodomą chromatogramą ir tolimesnius baltymų elektroforezės rezultatus.

3.14 Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis (SDS-PAGE) sąlygomis

Po gryninimo mėginiai sumaišomi su pavyzdžio dažu, kurį sudaro natrio dodecilsulfatas ir 2-merkaptoetanolis santykiu 1:1, ir apie 7 min. pakaitinami 90-100 ºC. Supilsčius mėginius bei baltymo molekulinės masės standartus, elektroforezė vykdoma 14 % poliakrilamido skirstomajame gelyje. Po elektroforezės gelis nudažomas Coomassie G-250 dažu bei gerai nuplaunamas vandens ir acetono mišiniu. Rezultatai stebimi gelį padėjus ant transiliuminatoriaus.

3.15 Baltymo koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu

Naudojant žinomas 0,125, 0,25 ir 0,5 mg/ml BSA tirpalų koncentracijas iš "PierceTM Coomassie (Bradford) Protein Assay" rinkinio, 4 µl paruošto tirpalo įpilama į 96 duobučių mikroplokštelę, įpilama 200 µl Bradfordo reagento ir spektrofotometru išmatuojamas optinis tankis

esant 595 nm bangos ilgiui, kad būtų sudaryta kalibravimo kreivė. Išmatuojamas optinis tankis esant 595 nm bangos ilgiui ir 4 µL išgryninto baltymo sumaišoma su 200 µL Bradfordo reagento, kad būtų nustatyta tikslinio baltymo koncentracija. Baltymų koncentracija nustatoma pagal kalibracinę kreivę.

3.16 Hidrolizės reakcijos produktų nustatymas plonasluoksnės chromatografijos metodu

Ruošiami 20 µl reakcijos mišiniai su 2 µl fermento (0,176-0,724 mg/ml), 4 mM pasirinkto substrato ir likusi dalis 50 mM kalio fosfato buferino tirpalo, pH 7,5. Reakcijos mišiniai be fermento naudojami kaip kontrolės. Mėginiai 37 °C inkubuojami 30 min. Po inkubacijos laikotarpio 0,9 µl kiekvieno reakcijos mišinio užpilama ant plonasluoksnės chromatografijos plokštelės, pagamintos iš „TLC Silica gel 60“. Plokštelės panardinamos į 5:1 chloroformo ir metanolio judriąją fazę ir paliekamos, kol skystis pasiekia tam tikrą ribą. Po to, kai plokštelės išdžiūsta, rezultatai tiriami apšviečiant plokštelę ultravioletine 254 nm bangos ilgio šviesa.

3.17 Hidrolizės reakcijų produktų nustatymas HPLC-MS metodu

Analizuojant hidrolizės reakcijos produktus naudota aukšto slėgio skysčių chromatografas (CBM-20A, Shimadzu) bei masių spektrofotometras (LCMS-2020, Schimadzu). Prieš leidžiant mėginius HPLC-MS analizei pradinis mėginio tūris praskiedžiamas acetonitrilu santukiu 1:1 po skiedimo mėginiai centrifuguojami 10 min, 14200*g. Rezultatai analizuojami naudojant LabSolutions LC/MS programinę įrangą.

4. REZULTATAI

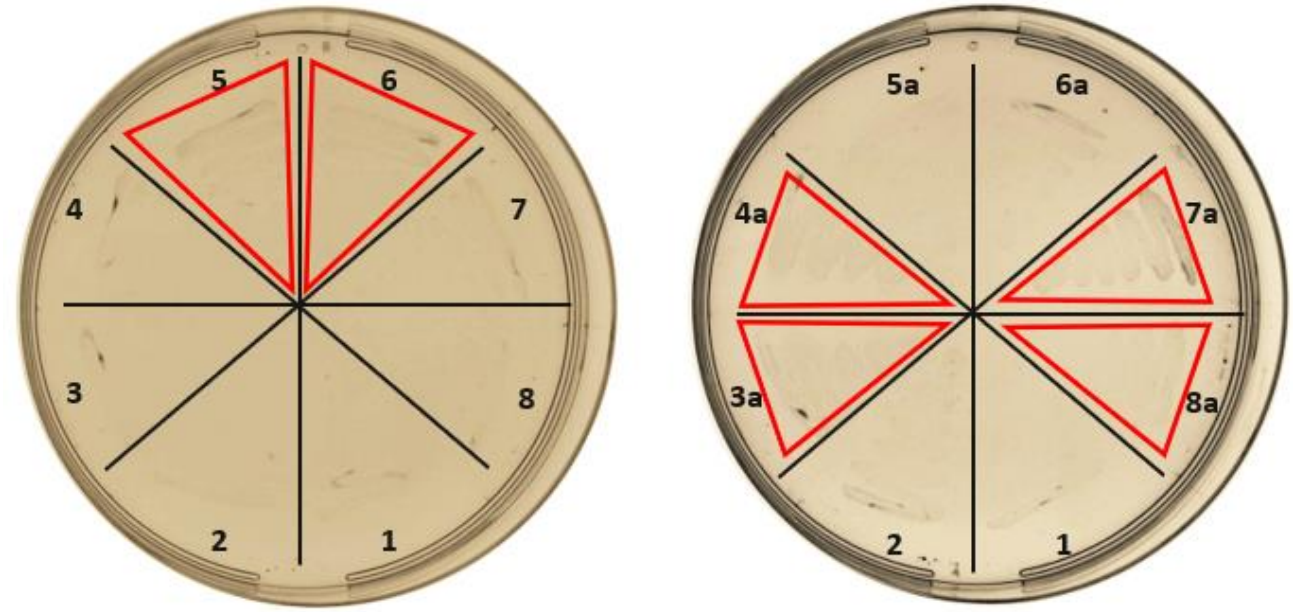
Šiame darbe tirtos šešios esterazės: PCLD420CE1, PCLD1E1, PETase075, PCLD3E2, PCLDK29_3, PCLD5BE1 (2.6 skyrius). Esterazės buvo atrinktos iš žemės mėginių paruošus metogenomines arba genomines bibliotekas Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus (Bchi, GMC, VU) darbuotojų, išskyrus PETase075 [46]. Šios esterazės tiriamos siekiant įvertinti gebėjimą regio-selektyviai modifikuoti uridino analogus.

