

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos II kurso studentė

Manta VAIČIKAUSKAITĖ

Magistro darbas

**Reguliuojamos raiškos sistemos kūrimas termofilinėms *Geobacillus* ir
Parageobacillus genčių bakterijoms**

Darbo vadovas

Dr. Arnoldas Kaunietis

Vilnius 2020

Reguliuojamos raiškos sistemos kūrimas termofilinėms *Geobacillus* ir *Parageobacillus* genčių bakterijoms

Darbas atliktas

Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre, Biomokslų instituto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje

Darbą atliko: Manta VAIČIKAUSKAITĖ

Darbo vadovas: Dr. Arnoldas KAUNIETIS

TURINYS

SANTRUMPŲ SAŖAŠAS.....	5
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Termofilinės bakterijos.....	8
1.1.1. <i>Geobacillus</i>	9
1.1.2. <i>Parageobacillus</i>	10
1.2. Termofiliniu bakteriju privalumai lyginant su mezofilais	10
1.3. Termofilinių bakterijų panaudojimas biotechnologijoje	12
1.3.1. Termostabilūs fermentai iš termofilinių bakterijų	12
1.3.2. Biomasės vertimas į kurą ar chemines medžiagas	14
1.3.3. Termofilinės bakterijos bioremediacijoje.....	15
1.4. <i>Geobacilų</i> ir <i>parageobacilų</i> raiškos sistemos.....	16
1.4.1. Plazmidiniai vektoriai	16
1.5. Nizinas ir jo autoindukcijos mechanizmas	18
1.5.1. NICE sistema.....	19
1.6. <i>Geobacilinas I</i>	20
2. Medžiagos ir metodai.....	21
2.1. Darbe naudotos medžiagos, prietaisai, vektoriai bakterijų kamienai ir terpės.....	22
2.1.1. Darbe naudotos medžiagos.....	22
2.1.2. Darbe naudoti fermentai.....	22
2.1.3. Darbe naudoti vektoriai.....	23
2.1.4. Darbe naudoti bakterijų kamienai.....	23
2.1.5. Darbe naudotos bakterijų kultivavimo terpės ir auginimo sąlygos.....	23
2.1.6. Darbe naudoti pradmenys.....	24
2.2. Metodai.....	25
2.2.1. Bioinformatinė analizė.....	25
2.2.2. DNR išskyrimas ir valymas.....	25
2.2.3. DNR elektroforezė agarozės gelyje	26

2.2.4.	Elektrokompetentinių termofilinių bakterijų ląstelių paruošimas.....	26
2.2.5.	Elektrokompetentinių <i>E. coli</i> ląstelių ruošimas	26
2.2.6.	Elektroporacija.....	27
2.2.7.	Protoplastų transformacija.....	27
2.2.8.	pUCG3.8 vektoriaus konstravimas	28
2.2.9.	<i>P</i> <i>geoA</i> , <i>geoA</i> ir <i>geoRK</i> genų klonavimas į pUCG18 vektorių.....	29
2.2.10.	Geno koduojančio GFP klonavimas į pUCG18-PGeoA	29
2.2.11.	pMS konstrukto gamyba	29
2.2.12.	<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ir <i>G. stearothermophilus</i> NUB3621R kamienų atsparumo chloramfenikoliui ir kanamicinui nustatymas	30
2.2.13.	<i>KNT</i> geno keitimas pMS vektoriuje į <i>cat</i>	30
3.	REZULTATAI	31
3.1.	Bioinformatinė analizė	31
3.2.	pUCG18 vektoriaus mažinimas į pUCG3.84.....	32
3.3.	Genų koduojančių <i>P</i> GeoA, GeoA ir GeoRK klonavimas į pUCG3.84.....	33
3.4.	Genų koduojančių P <i>geoA</i> , <i>geoA</i> ir <i>geoRK</i> klonavimas į pUCG18.	34
3.5.	Geno koduojančio GFP klonavimas į pUCG18-PGeoA-GeoA.	34
3.6.	GeoR ir GeoK genų klonavimas į pUCG18-PGeoA-sfGFP.....	35
3.7.	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> DSM 465 ir <i>Geobacillus stearothermophilus</i> NUB3621R kamienų atsparumo chloramfenikoliui ir kanamicinui tyrimas	35
3.8.	Konstrukto pMS-GFP transformacija į <i>Geobacillus</i>	36
3.9.	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> NUB3621R protoplastų transformacija.....	37
3.10.	Numatyti eksperimentai	38
3.10.1.	pMS-cat-GFP konstrukto gamyba	38
3.10.2.	pMSN-GFP Vektoriaus gamyba.....	38
3.10.3.	pMS raiškos sistemos efektyvumo tyrimas	39

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

ABC – ATP prisijungianti kasetė (angl. ATP-binding casette)

Aps/min – apsisukimai per minutę

ATP – adenzino trifosfatas (angl. adenosine triphosphate)

Cam^R – atsparumas chloramfenikoliui (angl. resistance to chloramphenicol)

DNR – Deoksiribonukleorūgštis

Kan^R – atsparumas kanamicinui (angl. resistance to kanamycin)

bp – bazių poros

LB – Luria-Bertani

MB – maitinamasis bulijonas

MCS – daugybinis klonavimo regionas (angl. multiple cloning site)

mTGP – modifikuota triptono glicerolio piruvato terpė

NICE – nizino kontroliuojama raiškos sistema (angl. Nisin Controlled Expression System)

OT – optinis tankis

PG – protoplastų gaminimo terpė

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

RC – riedančio rato mechanizmas (angl. Rolling Circle)

sfGFP – ypač gerai išsilankstantis žaliai fluorescuojantis baltymas (angl. superfolder Green Fluorescent Protein)

SOC – super optimalus bulijonas, su katabolitų represija (Super Optimal Broth with Catabolite repression)

TAE – tris bazė, acto rūgštis, EDTA

IVADAS

Termofilinėmis bakterijomis laikomi mikroorganizmai, kurie auga temperatūrose nuo 60 °C iki 80 °C. Dėl augimo aukštesnėje temperatūroje ir įvairiose aplinkose šios bakterijos turi įvairų metabolizmą ir unikalias makromolekulines ypatybes, dėl kurių turi aukštą medžiagų apykaitos lygį bei sintetina fiziškai ir chemiškai stabilius fermentus.

Ši gebėjimą turi ir *Parageobacillus* bei *Geobacillus* genčių bakterijos. Dėl savo augimo sąlygų šios bakterijos geba sintetinti termostabilius ir komerciškai naudingus fermentus (amilazes, hemiceliulazes, lipazes, polimerazes ir t.t.) bei chemines medžiagas (laktatą, formatą, acetatą, etanolį, gintaro rūgštį ir t.t.). Taip pat gali būti panaudojamos bioetanolio gamybai ir aplinkosaugai. Be to, pastaruoju metu vis daugiau tiriamas *Geobacillus* bakterijų potencialas sintetinant antimikrobinius peptidus.

Siekiant plačiau pritaikyti šias bakterijas biotechnologijoje, atsiranda poreikis jas modifikuoti, įterpti naujus genus, keisti esamus ar sustiprinti jau esamų genų sintezę. Šiuo metu vis daugiau dėmesio skiriama šių bakterijų raiškos sistemoms ir transformacijų metodams kurti. Kol kas šių bakterijų genetinei transformacijai atlikti daugiausia naudojami šaudykliniai vektoriai, bei keletas jų pagrindu sukurtų reguliuojamų genų raiškos sistemų, tačiau dažniausiai jos yra tinkamos tik vienam kamienui arba nėra pakankamai efektyvios, kad būtų plačiai pritaikomos. Lyginant su raiškos sistemomis sukurtomis *Echerichia coli* ir *Bacillus subtilis* bakterijoms, (*Para*)*Geobacillus* genčių bakterijos šiuo atžvilgiu stipriai atsilieka.

Šio darbo metu mes siekėme sukurti efektyvią ir reguliuojamą baltymų raiškos sistemą, skirtą (*Para*)*Geobacillus* genčių bakterijoms, naudodami *Geobacillus* bakterijų sintetinamo bakteriocino geobacilino I autoindukcijos mechanizmą.

Darbo tikslas:

Sukurti reguliuojamą baltymų raiškos sistemą termofilinėms *Parageobacillus* ir *Geobacillus* genčių bakterijoms.

Darbo uždaviniai:

- Identifikuoti geobacilino I genų klasterį ir jame esančias už bakteriocino raišką atsakingas DNR sekas *Geobacillus thermodenitrificans* DSM465 bakterijos genome.
- Sumažinti pUCG18 plazmidę, pašalinant nereikalingas ir nekoduojančias DNR sekas.

- Į modifikuotą pUCG18 plazmidę įterpti geobacilino I raišką reguliuojančias sekas.
- Gautame konstrukte, už bakteriocino promotoriaus, įterpti reporterinio žaliai fluorescuojančio baltymo geną.
- Šį konstruklą perkelti į *(Para)Geobacillus* bakterijas ir įvertinti sukurtos sistemos efektyvumą bei optimizuoti jos veikimo sąlygas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Termofilinės bakterijos

Termofilinėmis bakterijomis laikomi mikroorganizmai, kurių optimali augimo temperatūra yra nuo 60 °C iki 80 °C. Šios bakterijos dažniausiai auga karštosiose versmėse, išgyvena temperatūrose, aukštesnėse nei 70 °C. Tik keletas eukariotų gali augti tokioje temperatūroje, nors yra žinoma, kad kai kurie grybeliai gali augti esant 50 - 55 °C (Turner et al., 2007). Dėl augimo aukštoje temperatūroje ir unikalių makromolekulinių ypatybių termofilai turi aukštą medžiagų apykaitos lygį, fiziškai ir chemiškai stabilius fermentus, bei aukštesnius galutinio produkto kiekius, nei panašios mezofilinių bakterijų rūšys (Mehta et al., 2016).

Natūrali aplinka anaerobinėms termofilinėms bakterijoms varijuoja nuo sausumos vulkaninių vietovių, kur temperatūra šiek tiek viršija aplinkos temperatūrą, iki povandeninių hidroterminių sistemų (nuosėdų, povandeninių vulkanų), kuriose temperatūra gali viršyti 300 °C. Termofilinės bakterijos gali augti ir požeminėse vietovėse, kaip naftos rezervuarai, ant saulės įkaitintų žemės paviršių ar žmogaus sukurtoje aukštos temperatūros aplinkoje, pavyzdžiui, komposto dėžėje ar vandens šildytuve. Šių bakterijų platų paplitimą įrodo didelė įvairovė vietų, iš kurių šios bakterijos buvo išskirtos: ką tik nukritęs sniegas, Sacharos dykumos smėlis, vidutinio ir tropikų klimato dirvožemis, oras, druskingas ir gėlas vanduo.

Temperatūros toleranciją šiuose mikroorganizmuose lemia šie faktoriai:

- Pralaidumas. Ląstelių membranos efektyviai funkcionuoja kaip pralaidumo barjerai, kontroliuojantys patenkančių ir išeinančių mažo molekulinio dydžio junginių judėjimą. Riebiųjų acilo esterių lipidų membranos kinta priklausomai nuo temperatūros ir jų fazės kitimo temperatūra yra priklausoma nuo riebiųjų rūgščių kompozicijos. Pakitus augimo temperatūrai membranos lipidų riebiųjų rūgščių kompozicija yra greitai reguliuojama;
- Cheminis stabilumas. Termofiliniai organizmai gali augti aukštoje temperatūroje dėl jų membranos lipidų cheminio stabilumo;
- Temperatūra. Lipidai, kurių proporcijos auga kylant temperatūrai gali būti paskirti „termofiliniams lipidams“. Augimo temperatūrai pakilus nuo 45 °C iki 65 °C dieterinių archeolio pagrindu sudarytų lipidų kiekis sumažėja nuo 80 % iki 20 %, o standartinių, cholesterolio pagrindu sudarytų lipidų ir ciklinių archeolio pagrindu sudarytų lipidų kiekis išauga nuo 10 % iki 40 %;
- G+C bazių porų kiekis. Termofilinių organizmų rRNR ir tRNR molekulės turi didesnę G+C bazių porų kiekį nei mezofilų, kadangi GC bazių pora turi daugiau vandenilinių

ryšių nei AT bazių pora. Didesnis G+C kiekis dvigrandžiuose molekulės regionuose pagerina RNR molekulių stabilumą;

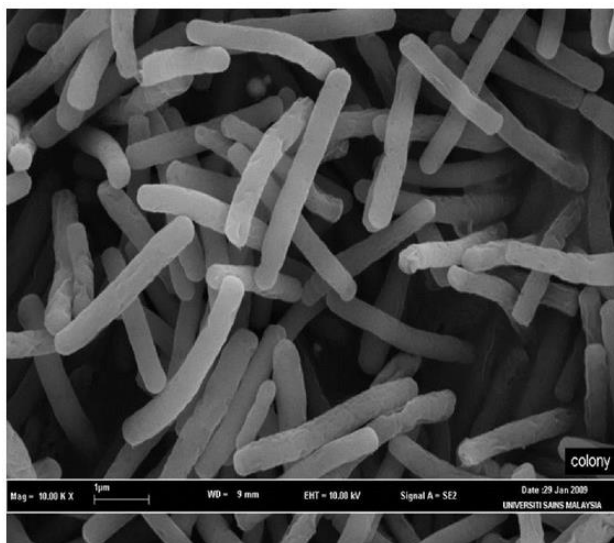
- Baltymai. Termofilinių baltymų paviršiaus regionai turi mažiau krūvio neturinčių polinių amino rūgščių ir daugiau krūvį turinčių amino rūgščių. Šios krūvį turinčios amino rūgščių liekanos padidina tarpmolekulinių tiltelių kiekį ir baltymų stabilumą.

Mikroorganizmų gebėjimas išgyventi nepalankiose sąlygose skatina mokslininkus tyrinėti šiuos organizmus, kad geriau suprastų jų charakteristikas ir galiausiai galėtų panaudoti juos įvairiose srityse (Mehta et al., 2016).

1.1.1. *Geobacillus*

Geobacillus spp. bakterijos yra gramteigiamos termofilinės aerobinės ar fakultatyviai aerobinės sporas formuojančios bacilos (1.1 pav.), jų optimali augimo temperatūra yra tarp 45 – 75 °C. Šios bakterijos yra plačiai paplitusios mūsų aplinkoje, jas galima izoliuoti iš komposto, karštųjų versmių ir įvairių gilių geoterminių šaltinių, kaip naftos gręžiniai ar gilūs sedimentai. Tačiau šiomis vietomis *Geobacillus* spp. bakterijos neapsiriboja. Jas taip pat galima rasti ir vėsesnėje aplinkoje, pavyzdžiui, giliuose jūrų vandenyse. Šitokio paradoksalaus pasiskirstymo priežastis yra *Geobacillus* organizmų gebėjimas formuoti sporas, kurios yra atsparios ultravioletinei (UV) šviesai, išdžiūvimui, ir terminiam inaktyvavimui (Zeigler, 2013; Hussein et al., 2015).

Šios bakterijos geba sintetinti ir į aplinką išskirti platų asortimentą komerciškai naudingų fermentų, tokių kaip amilazės, hemiceliulazės, lipazės, *Geobacillus* rūšys gali gaminti egzopolisacharidus ir bakteriocinus, gali būti panaudojamos gaminant biokurą ir bioremediacijoje. Nauji jų panaudojimo būdai vis dar atrandami (Novik et al., 2018).



1.1 pav. *Geobacillus thermodenitrificans* bakterijų nuotrauka, padaryta skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (Balan et al., 2012)

1.1.2. *Parageobacillus*

Parageobacillus genties bakterijos taipogi yra gramteigiami fakultatyviniai anaerobiniai termofiliniai organizmai. Šios genties bakterijos yra izoliuojamos iš plataus aukštos temperatūros aplinkos diapozono, įskaitant karštąsias versmes, gilius naftos šulinius ir dykumos smėlį (Mohr, Aliyu, Küchlin, Zwick, Cowan, Neumann, Maayer, 2018; Zeigler, 2013). Šios genties organizmų termofilinė prigimtis lemia augantį susidomėjimą jomis kaip šaltiniu pramonėje naudingų termostabilių fermentų, tokių kaip lipazės, proteazės, hemiceliulazės. Be to, kyla susidomėjimas, siekiant šiuos organizmus panaudoti kaip visos ląstelės biokatalizatorius įvairiuose biotechnologiniuose procesuose: bioetanolio gamyboje, lininių pluoštų biologiniame perdirbime ir aplinkos teršalų bioremediacijoje.

