



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos

2 kurso studentė

Elžbieta Kulicka

Tau baltymo (2N4R izoformos) sintezė ir gryninimas

Magistro darbas

Darbo vadovas:
dr. Vytautas Smirnovas

Vilnius
2020

Tau baltymo (2N4R izoformos) sintezė ir gryninimas

Darbas atliktas Vilniaus Universiteto

Gyvybės mokslų centro, Biotechnologijos institute

Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje

Amiloidų tyrimų grupėje

Darbą atliko: **Elžbieta Kulicka**

Darbo vadovas: **dr. Vytautas Smirnovas**

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AA/BAA – akrilamido ir bisakrilamido mišinys

AD – Alzheimerio liga (ang. Alzheimer's disease)

aps. - apsisukimai

A β – Amiloidas beta

bp – bazių poros

CNS – centrinė nervų sistema

CV – kolonos tūris (ang. column volume)

DMSO – dimetilsulfoksidai

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

GuHCl – guanidino hidrochloridas

His-tag – polihistidino žymuo (ang. polyhistidine tag)

IMAC – įmobilizuotų metalų jonų chromatografija (ang. Immobilized-Metal Affinity Chromatography)

IPTG – izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozidas

LB – Luria Bertani mitybinė terpė

MT- mikrovamzdelis

NDS – natrio dodecilsulfatas

NDS-PAAG – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė

NFT – neurofibriliniai raizginiai (ang. Neurofibrillary tangle)

Ni-NTA – nikelio nitrilo triacto rūgštis (ang. Nickel-nitrilotriacetic acid)

O.T. – optinis tankis

OD₆₀₀ – optinis tankis esant 600 nm bangos ilgiui

PHF – suporuotos β -klosčių fibrilės (ang. Paired helical filaments)

PIPES – Piperazino-N,N'-bis(2-etansulfoninė rūgštis)

PP2A – baltymo fosfatazė 2A

S.O.C. – optimali mitybinė terpė (ang. Super Optimal broth with Catabolite repression)

SF – tiesiosios fibrilės (ang. Straight filaments)

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiaminas

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

TRIS-HCl – TRIS(hidroksimetil)aminometano hidrochloridas

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	3
ĮVADAS.....	8
1 LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1 Tau baltymas	9
1.1.1 Tau baltymo struktūra ir biologinė reikšmė	9
1.1.2 Tau baltymo izoformas.....	11
1.1.3 Amiloidiniai baltymai.....	12
1.1.4 Alzheimerio liga	13
1.2 Rekombinantinių baltymų sintezė <i>E. coli</i> ląstelėse	14
1.2.1 <i>E. coli</i> geno ekspresijos kamienas BL21(DE3).....	15
1.2.2 Baltymo raiškos indukcija	16
1.2.3 Bakterijų augimo sąlygos	18
1.2.3.1 Temperatūra ir pH	18
1.2.3.2 Aeracija ir terpės tūris	18
1.2.4 SUMO-tag	19
1.3 His-tag pažymėtų rekombinantinių baltymų gryninimas IMAC metodu	19
2 MEDŽIAGOS IR METODAI	22
2.1 Medžiagos, aparatūra	22
2.1.1 Reagentai	22
2.1.2 Genetinis konstruktas	22
2.1.3 Raiškos sistema	23

2.1.4	Mitybinės terpės	23
2.1.5	Tirpalų standartai	24
2.1.6	Buferiniai tirpalai.....	25
2.1.7	Laboratorinė įranga.....	27
2.2	Metodai	28
2.2.1	Kompetentinių ląstelių ruošimas	28
2.2.2	Kompetentinių ląstelių transformacija.....	28
2.2.3	Geno raiškos optimizavimas.....	29
2.2.4	NDS-PAAG elektroforezė	30
2.2.5	Baltymo gryninimo optimizavimas	32
2.2.5.1	Kolonos „pakrovimas“	32
2.2.5.2	Baltymo gryninimas	32
2.2.5.3	Kolonos valymas	33
3	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	35
3.1	Įvadas	35
3.2	Atlikti eksperimentai	35
3.2.1	Rekombinantinės Tau baltymo 2N4R izoformos sintezė	35
3.2.1.1	Kompetentinių ląstelių ruošimas ir transformacija	35
3.2.1.2	Baltymo sintezės sąlygų optimizavimas	36
3.2.1.3	Baltymo sintezė optimaliomis sąlygomis.....	40
3.3	Planuoti eksperimentai.....	41
IŠVADOS	44
PADĖKA	45