4.1 Esterazių atranka M9 terpėje

Modifikuotus uridino analogus hidrolizuojančių esterazių atranka buvo vykdoma selektyvioje M9 terpėje uracilo auksotrofo kamiene *E. coli* KRX*ΔpyrF*. Buvo pasirinkti du skirtingi substratai − 2‘,3‘,5‘-tri-*O*-acetiluridinas (TAU) ir 2‘,3‘,5‘-tri-*O*-heksanoiluridinas (THU), kurie buvo įdėti į selektyvią M9 terpę kaip vieninteliai uridino šaltiniai. Tokiu atveju gali augti tik tie klonai, kurie produkuoja esterazes, gebančias uridino esterį hidrolizuoti iki uridino, kas lemia kompensuojamą uridino auksotrofo fenotipą (7 pav.), (8 pav.).



7 pav. Petri lėkštelių nuotraukos su KRX*ΔpyrF* kultūromis selektyvioje M9 terpėje, kurioje įdėtas TAU, turinčiomis plazmides su skirtingomis esterazėmis: 1-pET21b (K-); 2-pLATE31_SVG1 (K+); 3,4- pLATE11_PCLDk29-3; 5,6-pLATE11_PCLD1E1; 7,8-pLATE11_PCLD3E2; 3a,4a-pLATE11_PCLD420CE1; 5a,6a-pLATE11_PCLD5BE1; 7a,8a-pET21_PETase075



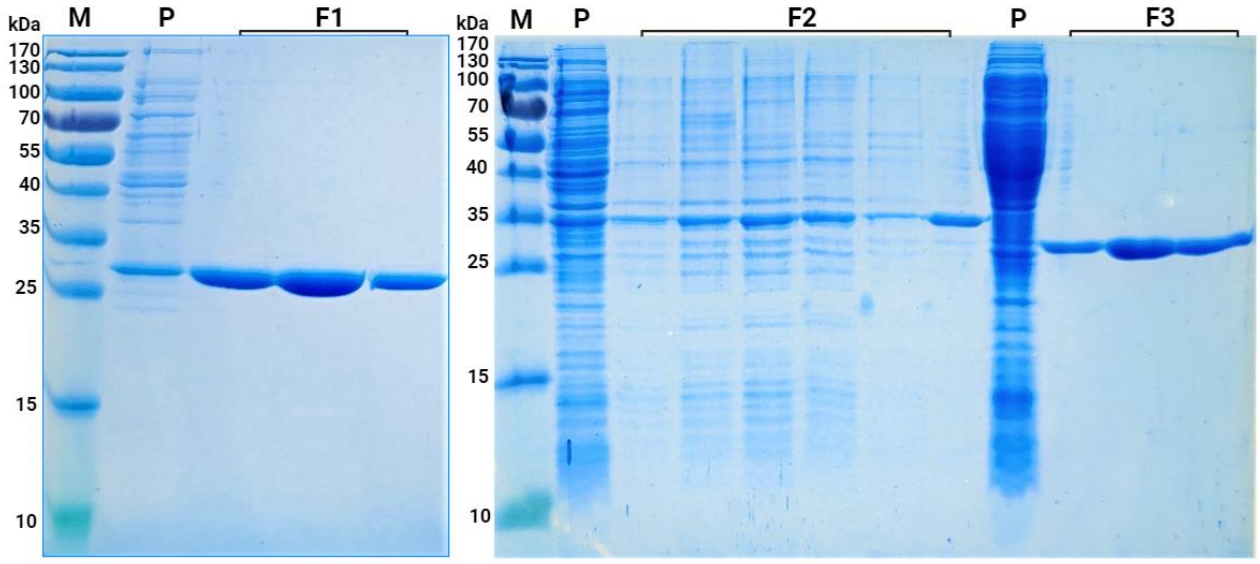
8 pav. Petri lėkštelių nuotraukos su KRX*ΔpyrF* kultūromis, selektyvioje M9 terpėje, kurioje įdėtas THU, turinčiomis plazmides su skirtingomis esterazėmis: 1-pET21b (K-); 2-pLATE31_SVG1 (K+); 3,4-pLATE11_k29_3; 5,6-pLATE11_PCLD1E1; 7,8- pLATE11_PCLD3E2; 3a,4a-pLATE11_PCLD420CE1; 5a,6a- pLATE11_PCLD5BE1; 7a,8a-pET21_PETase075.

Atrankos selektyvioje M9 terpėje su uridino analogais rezultatai rodo, kad TAU iki uridino hidrolizuoja PCLD1E1, o THU iki uridino hidrolizuoja PCLD1E1, PCLD420CE1, PETase075 esterazės. SVG1 esterazė buvo naudojama kaip teigiama kontrolė. Šis fermentas buvo identifikuotas jau anksčiau MMB skyriuje kaip uridino esterius hidrolizuojantis fermentas [47]. Atrinktos esterazės pažymėtos raudonais trikampiais (7 pav.), (8 pav.). Tai leido atrinkti esterazes tolimesniems tyrimams.

4.2 Atrinktų esterazių klonavimas ir biomasės auginimas

Siekiant išgryninti atrinktas TAU ir THU hidrolizuojančias PCLD1E1 ir PCLD420CE1 esterazes, pirmiausia jų genai buvo klonuoti į pLATE31 vektorių, turintį 6X-His-Taq C gale. Esterazių genai buvo pagausinti pagal metodą pateikta 3.2 skyrelyje, naudojant pradmenis, pateiktus 2.8 skyrelyje. Po pagausinimo išgryninti iš agarozės gelio kaip pateikta 3.4 skyrelyje ir suliguoti su pLATE31 vektoriumi pagal 3.6 skyriaus metodiką. Turimos plazmidės elektroporacijos būdų transformuotos į *E.coli* KRX*ΔpyrF* ląsteles, iš atsirinktų klonų išskirtos plazmidinės DNR (3.9 skyrius). Sangerio sekoskaitos būdu nustatytos DNR sekos, kurios patvirtino sėkmingą klonavimo rezultatą.