Už platų *Parageobacillus* spp. bakterijų panaudojimą iš dalies yra atsakingos jų plačios metabolinės galimybės. Jos gali utilizuoti didelį spektrą įvairių kompleksinių polisacharidų ir oligosacharidų augimui, įskaitant hemiceliuliozę, angliavandenius ir aromatinius junginius. Taip pat, *Parageobacillus* genties bakterijos, augdamos anaerobinėje aplinkoje, gali gaminti laktatą, formatą, acetatą, etanolį ir gintaro rūgštį, naudodamos įvairovę rūgšties fermentavimo kelių (Hussein et al., 2015; Mohr et al., 2018).

1.2. Termofiliniu bakteriju privalumai lyginant su mezofilais

Bendrai kalbant, reguliacijos mechanizmai biosintetiniuose ir kataboliniuose keliuose nesiskiria termofilinėse ir mezofilinėse bakterijose. Egzistuoja tik keletas pavyzdžių, kuriuose termofilai gali panaudoti substratus efektyviau nei mezofilai, tačiau abiejų šių grupių bakterijų reguliacijos keliai yra tokie pat ir tiek pat įvairūs. Turint tai omenyje, norint panaudoti termofilus įvairiose srityse, susiduriama su panašiomis problemomis. Tačiau termofilai kartu su ekstremaliais termofilais turi keletą privalumų, planuojant juos panaudoti biotechnologiniuose procesuose.

Laukinio tipo organizmų ląstelės yra tinkamai sureguliuotos, kad galėtų efektyviai konkuruoti kartu su kitais organizmais dėl anglies (C), azoto (N), energijos šaltinio ir gyvenamosios vietos. Dauguma organizmų yra perėję evoliucinę selekciją tam, kad galėtų augti ir skurdesnėje aplinkoje ar sąlygoms pasidarius nepalankioms. Siekiant panaudoti tokius organizmus biotechnologijoje, patraukli savybė yra šios subalansuotos reguliacijos nebuvimas. Dauguma termofilinių organizmų yra išskiriami iš ekstremalios aplinkos su mažesne kitų organizmų įvairove ir mažesniu maistinių medžiagų kiekiu. Ši savybė gali suteikti termofiliniams organizmams privalumą, kadangi šie organizmai dažnai neturi tinkamų

reguliacijos kelių augant aplinkoje, kurioje netrūksta maistinių medžiagų, ir tokioje aplinkoje jie gali būti lengvai priverčiami daugintis daugiau nei įprastai (Wiegel et al., 2008). Lyginant su mezofiliniais organizmais, naudojant greitai besidauginančias termofilines bakterijas, fermentacijos procesą galima pagreitinoti 2 – 3 kartus (Kambourova, 2018).

Kitas privalumas yra tas, kad termofiliniai organizmai yra nepatogeniniai ir jų augimo sąlygos nužudo arba inhibuoja patogeninių organizmų augimą, šių organizmų kultivavimo sąlygos sumažina riziką mikrobiniam užterštumui. Aukšta fermentavimo temperatūra sumažina kultūros skysčių klampumą, padidina paprastai sunkiai tirpių polimerinių medžiagų ir riebalų tirpumą (Kambourova, 2018).

Jų augimas aukštoje temperatūroje taip pat laikomas privalumu įvairiose fermentacijos reakcijose, siekiant sumažinti fermentacijos kaštus. Visų pirma, sumažėja išlaidos šaldant fermentatorius. Tai yra naudinga, kai naudojamas substratas būna sterilizuojamas garu arba bent jau paveiktas karščiu. Tuo atveju, jei fermentatoriaus vėsinimas yra reikalingas, jis yra daug efektyvesnis nei auginant mezofilinę kultūrą, dėl didesnio temperatūrų skirtumo. Be to, aukštesnės temperatūros fermentacijose reikalingas mažesnis energijos kiekis tiesioginei lakaus produkto, pavyzdžiui, etanolio, distiliacijai. Jei auginamos anaerobinės termofilinių bakterijų kultūros, gali būti naudojami patys paprasčiausi fermentatoriai, kuriuose nėra aeracijos sistemų ir naudojamas paprastas maišymo mechanizmas. Be to, aukštesnėje temperatūroje sumažėja deguonies tirpumas, tad lengviau palaikyti anaerobines sąlygas. (Wiegel et al., 2008).

Termofilinės bakterijos yra termostabilių fermentų šaltinis. Tokie fermentai yra atsparesni proteolizei ir cheminiam denatūravimui. Šių fermentų stabilumas sumažina fermentų „senėjimo“ procesą, tai yra ypač svarbu komerciniam panaudojimui, nes leidžia juos laikyti kambario temperatūroje su ilgesniu gyvavimo laiku ir stabilumu. Šie fermentai gali būti naudojami terpėse su įvairiais komponentais ir tirpikliais, kadangi jie išlaiko savo aktyvumą aplinkoje esant įvairių organinių tirpiklių ir detergentų. Taip pat, šie fermentai yra mažiau paveikiami gryninimo metu ir išlaiko savo aktyvumą, reikalingą biotechnologiniams procesams (Kambourova, 2018).

Kiti termofilinių organizmų siūlomi privalumai:

- Didelis metabolinis aktyvumas, dėl kurio gaunamas didesnis produkto formavimosi greitis;
- Reakcijos stabdymui nėra poreikio šaldyti kultūrą žemiau 20 °C;
- Aukštesnės temperatūros sąlygose padidėja difuzijos greitis ir cheminių medžiagų tirpumas (Wiegel et al., 2008).

Termostabilūs mikroorganizmų fermentai yra plačiai tyrinėjami pastaruosius du dešimtmečius, tačiau termofilais ir jų baltymų gebėjimu funkcionuoti aukštesnėje temperatūroje pradėta domėtis dar XX amžiaus šeštame dešimtmetyje Brocko ir jo kolegų (Brock et al., 1969). Ši susidomėjimo augimą lėmė molekulinės biologijos technologijų atsiradimas, leidžiantis genetinę analizę ir genų perkėlimą į raiškos kamienus. Šie atradimai taip pat skatino termofilinių organizmų išskyrimą iš aukštų temperatūrų aplinkos, tam kad būtų atrasti nauji termostabilūs fermentai, siekiant praplėsti fermentinių bioprocėsų panaudojimą (Turner et al., 2007). Vienas ankstyviausių sėkmingai komercijoje panaudotų tokio tipo fermentų yra *Taq* polimerazė (Chien et al., 1976), PGR reakcijose, DNR pagausinimui. Nuo to laiko dar daugelis kitų DNR modifikuojančių fermentų atrastų termofiliniuose organizmuose buvo komercializuota. Kita sritis, kėlusi daug susidomėjimo termofilinėmis bakterijomis, tai perspektyva panaudojimui technologiniuose procesuose, dažnai didelėmis apimtimis. (Turner et al., 2007).

Yra atlikta keletas tyrimų, kuriuose nustatyti termostabilūs fermentai iš mezofilinių ar net psichofilinių mikroorganizmų, tačiau termofilinės bakterijos yra natūralus ir labiausiai potencialus termostabilių fermentų šaltinis (Styles et al., 2017; Sato et al., 2017; Potprommanee et al., 2017). Keletas tokių fermentų pavyzdžių:

- Lipazės (EC 3.1.1.3). šios grupės fermentai katalizuoja ilgus grandinės acilglicerolių esterio ryšių hidrolizę. Dauguma žinomų lipazių yra aktyvios temperatūroje tarp 30 – 60 °C, 2013 metais buvo išskirta lipazė iš *Geobacillus* genties bakterijos, kuri buvo aktyvi esant 80 °C temperatūrai (Blamey, 2013). Lipazės naudojamos gaminant detergentus, daug termostabilių lipazių jau panaudotos, kaip detegentų priedai (Tang et al., 2017). Lipazės taip pat naudojamos popieriaus gamintojų, kad būtų pašalinti hidrofobiniai medienos komponentai, bei išgauti vertingiems produktams iš natūralių šaltinių.

- Ksilanazės (3.2.1.8). Šie fermentai priklauso glikozidazių klasės fermentams ir yra naudojami ksilanui, pagrindiniam hemiceliuliozės komponentui, degraduoti. Ksilanazės naudojamos kaip chloro atmaina celiuliozės masei balinti, hidrolizuoti augalinę masę iki fermentuojamų cukrų arba dalinai degraduoti, siekiant paruošti galvijų ir paukščių pašarus.

- Nitrilazės (EC 3.5.5.1). Jos katalizuoja tiesioginį nitrilų pavertimą į atitinkamas karboksirūgštis. Naudojama nitrilus paversti į netoksiškus ir nekancerogeniškus junginius, sintetinti α - ir β -aminorūgštis, bioremediacijoje.

- Transaminazės (EC 2.6.1.X). Dar žinomos kaip aminotransferazės (TA). Šios grupės fermentai katalizuoja amino grupės (-NH₂) perkėlimą nuo donorinio substrato (paprastai amino rūgšties) ant recipientinio substrato karbonilo grupės (-C=O). Šie fermentai yra dažnai

pasitaikantys gamtoje, kadangi yra dalis centrinio organizmų metabolizmo, tačiau termofilų transaminazių šiuo metu aprašyta tik keletas. TA naudojamos organinėje sintezėje ir farmacijos pramonėje. Šie fermentai yra gamtai draugiški ir jų reakcijų metu susidaro mažai pašalinių produktų. Termofilinių TA naudojimas leidžia didesnę reakcijų suderinamumą su organiniais tirpikliais dėl jų stabilumo. TA taip pat plačiai naudojamos aminų sintezėje, o šiuos fermentus naudojant su kitais fermentais galima sintetinti įvairias chemines medžiagas iš biomasės.

- Keletas kitų fermentų iš termofilinių bakterijų naudojamų pramonėje yra glutamato dehidrogenazės (EC 1.4.1.2/1.4.1.3/1.4.1.4.) ir lakazės (EC 1.3.10.2) (Atalah et al., 2019).

1.3.2. Biomasės vertimas į kurą ar chemines medžiagas

Pastaraisiais metais, daug dėmesio skiriama ieškant naujų šaltinių energijos gamybai, ypač bioenergijos gamybai, kadangi visame pasaulyje kyla nerimas dėl tuštėjančių fosilijų kuro rezervuarų ir klimato pokyčių. Skystas biokuras (bioetanolis, biodyzelis, biobutanolis) yra gaunamas fermentuojant medžiagas kaip krakmolą ir lignoceliuliozinę biomasę ar ekstrahuojant lipidines frakcijas iš augalų ar mikroorganizmų. Tradicinis organizmas, naudojamas etanolio gamyboje yra *Saccharomyces cerevisiae*, tačiau šios mielės neturi reikiamų metabolinių kelių, kad sunaudotų pentozinių cukrus, pagrinde ksilozę, gaunamą iš lignoceliuliozės. Gebėjimą fermentuoti ksilozę buvo badoma suteikti įvairiems mielių kamienams naudojantis genų inžinerijos metodais (Maris et al., 2006). Be mielių, daug dėmesio buvo skiriama mezofilinių bakterijų, kurios natūraliai gali vartoti pentozinių ir heksozinių cukrus, metabolinei inžinerijai, kad galėtų gaminti etanolį. Buvo sukurta keletas rūšių mezofilinių bakterijų, gebančių gaminti etanolį iš gliukozės, ksilozės ir kitų cukrų, tačiau šios bakterijos nebuvo tinkamos panaudojimui pramonėje (Dien, 2003; Talarico et al., 2005).

Yra pripažinta, kad termofiliniai organizmai, lyginant su mezofiliniais, turi keletą pranašumų, naudojant juos bioetanolio gamybos procesų kūrime. Visų pirma, jų augimo temperatūra yra aukšta ir palengvina žaliavos vertimą į produktą ir sumažina fermentatoriaus vėsinimo kaštus, tuo tarpu palengvinant etanolio pašalinimą ir išgavimą. Be to, jau anksčiau minėta, kad termofilinės bakterijos geba utilizuoti platų spektrą substratų ir turi unikalių bei stabilių fermentų, kuriuos galima panaudoti tokiuose procesuose (Cripps et al., 2009).

Geobacillus genties bakterijos yra žinomos, kaip potenciali platforma bioetanoliumi gaminti. Šios bakterijos auga iki didelio ląstelių tankio ir geba utilizuoti didelę įvairovę polimerinių ar trumpų oligomerinių angliavandenių augimui. Be to pastaraisiais metais pradėjo atsirasti genetiniai įrankiai, kurių dėka galima patobulinti šių bakterijų natūralų gebėjimą

gaminti etanolį padidinant jo išeigas (Cripps et al., 2009; Zyl et al., 2014) ar net pridėti kelius, sintetinti ne natyviems produktams, pavyzdžiui, izobutanoliui (Lin et al., 2014).

1.3.3. Termofilinės bakterijos bioremediacijoje

Kylant aplinkos taršos lygiui, didėja poreikis tą taršą mažinti. Pastaraisiais metais tam sutelkta daug dėmesio. Dažniausiai sintetiniai teršalai degraduoja labai lėtai natūralioje aplinkoje, todėl jiems pašalinti yra reikalingi intensyvesni ir efektyvesni metodai. Vienas jų – bioremediacija. Tai aplinkos teršalų apdirbimo technologija, kurioje mikroorganizmų pagalba teršalai sumažinami, pašalinami ar paverčiam į gerybinius produktus. Ši technologija yra gamtai draugiška ir efektyvi atmaina įprastiniams metodams, kurie yra brangesni, reikalauja daug įvairių reagentų bei lėšų ir generuoja didelius kiekius kitokių atliekų, kurias reikia pašalinti (Sar et al., 2013).

Termofiliniai organizmai turi natūralų gebėjimą augti aukštesnėje temperatūroje kartu su kitais gyvenimui nepalankiais rodikliais, pavyzdžiui, sunkiaisiais metalais ar kitomis medžiagomis, įprastai stabdančiomis organizmų augimą. Dėl savo augimo įvairioje aplinkoje, termofilinės bakterijos turi unikalią ląstelės sienelės struktūrą bei metaboles ir fermentines savybes, kurios leidžia šios organizmus pritaikyti bioremediacijoje. Jau yra parodyta, kad termofiliniai organizmai geba efektyviau pasisavinti sunkiuosius metalus ir juos versti į kitus produktus, kurie nėra kenksmingi aplinkai. Šios bakterijos taip pat geba redukuoti didelę įvairovę metalų įskaitant Mn (IV), Cr (VI), U (VI), Tc (VII), Co (III), Mo (VI), Au (I, III) ir Hh (II). Šis jų gebėjimas gali būti naudojamas imobilizuoti toksiniams metalams ir radionuklidams iš karšto nuotekų vandens ar radioaktyvių atliekų bioremediacijoje (Sar et al., 2013).

Termofilai taip pat yra naudojami neapdirbtos naftos ar apdirbtų degalų taršai mažinti. Šie mikroorganizmai geba augti žalioje naftoje ją skaidydami ir naudodami kaip anglies šaltinį. Šioje bioremediacijos srityje didžiausią potencialą turi *Bacillus* ir *Geobacillus* genčių bakterijos, yra nustatyta daug šių genčių kamienų, galinčių augti naftoje (Mohr et al., 2018; Margesin, 2001).

Fenolis ir fenoliniai junginiai priklauso vienai didžiausių aplinkos teršalų grupių, dėl jų plataus naudojimo kaip antibakterinių ir antigrybelinių medžiagų. *Geobacillus* bakterijų gebėjimas metabolizuoti aromatinius junginius išnaudojamas pašalinti tokiems teršalams (Feitkenhauer et al., 2003).

Akrilamidas yra monomeras plačiai naudojamas poliakrilamidų sintezėje. Šis junginys yra neurotoksinis, genotoksinis ir kancerogeninis. Šiuo metu akrilamidu yra užteršiamas vanduo ir žemė. 2013 metais buvo izoliuotas ir charakterizuotas *G. thermoglukosidasus* AUT-01 kamienas, kuris geba degraduoti akrilamidą, koncentracijose iki 7 mM (Cha et al., 2013).

