

VILNIAUS UNIVERSITETAS

EUGENIJUS ŠIMOLIŪNAS

**BAKTERIOFAGŲ STRUKTŪRINIŲ BALTYMŲ
PANAUDOJIMAS SAVITVARKIŲ
NANOSTRUKTŪRŲ SURINKIMUI**

Daktaro disertacija,
Fiziniai mokslai, Biochemija (04 P)

Vilnius, 2017

Disertacija parengta 2012–2016 metais Vilniaus universiteto Biochemijos institute, Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje.

Mokslinis vadovas:

Dr. Rolandas Meškys (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

TURINYS

SANTRUMPOS.....	5
ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1 Bakteriofagų įvairovė, identifikavimas ir charakterizavimas	11
1.2 Bakteriofagų praktinė taikomoji reikšmė	14
1.3 Virusinių baltymų pagrindu paremtų nanostruktūrų konstravimas.....	15
1.4 <i>Myoviridae</i> bakteriofagų uodegėlės apvalkalas	18
1.5 <i>Siphoviridae</i> bakteriofagų uodegėlės vamzdelis	24
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	29
2.1. Medžiagos.....	29
2.1.1. Bakteriofagai.....	29
2.1.2. Bakterijų kamienai	29
2.1.3. Plazmidiniai vektoriai	29
2.1.4. Oligonukleotidiniai pradmenys.....	29
2.1.5. Cheminės medžiagos	37
2.1.6. Fermentai	37
2.1.7. Terpės ir buferiniai tirpalai	37
2.2 Metodai.....	38
2.2.1 Bakterinių ląstelių auginimas.....	38
2.2.2 Bakteriofagų izoliavimas	39
2.2.3 Bakteriofagų dauginimas	39
2.2.4 Bakteriofagų titravimas.....	40
2.2.5 Bakteriofagų ląstelių šeiminių spektro nustatymas	41
2.2.6 Bakteriofagų infekcinio efektyvumo, adsorbcijos ir išėigos iš vienos ląstelės šeiminių eksperimentai	41
2.2.7 Bakteriofagų gryninimas cezio chlorido gradientu	42
2.2.8 Preparatų paruošimas TEM metodui	42
2.2.9 Fagų genomines DNR išskyrimas ir gryninimas	43
2.2.10 Plazmidinės DNR išskyrimas	44
2.2.11 DNR amplifikavimas <i>in vitro</i> PGR metodu.....	44
2.2.12 DNR elektroforezė agarozės gelyje	44
2.2.13 Plazmidinių vektorių konstravimas.....	45
2.2.14 Bakterinių ląstelių transformacija	45
2.2.15 DNR nukleotidų sekų nustatymas ir analizė.....	46
2.2.16 Rekombinantinių baltymų biosintezė	46
2.2.17 Bakterinių ląstelių ardymas ir baltymų analizė.....	47
2.2.18 Rekombinantinių baltymų gryninimas.....	47
3. REZULTATAI.....	49
3.1 Naujų bakteriofagų charakterizavimas.....	49
3.1.1 <i>Klebsiella</i> sp. bakteriofagas vB_KleM-RaK2	49
3.1.2 <i>Arthrobacter</i> bakteriofagas vB_ArS-ArV2	51
3.1.3 <i>Arthrobacter</i> bakteriofagas vB_ArtM-ArV1	53
3.1.4 <i>Escherichia coli</i> bakteriofagas vB_EcoS_NBD2	55
3.1.5 <i>Escherichia coli</i> bakteriofagas vB_EcoM-FV3.....	56

3.2 Bakteriofagų struktūrinius baltymus koduojančių genų klonavimas, raiška ir formuojamų nanostruktūrų analizė.....	57
3.2.1 Bakteriofago RaK2 struktūrinių baltymų tyrimai	58
3.2.2 Bakteriofagų ArV1 ir ArV2 struktūrinių baltymų tyrimai.....	60
3.2.3 Bakteriofago NBD2 struktūrinių baltymų tyrimai.....	61
3.2.4 Bakteriofago FV3 struktūrinių baltymų tyrimai	62
3.3 Bakteriofago FV3 gp053 formuojamų nanostruktūrų tyrimai	64
3.3.1 Baltymo gp053 sekos bioinformatinė analizė.....	64
3.3.2 Rekombinantinio gp053 biosintezė, gryninimas ir stabilumo tyrimai...	67
3.3.3 gp053 delecinių mutantų tyrimai	72
3.3.4 gp053 mutantų su tikslinėmis klonavimo vietomis tyrimai.....	81
3.3.5 gp053 pagrindu sukurtų hibridinių baltymų tyrimai.....	87
3.3.6 gp053 vamzdelių ir aukso nanodalelių hibridai	96
3.3.7 gp053 mutantų oligomerų tyrimai	97
REZULTATŲ APIBENDRINIMAS.....	102
IŠVADOS	105
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	106
FINANSINĖ PARAMA	110
PADĖKA	111
LITERATŪROS SĄRAŠAS	112

SANTRUMPOS

- a.r. – aminorūgštis
- ASR – atviras skaitymo rėmelis
- ATCC – amerikos tipinių kultūrų kolekcija (*angl.* American Type Culture Collection)
- CPMV – kininės pupuolės mozaikos virusas (*angl.* cowpea mosaic virus)
- CPV – šunų parvovirusas (*angl.* canine parvovirus)
- DSMZ – Vokietijos mikroorganizmų ir ląstelių kultūrų kolekcija (*vok.* Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
- EDTA – N,N,N',N'-etilendiaminotetraacto rūgštis (*angl.* ethylenediaminetetraacetic acid)
- e.o.p. – infekcinis efektyvumas (*angl.* efficiency of plating)
- FHV – flock house virusas (*angl.* flock house virus)
- gDNR – genomine DNR
- HBV – hepatito B virusas
- IPTG – izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozidas
- Krio-EM – krioelektroninė mikroskopija
- LB – Luria-Bertani terpė
- LC-MS/MS – skysčių chromatografja-masių spektrometrija (*angl.* liquid chromatography–mass spectrometry)
- MCIC – agarizuota terpė (*angl.* MacConkey-inositol-carbenicillin agar)
- MOI – infekcijos daugybiškumas (*angl.* multiplicity of infection)
- NCBI – nacionalinis biotechnologijos informacijos centras (*angl.* National Center for Biotechnology Information)
- NCP – nesutrauktos konformacijos poliaapvalkalai (*angl.* „noncontracted polysheaths“ (NCP))
- OT – optinis tankis
- PAA – poliakrilamidas
- PB – fosfatinis bakteriofagų suspensijos buferinis tirpalas (*angl.* phosphate buffer)
- PDB – baltymų duomenų bankas (*angl.* Protein Data Bank)
- pDNR – plazmidinė DNR
- PGR – polimerazės grandininė reakcija
- PLTS – į bakteriofagų uodegėlę panašios baltymų pernešimo struktūros (*angl.* phage tail-like protein translocation structures)
- PFU – negatyvias lizės zonas formuojantis infekcinis vienetas (*angl.* plaque forming unit)
- PVX – bulvių virusas X (*angl.* potato virus X)

SCAI – Simonso citrato agaras su inozitoliu (*angl.* Simmons citrate agar inositol)

SDS–PAGE – elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (*angl.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

TCP – uodegėlės užbaigimo baltymas (*angl.* tail completion protein)

TEM – transmisinė elektroninė mikroskopija

TMP – uodegėlės ilgio matavimo baltymas (*angl.* tape measure protein)

TMV – tabako mozaikos virusas

TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis

TrP – uodegėlės terminatorinis baltymas (*angl.* tail terminator protein)

TTC – uodegėlės galiuko kompleksas (*angl.* tail tip complex)

TTP – uodegėlės vamzdelio baltymas (*angl.* tail-tube protein)

T4 PNK – T4 polinukleotidkinazė

T6SS – VI tipo sekrecijos sistema (*angl.* type VI secretion system)

VNPs – virusų pagrindu sukurtos nanodalelės (*angl.* virus-based nanoparticles)

IVADAS

Pastaraisiais dešimtmečiais mokslo ir technologijų srityje ypatingas dėmesys skiriamas įvairių nanostruktūrų, paremtų savaime susirenkančiomis biomolekulėmis, konstravimui. Tyrimai šioje srityje nepaprastai svarbūs tiek fundamentiniu požiūriu, tiek dėl galimo šių struktūrų plataus praktinio taikymo galimybių pramonėje, medicinoje ir daugelyje kitų sričių (Busseron et al., 2013; Li ir Wang, 2014; Lee et al., 2016). Dėl šios priežasties ypač didelė ir saviagregacijos tyrimuose naudojamų (bio)molekulių įvairovė. Savaime susirenkančios nanostruktūros konstruojamos iš nukleotidų (Pinheiro et al., 2011; Zhang et al., 2014), peptidų (Mandal et al., 2014; Sharma et al., 2015), baltymų (Kostiainen et al., 2013; Glover et al., 2016) bei virusų, įskaitant ir bakteriofagų (Lee et al., 2012; Molek ir Bratkovic, 2015; Pires et al., 2016).

Bakteriofagų (taip pat ir kitų virusų) ar jų struktūrinių baltymų naudojimas nanobiotechnologijoje patrauklus ne tik dėl šių mikroorganizmų struktūrinių baltymų unikalių fizikinių, cheminių ir termodinaminių savybių, kurios išsivystė dėl ilgus metus trukusios evoliucijos, bet ir dėl galimybės šiuos baltymus lengvai modifikuoti tiek cheminių reakcijų metu, tiek taikant genų inžinerijos metodus (Pokorski ir Steinmetz, 2011). Be to, šių dalelių dydis, kuris svyruoja nuo keliasdešimties iki kelių tūkstančių nanometrų, taip pat yra ypač tinkamas nanostruktūrų formavimui (Douglas ir Young, 2006). Galiausiai, produktyvi šių nanostruktūrų gamyba, vykdant baltymų raišką ląstelėse, ir patogus gryninimas yra pigūs ir tausojantys aplinką procesai (Li ir Wang, 2014).

Nepaisant to, bakteriofagų struktūrinių baltymų polimerizacijos ir jų formuojamų nanostruktūrų tyrimai iki šiol vis dar yra atliekami tik su labai ribotu kiekiu tiriamųjų objektų. Dauguma darbų, kuriuose tiriama bakteriofagų struktūrinių baltymų praktinio pritaikymo galimybė biosensorių, energijos saugojimo prietaisų gamyboje, nanobiopolimerų sintezėje, audinių inžinerijoje ir dar daugelyje kitų sričių, yra atliekami naudojant bakteriofagą M13 (Moon et al., 2015; Pires et al., 2016). Taip pat tirtas ir savaime susirenkančių

nanosuktūrų konstravimas naudojant bakteriofagų T4 (Daube et al., 2007; Yokoi et al., 2010), P22 (Bhardwaj et al., 2008) ar phi29 (Guo, 2005) struktūrinius baltymus.

Kita vertus, daugybė bakteriofagų struktūrinių baltymų šiuo metu net nėra nustatyti arba nors ir yra žinoma (spėjama) jų funkcija, tačiau detalesni tyrimai vis dar nėra atlikti. Siekiant bent iš dalies pakeisti esamą situaciją, šio darbo metu buvo vykdoma naujai išskirtų bakteriofagų struktūrinių baltymų, formuojančių savaime susirenkančias nanosuktūras, paieška ir jų formuojamų struktūrų tyrimai. Taip pat bakteriofagų struktūrinių baltymų pagrindu buvo konstruojami hibridiniai baltymai bei tiriamos jų formuojamos struktūros.

Darbo tikslas

Panaudoti bakteriofagų struktūrinius baltymus tikslingam savitvarkių hibridinių nanosuktūrų konstravimui.

Uždaviniai

1. Identifikuoti ir charakterizuoti naujus bakteriofagus bei jų struktūrinius baltymus.
2. Nustatyti, kurie iš identifikuotų struktūrinių baltymų yra tinkami savitvarkių nanosuktūrų konstravimui *in vivo* ar *in vitro*.
3. Sukonstruoti bakteriofagų struktūrinių baltymų mutantus ir ištirti jų formuojamas nanosuktūras.
4. Panaudojant bakteriofagų struktūrinius baltymus sukonstruoti hibridinius baltymus ir ištirti jų formuojamas nanosuktūras.

Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė

Darbo metu identifikuoti ir charakterizuoti 5 nauji bakteriofagai. Paskelbus *Klebsiella* bakteriofago RaK2 genomą NCBI duomenų bazėje, tai buvo didžiausią genomą turintis *Klebsiella* sp. infekuojantis bakteriofagas su pilnai nustatyta genomo seka bei antras pagal publikuoto genomo dydį bakterijas infekuojantis virusas. Pirmą kartą NCBI duomenų bazėje buvo publikuota ir *Arthrobacter* fago genomo seka (ArV2). Tuo tarpu bakteriofagas

ArV1 buvo pirmasis *Arthrobacter* sp. genties bakterijas infekuojantis *Myoviridae* šeimos bakteriofagas su NCBI duomenų bazėje paskelbta genomo seka. Darbo metu atlikti bakteriofagų morfologijos, fiziologijos, genomų bioinformatinės analizės ir daugelis kitų tyrimų yra ypač svarbūs gilinant teorines žinias apie bakteriofagų įvairovę, jų tarpusavio ryšius bei praktinio pritaikymo galimybes įvairiose srityse.

Nors bakteriofagų uodegėlės apvalkalo baltymų formuojamų nanostruktūrų tyrimai vykdomi jau ilgą laiką (dauguma darbų atlikta su *E. coli* bakteriofagu T4), tačiau jų metu, iš esmės, buvo atliekami tik natyvių ar mutantinių rekombinantinių baltymų polimerizavimosi ir jų formuojamų struktūrų tyrimai. Iki šiol, mūsų duomenimis, literatūroje duomenų apie bakteriofagų uodegėlės apvalkalo baltymo pagrindu sukurtų hibridinių baltymų panaudojimą konstruojant savaime susirenkančias nanostruktūras nebuvo skelbta. Dėl šios priežasties darbo metu gautų bakteriofago FV3 gp053 pagrindu sukurtų hibridinių baltymų tyrimai ypač svarbūs ieškant naujų, alternatyvių biomolekulių nanostruktūrų sintezei.

Darbų su bakteriofago NBD2 gp39 metu pirmą kartą įrodyta, kad bakteriofago rekombinantiniai uodegėlės vamzdelio baltymai *in vivo*, net ir nesant iniciacinio baltymų komplekso, polimerizuojasi į tvarkingos struktūros, lanksčias ir ypač ilgas (net iki 3 μm) vamzdelines struktūras. Šie rezultatai svarbūs ne tik konstruojant naujų bakteriofagų struktūrinių baltymų pagrindu paremtas savitvarkes struktūras, kurios ateityje galėtų būti pritaikytos įvairiose nanobiotechnologijos srityse, bet ir suteikia naujų žinių apie bakteriofagų uodegėlės vamzdelio baltymų savybes.

Ginamieji teiginiai

1. Rekombinantiniai *Klebsiella* bakteriofago RaK2 gp041, taip pat *Esherichia* bakteriofagų NBD2 gp39 ir FV3 gp053 *in vivo*, nesant kitų faginių baltymų, formuoja savaime susirenkančias, tvarkingas vamzdelines struktūras.
2. Fago FV3 rekombinantinio gp053 formuojami nanovamzdeliai – įvairiems aplinkos veiksniams ypatingai atsparios struktūros.
3. C-galinių aminorūgščių delecijos turi mažiau įtakos FV3 gp053 polimerizacijos procesui nei aminorūgščių panaikinimas iš šio baltymo N-galo.
4. FV3 mutantiniai gp053 ir jų pagrindu sukonstruoti hibridiniai baltymai formuoja nanovamzdelines struktūras, kurių savybės priklauso nuo pašalintų ar įterptų aminorūgščių skaičiaus, taip pat jų pozicijos baltymo sekoje.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

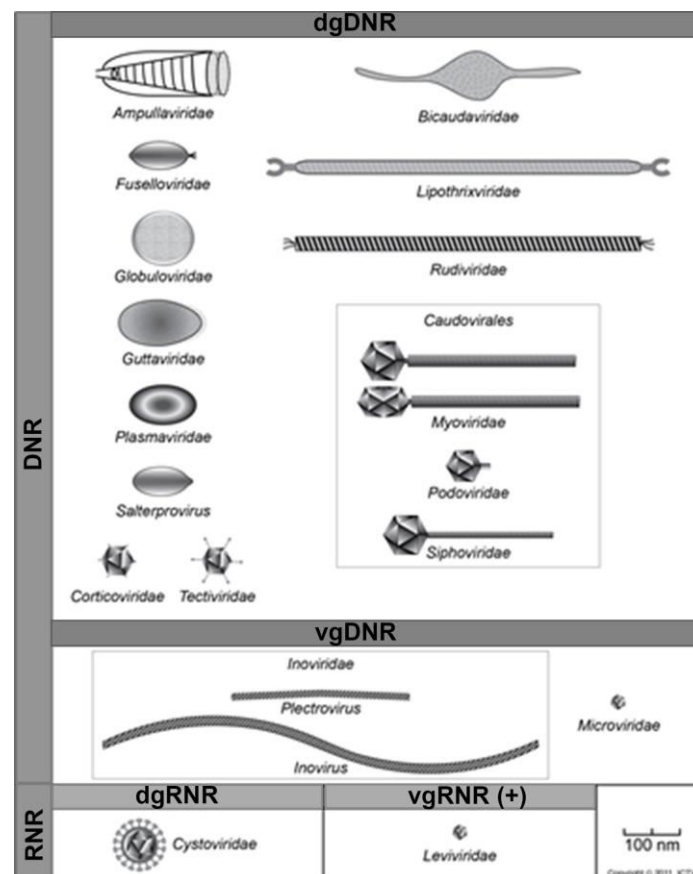
1.1 Bakteriofagų įvairovė, identifikavimas ir charakterizavimas

Bakteriofagai (fagai) – virusai, infekuojantys bakterijas. Fagai, kaip ir eukariotų (augalų, gyvūnų ir grybų) virusai, pasižymi didele funkcine ir struktūrine įvairove. Tipinę bakteriofago struktūrą sudaro nukleorūgštis ir ją gaubiantis išorinis baltyminis sluoksnis – kapsidė. Baltyminė struktūra apsaugo viruso genetinę medžiagą nuo neigiamų aplinkos veiksnių ir užtikrina efektyvų jos patekimą į infekuojamos bakterijos vidų. Kita vertus, kai kurie bakteriofagai be nukleorūgščių ir baltymų dar turi ir fosfolipidinį bisluoksnį, kuris dengia baltyminę kapsidę iš išorės ir yra reikalingas viriono patekimui arba pašalinimui iš ląstelės šeimininkės į išorinę aplinką. Kai kurių virusų lipidinis bisluoksnis yra kapsidės vidinėje dalyje, pavyzdžiui, *Tectiviridae* šeimos faguose (Bamford, 2005). Bakteriofagų genetinė medžiaga yra DNR (daugumos) arba RNR, viengrandinė arba dvigrandinė forma, žiedinė arba linijinė, su grandinės galuose prisitvirtinusiis baltymais arba be jų (Ackerman, 2005).

Fagai yra labai plačiai paplitę ir randami visose šeimininkų užimamose nišose: dirvožemyje, vandenyje, gyvūnų virškinamajame trakte ir kitose bakterijų aptikimo vietose. Bendras jų skaičius biosferoje gali svyruoti nuo 10^{30} iki 10^{32} vnt. (Kutter ir Sulakvelidze, 2005). Dirvožemio mėginiuose fagų koncentracija gali siekti iki 10^9 vnt/g, vandens ekosistemose – nuo 10^4 iki 10^8 vnt/ml, o infekuotų bakterijų skaičius sudaryti iki 70 % (Wommack ir Colwel, 2000; Weinbauer, 2004; Suttle, 2005). Bakteriofagai atlieka svarbų vaidmenį mikroorganizmų ekologijoje ir, manoma, yra pagrindinė varomoji jėga, kurianti bakterijų populiacijų genetinę įvairovę (Abedon, 2008; Clokie et al., 2011).

Tarptautinis virusų taksonomijos komitetas – ICTV (*angl.* International Committee on Taxonomy of Viruses) yra nustatęs tam tikrus kriterijus, kuriais remiantis atliekamas naujų prokariotų virusų (bakteriofagų bei archėjas infekuojančių virusų) identifikavimas ir charakterizavimas. Šių procedūrų metu

gali būti atsižvelgta net į 70 virusų savybių, įskaitant: nukleorūgšties prigimtį, viriono morfologiją, fizikines bei chemines savybes, bakteriofagų inaktyvacijos veiksnius, fagų virionų replikacijos, susirinkimo mechanizmus, fiziologines savybes (vystymosi temperatūrą, ląstelių šeiminių ratą, vystymosi ciklo tipą) (Ackerman, 2009). Vis dėlto, nukleorūgščių prigimtis ir bendra morfologija šiuo metu yra patys svarbiausi kriterijai, iš esmės lemiantys, kokiai šeimai ar kitam taksonominiam rangui bus priskiriami konkretūs bakteriofagai (Ackerman, 2009). Šiuo metu žinomos prokariotų virusų šeimos ir joms būdingi morfologiniai požymiai bei genetinės informacijos tipai pateikiami 1.1 paveiksle.



1.1 pav. Bakterijas ir archėjas infekuojančių virusų taksonominės grupės. Paveikslas sudarytas remiantis King et al. pateikiama informacija (King et al., 2011).

Prokariotų virusai – pati skaitlingiausia virusų grupė, kurią sudaro virusai, infekuojantys bakterijas (bakteriofagai) ir virusai, infekuojantys

archėjas. Nuo 1959 iki šių dienų morfologiškai charakterizuota beveik 6300 prokariotų virusų, įskaitant 6196 bakteriofagus ir 88 archėjų virusus (Ackerman ir Prangishvili, 2012). Įdomu tai, kad absoliuti dauguma šių prokariotų virusų (96,3 %) turi uodegėlę (dauguma jų – bakteriofagai) ir tik 230 (3,7 %) yra poliedriniai, filamentiniai ar pleomorfiniai virusai (dauguma infekuoja archėjas) (Ackerman ir Prangishvili, 2012). Remiantis 2011 metais ICTV pateikta bakteriofagų klasifikacija, bakteriofagai infekuoja 179 bakterijų gentis, o patys yra priskiriami 10 bakteriofagų šeimų. Trys pagrindinės bakteriofagų šeimos, kurių atstovai turi uodegėlę, sudaro vadinamųjų uodeguotųjų fagų grupę – *Caudovirales*. Likusios septynios bakteriofagų šeimos yra labai negausios ir kartais turi tik po vieną atstavą (King et al., 2011).

Uodeguotieji bakteriofagai, manoma, yra vieni seniausių šiuo metu žinomų virusų. Šių fagų genetinė medžiaga yra dvigrandinė DNR, o galvutė – arba ištišusio, arba taisyklingo ikosaedro formos. Prie šių struktūrų tvirtinasi filamentinė uodegėlė, kuri yra spiralinės simetrijos ir iš esmės aprūpinta fiksuojančiomis struktūromis: bazinėmis plokštelėmis, spygliais, ataugėlėmis. Šie fagai neturi lipidinio apvalkalo. Virusinės dalelės prisitvirtina prie ląstelių šeimininkų paviršinių baltymų ir infekuoja jas virionui liekant išorinėje aplinkoje: į ląstelių vidų patenka tik fago DNR ir jos replikacijos iniciacijai reikalingi baltymai. Nauji fagai susirenka per kompleksą etapų, kurių metu fagų DNR įterpiama į jau iš anksto susiformavusias kapsides (Ackerman, 2005; Ackerman, 2009).

Uodeguotieji fagai pasižymi didele virionų dydžio ir struktūros, DNR ilgio ir sudėties, genomo struktūros, baltymų, antigeninių ir biologinių savybių įvairove. Fagai gali būti virulentiniai arba nuosaikieji. Remiantis fagų uodegėlių morfologija, yra išskiriamos 3 uodeguotųjų fagų šeimos: *Myoviridae* (uodegėlės ilgos ir susitraukiančios), *Siphoviridae* (uodegėlės ilgos ir nesusitraukiančios) ir *Podoviridae* (trumpos uodegėlės) (Ackerman, 2003).

Myoviridae. Uodegėlė susideda iš kaklelio, susitraukiančio apdangalo ir centrinio vamzdelio. Miovirusai paprastai yra didesni už *Siphoviridae* ir

Podoviridae šeimų atstovus, įskaitant didžiausius ir labiausiai evoliucionavusius virusus. *Myoviridae* šeimos bakteriofagai sudaro apie 25 % uodeguotųjų prokariotų virusų.

Siphoviridae. Uodegėlė ilga, nesusitraukianti, lanksti.. Sifovirusai yra skaitlingiausia žinomų uodeguotųjų fagų grupė, turinti virš 3600 atstovų (57 % uodeguotųjų prokariotų virusų).

Podoviridae. Uodegėlė trumpa ir nesusitraukianti. Manoma, kad podovirusai yra labiau susiję su sifovirusais negu su miovirusais. *Podoviridae* šeimos fagai sudaro apie 14 % visų žinomų uodeguotųjų prokariotų virusų (Ackerman, 2005; Ackerman, 2009; Ackerman ir Prangishvili, 2012).

1.2 Bakteriofagų praktinė taikomoji reikšmė

Bakteriofagų praktinio pritaikymo galimybės imta domėtis tuoj po jų atradimo dar XX a. pirmojoje pusėje. Eksperimentų, o vėliau ir klinikinių darbų metu jie buvo naudojami kaip viena iš priemonių kovojant su patogeninėmis, įvairias ligas sukeliančiomis bakterijomis, tačiau dėl prieštaringų gydymo rezultatų ir antibiotikų, kaip galimai perspektyvesnių vaistų, atradimo Vakarų šalyse susidomėjimas fagų terapija sumenko, o vėliau ir visiškai išnyko (Carlton, 1999; Kropinski, 2006). Vis dėlto, pastaruoju metu didėjantis bakterijų atsparumas antibiotikams verčia ieškoti naujų, efektyvių šios problemos sprendimo būdų. Vienas jų galėtų būti ir natūraliai esančių gamtoje arba genomų modeliavimo ir inžinerijos metodais sukurtų „geresnių“ fagų praktinis pritaikymas medicinoje, veterinarijoje, maisto pramonės ir kitose žemės ūkio srityse (Thiel, 2004; Hagens ir Loessner, 2010; Chan et al., 2013; Endersen et al., 2014; Kazi ir Annapure, 2016; Nicastro et al., 2016). Fagai taip pat naudojami kaip žymenys greitam patogenų identifikavimui (Yim et al., 2009; Schofield et al., 2012; Schmelcher ir Loessner 2014). Ypač tai aktualu dirbant su tokiais antibiotikams atspariomis bakterijomis kaip MRSA (Guntupalli et al., 2008) arba lėtai augančiomis kultūromis, pavyzdžiui, *Mycobacterium tuberculosis* (Barman ir Gadre, 2007).

Kita vertus, dėl savitų morfologinių, fizikinių, cheminių ir genetinių ypatybių bakteriofagai yra ypač patogios modelinės sistemos molekulinės biologijos, biochemijos ar biotechnologijos tyrimuose. Nuo pat 1940-ųjų šie bakterijų virusai buvo vieni svarbiausių įrankių plėtojant moderniąją genetiką ir molekulinę biologiją. Pasitelkiant fagus T2 ir T4 buvo įrodyta: DNR, kaip pagrindinės genetinės medžiagos, egzistavimas, genetinio kodo tripletiškumas, nuo šviesos priklausantys ir nepriklausantys DNR atstatymo mechanizmai, DNR restrikcija ir modifikacija, rekombinacijos svarba DNR replikacijoje, įvesta geno sąvoka, atrasta iRNR, savaime išsikerpantys prokariotų intronai (Miller et al., 2003). Bakteriofagai yra naujų, potencialiai naudingų įvairiose mokslo ir žmogaus gyvenimo srityse fermentų ir kitų makromolekulinių junginių šaltinis (Drulis-Kawa et al., 2015; Schmelcher ir Loessner, 2016). Bakteriofagų pagrindu kuriamos struktūros, skirtos diagnostikai, vakcinų pernešimui (Pumpens et al., 2016; Karimi et al., 2016), taip pat genų raiškos vektoriai (Chauthaiwale et al., 1992; Seow ir Wood, 2009). Naudojant fagų ekspozicijos sistemas (svetimo (poli)peptido eksponavimas ant bakteriofago paviršiaus) vykdoma ne tik naujų, tam tikromis savybėmis pasižyminčių peptidų paieška (Vodnik et al., 2011; Nicastro et al., 2014), bet ir kuriamos vakcinos (Bazan et al., 2012), biosensoriai (Lee et al., 2013) ar pernašos sistemos, skirtos, pavyzdžiui, vaistų nukreipimui į konkretų taikinį ar vėžinio audinio atpažinimui (Yacoby ir Benhar, 2008; Deutscher, 2010).

1.3 Virusinių baltymų pagrindu paremtų nanostruktūrų konstravimas

Pastaraisiais dešimtmečiais mokslo ir technologijų srityje ypatingas dėmesys skiriamas įvairių nanostruktūrų, paremtų savaime susirenkančiomis biomolekulėmis, konstravimui. Tyrimai šioje srityje nepaprastai svarbūs tiek fundamentiniu požiūriu, tiek dėl šių struktūrų praktinio taikymo galimybių pramonėje, medicinoje ir daugelyje kitų sričių (Busseron et al., 2013; Li ir Wang, 2014; Lee et al., 2016). Nepaprastai didelė ir biomolekulių, kurios naudojamas nanostruktūrų konstravimui, įvairovė. Vienos jų – nukleotidai.

Pastarieji nanobiotechnologijoje ypač paklausūs dėl jų hibridizacinių savybių ir lengvo paruošimo. Be to, priklausomai nuo pasirinktos nukleotidų sekos, gali būti keičiamos ir jų formuojamos topologinės struktūros: iš atitinkamai sumodeliuotų DNR grandinių gaunamos juostinės, superspiralinių žiedų ar trikampės struktūros (Han et al., 2010; Seeman, 2010; Pinheiro et al., 2011; Zhang et al., 2014). Kitos biomolekulės, turinčios naudingas biologines ir chemines charakteristikas, reikalingas savaime susirenkančių nanostruktūrų konstravimui, – peptidai. Peptidai gali būti sintetinami dirbtinai ir, naudojant biokonjugacinę techniką, jungiami su organinėmis molekulėmis, tokiu būdu išsaugant jų biologinį katalizinį aktyvumą ir specifinį atpažinimą (Mandal et al., 2014; Sharma et al., 2015). Konstruojant nanostruktūras taip pat dažnai naudojami ir baltymai. Pastarųjų cheminės savybės, priklausančios nuo antrinių molekulinų sąveikų (vandenilinių ryšių, elektrostatiinių ir hidrofobinių sąveikų), leidžia naudoti baltymus kaip pagrindą gaminant apibrėžtos geometrijos nanomedžiagas (Kostiainen et al., 2013; Glover et al., 2016). Galiausiai, virusai (įskaitant bakteriofagus) taip pat yra puikus pasirinkimas hibridinių nanomedžiagų sintezėje (Lee et al., 2012; Hyman, 2012; Farr et al., 2014; Molek ir Bratkovic, 2015; Wen ir Steinmetz, 2016; Pires et al., 2016; Steele et al., 2017).

Kalbant apie virusų ar jų struktūrinių baltymų pagrindu sukurtų nanodalelių (*angl.* virus-based nanoparticles (VNPs)) privalumus konstruojant nanostruktūras, galima pabrėžti keletą dalykų. Pirmiausia – šių dalelių dydis. Jis svyruoja nuo keliasdešimties iki kelių tūkstančių nanometrų, todėl yra ypač tinkamas nanostruktūrų formavimui (Douglas ir Young, 2006). Antra, šių struktūrų homogeniškumas, kadangi jos yra sintetinės gyvoje ląstelėje, turinčiose mechanizmus tiksliai produkto kokybės kontrolei (Bukau et al., 2006). Trečia, virusai ar jų pagrindu sukurtos struktūros, siekiant įgyti naujas funkcines savybes, gali būti modifikuojami tiek cheminių reakcijų metu, tiek taikant genų inžinerijos metodus (Pokorski ir Steinmetz, 2011). Galiausiai, efektyvi šių nanostruktūrų gamyba, vykdant baltymų raišką ląstelėje, ir

patogus gryninimas yra pigūs ir tausojantys aplinką procesai (Li ir Wang, 2014).

Virusinių struktūrinių baltymų produkcija gali būti vykdoma naudojant bakterijų, mielių, vabzdžių ar augalų raiškoss sistemas, taip pat pasitelkiant beląstelinę baltymų sintezę *in vitro* (Wen ir Steinmetz, 2016). Nors virusinių baltymų raiškaibakterijose gali būti naudojamos ir tokių bakterijų kaip, pavyzdžiui, *Pseudomonas fluorescens* raiškos sistemos (Phelps et al., 2007), visgi plačiausiai paplitusi, lengvai kontroliuojama ir greita baltymų produkcija vykdoma *Escherichia coli* ląstelėse (Rosano ir Ceccarelli, 2014). Vykdamt genų raišką bakterijose, į vamzdelines ar sferines struktūras savaime susirinko bakteriofagų T4 (Aksyuk et al., 2009), phiKZ (Aksyuk et al., 2011), SPP1 (Langlois et al., 2015) ar MS2 (Pickett ir Peabody, 1993), taip pat augalų tabako mozaikos viruso (TMV) (Hwang et al., 1994) ar žinduolių hepatito B viruso (HBV) (Birnbaum ir Nassal, 1990) struktūriniai baltymai. Deja, dalis žinduolių virusų baltymų, naudojant šią sistemą, lieka netirpūs, todėl vykdomas jų surinkimas *in vitro* arba naudojamos eukariotinės genų raiškossistemos. Pastarosios net tik padidina eukariotinių baltymų tirpumą, bet ir atlieka tokias potransliacines modifikacijas kaip glikozilinimą, disulfidinių ryšių formavimą ir proteolitinį apdorojimą (Celik ir Calık, 2012; Webster ir Thomas, 2012). Dažniausiai naudojamos mielių *Saccharomyces cerevisiae* ar *Pichia pastoris* raiškos sistemos (Freivalds et al., 2006), tačiau virusinių baltymų dauginimui gali būti pasitelktosir vabzdžių ląstelių kultūros. Kandyse *Spodoptera frugiperda* ir *Trichoplusia ni* bakulovirusų pagrindu sukurtos sistemos naudojamos vabzdžių (FHV), augalų (CPMV) ir žinduolių (CPV, HPV) virusų struktūrinius baltymus koduojančių genų raiškai (Felberbaum, 2015). Augalų virusų (CPMV, PVX ar TMV) nanodalelių produkcijai dažnai naudojamos pačių augalų raiškos sistemos (Saunders et al., 2009). Galiausiai, kaip alternatyva virusinių baltymų produkcijai *in vivo*, gali būti pritaikytos ir beląstelinės sistemos. kuriose ląstelių transkripcijos ir transliacijos sistemos *in vitro* yra naudojamos, pavyzdžiui, norint gauti nanostruktūras formuojančius, tačiau ląstelėms toksiškus baltymus (Smith et al., 2014).

Siekiant sukurti efektyvesnes, konkrečiam tikslui ar, priešingai, platesniam pritaikymui skirtas virusines nanostruktūras, atliekamas jų modifikavimas. Dažniausiai tai daroma pasitelkiant genų inžinerijos, biokonjugacijos, biomineralizacijos metodus ir savaiminį dalelių susirinkimą (Wen ir Steinmetz, 2016). Atliekant tiesioginę nanomedžiagų sintezę arba perkeliant prieš tai sukurtas nanomedžiagas į/ant virusinių nanostruktūrų, modifikuojamas tiek vidinis, tiek išorinis nanostruktūrų paviršius (Li ir Wang, 2014).

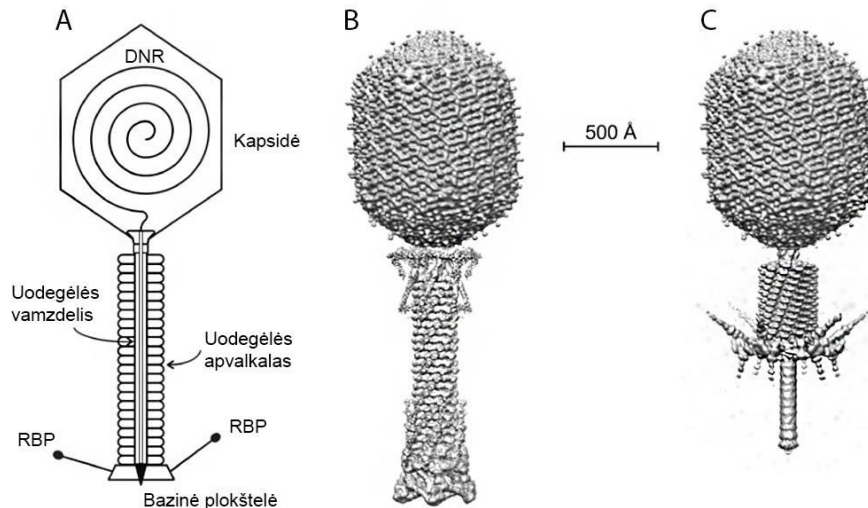
Konstruojant nanostruktūras su jų paviršiuje esančiomis pageidaujamosiomis funkcinėmis grupėmis, taikant genų inžinerijos metodus, atliekamas nukleotidų sekos pakeitimas, įterpimas arba pašalinimas (Chatterji, 2004; Strable et al., 2008). Šiuo atveju, dėl galimų disulfidinių ryšių formavimo, taip pat sąveikos su auksu ir biokonjugacijos su tioliu atrankiomis medžiagomis, ypač patrauklūs cisteino mutantai (Peabody, 2003). Be pavienių aminorūgščių modifikacijų, atliekamas ir didesnis jų skaičiaus pakeitimas, pavyzdžiui, grynimui ar aukso, geležies oksido nanodalelių prisitvirtinimui skirtų inkarų (Shen et al., 2015), trumpų peptidų, įskaitant vakcinų epitopus (Dalsgaard et al., 1997), ir receptorių taikinių (Merzlyak et al., 2009) eksponavimas ant virusinių nanostruktūrų paviršaus. Taip pat demonstruotas ir baltymų ar jų domenų įterpimas į baltymo seką (Shukla et al., 2014; Uhde-Holzem et al., 2016), sukonstruoti kelių virusų apvalkalo baltymus turintys hibridiniai virusai (Dickmeis, 2015).

Visgi, konstruojant savaime susirenkančių virusinių baltymų pagrindu paremtas vamzdelines nanostruktūras, daugeliu atveju tyrimai atliekami su bakteriofago M13 arba jam artimai giminingų filamentinių fagų, taip pat TMV arba CPMW virusų baltymais. Tuo tarpu literatūroje skelbiamų duomenų apie hibridinių baltymų konstravimui naudojamus bakteriofagų uodegėlės apvalkalo baltymus iki šiol, mūsų duomenimis, nebuvo skelbta.

1.4 *Myoviridae* bakteriofagų uodegėlės apvalkalas

Bakteriofagų uodegėlė – sudėtinga kompleksinė makromolekulinė mašina, atsakinga už ląstelių šeiminikių atpažinimą, prisitvirtinimą bei prasiskverbimą pro ląstelių apvalkalą. Ši struktūra bakteriofago infekcijos metu suformuoja kanalą, kuriuo į ląstelės-šeiminikės citoplazmą yra pernešama bakteriofago kapsidėje esanti genomine DNR ir baltymai.

Myoviridae šeimos bakteriofagų ilga ir susitraukianti uodegėlė yra sudaryta iš bazinės plokštelės (*angl.* baseplate), vidinio centrinio vamzdelio (*angl.* tail tube), išorinio susitraukiančio apvalkalo (*angl.* tail sheath) ir terminacinio komplekso (*angl.* termination complex) (1.2 pav.) (Leiman et al., 2010). Terminacinis kompleksas pritvirtina uodegėlę prie fago galvutės per viename iš 12 pentamerinių kapsidės viršūnių esantį uodegėlę-galvutę jungiantį baltymą (*angl.* head-to-tail connector protein). Tuo tarpu bazinė plokštelė turi prie ląstelės šeiminikės prisitvirtinti padedančias struktūras (*angl.* receptor binding proteins (RBPs)). Pastarosioms prisijungus prie bakterijų paviršiaus, keičiasi bazinės plokštelės konformacija, kuri, savo ruožtu, skatina uodegėlės apvalkalo susitraukimą. Uodegėlės apvalkalas susitraukia perpus ar net daugiau savo pradinio ilgio (tokiu būdu priartindamas visą fago dalelę arčiau ląstelės) tvirtas, nelankstus vidinis uodegėlės vamzdelis įstumiamas per ląstelės paviršiaus struktūras. Šiuo vamzdiniu kanalu į ląstelės šeiminikės citoplazmą yra pernešami bakteriofago kapsidėje esantys baltymai ir genomine DNR (Leiman ir Shneider, 2012).