Po gryninimo sekė biomasių auginimas, ląstelių suardymas ir fermentų gryninimas (3.11 - 3.13 skyriai). Pirmiausia pLATE11_ PCLD1E1, pLATE11_PCLD420CE1 bei pET21_ Petase075 plazmidėmis buvo transformuotos *E. coli* HMS174 (DE3) kamieno ląstelės. Kultūros su skirtingomis esterazėmis buvo auginamos LB terpėje, PCLD1E1 ir Petase075 esterazių kultūros buvo augintos 18 ºC, o PCLD420CE1 30 ºC temperatūroje. Išgryninus fermentus su „AKTA purifier“ chromatografijos sistema buvo atlikta baltymų elektroforezė denatūruojančiomis (SDS-PAGE) sąlygomis bei vizualiai įvertintas esterazių fizinis grynumas (8 pav.) Remiantis 3.15 skyrelyje pateikta metodika, nustatytos išgrynintų fermentų koncentracijos: PCLD1E1 – 0.24 mg/ml, PCLD420CE1 – 1.76 mg/ml, PETase075 – 0.21 mg/ml. Atitinkamai buvo suskaičiuoti baltymų kiekiai gauti iš biomasės užaugintos 20 mL LB terpės: PCLD1E1 – 0.024 mg, PCLD420CE1 – 0.176 mg, PETase075 – 0.627 mg.

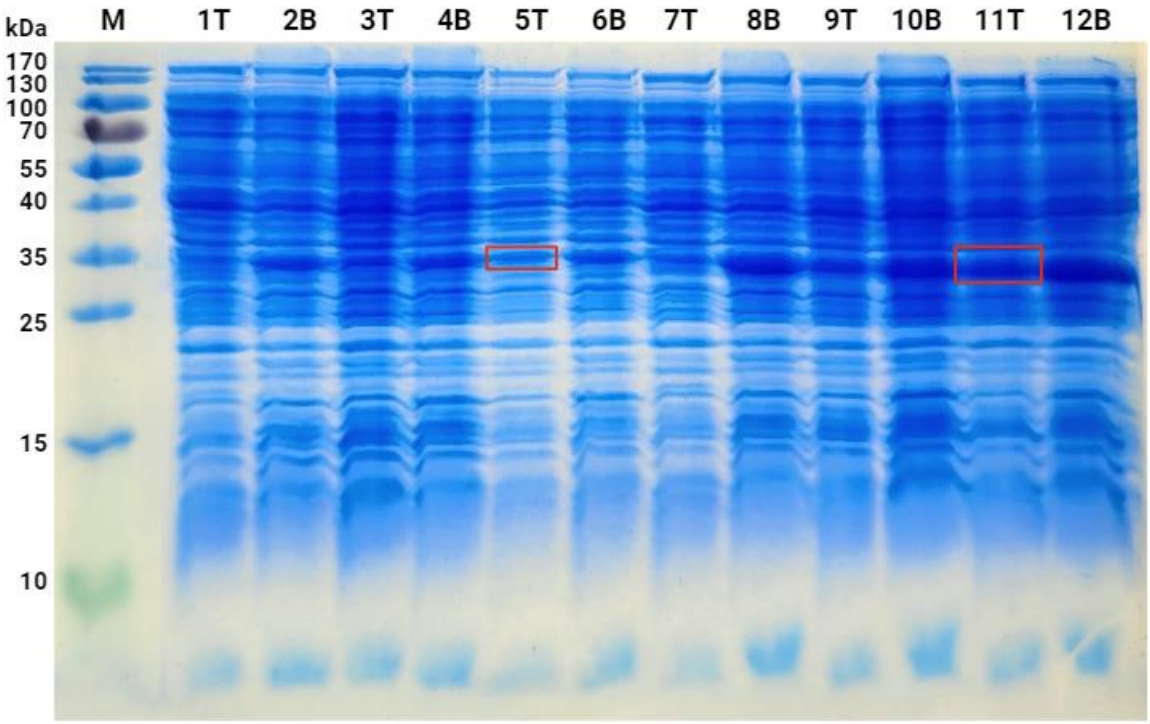


9 pav. Baltymų elektroforezės gelis su išgrynintais fermentais. M –baltymų molekulinės masės standartas (PageRuler™ Prestained Protein Ladder), P – nesisorbavusių baltymų frakcija, F1 – PETase075 (27 kDa), F2 – PCLD1E1 (31.5 kDa), F3 – PCLD420CE1 (32 kDa).

SDS-PAGE analizė parodė, kad gauti didelio grynumo PETase075 ir PCLD420CE1 esterazių preparatai. Tuo tarpu PCLD1E1 grynumas buvo nepakankamas. Be to visų trijų baltymų išeigos gautos ganėtinai mažos (9 pav.).

4.3 Biomasės auginimo sąlygų optimizavimas

Kadangi gautos fermentų išeigos buvo gan mažos, bandyta pakeisti biomasių auginimo sąlygas norint padidinti tikslinių fermentų išeigą. Tuo tikslu pET21_PETase075 kamienas buvo pakeistas į *E. coli* LOBSTR kamieno ląstelės. Tuo tarpu PCLD1E1 bei PCLD420CE1 kamienas išliko toks pat esterazių biosintezė buvo vykdoma tame pačiame HMS174(DE3) kamiene, tačiau keičiant biomasės auginimo sąlygas. Išeigai padidinti buvo išbandytos tokios terpės: buvo pakeista auginimo terpė iš LB į pusiau sintetinę bei pasirinkti trys skirtingi priedai atskiriems biomasės auginimams tai yra – 0.5 M sacharozės, 0.7 M manitolio ir 0.5 M arginino [48]. Iš literatūros duomenų yra žinoma, kad šie priedai gali padidinti tirpaus baltymo biosintezės lygį. Suardžius biomases pagal metodą pateiktą 3.12 skyrelyje buvo atskirtos bendra frakcija bei tirpi frakcija ir atlikta baltymų elektroforezė denatūruojančiomis (SDS-PAGE) sąlygomis, norint įvertinti, kuriomis sąlygomis gaunama daugiausiai tirpaus fermento (10 pav.).