Termofilai savo fermentų arsenale turi lakazę. Šis fermentas, išskirtas iš *Geobacillus thermocatenulatus* MS5 kamieno, turi didelį katalitinį aktyvumą, yra ekonomiškas, ir stabilus įvairiose temperatūrose bei pH. Verma ir Shikot išgrynino šį fermentą ir savo tyrimų metu parodė jo efektyvumą įvairių tekstilinių dažų boremediacijoje (Ambika Verma et al., 2014).

1.4. *Geobacilų* ir *Parageobacilų* raiškos sistemos

Iš anksčiau aptartų skyrelių matyti, kad *Geobacillus* ir *Parageobacillus* genčių bakterijos, dėl savo turimo metabolizmo ir fermentų arsenalo, turi didelį potencialą panaudojimui įvairiose srityse, nuo paprasčiausių fermentacijos reakcijų iki sudėtingų sunkiųjų metalų imobilizacijos reakcijų. Kadangi šios bakterijos yra gramteigiamos, jų vienas pagrindinių pranašumų rekombinantinei baltymų raiškai yra gebėjimas išskirti rekombinantinius baltymus į ląstelės išorę (Drejer et al., 2018). Visgi, siekiant plačiau pritaikyti šios grupės bakterijas biotechnologijoje, atsirado poreikis koreguoti šių bakterijų genomus, kiek keičiant metabolinius kelius, įterpiant naujus genus ar pakoreguojant jau esamus. Siekiant susintetinti didelius termostabilių fermentų kiekius taip pat reikalingos raiškos sistemos šiems organizmams, kadangi mezofiliniai raiškos kamienai ne visada geba tinkamai susintetinti šiuos fermentus (fermentas sulankstomas netinkamai ar gaunamas per mažas jo kiekis) (Francis et al., 2010; Rosano et al., 2014).

Yra sukurta nemažai raiškos sistemų mezofiliniams organizmams, tačiau termofilinė *Geobacillus* ir *Parageobacillus* organizmų prigimtis limituoja šių raiškos sistemų panaudojimą, dėl jose esančių baltymų, ypač atrankos antibiotikų, nestabilumo aukštesnėje temperatūroje (Hussein et al., 2015).

1.4.1. Plazmidiniai vektoriai

Pirmiausiai kuriant genetinės manipuliacijos vektorius (*Para*)*Geobacillus* bakterijoms buvo atrenkamos savaimė besidauginančios plazmidės, į jas įterpiamas atrankos žymuo ir stebimas jų stabilumas. Buvo aprašytos plazmidės, kurios geba daugintis riedančio rato (RC) ir teta (θ) mechanizmais (Jesu et al., 1998). Vienas dažniausiai naudojamų vektorių yra pNW33N. Šis vektorius turi chloramfenikolio acetyltransferazės geną iš *Staphylococcus aureus* plazmidės pC194, replikacijos pradžios sekas iš *Escherichia coli* pUC19 plazmidės iš *Bacillus* genomo (Drejer et al., 2018). Neskaitant šios plazmidės sėkmingo panaudojimo pavyzdžių (Martinus J A Daas et al., 2018; Zarschler et al., 2009), ji turi savų trūkumų, kadangi chloramfenikolis yra tik vidutiniškai stabilus aukštoje temperatūroje (Taylor et al., 2008).

Siekiant sukurti universalesnį vektorių buvo sukonstruotas pUCG18 vektorius. Proceso metu į pUC18 plazmidę buvo įterptas atsparumo kanamicinui genas ir teta replikono replikacijos pradžios seka iš pBST22 plazmidės (šis vektorius taip pat naudojamas (*Para*)*Geobacillus* bakterijų genetinei transformacijai) (Taylor et al., 2008). Šis vektorius vėliau buvo patobulintas sumažinant jo dydį ir pavadintas pUCG3.8 (Bartosiak-jentys et al., 2013).

Be pUCG18 ir pNW33N dar yra sukurta šaudyklinių vektorių, naudojamų *Geobacillus* bakterijų genetinei transformacijai, kurių keletas aprašyta 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė *Geobacillus* bakterijų vektoriai

Plazmidės pavadinimas	dydis	Atrankos žymuo	pastabos	šaltinis
pTMO31	5,1 kBp	Kan ^R (pUB110)	<i>E. coli</i> ir <i>Geobacillus</i> šaudyklinis vektorius. Jautrus temperatūrai vektorius, prarandamas esant 65 °C temperatūrai, dėl negalėjimo replikuotis.	(Cripps et al., 2009)
pBST22	7,6 kBp	Kan ^R (TK101) Cam ^R (pC194)	Šaudyklinis vektorius išvestas iš <i>G. stearothermophilus</i> pBST1 plazmidės. Neturi daugybinio klonavimo regiono ir funkcionalios mėlyna-balta atrankos sistemos	(Liao et al., 1990)
pSTE12	5.8 kBp	Tet ^R (pTHT15)	Nestabili plazmidė, prarandama nesant atrankos žymens	(Narumi, Yanagisawa, et al., 1992)

Be šaudyklinių vektorių šiuo metu yra sukurtų ir promotorius turinčių, indukuojamų raiškos sistemų, kurios buvo sėkmingai panaudotos termostabilių fermentų raiškai. Vienas jų buvo sukurtas *Geobacillus kaustophilus* rūšies bakterijoms. Kūrimo metu, straipsnių autoriai modifikavo pGAM48 šaudyklinį vektorių į jį įterpiant P_{gk704} nekoduojantį regioną (randamas prieš amilozės metabolizmo genų klasterį, jame koduojamas maltoze indukuojamas promotorius), kurio pagalba ši plazmidė integruojasi į bakterijos genomą. Į šią plazmidę buvo įterptas beta-gliukozidazės genas *bgaB*, ir po indukcijos išgryninto baltymo išėiga buvo 28 mg/L (Suzuki et al., 2013). Ši raiškos sistema yra tinkama termostabiliems fermentams sintetinti, gaunamos nemažos išėigos, tačiau tinkama naudoti tik *Geobacillus kaustophilus* bakterijoms. Tai yra, ši sistema nėra universali *Geobacillus* bakterijoms. Kito tyrimo metu, geobacilose reguliavimo funkciją atliekantys ir guanoziną prisijungiantys ribojungikliai buvo panaudoti genų raiškai indukuoti. Du ribojungikliai randami prieš ksantino permeazę ir inozino-5'-monofostato dehidrogenazę koduojančius genus buvo įterpti prieš promotorių pG1AK-sf plazmidėje, ir žalio fluorescuojančio baltymo raiška buvo indukuojama guanozinu. Gauto produkto išėigos buvo padidintos 16 kartų (Marcano-Velazquez et al., 2019). Buvo atlikta dar

keletas tyrimų, kuriant indukuojamas raiškos sistemas *geobacillus* bakterijoms (Miyano et al., 2018; Pogrebnyakov et al., 2017), tačiau iki šiol šios sistemos nėra plačiai pritaikomos.

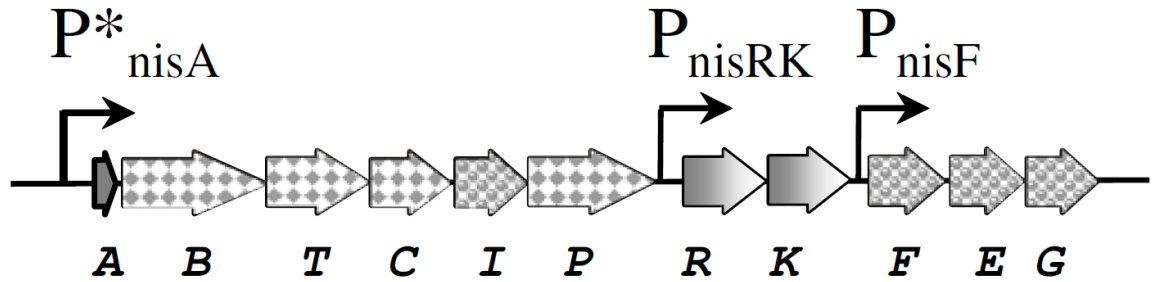
Nors yra sukurta keletas raiškos sistemų, (*Para*)*Geobacillus* bakterijų naudojimas biotechnologijoje ir pramonėje dar nėra populiarus ir išplitęs. Visos raiškos sistemos turi savų minusų, dalis nėra pakankamai efektyvios, kad būtų pritaikomos baltymų raiškai didelėmis skalėmis. Galima manyti, kad naujos ir efektyvios raiškos sistemos sukūrimas, galėtų paspartinti šių bakterijų pritaikymą įvairiose srityse.

1.5. Nizinas ir jo autoindukcijos mechanizmas

Nizinas yra antimikrobinis peptidas (kitaiškai bakteriocinas), kurį sintetina tam tikros gramteigiamos bakterijų rūšys, pavyzdžiui, *Lactococcus* ir *Streptococcus* (J. Lubelski et al., 2008). Šis bakteriocinas buvo atrastas 1928 metais fermentuoto pieno kultūrose (Rogers et al., 1928). Toliau tęsėsi išsamūs šio bakteriocino tyrimai, kol galiausiai jis buvo pripažintas jungtinės maisto ir agrokultūros departamento/pasaulio sveikatos organizacijos saugiu maisto priedu. Pirmasis aprašytas nizino variantas, žinomas kaip nizinas A, yra sudarytas iš 34 aminorūgščių, 5 žiedinių struktūrų ir yra gaminamas *Lactococcus lactis* bakterijų (Gross ir Morell, 1971).

Nizinas veikia prisijungdamas prie lipido II ir kartu su šiuo ląstelės sienelės sintezės pirmtaku suformuoja poras, pro kurias iš ląstelės pašalinamos mažos molekulės, įskaitant ATP, ir sukeliama ląstelės žūtis.

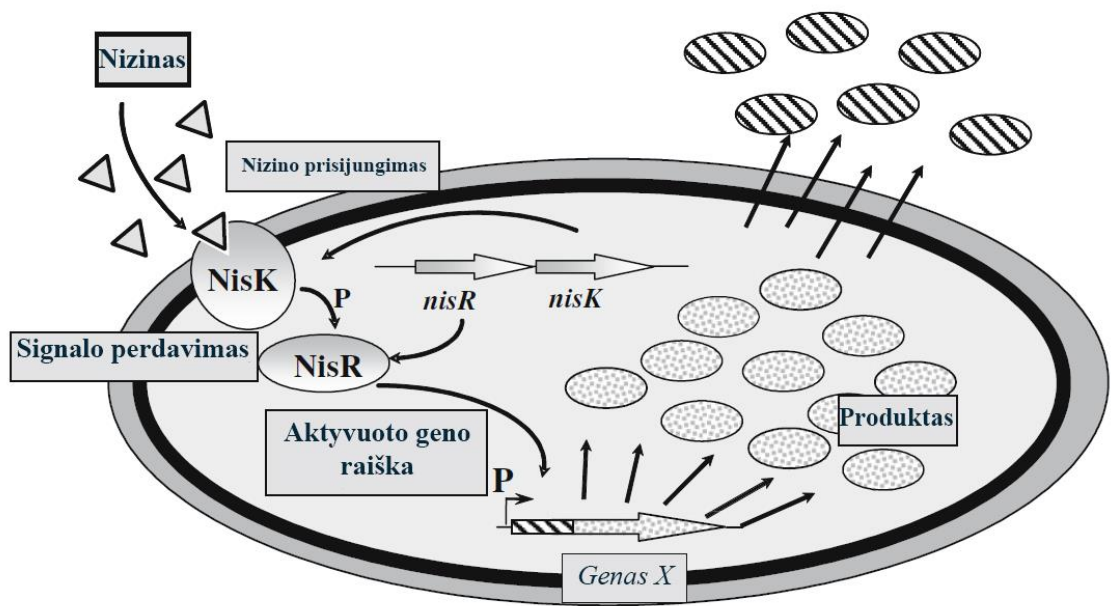
Nizino biosintezė yra reguliuojama paties nizino subrendusios molekulės. Šios reguliacijos metu, nizinas veikia kaip signalinė molekulė ir indukuoja nizino biosintetinio genų klasterio genų transkripciją (Zhou et al., 2006). Pirmiausiai ribosomų sintetinamas yra nizino pirmtakas, kuris vėliau yra modifikuojamas įvairių fermentų. Šios modifikacijos suteikia nizinui neįprastas chemines ir struktūrines ypatybes. Galiausiai, modifikuota molekulė yra perkeliama per citoplazminę membraną ir paverčiama į subrendusią nizino formą (Kleerebezem et al., 1997). Nizino biosintezė yra koduojama 11 genų klasterio (1.3 pav.), iš kurių pirmasis genas *nisA* koduoja nizino pirmtaką. Kiti genai reguliuoja baltymus, kurie yra susiję su nizino modifikacija, translokacija ir apdorojimu (*nisB*, *nisC*, *nisP* ir *nisT*), imunitetu nizinui (*nisI*, *nisF*, *nisE* ir *nisG*) ir raiška (*nisR* ir *nisK*). *NisK* ir *NisR* priklauso bakterinėms dviejų komponentų signalo transdukcijos sistemoms. *NisK* yra histidino-baltymų kinazė, kuri yra lokalizuota citoplazminėje membranoje ir veikia kaip subrendusios nizino molekulės receptorių. Susijungęs su nizinu, *NisK* autofosforiliasi ir perkelia fosfato grupę *NisR*, kuris yra atsako reguliatorius, taip jį aktyvuodamas. Aktyvuotas *NisR** indukuoja du promotorius: P_{nisA} ir P_{nisF} (Mierau et al., 2005). Šitoks nizino autoindukcijos mechanizmas buvo panaudotas NICE sistemai sukurti.



pav. 1.3 Nizino genų klasterio schematinis vaizdas. Juodos rodyklės reprezentuoja tris promotorius, kurie reguliuoja niziono genų ekspresiją. P^*_{nisA} indukuoja *nisA* promotorių, kuris yra naudojamas nizino kontroliuojamoje genų raiškos sistemoje (Mierau et al., 2005).

1.5.1. NICE sistema

Siekiant išnaudoti nizino autoindukcijos mechanizmą genų raiškai, genai reikalingi signalo perdavimo sistemai *nisK* ir *nisR* buvo izoliuoti iš nizino genų klasterio ir perkelti į *L. lactis* subsp *cremoris* MG1363 (nizino nesintetinantį kamieną), sukuriant NZ9000 kamieną (Kuipers et al., 1998). Vėliau, įterpiant norimą geną prieš P_{nisA} promotorių plazmidėje ar chromosomoje, jo raiška gali būti indukuojama pridėdant subinhibitorinį kiekį nizino (0,1 – 5 ng/mL) į terpę kurioje auga kultūra (1.4 pav.). Priklausomai nuo tinkamo signalinės sekos buvimo ar nebuvimo, baltymas gali būti citoplazmoje, įterpiamas į membraną arba sekretuojamas į išorę. Priklausomai, nuo nizino kiekio esančio terpėje, gaunamas atitinkamas kiekis produkto (stebima linijinė priklausomybė), todėl tokia indukcijos sistema gali būti naudojama ne tik įjungti ar išjungti norimo geno raišką, bet ir dozuoti jo kiekį (Mierau et al., 2005). Yra sukurta keletas NICE sistemų su įvairiais plazmidžių variantais. Visose plazmidėse yra randamas arba P_{nisA} arba P_{nisF} promotorius. Paprastai nizino nesintetinančiuose kamienuose, norint panaudoti NICE sistemą, *nisRK* genai terpiami į tinkamos sistemai ląstelės šeimininkės genomą, tačiau šitas procesas yra sudėtingas ir reikalauja daug darbo (Zhou et al., 2006). Siekiant sumažinti šios sistemos sudėtingumą, buvo sukurtos sistemos, kuriose buvo naudojami du vektoriai, turintys suderinamus replikonus. Viename iš jų buvo įterpiamas genas, kurio raišką norima indukuoti, kartu su P_{nisA} promotoriumi, o kitame *nisR* ir *nisK* genai. ši sistema buvo veikianti tačiau bakterijų transformacija buvo sudėtingesnė, ir ląstelės su NICE sistemos vektoriais augo dukart lėčiau (Bryan et al., 2000).