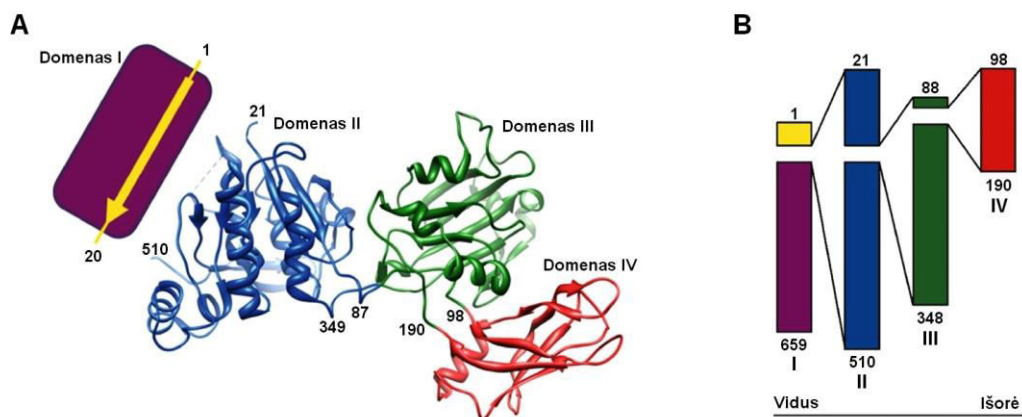


1.2 pav. *Myoviridae* bakteriofago struktūra. (A) Susitraukiančios fago uodegėlės pagrindinių komponentų schematinis vaizdas. (B, C) Bakteriofago T4 su ištęsta ir sutraukta uodegėle krioelektroninės mikroskopijos (krio-EM) rekonstrukcija (Fokine et al., 2004; Leiman et al., 2004; Kostyuchenko et al., 2005; Leiman ir Shneider, 2012).

Vidutinis bakteriofagų susitraukiančių uodegėlių diametras yra ~22 nm, bet gerokai skiriasi jų ilgis, kuris siekia nuo 100 iki 450 nm. Nepaisant santykinai didelio dydžio, susitraukianti uodegėlė yra pakankamai paprasta, kadangi pagrindinė jos dalis yra pasikartojanti struktūra, sudaryta iš dviejų baltymų – vidinio vamzdelio ir išorinio susitraukiančio apvalkalo. Šie baltymai elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje (SDS-PAGE) paprastai formuoja dvi pagrindines baltymų juostas ir tarnauja kaip pavyzdiniai žymenysidentifikuojant panašias, susitraukiančias uodegėlės apvalkalo struktūras (Leiman ir Shneider, 2012). *Myoviridae* bakteriofagų uodegėlės apvalkalo baltymo molekulinė masė svyruoja nuo ~40 iki ~80 kDa, o dažniausiai sutinkami yra ~45 kDa dydžio uodegėlės apvalkalo baltymai (Leiman ir Shneider, 2012).

Šiuo metu detaliausiai ištirta bakteriofago T4 uodegėlės apvalkalo, sudaryto išgp18 subvienetų, struktūra. Rekombinantiniai gp18 formuoja įvairaus ilgio, nehomogeniškas polimerines apvalkalines struktūras (*angl.* polysheaths), kurios nėra tinkamos kristalinės struktūros nustatymui (King, 1968). Dėl šios priežasties, nepaisant to, kad tyrimai šioje srityje atliekami jau daugelį metų (Coombs ir Arisaka, 1994; Leiman et al., 2010), gp18 kristalinė

struktūra nustatyta palyginti neseniai, sukonstravus polimerinių struktūrų neformuojantį gp18M mutantą (Aksyuk et al., 2009). Šis baltymas yra sudarytas iš $\frac{3}{4}$ normalaus baltymo (mutantas, neturintis 20 N-galinių ir 160 C-galinių a.r. liekanų, kurios formuoja domeną I) (Kuznetsova et al., 1998; Poglazov et al., 1999). Atlikus gp18M kristalografinę analizę, nustatyta, kad bakteriofago T4 uodegėlės apvalkalo baltymas sudarytas iš keturių, vienas į kitą įsiterpiančių domenų. Domenas IV yra įsiterpęs tarp 97 ir 189 a.r. liekanų, kurios priklauso kilpai, jungiančiai dvi domeno III β -juostas. Domenas III įsiterpęs tarp 87 ir 346 a.r. į domeno II kilpą. Tuo tarpu domenas II įsiterpęs į nenustatytos kristalinės struktūros domeną I, sudarytą iš baltymo N- ir C-galinių a.r. liekanų (Leiman ir Shneider, 2012). T4 pagrindinio uodegėlės baltymo struktūra ir schematinis domeninės organizacijos vaizdas pateikiami 1.3 pav.

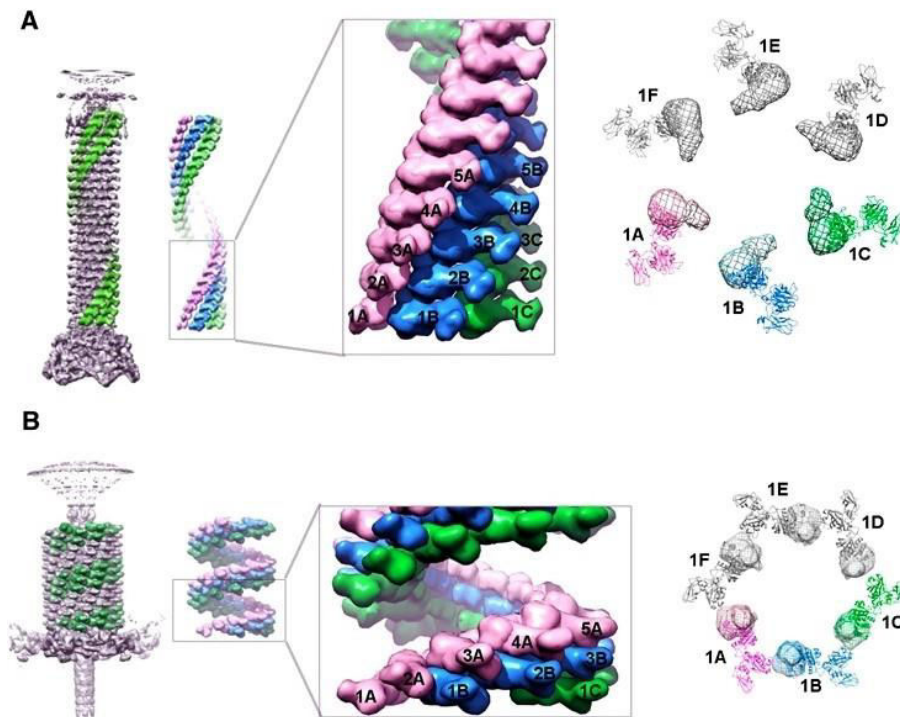


1.3 pav. T4 uodegėlės apvalkalo baltymo (gp18) struktūra (A) ir schematinis domeninės organizacijos vaizdas (B). Domenai I, II, III ir IV yra nuspalvinti atitinkamai violetine, mėlyna, žalia ir raudona spalva. Domenas I, kurio kristalinė struktūra nėra nustatyta, pateikiamas kaip violetinis stačiakampis, į jį įsiterpusi N-galinė seka pažymėta geltonai. Rodyklė žemiau schematinės diagramos žymi gp18 orientaciją uodegėlės ašies atžvilgiu. Paveikslas sudarytas remiantis Leiman ir Shneider pateikiama informacija (Leiman ir Shneider, 2012).

Taikant krio-EM nustatyta, kad T4 gp18 domenas I sąveikauja su uodegėlės vamzdeliu ir sudaro vidinę uodegėlės apvalkalo šerdį, domenai II ir III tik iš dalies atsiduria uodegėlės apvalkalo išorėje, o domenas IV formuoja didžiąją dalį išorinio uodegėlės apvalkalo paviršiaus. (Leiman et al., 2004; Kostyuchenko et al., 2005; Leiman ir Shneider, 2012). T4 uodegėlės

apvalkalas sudarytas iš aplink uodegėlės vamzdelį spirale susisukančių ir šešias vijas suformuojančių 138 gp18 subvienetų (kiekviena vija sudaryta iš 23 gp18 subvienetų) (Leiman et al., 2004). Ištemptos konformacijos apvalkalo skersmuo yra 24 nm, ilgis 92,5 nm, vijos žingsnis ir sūkis atitinkamai 4,06 ir 1,72 nm (Kostyuchenko et al., 2005) (1.4 pav.). Kiekvienas gp18 subvienetas sąveikauja su keturiais šalia esančiais baltymais: dviem gretimoms vijoms baltymais (tarpvijiniai kontaktai) ir dviem, esančiais toje pačioje vijoje (viduvijiniai kontaktai).

Apvalkalui susitraukus, jo skersmuo padidėja iki 33 nm, ilgis sumažėja iki 42 nm, pasikeičia ir vijos žingsnis (1,64 nm) bei sūkis (3,29 nm) (Leiman et al., 2004). Kiekvienas iš gp18 subvienetų nuo uodegėlės ašies pasislenka apie ~5 nm ir pakrypsta apie ~45°, tačiau žymesni baltymo domeninės struktūros pokyčiai nevyksta, pats baltymas juda kaip vientisas kūnas (Aksyuk et al., 2009). Apvalkalo susitraukimo metu, tą pačią viją sudarančių gp18 subvienetų domenai I lieka susijungę, tokiu būdu yra išsaugoma apvalkalo spiralinė struktūra. Tuo tarpu domenai II-IV suformuoja naujus ryšius (1.4 pav.), sąveikos paviršius tarp gp18 molekulių padidėja apie keturis kartus (Aksyuk et al., 2009). Dėl šios priežasties susitraukęs uodegėlės apvalkalas yra labai stabilus ir įvairiems aplinkoms veiksniams atspari struktūra (Aksyuk et al., 2009; Leiman ir Shneider, 2012).



1.4 pav. Ištęsto ir sutraukto T4 uodegėlės apvalkalo krio-EM rekonstrukcija. Paveiksle pateikiamas trijų (iš esančių šešių) gp18 vijų vaizdas esant ištęstai (A) arba sutrauktai (B) konformacijai. Kiekviena vija pažymėta skirtinga spalva (rožine, mėlyna ir žalia). Vienas po kito susiformuojantys gp18 sluoksniai (diskai) pradedant disku, esančiu arčiausiai bazinės plokštelės, sunumeruoti nuo 1 iki 5. Paveikslo viduriniojoje dalyje pavaizduota tris viena šalia kitos esančias vijas sudarančių gp18 tarpusavio sąveika esant sutrauktai ir ištęstai konformacijai. Paveikslo dešinėje pateikiamas tas pačias tris vijas sudarančių domenų sąveikos vaizdas žiūrint “iš viršaus” (domenas I, kurio kristalinė struktūra nenustatyta, vaizduojamas kaip tankus segmentas). Paveikslas sudarytas remiantis Leiman et al., 2004, Kostyuchenko et al., 2005, Aksyuk et al., 2009, Leiman ir Shneider, 2012 pateikiama informacija.

Uodegėlės apvalkalo struktūra ir funkcija yra konservatyvi, todėl, nepaisant nedidelio baltymų identiškumo aminorūgščių lygmenyje, skirtingų *Myoviridae* bakteriofagų uodegėlės apvalkalo baltymai turi panašius morfologinius ir funkcinis parametrus (Fokine et al., 2007; Kurochkina et al., 2009; Aksyuk et al., 2009; Leiman ir Shneider, 2012; Fokine ir Rossman, 2014). Pavyzdžiui, atlikus kristalografinę analizę, vienas į kitą įsiterpiančių domenų organizacija nustatyta ir *Listeria innocua* (PDB ref 3LML) ar *Desulfotobacterium hafniense* (PDB ref 3HXL) profagų (Leiman ir Shneider, 2012), taip pat *Pseudomonas aeruginosa* fago phiKZ uodegėlės apvalkalo baltymo atveju, nors pastarojo identiškumas T4 uodegėlės apvalkalo baltymui aminorūgščių lygmenyje tesiekia 12 % (Aksyuk et al., 2011). Dar daugiau,

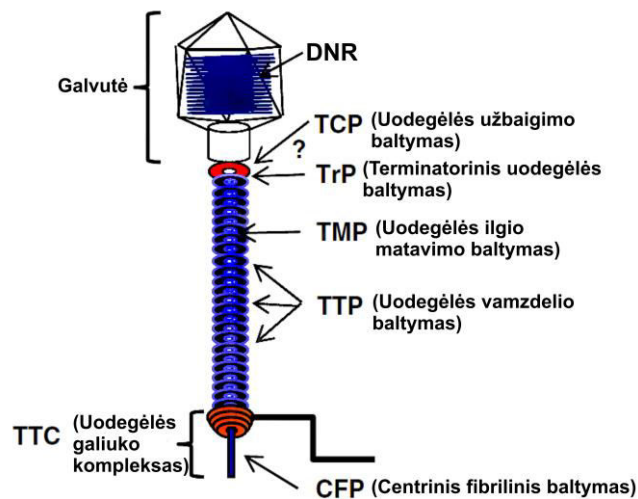
nustatyta, kad bakteriofagų susitraukiančių struktūrų sandara labai panaši į susitraukiančias molekulinės mašinas, randamas daugelyje prokariotų: R-tipo piocinus, VI tipo sekrecijos sistemą (*angl.* type VI secretion system (T6SS)) ir į bakteriofagų uodegėlę panašias baltymų pernešimo struktūras (*angl.* phage tail-like protein translocation structures (PLTS)) (Leiman et al., 2009; Leiman ir Shneider, 2012; Lossi et al., 2013; Sarris et al., 2014; Kube ir Wendler, 2015; Kudryashev et al., 2015).

Tiriamas bakteriofago T4 uodegėlės apvalkalo ir jį sudarančių subvienetų struktūrą ir susirinkimo mechanizmą, kaip jau minėta anksčiau, nustatyta, kad gp18 formuoja polimerines vamzdelines struktūras. Šių darbų metu įrodyta, kad uodegėlės apvalkalo baltymo polimerizacijos iniciacijai ir tolimesniam susirinkimui pagalbina baltymai nėra reikalingi, o šių struktūrų morfologija ir savybės atitinka bakteriofago sutrauktos uodegėlės apvalkalo konformaciją (Kellenberger ir Boy de la Tour., 1964; Moody, 1967; King, 1968; Tschopp, 1979). Dėl šios priežasties gp18 formuojamos vamzdelinės struktūros yra ypatingai stabilios ir atsparios įvairiems fizikiniams bei cheminiams veiksniams įskaitant inkubaciją 6 M karbamido tirpale ar tirpale su tripsinu (Arisaka et al., 1981; Arisaka et al., 1990; Coombs ir Arisaka, 1994). Panašūs rezultatai pastebėti ir ištyrus bakteriofago phiKZ rekombinantinio uodegėlės apvalkalo baltymo formuojamas polivamzdelines struktūras: po inkubacijos su tripsinu vamzdelių morfologija taip pat išliko nepakitusi (Kurochkina et al., 2009).

1.5 *Siphoviridae* bakteriofagų uodegėlės vamzdelis

Siphoviridae šeimos bakteriofagų ilga, lanksti ir nesusitraukianti uodegėlė yra sudaryta iš uodegėlės galiuko komplekso (*angl.* tail tip complex (TTC)), uodegėlės vamzdelio (*angl.* tail-tube) su viduje esančiu uodegėlės ilgio matavimo baltymu (*angl.* tape measure protein (TMP)) ir uodegėlės terminatorinio baltymo (*angl.* tail terminator protein (TrP)) (1.5 pav). Pastarasis sudaro uodegėlės viršutinę dalį, kuri jungia uodegėlės vamzdelį su

galvute. Gausiausias sifovirusų uodegėlės komponentas yra uodegėlės vamzdelio baltymas (*angl.* tail-tube protein (TTP)), kuris dažnai dar yra vadinamas pagrindiniu uodegėlės baltymu. Šis uodegėlės komponentas sudaro heksamerinius žiedus, kurie tvirtinasi prie vamzdelio vidinėje dalyje esančio uodegėlės ilgio matavimo baltymo, kurio formuojamų nanostruktūrų dydis iš esmės ir lemia uodegėlės vamzdelio ilgį. Tuo tarpu uodegėlės galiuko kompleksas sudaro uodegėlės apatiniąją dalį ir yra atsakingas už sąveiką su ląstelėmis šeimininkėmis. Šio komplekso komponentų sudėtis skiriasi priklausomai nuo sifovirusų grupės: vieni fagai turi siaurą smeigtuko pavidalo struktūrą, kiti – bazinę plokštelę su įvairiomis atpažinimui ir prisitvirtinimui skirtomis fibrilinėmis struktūromis (Davidson et al., 2012).



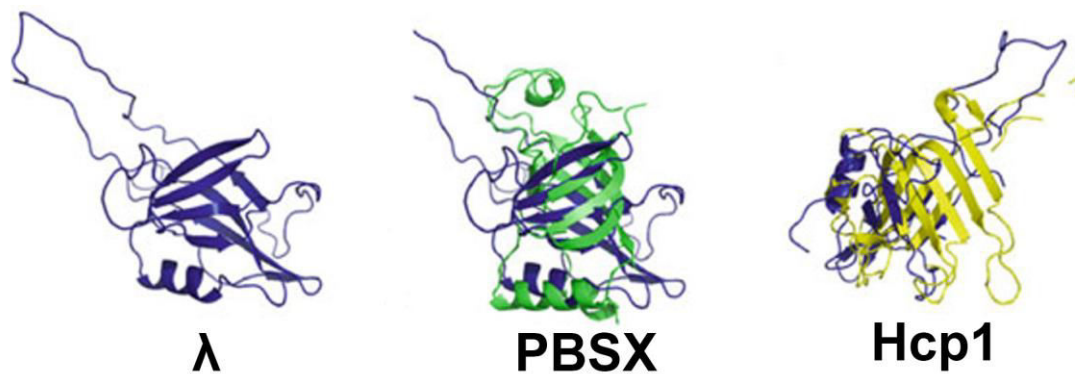
1.5 pav. *Siphoviridae* bakteriofago uodegėlės komponentų schematinis vaizdas. ? žymi nenustatytą uodegėlės užbaigimo baltymo vietą uodegėlės struktūroje. Paveikslas sudarytas remiantis Davidson et al. pateikiama informacija (Davidson et al., 2012).

Siphoviridae bakteriofagų uodegėlės susirinkimo metu pirmiausia susiformuoja uodegėlės galiuko kompleksas, ant kurio paviršiaus tvirtinasi uodegėlės ilgio matavimo baltymas. Susidarius šiai struktūrai, inicijuojama uodegėlės vamzdelio baltymo polimerizacija, kuri trunka iki pasiekiamas uodegėlės ilgio matavimo baltymo galas. Galiausiai, pasibaigus polimerizacijai, prie uodegėlės viršutinės dalies prisitvirtina uodegėlės

terminatorinis baltymas, sujungiantis uodegėlę su galvute (Katsura, 1983; Katsura, 1984; Davidson et al., 2012).

Šiuo metu išsamiausiai ištirtas bakteriofago λ uodegėlės vamzdelio baltymas (gpV). Šio, iš dviejų domenų sudaryto baltymo N-galinis domenas (gpV_N, 1–160 a.r.) yra esminis efektyviam uodegėlės vamzdelio formavimuisi, tuo tarpu C-galinis domenas (gpV_C, 161–246 a.r.) yra Ig-tipo šeimos baltymas (Katsura 1981), kurio funkcija gali būti susijusi su sąveikos tarp bakteriofago ir ląstelės šeimininkės paviršiaus angliavandenių, tokių kaip LPS ar teicho rūgštis, sudarymu (Fraser et al. 2006). Išgrynintas gpV egzistuoja monomero ar dimero forma (Katsura ir Tsugita 1977), tačiau baltymams sąveikaujant su susidariusiu uodegėlės galiuko kompleksu, gpV greitai heksamerizuoja ir renkasi į vamzdelines struktūras (Katsura, 1983). Bakteriofago λ uodegėlės vamzdelis yra sudarytas iš 32 heksamerinių gpV žiedų, vamzdelio išorinis diametras 9 nm, vidinis – 3 nm (Katsura 1981).

Uodegėlės apvalkalo baltymų struktūros analizė atskleidė, kad, nepaisant nedidelio identiškumo aminorūgščių lygmenyje, gpV_N struktūra labai panaši į *Bacillus subtilis* profago PBSX uodegėlės vamzdelio baltymą (1.6 pav.) (Pell et al., 2009). Įdomu tai, kad šis profagas yra susitraukiančią uodegėlę turintis miovirusas, todėl tikėtina, kad evoliuciniu požiūriu sifovirusų ir miovirusų vamzdelis yra formuojamas iš tos pačios „statybinės medžiagos“. Dar daugiau, nustatyta, kad gpV_N struktūra taip pat labai panaši į VI tipo sekrecijos sistemos vamzdelio baltymą Hcp1 (1.6 pav.) (Pell et al., 2009). Pastarasis, priešingai nei monomerinėje ar dimerinėje formoje aptinkamas gpV_N, formuoja heksamerinius, savaimė nesipolimerizuojančius žiedus, kurių diametras (9 nm išorinis ir 4 nm vidinis) (1.6 pav.) labai panašus į heksamerinių žiedų, formuojamų bakteriofago λ gpV_N. Dėl šios priežasties Hcp1 heksamerinė struktūra buvo panaudota modeliuojant gpV_N galimą išsidėstymą uodegėlės vamzdelyje (Pell et al., 2009).



1.6 pav. Bakteriofago λ uodegėlės vamzdelio baltymo N-galinio domeno (gpV_N) ir kitų baltymų struktūros palyginimas. Kairėje gpV_N baltymas (mėlyna, PDB ID: 2K4Q); viduryje gpV_N struktūra, perkelta ant *B. subtilis* profago PBSX uodegėlės vamzdelio baltymo (žalia, PDB ID: 2GUJ) struktūros; dešinėje gpV_N struktūra, perkelta ant VI tipo sekrecijos sistemos baltymo Hcp1 (geltona, PDB ID: 1Y12) struktūros. Paveikslas sudarytas remiantis Davidson et al. pateikiama informacija (Davidson et al., 2012).

Atsižvelgiant į identifikuotų uodegėlės vamzdelio baltymų struktūrinį konservatyvumą tiek susitraukiančiose, tiek nesusitraukiančiose uodegėlėse, taip pat VI tipo sekrecijos sistemoje (Leiman et al., 2009), buvo pasiūlyta, kad šis konservatyvumas, greičiausiai, būdingas visiems ilgas uodegėles turintiems fagams (Davidson et al., 2012). Kita vertus, nustatyta, kad bakteriofagui T5 būdingesnė trišalė, o ne įprastinė šešiašalė simetrija (Effantin et al., 2006). Šio bakteriofago uodegėlės vamzdelio baltymas, turintis dar keletą identifikuotų homologų, yra apytiksliai dvigubai didesnis nei daugumos kitų bakteriofagų uodegėlės vamzdelio baltymų. Tikėtina, kad šio bakteriofago genome yra koduojamos dvi kopijos į uodegėlės vamzdelio baltymo formą susilankstančių baltymų, galinčių formuoti pseudoheksamerinę struktūrą (Effantin et al., 2006).

Tuo tarpu *B. subtilis* bakteriofago SPP1 atveju identifikuoti du uodegėlės vamzdelio baltymai: gp17.1 (19,1 kDa) ir gp17.1* (28,3 kDa). Šių baltymų N-galinė seka identiška, tik gp17.1* dar turi papildomą C-galinę seką (Auzat et al., 2008). gp17.1 ir gp17.1* santykis fago uodegėlės vamzdelyje yra 3:1, tačiau uodegėlės vamzdelis susiformuoja ir esant tik gp17.1 (Langlois et al., 2015). Idomu tai, kad, priešingai nei ankstesnių darbų metu, atlikus SPP1 uodegėlės vamzdelio baltymų analizę, pirmą kartą buvo įrodyta, kad vamzdelinės struktūros susiformuoja ir nesant jau susidariusių pamatinių struktūrų, kurios yra būtinos bakteriofagų λ (Katsura ir Tsugita 1977; Katsura,

1983) ar T4 (King, 1971) uodegėlės vamzdelio baltymų polimerizavimuisi. Bakteriofago SPP1 uodegėlės vamzdelio baltymai tirpale egzistuoja kaip iš dalies susilankstę, nestabilūs monomerai. Vykstant struktūros konformaciniam pokyčiams (β -struktūrų formavimuisi ir stabilizavimuisi) gp17.1 heksamerizuojasi ir *in vitro* renkasi į vamzdelines struktūras, kurių morfologiniai parametrai atitinka bakteriofago uodegėlės vamzdelio parametrus (Langlois et al., 2015). Kita vertus, šis procesas trunka santykinai ilgai. Remiantis straipsnio autorių pateikiamomis TEM nuotraukomis, dalis struktūrų susiformuoja jau po 3, tačiau didžiausia vamzdelių koncentracija pasiekama praėjus net 10 dienų nuo gp17.1 inkubacijos *in vitro* pradžios (Langlois et al., 2015).

Apibendrinant literatūros duomenis, galime teigti, kad pastaruoju metu susidomėjimas savaime susirenkančias nanostruktūras formuojančiais baltymais ir jų praktiniu panaudojimu įvairiose srityse iš tiesų didelis. Visgi, nepaisant nepaprastai gausios virusų (ir ypač bakteriofagų) įvairovės, iki šiol tyrimai šioje srityje atliekami tik su palyginti labai ribotu šių mikroorganizmų struktūrinių baltymų skaičiumi. Ne išimtis ir uodeguotųjų bakteriofagų uodegėlės vamzdelio ar apvalkalo baltymų formuojamos nanostruktūros. Bakteriofago λ ar SPP1 uodegėlės vamzdelio baltymo (kaip ir T4 ar phiKZ uodegėlės apvalkalo baltymo) formuojamų vamzdelinių struktūrų tyrimai iš esmės buvo atliekami siekiant nustatyti uodegėlės baltymų struktūrą ar jų polimerizavimosi savybes. Mūsų žiniomis, literatūrinių duomenų apie šių baltymų pagrindu sukurtų hibridinių baltymų panaudojimą kuriant savaime susirenkančias nanovamzdelines struktūras, kurios ateityje galėtų būti pritaikytos įvairiose nanobiotechnologijos srityse, iki šiol nėra paskelbta.

Siekiant bent iš dalies pakeisti esamą situaciją, šio darbo metu buvo vykdoma ne tik naujų faginių baltymų, galinčių formuoti savaime susirenkančias nanostruktūras, paieška, bet ir bakteriofagų struktūrinių baltymų pagrindu konstruojami mutantiniai, taip pat hibridiniai baltymai, atlikta šių baltymų formuojamų nanostruktūrų analizė.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Bakteriofagai

vB_KleM-RaK2 (RaK2): *Klebsiella* sp. veterinarinį izoliatą KV3 infekuojantis bakteriofagas, išskirtas VU Biochemijos instituto darbuotojų iš vandens mėginių, surinktų iš Radviliškio rajone (Naujasodyje) esančios kūdros.

vB_EcoM-FV3 (FV3): *E. coli* K12 grupės kamienus infekuojantis bakteriofagas, išskirtas VU Biochemijos instituto darbuotojų iš vandens mėginių, surinktų iš Vilniaus miesto nutekamojo vandens valyklos.

vB_EcoS_NBD2 (NBD2): *E. coli* infekuojantis bakteriofagas, išskirtas VU Biochemijos instituto darbuotojų iš dirvožemio mėginių.

vB_ArS-ArV2 (ArV2): *Arthrobacter* sp. 68b kamieną infekuojantis bakteriofagas, išskirtas VU Biochemijos instituto darbuotojų iš Vilniaus miesto teritorijoje surinktų dirvožemio mėginių.

vB_ArtM-ArV1 (ArV1): *Arthrobacter* sp. infekuojantis bakteriofagas, išskirtas VU Biochemijos instituto darbuotojų iš Vilniaus miesto teritorijoje surinktų dirvožemio mėginių.

2.1.2. Bakterijų kamienai

Darbe naudoti bakterijų kamienai pateikiami 2.1 lentelėje.

2.1.3. Plazmidiniai vektoriai

Darbe naudoti plazmidiniai vektoriai: pJET1.2 (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Fisher Scientific), pET16b, pET21a, pET21b, pET28a (Novagen).

2.1.4. Oligonukleotidiniai pradmenys

Bakteriofagų struktūrinių genų klonavimui naudoti pradmenys pateikiami 2.2 lentelėje.

2.1 lentelė. Darbe naudoti bakterijų kamienai.

Kamienas	Naudojimo tikslas	Šaltinis/nuoroda
<i>Acinetobacter baumannii</i> #16	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedėlienė
<i>Acinetobacter baumannii</i> #46	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedėlienė
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 13#23	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedėlienė
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 3#9	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedėlienė
<i>Arthrobacter alkaliphilus</i> DSM 23368	ArV1 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 20116	ArV1 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> DSM 12829	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter citreus</i> DSM 20133	ArV1 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter crystallopoetes</i> DSM 20117	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter defluvii</i> DSM 18782	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter gandavensis</i> DSM 15046	ArV1 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter globiformis</i> DSM 20124	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter globiformis</i> NRRL B-2979	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Casaite et al, 2011
<i>Arthrobacter histidinolorans</i> DSM 20115	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter ilicis</i> DSM 20138	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter koreensis</i> DSM 16760	ArV1 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter luteolus</i> DSM 13067	ArV1 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter methylotrophus</i> DSM 14008	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> DSM 420	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> DSM 15232	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Arthrobacter</i> sp. 68b	ArV1, ArV2 izoliavimas, dauginimas, adsorbcijos eksperimentai, šeimininkų spektro nustatymas	Stanislauskienė et al. 2011
<i>Arthrobacter</i> sp. 68m	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	laboratorijos kolekcija

2.1 lentelės tęsinys kitame puslapyje

2.1 lentelės tęsinys

<i>Arthrobacter</i> sp. 83b	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	laboratorijos kolekcija
<i>Arthrobacter</i> sp. 85	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	laboratorijos kolekcija
<i>Arthrobacter</i> sp. 94	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	laboratorijos kolekcija
<i>Arthrobacter</i> sp. 96	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	laboratorijos kolekcija
<i>Arthrobacter</i> sp. 25DMP1	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	Kutanovas et al. 2013
<i>Arthrobacter</i> sp. 25DOT1	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	Kutanovas et al. 2013
<i>Arthrobacter</i> sp. BL-3	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Stanislauskienė et al. 2012
<i>Arthrobacter</i> sp. IN13	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	Gasparavičiūtė et al. 2006
<i>Arthrobacter</i> sp. PY11	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	Semenaite et al. 2003
<i>Arthrobacter</i> sp. PY21	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Stanislauskienė et al. 2012
<i>Arthrobacter</i> sp. PY22	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Stanislauskienė et al. 2012
<i>Arthrobacter</i> sp. PRH1	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	Stanislauskienė et al. 2012
<i>Arthrobacter</i> sp. VM22	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	Semenaite et al. 2003
<i>Arthrobacter</i> sp. VP3	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	Semenaite et al. 2003
<i>Arthrobacter karbamidofaciens</i> DSM 20126	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Buttiauxella</i> sp. S1-1	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Šimoliūnas et al, 2013
<i>Citrobacter freundii</i>	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedėlienė
<i>Enterobacter cloacae</i>	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedėlienė
<i>Enterobacter</i> sp. VT1-1	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Šimoliūnas et al, 2013
<i>Erwinia carotovora</i> 8982	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedėlienė
<i>Erwinia carotovora</i> 961-63	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedėlienė
<i>Escherichia coli</i> B ^E	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Dr. L. W. Black
<i>Escherichia coli</i> BL21-DE3	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas, plazmidžių recipientas, genų raiškos eksperimentai.	Avidis
<i>Escherichia coli</i> B834-DE3	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Dr. L. W. Black

2.1 lentelės tęsinys kitame puslapyje

2.1 lentelės tęsinys

<i>Escherichia coli</i> CR63	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Dr. K. N. Kreuzer
<i>Escherichia coli</i> DH5α	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas, plazmidžių recipientas.	Pharmacia
<i>Escherichia coli</i> DH10β	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas, kamienas taip pat naudotas kaip plazmidžių recipientas.	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> GM2163	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Fermentas
<i>Escherichia coli</i> JM109	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Fermentas
<i>Escherichia coli</i> MH1	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Dr. K. N. Kreuzer
<i>Escherichia coli</i> Nova Blue (DE3)	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Avidis
<i>Escherichia coli</i> Rosetta (DE3)	Plazmidžių recipientas, genų raiškos eksperimentai.	Novagen
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Stratagene
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	ATCC
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1705	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	ATCC
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 279	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedėlienė
<i>Klebsiella</i> sp. KV-1	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Šimoliūnas et al. 2013
<i>Klebsiella</i> sp. KV-3	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas, RaK2 izoliavimas, dauginimas ir kiti eksperimentai	Šimoliūnas et al. 2013
<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925	ArV1 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Kribella catacumbae</i> DSM 19601	ArV1 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Nesterenkonia aethiopica</i> DSM 17733	ArV1 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	ArV1, ArV2, RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedėlienė
<i>Pseudomonas brenneri</i> D14	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedėlienė
<i>Pseudomonas</i> sp. PV1-1	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Šimoliūnas et al, 2013
<i>Pseudomonas</i> sp. RA1-1	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Šimoliūnas et al, 2013
<i>Pseudomonas</i> sp. RA1-3	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Šimoliūnas et al, 2013

2.1 lentelės tęsinys kitame puslapyje

2.1 lentelės tęsinys

<i>Pseudomonas</i> sp. RA1-11	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Šimoliūnas et al, 2013
<i>Rhodococcus erythropolis</i> SQ1	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Quan et al., 1993
<i>Rhodococcus</i> sp. PY11	RaK2 šeimininkų spektro nustatymas	Semėnaitė et al, 2000
<i>Rothia aerea</i> DSM 14556	ArV1 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium 292	ArV1, ArV2 šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedėlienė
<i>Solitalea canadensis</i> DSM 3403	ArV1 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Yaniella soli</i> DSM 22211	ArV1 šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ

2.2 lentelė. Bakteriofaų struktūrinių genų klonavimui naudoti pradmenys.

Genas (koduojamo baltymo funkcija)	Geno pagausinimui naudotų pradmenų pavadinimas ir oligonukleotidų seka (5'→3')	Geno raiškos vektorius
RaK2_g041 (uodegėlės apvalkalo baltymas)	Rak2_orf041_Nco_F ggaggattttccatggcagatttaac Rak2_041_Xho_R_n cccttttgatactcgagagtatttc	pET21d
RaK2_g042 (uodegėlės vamzdelio baltymas)	RaK2_42NdeF ggagaaattatcatatggcg RaK2_42XhoR gctccgacgtctcgagcatcg	pET21a
RaK2_g043 (hipotetinis baltymas)	RaK2_43NdeF cagaggtaacatattggctgatatg RaK2_43XhoR caagtacagtctcgagaacatttg	pET21a
RaK2_g106 (hipotetinis kapsidės dekoravimo baltymas)	RaK2106NdeIF ttgactaaggagattttcatatgagtc RaK2106BamHIR cggatttagtagtatttaggatccatag	pET16b, pET21a
RaK2_g107 (hipotetinis kapsidės dekoravimo baltymas)	RaK2107NdeIF attacatatggctactaataactactaatac RaK2107BamHIR tccagacatttctctcgagggatttaaac	pET16b, pET21a
ArV1_g15 (uodegėlės apvalkalo baltymas)	ArV1_put_tail_sheatF gagacaggagaaaacatattggctattg ArV1_put_tail_sheatR gttgtctttgtctcgagtcagttattc	pET16b, pET21a
ArV2_g03 (portalinis baltymas)	ArV2_portal_NdeIF ggtggtgtcaccatattgtaatttc ArV2_portal_BamHIR gttgcaactgtacgggatccacgtcg	pET16b
ArV2_g05 (kapsidės formavimo baltymas)	ArV2_scaffold_NdeIF gacggcggatcatattgctggttag ArV2_scaffold_BamHI gcggtcaacaggatccttagtgcc	pET16b
ArV2_g06 (pagrindinis kapsidės baltymas)	ArV2_majcap_NdeIF cttaggagtttcatattggcgcag ArV2_majcap_BamHIR ggtaaccctcgggatccccaccag	pET16b
ArV2_g11 (pagrindinis uodegėlės baltymas)	ArV2_maj-tail_NdeIF ggaaaccgaaaacatattgcccttg ArV2_maj-tail_BamHIR gttgagagcgggctgatccaccac	pET16b
ArV2_g15 (uodegėlės ilgio matavimo baltymas)	ArV2_tape-m_NdeIF gccagtctgccgggtctcatattggccg ArV2_tape-m_XhoIR tgggtgccggcggagctcgagggatgg	pET16b

2.2 lentelės tęsinys kitame puslapyje

2.2 lentelės tęsinys

ArV2_g16 (uodegėlės baltymas)	ArV2_tail(1)_NdeIF catttagggaggccatattggtgggtatc ArV2_tail(1)_XhoIR caataaactcccaccctcgagaaacca	pET16b
ArV2_g17 (uodegėlės baltymas)	ArV2_tail(2)_NdeIF gtcactaacaagtatcatatggcggtc ArV2_tail(2)_XhoIR ctcttcgttactgctcgagccattag	pET16b
ArV2_g18 (uodegėlės baltymas)	ArV2_min-tail_NdeIF catggacaggatggcccgcatatggc ArV2_min-tail_BamHIR gccagccattgcagcggatccac	pET16b
ArV2_g20 (uodegėlės fibrilių baltymas)	ArV2_adhes_NdeIF ccggaggacaaagcatatgagtgaatc ArV2_adhes_BamHIR cggcgccggaactggatccatcatg	pET16b
ArV2_g24 (uodegėlės fibrilių baltymas)	ArV2_tail(3)_NdeIF gaggaggtcggttccatattgggttac ArV2_tail(3)_BamHIR gcggtctttgggatcctgctcgcggtc	pET16b
NBD2_g39 (uodegėlės vamzdelio baltymas)	NBD2-mtail-NdeIF caaaggagtttcatatgtctcttc NBD2_mtail_BamHIR ctcttggtgatccagtcgc	pET16b, pET21a
	NBD2-mtail-NdeIF caaaggagtttcatatgtctcttc NBD2_mtail_XhoR gcaatgcccccttcggctcgcgagaacttc	pET21a
FV3_g052 (uodegėlės vamzdelio baltymas)	FV52_Nde_F1 gactgaataaggaagacatatggaaactc FV52_BamHI_R1 cgaaggtgagatcctatgctaaagtg	pET21a, pET16b
	FV52_Nde_F1 gactgaataaggaagacatatggaaactc FV52_XhoI_R1 gcctatgctaaagtgtgctcgaggataatacc	pET21a
FV3_g53 (uodegėlės apvalkalo baltymas)	FV53_NdeI_F1 ggaaacatatgcatatttagataaagtg FV-53_BamHI_R1 ttgaggatccatctagtcttcttattc	pET21a, pET16b
	FV53_NdeI_F1 ggaaacatatgcatatttagataaagtg FV-53_XhoI_R1 catctagtcttctcaggttcagtcattg	pET21a

2.3 lentelė. FV3 gp053 mutantų ir hibridinių baltymų konstravimui naudoti pradmenys.

Pradmens pavadinimas	Oligonukleotidų seka (5'→3')
FV53_NdeI_F1	ggaaacatatgcatatttagataaagtg
FV53_BamHI_R1	ttgaggatccatctagtcttccttattc
FV53_XhoI_R1	catctagtcttctcgcagttcagtcattg
FV53_Nde10F	taaagtggacatatgacagttaac
FV53_Bam10R	cagcattggtggatccttaaccaac
FV53_Xho10R	cagcattggtggactcgagaccaac
FV53_Nde20F	cccagcctattcatatggtaggtttc
FV53_Bam20RN	gtccagaaggatcctttaccggatacg
FV53_Xho20R	gaaggacgttgatctcgagacgaac
FV53_Nde25F	ctgtaggtttccatagccgctg
FV53_Bam25R	gttgatccggatccgaacttagtgc
FV53_Xho25R	gatccggatagctcgaggtgcag
FV53_Nde30F	gaaactccgctgcatatggctatcc
FV53_Bam30R	cgaagtgcggatccttgttttacac
FV53_Bam50R	ctgattggatccgatctatgcacg
FV53_Bam75R	ctgtcaggatccctcaattcttaatg
FV53_Bam100R	cggaagatcaggatccgactacttcatg
FV53_Bam150R	caacaccgtggatccttcagtagaag
FV53_Bam200R	cacctatgataggatcctacggaaaatc
PilnasMaF	gatatacatatggctagcacaggtacccatatttagataaagtgg
PilnasMaR	gtggtgctcgagttacgtacgtgtactagtttcagtcattgcaacagc
PilnasMaRH	gtggtgctcgagcgtacgtgtactagtttcagtcattgcaacagc
10MaF	gatatacatatggctagcacaggtaccgtaacctcggaaaccagc
10MaR	gtggtgctcgagttacgtacgtgtactagtaccaactttgtccagaagg
10MaRH	gtggtgctcgagcgtacgtgtactagtaccaactttgtccagaagg
20MaF	gatatacatatggctagcacaggtaccgtaggtttcggaaactccgc
20MaRH	gtggtgctcgagcgtacgtgtactagtatacgaacgaagtgcagg
SmaBamR	gagttgcacctgttccaccagggatcccgggtatcagagaagtattgtag
SmaBamF	ctacaatacttctctgataccgggatccctggtggaacaggtgcaactc
SBv2BamR	cactaggatcccgggattgtagctaccttttgcaata
SBv2SmaF	acaatcccgggatcctagtgcctatctctgtggaac
SBv3BamR	agtatggatcccgggttttgcaatagtcattacgaca
SBv3SmaF	caaaaccgggatccatacttctctgatagtgcctat
SBv4BamR	accttggatcccgggcattacgacatcagatcagct
SBv4SmaF	taatgcccgggatccaaggtagctacaatacttctct
SBv5BamR	tgcacggatcccgggagagataggcactatcagagaa
SBv5SmaF	tcttcccgggatccgtgcaactcagattgcagagtc
SBv6BamR	tgactggatcccgggagttgcactgttccaccagag
SBv6SmaF	caactcccgggatccagtcfaatgaagactaaaattga
SBv7BamR	ttcaaggatcccgggcattgactctgcaatctgagtt
SBv7SmaF	caatgcccgggatccttgaagcagatgatagcttgaa
Kilpa239R	ttgtggatcccgggttgggtggcagttactatct

2.3 lentelės tęsinys kitame puslapyje

2.3 lentelės tęsinys

Kilpa239F	caaaccgggatcccacaatatgatagcgtcggcatg
Kilpa2392R	ttgtgggatcccgggttggggcgcgatgttactatct
Kilpa2392F	caaaccgggatcccacaatatgatagcgtcggcatg
FV53_Sma75R	caggatctcgagctactggatcccgggattgatcgggtgttcac
FV53_Gly_Xho	ggagttaaatttctcgaggctcctcctcctcctcagtcattgccaac
100C_Gly_Xho	gaacagactgataacctcgaggctcctcctcctcctcctcatgcttaaac
AgE6F	ctagcgaagaagaagaagaagaag
AgE6R	gtaccttcttcttcttcttctcg
Ti1F	ctagccgtaaaaaacgtacaaaaaccgacccacaaaactgggtgggtggg
Ti1R	gtacccaaccaccaccagtttggggcgggttttggtagtttttacgg
SmaAgD6F	gacgacgacgacgacgacgg
SmaAgD6R	gatcccgtcgtcgtcgtcgtcgtc
SmaAgE6F	gaagaagaagaagaagaagg
SmaAgE6R	gatcccttcttcttcttcttcttc
SmaAgE6F	gaagaagaagaagg
SmaAgE6R	gatcccttcttcttcttcttc
Pfl23Strep	tggtgctcgagttattttcgaactgcggtggctccacgtacgttcagtcattgcaacagc

2.1.5. Cheminės medžiagos

Visos šiame darbe naudotos cheminės medžiagos buvo analitiškai grynos.