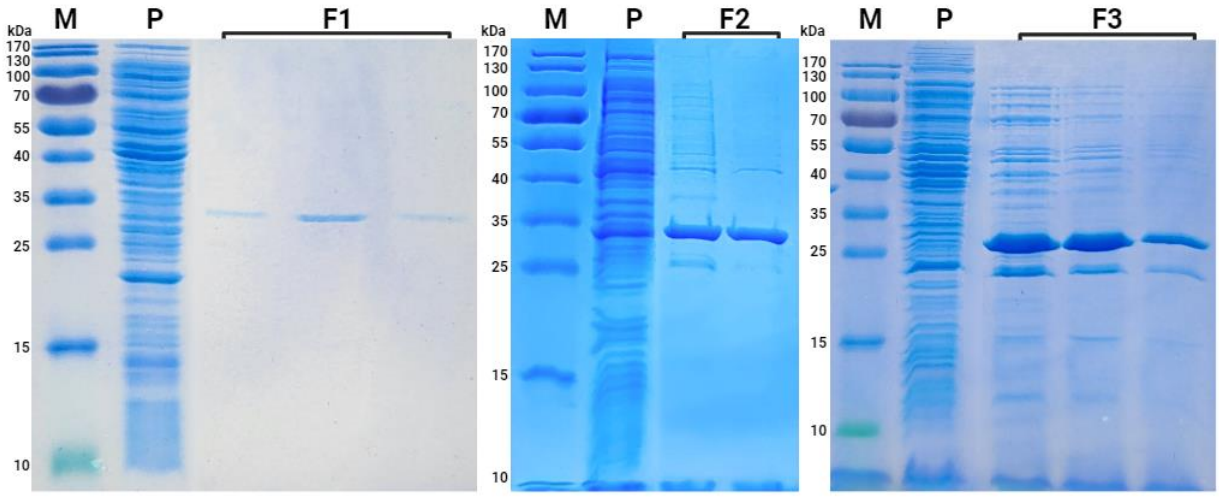


10 pav. Baltymų elektroforezės gelis su fermentų bendromis ir tirpiomis frakcijomis bei skirtingais anglies šaltiniais. M – baltymų molekulinės masės standartas (PageRuler™ Prestained Protein Ladder), T – tirpi frakcija, B – bendra frakcija, PCLD420CE1 (32 kDa) (1,2 – argininas, 3,4 – manitolis, 5,6 – sacharozė); PCLD1E1 (31.5 kDa) (7,8 – argininas, 9,10 – manitolis, 11,12 – sacharozė). Raudoni stačiakampiai žymi tikslinį balymą.

Iš elektroforezės duomenų matoma, kad tirpaus baltymo daugiausia matoma 5T variante tai yra PCLD420CE1 su sacharoze bei 11T variante, tai yra PCLD1E1 su sacharoze, jie pažymėti raudonais stačiakampiais (10 pav.). Šie variantai buvo pasirinkti gryninimui.

Išgryninus fermentus su „AKTA purifier“ chromatografijos sistema, buvo atlikta baltymų elektroforezė denatūruojančiomis (SDS-PAGE) sąlygomis bei vizualiai buvo įvertintas jų fizinis grynumas (9 pav.). Remiantis 3.15 skyrelyje pateikta metodika, nustatytos išgrynintų fermentų tirpalų koncentracijos: PCLD1E1 – 3.2 mg/ml, PCLD420CE1 – 0.19 mg/ml, PETase075 – 1.3 mg/ml. Atitinkamai buvo suskaičiuotos baltymų kiekiai gauti iš biomasės užaugintos 20 mL pusiau sintetinės

terpės PCLD1E1 – 0.161 mg, PCLD420CE1 – 0.186 mg ir 200 mL LB terpės PETase075 – 0.665 mg.

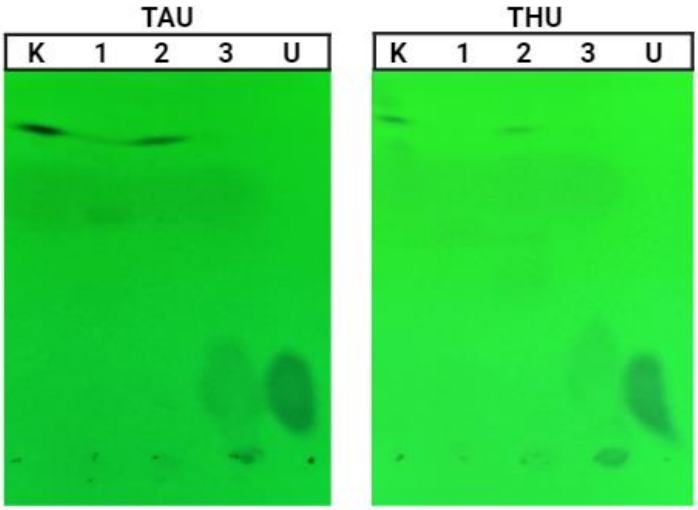


11 pav. Baltymų elektroforezės gelis su išgrynintais fermentais. M – baltymų molekulinės masės standartas (PageRuler™ Prestained Protein Ladder), P – nesisorbavusių baltymų frakcija, F1 – PCLD420CE1 (32 kDa) eliucijos frakcijos, F2 – PCLD1E1 (31.5 kDa) eliucijos frakcijos, F3 – PETase075 (27 kDa) eliucijos frakcijos.

Iš gautų rezultatų matoma, kad išeigos padidėjo tik PCLD1E1, o PCLD420CE1 ir PETase075 atveju liko maždaug panašios. Taip pat didelis grynumas buvo pasiektas tik PCLD420CE1 atveju (11 pav.). Tačiau pakeitus HMS174 (DE3) kamieną PETase075 biosintezei į LOBSTR, gautas mažesnis fermento grynumas.