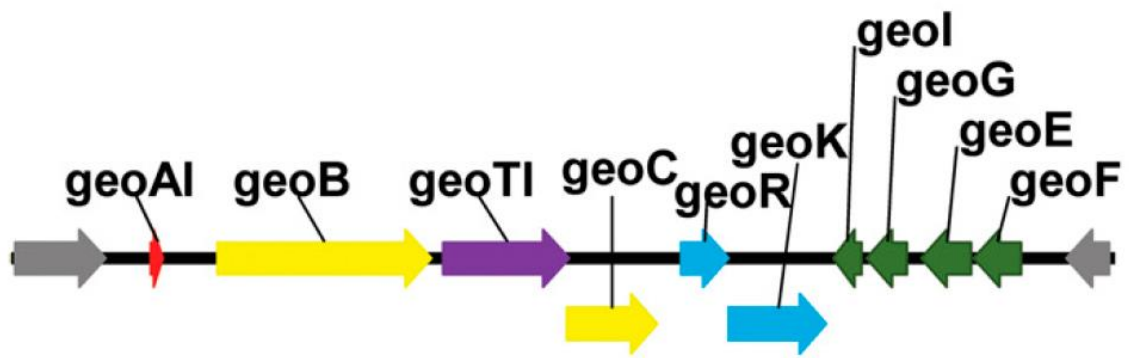
1.4 pav. Nizino kontroliuojama genų raiška. NisK – histidino baltymų kinazė, NisR – atsako reguliatorius, Genas X – tikslinis genas, įklonuotas už *nisA* promotoriaus kartu arba be nukreipimo signalų (Mierau et al., 2005).

1.6. Geobacilinas I

Kaip jau minėta, pastaruoju metu daug dėmesio skiriama *Geobacillus* genties bakterijų panaudojimui biotechnologijoje, tačiau visai neseniai pradėta domėtis ir šių bakterijų potencialu sintetinant bakteriocinus. Šiuo metu yra vos keletas aprašytų šių bakterijų sintetinamų antimikrobinių peptidų pavyzdžių, iš kurių geriausiai charakterizuoti lantibiotikai, priklausantys I bakteriocinų klasei, yra geobacilinas I ir geobacilinas II. Abu šie lantibiotikai identifikuoti keletoje *Geobacillus thermodenitrificans* kamienų, įskaitant NG80-2, DSM465, OHT-1, M10EXG, OH2-1 ir OH5-2 (Garg et al., 2012). *Geobacillus* genties bakterijose nustatyta ir daugiau genų koduojančių bakteriocinus, tačiau tyrimai daugiausia atlikti bioinformatiniais metodais naudojantis BAGEL3 programa (Egan et al., 2018; Garg et al., 2012).

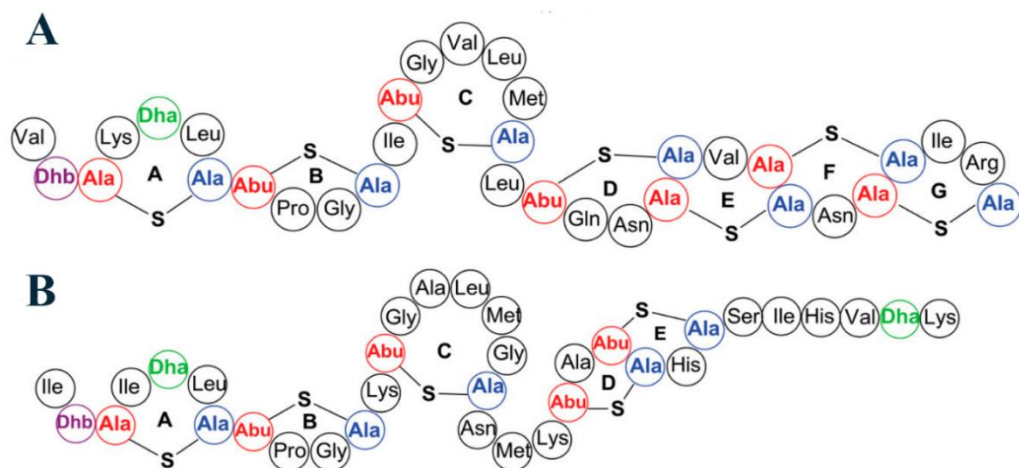
Geobacilinas I yra laikomas nizino analogu *Geobacillus* genties bakterijose. GeoAI pirmtako peptidas turi homologijų su nizinu ir subtilinu, ypač N-galiniame regione, tačiau žinoma, kad turi dar dvi papildomas cisteino liekanas, lyginant su prieš tai minėtais bakteriociniais. Be to, geobacilinas I nuo nizino skiriasi dviem papildomais tioeteriniais kryžminiais ryšiais. Nizine yra penki tokio tipo ryšiai, o geobaciline I – septyni.

Genai, paprastai randami lantibiotikų biosintetinių genų klasteriuose yra randami už *geoAI*, įskaitant dehidratazė (*geoB*), ABC transporterį (*geoT*), ciklazę (*geoC*), dviejų komponentų transkripcijos reguliatorių (*geoR* ir *geoK*), bei imuniteto baltymus (*geoI*, *geoG*, *geoE*, *geoF*) (1.5 pav.).



1.5 pav. genų klasteris, koduojantis geobacilią I (Garg et al., 2012)

Geobacilinas I yra aktyvus prieš platų spektrą gramteigiamų bakterijų, bet nėra aktyvus prieš gramneigiamą *Escherichia coli*. Taip pat, savo struktūroje turi konservatyvius A ir B žiedus, būdingus nizinui, kurie yra svarbūs prisijungiant prie lipodo II (1.6 pav.). Vėliau atliktų tyrimų metu buvo nustatyta, kad geobacilinas I, nors ir turi struktūrinių skirtumų, lyginant su nizinu, veikia taip pat jungdamasis su lipidu II ir formuodamas poras (Garg et al., 2014).



1.6 pav. Geobacilino I (A) ir nizino A (B) aminorūgščių sekos ir žiedų topologija (Garg et al., 2012).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Darbe naudotos medžiagos, fermentai, vektoriai, bakterijų kamienai ir terpės

2.1.1. Darbe naudotos medžiagos

Glicerolis (Roth)

Sorbitolis (Roth)

Manitolis (Roth)

Triptonas (Roth)

Mėsos ekstraktas (Merck)

NaCl (AppliChem)

K₂HPO₄ (Roth)

Natrio piruvatas (Merck)

Mielių ekstraktas (AppliChem)

MgCl₂ (Merck)

CaCl₂ (Merck)

KCl (Roth)

ZnSO₄ (Merck)

MnSO₄ (Merck)

Laktozė (Roth)

Kanamicinas (Roth)

Chloramfenikolis (Roth)

2.1.2. Darbe naudoti fermentai

T4 DNR ligazė (Thermo Fisher Scientific)

FD BamHI restrikcijos fermentas (Thermo Fisher Scientific)

BglIII restrikcijos fermentas (Thermo Fisher Scientific)

FD EcoRI restrikcijos fermentas (Thermo Fisher Scientific)

FD XhoI restrikcijos fermentas (Thermo Fisher Scientific)

NdeI restrikcijos fermentas (Thermo Fisher Scientific)

XbaI restrikcijos fermentas (Thermo Fisher Scientific)

NheI restrikcijos fermentas (Thermo Fisher Scientific)

Phusion High Fidelity DNR polimerazė (Thermo Fisher Scientific)

2.1.3. Darbe naudoti vektoriai

pNW33N (BGSC – Bacillus Gene Stock Centre)

pUCG18 Taylor ir kt. (2008)

pNW33N-pta-sfGFP(SP)-3TER (Frenzel et al., 2018)

pCDFDuet-1 (Novagen)

pUCG3.84 (šis darbas)

pUCG18-^PgeoA-geoA

pUCG18-^PgeoA-sfGFP-geoRK (šis darbas)

pUCG18-^PgeoA-sfGFP (šis darbas)

pMS-sfGFP (šis darbas)

2.1.4. Darbe naudoti bakterijų kamienai

Escherichia coli DH5α

Geobacillus thermodenitrificans DSM 465

Geobacillus thermoglucosidasus DSM 2542

Geobacillus stearothermophilus NUB3621R

2.1.5. Darbe naudotos bakterijų kultivavimo terpės ir auginimo sąlygos

Termofilinių bakterijų kultūros augintos MB, mTGP terpėse, *E. coli* kultūros augintos LB terpėje. Terpių ir buferių, naudotų darbe, sudėtis pateikta 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė Darbe naudotos terpių ir buferių sudėtys

Terpė/buferis	Sudėtis
LB	10 g/L triptono, 5 g/L mielių ekstrakto, 5 g/L NaCl
MB	10 g/L triptono; 5 g/L mėsos ekstrakto; 5 g/L NaCl
mTGP	17 g/L triptono; 3 g/L mėsos ekstrakto; 5 g/L NaCl; 2,5 g/L K ₂ HPO ₄ ; 4 g/L glicerolio; 4g/L natrio piruvato
SOC	5 g/L mielių ekstrakto, 20 g/L triptono, 0,584 g/L NaCl, 0,186 g/L KCl, 2,4 g/L MgSO ₄ , 20 mL/L gliukozės
GSM	1 M glicerolio, 0,4 M sorbitolio, 0,4 M manitolio
PG	10 g/L peptono, 5 g/L mielių ekstrakto, 5 g/L NaCl, 20 mM CaCl ₂ , 10 mM MgCl ₂ , 10 % [wt/vol] laktozės

Termofilinių kultūrų auginimui MB ir mTGP terpės buvo papildomos DR1 ir DR2 druskų tirpalais:

- DR1: MnSO₄ (0,47 μmol/L), ZnSO₄ (0,91 μmol/L), KCl (0,07 mmol/L), MgCl₂ (1,1 mmol/L), CaCl₂ (2,3 mmol/L) ;
- DR2: MnCl₂ (15,2 μmol/L), FeCl (43,2 μmol/L), ZnSO₄ (1,4 mmol/L), H₃BO₃ (0,1617 mmol/L), CaCl₂ (0,2106 mmol/L), CuSO₄ (1,2531 mmol/L), NiCl₂ (42,1 μmol/L).

Auginimams buvo naudotas druskų tirpalas DR1, jei nepaminėta kitaip. Visos termofilinės bakterijos augintos 55 °C temperatūroje, 200 aps/min. *E. coli* bakterijų kultūros augintos Luria-Bertani (LB) terpėje, 37 °C temperatūroje, 180 aps/min. SOC terpė naudota *E. coli* transformantų regeneravimui, o termofilinių bakterijų regeneravimui naudotas GSM buferis. Agarizuotos MB, mTGP, PG ir LB terpės buvo gaminamos pridedant į jas agarą (1,5 %), į agarizuotą PG terpę dar papildomai pridedama 20 mM CaCl₂. Antibiotikai buvo naudojami kaip atrankos žymenys ir į terpę dedami atitinkamomis koncentracijomis pagal poreikį (*E. coli*: ampicilinas 50 μg/mL, kanamicinas 50 μg/mL, chloramfenikolis 34 μg/mL, termofilinėms bakterijoms: kanamicinas 12,5 μg/mL, chloramfenikolis 7 μg/mL)

2.1.6. Darbe naudoti pradmenys

Visi darbe naudoti pradmenys nurodyti 2.2 lentelėje. Šio darbo metu kurti pradmenys buvo užsakyti iš Metabion (Vokietija).

2.2 lentelė darbe naudoti pradmenys ir jų sekos

Pavadinimas	Seka 5' – 3'	Restrikcijos vieta
p3.84_OriKan_F	attggatccaatcccctaacgtgagtttcg	BamHI
p3.84_OriKan_R	caaaatggtatgcgtttgacacatc	BamHI
p3.84_RepBST_F	cgtagatctcttaaagacgtctctacgc	BglII
p3.84_RepBST_R	tagagatctttgaaaatagacctgtcgc	BglII
DuetUP2	ttgtacacggccgcaatac	-

PGeoA_F	gcaacgcaatccaataaccttttgagatagctcgtatacaca	-
PGeoA_R	cataccatttgacattccaagatgatctaaggaaaaatcaagaatgg	-
pUCG_PGeoA_F	catcttggaatgtcaaaatggtatgcgttttgacac	-
pUCG_PGeoA_R	aggttattggattgcgttcgctcactg	-
GeoRK_F	agacgtcttaagatggtttatatacaatggaaaagccgact	-
GeoRK_R	ttcatggatctaggcttagagactgtcagctagg	-
pUCG_GeoRK_F	tataaacaacatctaaagacgtctctacgcgcc	-
pUCG_GeoRK_R	tcctaagcctagatccatgaagatggattttctattattgcaatg	-
GFP(SF)_F	tcagtaggatcctctagaactaataaggaggacaacatg	BamHI
GFP(SF)_R	tcagagctagcttgaatcttgcttgcgaaggttc	NheI
pUCGpGeoA_GFP(SF)_F	atgcttctagattcgattgatcacacattcattgaacca	XbaI
pUCGpGeoA_GFP(SF)_R	tcctcgatccattggtgatattatcattaactactgatgaaagatg	BamHI
cat_pNW_F	aaatctaaaattatctgaaaagggaatgaactttaataaaattgatttagacaattg gaagagaaaagaga	-
cat_pNW_R	ttccttagatcatcctcagatattgtataaaagccagtcattaggcctatctgacaattcctgaata gagt	-
pMS_cat_F	tcccttttcagataattttgatattgcttttctaataagaatattgg	-
pMS_cat_R	catatctcgaggatgatctaaggaaaaatcaagaatggacaaggg	-

2.2. Metodai

2.2.1. Bioinformatinė analizė

Geobacilino I genų klasteris *Geobacillus thermodenitrificans* DSM465 bakterijose (genomo sekai priskirtas numeris: AYKT00000000) nustatytas naudojantis BAGEL4) (<http://bagel4.molgenrug.nl/> programa, jame esantys promotoriai nustatyti PromoterHunter (<http://www.phisite.org>) ir BacPP (<http://www.bacpp.bioinfocps.com/home>) programomis.

2.2.2. DNR išskyrimas ir valymas

Visi darbe naudoti vektoriai buvo gryninami iš 5 ml *E. coli* bakterijų naktinės kultūros (augintos 16 val.), naudojant GeneJET plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific) plazmidinės DNR išskyrimo rinkinius ir laikantis gamintojo pateikiamo protokolo.

Išskiriant genominę DNR, *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465 kamienas tankiai užsėtas gazonu ant Petri lėkštelės su agarizuota MB terpe ir auginamas 4 val. 55 °C temperatūroje. Tuomet lėkštelės plautos nuo lėkštelės skysta MB terpe ir iš pagamintos ląstelių suspensijos genominė DNR išskirta naudojant genomines DNR išskyrimo rinkinį Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific), laikantis gamintojo protokolo.

Iš agarozinio gelio DNR valyta naudojantis GeneJet Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific) rinkiniu, laikantis gamintojo protokolo. DNR po PGR arba po karpymo su restriktazėmis, toliau naudojama molekulinės biologijos darbuose, gryninta GeneJet PCR Purification rinkiniu (Thermo Fisher Scientific), laikantis gamintojo protokolo. Išgrynintų ir išskirtų produktų kokybė ir kiekis buvo tikrinamas spektrofotometriškai ir/arba elektroforetiškai

2.2.3. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR fragmentų grynimui, PGR produktų detekcijai, plazmidinės DNR bei kolonijų PGR analizei buvo taikyta elektroforezė agarozės gelyje (1 %). Reikalingas agarozės kiekis buvo užpildytas 1x TAE (40 mM Tris; 20 mM acto rūgštis; 1 mM EDTA) buferiniu tirpalu ir kaitintas, kol agarozė išsilydė ir tirpalas tapo skaidrus bei homogeniškas. Tirpalas buvo atvėsintas ir į jį įpilta etidžio bromido (galutinė koncentracija 0,5 µg/ml). Gautas tirpalas buvo pilamas į gelio formavimo indą, o jam sustingus DNR ilgio žymuo ir tiriami mėginiai yra užnešti į šulinėlius. DNR elektroforezė vykdyta 35-45 min. esant 100 V įtampai. Po elektroforezės gelis apšviestas UV šviesa ir analizuotas (Lee et al., 2012). DNR dydžio standartu naudotas GeneRuler 1 kb DNA Ladder, GeneRuler DNA Ladder Mix arba MassRuler DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

2.2.4. Elektrokompentinių termofilinių bakterijų ląstelių paruošimas

Ruošiant elektrokompentines ląsteles, *Geobacillus* bakterijos buvo augintos MB arba mTGP terpėje. Abi terpės buvo papildomos DR1 arba DR2 druskomis. Bakterijų kultūros buvo auginamos per naktį 55 °C maišant (200 aps/min). Ryte po 2,5 mL bakterijų kultūrų persėtos į 100 ml šviežios terpės (MB arba mTGP). Toliau ląstelės buvo auginamos purtyklėje su aeracija 55 °C temperatūroje esant 200 aps/min. Ląstelėms pasiekus optinį tankį esant 600 nm bangos ilgiui (OT_{600}) lygų 1, jos buvo ištraukiamos iš purtyklės ir atšaldomos šaltoje ledo vonioje 15 min.