2.1.6. Fermentai

T4 PNK, T4 DNR ligazė, FastDigest restrikcijos endonukleazės, RNazė A, DNazė I, proteinazė K, Pfu, DreamTaq DNR ir Phusion DNR polimerazės buvo iš Thermo Fisher Scientific ir naudotos pagal gamintojo rekomendacijas.

2.1.7. Terpės ir buferiniai tirpalai

Terpės

Pusiau agarizuota LB terpė (minkštas agaras fagams): agaras (6 g/l), triptonas (10 g/l), mielių ekstraktas (5 g/l), NaCl (10 g/l).

MCIC terpė (pH 7,1): MacConkey agaras (40 g/l), inozitolis (10 g/l), karbenicilinas (0,05 g/l).

SCAI terpė: Simonso citrato agaras (23 g/l), inozitolis (10 g/l). MCIC ir SCAI terpės naudotos *Klebsiella* sp. bakterijų paieškai.

Agarizuota R2A terpė (pH 7,0): mielių ekstraktas (0,5 g/l), peptonas (0,5 g/l), kazaminorūgštys (0,5 g/l), gliukozė (0,5 g/l), krakmolas (0,5 g/l), natrio piruvatas (0,3 g/l), K_2HPO_4 (0,3 g/l), $MgSO_4 \times 7H_2O$ (0,05 g/l), agaras (15 g/l). Agarizuota R2A terpė naudota *Kribella catacumbae* DSM 19601 auginimui.

Buferiniai tirpalai

Bakteriofagų suspensijos buferinis tirpalas PB: Na_2HPO_4 (7 g/l), KH_2PO_4 (3 g/l) NaCl (4 g/l), $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (0,2 g/l).

Bakteriofagų dializės buferinis tirpalas I: (NaCl (3 M), Tris-HCl (50 mM, pH 7,5).

Bakteriofagų dializės buferinis tirpalas II: (NaCl (300 mM), Tris-HCl (50 mM, pH 7,5).

Bakteriofagų dializės buferinis tirpalas SM: NaCl (100 mM), Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), $MgSO_4$ (8 mM).

Baltymų suspensijos buferinis tirpalas TE: Tris-HCl (20 mM, pH 7,4), EDTA (1 mM).

Baltymų suspensijos buferinis tirpalas HEPES: HEPES (10 mM, pH 7,5).

2.2 Metodai

2.2.1 Bakterinių ląstelių auginimas

Bakterinių ląstelių kultūros buvo auginamos LB terpėje 28–37 °C temperatūroje iki ląstelių suspensijos optinis tankis (A_{600nm}) pasiekia 0,4–1. Užaugusi bakterijų kultūra naudota bakteriofagų izoliavimui, dauginimui, titravimui, ląstelių šeiminių spektro nustatymo, infekcinio efektyvumo, adsorbcijos bei vieno žingsnio eksperimentams, taip pat ruošiant kompetentes ląsteles transformacijai ir genų raiškos eksperimentams. Bakterijų kultūros Petri lėkštelėse augintos ant agarizuotos LB terpės (*Kribella catacumbae* DSM 19601 kamienas augintas ant agarizuotos R2A terpės) 18–48 °C temperatūroje nuo 12 val. iki 7 parų. Tuo tarpu atliekant *Klebsiella* sp. infekuojančio bakteriofago RaK2 ląstelių šeiminių paiešką, buvo naudojami ne tik 2.1 lentelėje pateikiami bakterijų kamieniai, bet ir atliekamas potencialių

ląstelių šeimininkų izoliavimas iš vandens mėginių. Tuo tikslu, mėginių pavyzdžiai (100–200 µl) buvo išsėjami ant agarizuotų MCIC ir SCAI terpių bei auginami 30 °C temperatūroje 12–48 val.

2.2.2 Bakteriofagų izoliavimas

Bakteriofagų izoliavimas iš dirvožemio mėginių

Į sterilius mėgintuvėlius surinkti dirvožemio mėginiai (1–10 g) užpilami 10 ml LB terpės ir inkubuojami purtant 15–60 min. 30–37 °C temperatūroje, po to centrifuguojama 15 min. 4 °C temperatūroje 3000 g. Supernatantas nupilamas ir perfiltruojamas per 0,45 ir 0,2 µm membraninius filtrus. Vėliau bakteriofagai titruojami arba papildomai koncentruojami (1 val., 4 °C, 16000 g). Supernatantas nupilamas, nuosėdos užpilamos 1 ml PB buferio ir laikomos 4 °C temperatūroje 2–18 val.

Bakteriofagų izoliavimas iš vandens mėginių

Į sterilius mėgintuvėlius iš įvairių vandens telkinių surinkti mėginiai (10–100 ml) centrifuguojami (15 min., 4 °C, 3000 g). Supernatantas nupilamas ir perfiltruojamas per 0,45 ir 0,2 µm membraninius filtrus. Vėliau bakteriofagai titruojami arba papildomai koncentruojami (1 val., 4 °C, 16000 g). Supernatantas nupilamas, nuosėdos užpilamos 1 ml PB buferio ir laikomos 4 °C temperatūroje 2–18 val.

2.2.3 Bakteriofagų dauginimas

Bakteriofagų dauginimas skystoje LB terpėje

Dauginant *E. coli* bakteriofagą FV3, *E. coli* kamieno MH1 ląstelių kultūra užsėjama į 10 ml LB terpės ir auginama aeruojant 37 °C kol ląstelių suspensijos A_{600} pasiekia 0,5. *Klebsiella* sp. infekuojantis bakteriofagas RaK2 dauginamas į 10 ml LB terpės užsėjant *Klebsiella* sp. KV3 kultūros ir auginant aeruojant 30 °C iki A_{600} pasiekia 0,4. Tuomet bakterijų kultūra infekuojama vienos lizės zonos suspensijos turiniu (šviežia fagų lizės zona, suspenduota 10 µl LB terpės) ir toliau auginama iki pilnos arba dalinės bakterijų lizės. Lizuotų

bakterijų kultūra centrifuguojama (1 val., 8 °C, 16000 g). Supernatantas nupilamas, nuosėdos užpilamos 1 ml PB buferio, pridedama 1/10 dalis CHCl₃ ir 2 µl DNazėsI (1 u/µl). Mišinys inkubuojamas purtant 1 val., 37 °C temperatūroje, po to suspenduojamas ir supilamas į naują mėgintuvėlį. Suardytų bakterinių ląstelių nuosėdos pašalinamos centrifuguojant 10–15 min. kambario temperatūroje, 3000 g. Supernatantas su fagais surenkamas ir laikomas 4 °C temperatūroje.

Bakteriofagų dauginimas pusiau agarizuotoje LB terpėje (dvisluoksnio agaru metodu)

Dvisluoksnio agaru metodu (Adams et al., 1959) su nedidelėmis modifikacijomis dauginami *Arthrobacter* spp. infekuojantys bakteriofagai ArV1 ir ArV2. Bakteriofagų dauginimui atrenkamos šviežios (iki 24 valandų) titruotų fagų lėkštelės, kuriose infekciniai centrai užima apie ½ lėkštelės ploto. Bakteriofagų titravimui naudotas *Arthrobacter* sp. 68b kamienas. Nuo lėkštelių nugrandomas viršutinis minkšto agaru sluoksnis ir užpilamas LB terpe (3 ml vienai lėkštei). Gauta suspensija inkubuojama 15–30 min. 8 °C temperatūroje, po to centrifuguojama (15 min., 4 °C, 6000 g). Supernatantas surenkamas, pakartotinai centrifuguojamas tomis pačiomis sąlygomis, filtruojamas per 0,45 µm membraninius filtrus.

2.2.4 Bakteriofagų titravimas

Bakteriofagai titruoti naudojant dvisluoksnio agaru metodiką su nedidelėmis modifikacijomis. Fagų suspensija buvo skiedžiama dešimtainiais skiedimais LB terpėje. Praskiesta fagų suspensija (100 µl) buvo sumaišoma su 3 ml išlydytos pusiau skystos agarizuotos LB terpės ir 500 µl eksponentinėje augimo fazėje esančios bakterijų kultūros, augintos LB terpėje iki reikiamo tankio. Bakteriofagų ArV1 ir ArV2 atveju, titravimui naudotas *Arthrobacter* sp. kamienas 68b, augintas iki $A_{600} \sim 1$. Fagas RaK2 titruotas ant *Klebsiella* sp. KV3, kai $A_{600} \sim 0,4$. Fagai FV3 ir NBD2 titruoti naudojant įvairius *E. coli* kamienus, kai A_{600} buvo $\sim 0,5$. Toks mišinys gerai sumaišomas ir greitai paskleidžiamas Petri lėkštelėje su agarizuota LB terpe. Lėkštelės inkubuojamos

12–16 val. 28–37 °C temperatūroje. Pagal susiformavusių lizės zonų skaičių, įvertinus praskiedimą, apskaičiuojamas fagų suspensijos titras.

2.2.5 Bakteriofagų ląstelių šeimininkių spektro nustatymas

Bakteriofagų ląstelių šeimininkių spektras buvo nustatomas atliekant bakteriofagų titravimą arba lašinimo testus ant bakterijų kamienų, pateikiamų 2.1 lentelėje. Lašinimo testų metu 500 µl eksponentinėje augimo fazėje esančios bakterijų kultūros (A_{600} 0,4–1) buvo sumaišoma su 3 ml išlydytos pusiau skystos agarizuotos LB terpės, mišinys gerai sumaišomas ir greitai paskleidžiamas Petri lėkštelėje su agarizuota LB terpe. Ant susipolimerizavusio ir dalinai pradžiuvusio viršutinio agaro sluoksnio su pusiau skysta agarizuota LB terpe ir bakterijų kultūra lašinama bakteriofagų suspensija. Lėkštelės inkubuojamos 12–16 val. optimaliomis fagų vystymosi sąlygomis.

2.2.6 Bakteriofagų infekcinio efektyvumo, adsorbcijos ir išėigos iš vienos ląstelės šeimininkės eksperimentai

Bakteriofagų infekcinio efektyvumo (*angl.* efficiency of plating) įvertinimas buvo atliekamas pagal Kalinienės ir kitų aprašytą metodiką (Kalinienė et al., 2010), titruojant bakteriofagų suspensiją su ląstelėmis šeimininkėmis ir inkubuojant lėkšteles skirtingose temperatūrose (10–47 °C) nuo 12 val. iki 7 parų. Suskaičiavus infekcinių centrų skaičių, taip pat įvertinus jų dydį bei morfologiją, nustatoma optimali fagų vystymosi temperatūra.

Bakteriofagų adsorbcijos prie ląstelės šeimininkės eksperimentai buvo atliekami pagal Kropinski aprašytą metodiką (Kropinski et al., 2009) su modifikacijomis. Eksponentinėje augimo fazėje esančios bakterinės ląstelės auginamos iki A_{600} pasiekia 0,5. Tuomet bakterijos sumaišomos su bakteriofagų suspensija, kad MOI būtų 0,1 (bakterijų ir bakteriofagų santykis tiriamajame mišinyje 10:1) ir inkubuojamos 30–37 °C temperatūroje iki 15–20 min. Tam tikrais laiko intervalais imama 100 µl mėginio ir atliekami skiedimai

LB terpėje. Bakterijų ir ant jų paviršiaus prisitvirtinusių fagų kompleksai pašalinami mėginius veikiant chloroformu (1/10 tirpalo tūrio) ir centrifuguojant 5 min. 5000 g. Nesiadsorbavusių fagų titras supernatante nustatomas atliekant bakteriofagų titravimą dvigubo agaro metodu.

Bakteriofagų išeigos iš vienos ląstelės šeimininkės arba vieno žingsnio (*angl.* single step) eksperimentai buvo atliekami pagal Carlson ir Miller aprašytą metodiką (Carlson ir Miller, 1994).

2.2.7 Bakteriofagų gryninimas cezio chlorido gradientu

Bakteriofagai buvo gryninami naudojant cezio chlorido gradientą pagal Sambrook ir kitų metodiką (Sambrook et al., 2001) su modifikacijomis. Koncentruotų fagų suspensija užnešama ant paruoštų ultracentrifuginių mėgintuvėlių (su 1,1, 0,9, 0,7 ir 0,5 g/ml cezio chlorido gradientu) viršutinio sluoksnio ir centrifuguojama 2–3 val. 4 °C temperatūroje, 24000 aps./min greičiu (centrifuga „Beckman“, rotorius SW40). Fagų formuojama šviesą barstanti juosta surenkama švirkštu ir dializuojama (4 °C) buferiniuose tirpaluose su skirtinga druskų koncentracija. Pradžioje 30 min. dializuojama buferyje I, vėliau du kartus – buferyje II. Galiausiai fagų suspensija dializuojama 2–18 val. SM buferyje. Po dializės įvertinamas išgrynintų fagų suspensijos titras, bakteriofagai naudojami tolimesniems darbams arba pakartotinai gryninami CsCl gradientu.

2.2.8 Preparatų paruošimas TEM metodu

Cezio chlorido gradientu išgrynintų bakteriofagų suspensija praskiedžiama iki $\sim 10^{11}$ PFU/ml koncentracijos ir užnešama po 5–10 μ l pavyzdžio ant anglimi dengtų nitroceliuliozinių (tinkleliai pagaminti prof. J. Staniulio), varinių arba nikelinių (Agar Scientific) tinklelių. Po 2–5 min. skystis nusiurbiamas filtriniu popieriumi, preparatai dažomi ant tinklelio užnešant 10 μ l 2 % uranilo acetato (pH 4,5) tirpalo. Po 2–5 min. skystis nusiurbiamas filtriniu popieriumi ir paruošti preparatai stebimi transmisinės

elektroninės mikroskopijos (TEM) metodu. Taip pat TEM analizei ruošiami ir mėginiai su fagų baltymais, ant tinklelių užnešant 5–10 µl rekombinantinių baltymų tirpalų. TEM analizė atlikta Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute naudojant MorgagniTM 268(D) bei Fizinių ir technologijos mokslų centre naudojant Tecnai G2 F20 X-TWIN transmisinius elektroninius mikroskopus.

2.2.9 Fagų genomines DNR išskyrimas ir gryninimas

Padaugintų ir išgrynintų fagų genomine DNR buvo skiriama naudojant fenolio-chloroformo metodiką (Kricker ir Carlson, 1994) su modifikacijomis. 100–200 µl fagų suspensijos (titras $\sim 1 \times 10^{11}$ PFU/ml) gerai sumaišoma su lygiu tūriu TE buferio (pH 8,0) prisotinto fenoliu ir centrifuguojama (22 °C, 5 min., 6000 g). Po centrifugavimo viršutinė frakcija atsargiai nusiurbama į naują mėgintuvėlį. Į šią frakciją pridedamas lygus tūris fenolio ir chloroformo mišinio (1:1), gerai sumaišoma, centrifuguojama (5 min., 6000 g), viršutinė frakcija surenkama į naują mėgintuvėlį. Procedūra kartojama 3 kartus. Paskutinį kartą surinkta fagų suspensija užpilama 600 µl šalto 96 % etanolio ir 10 µl 3 M amonio acetato. Susiformavę DNR „siūlai“ greitai surenkami išsukant sterilia stikline lazdele, kuri paliekama nudžiūti, vėliau praplaunama 2–3 lašais 70 % etanolio ir dar kartą išdžiovinus, užpilama 50 µl vandens be nukleazių. Inkubuojama 45 min. 37 °C temperatūroje. Tais atvejais, kai į fagų suspensiją užpylus etanolio ir įlašinus amonio acetato DNR „siūlai“ nesusiformuoja ir/arba nepavyksta jų surinkti (per mažas fagų titras ir/arba nedidelis gDNR dydis), mišinys paliekamas bent porai valandų –20 °C temperatūroje, kad išsėstų gDNR. Suspensija centrifuguojama (15 min., 16000 g), supernatantas nupilamas ir nuosėdos užpilamos 300 µl 70 % etanolio ir centrifuguojama (5 min., 16000 g). Etanolis nusiurbiamas, nuosėdos išdžiovinamos ir užpilamos 50 µl vandens be nukleazių. Inkubuojama 10–15 min. 37 °C temperatūroje, vėliau nuosėdos gerai suspenduojamos. Išgryninta fagų gDNR laikoma 4 °C temperatūroje. Fagų gDNR taip pat buvo skirta ir su

Zymo Research rinkiniu Quick-gDNA Miniprep pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.10 Plazmidinės DNR išskyrimas

Plazmidinė DNR buvo skiriama naudojant GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkinį, remiantis gamintojo pateikiamomis rekomendacijomis. Šiuo būdu išskirta pDNR buvo naudojama restrikcinei analizei, transformacijai ir sekoskaitos reakcijoms.

2.2.11 DNR amplifikavimas *in vitro* PGR metodu

DNR buvo padauginama atliekant polimerazės grandininę reakciją (PGR). Matrica buvo naudota iš koncentruotos fagų suspensijos išskirta genomine DNR, taip pat išgrynintų fagų virionų arba gautų bakterijų klonų suspensija. Reakcijos vykdytos naudojant specifinius sintetinius oligonukleotidinius pradmenis (2.1.4. skyrelis) ir polimerazės grandininės reakcijos rinkinius. 30 reakcijos ciklą buvo atliekama pagal gamintojų pateikiamas standartines schemas, atsižvelgiant į pradmenų lydimosi temperatūrą ir amplifikuojamo fragmento ilgį. Pasibaigus reakcijai, DNR fragmentai gryninti GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit rinkiniu (Thermo Fisher Scientific). Išgryninto fragmento koncentracija DNR elektroforezės agaroziniame gelyje nustatoma naudojant molekulinės masės žymenis MassRuler Express LR Forward DNA Ladder ir MassRuler Express LR Reverse DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

2.2.12 DNR elektroforezė agarozės gelyje

Elektroforezei buvo naudojamas 0,8–1,2 % agarozės gelis, turintis 0,5 µg/ml etidžio bromido. Elektroforezė vykdyta 1 × TAE buferyje. Gauti elektroforetiniai vaizdai buvo analizuojami naudojant UV šviesos transiliumatorių. DNR fragmentai iš gelio buvo gryninami naudojant QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), GeneJET Gel Extraction ir GeneJET

Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit rinkinius (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.13 Plazmidinių vektorių konstravimas

Reakcijos buferiniai tirpalai, reagentų kiekiai, temperatūra ir trukmė buvo pasirinkti atsižvelgiant į restrikcijos endonukleazijų gamintojų rekomendacijas. Reakcijos produktai analizuoti elektroforezės agarozės gelyje metodu, gryninti naudojant GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkinį. Plazmidinių vektorių DNR ir DNR fragmentai liguoti, sudedant į bendrą reakcijos mišinį atitinkamomis restrikcijos endonukleazėmis sukarpytą ir iš gelio išgrynintą plazmidinių vektorių DNR bei įterpiamos DNR fragmentus (1:3). Reakcija atliekama 1× ligazės buferyje, į 20 µl galutinio reakcijos mišinio pridedant apie 1 µl fago T4 ligazės (2,5 u/µl). Reakcija vykdoma 0,5–1 val. 22 °C temperatūroje. Ligavimo reakcijos buvo vykdomos ir naudojant Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkinį, remiantis gamintojo pateikiamomis rekomendacijomis.

2.2.14 Bakterinių ląstelių transformacija

Kompetentinių ląstelių cheminė transformacija

Bakterijų kultūros optiniui tankiui (A_{600}) pasiekus ~ 0,5, ruošiamos imliosios ląstelės pagal Mandel ir Higa aprašytą metodą (Mandel ir Higa, 1970).

Kompetentinių ląstelių elektroporacija

Bakterijų kultūros optiniui tankiui (A_{600}) pasiekus ~ 0,5, ląstelių suspensija centrifuguojama (30 min., 9000 g). Supernatantas nupilamas, o mėgintuvėlyje likusios ląstelės plaunamos 1 tūriu steriliaus 10 % glicerolio tirpalu ir vėl centrifuguojamos (30 min., 9000 g). Plaunama 2–4 kartus kaskart mažinant glicerolio tirpalo tūrį. Galiausiai ląstelės suspenduojamos 1–2 ml 10 % glicerolio tirpalo ir išpilstomos į mėgintuvėlius 100 µl porcijomis, kurios užšaldomos –80 °C. Į paruoštų kompetentinių ląstelių tirpalą dedama 0,5–5 µl

išgrynintos plazmidinės DNR arba ligavimo mišinio tirpalo. Elektroporacijos sąlygos: 1 mm kiuvetė, 2–4 ms ir 20 kV/cm impulsas. Ląstelės gaivinamos jas suspenduojant 500 µl sterilios LB terpės ir inkubuojant 30 min. 37 °C temperatūroje. Tada ląstelės paskirstomos ant selektyvios agarozinės LB terpės. Petri lėkštelės inkubuojamos per naktį 37 °C temperatūroje.

2.2.15 DNR nukleotidų sekų nustatymas ir analizė

DNR fragmentų nukleotidų sekos nustatytos Macrogen kompanijoje (Belgija). Bakteriofagų genomų sekoskaita atlikta BaseClear sekoskaitos centre (Olandija). Nukleotidų sekų analizei ir vaizdiniam pateikimui buvo naudojamos EMBL-EBI duomenų bazėje (<http://www.ebi.ac.uk>) esančios bioinformacinės analizės programos Fasta-Protein, Fasta-Nucleotide, Fasta-Genome, BLASTP, Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>), taip pat Sequence Editor (<http://www.fr33.net/seqedit.php>) ir Transeq (http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq). tRNR paieška genomuose vykdyta naudojant tRNAscan-SE 1.21 (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>). Filogenetinė analizė buvo atliekama naudojant MEGA 5.0 (Tamura et al, 2011), palyginamajai genomų analizei naudota Artemis programa (Carver et al., 2008), o pačių genomų analizei ir žemėlapių sudarymui – Geneious v5.5.6. (<http://www.geneious.com/>). Fago FV3 gp053 tretinės struktūros nustatymui naudoti HHpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) (Söding et al, 2005) ir I-TASSER įrankiai (Zhang, 2008).

2.2.16 Rekombinantinių baltymų biosintezė

Rekombinantinėmis plazmidėmis transformuota *E. coli* BL21-DE3 ląstelių kultūra auginama skystoje LB terpėje su ampicilinu (50 µg/ml) 37 °C temperatūroje, kol kultūros tankis (A_{600}) pasiekia 0,5. Klonuoto geno raiška indukuojama IPTG (0,1 mM). Ląstelių auginimo temperatūra sumažinama iki 30 °C, inkubacija vykdoma 3 valandas. Jei baltymas mažai tirpus arba siekiama gauti didesnę biomasės kiekį, ląstelės auginamos 16–18 valandų 20

°C temperatūroje. Bakterijos surenkamos centrifuguojant (10 min., 3000 g) ir suspenduojamos ląstelių ardymui paruoštuose His-binding arba TE buferiniuose tirpaluose.

2.2.17 Bakterinių ląstelių ardymas ir baltymų analizė

Ląstelės (0,75–1,5 ml suspensijos) buvo ardamos ultragarsu naudojant SONOPULS HD 2070 (BANDELIN, Vokietija) sonopulso aparatą (ledovandens vonioje, 5 ciklai: 30 s pulsas, 30 s pauzė, ardymo amplitudė 30–35 %). Ląstelių homogenizatas centrifuguojamas (4 °C, 15 min., 20000 g). Beląstelinis ekstraktas analizuojamas elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje (4,5 % koncentruojančio ir 14 % skirstomojo) denatūruojančiomis sąlygomis (SDS-PAGE) metodu. Po elektroforezės baltymai dažomi Coomassie Brilliant Blue dažu (Thermo Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas, gelis atplaunamas 7 % acto rūgšties vandeniniu tirpalu.

2.2.18 Rekombinantinių baltymų gryninimas

Baltymų gryninimas naudojant metalo-chelatinį sorbentą

Tirpiojoje frakcijoje esantys tiksliniai rekombinantiniai, histidinius inkarus turintys baltymai gryninti naudojant Zymo Research His-Spin Protein Miniprep rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas.

Baltymų gryninimas išsodinant amonio sulfatu

TEM analizės metu nustatėm, kad tirpiojoje frakcijoje esantys tiksliniai rekombinantiniai faginiai baltymai formuoja nanovamzdelines struktūras, jos grynintos išsodinant amonio sulfatu. Tuo tikslu į tirpią frakciją pridedama amonio sulfato (galutinė koncentracija 10 %) ir laikoma lede 10 min. Mišinys centrifuguojamas (4 °C, 15 min., 9000 g), nuosėdos suspenduojamos 1/10 pradinio tūrio TE arba HEPES buferyje ir laikomos 4 °C temperatūroje. Gryninant gp053 pagrindu sukonstruotus mutantinius baltymus, kurių formuojamų nanovamdelių ilgis, remiantis TEM analize, trumpesnis, lyginant su natyvaus rekombinantinio gp053 formuojamomis struktūromis, baltymai gryninti padidinant amonio sulfato koncentraciją iki 15–20 % arba pakartotinai

centrifuguojant. Baltymų koncentracijos nustatymui naudotas Lowry metodas (Lowry et al., 1951).

3. REZULTATAI

3.1 Naujų bakteriofagų charakterizavimas

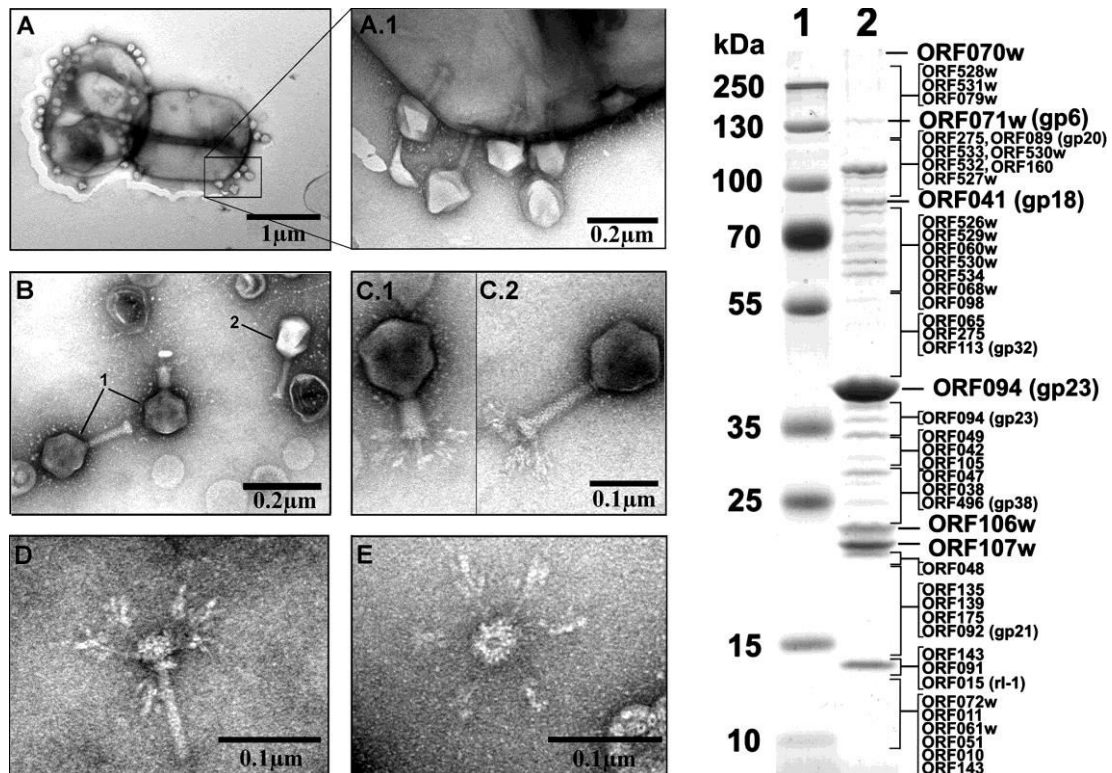
Šio darbo pagrindinis tikslas buvo gauti bakteriofagų struktūrinių baltymų pagrindu paremtas savaime susirenkančias hibridines nanostruktūras ir atlikti jų tyrimus. Šių struktūrų konstravimui nuspręsta panaudoti naujų bakteriofagų struktūrinius baltymus. Šiam tikslui pasiekti visų pirma buvo atliekamas naujų bakteriofagų detalus charakterizavimas. Jo metu buvo atliekama bakteriofagų morfologijos, fiziologijos, ląstelių šeiminių spektro nustatymo ir kiti tyrimai, taip pat sekoskaitos, bioinformatikos bei proteomikos metodais identifikuoti naujų fagų struktūriniai baltymai, iš kurių dalis pasirinkti tolimesniems tyrimams.

3.1.1 *Klebsiella* sp. bakteriofagas vB_KleM-RaK2

Klebsiella sp. infekuojantis bakteriofagas vB_KleM-RaK2 (sutrumpintas pavadinimas RaK2) – unikalus *Myoviridae* šeimos atstovas. Išskirtinis šio bakteriofago bruožas – ypač didelis genomas (345809 bp). 2012 metais paskelbus duomenis apie šio bakteriofago genomą, tai buvo didžiausią genomą turintis *Klebsiella* sp. infekuojantis bakteriofagas bei antras pagal genomo dydį bakterijas infekuojantis virusas su pilnai nustatyta genomo seka. Remiantis NCBI duomenų bazėje skelbiama informacija, net ir šiuo metu pagal genomo dydį bakteriofagas RaK2 yra šeštoje vietoje (Yuan ir Gao, 2017).

Kalbant apie RaK2 išskirtinumą, verta paminėti ir šio bakteriofago morfologiją. Remiantis TEM analizės duomenimis, taisyklingos ikosaedrinės RaK2 galvutės diametras yra 123 nm, o miovirusamas būdingos ilgos, nelanksčios ir susitraukiančios uodegėlės ilgis siekia 128 nm, skersmuo esant ištęstai ir sutrauktai konformacijai yra atitinkamai 21,5 nm ir 42 nm. Uodegėlė taip pat turi aiškiai pastebimą kaklelį (12,3 nm), jį supančią apykaklę (18,5 nm) ir bazinę plokštelę (35 nm). Visgi, struktūriniu požiūriu įdomiausias prie bazinės plokštelės besitvirtinančios šešios gan neįprastos fibrilinės struktūros

(3.1 pav.). Pastarųjų tikslų ilgį nustatyti yra ganėtinai sunku, kadangi šių „plunksniškų“ darinių struktūra yra pakankamai sudėtinga. Panašios prisitvirtinimo struktūros pastebėtos tik faguose iš „viunalikevirus“ fagu grupės (Adriaenssens et al., 2012). Visgi, remiantis bioinformatinės ir filogenetinės analizės rezultatais, artimo ryšio tarp RaK2 ir minėtųjų fagu potencialių uodegėlės fibrilių baltymų nebuvo rasta.



3.1 pav. Bakteriofago RaK2 virionų TEM (kairėje) ir baltymų SDS-PAGE (dešinėje) analizė. (A, A.1) RaK2 virionai ant ląstelių šeimininkų paviršiaus. (B) Bakteriofagai RaK2 (1) ir fagas T4 (2). RaK2 su sutraukta (C.1) ir iššęta (C.2) uodegėle. (D) RaK2 uodegėlės vamzdelis su bazine plokštele ir prie jos prisitvirtinusiomis fibrilėmis. (E) RaK2 bazinės plokštelės su prisitvirtinusiomis šešiomis fibrilėmis vaizdas iš viršaus. Dešinėje pusėje esančiame paveiksle simboliai žymi: 1 – baltymų molekulinės masės standartas Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific); 2 – RaK2 viriono baltymai. Kairėje nurodyta baltymų molekulinė masė, dešinėje – MS/MS analizės metu identifikuoti RaK2 baltymai.

Darbo metu nustatyta, kad RaK2 iš 40-ties tikrintų įvairių rūšių bakterijų infekuoja tik veterinarinį izoliatą *Klebsiella* sp. KV-3. Fago infekcinio efektyvumo (e.o.p.) analizė atskleidė, kad optimali RaK2 vystymosi temperatūra yra 30 °C, latentinio ir eklipsinio periodų trukmės atitinkamai 60 ir

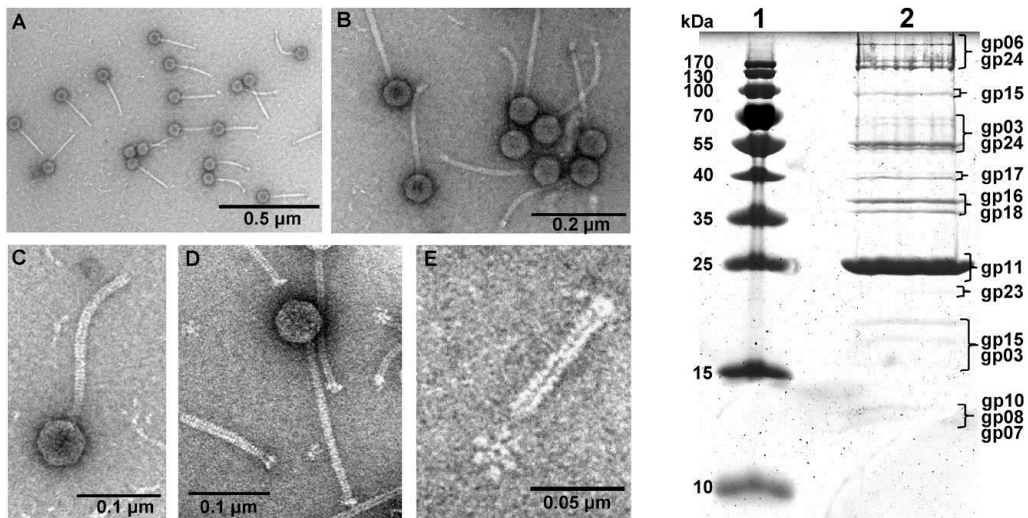
40 min., o infektyvių virusinių dalelių išėiga iš ląstelės siekia ~140 vienetų. Atlikus RaK2 genomo bioinformatinę analizę nustatyta, kad šio fago gDNR G+C sudėtis – 31,7 %. Identifikuoti 534 ASR, iš kurių didžioji dalis (85,2 %) anotuoti kaip nežinomos funkcijos baltymus koduojantys genai. Genome taip pat aptiktos 5 tRNR bei 2 pseudo tRNR. Atvirkštinės fazės nano-skysčių chromatografija, tiesiogiai taikyta su LC-MS/MS baltymų SDS-PAGE analize, padėjo nustatyti 54 RaK2 viriono struktūrinius baltymus (19 iš jų identifikuoti kaip struktūriniai baltymai ir bioinformatinės analizės metu). Remiantis SDS-PAGE ir LC-MS/MS analizės duomenimis, gausiausias RaK2 viriono baltymas, kaip ir įprasta miovirusams, yra pagrindinis kapsidės baltymas (gp094) (3.1 pav.), tačiau vienų iš gausiausiai aptinkamų gp106 ir gp107 funkcijos, taikant bioinformatinę analizę, nustatyti nepavyko. Siekiant įvertinti, ar šie baltymai negalėtų formuoti savitvarkių struktūrų *in vivo* ar *in vitro*, tolimesnių darbų metu alikti minėtųjų genų raiškos bakterinėse ląstelėse tyrimai (žr. 3.2.1 skyrelį).

3.1.2 *Arthrobacter* bakteriofagas vB_ArS-ArV2

Nepaisant to, kad *Arthrobacter* spp. yra vienos gausiausiai dirvožemyje aptinkamų bakterijų ir, manoma, atlieka ypatingai svarbų vaidmenį ekosistemose (Cacciari ir Lippi, 1987), išsamūs, šiuolaikiniais metodais pagrįsti šias bakterijas infekuojančių virusų tyrimai ilgą laiką nebuvo vykdomi. Siekiant pakeisti tokią situaciją ir ieškant potencialių struktūrinių baltymų nanostruktūrų konstravimui, šio darbo metu buvo išskirti du *Arthrobacter* genties bakterijas infekuojantys bakteriofagai.

Bakteriofagas vB_ArS-ArV2 (ArV2) – pirmasis aprašytas *Arthrobacter* spp. infekuojantis fagas su pilnai nustatyta ir NCBI duomenų bazėje paskelbta genomo seka. Atliktų darbų metu nustatyta, kad fagas ArV2 iš 40-ties tikrintų bakterijų kamienų (28 iš jų – *Arthrobacter* genties bakterijos) infekuoja tik *Arthrobacter* sp. 68b. Šio fago optimali vystymosi temperatūra yra ~30 °C, tačiau adsorbcijos prie ląstelių šeimininkų paviršiaus efektyvumas yra mažas,

todėl išeigos iš vienos ląstelės eksperimentus vykdyti nebuvo tikslinga. TEM analizė atskleidė, kad ArV2 priklauso *Siphoviridae* fagų šeimai. Šis bakteriofagas turi 63 nm skersmens taisyklingos ikosaedrinės struktūros galvutę, nesusitraukiančią, lanksčią uodegėlę (~194×10 nm) ir šešias trumpas uodegėlės fibriles (3.2 pav.).



3.2 pav. Bakteriofago ArV2 virionų TEM (kairėje) ir baltymų SDS-PAGE (dešinėje) analizė. (A–D) bakteriofago ArV2 virionai. (E) ArV2 uodegėlės vamzdelis ir šalia esanti bazinė plokštelė su šešiomis trumpomis prisitvirtinimui skirtomis fibrilinėmis struktūromis. Dešinėje pusėje esančiame paveiksle simboliai žymi: 1 – baltymų molekulinį masių standartą Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific); 2 – ArV2 viriono baltymai. Kairėje nurodyta baltymų molekulinė masė, dešinėje – MS/MS analizės metu identifikuoti ArV2 baltymai.

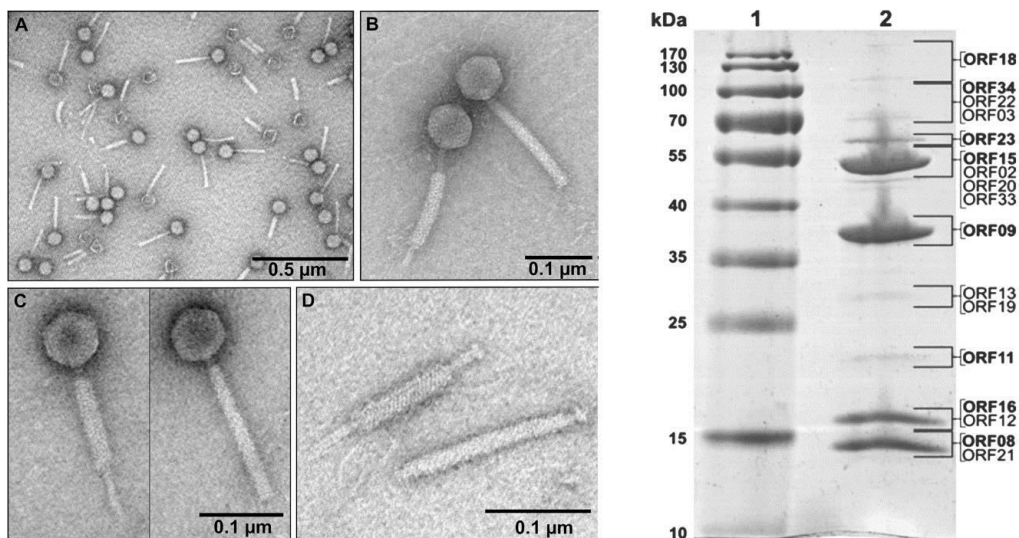
Bakteriofago ArV2 genetinė medžiaga – dvigrandinė DNR (37372 bp), kurios G+C sudėtis yra 62,73 %. Atlikus bioinformatinę analizę ArV2 genome nustatyti 68 ASR, iš kurių 28 (41 %) neturėjo jokių žinomų homologų duomenų bazėse esančioms sekoms. tRNR fago ArV2 genome identifikuota nebuvo. Atvirkštinės fazės nano-skysčių chromatografija, tiesiogiai taikyta su LC-MS/MS ArV2 struktūrinių baltymų SDS-PAGE analize, padėjo identifikuoti 14 viriono struktūrinių baltymų (9 iš jų identifikuoti kaip struktūriniai baltymai ir bioinformatinės analizės metu). Kai kurie šių baltymų pasirinkti detalesniems tyrimams.