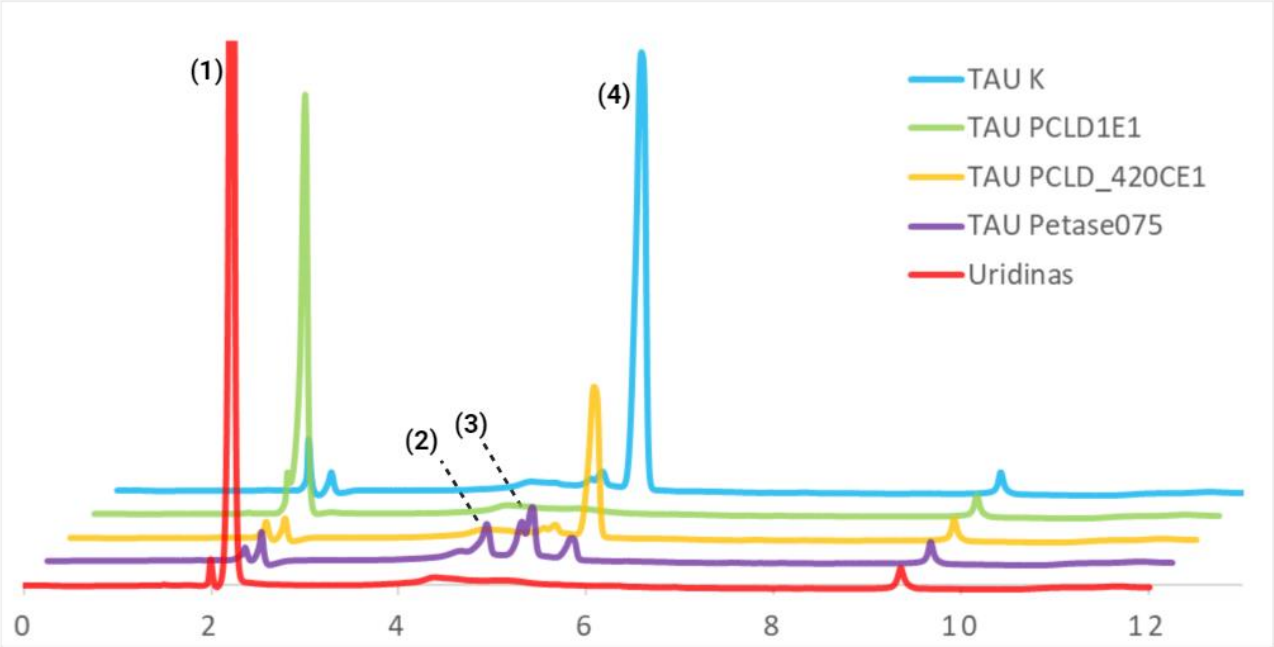
4.4 Hidrolizės reakcijos

Su atrinktomis esterazėmis PCLD420CE1, PETase075 ir PCLD1E1 atliktos uridino esterių hidrolizės reakcijos bei rezultatai tiriami apšviečiant plonasluoksnę chromatografinę plokštelę ultravioletine 254 nm bangos ilgio šviesa. (12 pav.) pagal metodą pateiktą 3.16 skyrelyje.

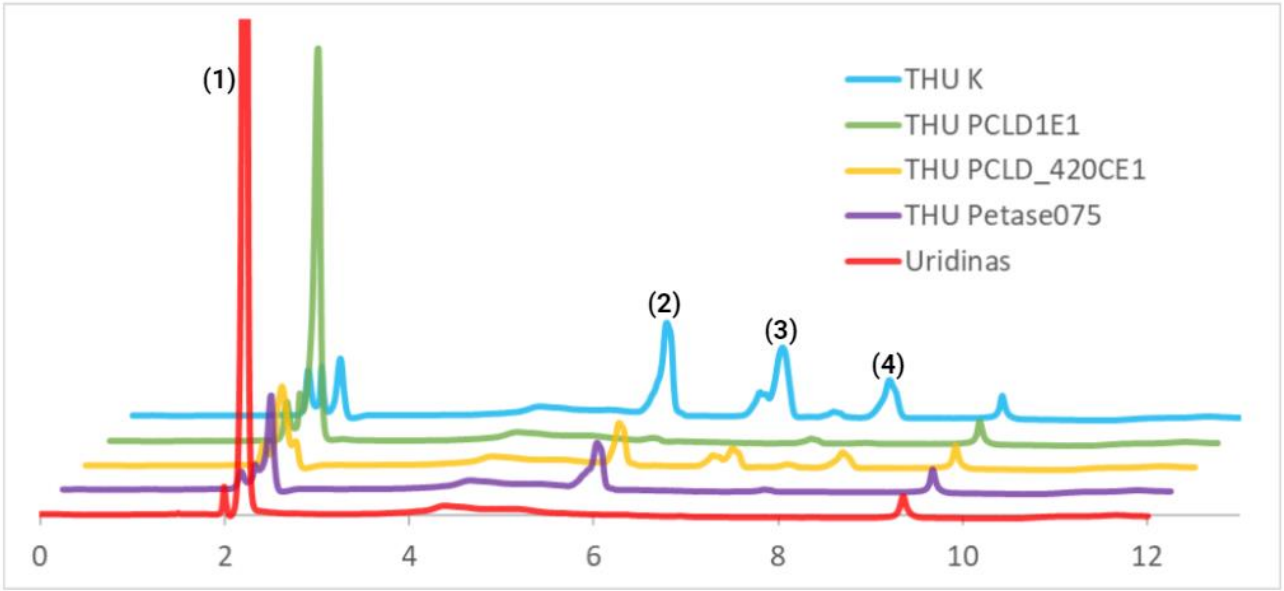


12 pav. Plonasluoksnės chromatografinės plokštelės apšviestos ultravioletine 254 nm bangos ilgio šviesa. Vienoje plokštelėje atvaizduotos hidrolizės reakcijos 2‘,3‘,5‘-tri-O-acetiluridinas (TAU) kitoje su 2‘,3‘,5‘-tri-O-heksanoiluridinas (THU). K – kontrolė be fermento, 1 – PETase075, 2 – PCLD_420CE1, 3 – PCLD1E1, U – uridinas.

Hidrolizės reakcijų mėginiai taip pat buvo analizuoti HPLC-MS analizatoriumi pagal 3.17 skyrelyje pateiktą metodą. Rezultatai atvaizduoti chromatogramoje (13 pav.), (14 pav.).



13 pav. Chromatograma, kurioje atvaizduota hidrolizės reakcijų metu išsiskyrę produktai. 1 – uridinas, 2 – 5‘-mono-*O*-acetiluridinas, 3 – 3‘,5‘-di-*O*-acetiluridinas, 4 – 2‘,3‘,5‘-tri-*O*-acetiluridinas (TAU).



14 pav. Chromatograma, kurioje atvaizduota hidrolizės reakcijų metu išsiskyrę produktai. 1 – uridinas, 2 – 2‘,3‘,5‘-tri-*O*-heksanoiluridinas (THU), 3 – 3‘,5‘-di-*O*-heksanoiluridinas (DHU), 4 – 5‘-mono-*O*-heksanoiluridinas (MHU). Šiuo atveju galima pastebėti, kad pradinis substratas THU suskilo iki DHU ir MHU.