Vėliau bakterijų kultūros surenkamos centrifuguojant 4 °C temperatūroje 5000×g 15 min. Nuosėdos buvo plaunamos keturis kartus šaltu elektrotransformacijos buferiu GSM. Pirmą kartą ląstelės suspenduojamos 30 mL GSM buferyje ir centrifuguojamos 15 min. 6000×g; antrą kartą suspenduojamos 30 mL GSM buferyje ir centrifuguojamos 20 min. 6000×g; trečią kartą ląstelės suspenduojamos 30 mL GSM buferyje ir centrifuguojamos 25 min. 6000×g.

Toliau ląstelių nuosėdos suspenduojamos elektrotransformacijos buferyje (GSM) ir pagaminama suspensija, kurios optinis tankis (OT_{600}) būtų lygus 100. Gauta suspensija išpilstoma į mėgintuvėlius po 50 µL ir iki transformacijos ląstelės laikomos -70 °C šaldiklyje.

2.2.5. Elektrokompentinių *E. coli* ląstelių ruošimas

Ruošiant elektrokompentines ląsteles *E. coli* DH5a bakterijos buvo augintos LB terpėje per naktį 37 °C maišant (180 aps/min). Ryte 1 ml *E. coli* bakterijų kultūros, persėjama į 100 mL šviežios LB terpės. Toliau bakterijų kultūra auginama purtyklėje, 37 °C temperatūroje, 180 aps/min, kol pasiekiamas ląstelių optinis tankis esant 600 nm bangos ilgiui (OT_{600}) 0,5.

Tuomet ląstelės vėsinašos ledo vonelėje 15-20 min (po šio žingsnio ląstelės visada laikomos šaltai).

Atvėsusios ląstelės centrifuguojamos +4 °C temperatūroje 15 min. 5000 × g. Nucentrifugavus nupilamas supernatantas, ląstelių nuosėdos suspenduojamos 30 mL sterilaus distiliuoto šalto vandens ir vėl centrifuguojamos 15 min. 6000 × g. Plovimas steriliu vandeniu pakartojamas dar du kartus, antra kartą centrifuguojant 20 min. esant 6500 × g, trečią kartą – 25 min 7000 × g.

Po trečio plovimo nupilamas supernatantas, ląstelės suspenduojamos 3 mL 10% glicerolio tirpale ir centrifuguojamos esant 5000 × g 3 min. Baigus centrifuguoti supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 1 mL 10 % glicerolio tirpale ir išpilstomos po 50 µL į mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai su pagamintomis kompetentinėmis ląstelėmis laikomi -70 °C temperatūroje

2.2.6. Elektroporacija

Atšildžius elektrokompentines ląsteles ant ledo, 50 µL kompetentinių ląstelių buvo sumaišoma su 1 – 2 µL plazmidine DNR ir inkubuojamos 2 min kambario temperatūroje. Vėliau kompetentinės ląstelės perkeliomos į iš anksto atšaldytą (0 °C) elektroporacijos kiuvetę (plotis - 0,1 cm). Elektroporacija vykdoma „Eppendorf Multiporator“ aparatu taikant skirtingus elektrinio lauko parametrus (18 kV/cm, *E. coli* elektromompentimėms ląstelėms ir 20 kV/cm termofilinių bakterijų elektrokompentinėms ląstelėms, po 5 ms). Iš karto po elektrinio impulso ląstelių suspensijos sumaišomos su 1 mL regeneracijos terpės ir perkeliomos į 1,5 mL mėgintuvėlius. Transformuotos *E. coli* ląstelės regeneruojamos 1 val. 37 °C SOC terpėje, o transformuotos termofilinių bakterijų ląstelės regeneruojamos 55 °C su aeracija 2 val NB terpėje su druskomis. Tuomet ląstelės išsėjamos ant agarizuotos terpės su atitinkamu kiekiu antibiotiko ir auginamos per naktį (16 val.).

2.2.7. Protoplastų transformacija

Protoplastų transformacija daryta pagal (Wu et al., 1989) su modifikacijomis. Ruošiant *G. stearotherophilus* NUB3621R ląstelių protoplastus, šios bakterijos augintos MB terpėje per naktį 55 °C maišant (200 aps/min). Ryte 2,5 mL bakterijų kultūros persėta į 100 ml šviežios PG terpės. Toliau ląstelės buvo auginamos purtyklėje su aeracija 55 °C temperatūroje esant 200 aps/min iki kol pasiekė OT₆₀₀ lygų 1,8. Ląstelėms pasiekus reikiamą optinį tankį, po 2 mL ląstelių kultūros centrifuguojama 1 min. 5000 × g. Po centrifugavimo nupilamas supernatantas ir ląstelės resuspenduojamos 500 µL PM, papildant 10 µL 1 mg/mL lizocimo. Ląstelės inkubuojamos 20 min 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos reakcijos mišinys papildomas dar

500 μ L PM ir centrifuguojamas 5 min $800 \times g$. Po centrifugavimo nupilamas supernatantas ir ląstelės resuspenduojamos 100 μ L PM atsargiai pipetuojant.

Į resuspenduotus *G. stearotherophilus* protoplastus įdedamas 1 μ g vektoriaus ir 900 μ L 40% PEG tirpalo. Mišinys inkubuojamas 2 min. 50°C , maišant 130 aps/min greičiu. Po inkubacijos centrifuguojama 5 min. $800 \times g$, nupylus supernatantą resuspenduojama 100 μ L PM ir ląstelės regeneruojamos 1 val. 50°C maišant 130 aps/min greičiu. Po inkubacijos ląstelės išskirstomos ant agarizuotos PM terpės ir auginamos 50°C temperatūroje 12 val., po to perkeltos į 60°C temperatūrą (auginama 12-24 val.).

2.2.8. pUCG3.8 vektoriaus konstravimas

pUCG18 ir pCDFDuet-1 vektoriai buvo sukarpyti EcoRI ir NdeI restrikcijos fermentais, ir išskirstyti agarozės gelyje elektroforezės metodu. Iš gelio naudojant GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) buvo išgryninta dviejose vietose perkirpta pUCG18 plazmidė bei multikloninis saitas (MCS-1) iškirptas iš pCDFDuet-1 plazmidės. Šie trys DNR fragmentai toliau buvo suliguoti naudojant T4 DNR ligazę, o gautas ligavimo mišinys perkeltas į *E. coli* DH5 α ląsteles elektroporacijos būdu. Teigiami transformantai buvo atrinkti naudojant „mėlyna-balta“ atrankos sistemą. Atrinkta teigiama transformanto kolonija atliekant du kolonijų PGR. Pirmo PGR metu naudota DuetUP2 ir p3.84_OriKan_R pradmenų pora (patvirtinamas MCS-1 iš pCDS Duet-1 plazmidės įterpimas), o antrojo PGR metu naudota p3.84_OriKan_F ir p3.84_OriKan_R pradmenų pora. Kolonija, turinti naują DNR konstrukta pUCG18-MCS, buvo persėta į šviežią LB terpę su atitinkamu antibiotiku ir auginta per naktį. Ryte pUCG18-MCS konstruktas buvo išskirtas iš ląstelių naudojant Plasmid extraction Kit (Thermo Fisher Scientific).

Toliau išskirto konstrukto du atskiri fragmentai buvo padauginti PGR metodu naudojantis p3.84_OriKan_F, p3.84_OriKan_R ir p3.84_RepBST_F, p3.84_RepBST_R pradmenų poromis. Fragmentas, padaugintas p3.84_OriKan_F ir p3.84_OriKan_R sukarpytas BamHI restrikcijos endonukleaze, o fragmentas padaugintas p3.84_OriKan_F ir p3.84_OriKan_R sukarpytas BglII restrikcijos endonukleaze. Tada abu fragmentai išgryninti ir suliguoti naudojant T4 ligazę. Ligavimo mišinys perkeltas į *E. coli* DH5 α ląsteles elektroporacijos būdu. Teigiami transformantai, turintys naują konstrukta pUCG3.84, pasirinkti atliekant du kolonijų PGR testus, DNR pagausinimui naudojant p3.84_RepBST_F ir p3.84_OriKan_R bei p3.84_OriKan_F ir p3.84_RepBST_R pradmenų poras. Atrinkta teigiama transformanto kolonija, turinti naują DNR konstrukta pUCG3.84, buvo persėta į šviežią LB terpę su atitinkamu antibiotiku ir auginta per naktį. Ryte pUCG3.84 konstruktas buvo išskirtas iš ląstelių naudojant Plasmid extraction Kit (Thermo Fisher Scientific).

2.2.9. *P_{geoA}*, *geoA* ir *geoRK* genų klonavimas į pUCG18 vektorių

Pirmiausiai į plazmidę buvo įterpiamas *GeoA* koduojantis genas, kartu su promotoriumi ir terminatoriumi (*P_{geoA}*, *T_{geoA}*). Tam buvo sukurti pradmenys persidengiančiais galais. Naudojantis pGeoA_F ir PGeoA_R pradmenų pora, padaugintas *geoA* kartu su *P_{geoA}* ir *T_{geoA}*, o pUCG_PGeoA_F ir pUCG_PGeoA_F pradmenų pora padauginta pUCG3.84 plazmidė, be multikloninio saito. Abu PGR metu gauti fragmentai išgryninti ir suliguoti naudojant NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs). Reakcijos metu buvo laikomasi gamintojo protokolo nurodymų, vektoriaus ir inserto santykis buvo 1:2. Gautas ligatas elektroporacijos metodu perkeltas į *E. coli* DH5 α . Teigiami transformantai atrinkti kolonijų PGR metodu (naudota pGeoA_F ir PGeoA_R pradmenų pora), ir viena kolonija turinti reikiamą vektorių užsėta į skystą LB terpę. Iš naktinės šių bakterijų kultūros išskirtas vektorius pUCG18-*P_{geoA}*-*geoA*.

Vėliau pUCG18-*P_{geoA}*-*geoA* vektorius padaugintas PGR metodu naudojant pUCG_GeoRK_F ir pUCG_GeoRK_R pradmenų porą. Gautas produktas išgrynintas ir suliguotas su *geoRK* genu (naudojant NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix), kuris buvo padaugintas PGR metodu naudojant GeoRK_F ir GeoRK_R pradmenų porą ir išgrynintas. Gautas ligatas elektroporacijos metodu perkeltas į *E. coli* DH5 α . Teigiamų transformantų ieškota kolonijų PGR metodu (naudoti GeoRK_F ir GeoRK_R pradmenys).

2.2.10. Geno koduojančio GFP klonavimas į pUCG18-PGeoA

sfGFP(SP) genas buvo padaugintas PGR metodu nuo pNW33N-pta-sfGFP(SP)-3TER plazmidės, naudojant GFP(SF)_F ir GFP(SF)_R pradmenis, kurių pagalba įterptos BamHI ir NdeI restrikcijos vietos geno galuose. Gautas PGR produktas sukarpytas atitinkamais restrikcijos fermentais ir išgrynintas. Paraleliai, PGR metodu buvo daugintas pUCG18-*P_{GeoA}*-*GeoA* vektorius naudojant pUCGpGeoA_GFP(SF)_F ir pUCGpGeoA_GFP(SF)_R pradmenis. Šių pradmenų pagalba, PGR produkto galuose buvo įterptos XbaI ir BamHI restrikcijos vietos. Padaugintas vektorius sukarpytas atitinkamomis restriktazėmis ir išgrynintas. Abu išgryninti fragmentai suliguoti T4 DNR ligaze. Gautas ligatas elektroporacijos metodu transformuotas į *E. coli* DH5 α . Teigiami transformantai atrinkti kolonijų PGR metodu (naudota GFP(SF)_F ir GFP(SF)_R pradmenų pora), ir viena kolonija turinti reikiamą vektorių užsėta į skystą LB terpę. Iš naktinės šių bakterijų kultūros išskirtas vektorius pUCG18-*P_{GeoA}*-*sfGFP*.

2.2.11. pMS konstrukto gamyba

Šio etapo metu NEBuilder HiFi DNA assembly Master Mix pagalba suliguoti du DNR fragmentai. Pirmas fragmentas gautas nuo pUCG18-*P_{GeoA}*-*sfGFP* plazmidės, naudojantis PGeoA_F ir PGeoA_R pradmenų pora, PGR metodu padauginant *sfGFP* kartu su *P_{geoA}*

promotoriumi ir *TgeoA* terminatoriumi. Antrasis fragmentas gautas pUCG18-geoRK plazmidę iš 2.2.9 skyriaus padauginant PGR metodu, naudojant pUCG_PGeoA_F ir pUCG_PGeoA_R pradmenis. Gautas ligatas elektroporacijos metodu transformuotas į *E. coli* DH5 α . Teigiamų transformantų ieškota kolonijų PGR metodu, naudoti PGeoA_F ir PGeoA_R pradmenys. Atrinkta teigiama transformanto kolonija, turinti naują DNR konstrukta, buvo persėta į šviežią LB terpę su atitinkamu antibiotiku ir auginta per naktį. Ryte pMS konstruktas buvo išskirtas iš ląstelių naudojant Plasmid extraction Kit (Thermo Fisher Scientific).

2.2.12. *G. thermodenitrificans* DSM 465 ir *G. stearothermophilus*

NUB3621R kamienų atsparumo chloramfenikoliui ir kanamicinui nustatymas

Siekiant nustatyti *G. thermodenitrificans* DSM 465 ir *G. stearothermophilus* NUB3621R kamienų atsparumą antibiotikams, paruošti mėgintuvėliai su 5 mL MB terpės ir atitinkamomis antibiotikų koncentracijomis (2.3 lentelė). Kiekvieno mėgintuvėlio (1-10) paruošta po du, į vieną iš jų užsėjant *G. thermodenitrificans* DSM 465 kamieno naktinės kultūros, į kitą - *G. stearothermophilus* NUB3621R. Kultūros terpėse su antibiotiku augintos 24 val. ir stebėtas bakterijų augimas.

2.3 lentelė antibiotikų paruoštuose mėgintuvėliuose koncentracijos

Mėgintuvėlio Nr.	Chloramfenikolio koncentracija, $\mu\text{g/mL}$	Mėgintuvėlio Nr.	Kanamicino koncentracija, $\mu\text{g/mL}$
1.	34	6.	50
2.	17	7.	25
3.	8,5	8.	12.5
4.	4.25	9.	6.25
5.	2.125	10.	3.125

2.2.13. *KNT* geno keitimas pMS vektoriuje į *cat*

Siekiant atsparumo kamamicinui geną *KNT* pMS vektoriuje pakeisti į atsparumo chloramfenikoliui *cat* geną, buvo sukurti pradmenys, persidengiančiais galais. Naudojantis *cat*_PNW_F ir *cat*_PNW_R pradmenų pora PGR metodu padaugintas atsparumo chloramfenikoliui genas, esantis pNW33N vektoriuje. Naudojantis pMS_cat_F ir pMS_cat_R pradmenų pora PGR metodu padauginta pMS plazmidė, be atsparumo kanamicinui geno. Abu PGR produktai išgryninti ir suliguoti naudojant NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs). Gautas ligatas transformuojamas į *E. coli* DH5 α , teigiamos kolonijos atrenkamos kolonijų PGR metodu naudojant GFP(SF)_F ir *cat*_PNW_F pradmenų porą. Viena kolonija, turinti *cat* geną, užsėjama į skystą terpę ir iš naktinės bakterijų kultūros išskiriamas vektorius pMS_cat_sfGFP.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

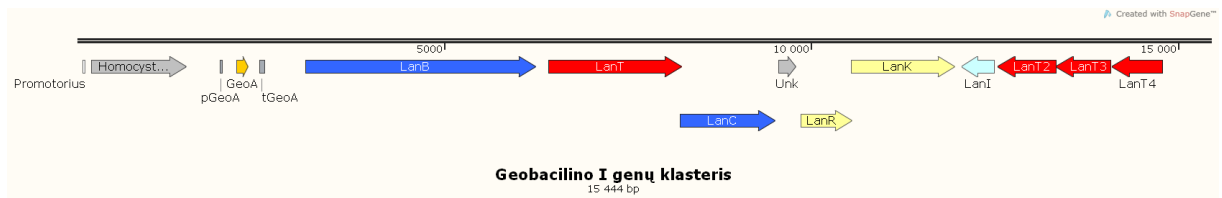
Šio darbo metu buvo siekiama sukurti universalią reguliuojamą raiškos sistemą (pMS plazmidę) *Geobacillus* ir *Parageobacillus* genties bakterijoms. Literatūros analizės metu nustatyta, kad *Geobacillus thermodenitrificans* keletas kamienų sintetina į niziną A panašų bakteriociną geobaciliną I, kuris kaip ir nizinas A turi reguliuojamą autoindukcijos mechanizmą. Žinant šią informaciją, šiame darbe buvo bandoma sukurti NICE sistemos analogą *Geobacillus* ir *Parageobacillus* genčių bakterijoms.