Įdomu tai, kad, remiantis SDS-PAGE ir LC-MS/MS analizės duomenimis, gausiausias ArV2 viriono baltymas yra pagrindinis uodegėlės

vamzdelio baltymas (gp11) (3.2 pav.). ArV2 pagrindinis kapsidės baltymas (gp06) SDS-PAGE gelyje matomas gerokai aukščiau (virš 170 kDa žymos) nei jo teorinė molekulinė masė (~31 kDa). Šis reiškinys, tikėtina, yra susijęs su stipria kovalentine kapsidės baltymų tarpusavio sąveika, kuri buvo pastebėta ir kai kurių kitų bakteriofagų kapsidės baltymu atveju (Wikoff et al., 2000). Stiprūs kapsidės baltymų tarpusavio ryšiai paaiškina ir, priešingai nei daugumos uodeguotųjų fagų atveju, neįprastai mažą pagrindinio kapsidės baltymo koncentraciją SDS-PAGE gelyje, kadangi dėl nesuardytų sąveikų išliekantiems ypač didelės molekulinės masės junginiams sudėtingiau prasiskverbti į PAA gelį.

3.1.3 *Arthrobacter* bakteriofagas vB_ArtM-ArV1

Arthrobacter bakteriofagas vB_ArtM-ArV1 (ArV1) – pirmasis *Arthrobacter* spp. genties bakterijas infekuojantis myovirusas su pilnai nustatyta ir NCBI duomenų bazėje publikuota genomo seka. Įdomu tai, kad šio bakteriofago morfologija neleidžia abejoti, kad šis virusas yra *Myoviridae* šeimos atstovas (3.3 pav.), tačiau genomo bioinformatinė analizė parodė, kad dauguma bakteriofago ArV1 genų pasižymi didesne homologija sifovirusų baltymams. Didesnis giminingumas *Siphoviridae* šeimos bakteriofagams nustatytas ir atlikus konservatyvių struktūrinių baltymų filogenetinę analizę. Remiantis šiais duomenimis, ArV1 evoliuciniu požiūriu yra ypač įdomus bakteriofagas, užimantis tarpinę padėtį tarp mio- ir sifovirusų.



3.3 pav. Bakteriofago ArV1 virionų TEM (kairėje) ir baltymų SDS-PAGE (dešinėje) analizė. (A–C) Bakteriofago ArV1 virionai. (D) ArV1 uodegėlė su sutrauktu (viršuje) ir ištęstu (apačioje) uodegėlės apvalkalu. Dešinėje pusėje esančiame paveiksle simboliai žymi: 1 – baltymų molekulinės masės standartas Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific). 2 – ArV1 viriono baltymai. Kairėje nurodyta baltymų molekulinė masė, dešinėje – MS/MS analizės metu identifikuoti ArV1 baltymai.

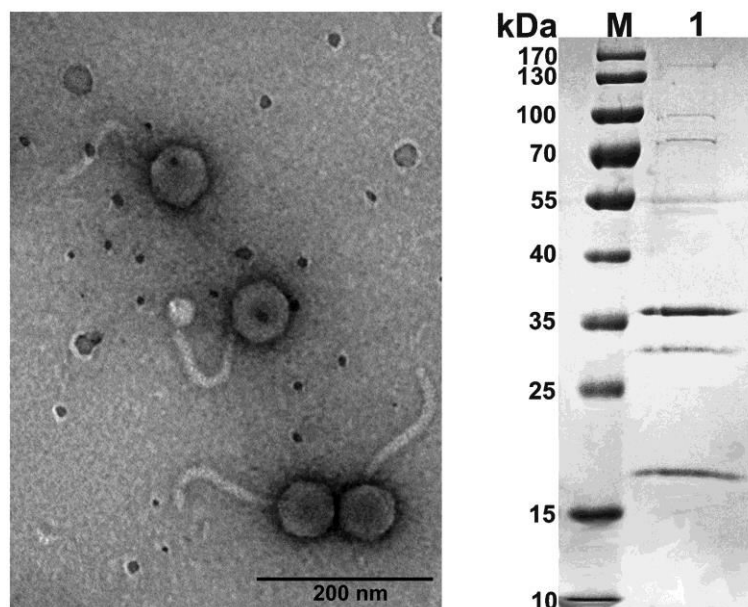
Remiantis TEM rezultatais, fago ArV1 taisyklingos ikosaedrinės galvutės skersmuo 74 nm, uodegėlės ilgis ~192 nm, skersmuo ~11 nm (3.3 pav.). Nustatyta, kad fagas ArV1 iš 32 tikrintų *Arthrobacter* genties bakterijų kamienų infekuoja šešis. Fago infekcinio efektyvumo eksperimentų rezultatai atskleidė, kad optimali ArV1 vystymosi temperatūra yra 28 °C. Bakteriofago ArV1 genetinė medžiaga – dvigrandininė DNR (71200 bp), kurios G+C sudėtis – 61,6 %. Atlikus bioinformatinę analizę ArV1 genome nustatyti 101 ASR, iš kurių daugiau nei 50 % neturėjo jokių žinomų homologų duomenų bazėse esančioms sekoms. tRNR genų fago ArV1 genome identifikuota nebuvo.

Bioinformatinės analizės metu identifikuota 13 struktūrinių ArV1 baltymų, dar 6 struktūriniai baltymai nustatyti atlikus LC-MS/MS analizę. Remiantis SDS-PAGE rezultatais, gausiausi ArV1 virionuose yra pagrindinis kapsidės (gp09) ir uodegėlės vamzdelio (gp16), taip pat uodegėlės apvalkalo (gp15) bei kapsidės dekoravimo (gp08) baltymai (3.3 pav.). Uodegėlės

apvalkalo baltymas pasirinktas detalesniems nanostruktūrų konstravimo tyrimams.

3.1.4 *Escherichia coli* bakteriofagas vB_EcoS_NBD2

Bakteriofagas vB_EcoS_NBD2 (NBD2) – *Siphoviridae* šeimos atstovas. TEM analizės metu nustatyta, kad šio fago taisyklingos ikosaedrinės galvutės skersmuo 65 nm, lanksčios uodegėlės ilgis ~170 nm, skersmuo ~12 nm (3.4 pav.). Nors nei bazinė plokštelė, nei uodegėlės fibrilės TEM darytose fagų virionų nuotraukose nebuvo aiškiai matomos, genomo bioinformatinės analizės metu (darbas atliktas dr. Lauros Kalinienės) šias struktūras koduojantys genai (atitinkamai ASR44 ir ASR45 bei ASR47 ir ASR57) buvo identifikuoti. Bakteriofago NBD2 genome, įskaitant ir jau minėtuosius, iš viso identifikuota 16 struktūrinius baltymus koduojančių genų. Visi šie struktūriniai baltymai buvo patvirtinti ir atlikus LC-MS/MS analizę. Be to, jos metu nustatyti dar du NBD2 struktūriniai baltymai (gp26 ir gp49), neturintys patikimos homologijos su anotuotais kitų organizmų struktūriniais baltymais.



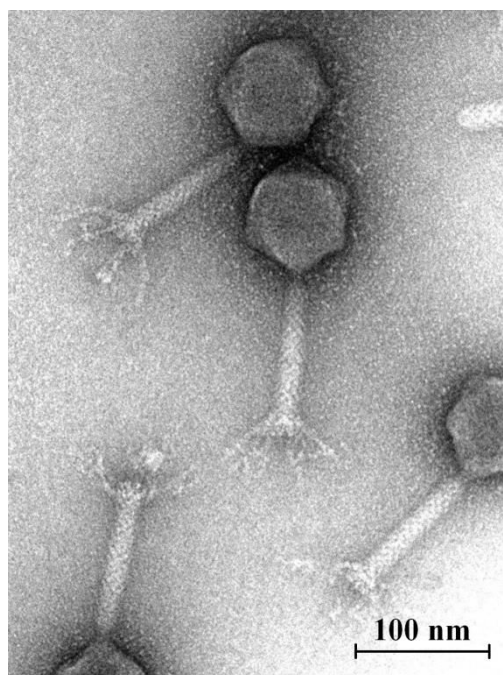
3.4 pav. Bakteriofago NBD2 virionų TEM (kairėje) ir SDS-PAGE (dešinėje) analizė. Dešinėje pusėje esančiame paveiksle simboliai žymi: 1 – baltymų molekulinės masės standartas Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific); 2 – NBD2 viriono baltymai.

Darbo metu atlikta SDS-PAGE analizė atskleidė, kad intensyviausia NBD2 viriono baltymų formuojama juosta yra matoma truputį aukščiau 35 kDa ribos (3.4 pav.). Įprastai vienas gausiausių uodeguotųjų bakteriofagų viriono baltymų yra pagrindinis kapsidės baltymas. Tikėtina, kad ir NBD2 virionai nėra išimtis, kadangi NBD2 pagrindinio kapsidės baltymo (gp33) teorinė molekulinė masė yra 35,11 kDa. Tolimesniems nanostruktūrų tyrimams, dėl neįprastai lanksčių uodegėlių, pasirinktas uodegėlės vamzdelio baltymas (gp39).

3.1.5 *Escherichia coli* bakteriofagas vB_EcoM-FV3

Bakteriofagas vB_EcoM-FV3 (FV3) – į „rV5-panašių virusų“ grupės atstovas (Santos et al., 2011), infekuojantis *E. coli* K-12 grupės laboratorinius kamienus. TEM analizės metu nustatyta, kad šis bakteriofagas yra tipinis miovirusas, turintis taisyklingo ikosaedro formos galvutę (skersmuo 85 nm) ir ilgą, susitraukiančią, su pastebimu kakleliu uodegėlę. Pastarosios ilgis esant ištemptai konformacijai yra 120 nm, skersmuo – 18 nm. Uodegėlei susitraukus, jos skersmuo padidėja iki 27 nm. Uodegėlės pamatinėje dalyje pastebima bazinė plokštelė su prie jos prisitvirtinusiomis šešiomis ląstelių šeimininkų atpažinimui skirtomis fibrilinėmis struktūromis (3.5 pav.).

Atlikus bakteriofago FV3 genomo (136947 bp) bioinformatinę analizę nustatyta, kad genomo G+C sudėtis yra 43,7 %, jame koduojami 218 ASR ir 5 tRNR. Palyginamoji genomų analizė atskleidė, kad FV3 genomo struktūra labai panaši į *E. coli* fago rV5 genomo struktūrą (Kropinski et al., 2013): net 212 fago FV3 ASR yra homologiški fago rV5 ASR, o jų vidutinis identiškumas aminorūgščių lygmenyje siekia 93,1 %.



3.5 pav. Bakteriofago FV3 virionų vaizdas, stebimas TEM analizės metu.

Bioinformatinės analizės metu identifikuota 19 struktūrinius baltymus koduojančių fago FV3 genų. Iš jų detalesniems tyrimams pasirinkti potencialūs uodegėlės vamzdelio (gp052) ir uodegėlės apvalkalo (gp053) baltymus koduojantys genai.

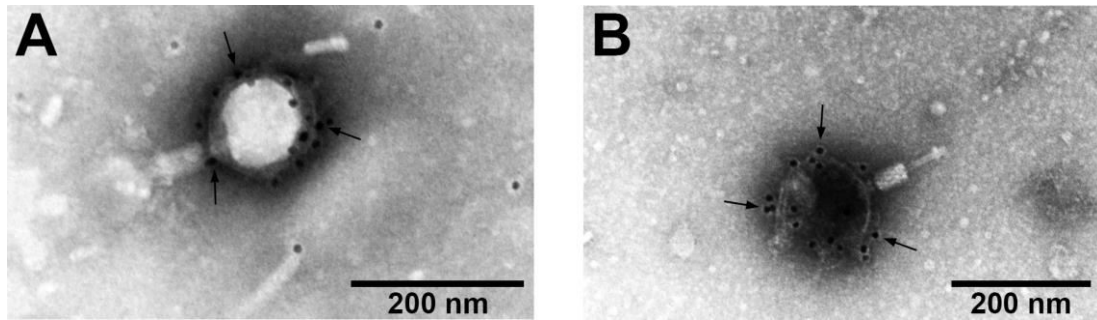
3.2 Bakteriofagų struktūrinius baltymus koduojančių genų klonavimas, raiška ir formuojamų nanostruktūrų analizė

Identifikavus potencialius bakteriofagų struktūrinius baltymus, kurie galėtų būti panaudoti kaip pagrindas savitvarkių hibridinių nanostruktūrų konstravimui, tolimesnių darbų metu PGR metodu pagausinti pasirinktų genų DNR fragmentai buvo klonuojami į indukuojamos raiškos plazmidinius vektorius. Buvo tiriama genų raiška ir, jei būtina, ji optimizuojama. Rekombinantinių baltymų gebėjimas formuoti struktūras buvo vertinamas TEM analize. Informacija apie pasirinktus bakteriofagų struktūrinius genus, jų pagausinimui PGR metodu naudotus pradmenis bei genų raiškos vektorius pateikta 2.2 lentelėje.

3.2.1 Bakteriofago RaK2 struktūrinių baltymų tyrimai

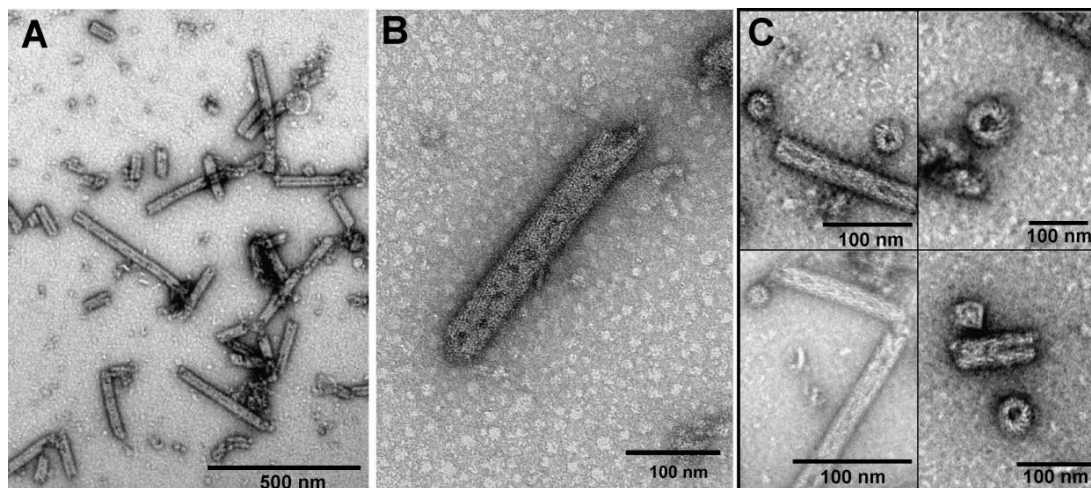
Savitvarkių nanostruktūrų konstravimui bakteriofago RaK2 atveju pasirinktas uodegėlės apvalkalo baltymas (gp041) bei nežinomos funkcijos, bet gausiai fagų virionuose aptinkami gp106 ir gp107. Pastarieji baltymai pasirinkti todėl, kad bioinformatinės analizės metu fago RaK2 genome nepavyko identifikuoti uodegėlės vamzdelio baltymo, todėl buvo manoma, kad šią funkciją galėtų atlikti kažkuris iš šių baltymų. Visų pirma, didelis gp106 ir gp107 kiekis, stebimas SDS-PAGE nuotraukose, leidžia manyti, kad tai yra vieni iš gausiausių ir svarbiausių fago RaK2 struktūrinių baltymų. Kadangi gausiausias fago viriono baltymas (kapsidės baltymas), kaip jau minėta, yra koduojamas geno *094*, tai genų *106* arba *107* produktai, buvo spėjama, kad galėtų būti kitų esminių faginių struktūrų, tokių kaip uodegėlė, vieni pagrindinių komponentų. Antra, gp106 ir gp107 antrinės struktūros analizės duomenys parodė, kad šie baltymai linkę formuoti uodegėlės vamzdelio baltymams būdingą beta-klostinę struktūrą. Trečia, šių baltymų dydis (atitinkamai 24,6 kDa ir 21,1 kDa) panašus į daugumos bakteriofagų uodegėlės vamzdelio baltymų dydžius (Leiman ir Shneider, 2012).

Nors darbo metu atlikus RaK2 gp106 ir gp107 raiškos tyrimus, buvo gauti tirpūs rekombinantiniai baltymai, tačiau TEM analizės metu susirinkusių tvarkingų nanostruktūrų nebuvo matyti. Siekiant nustatyti šių struktūrinių baltymų funkciją, buvo gauti polikloniniai antikūnai prieš šiuos baltymus (darbas atliktas dr. I. Dumalakienės), atliktas jų žymėjimas aukso nanodalelėmis (darbas atliktas dr. L. Kalinienės) ir preparatų TEM analizė. Jos metu nustatyta, kad gp106 ir gp107 iš tiesų yra fago kapsidės komponentai (3.6 pav.). Atlikus detalesnę bioinformatinę analizę bei remiantis bendromis žiniomis apie uodeguotųjų bakteriofagų struktūrą, tikėtina, kad RaK2 gp106 ir gp107 yra kapsidės dekoravimo baltymai.



3.6 pav. Bakteriofago RaK2 virionų vaizdas, stebimas TEM analizės metu. Fagai inkubuoti su aukso nanodalelėmis žymėtais polikloniniais antikūnais prieš RaK2 gp106 (A) ir gp107 (B). Rodyklės žymi polikloninių antikūnų prisitvirtinimo vietas.

Kita vertus, klonavus RaK2 uodegėlės apvalkalo baltymą koduojantį geną (*g041*) į indukuojamos raiškos plazmidinį vektorių pET21d ir ištyrus baltymų sintezę *E. coli* BL21-DE3 ląstelėse (darbas atliktas dr. S. Povilonienės) nustatyta, kad, net ir nesant kitų faginių baltymų, *E. coli* ląstelėse rekombinantinis gp041 formuoja vamzdelines struktūras. Remiantis TEM analizės rezultatais, šių struktūrų ilgis siekia nuo 10 iki 750 nm, o skersmuo (~41 nm) atitinka fago RaK2 virionų sutrauktos uodegėlės plotį (~42 nm). Šių nanostruktūrų nuotraukos pateikiamos 3.7 paveiksle.



3.7 pav. Bakteriofago RaK2 rekombinantinio gp041 formuojamų nanostruktūrų TEM analizė. (A, B) RaK2 gp041 formuojami nanovamzdeliai. (C) RaK2 gp041 nanovamzdelius sudarantys pavieniai žiedeliai.

Eksperimentiškai įrodžius, kad RaK2 *g041* iš tiesų yra uodegėlės apvalkalo baltymą koduojantis genas, tolimesnių darbų metu buvo atliekami ir potencialių uodegėlės vamzdelio baltymus koduojančių *g042* ir *g043* raiškos

tyrimai. Deja, bet beląstelinių ekstraktų SDS-PAGE analizė parodė, kad abu baltymai tirtomis sąlygomis buvo netirpūs, todėl nebuvo toliau tiriami.

3.2.2 Bakteriofagų ArV1 ir ArV2 struktūrinių baltymų tyrimai

Siekiant gauti savaime susirenkančias nanostruktūras iš *Arthrobacter* bakteriofagų ArV1 ir ArV2 baltymų, darbo metu atlikti šių bakteriofagų esminių struktūrinių galvutės ir uodegėlės baltymų genų klonavimo ir raiškos tyrimai (2.2 lentelė). Bakteriofago ArV1 atveju tirtas uodegėlės apvalkalo baltymas (gp15). Nustatyta, kad geno 15, klonuoto į indukuojamos raiškos plazmidinius vektorius pET16b (gautas baltymas su N-galiniu polihistidino inkaru) ir pET21a (gautas baltymas be histidino inkaro) produktai yra tirpūs, genų raišką vykdant *E. coli* Rosseta kamieno ir po indukcijos 0,1 mM IPTG inkubuojant ląstelių kultūrą 18–20 val. 20 °C temperatūroje. Deja, atlikus šių baltymų TEM analizę, vamzdelinių ar kitokių nanostruktūrų nebuvo pastebėta.

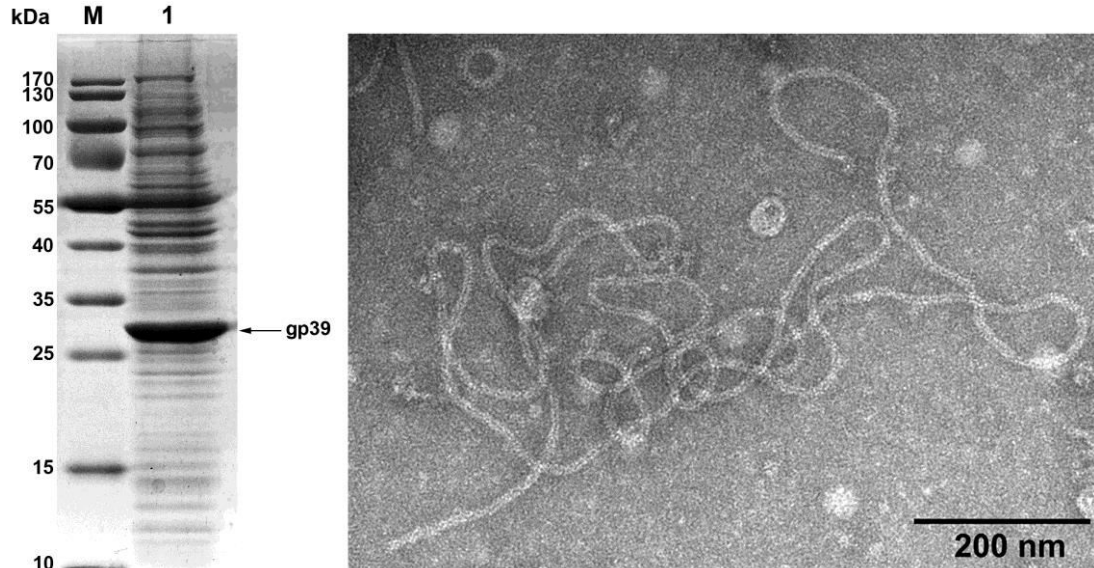
Tiriant bakteriofago ArV2 struktūrinių baltymų praktinio pritaikymo nanostruktūrų konstravimui galimybes, tyrimams pasirinkti gp03 (portalo baltymas), gp05 (kapsidės formavimosi baltymas), gp06 (pagrindinis kapsidės baltymas), gp11 (pagrindinis uodegėlės baltymas), gp15 (uodegėlės ilgio matavimo baltymas), gp16, gp17, gp18 (uodegėlės baltymai), gp20 bei gp24 (uodegėlės fibrilių baltymai). Darbo metu sukonstruoti indukuojamos raiškos plazmidiniai vektoriai pET16b, turintys visus minėtuosius baltymus (išskyrus gp15) koduojančius genus. Genų raiška tikrinta *E. coli* BL21-DE3 bei Rosseta laboratoriniuose kamienuose, bakterijų kultūrą indukuojant 0,1 mM IPTG, inkubuojant 5–20 val., 18–37 °C temperatūroje. Esant šioms sąlygoms, buvo stebima intensyvi tikslių genų raiška, o rekombinantinių baltymų tirpumas priklausė nuo konkretaus baltymo bei bakterijų kamieno.

Gauti rezultatai parodė, kad vykdant genų raišką *E. coli* BL21-DE3 kamieno, vieninteliai tirpūs iš tirtųjų ArV2 struktūrinių baltymų yra gp05 ir gp18. Genų raiškos tyrimams pasirinkus *E. coli* laboratorinį kamieną Rosetta ir atlikus analogiškus eksperimentus, gauti tirpūs gp24 produktai. Vis dėlto, atlikus

gp05, gp18 ir gp24 tirpių frakcijų TEM analizę, susiformavusios tvarkingos nanostruktūros nebuvo pastebėtos.

3.2.3 Bakteriofago NBD2 struktūrinių baltymų tyrimai

Darbo metu taip pat atlikta *E. coli* bakteriofago NBD2 geno 39 (koduojančio pagrindinį uodegėlės baltymą) raiškos tyrimai bei gautųjų rekombinantinių baltymų formuojamų struktūrų analizė TEM metodu. Šiuo tikslu, fago NBD2 *g39* pagausintas PGR metodu, gautasis fragmentas išgrynintas ir klonuotas į indukuojamos raiškos plazmidinius vektorius pET16b arba pET21a. Genų raiška tikrinta *E. coli* BL21-DE3 laboratoriniame kamiene, bakterijų kultūrą indukuojant 0,1 mM IPTG ir inkubuojant 3 val. 30 °C arba 16–20 val. 20 °C temperatūroje. SDS-PAGE analizės metu nustatytas tirpus ~27 kDa rekombinantinis NBD2 gp39 (3.8 pav.). Atlikus tirpios baltymų frakcijos TEM analizę, buvo stebimos ypatingai lanksčios ir ilgos vamzdelinės struktūros, kurių skersmuo atitiko bakteriofago NBD2 uodegėlės skersmenį (~12 nm), o ilgis siekė net 2–3 μm (3.8 pav.).



3.8 pav. Bakteriofago NBD2 gp39 sintezės *E. coli* BL21-DE3 ląstelėse, turinčiose pET21a plazmidę su įterptu *g39* SDS-PAGE (kairėje) ir gautų produktų TEM (dešinėje) analizė. Geno raiška indukuota 0,1 mM IPTG ir inkubuojant ląsteles 16 val. 20 °C temperatūroje. Kairėje pusėje esančiame paveiksle pavaizduota: M – baltymų molekulinės masės standartas Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific); 1 – tirpių baltymų frakcija.

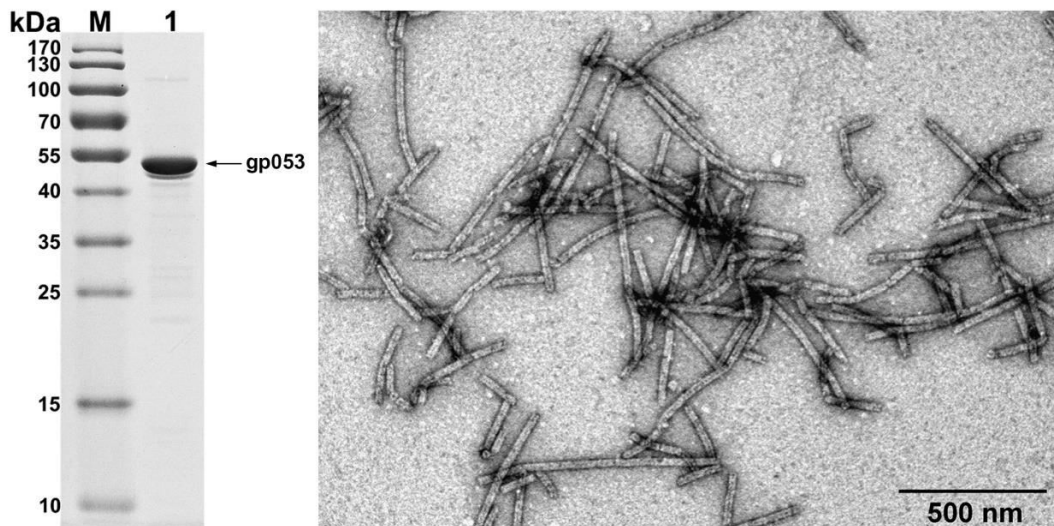
Įdomu tai, kad rekombinantinis NBD2 gp39, kaip ir bakteriofago SPP1 uodegėlės vamzdelio baltymas (gp17.1), renkasi į tvarkingas vamzdelines struktūras, net ir nesant kitų faginių baltymų, kurie įprastai yra būtini uodegėlės vamzdelio polimerizacijos iniciacijai (King, 1971; Katsura ir Tsugita 1977; Katsura, 1983). Kita vertus, fago SPP1 gp17.1 susirinkimas į vamzdelines struktūras vyksta ne *in vivo*, kaip NBD2 gp39 atveju, o *in vitro* ir yra pakankamai ilgai (net iki 10 dienų) trunkantis procesas (Langlois et al., 2015). Be to, remiantis straipsnyje pateikiamomis TEM nuotraukomis, gp17.1 nanostruktūrų ilgis gerokai trumpesnis už NBD2 gp39 formuojamus nanovamzdelius. Dėl šių priežasčių tolimesni gp39 tyrimai gali būti ypač įdomūs ne tik dėl galimybės kurti hibridinius nanovamzdelius, bet ir aiškinantis bakteriofagų uodegėlės vamzdelio baltymų polimerizacijos procesus, kurie, panašu, vis dar nėra pakankamai ištirti.

3.2.4 Bakteriofago FV3 struktūrinių baltymų tyrimai

Bioinformatiniais metodais identifikavus fago FV3 potencialius uodegėlės vamzdelio (gp052) ir uodegėlės apvalkalo (gp053) baltymus koduojančius genus, pastebėta, kad abu baltymai fago FV3 genome yra koduojami komplementarioje DNR grandinėje ir išsidėstę vienas šalia kito. Be to, genai transliuojami tuo pačiu skaitymo rėmeliu, o tarp šių dviejų genų esanti ribosomos prisijungimo vieta suteikia galimybę vienu metu pasireikšti abiem genams, naudojant vieno vektoriaus sistemą. Remiantis tuo, sukurti pradmenys 053 ir 052 genų pagausinimui ir klonavimui į indukuojamos raiškos plazmidinius vektorius pET16b (poliHis-inkaras gp053 N-gale) bei pET21a (poliHis-inkaras gp052 C-gale). Genų raiška tikrinta *Escherichia coli* BL21-DE3 laboratoriniame kamiene, bakterijų kultūrą indukuojant 0,5 mM IPTG, inkubuojant 3 val., 30 °C temperatūroje. SDS-PAGE analizės metu nustatyta, kad abiem atvejais vyko intensyvi g053 ir g052 raiška, abu baltymai buvo tirpūs, atliktas jų gryninimas naudojant poli-histidino inkarus turinčius

baltymus surišančias kolonėles (pradinį genų *053–052* pagausinimą PGR metodu bei pirmuosius baltymų biosintezės tyrimus atliko dr. L. Truncaitė).

Atlikus *g053–052* koduojamų baltymų tirpių frakcijų TEM analizę, nustatyta, kad vykstant šių genų raiškai minėtomis sąlygomis, *E. coli* ląstelėse susiformuoja ilgos (iki 1000 nm), tvarkingos (~28 nm skersmens) vamzdelinės struktūros (3.9 pav.). Siekiant išsiaiškinti, ar tai geno *052* ar *053* koduojami baltymai ir ar šios vamzdelinės struktūros susirenka, esant tik vienam iš minėtųjų baltymų bei įvertinti N- arba C-galinių polihistidino inkarų įtaką nanostruktūrų susidarymui, buvo atlikti išsamesni tokių rekombinantinių baltymų tyrimai.



3.9 pav. Bakteriofago FV3 išgryninto rekombinantinio gp053 SDS-PAGE (kairėje) ir TEM (dešinėje) analizė. Kairėje pusėje esančiame paveiksle pavaizduota: M – baltymų molekulinės masės standartas Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific); 1 – tirpių baltymų frakcija.

Buvo sukonstruoti indukuojamos raiškos plazmidiniai vektoriai pET16b ir pET21a, turintys įklonuotus *g052* ir *g053*. Genų raiška tikrinta *E. coli* BL21-DE3 ląstelėse, kultūrą indukuojant 0,1 mM IPTG, inkubuojant 5–20 val., 30 °C temperatūroje. Nustatyta, kad stebėtos nanostruktūros yra formuojamos geno *053* koduojamo uodegėlės apvalkalo baltymo. Struktūrų susidarymui uodegėlės vamzdelio baltymas (gp052) įtakos neturi. Pats gp052 (su N- arba C-galiniais histidino inkarais arba be jų) visais atvejais yra tirpus, tačiau į vamzdelines struktūras, nesant papildomų faginių baltymų, nesusirenka. Dėl šios priežasties, remiantis gautais rezultatais, tolimesniems tyrimams pasirinktas gp053.

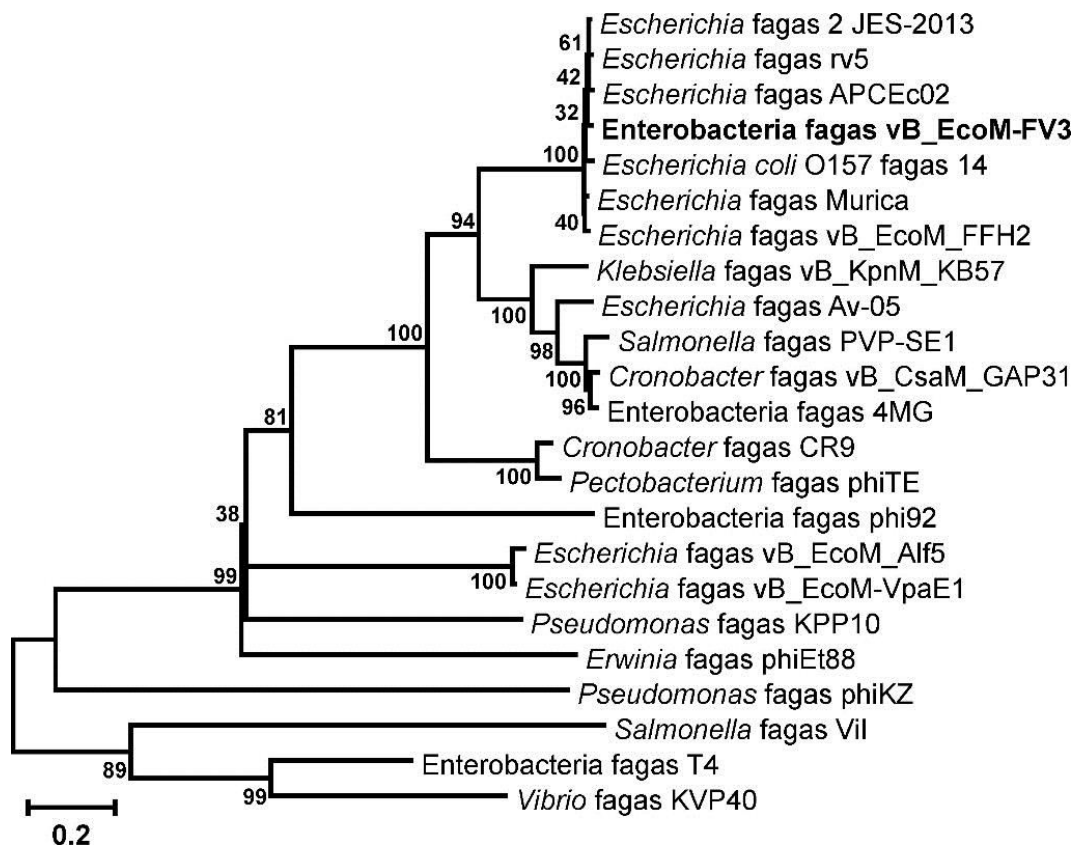
3.3 Bakteriofago FV3 gp053 formuojamų nanostruktūrų tyrimai

Darbo metu buvo atlikta gp053 bioinformatinė analizė, jo formuojamų vamzdelinių struktūrų atsparumo įvairiems aplinkos veiksniams tyrimai, taip pat mutantinių gp053, turinčių įvairias aminorūgščių delecijas, pakeitimus arba papildomas aminorūgštis, konstravimas bei hibridinių baltymų konstravimas ir jų formuojamų nanostruktūrų tyrimai.

3.3.1 Baltymo gp053 sekos bioinformatinė analizė

Siekiant sukonstruoti stabilius bei pageidaujamomis savybėmis pasižyminčius hibridinius nanovamzdelius, ypatingai svarbus šių struktūrų pagrindą sudarančių baltymų aminorūgščių išsidėstymo baltymo erdvinėje struktūroje, o taip pat ir paties baltymo padėties bei galimos sąveikos su šalia esančiais baltymais nustatymas. Dėl šios priežasties atlikta detali gp053 bioinformatinė analizė, kurios metu įvertintas gp053 pirminės ir tretinės struktūros panašumas su NCBI duomenų bazėje esančiais baltymais, taip pat sudarytas numanomas gp053 tretinės struktūros modelis bei atlikta filogenetinė analizė, kurios metu nustatytas FV3 gp053 ryšys su kitų bakteriofagų uodegėlės apvalkalo baltymais.

Bioinformatinės analizės metu nustatyta, kad gp053 aminorūgščių lygmenyje panašiausias (identiškas 98–99 %) į „rV5-panašių“ fagų grupės, kuriai priskiriamas ir FV3, uodegėlės apvalkalo baltymus, o identiškas kitų fagų uodegėlės apvalkalo baltymams mažesnis nei 60 %. Siekiant geriau suprasti evoliucinius ryšius tarp FV3 ir kitų uodeguotųjų bakteriofagų uodegėlės apvalkalo baltymų, buvo atlikta filogenetinė analizė. Nustatyta, kad į „rV5-panašių“ bakteriofagų uodegėlės apvalkalo baltymai (įskaitant fago FV3 gp053) evoliuciniu požiūriu artimiausi *Klebsiella* fago vB_KpnM_KB57 bei su „rV5-panašiais“ fagais filogenetiškai artimai susijusių „PVP-SE1-panašių“ fagų (Santos et al., 2011; Kim, 2014) uodegėlės apvalkalo baltymams (3.10 pav.).

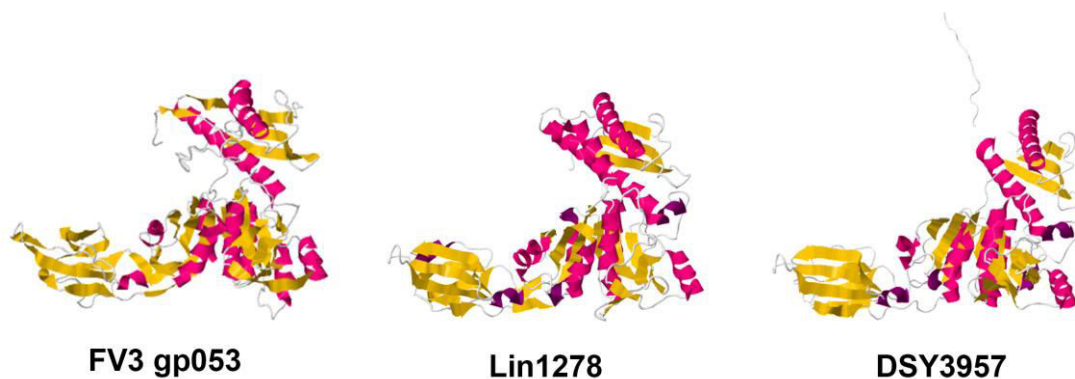


3.10 pav. Filogenetinė bakteriofagų uodegėlės apvalkalo baltymo diagrama, sudaryta artimiausių grupių apjungimo būdu. Šalia atsišakojimų nurodyta procentinė įkėlos sutapimo su tiriamuoju baltymu išraiška. Mastelis atitinka pakeistų aminorūgščių skaičių, tenkantį vienai pozicijai.

Nepaisant ypač didelio gp053 ir „rV5-panašių“ fagų uodegėlės apvalkalo baltymų identiškumo, erdvinės šių baltymų struktūros klausimas vis dar išlieka atviras. Remiantis duomenų bazėse esančia informacija, nei vieno iš „rV5-panašių“ ar jiems giminingų fagų uodegėlės apvalkalo baltymų kristalografinės struktūros vis dar nėra nustatytos. Dėl šios priežasties atlikta gp053 ir vieno iš nedaugelio nustatytos kristalinės struktūros bakteriofago T4 uodegėlės apvalkalo baltymo (gp18) palyginamoji analizė. Nustatyta, kad šių baltymų identiškumas aminorūgščių lygmenyje tėra 12 %. Kita vertus, kaip jau minėta 1.4 skyrelyje, 12 % identiškumas nustatytas ir fago T4 bei phiKZ uodegėlės apvalkalo baltymų atveju, tačiau krioelektroninės mikroskopijos ir rentgeno struktūrinės analizės rezultatai atskleidė didelį šių baltymų formuojamų struktūrų panašumą (Aksyuk et al., 2011).

Siekiant nustatyti gp053 tretinės struktūros panašumą fago T4 gp18 ir kitų žinomos struktūros baltymų atžvilgiu, atlikta palyginamoji analizė naudojantis HHpred įrankiu. Nustatyta, kad fago FV3 uodegėlės apvalkalo baltymo tik C-galinio fragmento (258–442 a.r.) susilankstymas atitinka fago T4 gp18 (PDB ref: 3J2M) C-galinio fragmento (470–643 a.r.) konformaciją su 97,2 % tikimybe (įvertis=0,00034). Kita vertus, nustatyta, kad gp053 galimas susilankstymas artimiausias trijų į bakteriofagų susitraukiančias struktūras panašių baltymų susilankstymui. 1–422 a.r. atitinka R-tipo piocino iš *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ref: 3J9Q) susilankstymą su 98,6 % tikimybe (įvertis=9.9e-07). 18–442 a.r. atitinka uodegėlės apvalkalo baltymo Lin1278 iš *Listeria innocua* profago (PDB ref: 3LML) susilankstymą su 98,5 % tikimybe (įvertis=1.3e-05). 16–422 a.r. atitinka uodegėlės apvalkalo baltymo DSY3957 iš *Desulfitobacterium hafniense* profago (PDB ref: 3HXL) susilankstymą su 98,5 % tikimybe (įvertis=6.3E-06). Įdomu tai, kad nepaisant tretinės struktūros panašumo, gp053 identiškumas aminorūgščių lygmenyje su pastaraisiais baltymais tesiekia 14,2 % (3J9Q), 14,4 % (3HXL) ir 15,7% (3LML).