Iš gautų uridino esterių hidrolizės reakcijų rezultatų galima pastebėti skirtingus susidariusius produktus. PETase075 esterazė hidrolizavo 2‘,3‘,5‘-tri-O-acetiluridiną (molekulinė jono masė 371 (+)) iki 3‘,5‘-di-*O*-acetiluridino (molekulinė jono masė 329 (+)) bei 5‘-mono-*O*-acetiluridino (molekulinė jono masė 287 (+)), o 2‘,3‘,5‘-tri-*O*-heksanoiluridiną (molekulinė jono masė 371 (+)) hidrolizavo iki 5‘-mono-*O*-heksanoiluridino (molekulinė jono masė 343 (+)). PCLD_420CE1 atveju hidrolizė pastebima tik 2‘,3‘,5‘-tri-*O*-heksanoiluridino (molekulinė jono masė 371 (+)) atveju, kuomet matoma hidrolizė iki 3‘,5‘-di-O-heksanoiluridino (molekulinė jono masė 441 (+)) ir 5‘-mono-O-heksanoiluridino (molekulinė jono masė 343 (+)). Tuo tarpu PCLD1E1 abu uridino esterius hidrolizuoja iki uridino (molekulinė jono masė 245 (+)). PETase075 bei PCLD_420CE1 esterazės pasižymi daliniu regio-selektyvumu hidrolizuojant substratą, o PCLD1E1 selektyvumas nepasireiškia.

5. IŠVADOS

- Atlikus uridino esterius hidrolizuojančių esterazių atranką selektyvioje M9 terpėje *E. coli* uracilo auksotrofo kamiene, identifikuotos trys aktyvios nukleozidų analogų atžvilgiu esterazės.
- Nustatyta, kad regio-selektyvumu pasižymėjo esterazės PETase075 ir PCLD420CE1.
- PCLD1E1 hidrolizavo uridino esterius iki uridino ir regio-selektyvumu nepasižymėjo.
- Lyginant hidrolizės produktus, PCLD420CE1 efektyviau hidrolizavo ilgesnės alifatinės grandinės esterius (THU) lyginat su trumpos grandinės esteriais (TAU)
- PETase075 taip pat geriau hidrolizavo ilgesnės alifatinės grandinės esterius (THU). (TAU) atveju hidrolizė vyko iki 3‘,5‘-di-*O*-acetiluridino ir 5‘-mono-*O*-acetiluridino, pradinis substratas pilnai nebuvo hidrolizuotas, (THU) atveju hidrolizė vyko iki 5‘-mono-*O*-heksanoiluridino, pradinis substratas buvo pilnai hidrolizuotas.
- Optimizuojant fermentų augimo sąlygas nustatyta kad:
    - Fermentų PCLD1E1 ir PCLD420CE1 tirpumą padidino į terpę pridėta sacharozė.
    - PCLD1E1 fermento išeiga pagerėjo apie septynis kartus.

6. LITERATŪRA

[1] D. Kumar, L. Kumar, S. Nagar, C. Raina, R. Parshad, and V. K. Gupta, "Screening, isolation and production of lipase/esterase producing Bacillus sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions," 2012.

[2] U. T. Bornscheuer, "Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis," *FEMS Microbiol Rev*, vol. 26, no. 1, pp. 73–81, Mar. 2002, doi: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00599.x.

[3] D. L. Ollis *et al.*, "The alpha/beta hydrolase fold," *Protein Eng*, vol. 5, no. 3, pp. 197–211, Apr. 1992, doi: 10.1093/protein/5.3.197.

[4] M. Holmquist, "Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and Mechanisms," *curr protein pept sci*, vol. 1, no. 2, pp. 209–235, Sep. 2000, doi: 10.2174/1389203003381405.

[5] H. Soreq, *Human cholinesterases and anticholinesterases*. Academic Press, 2012.

[6] E. A. Barnard, "Neuromuscular Transmission—Enzymatic Destruction of Acetylcholine," in *The Peripheral Nervous System*, J. I. Hubbard, Ed., Boston, MA: Springer US, 1974, pp. 201–224. doi: 10.1007/978-1-4615-8699-9_9.

[7] C. Upton and J. T. Buckley, "A new family of lipolytic enzymes?," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 20, no. 5, pp. 178–179, May 1995, doi: 10.1016/S0968-0004(00)89002-7.

[8] C. C. Akoh, G.-C. Lee, Y.-C. Liaw, T.-H. Huang, and J.-F. Shaw, "GDSL family of serine esterases/lipases," *Progress in Lipid Research*, vol. 43, no. 6, pp. 534–552, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.plipres.2004.09.002.

[9] A. C. Anderson, S. Stangherlin, K. N. Pimentel, J. T. Weadge, and A. J. Clarke, "The SGNH hydrolase family: a template for carbohydrate diversity," *Glycobiology*, vol. 32, no. 10, pp. 826–848, Oct. 2022, doi: 10.1093/glycob/cwac045.

[10] Y. J. Choi, C. B. Miguez, and B. H. Lee, "Characterization and Heterologous Gene Expression of a Novel Esterase from *Lactobacillus casei* CL96," *Appl Environ Microbiol*, vol. 70, no. 6, pp. 3213–3221, Jun. 2004, doi: 10.1128/AEM.70.6.3213-3221.2004.

[11] S. Kermasha, B. Bisakowski, S. Ismail, and A. Morin, "The e€ ect of physical and chemical treatments on the esterase activity from Pseudomonas fragi CRDA 037," *Food Research International*, 2000.

[12] J. Dufour and Y. Bing, "Influence of yeast strain and fermentation conditions on yeast esterase activities," *Brew Dig*, vol. 76, p. 44, 2001.

[13] K. Fukuda *et al.*, "Balance of Activities of Alcohol Acetyltransferase and Esterase in *Saccharomyces cerevisiae* Is Important for Production of Isoamyl Acetate," *Appl Environ Microbiol*, vol. 64, no. 10, pp. 4076–4078, Oct. 1998, doi: 10.1128/AEM.64.10.4076-4078.1998.

[14] R. Jahangir, C. B. McCloskey, W. G. Mc Clung, R. S. Labow, J. L. Brash, and J. P. Santerre, "The influence of protein adsorption and surface modifying macromolecules on the hydrolytic degradation of a poly(ether–urethane) by cholesterol esterase," *Biomaterials*, vol. 24, no. 1, pp. 121–130, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00269-7.