Siekiant sukurti šią reguliuojamą raiškos sistemą, pirmiausiai į pasirinktą vektorių reiktų perkelti geobacilino I pirmtako geną (*geoA*), kartu su jo reguliuojamu promotoriumi, ir terminatoriumi, bei dviejų komponentų signalo perdavimo sistemos genus (*geoR* ir *geoK*), kartu su promotoriumi P_{geoRK} , kurie bus reikalingi geno raiškos reguliavimui. Vėliau *geoA* genas bus pakeistas kito baltymo, kurio heterologinę raišką norima vykdyti, genu (pavadinkime jį genu *X*). Genas *X* būtų įterptas iškart po reguliuojamu P_{geoA} promotoriumi, ir jo raiška būtų indukuojama į terpę pridedant subinhibitorinį kiekį geobacilino I. Geobacilinas I prisijungia prie histidino baltymų kinazės GeoK, lokalizuotos bakterijos membranoje, ši autofosforilinas ir perkelia fosfato grupę ant atsako reguliatoriaus GeoR, kuris po perkėlimo aktyvuoja promotorių P_{geoA} . Aktyvuotas P_{geoA}^* indukuos už šio promotoriaus esančio geno *X* raišką. Po geno *X* bus T_{geoA} terminatorius. Jo buvimas padidina norimo produkto išėgą, sumažindamas nereikalingų genų transliaciją.

3.1. Bioinformatinė analizė

Geobacillus thermodenitrificans DSM465 kamienas buvo pasirinktas kaip *geoARK* genų šaltinis, kadangi išanalizavus literatūrą nustatyta, jog šiame kamiene yra randamas geobacilino I genų klasteris (Garg et al., 2012). Be to šis kamienas yra lengvai pasiekiamas mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros kultūrų kolekcijoje. Siekiant nustatyti šio bakteriocino genų klasterį ir jų sekas, *G. thermodenitrificans* DSM465 kamieno genomo seka FASTA formatu įkelta į BAGEL4 programą. Analizės metu nustatytos sekos, koduojančios *geoA*, *geoR* ir *geoK* genus, kurie toliau buvo naudojami molekulinės biologijos darbuose.

Nors BAGEL4 programa geba atpažinti promotoriaus ir terminatoriaus sekas, šiuo atveju nebuvo tiksliai nustatyti *geoA* promotorius ir terminatorius. Jų nustatymui panaudotos PromoterHunter ir BacPP programos. Bioinformatinės analizės metu gauti rezultatai susisteminti 3.1 pav..

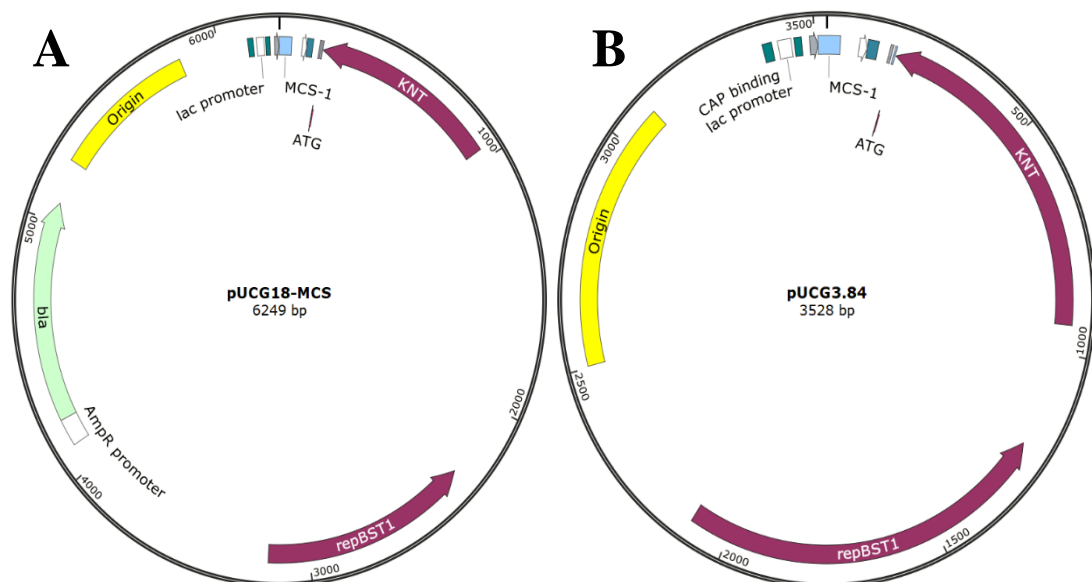


3.1 pav. Geobacilino I genų klasteris *geobacillus thermodenitrificans* DSM465 bakterijos geome. Terminorius *T_{geoA}* ir promotorius *P_{geoA}* pažymėti pilkos spalvos stačiakampiais.

3.2. pUCG18 vektoriaus mažinimas į pUCG3.84

Sistemos kūrimui pasirinkome šaudyklinį pUCG18 vektorių. Darbų pradžioje siekėme sumažinti šį vektorių, pašalinant nereikalingas ir nekoduojančias sekas, taip padidinant plazmidės perkėlimo ir bakterijų transformacijos efektyvumą. Yra žinoma, kad kuo didesnis vektorius terpiamas į bakteriją, tuo mažesnis transformacijos efektyvumas (Hanahan, 1983). Pirmame žingsnyje mes turėjome pašalinti BamHI restrikcijos vietą iš pUCG18 vektoriaus, kadangi tolimesniuose darbuose mažinant plazmidę planavome naudoti BamHI restrikcijos vietą sujungiant sumažintos plazmidės fragmentus. Todėl nusprendėme šio vektoriaus lacZ klonavimo saitą, turintį BamHI kirpimo vietą, pakeisti pCDFDuet-1 vektoriaus MCS-1 klonavimo saitą, neturintį BamHI kirpimo vietos. Vektorių pUCG18 sukirpome EcoRI ir NdeI restriktazėmis, taip pašalindami lacZ saitą. Tuo tarpu MCS-1 iš pCDFDuet-1 plazmidės iškirpome naudodami EcoRI ir NdeI restriktazes. NdeI restriktazės perkirptą plazmidę be lacZ fragmento suligavome su iškirptu MCS-1 fragmentu ir gavome konstrukta pUCG18-MCS, neturintį BamHI kirpimo saito (3.2 pav. A).

Antrame žingsnyje siekėme pašalinti nereikšmingas ir nieko nekoduojančias DNR sekas iš gauto konstrukto pUCG18-MCS. Šiam tikslui mes PGR būdu padauginome du atskirus šios plazmidės fragmentus: 1- koduojantį Ori seką, lac promotorių, įterptą pCDFDuet-1 klonavimo saitą MCS-1 ir kanamicino atsparumo geną, bei 2 – koduojantį RepBST1 geną. Gautas 1 fragmentas buvo sukarpytas BamHI restriktaze, 2 fragmentas – BglII, abu fragmentai suliguoti ir gauta nauja plazmidė pUCG3.84 (3.2 pav. B).

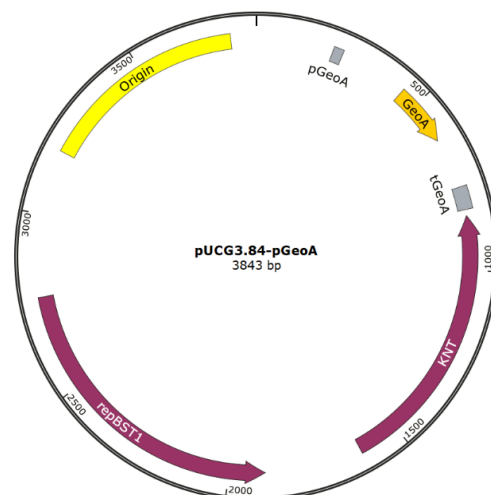


3.2 pav. pUCG18 vektoriaus mažinimo metu gauti vektoriai. A – pUCG18-MCS vektorius, B – pUCG3.84 vektorius

3.3. Genų koduojančių P_{GeoA} , $GeoA$ ir $GeoRK$ klonavimas į pUCG3.84.

Turint pUCG3.84 vektorių, kitas žingsnis buvo genus, *geoA* kartu su P_{geoA} bei T_{geoA} , *geoR* ir *geoK*, reikalingus indukcijai, įterpti į šį vektorių. *GeoA* genas pMS sistemai nebus reikalingas, tačiau siekiant supaprastinti molekulinės biologijos darbus buvo terpiamas kartu su savo promotoriumi ir terminatoriumi. Vėlesniuose darbuose šis genas bus pakeistas kitu, kurio raišką sieksime indukuoti.

Padauginti pUCG3.84 vektorių ir DNR, koduojančią P_{geoA} , *geoA* ir T_{geoA} buvo sukonstruoti pradmenys, persidengiančiais galais, todėl į pUCG3.84 nebuvo įvedamos papildomos restrikcijos fermentų sekos. Pirmiausiai į plazmidę buvo įterpti P_{geoA} , *geoA* ir T_{geoA} . Geobacilino pirmtako ir jo promotoriaus bei terminatoriaus genas buvo įterptas iškart už plazmidės Origin sekos, pašalinant visą klonavimo saitą (3.3 pav.). Taip buvo gauta ir išskirta sukonstruota pUCG3.84- P_{geoA} -*geoA* plazmidė.



3.3 pav. pUCG3.84 plazmidė su įterptu *geoA*, jo promotoriumi ir terminatoriumu

Vėliau į pUCG3.84-^PgeoA-geoA siekėme įterpti *geoR* ir *geoK* genus, kartu su jų promotoriumi. Deja, šioje šių genų įklonuoti į pUCG3.84-^PgeoA-geoA plazmidę niekaip nepavyko. Todėl į pUCG3.84 plazmidę nusprendėme pirmiausiai įklonuoti *geoR* ir *geoK* genus, kartu su jų promotoriumi. Gavus pUCG3.84-geoRK konstrukta į jį bandėme klonuoti ^P*geoA*, *geoA* ir ^T*geoA*. Deja, gauti ir išskirti naujo konstrukto pUCG3.84-^PgeoA-geoARK nepavyko

3.4. Genų koduojančių P^{geoA}, *geoA* ir *geoRK* klonavimas į pUCG18.

Kadangi nepavyko visų genų įklonuoti į sumažintą pUCG3.84 vektorių, buvo nuspręsta toliau dirbti su pUCG18 vektoriumi. Pirmiausiai tokiu pačiu principu kaip ir pUCG3.84-^PgeoA-geoA, į vektorių buvo įterpiami ^P*geoA*, *geoA* ir ^T*geoA* genai. Į gautą konstrukta pUCG18-^PgeoA-geoA vėliau terpėme *GeoR* ir *GeoK* koduojančius genus su jų promotoriumi. Kaip ir prieš tai, gauti plazmidės su visais ^P*geoA*, *geoA*, ^T*geoA*, *geoR* ir *geoK* genais nepavyko

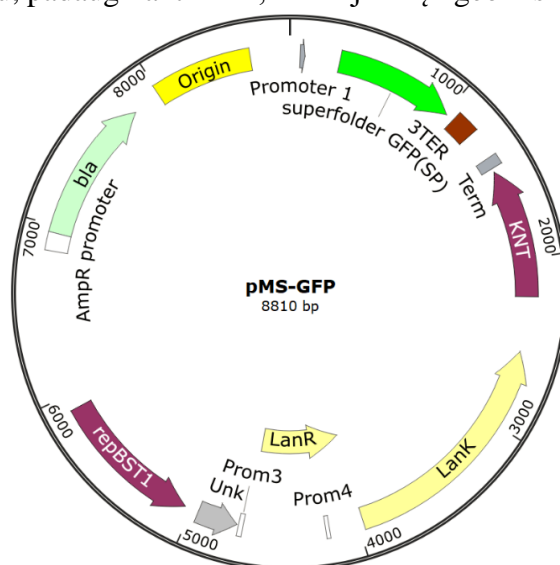
Turint šiuos rezultatus, buvo iškelta hipotezė, kad visiems komponentams esant vektoriuje, vyksta foninė geobacilino I raiška. Susintetintas geobacilinas I per dvikomponentę signalo perdavimo sistemą (*GeoRK*) aktyvuoja ^PgeoA promotorių ir didėja Geobacilino I raiškos lygis. Geobacilinas I pradamas sintetinti iškart po transformacijos pradeda veikti ląstelę ir kolonijos turinčios pUCG18-^PgeoA-geoARK vektorių nebeužauga.

3.5. Geno koduojančio GFP klonavimas į pUCG18-PGeoA-GeoA.

Tolimesnių darbų eigoje buvo numatyta *GeoA* koduojantį geną pakeisti GFP stabilus aukštoje temperatūroje (*sfGFP*) genu, tam kad būtų patogiu stebėti indukuojamų genų raišką ir sistemos efektyvumą. Susidūrus su problemomis klonuojant ^P*geoA*, *geoA*, *geoR* ir *geoK* genus į pUCG18 vektorių, nuspręsta turimame sukonstruotame pUCG18-^PGeoA-GeoA vektoriuje, prieš klonuojant *geoR* ir *geoK* genus, *geoA* geną pakeisti *sfGFP* genu. DNR, koduojanti ^P*geoA*, *geoA* ir ^T*geoA*, bei *sfGFP* genas padauginyti PGR metodu, sukarpyti *Xba*I ir *Bam*HI restrikcijos fermentais ir suliguoti. Kolonijos buvo atrinktos kolonijų PGR metodu ir išskirtas pUCG18-^PgeoA-*sfGFP* vektorius

3.6. GeoR ir GeoK genų klonavimas į pUCG18-PGeoA-sfGFP

Buvo spėjama, kad pakeitus *geoA* geną į sfGFP pUCG18-^PgeoA-geoA vektoriuje, pavyks sukurti pMS vektorių, turintį visus reikalingus raiškos sistemai genus: ^P*geoA*, *geoR* ir *geoK*. Todėl toliau į pUCG18-^PgeoA-sfGFP vektorių buvo terpiami *geoR* ir *geoK* genai, kaip anksčiau darbe aprašytame 3.4 skyriuje. Bakterijų kolonijos, turinčios reikiamą plazmidę buvo atrinktos kolonijų PGR metodu. Iš jų išskirta pMS-sfGFP ir vektoriaus (3.4 pav.) tinkamumas patvirtintas PGR metodu, padauginant DNR, koduojančią PgeoA-sfGFP ir GeoRK fragmentus.