Didžiausias fago FV3 uodegėlės apvalkalo baltymo galimos tretinės struktūros panašumas į minėtuosius baltymus nėra netikėtas dėl keleto priežasčių. Visų pirma, šiuo metu vis dar išlieka tik labai ribotas skaičius nustatytų uodegėlės apvalkalo baltymų struktūrų (Kube ir Wendler, 2015). Antra, kaip jau minėta literatūrinėje dalyje, bakteriofaguose ir prokariotuose aptinkamų susitraukiančių vamzdelinių struktūrų sandara labai panaši, todėl nenuostabu, kad gp053 tretinė struktūra panašesnė į bakterijose aptinkamus R-tipo piocinus nei į bakteriofagų uodegėlės apvalkalo baltymo struktūrą (Leiman ir Shneider, 2012; Sarris et al., 2014; Kube ir Wendler 2015; Kudryashev et al., 2015).



3.11 pav. Bakteriofago FV3 gp053 monomero molekulinio modelio ir nustatytos kristalinės struktūros baltymų Lin1278 (3LML) bei DSY3957 (3HXL) palyginimas. gp053 molekulinis modelis sudarytas naudojantis I-TASSER įrankiu (Zhang, 2008).

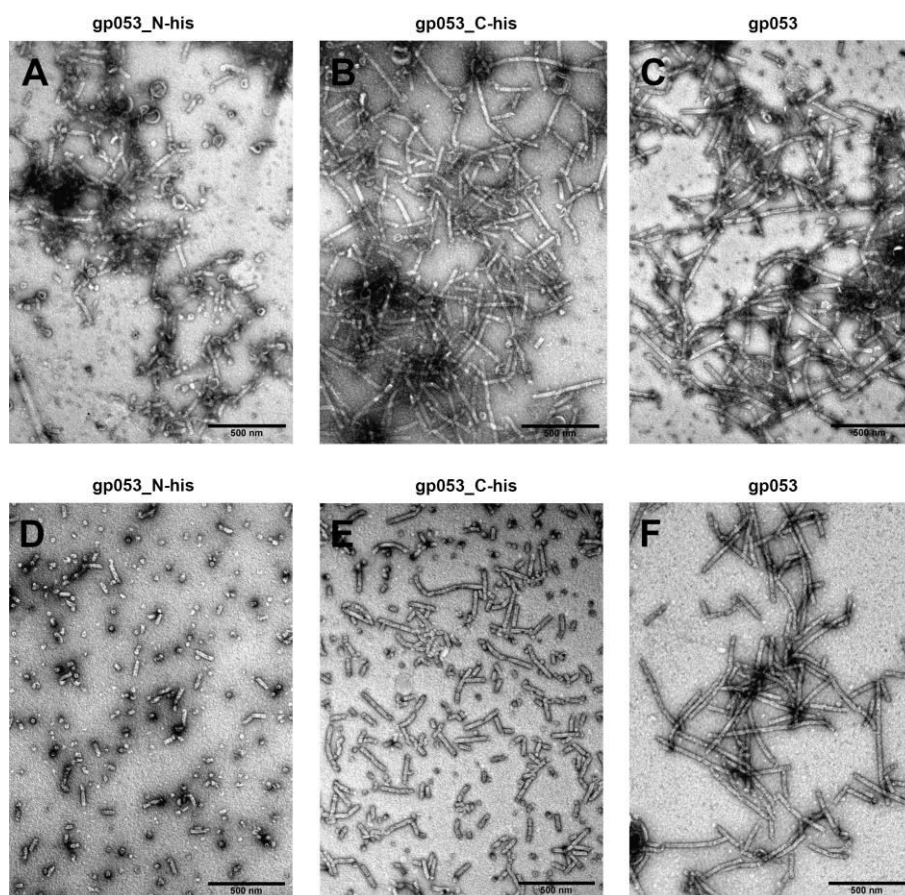
Bakteriofago FV3 gp053 numanomas tretinės struktūros modelis (3.11 pav.) sukurtas naudojantis I-TASSER įrankiu (Zhang, 2008). Labiausiai tikėtinių trijų gp053 modelių (iš sumodeliuotų penkių) struktūriniai analogai baltymų duomenų bazėje (*angl.* protein data base (PDB)) atitiko ir nustatytus HHpred analizės metu: 3LML, 3HXL ir 3J9Q. I-TASSER apskaičiuotas pirmojo modelio TM-įvertis ($0,54 \pm 0,15$) rodo didelę gp053 tretinės struktūros ir šio modelio sutapimo tikimybę.

3.3.2 Rekombinantinio gp053 biosintezė, gryninimas ir stabilumo tyrimai

FV3 gp053 koduojančio geno raiška tirta *E. coli* BL21-DE3 ląstelėse, kultūrą indukuojant 0,1 mM IPTG ir inkubuojant 3–20 val., 30 °C temperatūroje. Esant šioms sąlygoms buvo stebima intensyvi rekombinantinio baltymo sintezė, o po ląstelių suardymo tirpioje frakcijoje esančių rekombinantinių baltymų gryninimas buvo optimizuotas keliais etapais.

Remiantis konservatyviu bakteriofago T4 uodegėlės apvalkalo modeliu, uodegėlės apvalkalą sudarančių baltymų N- ir C-galinės aminorūgštys formuoja domeną I, kuris atsiduria baltymo apvalkalo vidinėje pusėje (žiūrėti 1.4 skyrelį). Žinant, kad bakteriofagų rekombinantinių uodegėlės apvalkalo baltymų formuojamų polimerinių vamzdelių morfologija ir savybės atitinka bakteriofago sutrauktos uodegėlės apvalkalo konformaciją ir tai, kad šių struktūrų, nepaisant nedidelio panašumo aminorūgščių lygmenyje, morfologija

itin panaši (žiūrėti 1.4 skyrelį), tikėtina, kad ir bakteriofago FV3 gp053 N- ir C-galinės aminorūgštys atsiduria vidinėje vamzdelio dalyje. Siekiant patvirtinti arba paneigti (šiuo atveju dar ir sukuriant efektyvų nanovamzdelių gryninimo metodą) šią prielaidą, buvo sukonstruoti rekombinantiniai gp053, turintys N- ir C-histidino inkarus. Baltymai išgryninti naudojant metalų chelatinę chromatografiją. Tiek negryninti, tiek gryninti baltymai analizuoti SDS-PAGE ir TEM metodais. Nustatyta, kad gryninant baltymus, didžiausias jų kiekis atsiduria su sorbentu nesąveikaujančiose frakcijose, o išgrynintą frakciją sudaro gp053, formuojantys trumpesnes vamzdelines arba tik pavienes žiedines struktūras (3.12 pav. D, E).



3.12 pav. Fago FV3 gp053 formuojamų nanostruktūrų TEM analizė prieš (viršuje) ir po (apačioje) gryninimo. gp053_N-his (D) ir gp053_C-his (E) gryninti naudojant metalų chelatinę chromatografiją, gp053 (F) grynintas išsodinant amonio sulfatu.

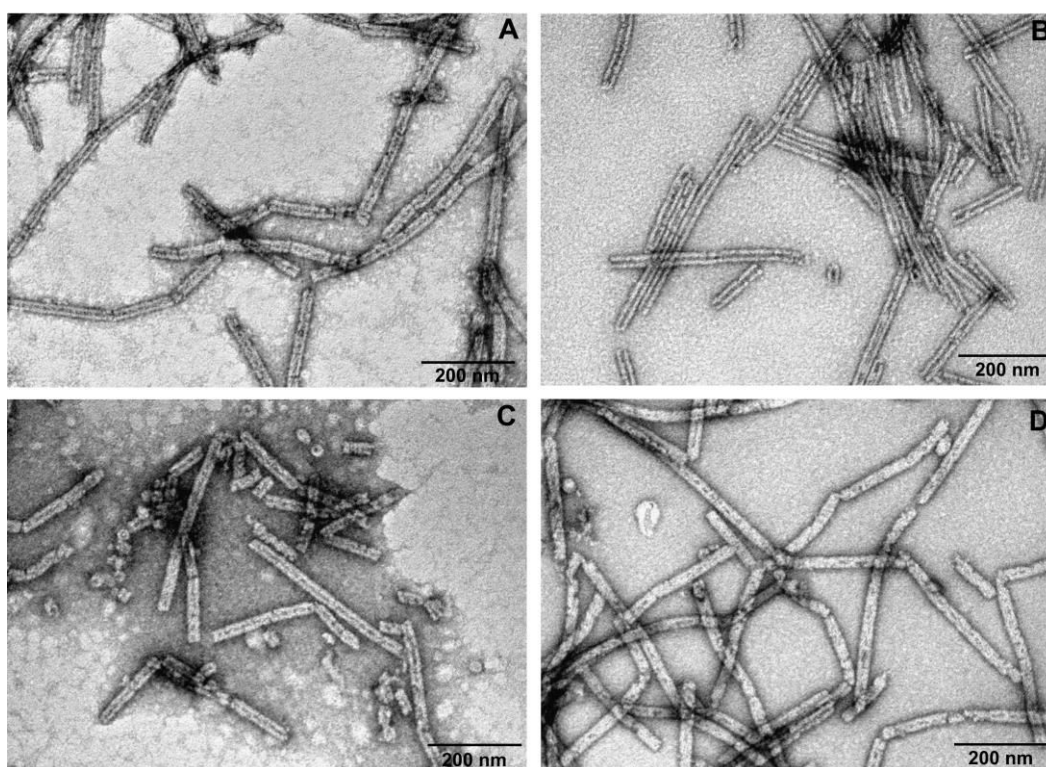
Remiantis gautais rezultatais, taip pat ir bioinformatinės analizės duomenimis, tikėtina, kad ir gp053 atveju baltymo N- ir C-galinės

aminorūgštys polimerizacijos metu atsiduria vamzdelio vidinėje dalyje. Be to, papildomas N-histidino inkaras turi daugiau neigiamos įtakos baltymo susirinkimui į tvarkingas nanostruktūras nei baltymo C-gale esantys papildomi histidiniai: gp053_N-his formuojami nanovamzdeliai gerokai trumpesni (iki 300 nm), lyginant su struktūromis, kurios yra stebimos rekombinantinio gp053_C-his atveju (vamzdelių ilgis iki 1000 nm). Tiek gp053_N-his, tiek gp053_C-his formuojamų nanovamzdelių skersmuo (~28 nm) išlieka nepakitęs, lyginant su natyvaus rekombinantinio gp053 formuojamų vamzdelių diametru.

Atsižvelgiant į darbo metu gautus rezultatus bei ieškant alternatyvių gp053 formuojamų struktūrų gryninimo metodų, tirpius, itin didelės molekulinės masės nanovamzdelius nuspręsta gryninti išsodinant amonio sulfatu (žiūrėti 2.2.18 skyrelį). Atliktas gryninimo sąlygų optimizavimas, kurio metu tirta gp053 formuojamų nanovamzdelių tirpumo priklausomybė nuo amonio sulfato druskų koncentracijos ir inkubacijos laiko. Galutinis šio dabo rezultatas – ypač greitai (vos per pusvalandį), pigiai (gryninimui naudojama tik amonio sulfato druska) ir produktyviai (biomasės išeiga 1–5 mg/ml) gaunami gp053 formuojami nanovamzdeliai. Taikant šį metodą išgryninto gp053 SDS-PAGE nuotrauka pateikiama 3.9 paveiksle (kairėje), o baltymo formuojamų struktūrų vaizdas, stebimas TEM – 3.9 pav. (dešinėje), taip pat 3.12 pav. (F). Kita vertus, amonio sulfatu gryninant gp053 mutantus arba hibridinius baltymus (detalesni šių baltymų tyrimai aprašyti kituose skyriuose), kurių formuojamų vamzdelinių nanostruktūrų ilgis trumpesnis, lyginant su natyvaus rekombinantinio gp053 formuojamomis struktūromis, naudojant 10 % amonio sulfato druską išsodinama tik nedidelė dalis tikslinio baltymo. Sprendžiant šią problemą, nanovamzdelių gryninimas atliekamas taikant išsodinimo amonio sulfatu metodiką su nedideliais pakeitimais (žiūrėti 2.2.18 skyrelį).

Remiantis literatūros duomenimis, bakteriofagų sutrauktos konformacijos uodegėlės apvalkalas ir šią jo struktūrą atitinkantys rekombinantinio uodegėlės apvalkalo baltymo formuojami poliapvalkalai –

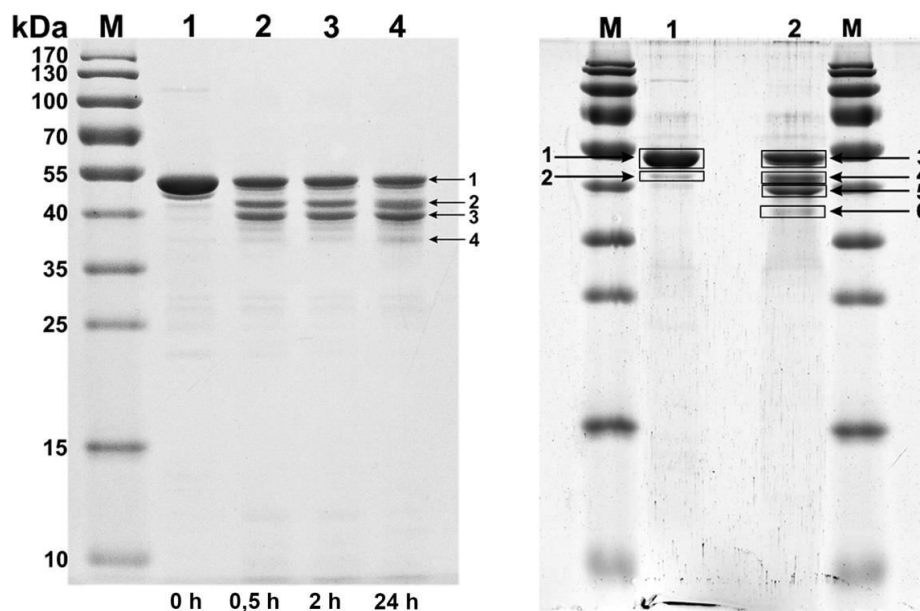
įvairiems fiziniams ir cheminiams veiksniams ypatingai atsparios struktūros (žiūrėti 1.4 skyrelį). Siekiant įvertinti FV3 uodegėlės apvalkalo baltymų formuojamų nanovamzdelių savybes, atlikti jų stabilumo tyrimai. Remiantis TEM analizės rezultatais, nustatyta, kad daugiau nei metus laiko buferiniame tirpale 4 °C temperatūroje laikytų gp053 nanovamzdelių struktūra išliko nepakitusi. Struktūriniai pokyčiai nebuvo pastebimi ir atlikus analizę mėginių, inkubuotų 16 val. su tripsinu (0,02 mg/ml) ar 8 M karbamido tirpale, taip pat laikytų 30 min. verdančiame vandenyje (3.13 paveikslas). Remiantis šiais rezultatais, galime teigti, kad bakteriofago FV3 gp053 formuojami nanovamzdeliai yra ypač stabilios ir įvairiems veiksniams atsparios struktūros.



3.13 pav. FV3 gp053 formuojamų nanostruktūrų TEM analizė. Mėginiai laikyti: (A) metus laiko TE buferyje 4 °C temperatūroje; (B) 16 val. su tripsinu (0,02 mg/ml); (C) 16 val. 8 M karbamido tirpale; (D) 30 min. verdančiame vandenyje.

Kita vertus, nors TEM nuotraukose matyti, kad po inkubacijos su tripsinu gp053 nanovamzdelių forma išlieka stabili, SDS-PAGE analizės rezultatai rodo, kad dalis šias struktūras sudarančių baltymų visgi yra suskaldomi (3.14 pav.). Praėjus pusvalandžiui nuo inkubacijos pradžios, natyvaus gp053 (~50 kDa) kiekis gerokai sumažėja, atsiranda mažesnės

molekulinės masės baltymų (~43, ~39 ir ~37 kDa). Įdomu tai, kad šių, po inkubacijos su tripsinu SDS-PAGE stebimų, baltymų kiekis, vykdant reakciją ilgesnį laiką, faktiškai nebesikeičia. Atlikus gp053 pirminės struktūros analizę, šio baltymo sekoje nustatytos 22 tripsino atpažinimo vietos. Tuo tarpu SDS-PAGE ir TEM analizės rezultatai rodo, kad vamzdelį sudarantys gp053 šioje struktūroje išsidėsto taip, kad egzistuoja tik nedidelis skaičius tripsinui „lengvai pasiekiamų“ taikinių. Be to, net ir hidrolizavus atitinkamas aminorūgštis, dėl itin stiprios vamzdelį sudarančių gp053 tarpusavio sąveikos, vamzdelinė struktūra išlieka stabili (3.13 pav. B).



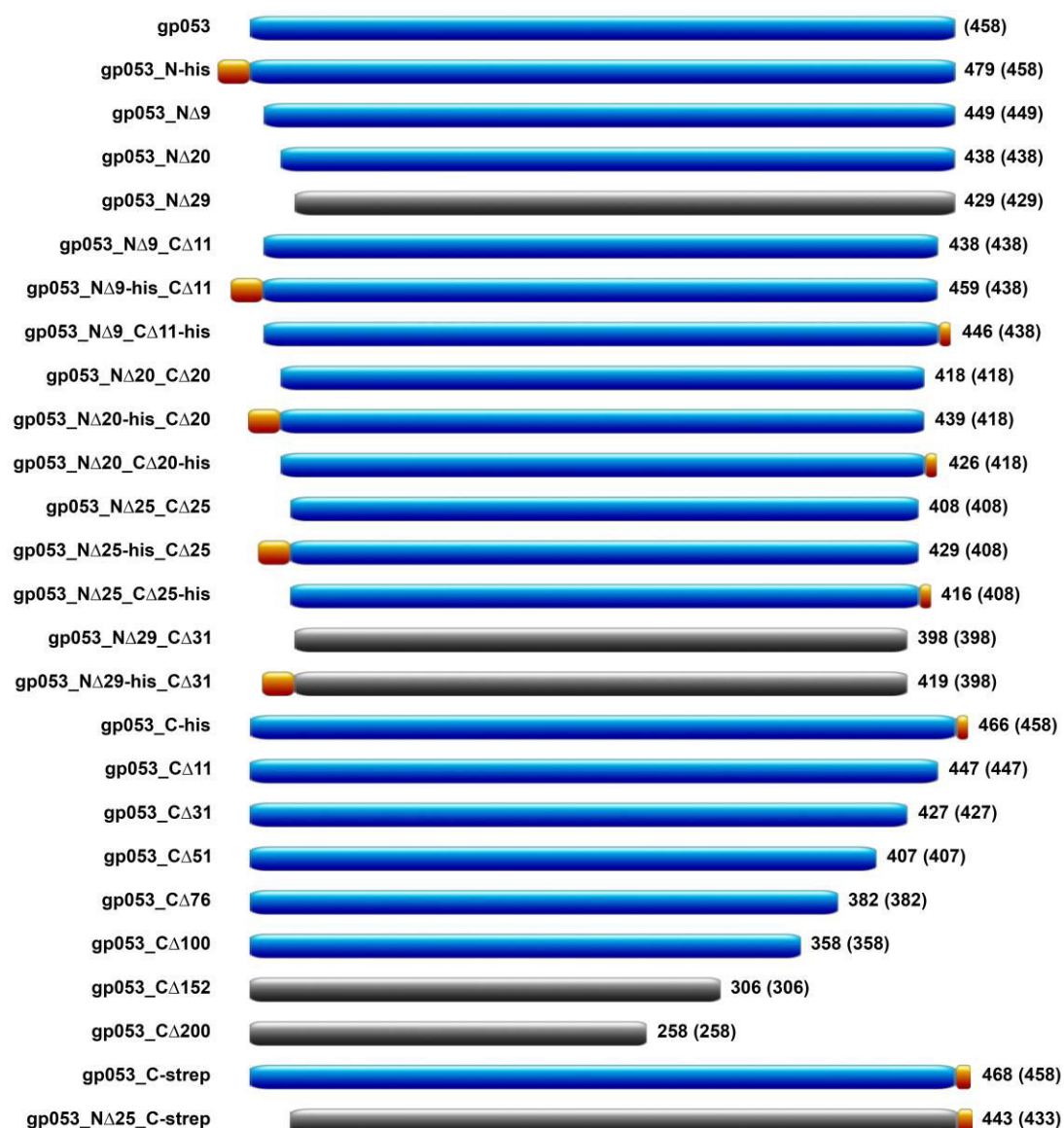
3.14 pav. Išgrynintų FV3 gp053 formuojamų nanostruktūrų, inkubuotų su tripsinu, SDS-PAGE analizė. Kairėje pusėje pavaizduota gp053 fragmentų susidarymo priklausomybė nuo inkubacijos laiko. Takeliai žymi: M – molekulinės masės dydžio standartas Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1 – rekombinantinis gp053, 2–4 rekombinantinis gp053, inkubuotas su tripsinu (0,02 mg/ml). Inkubacijos laikas pažymėtas apačioje. Rodyklės rodo rekombinantinį gp053 (1) ir tripsinolizės metu susidarancius jo fragmentus (2–4). Dešinėje pusėje pavaizduota LC-MS/MS analizės metu tirti gp053 fragmentai (apvesti juodu stačiakampiu). Takeliai žymi: M – molekulinės masės dydžio standartas Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1 – rekombinantinis gp053 (kontrolė); 2– rekombinantinis gp053, 24 valandas inkubuotas su tripsinu (0,02 mg/ml). Rodyklės rodo rekombinantinį gp053 (1,3), kontroliniame tirpale esantį gp053_NΔ86 (2) ir tripsinolizės metu susidarancius gp053 fragmentus: gp053_CΔ41 (2), gp053_CΔ77 (3), gp053_N86_CΔ41 (4).

Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad tripsinolizės metu hidrolizuojamos aminorūgštys galėtų būti vidiniame arba išoriniame gp053 formuojamo vamzdelio paviršiuje esantys proteazių taikiniai. Šių taikinių identifikavimas ypač svarbus konstruojant hibridinius baltymus su tikslinėmis vamzdelių vidiniame arba išoriame paviršiuje esančiomis fermentų arba peptidų klonavimo vietomis. Siekiant nustatyti šias tripsino atpažinimo vietas, atlikta prieš ir po inkubavimo su tripsinu gp053 baltymų SDS-PAGE matomų baltymų fragmentų (3.14 pav.) LC-MS/MS analizė. Remiantis šios analizės rezultatais, nustatyta, kad didžioji dauguma išgrynintoje frakcijoje randamų baltymų yra natyvus gp053, tačiau aptikta ir 86 a.r. N-galinę deleciją turinčių gp053 (gp053_N Δ 86) (3.14 pav.). Kadangi pastarųjų baltymų kiekis santykinai mažas, tikėtina, kad tai galėtų būti pavienius žiedelius sudarantys arba vamzdelinių struktūrų galuose esantys baltymai, kurių N-galinės sekos tampa „lengviau prieinamomis“ tirpale baltymų gryninimo metu galinčioms atsirasti įvairioms proteazėms (į išgrynintų baltymų suspensiją proteazių slopiklių nebuvo dėta). Tuo tarpu po inkubacijos su tripsinu SDS-PAGE intensyviausias juostas formuojančių baltymų LC-MS/MS analizės metu identifikuotas ne tik natyvus gp053, bet ir gp053, turintis 41 ir 77 a.r. C-galines delecijas (gp053_C Δ 41 ir gp053_C Δ 77), taip pat gp053, neturintis 86 N-galinių ir 77 C-galinių a.r. (gp053_N86_C Δ 41). Šie rezultatai rodo, kad tripsinas atpažįsta ir suardo gp053 peptidinį ryšį tarp Lys381–Asn382 ir Arg417–Val418. Remiantis šiais duomenimis, tikėtina, kad šios aminorūgštys yra išsidėsčiusios vamzdelių vidiniame arba išoriniame paviršiuje, todėl yra potencialūs taikiniai konstruojant tikslinias klonavimo vietas svetimų aminorūgščių įvedimui.

3.3.3 gp053 delecinių mutantų tyrimai

Konstruojant hibridines nanostruktūras, svarbu žinoti, kurios aminorūgštys yra esminės baltymo polimerizacijos procesui, t.y. kurias iš aminorūgščių pašalinus ar pakeitus svetimomis, vis dar susiformuoja tvarkingos savitvarkės struktūros. Šio darbo metu, siekiant gauti bakteriofago

FV3 uodegėlės apvalkalo baltymo pagrindu sukurtas nanostruktūras, nuspręsta iširti, kokią įtaką baltymo polimerizacijos procesui turi tam tikrų aminorūgščių pašalinimas. Šiuo tikslu buvo sukonstruota grupė gp053 mutantų, turinčių N- ir C-galinių aminorūgščių delecijas (3.15 pav., 3.1 lentelė).



3.15 pav. Delecinių gp053 mutantų polimerizacijos analizė. Mėlyna spalva žymi tvarkingas savitvarkes vamzdelines struktūras formuojančius mutantinius baltymus (įskaitant natyvų gp053). Juoda – netirpius arba tirpius, bet tvarkingų struktūrų neformuojančius baltymus. Oranžine spalva pažymėti histidino inkarai. Žalia – streptavidino inkarai. Mutantų pavadinimas sudarytas remiantis N- arba C-galinių a.r. delecijų skaičiumi bei histidino arba streptavidino inkaro ekspozicija baltymo N- arba C-gale. Dešinėje pateikiamas baltymų sudarančių a.r. skaičius, skliausteliuose pažymėtas natyvaus gp053 nepakeistų a.r. skaičius.

3.1 lentelė. gp053 deleciniai mutantai ir jų formuojamų nanostruktūrų esminės charakteristikos. Baltymo pavadinime naudojami simboliai žymi: Δ – aminorūgščių delecija (simboliai N arba C nurodo baltymo galą, kuriame yra delecija, skaičius – pašalintų aminorūgščių kiekį); his – histidino inkaras; strep – streptavidino inkaras.

Baltymas	PGR fragmento pagausinimui naudoti pradmenys	Ekspresijos vektorius	Baltymo formuojamų struktūrų morfologija
Natyvus gp053	FV53_NdeI_F1 FV53_BamHI_R1	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 1000 nm (daugumos ilgis nuo 500 iki 800 nm) skersmuo 27,8±2,7 nm
gp053_N-his	FV53_NdeI_F1 FV53_BamHI_R1	pET-16b	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 300 nm (daugumos ilgis nuo 50 iki 200 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_C-his	FV53_NdeI_F1 FV53_XhoI_R1	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 1000 nm (daugumos ilgis nuo 300 iki 500 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_NΔ9	FV53_Nde10F FV53_BamHI_R1	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 600 nm (daugumos ilgis nuo 200 iki 300 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_CΔ11	FV53_NdeI_F1 FV53_Bam10R	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 600 nm (daugumos ilgis nuo 200 iki 300 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_NΔ9_CΔ11	FV53_Nde10F FV53_Bam10R	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 500 nm (daugumos ilgis nuo 100 iki 300 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_NΔ9-his_CΔ11	FV53_Nde10F FV53_Bam10R	pET-16b	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 800 nm (daugumos ilgis nuo 200 iki 400 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_NΔ9_CΔ11-his	FV53_Nde10F FV53_Xho10R	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 800 nm (daugumos ilgis nuo 200 iki 400 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_NΔ20	FV53_Nde20F FV53_BamHI_R1	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 500 nm (daugumos ilgis nuo 100 iki 300 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_NΔ20_CΔ20	FV53_Nde20F FV53_Bam20RN	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 600 nm (daugumos ilgis nuo 200 iki 400 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_NΔ20-his_CΔ20	FV53_Nde20F FV53_Bam20RN	pET-16b	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 1000 nm (daugumos ilgis nuo 400 iki 600 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_NΔ20_CΔ20-his	FV53_Nde20F FV53_Xho20R	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 1000 nm (daugumos ilgis nuo 400 iki 600 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_NΔ25_CΔ25	FV53_Nde25F FV53_Bam25R	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 800 nm (daugumos ilgis nuo 300 iki 600 nm) skersmuo ~28 nm

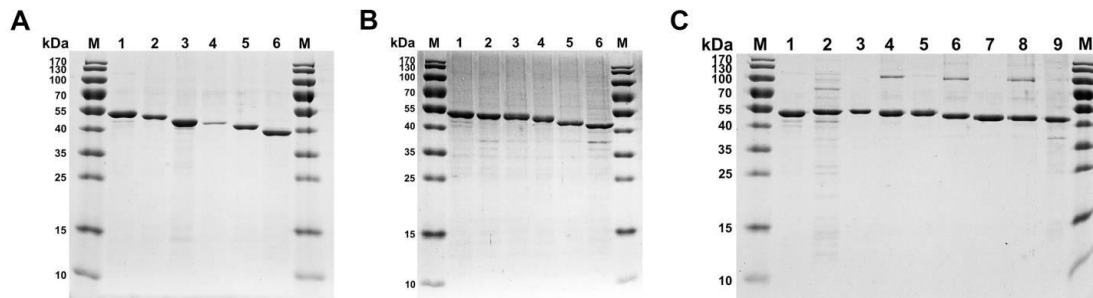
3.1 lentelės tęsinys kitame puslapyje

3.1 lentelės tęsinys

gp053_NΔ25-his_CΔ25	FV53_Nde25F FV53_Bam25R	pET-16b	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 800 nm (daugumos ilgis nuo 300 iki 500 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_NΔ25_CΔ25-his	FV53_Nde25F FV53_Xho25R	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 800 nm (daugumos ilgis nuo 300 iki 500 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_NΔ29	FV53_Nde30F FV53_BamHI_R1	pET-21a	Tirpūs, tačiau tvarkingų nanostruktūrų neformuojantys baltymai.
gp053_NΔ29_CΔ31	FV53_Nde30F FV53_Bam30R	pET-21a	Tirpūs, tačiau tvarkingų nanostruktūrų neformuojantys baltymai.
gp053_NΔ29-his_CΔ31	FV53_Nde30F FV53_Bam30R	pET-16b	Netirpus baltymas
gp053_CΔ31	FV53_NdeI_F1 FV53_Bam30R	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 600 nm (daugumos ilgis nuo 200 iki 300 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_CΔ51	FV53_NdeI_F1 FV53_Bam50R	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 600 nm (daugumos ilgis nuo 200 iki 300 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_CΔ76	FV53_NdeI_F1 FV53_Bam75R	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 600 nm (daugumos ilgis nuo 200 iki 300 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_CΔ100	FV53_NdeI_F1 FV53_Bam100R	pET-21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 2000 nm (daugumos ilgis nuo 500 iki 1000 nm) skersmuo ~32 nm
gp053_CΔ152	FV53_NdeI_F1 FV53_Bam150R	pET-21a	Tirpūs, tačiau tvarkingų nanostruktūrų neformuojantys baltymai.
gp053_CΔ200	FV53_NdeI_F1 FV53_Bam200R	pET-21a	Tirpūs, tačiau tvarkingų nanostruktūrų neformuojantys baltymai.
gp053_C-strep	FV53_NdeI_F1 Pfl23Strep	pET21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 500 nm (daugumos ilgis nuo 150 iki 300 nm) skersmuo ~28 nm
gp053_NΔ25_C-strep	FV53_NdeI_F1 Pfl23Strep	pET21a	Netirpus baltymas

Mutantinių gp053 ilgis sudarė nuo 98,0 % (gp053_NΔ9) iki 43,7 % (gp053_CΔ200) natyvaus rekombinantinio gp053 ilgio. Genų raiškavykdyta *E. coli* BL21-DE3 ląstelėse tomis pačiomis sąlygomis, kaip ir natyvaus gp053 atveju. TEM analizės metu nustatė, kad aminorūgščių pašalinimas baltymo polimerizacijai įtakos neturi, buvo atliekamas baltymų gryninimas išsodinant amonio sulfatu (2.2.18 skyrelis). Išgrynintų delecinių gp053 mutantų SDS-

PAGE nuotrauka pateikiama 3.16 paveiksle, TEM analizės rezultatai – 3.17 ir 3.18 paveiksluose.

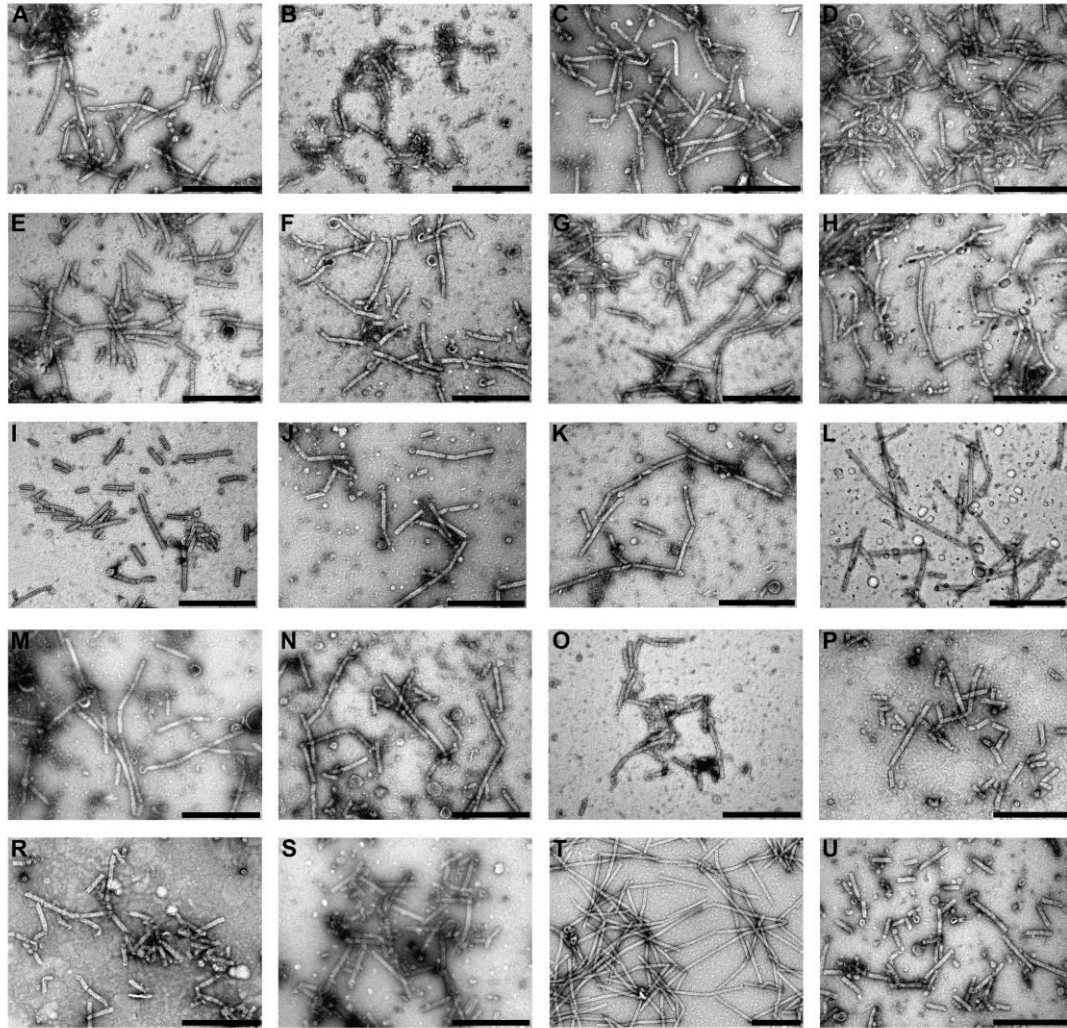


3.16 pav. Išgrynintų gp053 delecinių mutantų, formuojančių savitvarkes vamzdelines struktūras, SDS-PAGE analizė. (A) C-galinių a.r. delecijas turintys mutantai: gp053 (1); gp053_CΔ11 (2); gp053_CΔ31 (3); gp053_CΔ51 (4); gp053_CΔ76 (5); gp053_CΔ100 (6). **(B)** N-galinių bei N- ir C-galinių a.r. delecijas turintys mutantai: gp053 (1); gp053_NΔ9 (2); gp053_NΔ20 (3); gp053_NΔ9_CΔ11 (4); gp053_NΔ20_CΔ20 (5); gp053_NΔ25_CΔ25 (6). **(C)** N-galinių, C-galinių bei N- ir C-galinių a.r. delecijas bei N- arba C-galinius his-inkarus turintys mutantai: gp053 (1); gp053_N-his (2); gp053_C-his (3); gp053_NΔ9-his_CΔ11 (4); gp053_NΔ9_CΔ11-his (5); gp053_NΔ20-his_CΔ20 (6); gp053_NΔ20_CΔ20-his (7); gp053_NΔ25-his_CΔ25 (8); gp053_NΔ25_CΔ25-his (9). M – molekulinės masės dydžio standartas Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

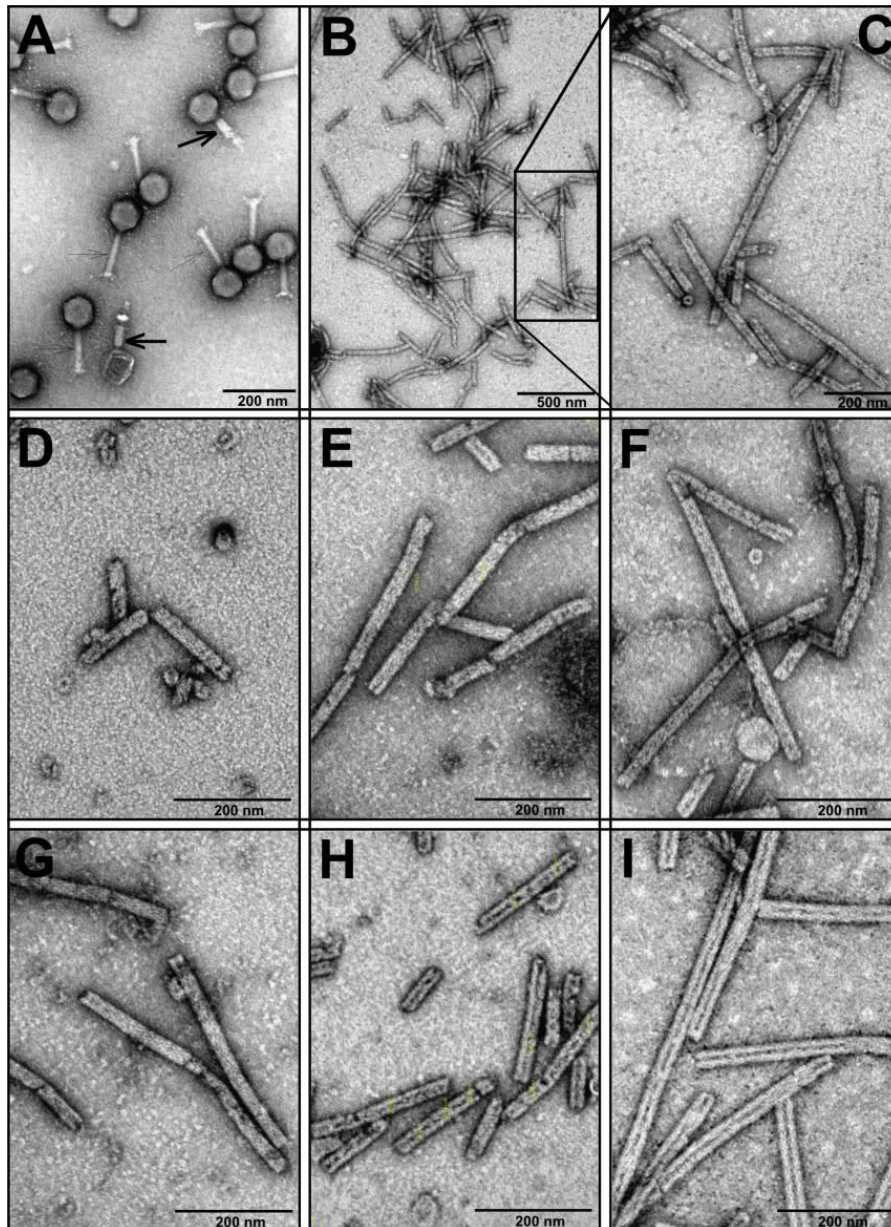
Atlikus N-galinių aminorūgščių delecijas turinčių gp053 mutantų formuojamų nanostruktūrų TEM analizę, nustatyta, kad 9 (gp053_NΔ9) ar 20 (gp053_NΔ20) a.r. pašalinimas nuo baltymo N-galo, gp053 mutantų polimerizacinių savybių nekeičia (3.17 pav. D ir I). Tvarkingos nanostruktūros buvo stebimos ir atlikus 25 a.r. N- ir C-galines delecijas turinčių mutantų (gp053_NΔ25_CΔ25, 3.17 pav. M), taip pat 25 a.r. N- ir C-galines delecijas turinčių mutantų su N- (gp053_NΔ25-his_CΔ25) arba C-galuose (gp053_NΔ25_CΔ25-his) eksponuojamais histidino inkarais, TEM analizę (3.17 pav. M, N, O). Tik pašalinus 29 a.r. nuo gp053 N-galo buvo gauti tirpūs, tačiau tvarkingų nanostruktūrų neformuojantys (gp053_NΔ29, gp053_NΔ29_CΔ31) arba netirpūs (gp053_NΔ29-his_CΔ31) baltymai (3.15 pav., 3.1 lentelė). Kita vertus, nustatyta, kad gp053 C-gale eksponuojant streptavidino inkarą, net ir 25 a.r. pašalinimas nuo baltymo N-galo (gp053_NΔ25_C-strep) lemia esminius gp053 tretinės struktūros pokyčius –

baltymas tampa netirpus (3.15 pav., 3.1 lentelė). Remiantis šiais rezultatais, galime teigti, kad gp053 polimerizavimuisi svarbus ne tik pašalintų N-galinių a.r. skaičius, bet ir baltymo C-gale eksponuojamos aminorūgštys.