[15] G. T. Howard, B. Crother, and J. Vicknair, "Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (pueB) from Pseudomonas chlororaphis," *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 47, no. 3, pp. 141–149, 2001, doi: 10.1016/S0964-8305(01)00042-7.

[16] D. Shen, J.-H. Xu, H.-Y. Wu, and Y.-Y. Liu, "Significantly improved esterase activity of Trichosporon brassicae cells for ketoprofen resolution by 2-propanol treatment," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 18, no. 4–6, pp. 219–224, Oct. 2002, doi: 10.1016/S1381-1177(02)00099-1.

[17] G.-J. Kim, G.-S. Choi, J.-Y. Kim, J.-B. Lee, D.-H. Jo, and Y.-W. Ryu, "Screening, production and properties of a stereospecific esterase from Pseudomonas sp. S34 with high selectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 17, no. 1, pp. 29–38, Mar. 2002, doi: 10.1016/S1381-1177(01)00077-7.

[18] W. Wrasidlo *et al.*, "Synthesis, Hydrolytic Activation and Cytotoxicity of Etoposide Prodrugs," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 12, no. 4, pp. 557–560, Feb. 2002, doi: 10.1016/S0960-894X(01)00801-0.
[19] I. Horne, R. L. Harcourt, T. D. Sutherland, R. J. Russell, and J. G. Oakeshott, "Isolation of a Pseudomonas monteilli strain with a novel phosphotriesterase," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 206, no. 1, pp. 51–55, Jan. 2002, doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb10985.x.
[20] J. Martín Reina, J. Duarte, L. Cerrillos, J. D. Bautista Palomas, and I. M. Moreno Navarro, "Insecticide reproductive toxicity profile: organophosphate, carbamate and pyrethroids," *Journal of Toxins, 4 (1), 1-7.*, 2017.
[21] L. Bai *et al.*, "Identification and biochemical characterization of carboxylesterase 001G associated with insecticide detoxification in Helicoverpa armigera," *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 157, pp. 69–79, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.pestbp.2019.03.009.
[22] H. Kontkanen, M. Tenkanen, R. Fagerström, and T. Reinikainen, "Characterisation of steryl esterase activities in commercial lipase preparations," *Journal of Biotechnology*, vol. 108, no. 1, pp. 51–59, Feb. 2004, doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.11.003.
[23] T. Panda and B. S. Gowrishankar, "Production and applications of esterases," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 67, no. 2, pp. 160–169, Apr. 2005, doi: 10.1007/s00253-004-1840-y.
[24] G. P. Connolly and J. A. Duley, "Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 20, no. 5, pp. 218–225, May 1999, doi: 10.1016/S0165-6147(99)01298-5.
[25] J. Maowa *et al.*, "Pharmacokinetics and Molecular Docking Studies of Uridine Derivatives as SARS-COV-2 Mpro Inhibitors," *PCR*, vol. 9, no. 3, Sep. 2021, doi: 10.22036/pcr.2021.264541.1869.
[26] G. W. Koszalka, S. M. Daluge, and F. Leslie Boyd, "Advances in Nucleoside and Nucleotide Antiviral Therapies," in *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, vol. 33, Elsevier, 1998, pp. 163–171. doi: 10.1016/S0065-7743(08)61081-7.
[27] K. Y. Chan, A. B. Kinghorn, M. Hollenstein, and J. A. Tanner, "Chemical Modifications for a Next Generation of Nucleic Acid Aptamers," *ChemBioChem*, vol. 23, no. 15, p. e202200006, Aug. 2022, doi: 10.1002/cbic.202200006.
[28] I. Mikhailopulo and A. Miroshnikov, "New trends in nucleoside biotechnology," *Acta Naturae (англоязычная версия)*, vol. 2, no. 2 (5), pp. 36–58, 2010.
[29] A. Alam, M. A. Hosen, A. Hosen, Y. Fujii, Y. Ozeki, and S. M. Abe Kawsar, "Synthesis, characterization, and molecular docking against a receptor protein FimH of Escherichia coli (4XO8) of thymidine derivatives," *Journal of the Mexican Chemical Society*, vol. 65, no. 2, pp. 256–276, 2021.
[30] C. A. Arbour and B. Imperiali, "Uridine natural products: Challenging targets and inspiration for novel small molecule inhibitors," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 28, no. 18, p. 115661, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.bmc.2020.115661.
[31] R. kumar Thatipamula, S. Narsimha, K. Battula, V. Rajendra Chary, E. Mamidala, and N. Vasudeva Reddy, "Synthesis, anticancer and antibacterial evaluation of novel (isopropylidene) uridine-[1,2,3]triazole hybrids," *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 21, no. 7, pp. 795–802, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.jscs.2015.12.001.
[32] L. P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, and C. Dumontet, "Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 12, no. 6, pp. 447–464, Jun. 2013, doi: 10.1038/nrd4010.
[33] T. C. Pierson and M. S. Diamond, "The continued threat of emerging flaviviruses," *Nat Microbiol*, vol. 5, no. 6, pp. 796–812, May 2020, doi: 10.1038/s41564-020-0714-0.
[34] K. Uemura *et al.*, "2-thiouridine is a broad-spectrum antiviral nucleoside analogue against positive-strand RNA viruses," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 120, no. 42, p. e2304139120, Oct. 2023, doi: 10.1073/pnas.2304139120.