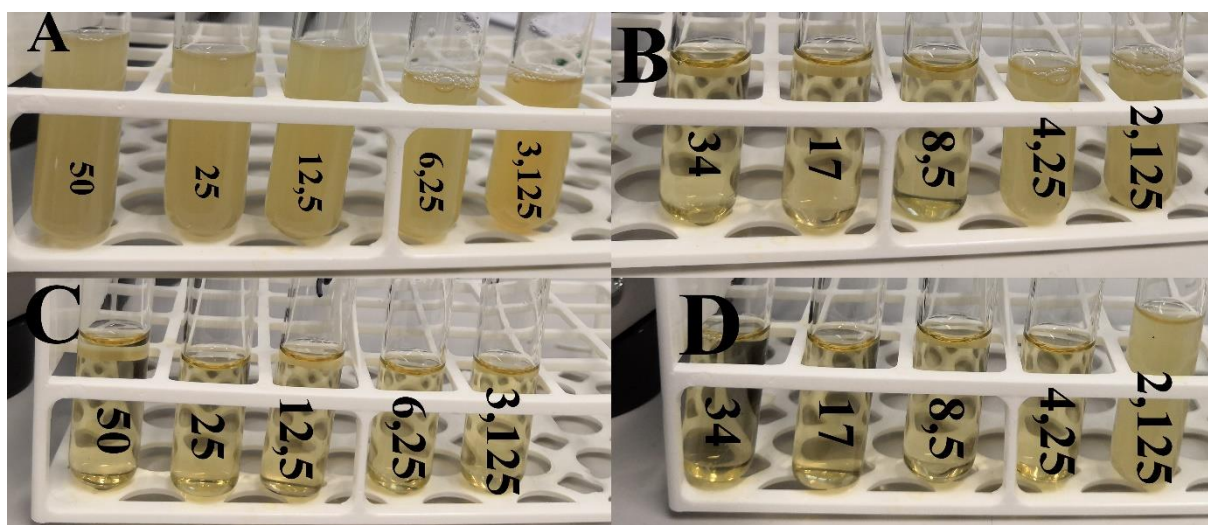


3.4 pav. pMS-GFP vektoriaus schematinis vaizdas

3.7. *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465 ir *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R kamienų atsparumo chloramfenikoliui ir kanamicinui tyrimas

Atlikus literatūros analizę, išsirinkome dvi *Geobacillus* bakterijų rūšis, esančias mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros kultūrų kolekcijoje, kurios prieš tai buvo sėkmingai transformuotos (Martinus J. A. Daas et al., 2018; Kananavičiūtė et al., 2015). Į *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465 ir *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R kamienus tolimesnių darbų eigoje buvo bandoma įterpti pMS- GFP plazmidę, tam, kad būtų galima nustatyti raiškos sistemos efektyvumą. Kadangi pMS-GFP plazmidė turi atsparumo kanamicinui geną, siekėme išsiaiškinti, ar šiame darbe naudojamų bakterijų kamienai nėra atsparūs kanamicinui, kad veiktų plazmidės atrankos sistema. Kartu buvo tiriamas ir bakterijų atsparumas kitam aukštesnėje temperatūroje stabiliam antibiotikui - chloramfenikoliui. Buvo paruošti mėgintuvėliai su skirtingomis šių antibiotikų koncentracijomis, kaip nurodyta 2.3 lentelėje, ir stebimas bakterijų augimas. Gauti rezultatai parodyti 3.5 pav.. Iš jų matyti, kad *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465 kamienas yra atsparus kanamicinui, bet nustoja augti terpėje su chloramfenikoliu, kai jo koncentracija siekia 8,5 µg/mL. *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R kamienas buvo jautrus net mažiausioje kanamicino

koncentracijoje (vos 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o chloramfenikoliui buvo atsparus tik esant 2,123 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antibiotiko koncentracijai.



3.5 pav. Bakterijų atsparumo antibiotikams tyrimo rezultatai. Nuotraukos darytos po 24 val. bakterijų auginimo terpėje su antibiotikais. A – *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465 kamieno bakterijos augintos skirtingose kanamicino koncentracijose, B – *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465 kamieno bakterijos augintos skirtingose chloramfenikolio koncentracijose, C – *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R kamieno bakterijos augintos skirtingose kanamicino koncentracijose, D – *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R 2542 kamieno bakterijos augintos skirtingose chloramfenikolio koncentracijose. Antibiotikų koncentracijos $\mu\text{g}/\text{mL}$ nurodytas nuotraukoje.

3.8. Konstrukto pMS-GFP transformacija į *Geobacillus*

Kadangi *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465 kamienas buvo atsparus kanamicinui, kuris yra naudojamas kaip atrankos žymuo pMS plazmidėje, bandėme paruošti *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R kompetentines ląsteles. Pirmiausiai kompetentinės ląstelės buvo bandoma paruošti auginant mTGP terpėje, remiantis literatūroje aprašyta metodika geobacilų transformacijai (Jensen et al., 2017). Siekiant pagerinti bakterijų augimą, terpė dar buvo papildoma druskų tirpalu DR2. Taip pat remiantis literatūros šaltiniais, kuriuose aprašyta geobacilų transformacija (Javed et al., 2017). Deja, auginimo metu ląstelės labai lėtai augo, ir nustojo dalintis pasiekus OT_{600} lygų 0,5. Iš literatūros yra žinoma, kad *Geobacillus* genties bakterijos geriausiai transformuojasi, kai kompetentinės ląstelės pasiekia vėlyvąją eksponentinio augimo fazę, t.y. kai pasiekia OD_{600} lygų 0,95 (Narumi et al., 1992).

Toliau nusprendėme kompetentines ląsteles auginti MB terpėje papildytoje druskomis DR1 remiantis literatūros šaltiniais, kuriuose aprašyta šio kamieno transformacija (Kananavičiūtė, 2015). Siekiant išplėsti tyrimo ribas, kompetentiniu ląstelių auginimui buvo pasirinktas dar vienas *Geobacillus thermoglucosidasus* DSM 2542 kamienas, nes šios rūšies bakterijos jau buvo sėkmingai transformuotos kitų mokslininkų tyrimų metu (Thompson et al.,

2008). Prieš kompetentinių ląstelių auginimą buvo patikrinta ar šis kamienas neturi atsparumo kanamicinui.

G. thermoglucosidasus DSM 2542 ir *G. stearothermophilus* NUB3621R kamienai, auginami MB terpėje, papildytoje DR1 druskomis, pasiekė OT600 lygį 0,95 po ~ 5 val. auginimo, ir toliau buvo paruoštos kompetentinės ląstelės.

Vėliau paruoštos kompetentinės ląstelės buvo transformuojamos pMS-GFP vektoriumi elektroporacijos metodu, kolonijos su pMS-GFP vektoriumi neužaugo. Siekiant išsiaiškinti, ar kompetentinių ląstelių paruošimas bei transformacija yra veiksmingi, kaip kontrolę į šiuos kamienus bandėme perkelti ir pUCG18 bei pNW33N vektorius. Transformantai su pUCG18 vektoriumi neužaugo, tačiau pNW33N vektorių pavyko perkelti į *Geobacillus thermoglucosidasus* DSM 2542 kamieną, kas rodo jog šis kamienas gali būti transformuojamas.

3.9. *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R protoplastų transformacija

Nepavykus pMS-GFP vektoriaus perkelti į *Geobacillus* ląsteles elektroporacijos metodu, nusprendėme *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R transformuoti protoplastų metodu. Po protoplastų transformacijos užaugo ląstelės neturinčios pMS-GFP konstrukto, tačiau gauti transformantų su pMS-GFP vektoriumi nepavyko. Yra parodyta, kad esant aukštesnei nei 50 °C temperatūrai, regeneracijos terpėje esantis didelis kiekis kalcio ir laktozės slopina kanamicino poveikį (Wu et al., 1989).

3.10. Kanamicino atsparumo geno keitimas į atsparumo chloramfenikoliui geną

Kadangi pMS vektoriuje esantis atsparumo kanamicinui genas riboja *Geobacillus* transformuojamų bakterijų šeiminkų ratą ir transformacijos metodų panaudojimą, nusprendėme sukurti antrą vektoriaus variantą, kuriame atsparumo kanamicinui genas bus pakeistas į atsparumo chloramfenikoliui geną. Tam buvo sukonstruoti pradmenys persidengiančiais galais, kurių viena pora naudojama padauginti pMS vektoriui, be kanamicino geno, o kita pora – atsparumo chloramfenikolio genui iš pNW33N plazmidės. Buvo atliktas PGR, padauginant chloramfenikolio atsparumo geną *cat* ir pMS vektorių be *KNT* geno. Fragmentų suliguoti šio darbo metu nebespėjome, tačiau pratęsus darbus pMS plazmidėje *KNT* genas būtų pakeistas *cat* genu, ir turėtume pMS2-GFP (pMS-GFP plazmidė, kurioje kan^R genas pakeistas cm^R genu) plazmidę.

3.11. Numatyti eksperimentai

3.11.1. pMS2-GFP konstrukto gamyba

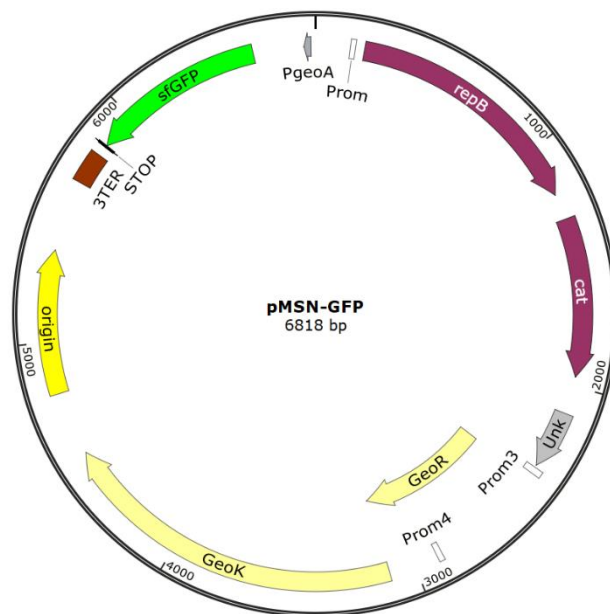
Tolimesnėje darbo eigoje buvo numatyta baigti konstruoti pMS2-GFP vektorių, taip praplečiant transformuojamų šeimininkų ratą ir suteikiant galimybę panaudoti protoplastų transformacijos metodą.

3.11.2. pMSN-GFP vektoriaus gamyba

Pavykusi *Geobacillus thermoglucosidasus* DSM 2542 elektrotransformacija pNW33N vektoriumi leidžia tikėtis, jog mums taip pat pavyktų perkelti ir pMS-cnt-GFP vektorių į pastarąjį kamieną. Taip pat planavome į pNW33N vektorių įklonuoti *sfGFP* geną, kartu su *geoA* promotoriumi ir terminatoriumi, bei *geoR* ir *geoK* genus (pav. 3.8). Būtume įvertinę ar vektorių replikacijos baltymai, kurie skiriasi tarp pUCG18 ir pNW33N pagrindu sukurtų vektorių, turi įtakos mūsų kuriamos baltymų raiškos sistemos efektyvumui. Šiuo metu jau esame sukūrę pradmenis, reikalingus šiai modifikacijai atlikti. Pradmenys pateikti lentelėje 3.1. Sukūrus šį konstrukta, *Geobacillus* transformacija būtų vykdoma tokia pačia eiga, kaip su pMS-GFP vektoriumi. Nepavykus ir šio konstrukto perkelti į *Geobacillus* bakterijas, toliau būtų vykdoma transformuojamų *Geobacillus* ir *Parageobacillus* kamienų paieška, bei transformacijos sąlygų optimizacija.

lentelė 3.1 Pradmenys, sukurti pMSN-GFP vektoriumi gaminti

Pavadinimas	Seka 5` – 3`
repB_cat_F	tgcgttttgagcgtagcgaaaaacgagttc
repB_cat_R	ccttcaaaactcccaaaggcgagccc
geoRK_F	ctcgcctttgggaagtgtgaaggaacgccttgggattgtgcattttattatctgaagt
geoRK_R	ttggtctgacagaggcttagagactgtcagctagggaaagaga
Ori_pNW_F	ttcttaagcctctgtcagaccaagtttactcatatatacttagattgattaaaactt
Ori_pNW_R	ttgaacctgtgtaaatgaatcggccaacgcgcggg
PgeoA_sfGFP_pNW_F	ttttcgctacgctcaaaacgcagctagcccaataaccttttgagatagctcgtatacaca
PgeoA_sfGFP_pNW_R	ccgattcattacacatggttcaatgaatgtgtgatcaatcgaatctagc



3.6 pav. pMSN-GFP vektoriaus shematinis vaizdas

3.11.3. pMS raiškos sistemos efektyvumo tyrimas

Pavykus pMS konstruktą perkelti į *Geobacillus* ar *Parageobacillus* bakterijas, toliau būtų stebimas šios raiškos sistemos efektyvumas ir optimizuojamos indukcijos sąlygos. Kadangi į pMS vektorių po *P_{geoA}* promotoriaus seka yra įterptas stabilus aukštoje temperatūroje GFP genas, būtų stebimas jo fluorescencijos stiprumas. Skirtingą optinį tankį pasiekusios ląstelės būtų indukuojamos skirtingu kiekiu induktoriaus ir fluorescencijos intensyvumas skirtingais laiko momentais būtų stebimas mikroplokštelių skaitytuvo pagalba.

Indukuoti ląsteles ketinama komerciškai prieinamu nizinu A, kadangi jo struktūra ir veikimo mechanizmas labai panašus į geobacilino I. Nepavykus indukuoti pMS sistemos nizinu, geobacilino I genas būtų klonuojamas į *E. coli* raiškos vektorių, sintetinamas *E. coli* DE3 ląstelėse ir gryninamas pagal aprašytą metodiką (Garg et al., 2012).

IŠVADOS

1. Naudojantis Bagel4, PromoterHunter ir BacPP programomis *Geobacillus thermodenitrificans* DSM465 bakterijos genome įidentifikavome geobacilino I biosintezės genų klasterį ir už bakteriocino raišką atsakingas DNR sekas ir genus: *PgeoA*, *geoA*, *TgeoA*, *geoR* ir *geoK*.
2. Iš pUCG18 plazmidės pašalinome nereikalingas ir nekoduojančias DNR sekas, gaudami pUCG3.84 vektorių, tačiau jo panaudoti raiškos sistemos konstravimui nepavyko.
3. Geobacilino I raišką reguliuojančios DNR sekos: *PgeoA*, *geoA*, *TgeoA*, *geoR* ir *geoK*, buvo įklonuotos į pUCG18 vektorių taip sukonstruojant pMS vektorių, skirtą genų raiškai termofilinėse bakterijose.
4. Į pMS vektorių įklonavome žaliai fluorescuojančio baltymo geną *sfGFP*, taip sukonstruojant pMS-GFP konstrukta, skirtą raiškos sistemos veikimo įvertinimui.
5. Perkelti pMS-GFP vektorius į (*Para*)*Geobacillus* bakterijas šio darbo metu nepavyko, todėl raiškos sistemos veikimas termofilinėse bakterijose dar nėra įvertintas.

SANTRAUKA

Manta Vaičiškaitė

Reguliuojamos raiškos sistemos kūrimas termofilinėms *Geobacillus* ir *Parageobacillus* genčių bakterijoms

Geobacillus ir *Parageobacillus* genčių bakterijos turi didelį potencialą, dėl savo metabolinių savybių ir gebėjimo sintetinti įvairias chemines medžiagas, bei termostabilius fermentus. Galimybė modifikuoti šių bakterijų genomus, įterpti svetimą DNR seką ar sukelti turimų baltymų padidintą raišką padėtų šias bakterijas plačiau pritaikyti biotechnologijoje.

Darbo metu siekėme sukurti naują raiškos sistemą (*Para*)*Geobacillus* genčių bakterijoms, panaudodami *Geobacillus thermodenitrificans* rūšies bakterijų sintetinio geobacilino I autoindukcijos mechanizmą. Kuriant raiškos sistemą pMS, sumažinome pUCG18 vektorių pašalindami nereikalingą ir nieko nekoduojančią seką. Buvo gautas pUCG3.84 vektorius, į kurį nepavyko įterpti geobacilino I raiškos reguliacijos genų, todėl P_{geoA} , T_{geoA} , *geoR* ir *geoK* genai buvo įterpti į pUCG18 vektorių. Sistemos efektyvumui patikrinti, tarp P_{geoA} ir T_{geoA} genų buvo įterptas *sfGFP* genas, sukuriant pMS-GFP vektorių. Šio vektoriaus nepavyko perkelti į geobacilas, todėl, siekiant praplėsti šeimininkų ratą, atsparumo kanamicinui genas buvo keičiamas atsparumo chloramfenikoliui genu.