Tiriant C-galinių a.r įtaką baltymo polimerizacijos procesams, nustatyta, kad gp053 mutantai, turintys C-galines 11 (gp053_CΔ11), 31 (gp053_CΔ31), 51 (gp053_CΔ51), 76 (gp053_CΔ76) ir net 100 (gp053_CΔ100) a.r. delecijas, susirenka į tvarkingas, stabilias nanostruktūras (3.17 pav. E, P, R, S, T) ir tik pašalinus 152 a.r. (gp053_CΔ152), gautas tirpus, tačiau nesipolimerizuojantis baltymas (3.15 pav., 3.1 lentelė). Šie rezultatai patvirtina darbų su bakteriofago T4 uodegėlės apvalkalo baltymo (gp18) mutantais duomenis, kad baltymo C-galinių aminorūgščių delecijos turi mažiau įtakos polimerizacijos procesui nei aminorūgščių panaikinimas iš baltymo N-galo (Kuznetsova et al., 1998; Poglazov et al., 1999; Efimov et al., 2002).



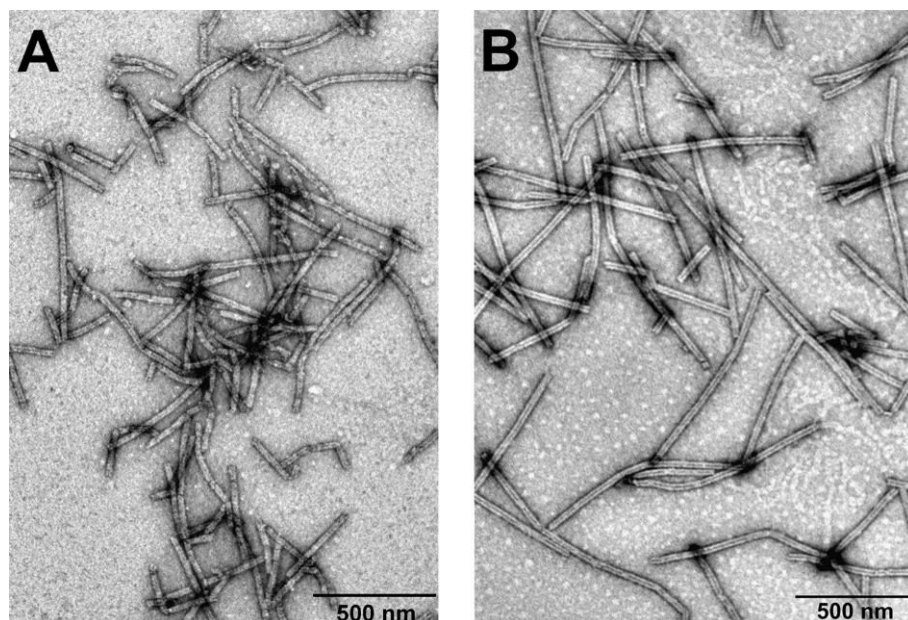
3.17 pav. Bakteriofago FV3 rekombinantinio uodegėlės apvalkalo baltymo (gp053) bei jo delecinių mutantų formuojamų nanostruktūrų TEM analizė. Simboliai A–U žymi nanostruktūras, formuojamas rekombinantinių baltymų: (A) gp053; (B) gp053_N-his; (C) gp053_C-his; (D) gp053_NΔ9; (E) gp053_CΔ11; (F) gp053_NΔ9_CΔ11; (G) gp053_NΔ9-his_CΔ11; (H) gp053_NΔ9_CΔ11-his; (I) gp053_NΔ20; (J) gp053_NΔ20_CΔ20; (K) gp053_NΔ20-his_CΔ20; (L) gp053_NΔ20_CΔ20-his; (M) gp053_NΔ25_CΔ25; (N) gp053_NΔ25-his_CΔ25; (O) gp053_NΔ25_CΔ25-his; (P) gp053_CΔ31; (R) gp053_CΔ51; (S) gp053_CΔ76; (T) gp053_CΔ100 (išgryninti baltymai); (U) gp053_C-strep. Mastelio dydis – 200 nm.



3.18 pav. Bakteriofago FV3 rekombinantinio uodegėlės apvalkalo baltymo (gp053) bei jo delecinių mutantų formuojamų nanostruktūrų TEM analizė. (A) FV3 virionai (rodyklės žymi sutrauktos konformacijos uodegėlės apvalkalą); **(B–I)** nanostruktūros, formuojamos rekombinantinių baltymų: **(B)** gp053; **(C)** gp053 (padidintas vaizdas); **(D)** gp053_N-his; **(E)** gp053_C-his; **(F)** gp053_N Δ 9-his_C Δ 11; **(G)** gp053_N Δ 25-his_C Δ 25; **(H)** gp053_N Δ 20; **(I)** gp053_C Δ 100.

Remiantis literatūros duomenimis, T4 gp18 C Δ 58, C Δ 129, C Δ 152, C Δ 172 ir C Δ 248 mutantai susirenka į plonesnes (lyginant su formuojamomis natyvaus gp18) vamzdelines struktūras, vadinamas „nesusitraukiančiais poliapvalkalais“ (*angl.* „noncontracted polysheaths“ (NCP)) (Poglazov et al, 1999). Šie vamzdeliai, manoma, atitinka pereinamąjį uodegėlės apvalkalo

būseną, susidarančią uodegėlės susitraukimo metu (Moody et al., 1973). Tuo tarpu atlikus FV3 mutantinių gp053 mėginių TEM analizę, mažesnio diametro nei natyvaus gp053 formuojamų vamzdelių, nustatyta nebuvo (3.18 pav., 3.1 lentelė). Netgi priešingai, gp053_Δ100 formuojamų nanostruktūrų diametras didesnis ($\sim 32,47 \pm 1,7$ nm) (3.18 pav. I, 3.1 lentelė) lyginant su natyvaus gp53 struktūrų diametru ($27,83 \pm 2,69$ nm). Be to, gp053_Δ100 formuojami vamzdeliai ypač ilgi, kai kurių jų ilgis siekia net iki 2000 nm (3.19 pav. B). Literatūroje duomenų apie tokias bakteriofagų rekombinantinių uodegėlės apvalkalo delecinių mutantų formuojamas struktūras iki šiol, mūsų duomenimis, nebuvo skelbta. Dėl šios priežasties gp053_Δ100 formuojamų nanostruktūrų tyrimai svarbūs ne tik konstruojant gp053 pagrindu paremtus, savaimė susirenkančius hibridinius baltymus, bet ir gilinant mokslines žinias apie bakteriofagų uodegėlės apvalkalo ar į šias struktūras itin panašių, daugelyje prokariotų aptinkamų susitraukiančių struktūrų (R-tipo piocinų, T6SS ar PLTS) sandarą ir polimerizacines savybes.



3.19 pav. FV3 rekombinantinio gp053 (A) bei jo delecinio mutanto gp053_Δ100 (B) formuojamų nanostruktūrų TEM analizė.

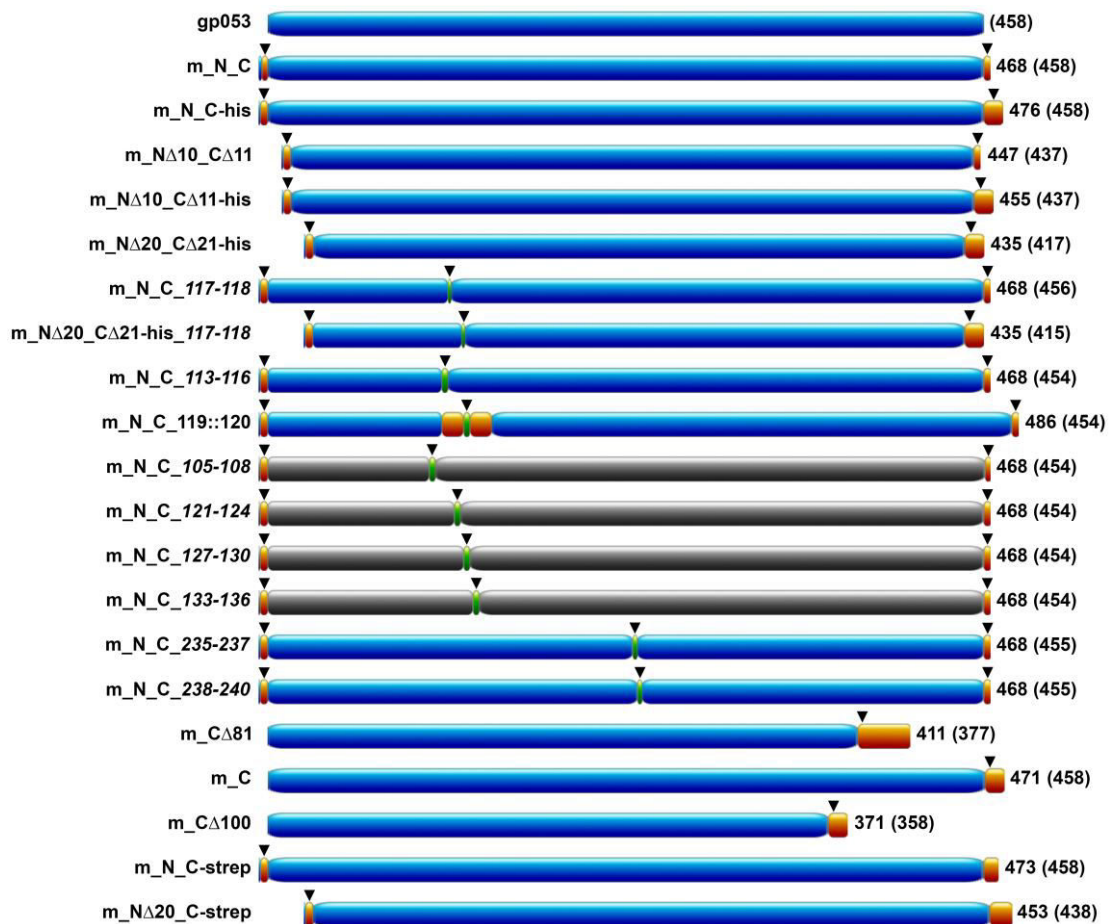
gp053_Δ100 formuojamų nanostruktūrų TEM analizės metu taip pat pastebėta, kad šio mutantinio baltymo TEM nuotraukose matyti ryškiau

išreikšta vidinė vamzdelio dalis (3.18 pav. I). Panaši ir gp053_NΔ20 (3.18 pav. H), m_CΔ81 (3.24 pav. C), netgi to paties natyvaus gp053, tik ilgą laiką laikyto TE buferiniame tirpale ar po inkubacijos su tripsinu (3.13 pav. A, B), formuojamų struktūrų morfologija. Vamzdeliai su ryškiai matomu vidiniu kanalu aprašyti ir *Pseudomonas aeruginosa* fago phiKZ rekombinantinio uodegėlės apvalkalo baltymo (gp029) atveju (Kurochkina et al., 2009), o autoriai šią morfologiją sieja su mažiau kompaktišku uodegėlės apvalkalo baltymų išsidėstymu ir dėl to galimo intensyvesnio dažų patekimo į vidinę vamzdelio dalį. Tikėtina, kad dėl šios priežasties skirtingas vamzdelių „nusidažymas“ stebimas ir gp053 ar jo mutantinių baltymų atvejais.

Apibendrinant gp053 delecinių mutantų tyrimų rezultatus, galima teigti, kad baltymo C-galinių aminorūgščių delecijos turi mažiau įtakos polimerizacijos procesui nei aminorūgščių panaikinimas iš baltymo N-galo. Be to, polimerizavimuisi svarbus ne tik pašalintų N-galinių a.r. skaičius, bet ir baltymo C-gale eksponuojamos aminorūgštys. Taip pat įrodyta, kad net ir pašalinus pakankamai didelį kiekį aminorūgščių, baltymas išlaiko polimerizacines savybes, o kai kuriais atvejais deleciniai mutantai formuoja netgi ilgesnes, tvarkingas savitvarkes struktūras. Dėl šios priežasties gp053 yra potencialus kandidatas konstruojant gp053 pagrindu paremtus hibridinius baltymus.

3.3.4 gp053 mutantų su tikslinėmis klonavimo vietomis tyrimai

Siekiant gauti hibridinius, gp053 pagrindu sukurtus savaime susirenkančias vamzdelines nanostruktūras formuojančius baltymus, visų pirma buvo atliekama gp053 mutantų su tikslinėmis klonavimo vietomis konstravimas ir jų formuojamų struktūrų analizė. Darbo metu sukonstruotų mutantų schematinė polimerizacijos analizė pateikiama 3.20 paveiksle, jų formuojamų struktūrų esminės charakteristikos aprašomos 3.2 lentelėje, o TEM nuotraukose stebimas vaizdas – 3.21 paveiksle.



3.20 pav. FV3 gp053 mutantų su tikslinėmis klonavimo vietomis polimerizacijos analizė. Spalvos žymi: mėlyna – tvarkingas savitvarkės vamzdelines struktūras formuojantys mutantiniai gp053 baltymai (įskaitant natyvų gp053). Juoda – netirpūs arba tvarkingų savitvarkių struktūrų neformuojantys baltymai. Oranžinė – į baltymo seką įterptos papildomos aminorūgštys su tikslinėmis klonavimo vietomis, kurių pozicija baltymo sekoje pažymėta apverstais juodais trikampaiais. Kairėje pusėje pateikiamuose baltymų pavadinimuose simboliai žymi: m – mutantinis gp053; N – baltymo N-gale įvesta tikslinė klonavimo vieta; C – baltymo C-gale įvesta tikslinė klonavimo vieta; Δ – aminorūgščių delecija; :: – natyvaus baltymo aminorūgščių, tarp kurių įterpta tikslinė klonavimo vieta, pozicija; skaičiai, parašyti pasviruoju šriftu, žymi natyvaus baltymo aminorūgščių, kurios pakeistos tikslinę klonavimo vietą sudarančiomis svetimomis a.r., poziciją. Dešinėje pateikiamas baltymą sudarančių a.r. skaičius, skliausteliuose pažymėtas natyvaus gp053 nepakeistų a.r. skaičius.

3.2 lentelė. gp053 mutantai su įterptomis tikslinėmis klonavimo vietomis ir jų formuojamų nanostruktūrų esminės charakteristikos. Baltymo pavadinime simboliai žymi: m – mutantinis gp053; N – baltymo N-gale įvesta tikslinė klonavimo vieta; C – baltymo C-gale įvesta tikslinė klonavimo vieta; Δ – aminorūgščių delecija; :: – natyvaus baltymo aminorūgščių, tarp kurių įterpta tikslinė klonavimo vieta, pozicija; skaičiai, parašyti pasviruoju šriftu, žymi natyvaus baltymo aminorūgščių, kurios pakeistos tikslinę klonavimo vietą sudarančiomis svetimomis a.r., poziciją.

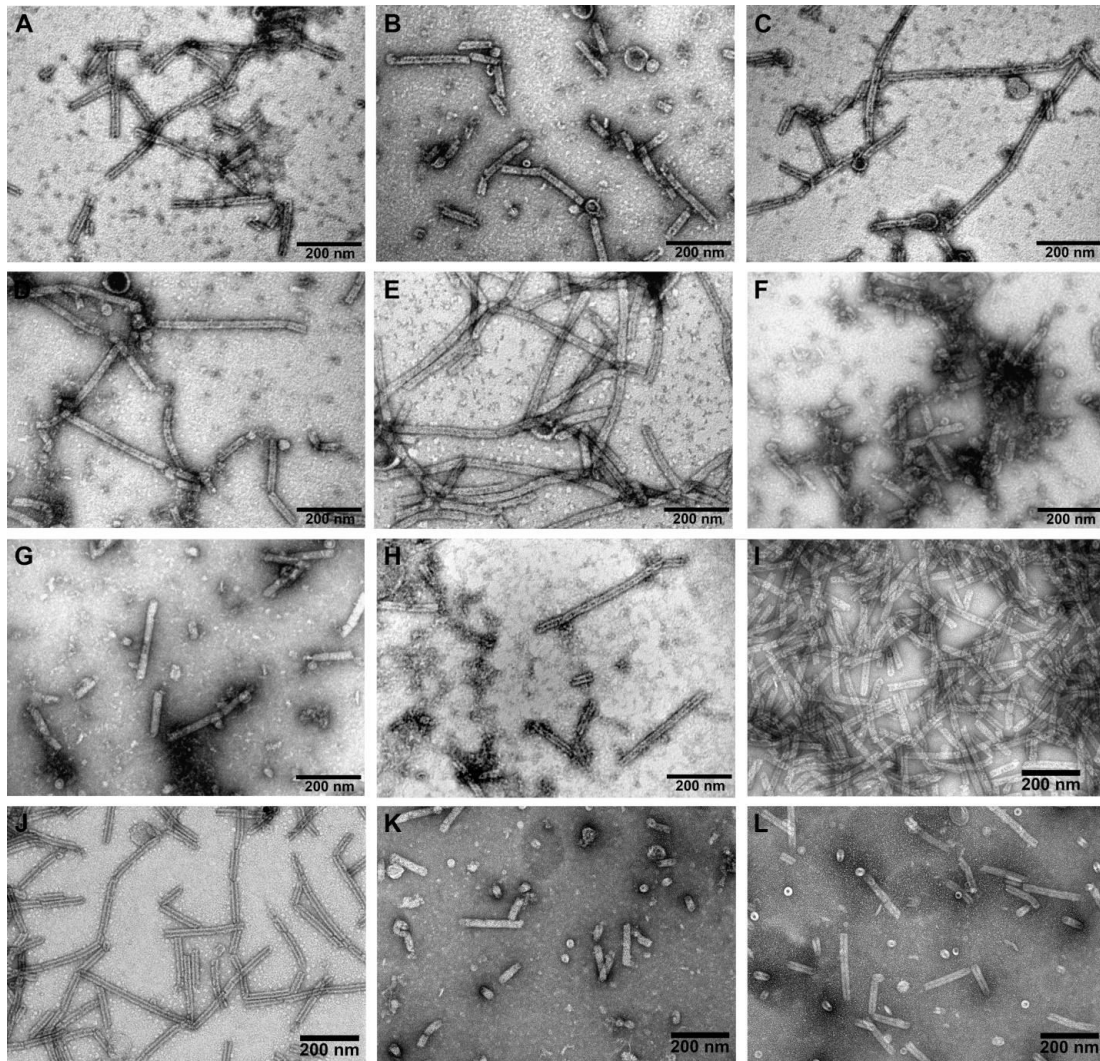
Baltymas	PGR fragmento pagausinimui naudoti pradmenys	Ekspresijos vektorius	Baltymo formuojamų struktūrų morfologija
m_N_C	PilnasMaF PilnasMaR	pET21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 500 nm (daugumos ilgis nuo 150 iki 300 nm), skersmuo ~28 nm
m_N_C- his	PilnasMaF PilnasMaRH	pET21b	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 500 nm (daugumos ilgis nuo 100 iki 300 nm), skersmuo ~28 nm
m_NΔ10 _CA11	10MaF 10MaR	pET21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 800 nm (daugumos ilgis nuo 300 iki 500 nm), skersmuo ~28 nm
m_NΔ10 _CA11- his	10MaF 10MaRH	pET21b	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 600 nm (daugumos ilgis nuo 200 iki 300 nm), skersmuo ~28 nm
m_NΔ20 _CA21- his	20MaF 20MaRH	pET21b	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 1000 nm (daugumos ilgis nuo 400 iki 600 nm), skersmuo ~28 nm
m_N_C_ 117-118	PilnasMaF–SmaBamR; SmaBamF–PilnasMaR	pET21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 200 nm (daugumos ilgis nuo 50 iki 150 nm), skersmuo ~28 nm
m_NΔ20 _CA21- his_117- 118	20MaF–SmaBamR; SmaBamF–20MaRH	pET21b	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 250 nm (daugumos ilgis nuo 50 iki 150 nm), skersmuo ~28 nm
m_N_C_ 113-116	T7prom–SBv2BamR; SBv2SmaF–T7term	pET21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 400 nm (daugumos ilgis nuo 150 iki 250 nm), skersmuo ~28 nm
m_N_C_ 119::120	T7prom–SBv3BamR; SBv3SmaF–T7term	pET21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 400 nm (daugumos ilgis nuo 150 iki 250 nm), skersmuo ~28 nm
m_N_C_ 105-108	T7prom–SBv4BamR; SBv4SmaF–T7term	pET21a	Baltymas netirpus

3.2 lentelės tęsinys kitame puslapyje

3.2 lentelės tęsinys

m_N_C_ 121-124	T7prom-SBv5BamR; SBv5SmaF-T7term	pET21a	Baltymas netirpus
m_N_C_ 121-124	T7prom-SBv6BamR; SBv6SmaF-T7term	pET21a	Baltymas netirpus
m_N_C_ 133-136	T7prom-SBv7BamR; SBv7SmaF-T7term	pET21a	Baltymas netirpus
m_N_C_ 235-237	T7prom-Kilpa239R; Kilpa239F-T7term	pET21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 250 nm (daugumos ilgis nuo 50 iki 150 nm), skersmuo ~28 nm
m_N_C_ 238-240	T7prom-Kilpa2392R; Kilpa2392F-T7term	pET21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 250 nm (daugumos ilgis nuo 50 iki 150 nm), skersmuo ~28 nm
m_CΔ81	FV53_NdeI_F1-FV3 Sma75R	pET21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 500 nm (daugumos ilgis nuo 200 iki 300 nm), skersmuo ~28 nm
m_C	FV53_NdeI_F1-FV3 Gly_Xho	pET21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 250 nm (daugumos ilgis nuo 50 iki 150 nm), skersmuo ~28 nm
m_CΔ10 0	FV53_NdeI_F1-100C Gly_Xho	pET21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 300 nm (daugumos ilgis nuo 100 iki 200 nm), skersmuo ~28 nm
m_N_C- strep	PilnasMaF Pfl23Strep	pET21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 700 nm (daugumos ilgis nuo 200 iki 300 nm), skersmuo ~28 nm
m_NΔ20 _C-strep	20MaF Pfl23Strep	pET21a	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 500 nm (daugumos ilgis nuo 200 iki 300 nm), skersmuo ~28 nm

Konstruojant gp053 mutantus su tikslinėmis klonavimo vietomis buvo atsižvelgiama į delecinių gp053 mutantų formuojamų nanostruktūrų TEM analizės rezultatus, taip pat remiamasi bioinformatinės analizės duomenimis. Papildomos aminorūgštys su tikslinėmis klonavimo vietomis buvo įterptos į natyvaus arba mutantinio gp053 N- arba C-galus, kurie, remiantis literatūros duomenimis ir bioinformatiniu modeliu, taip pat darbo metu gautais rezultatais, yra išsidėstę vamzdelio vidinėje dalyje. Taip pat gauti gp053 mutantai su pakeistomis arba įterptomis aminorūgštimis baltymo srityse, kurios, remiantis literatūros duomenimis ir bioinformatine analize, baltymams susipolimerizavus, atsiduria vamzdelio išoriniame paviršiuje.



3.21 pav. FV3 gp053 mutantų su tikslinėmis klonavimo vietomis formuojamų nanostruktūrų TEM analizė. Simboliai žymi nanostruktūras, formuojamas mutantinių baltymų: (A) m_N_C; (B) m_N_C-his; (C) m_N Δ 10_CA11; (D) m_N Δ 10_CA11-his; (E) m_N Δ 20_CA21-his; (F) m_N_C_117-118; (G) m_N Δ 20_CA21-his_117-118; (H) m_N_C_113-116; (I) m_N_C_119::120; (J) m_CA81; (K) m_C; (L) m_CA100.

Nustatyta, kad papildomų penkių aminorūgščių įterpimas į natyvaus gp053 N- ir C-galus (m_N_C) lemia trumpesnių, iki 500 nm ilgio, nanostruktūrų (3.2 lentelė, 3.21 pav. A) susidarymą lyginant su natyvaus gp053 formuojamomis struktūromis (3.19 pav. A). Trumpesnės, iki 500 nm ilgio, struktūros (3.2 lentelė, 3.21 pav. B) nustatytos ir įterpus tas pačias aminorūgštis į C-histidino inkarą turinčio natyvaus gp053 N- ir C-galus (m_N_C-his) lyginant su natyvaus C- histidino inkarą turinčio gp053 formuojamomis struktūromis (3.17 pav. C). Tvarkingos, tačiau dar trumpesnės (iki 250 nm ilgio) struktūros susirenka ir į natyvaus gp053 C-galą įterpus

papildomas 34 aminorūgštis su jose esančia peptidų klonavimo vieta (hibridinis baltymas m_C) (3.2 lentelė, 3.21 pav. K). Kita vertus, papildomų penkių a.r. įterpimas į 10 N- ir 11 C-galines delecijas turinčių baltymų N- ir C-galus (m_N Δ 10_C Δ 11 ir m_N Δ 10_C Δ 11-his) tvarkingos struktūros ilgų nanovamzdelių susidarymui įtakos turi mažiau (3.2 lentelė, 3.21 pav. C, D). Dar ilgesni (iki 1000 nm) vamzdeliai stebėti įterpus tas pačias aminorūgštis į gp053_N Δ 20_C Δ 21-his N- ir C-galus (m_N Δ 20_C Δ 21-his) (3.2 lentelė, 3.21 pav. D). Tvarkingus, iki 500 nm ilgio, vamzdelius formuoja ir svetimasis 34 a.r. su įterpta klonavimo vieta C-gale turintis delecinis mutantas m_C Δ 81 (3.2 lentelė, 3.21 pav. J). Tuo tarpu 100 a.r. C-galinę deleciją ir C-gale įterptas papildomas 13 a.r. turinčio mutanto m_C Δ 100 vamzdelių ilgis tesiekia 300 nm (3.2 lentelė, 3.21 pav. L) lyginant su delecinio mutanto gp053_C Δ 100 formuojamomis itin ilgomis struktūromis (3.19 pav. B).

Dar didesnę įtaką gp053 polimerizavimuisi turi baltymo aminorūgščių, esančių baltymo viduriniojoje dalyje, pakeitimas svetimomis a.r. Keturi gp053 mutantiniai baltymai (m_N_C_105-108, m_N_C_121-124, m_N_C_127-130 ir m_N_C_133-136) su pakeistomis keturiomis aminorūgštimis atitinkamose pozicijose, yra netirpūs (3.2 lentelė, 3.20 paveikslas). Mutantiniai baltymai m_N_C_117-118, m_N Δ 20_C Δ 21-his_117-118 ir m_N_C_113-116 formuoja taisyklingos struktūros, tačiau trumpesnes vamzdelines struktūras, kurių ilgis atitinkamai siekia iki 200 nm, 250 nm ir 400 nm (3.2 lentelė, 3.21 pav. F, G, H). Sukonstravus gp053 mutantą m_N_C_119::120 su įterptomis papildomomis 18 a.r. į natyvaus baltymo seką tarp 119 ir 120 pozicijoje esančių aminorūgščių ir atlikus jo formuojamų struktūrų TEM analizę, nustatyta, kad šis mutantas taip pat formuoja tvarkingus, iki 400 nm ilgio nanovamzdelius (3.2 lentelė, 3.21 pav. I). Šie ir dalis kitų minėtųjų mutantinių gp053 baltymų pasirinkti tolimesniems tyrimams, kurių metu, konstruojant hibridinius baltymus, į įterptas tikslines klonavimo vietas buvo klonuoti sidabro ir/arba titano oksido jonus surišantys peptidai (žr. 3.3.5 skyrių).

3.3.5 gp053 pagrindu sukurtų hibridinių baltymų tyrimai

FV3 gp053 mutantinių baltymų pagrindu sukurti hibridiniai baltymai buvo konstruojami atsižvelgiant į gp053 mutantų su tikslinėmis klonavimo vietomis formuojamų struktūrų TEM analizės rezultatus, taip pat siekiant gauti abeiose vamzdelio pusėse (tiek vidinėje, tiek išorinėje) eksponuojamus peptidus. Tyrimams pasirinkti sidabro jonus bei titano oksidą surišantys peptidai, kurių ilgis keturios (AgE4), šešios (AgD6, AgE6) arba šešiolika aminorūgščių (TiO₂). Peptidai buvo gaunami vykdant oligonukleotidinių pradmenų ligavimo reakciją. Darbo metu sukonstruotų gp053 mutantų su įterptais peptidais schematinis vaizdas pateikiamas 3.22 paveiksle, formuojamų struktūrų esminės charakteristikos pateikiamos 3.3 lentelėje, TEM analizės rezultatai – 3.23 ir 3.24 paveiksluose.



3.22 pav. FV3 gp053 pagrindu sukurtų hibridinių baltymų polimerizacijos analizė. Spalvos žymi: mėlyna – savitvarkes vamzdelines struktūras formuojantys mutantiniai gp053 baltymai (įskaitant natyvų gp053). Oranžinė – į baltymo seką įterptos papildomos aminorūgštys, su tikslinėmis klonavimo vietomis. Pilka – tikslinėse klonavimo vietose įklonuoti peptidai, kurių pavadinimai pateikiami tikslinių klonavimo vietų viršuje. Kairėje pusėje pateikiamuose baltymų pavadinimuose simboliai žymi: m – mutantinis gp053; N – baltymo N-gale įvesta tikslinė klonavimo vieta; C – baltymo C-gale įvesta tikslinė klonavimo vieta; Šalia tikslinių klonavimo vietų nurodytas įklonuoto peptido pavadinimas; Δ – aminorūgščių delecija; :: – natyvaus baltymo aminorūgščių, tarp kurių įterpta tikslinė klonavimo vieta, pozicija; Dešinėje pateikiamas baltymą sudarančių a.r. skaičius, skliausteliuose pažymėtas natyvaus gp053 nepakeistų a.r. skaičius.

3.3 lentelė. gp053 pagrindu sukurti hibridiniai baltymai ir jų formuojamų nanostruktūrų esminės charakteristikos. Baltymo pavadinime simboliai žymi: m – mutantinis gp053; N – baltymo N-gale įvesta tikslinė klonavimo vieta; C – baltymo C-gale įvesta tikslinė klonavimo vieta; Δ – aminorūgščių delecija; :: – natyvaus baltymo aminorūgščių, tarp kurių įterpta tikslinė klonavimo vieta, pozicija.

Hibridinis baltymas	gp053 mutantinis baltymas, į kurį įterpta peptido seka	Peptidas (peptido gavimui naudoti pradmenys)	Baltymo formuojamų struktūrų morfologija
m_NTi_C	m_N_C	TiO ₂ (Ti1F-Ti1R)	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 200 nm (daugumos ilgis nuo 50 iki 150 nm) skersmuo ~28 nm
m_N_CTi	m_N_C	TiO ₂ (Ti1F-Ti1R)	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 400 nm (daugumos ilgis nuo 150 iki 300 nm) skersmuo ~28 nm
m_NAgE6_C	m_N_C	AgE6 (AgE6F-AgE6R)	Dauguma netaisyklingos formos, trumpų (iki 100 nm) baltyminių agregatų
m_N_CAgE6	m_N_C	AgE6 (AgE6F-AgE6R)	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 200 nm (daugumos ilgis nuo 50 iki 150 nm) skersmuo ~28 nm
m_NΔ10AgE6_CΔ11	m_NΔ10_CΔ11	AgE6 (AgE6F-AgE6R)	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 600 nm (daugumos ilgis nuo 200 iki 300 nm) skersmuo ~28 nm
m_NΔ10_CΔ11_AgE6	m_NΔ10_CΔ11	AgE6 (AgE6F-gE6R)	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 600 nm (daugumos ilgis nuo 200 iki 300 nm) skersmuo ~28 nm
m_NΔ20AgE6_CΔ21Tihis	m_NΔ20_CΔ21-his	AgE6 (AgE6F-gE6R)	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 1000 nm (daugumos ilgis nuo 300 iki 500 nm) skersmuo ~28 nm
m_N_C_119::120_AgD6	m_N_C_119::120	AgD6 (SmaAgD6F-SmaAgD6R)	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 150 nm (daugumos ilgis nuo 50 iki 100 nm) skersmuo ~28 nm
m_N_C_119::120_AgE6	m_N_C_119::120	AgE6 (SmaAgE6F-SmaAgE6R)	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 150 nm (daugumos ilgis nuo 50 iki 100 nm) skersmuo ~28 nm
m_N_C_119::120_AgE4	m_N_C_119::120	AgE4 (SmaAgE4F-SmaAgE4R)	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 200 nm (daugumos ilgis nuo 50 iki 150 nm) skersmuo ~28 nm

3.3 lentelės tęsinys kitame puslapyje

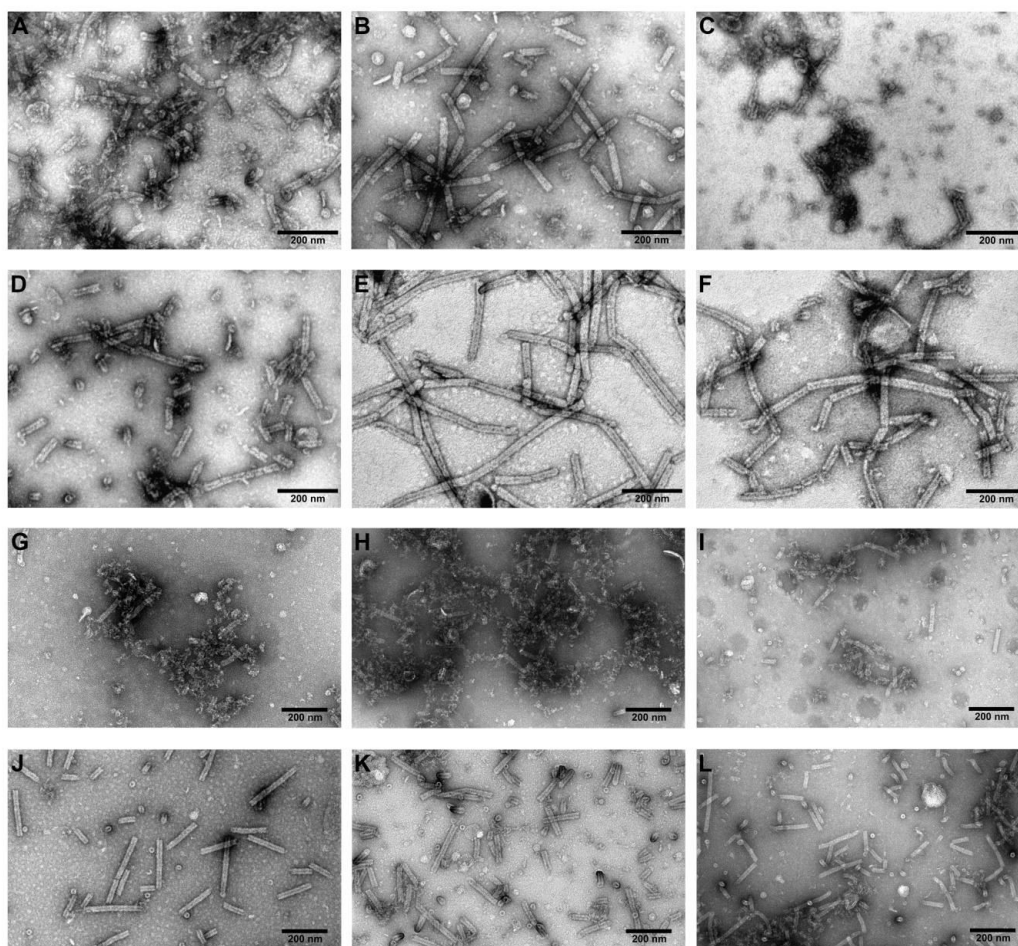
3.3 lentelės tęsinys

m_CΔ81_A gD6	m_CΔ81	AgD6 (SmaAgD6F- SmaAgD6R)	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 250 nm (daugumos ilgis nuo 100 iki 150 nm) skersmuo ~28 nm
m_CΔ81_A gE6	m_CΔ81	AgE6 (SmaAgE6F- SmaAgE6R)	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 250 nm (daugumos ilgis nuo 100 iki 150 nm) skersmuo ~28 nm
m_CΔ81_A gE4	m_CΔ81	AgE4 (SmaAgE4F- SmaAgE4R)	Tvarkingi vamzdeliai, ilgis iki 300 nm (daugumos ilgis nuo 100 iki 150 nm) skersmuo ~28 nm

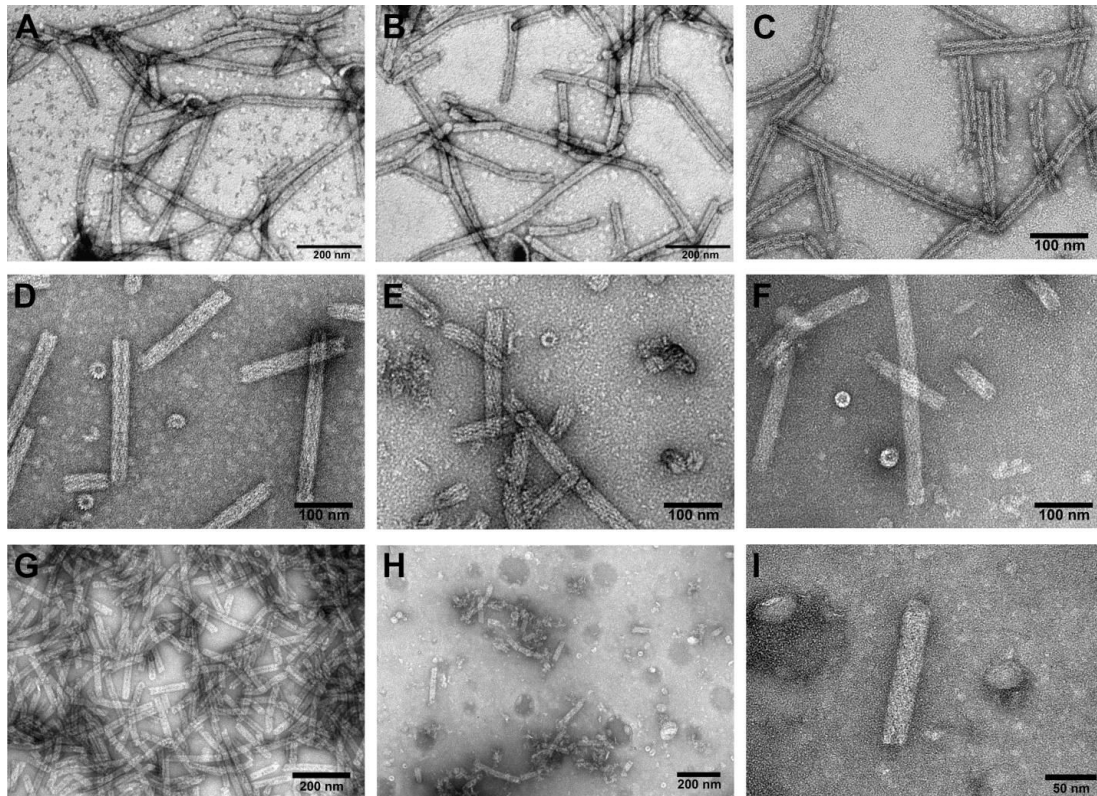
Darbo metu sukonstruoti gp053 mutantų pagrindu sukurti hibridiniai baltymai, turintys įterptus titano oksidą surišančius peptidus baltymo N- (m_NTi_C) arba C-galuose (m_N_CTi), taip pat sidabro jonus surišančius peptidus baltymo N- (m_NAgE6_C) arba C-galuose (m_N_CAgE6). TEM analizės metu nustatyta, kad tiek titano oksidą, tiek sidabro jonus surišančių peptidų įterpimas į baltymo N-galinę sritį lemia ženkliai trumpesnių (daugeliu atveju nuo 50 iki 150 nm ilgio) ir morfologiniu požiūriu mažiau tvarkingų vamzdelių susidarymą (3.3 lentelė, 3.23 pav. A, C) nei tų pačių peptidų įterpimas į baltymo C-galą (3.3 lentelė, 3.23 pav. B, D). Tuo tarpu įterpus peptidus į N- ir C-galines a.r. delecijas turinčius gp053 mutantus su tikslinėmis klonavimo vietomis vietoje pašalintų a.r. (m_NΔ10AgE61_CΔ11 ir m_NΔ20_AgE6_CΔ21Ti-his), TEM analizės metu buvo stebimos ilgos, tvarkingos, morfologiškai tapačios formuojamoms natyvaus gp053, struktūros (3.3 lentelė, 3.23 pav. F, E). Pirmuoju atveju į delecinio baltymo N-galinę sritį klonuotas sidabro jonus surišantis peptidas AgE6, antruoju – gautas hibridinis baltymas, turintis N-gale sidabro (AgE6), o C-gale – titano oksidą (TiO₂) surišančius peptidus.

Remiantis TEM analizės rezultatais, didesnę kiekį pašalintų ir papildomai įterptų svetimų (įskaitant ir peptidų) a.r. turintys hibridiniai baltymai (m_CΔ81_AgD6, m_CΔ81_AgE6 ir m_CΔ81_AgE4) formuoja gerokai trumpesnius (iki 250–300 nm ilgio), tačiau taip pat tvarkingos struktūros vamzdelius (3.3 lentelė, 3.23 pav. J, K, L, 3.24 pav. D, E, F). Tuo

tarpu peptidų įvedimas į papildomai įterptą tikslinę klonavimo vietą, esančią baltymo srityje tarp 119 ir 120 a.r. (natyvaus gp053 atžvilgiu) baltymo polimerizavimosi procesą veikia ypač neigiamai. Hibridiniai baltymai su įterptais AgD6 (m_N_C_119::120_AgD6) ir AgE6 (m_N_C_119::120_AgE6) peptidais daugeliu atvejų formuoja tvarkingas, tačiau ypač trumpas (nuo 50 iki 150 nm) struktūras (3.3 lentelė, 3.23 pav. G, H). Tik gp053 mutanto su į minėtąją sritį įterptu AgE4 peptidu (m_N_C_119::120_AgE4) atveju buvo stebimi tvarkingi, truputį ilgesni (iki 200 nm), vamzdeliai (3.3 lentelė, 3.23 pav. I ir 3.24 pav. H,I).