[35] H. Kantarjian *et al.*, “Phase I clinical and pharmacokinetic study of oral sapacitabine in patients with acute leukemia and myelodysplastic syndrome,” *J Clin Oncol*, vol. 28, no. 2, pp. 285–291, Jan. 2010, doi: 10.1200/JCO.2009.25.0209.
[36] N. L. Krett *et al.*, “8-amino-adenosine is a potential therapeutic agent for multiple myeloma,” *Mol Cancer Ther*, vol. 3, no. 11, pp. 1411–1420, Nov. 2004.
[37] C. M. Walko and C. Lindley, “Capecitabine: A review,” *Clinical Therapeutics*, vol. 27, no. 1, pp. 23–44, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.clinthera.2005.01.005.
[38] E. Ichikawa and K. Kato, “Sugar-Modified Nucleosides in Past 10 Years, A Review,” *CMC*, vol. 8, no. 4, pp. 385–423, Mar. 2001, doi: 10.2174/0929867013373471.
[39] I. A. Mikhailopulo and A. I. Miroshnikov, “New trends in nucleoside biotechnology,” *Acta Naturae*, vol. 2, no. 2, pp. 36–59, Jul. 2010.
[40] N. Li, T. J. Smith, and M.-H. Zong, “Biocatalytic transformation of nucleoside derivatives,” *Biotechnol Adv*, vol. 28, no. 3, pp. 348–366, 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.006.
[41] N. Li, M.-H. Zong, X.-M. Liu, and D. Ma, “Regioselective synthesis of 3′-O-caproyl-floxuridine catalyzed by Pseudomonas cepacia lipase,” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 47, no. 1–2, pp. 6–12, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.molcatb.2007.02.006.
[42] Z.-Y. Wang, Y.-H. Bi, X.-Q. Li, and M.-H. Zong, “Influence of substituent groups in regioselective acylation of nucleosides by Novozym 435 lipase,” *Process Biochemistry*, vol. 48, no. 8, pp. 1208–1211, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.procbio.2013.06.022.
[43] L.-H. Du, H.-M. Ling, and X.-P. Luo, “Michael addition of pyrimidine derivatives with acrylates catalyzed by lipase TL IM from Thermomyces lanuginosus in a continuous-flow microreactor,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 15, p. 7770, 2014, doi: 10.1039/c3ra47470d.
[44] L.-H. Du *et al.*, “Enzymatic synthesis of nucleoside analogues from uridines and vinyl esters in a continuous-flow microreactor,” *RSC Adv.*, vol. 8, no. 23, pp. 12614–12618, 2018, doi: 10.1039/C8RA01030G.
[45] M. Ferrero and V. Gotor, “Biocatalytic Selective Modifications of Conventional Nucleosides, Carbocyclic Nucleosides, and *C* -Nucleosides,” *Chem. Rev.*, vol. 100, no. 12, pp. 4319–4348, Dec. 2000, doi: 10.1021/cr000446y.
[46] E. Erickson *et al.*, “Sourcing thermotolerant poly(ethylene terephthalate) hydrolase scaffolds from natural diversity,” *Nat Commun*, vol. 13, no. 1, p. 7850, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-35237-x.
[47] N. Urbelienė *et al.*, “Application of the uridine auxotrophic host and synthetic nucleosides for a rapid selection of hydrolases from metagenomic libraries,” *Microbial Biotechnology*, vol. 12, no. 1, pp. 148–160, Jan. 2019, doi: 10.1111/1751-7915.13316.
[48] J. Kaur, A. Kumar, and J. Kaur, “Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 106, pp. 803–822, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Kipras Čekanauskas

Regio-selektyvių esterazių taikymas nukleozidų modifikavimui

Šiame darbe buvo analizuojamos šešios esterazės: PCLD420CE1, PCLD1E1, PETase075, PCLD3E2, PCLDK29_3, PCLD5BE1, kurios buvo atrinktos iš žemės mėginių paruošus metogenomines arba genomines bibliotekas Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus (Bchi, GMC, VU) darbuotojų, išskyrus PETase075.

Atrinktoms esterazėms toliau tyrime buvo vykdoma uridino esterius hidrolizuojančių esterazių atranka selektyvioje M9 terpėje *E. coli* uracilo auksotrofo kamiene. Pagal šį atrankos metodą iš šešių esterazių buvo atrinktos trys: PCLD420CE1, PCLD1E1 ir PETase075. Sekantis tyrimo žingsnis buvo atrinktų esterazių klonavimas bei His-tag sekų pridėjimas prie PCLD_420CE1 bei PCLD1E1. Pirmu biomasės auginimo buvo gautos nedidelės išeigos, todėl buvo bandyta optimizuoti auginimo sąlygas keičiant auginimo terpę. PCLD1E1 atveju išeiga padidėjo apie septynis kartus. Kitų fermentų išeigų padidėjimas nebuvo nustatytas.

Toliau su atrinktomis esterazėmis buvo vykdomos uridino esterių tai yra 2‘,3‘,5‘-tri-*O*-acetiluridino (TAU) ir 2‘,3‘,5‘-tri-*O*-heksanoiluridinas (THU) hidrolizės reakcijos, norint išsiaiškinti esterazių regio-selektyvumą. Atlikus reakcijas nustatyta, kad PCLD_420CE1 ir PETase075 vykdo uridino esterių hidrolizę iki tarpinių junginių, tuo tarpu PCLD1E1 hidrolizuoja iki uridino. Tai leido padaryti išvadą, kad PCLD420CE1 ir PETase075 selektyviai hidrolizuoja substratą, o PCLD1E1 selektyvumu nepasižymi.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCE CENTER

Kipras Čekanauskas

Application of regioselective esterases for nucleoside modification

Six esterases, PCLD420CE1, PCLD1E1, PETase075, PCLD3E2, PCLDK29_3, PCLD5BE1, were analysed in this work, which were selected from ground samples after preparation of metogenomic or genomic libraries by scientists of the Department of Molecular Microbiology and Biotechnology (BCHI, GMC, VU), except PETase075.

For the selected esterases, the study further involved the screening of esterases hydrolyzing uridine esters on selective M9 medium in the *E. coli* uracil auxotroph strain. Three of the six esterases, PCLD420CE1, PCLD1E1 and PETase075, were selected by this screening method. The next step in the study was to clone the selected esterases and add His-tag sequences to PCLD420CE1 and PCLD1E1. Low yields were obtained in the first biomass cultivation and therefore attempts were made to optimise the cultivation conditions by changing the cultivation medium. For PCLD1E1, the yield increase was about seven times. For the other enzymes, no increase in yield was detected.

The selected esterases were further used in the hydrolysis reactions of the uridine esters 2',3',5'-tri-*O*-acetyl uridine (TAU) and 2',3',5'-tri-*O*-hexanoyl uridine (THU) in order to investigate the regioselectivity of esterases. The reactions showed that PCLD420CE1 and PETase075 hydrolysed uridine esters to intermediates whereas PCLD1E1 hydrolysed to uridine. This led to the conclusion that PCLD420CE1 and PETase075 selectively hydrolyse the substrate, whereas PCLD1E1 does not.