SUMMARY

Manta Vaičiškauskaitė

Development of controlled gene expression system for thermophilic *Geobacillus* and *Parageobacillus* spp. Bacteria

Members of the genus *Geobacillus* and *Parageobacillus* bacteria have unique metabolic properties and are able to synthesise high variety of chemical compounds and thermostable enzymes. The ability to modify their genomes, introduce new genes and overexpress existing genes would increase their usage in biotechnology.

In this study, we were creating a new gene expression system called pMS using the autoinduction mechanism of bacteriocin geobacilin I found in *Geobacillus thermodenitrificans* bacteria. We inserted *PgeoA*, *TgeoA*, *geoR* and *GeoK* genes used in autoinduction mechanism of geobacilin I into pUCG18 plasmid and created pMS vector. Subsequently, we inserted superfolder green fluorescent protein gene between *PgeoA* and *TgeoA* genes, to be able to determine the efficiency of the system. Unfortunately, we weren't able to insert pMS-GFP vector into geobacili. In order to expand the range of possible hosts, we were changing resistance to kanamycin gene in pMS vector to resistance to chloramphenicol gene.

- Ambika Verma, Shirkot P. 2014. Purification and Characterization of Thermostable Laccase from Thermophilic *Geobacillus thermocatenulatus* MS5 and its applications in removal of Textile Dyes, *Scholars Academic Journal of Biosciences* 2(8): 2321–6883. Available at: www.saspublisher.com.
- Atalah J., Cáceres-moreno P., Espina G., Blamey J.M. 2019. Bioresource Technology Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts, 280(November 2018): 478–488. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.02.008 .
- Balan A., Ibrahim D., Abdul Rahim R., Ahmad Rashid F.A. 2012. Purification and Characterization of a Thermostable Lipase from *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra, *Enzyme Research* 2012: 1–7. DOI: 10.1155/2012/987523 .
- Bartosiak-jentys J., Hussein A.H., Lewis C.J., Leak D.J. 2013. Modular system for assessment of glycosyl hydrolase secretion in *Geobacillus thermoglucosidasius* Printed in Great Britain, : 1267–1275. DOI: 10.1099/mic.0.066332-0 .
- Blamey J.M. 2013. Production , Purification and Partial Characterization of Four Lipases from a Thermophile Isolated from Deception Island Production , Purification and Partial Characterization of Four Lipases from a Thermophile Isolated from Deception Island, (February). DOI: 10.1007/s11745-013-3771-9 .
- Brock T.D., Freeze H. 1969. sporulating Extreme Thermophile, 98(I): 289–297.
- Bryan E.M., Bae T., Kleerebezem M., Dunny G.M. 2000. Improved Vectors for Nisin-Controlled Expression in Gram-Positive Bacteria, *Plasmid* 44(2): 183–190. DOI: 10.1006/plas.2000.1484 .
- Cha M., Chambliss G.H. 2013. Cloning and sequence analysis of the heat-stable acrylamidase from a newly isolated thermophilic bacterium , *Geobacillus thermoglucosidasius* AUT-01, : 57–67. DOI: 10.1007/s10532-012-9557-6 .
- Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*., *Journal of Bacteriology* 127(3): 1550–1557. DOI: 10.1128/JB.127.3.1550-1557.1976 .
- Cripps R.E., Eley K., Leak D.J., Rudd B., Taylor M., Todd M., Boakes S., Martin S., Atkinson T. 2009. Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production, *Metabolic Engineering* 11(6): 398–408. DOI: 10.1016/j.ymben.2009.08.005 .
- Daas M.J.A., Nijssse B., Weijer A.H.P. Van De, Groenendaal B.W.A.J., Janssen F., Oost J. Van Der, Kranenburg R. Van 2018. Engineering *Geobacillus thermodenitrificans* to introduce cellulolytic activity ; expression of native and heterologous cellulase genes, : 1–13.

- Daas M.J.A., Nijssse B., van de Weijer A.H.P., Groenendaal B.W.A.J., Janssen F., van der Oost J., van Kranenburg R. 2018. Engineering *Geobacillus thermodenitrificans* to introduce cellulolytic activity; expression of native and heterologous cellulase genes, *BMC Biotechnology* 18(1): 42. DOI: 10.1186/s12896-018-0453-y .
- Dien M.B.S. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production : current status, : 258–266. DOI: 10.1007/s00253-003-1444-y .
- Drejer E.B., Hakvåg S., Irla M., Brautaset T. 2018. Genetic Tools and Techniques for Recombinant Expression in Thermophilic Bacillaceae. DOI: 10.3390/microorganisms6020042 .
- Egan K., Field D., Ross R.P., Cotter P.D., Hill C. 2018. In silico Prediction and Exploration of Potential Bacteriocin Gene Clusters Within the Bacterial Genus *Geobacillus*, 9(September). DOI: 10.3389/fmicb.2018.02116 .
- Ejaz U., Muhammad S., Hashmi I.A., Ali F.I., Sohail M. 2020. Utilization of methyltrioctylammonium chloride as new ionic liquid in pretreatment of sugarcane bagasse for production of cellulase by novel thermophilic bacteria, *Journal of Biotechnology* 317: 34–38. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.04.013 .
- Feitkenhauer H., Müller R., Märkl H. 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 6070 ° C by *Thermus* and *Bacillus* spp, : 367–372. DOI: 10.1023/a:1027357615649 .
- Francis D.M., Page R. 2010. Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*, (August): 1–29. DOI: 10.1002/0471140864.ps0524s61 .
- Frenzel E., Legebeke J., Stralen A. Van, Kranenburg R. Van, Kuipers O.P. 2018. Biotechnology for Biofuels In vivo selection of sfGFP variants with improved and reliable functionality in industrially important thermophilic bacteria, *Biotechnology for Biofuels*: 1–19. DOI: 10.1186/s13068-017-1008-5 .
- Garg N., Tang W., Goto Y., Nair S.K., Donk W.A. Van Der 2012. Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*. DOI: 10.1073/pnas.1116815109 .
- Garg N., Oman T.J., Andrew Wang T.-S., De Gonzalo C.V.G., Walker S., van der Donk W.A. 2014. Mode of action and structure–activity relationship studies of geobacillin I, *The Journal of Antibiotics* 67(1): 133–136. DOI: 10.1038/ja.2013.112 .
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Journal of Molecular Biology* 166(4): 557–580. DOI: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8 .
- Hussein A.H., Lisowska B.K., Leak D.J. 2015. *The Genus Geobacillus and Their Biotechnological Potential* Elsevier. DOI: 10.1016/bs.aambs.2015.03.001 .
- J. Lubelski, R. Rink, R. Khusainov, G. N. Moll O.P.K. 2008. Review Biosynthesis , immunity

- , regulation , mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin, 65: 455–476. DOI: 10.1007/s00018-007-7171-2 .
- Javed M., Baghaei-Yazdi N., Qin W., Amartey S. 2017. An improved agar medium for growth of *Geobacillus thermoglucosidarius* strains, *Journal of Microbiological Methods* 132: 116–118. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.11.014 .
- Jensen T.Ø., Pogrebnyakov I., Falkenberg K.B., Redl S., Nielsen A.T. 2017. Application of the thermostable β -galactosidase, BgaB, from *Geobacillus stearothermophilus* as a versatile reporter under anaerobic and aerobic conditions, *AMB Express* 7(1): 169. DOI: 10.1186/s13568-017-0469-z .
- Jesu A., Giraldo R., Di N. 1998. Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids, 62(2): 434–464.
- Kambourova M. 2018. Thermostable enzymes and polysaccharides produced by thermophilic bacteria isolated from Bulgarian hot springs, *Engineering in Life Sciences* 18(11): 758–767. DOI: 10.1002/elsc.201800022 .
- Kananavičiūtė R. 2015. *Geobacillus genties bakterijų transformacijos sistemos kūrimas*. Vilniaus universitetas.
- Kananavičiūtė R., Kanišauskaitė I., Novickij V., Čitavičius D.J. 2015. *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R genetic transformation by electroporation, *Biologija* 61(3–4). DOI: 10.6001/biologija.v61i3-4.3201 .
- Kleerebezem M., Quadri L.E.N., Oscar P. 1997. MicroReview Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria, 24: 895–904.
- Kuipers O.P., de Ruyter P.G.G., Kleerebezem M., de Vos W.M. 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria, *Journal of Biotechnology* 64(1): 15–21. DOI: 10.1016/S0168-1656(98)00100-X .
- Liao H.H., Kanikula A.M. 1990. Increased efficiency of transformation of *Bacillus stearothermophilus* by a plasmid carrying a thermostable kanamycin resistance marker, *Current Microbiology* 21(5): 301–306. DOI: 10.1007/BF02092095 .
- Lin P.P., Rabe K.S., Takasumi J.L., Kadisch M., Arnold F.H., Liao J.C. 2014. Isobutanol production at elevated temperatures in thermophilic *Geobacillus thermoglucosidarius*, *Metabolic Engineering* 24: 1–8. DOI: 10.1016/j.ymben.2014.03.006 .
- Marcano-Velazquez J.G., Lo J., Nag A., Maness P.-C., Chou K.J. 2019. Developing Riboswitch-Mediated Gene Regulatory Controls in Thermophilic Bacteria, *ACS Synthetic Biology* 8(4): 633–640. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00487 .
- Margesin M.R. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme

- environments, : 650–663. DOI: 10.1007/s002530100701 .
- Maris A.J.A. Van, et al. 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae* : current status, : 391–418. DOI: 10.1007/s10482-006-9085-7 .
- Mehta R., Singhal P., Singh H., Damle D. 2016. Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications, *3 Biotech* 6(1): 1–9. DOI: 10.1007/s13205-016-0368-z .
- Mierau M.I., Kleerebezem M. 2005. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*, : 705–717. DOI: 10.1007/s00253-005-0107-6 .
- Miyano M., Tanaka K., Ishikawa S., Mori K., Arribas A.M., Meijer W.J.J., Yoshida K. 2018. A novel method for transforming the thermophilic bacterium *Geobacillus kaustophilus*, *Microbial Cell Factories*: 1–13. DOI: 10.1186/s12934-018-0969-9 .
- Mohr T., Aliyu H., Kuchlin R., Zwick M., Cowan D., Neumann A., Maayer P. De 2018. Comparative genomic analysis of *Parageobacillus thermoglucosidasius* strains with distinct hydrogenogenic capacities, : 1–10.
- Mohr T., Aliyu H., Kuchlin R., Zwick M., Cowan D., Neumann A., de Maayer P. 2018. Comparative genomic analysis of *Parageobacillus thermoglucosidasius* strains with distinct hydrogenogenic capacities, *BMC Genomics* 19(1): 880. DOI: 10.1186/s12864-018-5302-9 .
- Narumi I., Sawakami K., Nakamoto S., Nakayama N., Yanagisawa T., Takahashi N., Kihara H. 1992. A newly isolated *Bacillus stearothermophilus* K1041 and its transformation by electroporation, *Biotechnology Techniques* 6(1): 83–86. DOI: 10.1007/BF02438695 .
- Narumi I., Yanagisawa T., Kihara H. 1992. A newly isolated *Bacillus stearothermophilus* K1041 and its transformation by electroporation, (October). DOI: 10.1007/BF02438695 .
- Novik G., Savich V., Meerovskaya O. 2019. *Geobacillus* Bacteria: Potential Commercial Applications in Industry, Bioremediation, and Bioenergy Production *Growing and Handling of Bacterial Cultures*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.76053 .
- Pogrebnyakov I., Jendresen C.B., Nielsen A.T. 2017. Genetic toolbox for controlled expression of functional proteins in *Geobacillus* spp. S. S. Fong, sud., *PLOS ONE* 12(2): e0171313. DOI: 10.1371/journal.pone.0171313 .
- Potprommanee L., Wang X.-Q., Han Y.-J., Nyobe D., Peng Y.-P., Huang Q., Liu J., Liao Y.-L., Chang K.-L. 2017. Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass S. Yang, sud., *PLOS ONE* 12(4): e0175004. DOI: 10.1371/journal.pone.0175004 .
- Rogers L.A., Whittier E.O. 1928. Limiting Factors in the Lactic Fermentation, *Journal of*

- Bacteriology* 16(4): 211–229. DOI: 10.1128/jb.16.4.211-229.1928 .
- Rosano G.L., Ceccarelli E.A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* : advances and challenges, 5(April): 1–17. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172 .
- Sar P., Kazy K., Paul D., Sarkar A. 2013. *Metal Bioremediation by Thermophilic Microorganisms*. DOI: 10.1007/978-94-007-5899-5 .
- Sato M., Suda M., Okuma J., Kato T., Hirose Y., Nishimura A., Kondo Y., Shibata D. 2017. Isolation of highly thermostable β -xylosidases from a hot spring soil microbial community using a metagenomic approach, *DNA Research* 24(6): 649–656. DOI: 10.1093/dnares/dsx032 .
- Styles M.Q., Nesbitt E.A., Marr S., Hutchby M., Leak D.J. 2017. Characterization of the first naturally thermostable terpene synthases and development of strategies to improve thermostability in this family of enzymes, *The FEBS Journal* 284(11): 1700–1711. DOI: 10.1111/febs.14072 .
- Suzuki H., Yoshida K., Ohshima T. 2013. Polysaccharide-Degrading Thermophiles Generated by Heterologous Gene Expression in *Geobacillus kaustophilus* HTA426, *Applied and Environmental Microbiology* 79(17): 5151–5158. DOI: 10.1128/AEM.01506-13 .
- Talarico L.A., Gil M.A., Yomano L.P., Ingram L.O., Maupin-furlow J.A. 2005. Construction and expression of an ethanol production operon in Gram-positive bacteria Printed in Great Britain, : 4023–4031. DOI: 10.1099/mic.0.28375-0 .
- Tang L., et al. 2017. Screening and characterisation of a novel thermostable lipase with detergent-additive potential from the metagenomic library of a mangrove soil. DOI: 10.1016/j.gene.2017.04.046 .
- Taylor M.P., Esteban C.D., Leak D.J. 2008. Plasmid Development of a versatile shuttle vector for gene expression in *Geobacillus* spp ., 60: 45–52. DOI: 10.1016/j.plasmid.2008.04.001 .
- Thompson A.H., Studholme D.J., Green E.M., Leak D.J. 2008. Heterologous expression of pyruvate decarboxylase in *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Biotechnology Letters* 30(8): 1359–1365. DOI: 10.1007/s10529-008-9698-1 .
- Turner P., Mamo G., Karlsson E.N. 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining, 23: 1–23. DOI: 10.1186/1475-2859-6-9 .
- Wiegel J., Ljungdahl L.G., Demain A.L. 2008. Critical Reviews in Biotechnology The Importance of Thermophilic Bacteria in Biotechnology, 8551. DOI: 10.3109/07388558509150780 .
- Wu L., Welker N.E. 1989. Protoplast Transformation of *Bacillus stearothermophilus* NUB36

- by Plasmid DNA, *Microbiology* 135(5): 1315–1324. DOI: 10.1099/00221287-135-5-1315 .
- Yan F., Wei R. 2020. Special issue article Thermophilic whole-cell degradation of polyethylene terephthalate using engineered *Clostridium thermocellum*. DOI: 10.1111/1751-7915.13580 .
- Zarschler K., Janesch B., Zayni S., Scha C., Messner P. 2009. Construction of a Gene Knockout System for Application in *Paenibacillus alvei* CCM 2051 T , Exemplified by the S-Layer Glycan Biosynthesis Initiation Enzyme WsfP □, 75(10): 3077–3085. DOI: 10.1128/AEM.00087-09 .
- Zeigler D.R. 2013. bacterial genus so prevalent on a mesophilic COLOUR, : 1–12. DOI: 10.1099/mic.0.071696-0 .
- Zhou J., Lian J., Rao C. V 2020. Metabolic engineering of *Parageobacillus thermoglucosidasius* for the efficient production of (2R, 3R)-butanediol, *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(10): 4303–4311. DOI: 10.1007/s00253-020-10553-8 .
- Zhou X.X., Li W.F., Ma G.X., Pan Y.J. 2006. The nisin-controlled gene expression system: Construction, application and improvements, *Biotechnology Advances* 24(3): 285–295. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.11.001 .
- Zyl L.J. Van, Taylor M.P., Eley K., Tuffin M. 2014. Engineering pyruvate decarboxylase-mediated ethanol production in the thermophilic host *Geobacillus thermoglucosidasius*, : 1247–1259. DOI: 10.1007/s00253-013-5380-1 .