3.23 pav. Bakteriofago FV3 gp053 pagrindu sukurtų hibridinių baltymų formuojamų nanostruktūrų TEM analizė. Simboliai žymi nanostruktūras, formuojamas hibridinių baltymų: (A) m_NTi_C; (B) m_N_CTi; (C) m_NAgE6_C; (D) m_N_CAgE6; (E) m_NΔ20AgE6_CΔ21Ti-his; (F) m_NΔ10AgE61_CΔ11; (G) m_N_C_119::120_AgD6; (H) m_N_C_119::120_AgE6; (I) m_N_C_119::120_AgE4; (J) m_CΔ81_AgD6; (K) m_CΔ81_AgE6; (L) m_CΔ81_AgE4.

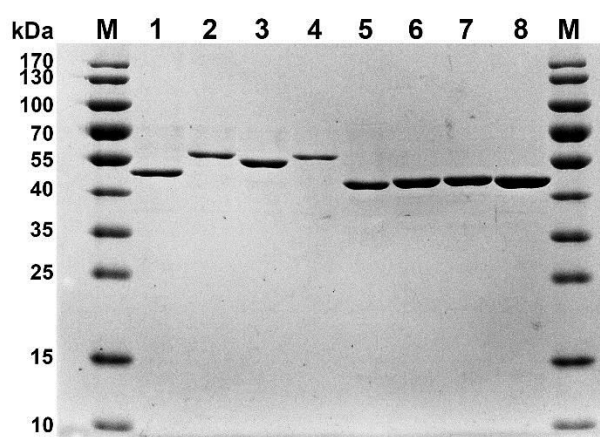


3.24 pav. FV3 gp053 mutantų su įterptomis tikslinėmis klonavimo vietomis ir šiose vietose peptidus eksponuojančių hibridinių baltymų formuojamų nanostruktūrų palyginamoji TEM analizė. Simboliai A, C ir G žymi mutantinių baltymų nanostruktūras prieš įterpiant peptidus. Simboliai B, D, E, F, H ir I žymi nanostruktūras, formuojamas baltymų po peptidų įterpimo. (A) m_N Δ 20_C Δ 21-his; (B) m_N Δ 20AgE6_C Δ 21Ti-his; (C) m_C Δ 81; (D) m_C Δ 81_AgD6; (E) m_C Δ 81_AgE6; (F) m_C Δ 81_AgE4; (G) m_N_C_119::120; (H) m_N_C_119::120_AgE6; (I) m_N_C_119::120_AgE6 (padidintas vaizdas)

Apibendrinant gp053 pagrindu sukurtų hibridinių baltymų formuojamų struktūrų TEM analizės rezultatus, galima teigti, kad peptidų įterpimas į baltymo N- arba C-galines sritis (ypač rekombinantiniuose baltymuose, turinčiuose nedidelį kiekį (10–20) pašalintų a.r.) tik minimaliai veikia baltymo polimerizavimosi procesą. Tuo tarpu peptidų įterpimas į baltymo vidinę dalį baltymo susirinkimui į vamzdelines struktūras daro ypač neigiamą įtaką, o hibridinių baltymų formuojamų struktūrų morfologija priklauso ir nuo įterpto peptido aminorūgščių sudėties.

Atlikus gp053 pagrindu sukurtų hibridinių baltymų TEM analizę ir atsirinkus potencialius kandidatus detalesniems tyrimams, tolimesnių darbų metu buvo tiriamas hibridinių baltymų su juose esančiais sidabro jonus surišančiais peptidais aktyvumas. Remiantis literatūros duomenimis, ant įvairių

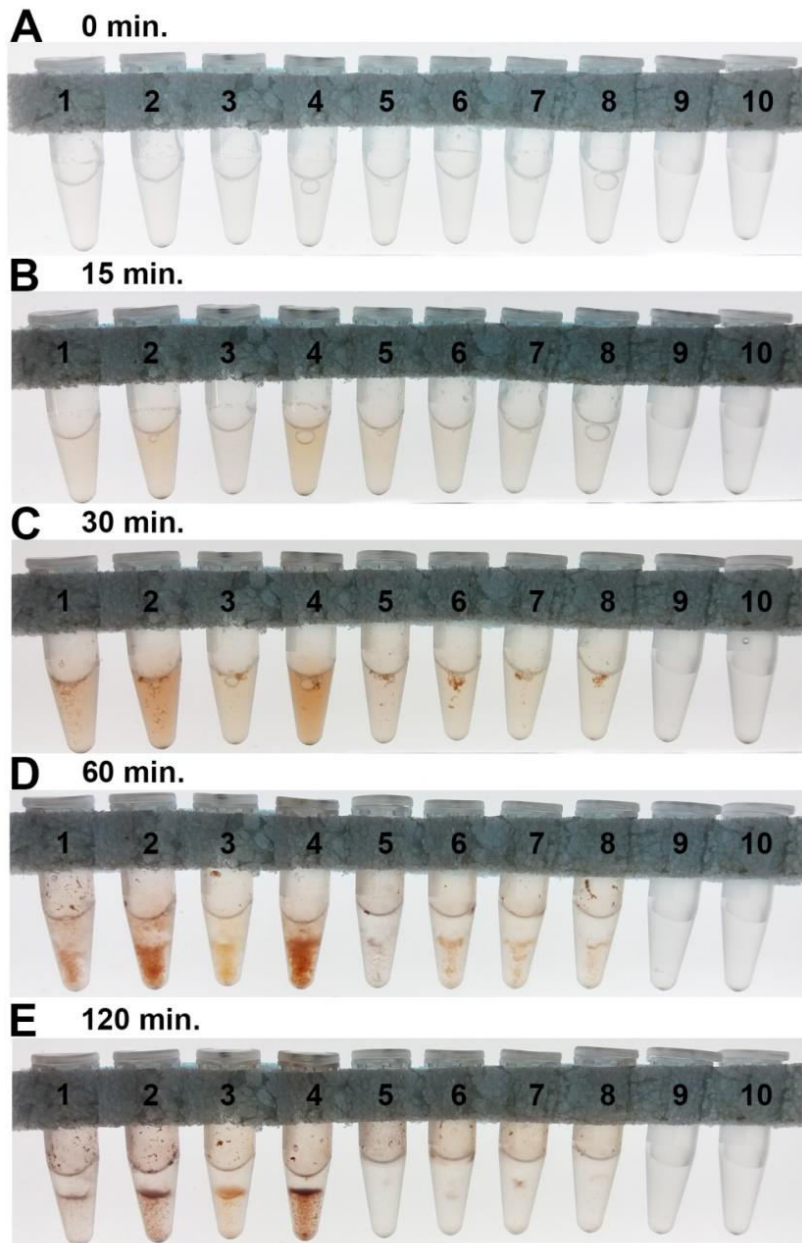
biologinių struktūrų (pavyzdžiui, bakteriofago M13 ar mielių ląstelių paviršiaus) eksponuojami peptidai (D6, E6, E4) šviesoje vykdo tirpale esančių sidabro jonų fotoredukciją (Nam et al., 2008). Šios reakcijos metu, vykstant sidabro jonų redukcijai, tirpalo spalva palaipsniui tampa rusva ar net raudona, o matuojant UV adsorbcijos spektrą dėl sidabro nanodalelių paviršiaus plazmoninio rezonanso yra stebimas adsorbcijos pikas esant 400 nm bangos ilgiui, kurio (tuo pačiu ir spalvos) intensyvumas priklauso nuo reakcijos metu susidarančių dalelių dydžio ir formos (Nam et al., 2008).



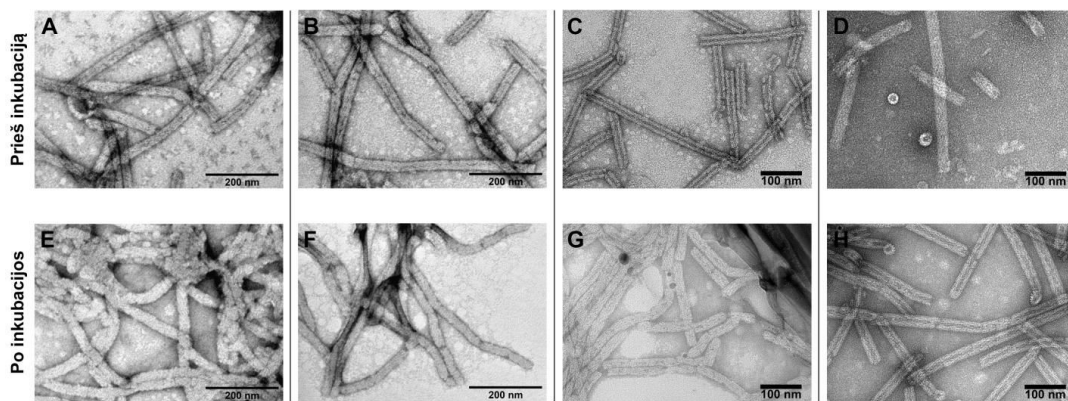
3.25 pav. Išgrynintų gp053 mutantų su tikslinėmis klonavimo vietomis ir jų pagrindu sukurtų savitvarkes vamzdelines struktūras formuojančių hibridinių baltymų SDS-PAGE analizė. Takeliai žymi: 1 – m_N Δ 20_C Δ 21-his; 2 – m_N Δ 20_AgE6_C Δ 21Ti-his; 3 – m_N_C_119::120; 4 – m_N_C_119::120_AgE4; 5 – m_C Δ 81; 6 – m_C Δ 81_AgD6; 7 – m_C Δ 81_AgE6; 8 – m_C Δ 81_AgE4. M – molekulinės masės dydžio standartas Page RulerTM Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Siekiant įvertinti darbo metu gp053 pagrindu sukonstruotų hibridinių baltymų gebėjimą redukuoti tirpale esančius sidabro jonus, išgryninti baltymai (3.25 pav.) buvo laikomi su AgNO₃ (galutinė koncentracija 1 mM). Reakcijos vykdytos vandenyje, TE, taip pat HEPES buferiniuose tirpaluose bei HEPES buferiniame tirpale su reduktoriumi – C₂H₅OH (galutinė koncentracija 1 %). Siekiant įsitinkinti, kad reakcija yra inicijuojama šviesos, vieno iš hibridinių baltymų mėginys buvo laikomas su AgNO₃ visiškoje tamsoje. Norint nustatyti, ar spalvinė reakcija nevyksta dėl vandenyje ar reakcijos buferiniame tirpale esančių komponentų sąveikos su AgNO₃, tirpalai tik su AgNO₃, bet be išgrynintų baltymų, taip pat laikyti šviesoje.

Nustatyta, kad esant intensyviai apšvietimui, mėginiuose su išgrynintais baltymais vyksta AgNO_3 fotoredukcija: jau po 15 minučių stebimas tirpalo spalvos pasikeitimas (reakcijos mišinys tampa rausvas), o praėjus valandai nuo reakcijos pradžios, spalvos pokytis yra intensyviausias (3.26 pav.). Spalvos pokytis buvo stebimas tiek vykdant reakciją su mutantiniais, tikslines klonavimo vietas turinčiais baltymais m_N Δ 20_C Δ 21-his, m_N_C_119::120 ir m_C Δ 81 (3.26 pav. 1, 3, 5), tiek su hibridiniais, į tikslines klonavimo vietas įterptus peptidus turinčiais baltymais m_N Δ 20AgE6_C Δ 21Ti-his, m_N_C_119::120_AgE4, m_C Δ 81_AgD6, m_C Δ 81_AgE6, m_C Δ 81_AgE4 (3.26 pav. 2, 4, 6, 7, 8). Kita vertus, hibridinių baltymų reakcijos mišiniuose spalvos pokytis buvo ryškesnis, lyginant su kontrolinių, tik įterptas klonavimo vietas turinčių mutantinių gp053 reakcijos mišinių spalva. Tamsoje su AgNO_3 laikyto m_N Δ 20AgE6_C Δ 21Ti-his, taip pat šviesoje su AgNO_3 laikyto HEPES buferio mėginiuose spalvinės reakcijos nevyko (3.26 pav. 9, 10).



3.26 pav. Išgrynintų gp053 mutantų su tikslinėmis klonavimo vietomis ir jų pagrindu sukurtų hibridinių baltymų inkubacijos su AgNO_3 esant apšvietimui analizė. Inkubacija vykdyta šviesoje, HEPES buferyje (galutinė koncentracija 10 mM, pH 7,5) su AgNO_3 (galutinė koncentracija 1 mM). Raidės žymi skirtingais laiko intervalais darytas mėginių nuotraukas (laikas nurodytas dešinėje). Skaičiai žymi: 1 – m_N Δ 20_C Δ 21-his; 2 – m_N Δ 20_AgE6_C Δ 21Ti-his; 3 – m_N_C_119::120; 4 – m_N_C_119::120_AgE4; 5 – m_C Δ 81; 6 – m_C Δ 81_AgD6; 7 – m_C Δ 81_AgE6; 8 – m_C Δ 81_AgE4; 9 – šviesoje laikytas HEPES buferinis tirpalas su AgNO_3 ; 10 – m_N Δ 20_AgE6_C Δ 21Ti-his (laikytas tamsoje).



3.27 pav. Išgrynintų gp053 mutantų su tikslinėmis klonavimo vietomis ir jų pagrindu sukurtų hibridinių baltymų TEM analizė prieš (viršuje) ir po (apačioje) inkubacijos su AgNO_3 . Inkubacija vykdyta šviesoje, HEPES buferyje (galutinė koncentracija 10 mM, pH 7,5) su AgNO_3 (galutinė koncentracija 1 mM). Raidės žymi: (A,E) m_NΔ20_Δ21-his; (B,F) m_NΔ20AgE6_Δ21Ti-his; (C,G) m_Δ81; (D,H) m_Δ81_AgE4.

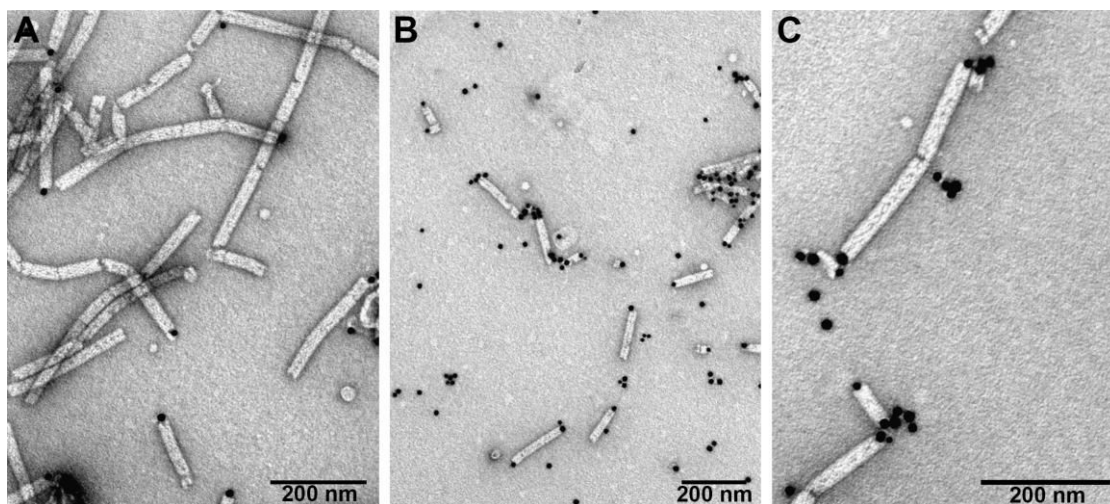
Remiantis literatūros duomenimis, redukuojant tirpale esančius sidabro jonus, vyksta šiuos jonus surišančius peptidus ant savo paviršiaus eksponuojančių molekulių biomineralizacija. Dėl šios priežasties keičiasi biopaviršių morfologija (Nam et al., 2008). Siekiant įvertinti gp053 pagrindu sukurtų hibridinių nanostruktūrų galimus morfologijos skirtumus, prieš ir po reakcijos su AgNO_3 , atlikta mėginių TEM analizė. Nepaisant spalvinės reakcijos metu stebėtų spalvos pasikeitimų, ryškesnių morfologinių pokyčių tiek kontrolinių (m_NΔ20_Δ21-his, m_Δ81), tiek hibridinių baltymų (m_NΔ20AgE6_Δ21Ti-his, m_Δ81_AgE4) struktūroje po inkubacijos su AgNO_3 , nustatyta nebuvo (3.27 pav.). Kita vertus, abiem minėtaisiais hibridinių baltymų atvejais, įterpti Ag^+ jonus surišantys peptidai, remiantis literatūros duomenimis, bioinformatine analize ir darbo metu atliktų eksperimentų rezultatais, tikėtina, yra eksponuojami vidinėje nanovamzdelių dalyje (1.4, 3.3.1 ir 3.3.2 skyriai). Tokiu atveju morfologiniai nanovamzdelių paviršiaus pasikeitimai gali būti ir nestebimi.

Iš kitos pusės, gp053 pagrindu sukurtas hibridinio m_N_C_119::120_AgE4, kurio formuojamose struktūrose, remiantis bioinformatine analize, Ag^+ jonus surišantys peptidai yra eksponuojami

išoriniame nanovamzdelių paviršiuje ir kurių mėginyje spalvinė reakcija buvo intensyviausia, TEM analizės metu tvarkingų pavienių nanovamzdelių identifikuoti nepavyko. Galima to priežastis – inkubacijos su AgNO₃ metu vykstantis vamzdelių fizikinių ir -cheminių savybių pasikeitimas (reakcijų metu visais atvejais stebimas baltymų iškritimas į nuosėdas (3.26 pav) ir dėl to susidarančios, tikėtina, hidrofobiškos ir ypač susiagregavusios, TEM analizei ir tolimesniems tyrimams netinkamos struktūros.

3.3.6 gp053 vamzdelių ir aukso nanodalelių hibridai

Kaip minėta 1.3 skyriuje, konstruojant nanostruktūras su jų paviršiuje esančiomis pageidaujamomis funkcinėmis grupėmis, dėl galimų disulfidinių ryšių formavimo, taip pat sąveikos su auksu ir biokonjugacijos su tioliui-selektyviomis medžiagomis, ypač partrauklūs struktūrų paviršiuje cisteiną eksponuojantys baltymai (Peabody, 2003). Bioinformatinės analizės metu gp053 pirminėje struktūroje (160, 198, 208 ir 320 pozicijose) identifikuotos keturios cisteino aminorūgštys. Siekiant nustatyti, ar šios aminorūgštys yra išsidėsčiusios išoriniame, ar vidiniame gp053 formuojamų nanostruktūrų paviršiuje, o tuo pačiu ir siekiant išsiaiškinti, ar jos gali būti panaudotos konstruojant savaimę susirenkančias nanostruktūras su jų paviršiuje eksponuojamomis įvairiomis biomolekulėmis, išgryninti gp053 modifikuoti biotinu, vėliau inkubuoti su neutravidinu konjuguotomis aukso nanodalelėmis (baltymų modifikavimas biotinu ir inkubacijos su neutravidinu konjuguotomis aukso nanodalelėmis reakcijos atliktos dr. S. Povilonienės). TEM analizės buvo gautos tvarkingos nanostruktūros su galuose prisitvirtinusiomis aukso nanodalelėmis (3.28 pav.).



3.28 pav. Biotinu modifikuoto FV3 gp053, inkubuoto su neutravidinu konjuguotomis aukso nanodalelėmis, TEM analizė.

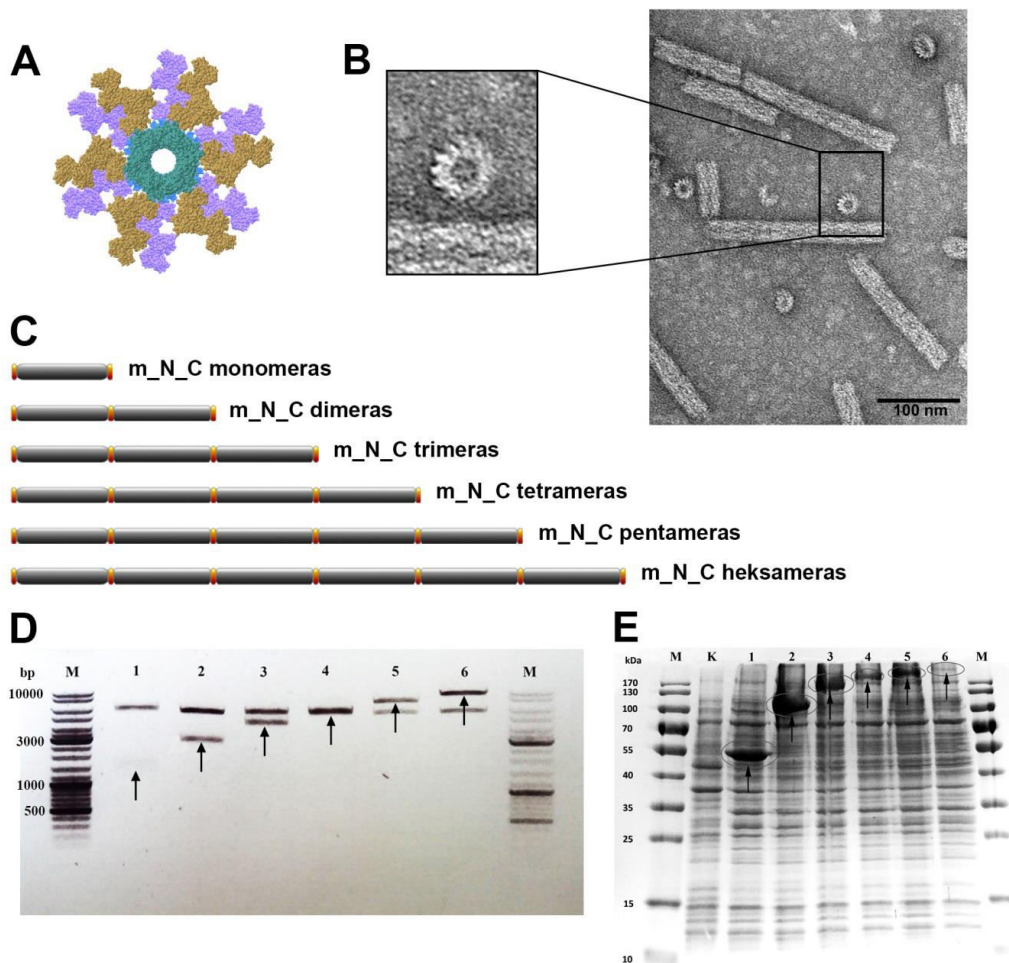
Kaip matyti iš 3.28 paveiksle pateiktos nuotraukos, dauguma aukso nanodalelių yra stebimos vamzdelių galuose, jų „lūžio“ vietose arba ant itin trumpų ar netaisyklingos struktūros darinių paviršiaus, tačiau jų eksponavimas ant tvarkingų, ilgų nanostruktūrų išorinio paviršiaus santykinai labai nedidelis. Šis atrankus aukso nanodalelių pasiskirstymas gali būti paaiškinamas tuo, kad, gp053 sudėtyje esančios cisteino aminorūgštys, baltymui polimerizuojantis, išsidėsto vidinėje, neutravidinu konjuguotoms aukso nanodalelėms „sunkiai pasiekiamoje“ vamzdelio dalyje. Išoriniame paviršiuje cisteinas yra eksponuojamas tik vamzdelio galuose, vamzdelio „lūžio“ vietose arba pavieniuose žiedeliuose, t.y. ten, kur TEM nuotraukose ir buvo stebimos aukso nanodalelės. Dėl šios priežasties biotinu modifikuoto gp053 formuojamų nanostruktūrų tyrimai svarbūs net tik konstruojant hibridines nanostruktūras, bet ir, pavyzdžiui, ateityje siekiant tvarkingai orientuoti arba imobilizuoti šias nanostruktūras ant tam tikrų paviršių.

3.3.7 gp053 mutantų oligomerų tyrimai

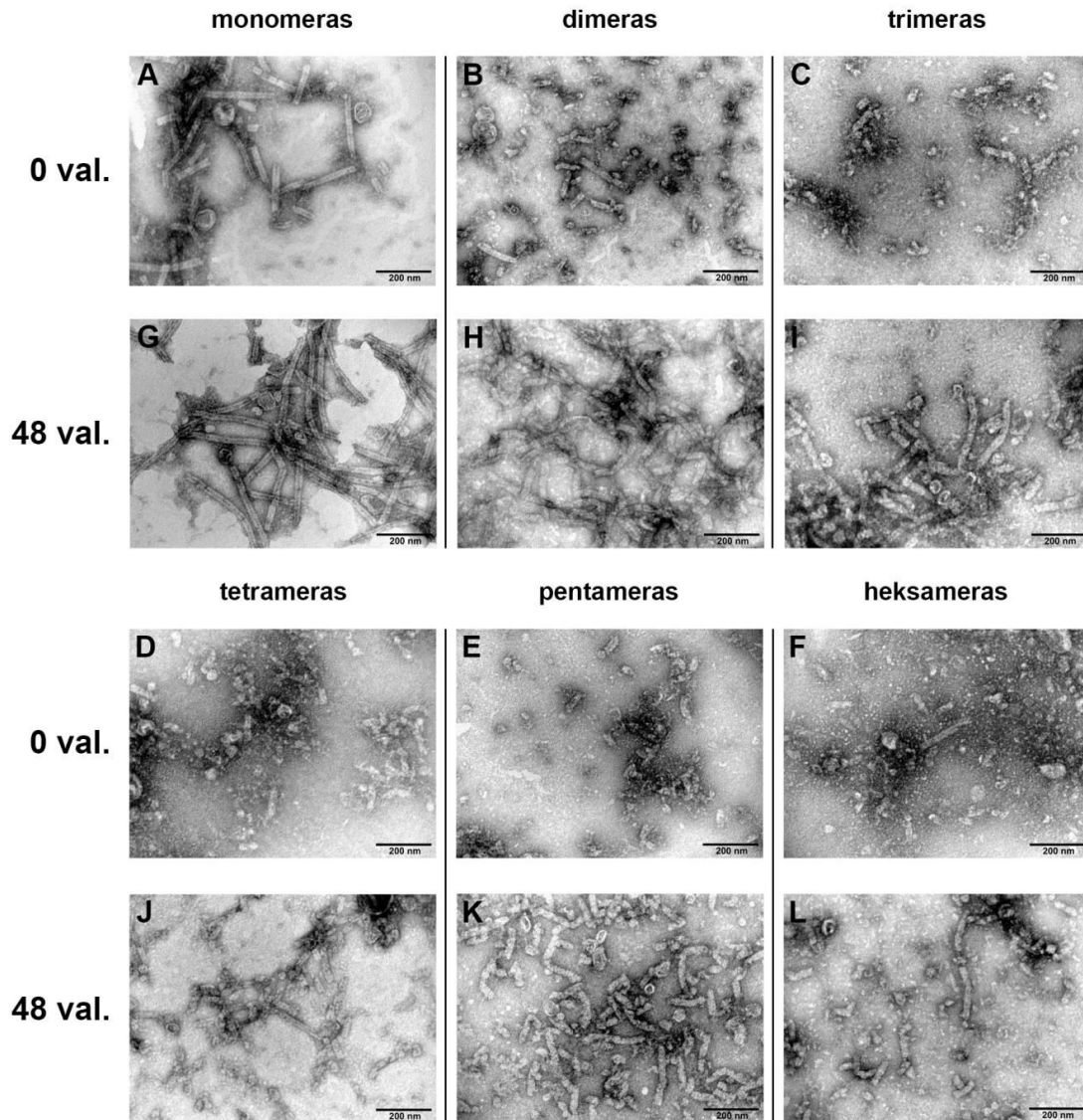
Remiantis literatūros duomenimis, bakteriofagų uodegėlės apvalkalo monomeriniai baltymai polimerizacijos metu vienas kito atžvilgiu išsidėsto taip, kad sudaro heksamerines žiedines struktūras, kurioms sąveikaujant

tarpusavyje suformuojamas uodegėlės apvalkalas (Leiman et al., 2004; Kostyuchenko et al., 2005; Aksyuk et al., 2009; Leiman ir Shneider, 2012). Dėl šios priežasties, konstruojant uodegėlės apvalkalo baltymų pagrindu paremtas hibridines nanostruktūras, tikslinių klonavimo vietų įvedimas į tam tikras monomerinio baltymo vietas, iš esmės leidžia sukurti tik homogeniškus vamzdelius. Siekiant nustatyti, ar įmanoma gauti hibridinius, gp053 pagrindu paremtus vamzdelius, kuriuose būtų galima kontroliuoti tam tikrų peptidų ar fermentų išsidėstymą vamzdelio struktūroje, (pavyzdžiui, eksponuoti vidinėje arba išorinėje vamzdelio dalyje vieną šalia kito kelis skirtingus peptidus ar fermentus) atlikti gp053 duplikatų konstravimo darbai bei jų formuojamų struktūrų analizė.

Oligomerų gavimui pasirinktas gp053 mutantinis baltymas m_N_C, turintis tikslines klonavimo vietas baltymo N- ir C-galuose (3.20 pav., 3.2 lentelė). Darbo metu sukonstruoti plazmidiniai vektoriai su m_N_C dimerais, trimerais, tetramerais, pentameriais ir heksamerais (3.29 pav. C). Atlikta m_N_C duplikatų raiška *E. coli* BL21-DE3 laboratoriniame kamiene, visais atvejais gauti tirpūs baltymai (3.29 pav. E). Atlikus iškart po ląstelių suardymo surinktų m_N_C oligomerų TEM analizę, nustatyta, kad tvarkingas, vamzdelines struktūras formuoja tik monomerinis m_N_C (3.30 pav. A). m_N_C dimero atveju buvo stebimi pavieniai, negausūs, ne tokie tvarkingi vamzdeliai (3.30 pav. B). Likusieji m_N_C oligomerai formavo tik ypač nedidelius vamzdelinius arba netaisyklingos struktūros baltyminius agregatus (3.30 pav. C–F).



3.29 pav. Bakteriofago FV3 gp053 mutanto m_NC oligomerų analizė. (A) Bakteriofago T4 sutrauktos uodegėlės molekulinis modelis. Žalsva spalva žymi gp15 formuojamą uodegėlės vamzdelį. Violetinė ir rudos spalvos žymi du iš 23 gp18 formuojamų heksamerinių žiedų, sudarančių uodegėlės apvalkalą. (B) Bakteriofago FV3 gp053 pagrindu sukonstruoto hibridinio baltymo m_{CA81}_AgD6 formuojamų struktūrų TEM analizė. Padidintoje nuotraukoje – vamzdelį sudarančių heksamerinių žiedų vaizdas. (C) Darbo metu sukonstruotų m_NC oligomerų schematinis vaizdas. Pilka spalva žymi natyvaus baltymo aminorūgštis, oranžinė – įterptas aminorūgštis su jose esančiomis tikslinėmis konavimo vietomis. (D) Indukuojamos raiškos plazmidiniame vektoriuje pET21a klonuotų m_NC genų duplikatų elektroforezės agaroziniame gelyje analizė. Fragmentai gauti po inbucacijos su NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis. Takeliai žymi: 1 – m_NC monomeras; 2 – m_NC dimeras; 3 – m_NC trimeras; 4 – m_NC tetrameras; 5 – m_NC pentameras; 6 – m_NC heksameras; M – markeris GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific). Rodyklės žymi m_NC oligomerų fragmentus. (E) m_NC sintezės *E. coli* BL21-DE3 ląstelėse, turinčiose pET21a plazmidę su įterptu m_NC genu SDS-PAGE analizė. Genų raiška vykdyta *E. coli* BL21-DE3 kamiene, indukuojant 0,1 mM IPTG ir inkubuojant ląsteles 3 valandas 30 °C temperatūroje. Paveiksle pateikiamas tirpios baltymų frakcijos vaizdas, takeliai žymi: 1 – m_NC monomeras; 2 – m_NC dimeras; 3 – m_NC trimeras; 4 – m_NC tetrameras; 5 – m_NC pentameras; 6 – m_NC heksameras; M – baltymų molekulinės masės standartas Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Rodyklės žymi rekombinantinius m_NC duplikatus.



3.30 pav. FV3 gp053 mutantinio baltymo su tikslinėmis klojavimo vietomis (m_N_C) oligomerų formuojamų nanostruktūrų susidarymo priklausomybės nuo inkubacijos laiko TEM analizė. Užrašas viršuje žymi baltymo duplikacijų skaičių, laikas kairėje nurodo mėginių inkubacijos laiką. Mėginiai laikyti kambario temperatūroje, purtant.

Atliekant gp053 mutantų tyrimus, pastebėta, kad kai kuriais atvejais tirpūs baltymai, kurie iškart po ląstelių suardymo taisyklingų struktūrų neformuoja, praėjus tam tikram laikui *in vitro* visgi susirenka į tam tikros struktūros darinius. Atlikus m_N_C oligomerų polimerizacijos *in vitro* tyrimus, nustatyta, kad inkubuojant minėtuosius baltymus kambario temperatūroje 48 val. ir intensyviai mėginius purtant, m_N_C suformuoja vamzdelines struktūras, kurių dydis ir struktūros morfologinės savybės priklauso nuo oligomerus sudarančių baltymų skaičiaus (3.30 pav. G, H, I, J, K, L). m_N_C

tetramerai ir heksamerasi formuoja trumpiausius ir netaisyklingiausios struktūros vamzdelinius darinius, tuo tarpu m_N_C dimerai, trimerai ir pentamerai susirenka į sąlyginai trumpas (iki 200 nm) vamzdelines struktūras, kurių diametras panašus į natyvaus gp053 formuojamų vamzdelių, tačiau struktūra nėra homogeniška – matyti vamzdelių trūkiai ar linkiai, taip pat struktūros susiaurėjimai ar praplatėjimai.

Apibendrinant gp053 oligomerų tyrimų rezultatus, galima teigti, kad pirmą kartą buvo įrodyta, jog vamzdelinės nanostruktūros gali susirinkti ne tik iš monomerinių uodegėlės apvalkalo baltymų, bet ir iš genetiškai sukonstruotų oligomerų. Dėl šios priežasties gp053 mutantiniai baltymai yra patrauklūs kandidatai, konstruojant baltyminius vamzdelius su norimais pakeitimais nanostuktūrose.

REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

Siekiant sukonstruoti bakteriofagų struktūrinių baltymų pagrindu savaimė susirenkančias nanostruktūras, visų pirma buvo identifikuoti ir charakterizuoti penki nauji bakteriofagai: *Klebsiella* sp. infekuojantis bakteriofagas RaK2, *Arthrobacter* spp. fagai ArV1 ir ArV2, bei *Escherichia coli* bakteriofagai FV3 ir NBD2. Nustatyta, kad bakteriofagai RaK2, FV3 ir ArV1 priklauso *Myoviridae* fagų šeimai, tuo tarpu fagai ArV2 ir NBD2 yra *Siphoviridae* šeimos atstovai. Visų bakteriofagų genomai publikuoti NCBI duomenų bazėje.

Atlikus genomų bioinformatinę analizę, taip pat remiantis proteominės analizės rezultatais, viso identifikuoti 122 minėtųjų bakteriofagų struktūriniai baltymai, 19 iš jų pasirinkti detalesniems tyrimams. Šių darbų metu buvo vykdomas struktūrinius baltymus koduojančių genų klonavimas į indukuojamos raiškos plazmidinius vektorius, gauta genųraiška *E. coli* ląstelėse ir atlikta baltymų formuojamų struktūrų TEM analizė. Nustatyta, kad beveik pusė (devyni) rekombinantinių baltymų tirtomis sąlygomis yra netirpūs, likusieji dešimt baltymų – tirpūs, tačiau tik trys iš jų *in vivo*, nesant kitų faginių baltymų, formuoja taisyklingas savitvarkes vamzdelines struktūras. Tai fagų RaK2 gp041 ir FV3 gp053, sudarantys bakteriofagų uodegėlės apvaskalą bei bakteriofago NBD2 uodegėlės vamzdelio baltymas gp39. Miovirusų rekombinantinių baltymų formuojamų nanostruktūrų diametras atitinka bakteriofagų sutrauktos uodegėlės diametrą: RaK2 gp041 (~41 nm), FV3 gp053 (~28 nm). Sifoviruso NBD2 gp39 skersmuo tapatus fago uodegėlės diametru (~12 nm). Be to, šio rekombinantinio baltymo formuojami vamzdeliai ilgiausi (net iki 2–3 μm). Bakteriofagų RaK2 ir FV3 nanostruktūrų ilgai siekia atitinkamai iki 750 ir 1000 nm.

Atliekant detalesnius bakteriofago FV3 gp053 formuojamų nanostruktūrų tyrimus, optimizuotas nanovamzdelių gryninimas, išsodinant amonio sulfatu. Taip pat atlikti nanovamzdelių atsparumo įvairiems aplinkos veiksniams tyrimai. Jų metu nustatyta, kad rekombinantinio gp053

formuojamos nanostruktūros išlieka morfologiškai nepakitusios: ilgą laiką (daugiau nei metus) laikant mėginius buferiniame tirpale 4 °C, inkubuojant 16 valandų su tripsinu (0,02 mg/ml) ar 8 M karbamido tirpale, taip pat laikant mėginius 30 min. verdančiame vandenyje.

Tiriant galinių aminorūgščių svarbą baltymo polimerizacinėms savybėms, sukonstruoti 25 gp053 deleciniai mutantai, atlikta mutantinių genų raiška *E. coli* ląstelėse, taip pat mėginių TEM analizė. Nustatyta, kad C-galinių aminorūgščių delecijos turi mažiau įtakos FV3 gp053 susirinkimui į nanostruktūras nei aminorūgščių pašalinimas iš baltymo N-galo. gp053 mutantai nebeformuoja savitvarkių struktūrų nuo N-galo pašalinus 29 a.r., tuo tarpu net 100 C-galinių a.r. delecija baltymo polimerizacinių savybių nekeičia, netgi priešingai. Atlikus TEM analizę nustatyta, kad gp053_CΔ100 formuojamų nanostruktūrų skersmuo ~32,5 nm, o nanostruktūrų ilgis siekia net iki 2000 nm.

Tiriant papildomai įterptų arba pakeistų svetimomis aminorūgščių įtaką gp053 polimerizacinėms savybėms, sukonstruota 20 gp053 mutantų su tikslinėmis klonavimo vietomis baltymo N- ir C-galuose, taip pat baltymo vidinėje dalyje. Atlikta mutantinių genų raiška *E. coli* ląstelėse, taip pat mėginių TEM analizė. Nustatyta, kad papildomos a.r., įterptos į mutantinių baltymų N- arba C-galus, turi didesnę neigiamą įtaką baltymo susirinkimui į tvarkingas nanostruktūras nei tų pačių a.r. įterpimas į 10 ar 20 a.r. galines delecijas turinčių gp053 mutantų N- arba C-galines sekas. Dar labiau baltymo savybes keičia jo vidinėje dalyje esančių a.r. pakeitimas svetimomis a.r. arba papildomų a.r. įterpimas: daugeliu atveju gauti arba netirpūs, arba tvarkingų struktūrų neformuojantys baltymai, tik m_N_C_119::120 atveju buvo stebimos susiformavusios tvarkingos, iki 500 nm ilgio vamzdelinės struktūros.

Darbo metu sukonstruota 13 hibridinių baltymų, sudarytų iš gp053 arba gp053 mutantų ir į baltymo N- ir/arba C-galuose esančias tikslines klonavimo vietas įterptų sidabro jonus ir titano oksidą surišančių peptidų. Taip pat gauti trys hibridiniai baltymai, kuriuose sidabro jonus surišantys peptidai buvo įterpti į m_N_C_119::120 tikslinę klonavimo vietą. Atlikta hibridinių baltymų raiška

E. coli ląstelėse, taip pat mėginių TEM analizė. Nustatyta, kad peptidų įterpimas į baltymo N- arba C-galines sritis (ypač rekombinantiniuose baltymuose, turinčiuose nedidelį kiekį (10–20) pašalintų a.r.) tik minimaliai paveikia baltymo polimerizavimosi procesą. Tuo tarpu peptidų įterpimas į baltymo vidinę dalį gerokai sumažina hibridinių baltymų saviagregacines savybes. Be to, hibridinių baltymų formuojamų struktūrų morfologija priklauso nuo įterpto peptido aminorūgščių sudėties. Darbo metu taip pat gauti biotinu modifikuoti gp053 hibridai su nanovamzdelių galuose prisitvirtinusiomis neutravidinu konjuguotomis aukso nanodalelėmis.

Siekiant nustatyti, ar įmanoma gauti hibridinius, gp053 pagrindu sukurtus vamzdelius, kuriuose būtų galima kontroliuoti tam tikrų peptidų ar fermentų išsidėstymą vamzdelio struktūroje, genetiškai sukonstruoti gp053 oligomerai bei atlikta jų formuojamų struktūrų analizė. Gauti gp053 mutantinio baltymo (m_N_C), turinčio tikslines klonavimo vietas baltymo N- ir C-galuose, dimerai, trimerai, tetramerai, pentamerai ir heksamerai. Atlikta mutantinių genų raiška *E. coli* ląstelėse, taip pat mėginių TEM analizė. Nustatyta, kad oligomerai daugeliu atvejų tvarkingų struktūrų *in vivo* nesuformuoja, tačiau praėjus 48 valandoms nuo mėginių inkubacijos kambario temperatūroje ir esant intensyviai mėginių purtymui, dalis m_N_C duplikatų susirenka į vamzdelines, tačiau netvarkingas struktūras.

IŠVADOS

1. Iš 19 tirtų struktūrinių bakteriofagų virionų baltymų (RaK2 gp041–gp043, gp106, gp107, ArV1 gp15, ArV2 gp05, gp06, gp11, gp15–gp18, gp20, gp24, NBD2 gp39, FV3 gp52, gp53), trys rekombinantiniai baltymai (RaK2 gp041, NBD2 gp39 ir FV3 gp053) *in vivo*, nesant kitų faginių baltymų, formuoja savaime susirenkančias, tvarkingas vamzdelines struktūras.
2. FV3 rekombinantinio gp053 formuojami nanovamzdeliai – ypatingai stabilios ir įvairiems aplinkos veiksniams atsparios struktūros, kurių diametras atitinka fago sutraukto uodegėlės apvalkalo plotį (~28 nm), o ilgis varijuoja nuo 10 iki 1000 nm.
3. C-galinių aminorūgščių delecijos turi mažiau įtakos FV3 gp053 polimerizacijos procesui nei aminorūgščių panaikinimas iš šio baltymo N-galo.
4. FV3 mutantiniai gp053 ir jų pagrindu sukurti hibridiniai baltymai *in vivo* formuoja nanovamzdelines struktūras, kurių morfologija priklauso nuo pašalintų ar įterptų a.r. skaičiaus, taip pat jų pozicijos baltymo sekoje.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta šiuose moksliniuose straipsniuose:

1. Kaliniene L*, **Šimoliūnas E***, Truncaitė L, Zajančauskaitė A, Nainys J, Kaupinis A, Valius M, Meškys R. (2017) Molecular analysis of *Arthrobacter* myovirus vB_ArtM-ArV1: we blame it on the tail. J Virol. 91: e00023-17
2. **Šimoliūnas E**, Kaliniene L, Stasilo M., Truncaitė L, Zajančauskaitė A, Staniulis J, Nainys J, Kaupinis A, Valius M, Meškys R. (2014) Isolation and characterization of vB_ArS-ArV2 – first *Arthrobacter* sp. infecting bacteriophage with completely sequenced genome. PLoS ONE 9: e111230
3. **Šimoliūnas E**, Kaliniene L, Truncaitė L, Zajančauskaitė A, Staniulis J, Kaupinis A, Ger M, Valius M, Meškys R. (2013) *Klebsiella* phage vB_KleM-RaK2 – a giant singleton virus of the family *Myoviridae*. PLoS ONE 8: e60717
4. Truncaite L, **Šimoliūnas E**, Zajančauskaite A, Kaliniene L, Mankevičiūtė R, Staniulis J, Klausas V, Meškys R. (2012) Bacteriophage vB_EcoM-FV3: a new member of "rV5-like viruses". Arch Virol. 157: 2431–2435
5. **Simoliūnas E**, Kaliniene L, Truncaite L, Klausas V, Zajančauskaite A, Meškys R. (2012) Genome of *Klebsiella* sp. infecting bacteriophage vB_KleM-RaK2. J Virol. 86: 5406

* – autorių indėlis į straipsnį lygiavertis

Su disertacijos tema nesusijusi medžiaga paskelbta šiuose moksliniuose straipsniuose:

1. Alijošius L, **Šimoliūnas E**, Kaliniene L, Meškys R, Truncaitė L. (2017) Complete genome sequence of *Escherichia coli* phage vB_EcoM_Alf5. Genome Announc. (*priimta spausdinti*)
2. **Šimoliūnas E**, Vilkaitytė M, Kaliniene L, Zajančauskaitė A, Kaupinis A, Staniulis J, Valius M, Meškys R, Truncaitė L. (2015) Incomplete LPS core-specific *Felix01likevirus* vB_EcoM_VpaE1. Viruses. 7, 6163–6181
3. Gelzinis A., Verikas A., Vaiciukynas E., Backauskienė M., Sulčius S., **Simoliūnas E.**, Staniulis J., Paskauskas R. (2015) Automatic detection and morphological delineation of bacteriophages in electron microscopy images. Comput Biol Med. 64:101–116

4. Kaliniene L, Zajančauskaitė A, **Šimoliūnas E**, Truncaitė L, Meškys R. 2015. Low-temperature bacterial viruses VR – a small but diverse group of *E. coli* phages. Arch Virol. 160:1367–1370
5. Šulčius S, **Šimoliūnas E**, Staniulis J, Koreivienė J, Baltrušis P, Meškys R, Paškauskas R. 2014. Characterization of a lytic cyanophage that infects the bloom-forming cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. FEMS Microbiology Ecology 91:1–7

KONFERENCIJOS

Disertacijoje pateikta medžiaga pristatyta šiose konferencijose:

1. **Šimoliūnas E**, Povilonienė S, Truncaitė L, Rutkienė R, Časaitė V, Kalinienė L, Pajeda S, Goda K, Meškys R. Bakteriofagų struktūrinių baltymų panaudojimas tikslingam savitvarkių hibridinių nanostruktūrų gavimui. 2016 m. Jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“, 12 07 2016, Lietuvos mokslų akademija, Vilnius, Lietuva. (*žodinis pranešimas*)
2. **Šimoliūnas E**, Časaitė V, Kalinienė L, Rutkienė R, Truncaitė L, Vilkaitytė M, Goda K, Meškys R. Investigation of tail-forming proteins of *Escherichia* phage vB_EcoM_NBD2. The 3rd Congress of Baltic Microbiologists (CBM2016), 10 18–21 2016, Vilnius, Lithuania (*žodinis pranešimas*)
3. Vilkaitytė M, Kalinienė L, Truncaitė L, Zajančauskaitė A, **Šimoliūnas E**, Goda K, Meškys R. Characterization of low-temperature *Escherichia* phage vB_EcoS_NBD2. The 3rd Congress of Baltic Microbiologists (CBM2016), 10 18–21 2016, Vilnius, Lithuania (*stendinis pranešimas*)
4. Kaliniene L, Zajanckauskaite A, **Simoliunus E**, Vilkaityte M, Urbonavicius J, Meskys R, Truncaite L. Host-Specificity Determinants of Bacteriophage vB_EcoM_FV3. The 41st FEBS Congress „Molecular and System Biology for a Better Life“, 09 03–08 2016, Ephesus / Kuşadası, Turkey (*stendinis pranešimas*)
5. Kaliniene L, Truncaite L, Zajanckauskaite A, **Simoliunus E**, Serviene E, Meskys R. Low-temperature enterobacteria phage vB_EcoS_NBD2 isolated from agricultural soil. The 41st FEBS Congress „Molecular and System Biology for a Better Life“, 09 03–08 2016, Ephesus / Kuşadası, Turkey (*stendinis pranešimas*)
6. **Šimoliūnas E**, Povilonienė S, Rutkienė R, Kalinienė L, Truncaitė L, Urbalienė N, Nainys J, Meškys R. Investigation of self-assembling tail proteins of phages. XIV International Conference of the Lithuanian

- Biochemical Society, 06 28–30, 2016, Druskininkai, Lithuania (*stendinis pranešimas*)
7. **Šimoliūnas E**, Povilonienė S, Kalinienė L, Meškys R. Bakteriofagu struktūrinių baltymų tyrimai. IX nacionalinė doktorantų konferencija “Mokslas sveikatai”, 04 13 2016, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Kaunas, Lietuva (*tezės konferencijos leidinyje*)
 8. **Šimoliūnas E**, Povilonienė S, Kalinienė L, Truncaitė L, Zajančauskaitė A, Meškys R. Bakteriofagų struktūrinių baltymų tyrimai ir panaudojimas. 2015 m. Jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“, 12 10 2015, Lietuvos mokslų akademija, Vilnius, Lietuva. (*žodinis pranešimas*)
 9. **Simoliūnas E**, Kaliniene L, Stasilo M, Truncaite L, Zajanckauskaite A, Meskys R. *Arthrobacter* phage vB_ArtM-ArV1: a solitary myovirus among the phages from family *Siphoviridae*. Conference „Phages 2015“, 09 01–02 2015, St Hilda's College, Oxford, UK (*stendinis pranešimas*)
 10. **Simoliūnas E**, Poviloniene S, Kaliniene L, Truncaite L, Zajanckauskaite A, Meskys R. Investigation of tail-forming proteins of *Klebsiella* phage vB_KleM-RaK2. XXIV Biennial Conference „Phage/Virus Assembly“, 06 07–12 2015, Les Diablerets, Switzerland (*stendinis pranešimas*)
 11. **Šimoliūnas E**, Stasilo M, Nainys J, Meškys R. Bakteriofagas vB_ArtM-ArV1 – pirmasis *Arthrobacter* genties bakterijas infekuojantis myovirusas su pilnai nustatyta genomo seka. VIII nacionalinė doktorantų konferencija “Mokslas sveikatai”, 04 10 2015, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Kaunas, Lietuva (*žodinis pranešimas*)
 12. **Simoliūnas E**, Kaliniene L, Stasilo M, Truncaite L, Zajanckauskaite A, Meskys R. Genomic characterization of the first bacteriophage infecting *Arthrobacter* sp. Conference „Phages 2014: Bacteriophage in Medicine, Food and Biotechnology“, 09 16–18 2014, St Hilda's College, Oxford, UK (*stendinis pranešimas*)
 13. **Šimoliūnas E**, Stasilo M, Kaliniene L, Truncaitė L, Zajančauskaitė A, Meškys R. Bakteriofagas vB_ArS-ArV2 – pirmasis *Arthrobacter* genties bakterijas infekuojantis fagas su pilnai nustatyta genomo seka. VII National PhD Students Conference „Science for Health“, 04 09 2014, *Lithuanian University of Health Sciences*, Kaunas, Lithuania (*žodinis pranešimas*)
 14. **Šimoliūnas E**, Stasilo M, Kaliniene L, Truncaitė L, Zajančauskaitė A, Meškys R. Characterization of vB_ArS-ArV2 – first *Arthrobacter* sp. infecting bacteriophage with completely sequenced genome. Conference of Natural and Life sciences „The COINS'14“, 03 3-8 2014, Faculty of Natural Sciences, Vilnius university, Vilnius, Lithuania (*stendinis pranešimas*)

15. Kaliniene L, **Šimoliūnas E**, Stasilo M, Truncaitė L, Zajančauskaitė A, Meškys R. Characterization of newly isolated *Arthrobacter* bacteriophages ArV1 and ArV2. 20th Biennial Evergreen International Phage Meeting, 08 4-9 2013, The Evergreen State College, Olympia, WA 98505, USA (*stendinis pranešimas*)
16. **Šimoliūnas E**, Kaliniene L, Truncaitė L, Zajančauskaitė A, Staniulis J, Meškys R. *Klebsiella* bakterijos infekuojantis fagas RaK2 – unikalus *Myoviridae* šeimos atstovas. VI National PhD Students Conference „Science for Health“, 04 05 2013, *Lithuanian University of Health Sciences*, Kaunas, Lithuania (*žodinis pranešimas*)
17. Kaliniene L, **Simoliunas E**, Truncaite L, Zajančauskaite A, Meškys R. Unique *Klebsiella* phage vB_KleM-RaK2 representing a novel genus within a family of *Myoviridae* of tailed bacteriophages. Conference „EuroPhages 2012: Bacteriophage in Medicine, Food and Biotechnology“, 09 24–26 2012, St Hilda's College, Oxford, UK (*stendinis pranešimas*)
18. **Šimoliūnas E**, Kalinienė L, Zajančauskaitė A, Truncaitė L. Investigation of DNA modification profiles in phages. XII Lithuanian Biochemical Society conference „Biochemijos studijoms Lietuvoje – 50 metų“, 06 28–30 2012 Tolieja, Lithuania (*tezės konferencijos leidinyje*).

FINANSINĖ PARAMA

Lietuvos Mokslo Tarybos (LMT) finansuoti nacionaliniai projektai: MIP-002/2014, SVE-04/2012, MIP-10240.

Lietuvos Mokslo Tarybos (LMT) stipendija už mokslinius pasiekimus (2013–2015).

Lietuvos Mokslo Tarybos (LMT) finansinė parama doktorantų vizitams (2013–2015).

PADĖKA

Noriu padėkoti savo darbo vadovui dr. Rolandui Meškiui už suteiktą galimybę domėtis, tobulėti, mokytis bei dirbti šioje srityje, taip pat už patarimus, pamokymus, diskusijas ir pagalbą rengiant mokslines publikacijas ir šią disertaciją.

Dėkoju dr. Lidijai Truncaitei už atliktus FV3 gp053 pirminius klonavimus, taip pat už mokslines diskusijas, palaikymą, paskatinimą, tikėjimą ir nuolatinę pagalbą kasdieniuose darbuose bei rengiant šią disertaciją.

Taip pat didžiulis dėkui už atliktus dalies ArV2 struktūrinių genų klonavimo ir raiškos tyrimų darbus Miroslavui Stasilo. Už darbą su bakteriofago NBD2 gp39 – Simonui Pajedai bei dr. Vidai Časaitei. Už RaK2 g041 klonavimo darbus esu dėkingas dr. Simonai Povilonienei.

Taip pat didžiulis dėkui dr. Laurai Kalinienei už visokeriopą pagalbą rengiant straipsnius. VU Proteomikos centro darbuotojams, o ypač dr. Algirdui Kaupiniui, esu dėkingas už fagų virionų ir FV3 gp053 proteominę analizę. prof. Juozui Staniuliui, Juozui Nainiui, Karoliui Godai ir Martynui Skapui didžiausias ačiū už pagalbą darbuose su TEM.

Taip pat didžiulis dėkui Monikai Vilkaitytei, dr. Aurelijai Zajančkauskaitei, dr. Rasai Rutkienei, Virginijai Dzekevičienei, Algimantui Krutkiui, Linai Juškienei, Nijolei Uždavinienei ir visiems kitiems skyriaus darbuotojams už pagalbą ir patarimus kasdieniniuose darbuose, palaikymą ir puikią darbo atmosferą.

LITERATŪROS SARAŠAS

1. Abedon S (2008) Phage, ecology, evolution. In: Abedon S (ed) Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses. Cambridge University Press, pp 1-28.
2. Ackermann H (2003) Bacteriophage observations and evolution. Res Microbiol 154:245–251.
3. Ackermann H (2009) Phage classification and characterization. In: Clokie MRJ, Kropinski AM (eds) Bacteriophages: methods and protocols, Volume 1: Isolation, characterization, and interactions. Humana Press, Totowa, NJ, pp 127–140.
4. Ackermann H-W (2005) Bacteriophage classification. In: Kutter E, Sulakvelidze A (eds) Bacteriophages: biology and applications. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 67–89.
5. Ackermann H-W, Prangishvili D (2012) Prokaryote viruses studied by electron microscopy. Arch Virol 157:1843–1849.
6. Adams M (1959) Bacteriophages. Interscience publishers, Inc., New York.
7. Adriaenssens EM, Ackermann H-W, Anany H, Blasdel B, Connerton IF, Goulding D, Griffiths MW, Hooton SP, Kutter EM, Kropinski AM, Lee J-H, Maes M, Pickard D, Ryu S, Sephehrizadeh Z, Shahrabak SS, Toribio AL, Lavigne R (2012) A suggested new bacteriophage genus: “Viunalikevirus.” Arch Virol 157:2035–2046.
8. Aksyuk AA, Kurochkina LP, Fokine A, Forouhar F, Mesyanzhinov VV, Tong L, Rossmann MG (2011) Structural conservation of the *Myoviridae* phage tail sheath protein fold. Structure 19:1885–1894.
9. Aksyuk AA, Leiman PG, Kurochkina LP, Shneider MM, Kostyuchenko VA, Mesyanzhinov VV, Rossmann MG (2009) The tail sheath structure of bacteriophage T4: a molecular machine for infecting bacteria. EMBO J 28:821–829.
10. Arisaka F, Engel J, Klump H (1981) Contraction and dissociation of the bacteriophage T4 tail sheath induced by heat and urea. Prog Clin Biol Res 64:365–379.
11. Arisaka F, Takeda S, Funane K, Nishijima N, Ishii S (1990) Structural

- studies of the contractile tail sheath protein of bacteriophage T4. 2. Structural analyses of the tail sheath protein, gp18, by limited proteolysis, immunoblotting, and immunoelectron microscopy. *Biochemistry* 29:5057–5062.
12. Auzat I, Droge A, Weise F, Lurz R, Tavares P (2008) Origin and function of the two major tail proteins of bacteriophage SPP1. *Mol Microbiol* 70:557–569.
 13. Bamford D (2005) Family Tectiviridae. In: Fauquet C, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, Ball L (eds) *Virus taxonomy*. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, California, pp 81–85.
 14. Barman P, Gadre D (2007) A study of phage based diagnostic technique for tuberculosis. *Indian J Tuberc* 54:36–40.
 15. Bazan J, Calkosiński I, Gamian A (2012) Phage display – powerful technique for immunotherapy: 2. Vaccine delivery. *Hum Vaccin Immunother* 8:1829–1835.
 16. Bhardwaj A, Walker-Kopp N, Wilkens S, Cingolani G (2008) Foldon-guided self-assembly of ultra-stable protein fibers. *Protein Sci* 17:1475–1485.
 17. Birnbaum F, Nassal M (1990) Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *J Virol* 64:3319–3330.
 18. Bukau B, Weissman J, Horwich A (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125:443–451.
 19. Busseron E, Ruff Y, Moulin E, Giuseppone N (2013) Supramolecular self-assemblies as functional nanomaterials. *Nanoscale* 5:7098–7140.
 20. Cacciari I, Lippi D (1987) *Arthrobacters*: successful arid soil bacteria: A review. *Arid Soil Res Rehab* 1:1–30.
 21. Carlson K, Miller E (1994) Experiments in T4 genetics. In: Karam J (ed) *Molecular biology of bacteriophage T4*. ASM Press, Washington, DC.
 22. Carlton RM (1999) Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 47:267–274.
 23. Carver T, Berriman M, Tivey A, Patel C, Böhme U, Barrell BG, Parkhill J,

- Rajandream M-A (2008) Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. *Bioinformatics* 24:2672–2676.
24. Casaite V, Poviloniene S, Meskiene R, Rutkiene R, Meskys R (2011) Studies of dimethylglycine oxidase isoenzymes in *Arthrobacter globiformis* cells. *Curr Microbiol* 62:1267–1273.
 25. Celik E, Calik P (2012) Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv* 30:1108–1118.
 26. Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C (2013) Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol* 8:769–783.
 27. Chatterji A, Ochoa WF, Paine M, Ratna B., Johnson JE, Lin T (2004) New addresses on an addressable virus nanoblock: uniquely reactive lys residues on cowpea mosaic virus. *Chem Biol* 11:855–863.
 28. Chauthaiwale VM, Therwath A, Deshpande VV (1992) Bacteriophage lambda as a cloning vector. *Microbiol Rev* 56:577–591.
 29. Clokie MR, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S (2011) Phages in nature. *Bacteriophage* 1:31–45.
 30. Coombs D, Arisaka F (1994) T4 tail structure and function. In: Karam J (ed) *Molecular biology of bacteriophage T4*. ASM Press, Washington, DC, pp 259–281.
 31. Dalsgaard K, Uttenthal A, Jones TD, Xu F, Merryweather A, Hamilton WD, Langeveld JP, Boshuizen RS, Kamstrup S, Lomonossoff GP, Porta C, Vela C, Casal JI, Meloen RH, Rodgers PB (1997) Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nat Biotechnol* 15:248–252.
 32. Daube SS, Arad T, Bar-Ziv R (2007) Cell-free co-synthesis of protein nanoassemblies: tubes, rings, and doughnuts. *Nano Lett* 7:638–641.
 33. Davidson AR, Cardarelli L, Pell LG, Radford DR, Maxwell KL (2012) Long noncontractile tail machines of bacteriophages. *Adv Exp Med Biol* 726:115–142.
 34. Deutscher SL (2010) Phage display in molecular imaging and diagnosis of cancer. *Chem Rev* 110:3196–3211.
 35. Dickmeis C, Honickel MMA, Fischer R, Commandeur U (2015)

Production of hybrid chimeric PVX particles using a combination of TMV and PVX-based expression vectors. *Front Bioeng Biotechnol* 3:189.

36. Douglas T, Young M (2006) Viruses: making friends with old foes. *Science* 312:873–875.
37. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B (2015) Bacteriophages and phage-derived proteins--application approaches. *Curr Med Chem* 22:1757–1773.
38. Effantin G, Boulanger P, Neumann E, Letellier L, Conway JF (2006) Bacteriophage T5 structure reveals similarities with HK97 and T4 suggesting evolutionary relationships. *J Mol Biol* 361:993–1002.
39. Efimov AV, Kurochkina LP, Mesyanzhinov VV (2002) Engineering of bacteriophage T4 tail sheath protein. *Biochemistry (Mosc)* 67:1366–1370.
40. Endersen L, O'Mahony J, Hill C, Ross RP, McAuliffe O, Coffey A (2014) Phage therapy in the food industry. *Annu Rev Food Sci Technol* 5:327–349.
41. Farr R, Choi DS, Lee S-W (2014) Phage-based nanomaterials for biomedical applications. *Acta Biomaterialia* 10:1741–1750.
42. Felberbaum RS (2015) The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnol J* 10:702–714.
43. Fokine A, Battisti AJ, Bowman VD, Efimov AV, Kurochkina LP, Chipman PR, Mesyanzhinov VV, Rossmann MG (2007) Cryo-EM study of the *Pseudomonas* bacteriophage ϕ KZ. *Structure* 15:1099–1104.
44. Fokine A, Chipman PR, Leiman PG, Mesyanzhinov VV, Rao VB, Rossmann MG (2004) Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6003–6008.
45. Fokine A, Rossmann MG (2014) Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage* 4:e28281.
46. Fraser JS, Yu Z, Maxwell KL, Davidson AR (2006) Ig-like domains on bacteriophages: a tale of promiscuity and deceit. *J Mol Biol* 359:496–507.
47. Freivalds J, Dislers A, Ose V, Skrastina D, Cielens I, Pumpens P, Sasnauskas K, Kazaks A (2006) Assembly of bacteriophage Q β virus-like

- particles in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 123:297–303.
48. Gasparavičiūtė R, Kropa A, Meškys R (2006) A new *Arthrobacter* strain utilizing 4-hydroxypyridine. *Biologija* 4:41–45.
 49. Glover DJ, Giger L, Kim SS, Naik RR, Clark DS (2016) Geometrical assembly of ultrastable protein templates for nanomaterials. *Nat Commun* 7:11771.
 50. Guntupalli R, Sorokulova I, Krumnow A, Pustovyy O, Olsen E, Vodyanoy V (2008) Real-time optical detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using lytic phage probes. *Biosens Bioelectron* 24:151–154.
 51. Guo P (2005) Bacterial virus phi29 DNA-packaging motor and its potential applications in gene therapy and nanotechnology. *Methods Mol Biol* 300:285–324.
 52. Hagens S, Loessner MJ (2010) Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Curr Pharm Biotechnol* 11:58–68.
 53. Han D, Pal S, Liu Y, Yan H (2010) Folding and cutting DNA into reconfigurable topological nanostructures. *Nat Nano* 5:712–717.
 54. Hwang DJ, Roberts IM, Wilson TM (1994) Expression of tobacco mosaic virus coat protein and assembly of pseudovirus particles in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9067–9071.
 55. Hyman P (2012) Bacteriophages and nanostructured materials. *Adv Appl Microbiol* 78:55–73.
 56. Kaliniene L, Klausas V, Truncaite L (2010) Low-temperature T4-like coliphages vB_EcoM-VR5, vB_EcoM-VR7 and vB_EcoM-VR20. *Arch Virol* 155:871–880.
 57. Kaliniene L, Simoliunas E, Truncaite L, Zajanckauskaite A, Nainys J, Kaupinis A, Valius M, Meskys R (2017) Molecular analysis of *Arthrobacter* myovirus vB_ArtM-ArV1: we blame it on the tail. *J Virol* 91:e00023-17.
 58. Karimi M, Mirshekari H, Moosavi Basri SM, Bahrami S, Moghoofei M,

- Hamblin MR (2016) Bacteriophages and phage-inspired nanocarriers for targeted delivery of therapeutic cargos. *Adv Drug Deliv Rev* 106:45–62.
59. Katsura I (1981) Structure and function of the major tail protein of bacteriophage lambda. Mutants having small major tail protein molecules in their virion. *J Mol Biol* 146:493–512.
 60. Katsura I (1983) Tail assembly and injection. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*; Volume 13: Lambda II 331–346.
 61. Katsura I, Hendrix RW (1984) Length determination in bacteriophage lambda tails. *Cell* 39:691–698.
 62. Katsura I, Tsugita A (1977) Purification and characterization of the major protein and the terminator protein of the bacteriophage λ tail. *Virology* 76:129–145.
 63. Kazi M, Annapure US (2016) Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *J Food Sci Technol* 53:1355–1362.
 64. Kellenberger E, Boy de la Tour E (1964) On the fine structure of normal and “polymerized” tail sheath of phage T4. *J Ultra Mol Struct R* 11:545–563.
 65. Kim M, Heu S, Ryu S (2014) Complete genome sequence of enterobacteria phage 4MG, a new member of the subgroup “PVP-SE1-like phage” of the “rV5-like viruses”. *Arch Virol* 159:3137–3140.
 66. King A, Lefkowitz E, Adams M, Carstens E (eds) (2011) Part I. Introduction. In: *Virus taxonomy. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Inc., San Diego, pp 1–20.
 67. King J (1968) Assembly of the tail of bacteriophage T4. *J Mol Biol* 32:231–262.
 68. King J (1971) Bacteriophage T4 tail assembly: four steps in core formation. *J Mol Biol* 58:693–709.
 69. Kostianen MA, Hiekkataipale P, Laiho A, Lemieux V, Seitsonen J, Ruokolainen J, Ceci P (2013) Electrostatic assembly of binary nanoparticle superlattices using protein cages. *Nat Nano* 8:52–56.
 70. Kostyuchenko VA, Chipman PR, Leiman PG, Arisaka F, Mesyanzhinov VV, Rossmann MG (2005) The tail structure of bacteriophage T4 and its

mechanism of contraction. *Nat Struct Mol Biol* 12:810–813.

71. Krickler M, Carlson K (1994) Isolation of T4 phage DNA. In: Karam J (ed) *Molecular biology of bacteriophage T4*. ASM Press, Washington, DC, pp 455–456.
72. Kropinski AM (2006) Phage therapy – everything old is new again. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 17:297–306.
73. Kropinski AM (2009) Measurement of the rate of attachment of bacteriophage to cells. *Methods Mol Biol* 501:151–155.
74. Kropinski AM, Waddell T, Meng J, Franklin K, Ackermann HW, Ahmed R, Mazzocco A, Yates J 3rd, Lingohr EJ, Johnson RP. (2013) The host-range, genomics and proteomics of *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage rV5. *Virology* 453:76–86.
75. Kube S, Wendler P (2015) Structural comparison of contractile nanomachines. *AIMS Biophysics* 2:88–115.
76. Kudryashev M, Wang RY-R, Brackmann M, Scherer S, Maier T, Baker D, DiMaio F, Stahlberg H, Egelman EH, Basler M (2015) Structure of the type VI secretion system contractile sheath. *Cell* 160:952–962.
77. Kurochkina LP, Aksyuk AA, Sachkova MY, Sykilinda NN, Mesyanzhinov VV (2009) Characterization of tail sheath protein of giant bacteriophage ϕ KZ *Pseudomonas aeruginosa*. *Virology* 395:312–317.
78. Kutanovas S, Rutkienė R, Urbelis G, Tauraitė D, Stankevičiūtė J, Meškys R (2013) Bioconversion of methylpyrazines and pyridines using novel pyrazines-degrading microorganisms. *Chemija* 24:67–73.
79. Kutter E, Sulakvelidze A (2005) Introduction. In: Kutter E, Sulakvelidze A (eds) *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 5–6.
80. Kuznetsova TA, Efimov AV, Aijrich LG, Kireeva IY, Marusich EI, Cappuccinelli P, Fiori P, Rappelli P, Kurochkina LP, Poglazov BF, Mesyanzhinov VV (1998) Properties of recombinant bacteriophage T4 tail sheath protein and its deletion fragments. *Biochemistry (Mosc)* 63:702–709.
81. Langlois C, Ramboarina S, Cukkemane A, Auzat I, Chagot B, Gilquin B,

- Ignatiou A, Petitpas I, Kasotakis E, Paternostre M, White HE, Orlova EV, Baldus M, Tavares P, Zinn-Justin S (2015) Bacteriophage SPP1 tail tube protein self-assembles into beta-structure-rich tubes. *J Biol Chem* 290:3836–3849.
82. Lee EJ, Lee NK, Kim I-S (2016) Bioengineered protein-based nanocage for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 106:157–171.
83. Lee J-W, Song J, Hwang MP, Lee KH (2013) Nanoscale bacteriophage biosensors beyond phage display. *Int J Nanomedicine* 8:3917–3925.
84. Lee S-Y, Lim J-S, Harris MT (2012) Synthesis and application of virus-based hybrid nanomaterials. *Biotechnol Bioeng* 109:16–30.
85. Leiman PG, Arisaka F, van Raaij MJ, Kostyuchenko VA, Aksyuk AA, Kanamaru S, Rossmann MG (2010) Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. *Virology Journal* 7:355.
86. Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA, Bonanno JB, Sauder JM, Pukatzki S, Burley SK, Almo SC, Mekalanos JJ (2009) Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4154–4159.
87. Leiman PG, Chipman PR, Kostyuchenko VA, Mesyanzhinov VV, Rossmann MG (2004) Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. *Cell* 118:419–429.
88. Leiman PG, Shneider MM (2012) Contractile tail machines of bacteriophages. *Adv Exp Med Biol* 726:93–114.
89. Li F, Wang Q (2014) Fabrication of nanoarchitectures templated by virus-based nanoparticles: strategies and applications. *Small* 10:230–245.
90. Lossi NS, Manoli E, Förster A, Dajani R, Pape T, Freemont P, Filloux A (2013) The HsiB1C1 (TssB-TssC) Complex of the *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system forms a bacteriophage tail sheathlike structure. *J Biol Chem* 288:7536–7548.
91. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
92. Mandal D, Nasrolahi Shirazi A, Parang K (2014) Self-assembly of peptides to nanostructures. *Org Biomol Chem* 12:3544–3561.

93. Mandel M., Higa A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53:159–162.
94. Merzlyak A, Indrakanti S, Lee S-W (2009) Genetically engineered nanofiber-like viruses for tissue regenerating materials. *Nano Lett* 9:846–852.
95. Miller ES, Kutter E, Mosig G, Arisaka F, Kunisawa T, Rüger W (2003) Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol R* 67:86–156.
96. Molek P, Bratkovic T (2015) Bacteriophages as scaffolds for bipartite display: designing swiss army knives on a nanoscale. *Bioconjug Chem* 26:367–378.
97. Moody MF (1967) Structure of the sheath of bacteriophage T4: I. Structure of the contracted sheath and polysheath. *J Mol Biol* 25:167–174.
98. Moody MF (1973) Sheath of bacteriophage T4: III. Contraction mechanism deduced from partially contracted sheaths. *J Mol Biol* 80:613–635.
99. Moon J-S, Kim W-G, Kim C, Park G-T, Heo J, Yoo SY, Oh J-W (2015) M13 bacteriophage-based self-assembly structures and their functional capabilities. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* 12:271–281.
100. Nam KT, Lee YJ, Krauland EM, Kottmann ST, Belcher AM (2008) Peptide-mediated reduction of silver ions on engineered biological scaffolds. *ACS Nano* 2:1480–1486.
101. Nicastro J, Sheldon K, Slavcev RA (2014) Bacteriophage lambda display systems: developments and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:2853–2866.
102. Nicastro J, Wong S, Khazaei Z, Lam P, Blay J, Slavcev RA (2016) Bacteriophage applications –historical perspective and future potential. *SpringerBriefs in biochemistry and molecular biology*. doi: 10.1007/978-3-319-45791-8.
103. Peabody DS (2003) A viral platform for chemical modification and multivalent display. *J Nanobiotechnology* 5.
104. Pell LG, Kanelis V, Donaldson LW, Howell PL, Davidson AR (2009) The phage λ major tail protein structure reveals a common evolution for

- long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4160–4165.
105. Phelps JP, Dao P, Jin H, Rasochova L (2007) Expression and self-assembly of cowpea chlorotic mottle virus-like particles in *Pseudomonas fluorescens*. *J Biotechnol* 128:290–296.
 106. Pickett GG, Peabody DS (1993) Encapsidation of heterologous RNAs by bacteriophage MS2 coat protein. *Nucleic Acids Res* 21:4621–4626.
 107. Pinheiro AV, Han D, Shih WM, Yan H (2011) Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology. *Nat Nano* 6:763–772.
 108. Pires DP, Cleto S, Sillankorva S, Azeredo J, Lu TK (2016) Genetically engineered phages: a review of advances over the last decade. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:523–543.
 109. Poglazov BF, Efimov AV, Marco S, Carrascosa J, Kuznetsova TA, Aijrich LG, Kurochkina LP, Mesyanzhinov VV (1999) Polymerization of bacteriophage T4 tail sheath protein mutants truncated at the C-termini. *J Struct Biol* 127:224–230.
 110. Pokorski JK, Steinmetz NF (2011) The art of engineering viral nanoparticles. *Mol Pharm* 8:29–43.
 111. Pumpens P, Renhofa R, Dishlers A, Kozlovska T, Ose V, Pushko P, Tars K, Grens E, Bachmann MF (2016) The true story and advantages of RNA phage capsids as nanotools. *Intervirology* 59:74–110.
 112. Quan S, Dabbs ER (1993) Nocardioform arsenic resistance plasmid characterization and improved *Rhodococcus* cloning vectors. *Plasmid* 29:74–79.
 113. Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5:172.
 114. Sambrook J, Russell D (eds) (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, pp 430–433.
 115. Santos SB, Kropinski AM, Ceysens P-J, Ackermann H-W, Villegas A, Lavigne R, Krylov VN, Carvalho CM, Ferreira EC, Azeredo J (2011) Genomic and proteomic characterization of the broad-host-range *Salmonella* phage PVP-SE1: creation of a new phage genus. *J Virol*

85:11265–11275. J Virol 85:11265–11273.

116. Sarris PF, Ladoukakis ED, Panopoulos NJ, Scoulica EV (2014) A phage tail-derived element with wide distribution among both prokaryotic domains: a comparative genomic and phylogenetic study. *Genome Biol Evol* 6:1739–1747.
117. Saunders K, Sainsbury F, Lomonosoff GP (2009) Efficient generation of *cowpea mosaicvirus* empty virus-like particles by the proteolytic processing of precursors in insect cells and plants. *Virology* 393:329–337.
118. Schmelcher M, Loessner MJ (2014) Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage* 4:e28137.
119. Schmelcher M, Loessner MJ (2016) Bacteriophage endolysins: applications for food safety. *Curr Opin Biotechnol* 37:76–87.
120. Schofield DA, Sharp NJ, Westwater C (2012) Phage-based platforms for the clinical detection of human bacterial pathogens. *Bacteriophage* 2:105–283.
121. Seeman NC (2010) Nanomaterials based on DNA. *Annu Rev Biochem* 79:65–87.
122. Semėnaitė R, Duran R, Marcinkevičienė L, Bachmatova I, Pacenkaitė J (2000) Degradation of pyridine and 2-hydroxypyridine by environmental *Rhodococcus* and *Arthrobacter* strains. *Biologija* 2:329–331.
123. Semėnaite R, Gasparaviciute R, Duran R, Precigou S, Marcinkeviciene L, Bachmatova I, Meškys R (2003) Genetic diversity of 2-hydroxypyridine-degrading soil bacteria. *Biologija* 2:27–29.
124. Seow Y, Wood MJ (2009) Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. *Mol Ther* 17:767–777.
125. Sharma PP, Rathi B, Rodrigues J, Gorobets NY (2015) Self-assembled peptide nanoarchitectures: applications and future aspects. *Curr Top Med Chem* 15:1268–1289.
126. Shen L, Zhou J, Wang Y, Kang N, Ke X, Bi S, Ren L (2015) Efficient encapsulation of Fe₃O₄ nanoparticles into genetically engineered hepatitis B core virus-like particles through a specific interaction for potential bioapplications. *Small* 11:1190–1196.

127. Shukla S, Dickmeis C, Nagarajan AS, Fischer R, Commandeur U, Steinmetz NF (2014) Molecular farming of fluorescent virus-based nanoparticles for optical imaging in plants, human cells and mouse models. *Biomater Sci* 2:784–797.
128. Šimoliūnas E, Kaliniene L, Stasilo M, Truncaitė L, Zajančauskaitė A, Staniulis J, Nainys J, Kaupinis A, Valius M, Meškys R (2014) Isolation and characterization of vB_ArS-ArV2 – first *Arthrobacter* sp. infecting bacteriophage with completely sequenced genome. *PLoS ONE* 9:e111230.
129. Šimoliūnas E, Kaliniene L, Truncaite L, Klausas V, Zajančauskaite A, Meškys R (2012) Genome of *Klebsiella* sp.-infecting bacteriophage vB_KleM_RaK2. *J Virol* 86:5406–5406.
130. Šimoliūnas E, Kaliniene L, Truncaitė L, Zajančauskaitė A, Staniulis J, Kaupinis A, Ger M, Valius M, Meškys R (2013) *Klebsiella* phage vB_KleM-RaK2 — a giant singleton virus of the family *Myoviridae*. *PLoS ONE* 8:e60717.
131. Šimoliūnas E, Vilkaitytė M, Kaliniene L, Zajančauskaitė A, Kaupinis A, Staniulis J, Valius M, Meškys R, Truncaitė L (2015) Incomplete LPS core-specific Felix01-like virus vB_EcoM_VpaE1. *Viruses* 7:6163–6181.
132. Smith MT, Wilding KM, Hunt JM, Bennett AM, Bundy BC (2014) The emerging age of cell-free synthetic biology. *FEBS Lett* 588:2755–2761.
133. Söding J, Biegert A, Lupas AN (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction *Nucleic Acids Res.* 33(Web Server issue): W244–W248.
134. Stanislauškiene R, Gasparaviciute R, Vaitekunas J, Meskiene R, Rutkiene R, Casaite V, Meskys R (2012) Construction of *Escherichia coli*-*Arthrobacter-Rhodococcus* shuttle vectors based on a cryptic plasmid from *Arthrobacter rhombi* and investigation of their application for functional screening. *FEMS Microbiol Lett* 327:78–86.
135. Stanislauškienė R, Rudenkov M, Karvelis L, Gasparavičiūtė R, Meškienė R, Časaitė V, Meškys R (2011) Analysis of phthalate degradation operon from *Arthrobacter* sp. 68b. *Biologija* 57:45–54.
136. Steele JFC, Peyret H, Saunders K, Castells-Graells R, Marsian J, Meshcheriakova Y, Lomonossoff GP (2017) Synthetic plant virology for nanobiotechnology and nanomedicine. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.*

doi: doi:10.1002/wnan.1447.

137. Strable E, Prasuhn DE, Udit AK, Brown S, Link AJ, Ngo JT, Lander G, Quispe J, Potter CS, Carragher B, Tirrell DA, Finn MG (2008) Unnatural amino acid incorporation into virus-like particles. *Bioconjug Chem* 19:866–875.
138. Suttle C (2005) Viruses in the sea. *Nature* 437:356–361.
139. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739.
140. Thiel K (2004) Old dogma, new tricks--21st century phage therapy. *Nat Biotechnol* 22:31–36.
141. Truncaite L, Šimoliūnas E, Zajanckauskaite A, Kaliniene L, Mankeviciute R, Staniulis J, Klausas V, Meskys R (2012) Bacteriophage vB_EcoM_FV3: a new member of “rV5-like viruses”. *Arch Virol* 157:2431–2435.
142. Tschopp J, Arisaka F, van Driel R, Engel J (1979) Purification, characterization and reassembly of the bacteriophage T4D tail sheath protein P18. *J Mol Biol* 128:247–258.
143. Uhde-Holzem K, McBurney M, Tiu BDB, Advincula RC, Fischer R, Commandeur U, Steinmetz NF (2016) Production of immunoabsorbent nanoparticles by displaying single-domain protein A on potato virus X. *Macromol Biosci* 16:231–241.
144. Vodnik M, Zager U, Strukelj B, Lunder M (2011) Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack. *Molecules* 16:790–817.
145. Webster DE, Thomas MC (2012) Post-translational modification of plant-made foreign proteins; glycosylation and beyond. *Biotechnol Adv* 30:410–418.
146. Weinbauer MG (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* 28:127–181.
147. Wen AM, Steinmetz NF (2016) Design of virus-based nanomaterials for

medicine, biotechnology, and energy. *Chem Soc Rev* 45:4074–4126.

148. Wikoff WR, Liljas L, Duda RL, Tsuruta H, Hendrix RW, Johnson JE (2000) Topologically linked protein rings in the bacteriophage HK97 capsid. *Science* 289:2129–2133.
149. Wommack KE, Colwell RR (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:69–114.
150. Yacoby I, Benhar I (2008) Targeted filamentous bacteriophages as therapeutic agents. *Expert Opin Drug Deliv* 5:321–329.
151. Yim PB, Clarke ML, McKinstry M, De Paoli Lacerda SH, Pease LF 3rd, Dobrovolskaia MA, Kang H, Read TD, Sozhamannan S, Hwang J (2009) Quantitative characterization of quantum dot-labeled lambda phage for *Escherichia coli* detection. *Biotechnol Bioeng* 104:1059–1067.
152. Yokoi N, Inaba H, Terauchi M, Stieg AZ, Sanghamitra NJM, Koshiyama T, Yutani K, Kanamaru S, Arisaka F, Hikage T, Suzuki A, Yamane T, Gimzewski JK, Watanabe Y, Kitagawa S, Ueno T (2010) Construction of robust bio-nanotubes using the controlled self-assembly of component proteins of bacteriophage T4. *Small* 6:1873–1879.
153. Yuan Y, Gao M (2017) Jumbo Bacteriophages: An Overview. *Front Microbiol.* 8:403.
154. Zhang F, Nangreave J, Liu Y, Yan H (2014) Structural DNA nanotechnology: state of the art and future perspective. *J Am Chem Soc* 136:11198–11211.
155. Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9:40.