SANTRAUKA	46
SUMMARY	47
LITERATŪROS SĄRAŠAS	48

ĮVADAS

Demografinis senėjimas didina demencijos paplitimą ir socialines sąnaudas. Pagal 2015 metais paskelbtą Pasaulinę Alzheimerio ataskaitą, manoma, kad žmonių, sergančių demencija, skaičius iki 2050 m. pasieks 130 milijonų. Daugumai lėtinių neurodegeneracinių ligų būdingas laipsniškas baltymų agregatų kaupimasis nervinėje sistemoje (Brunello et al., 2019). Dažniausiai pasireiškiantis su amžiumi susijęs demencijos tipas yra Alzheimerio liga (AD). Žmonėms sergantiems AD yra būdingos amiloidinių plokštelių ir neurofibrilinių raizginių (NFT) sankaupos smegenyse, su tuo susijęs sinapsių ir neuronų praradimas, sukkeliantis kognityvinį deficitą ir galiausiai demenciją. Tau baltymas ir amiloidas- β peptidas yra atitinkamai NFT ir senatvinių plokštelių komponentai (Congdon et Sigurdsson, 2018).

Iki šiol nėra vaistų, kurie išgydytų taupatijas, bet nuolat ieškoma potencialų amiloidinių darinių formavimosi slopiklių. Tyrimams atlikti reikia didelių kiekių baltymų, kuriuos pirkti iš komercinių įmonių yra labai brangu, todėl rekombinantiniai baltymai yra sintetinami ir gryninami laboratorijose.

Šio darbo tikslas yra pagaminti Tau baltymo 2N4R izoformą sulietą su SUMO-His žymeniu. Keliami tokie uždaviniai:

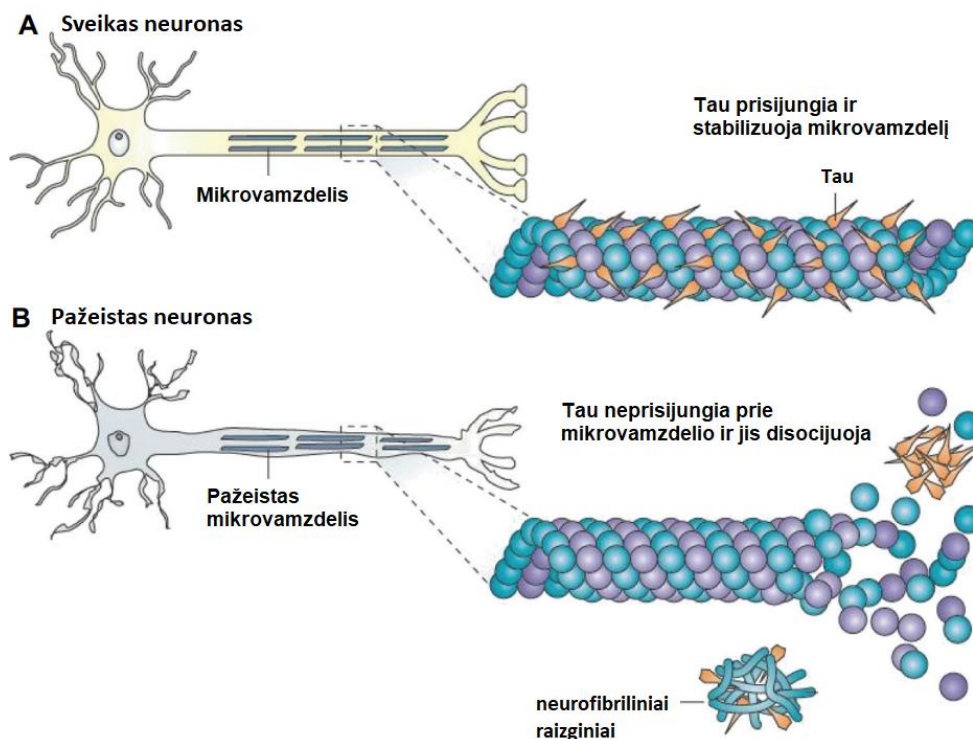
- Įvesti plazmidę koduojančią tikslinį baltymą į *E. coli* BL21(DE3) kompetentines ląsteles bei rasti optimalias sąlygas geno raiškai.
- Parinkus optimalias bakterijų kultivavimo sąlygas, užauginti biomasę skirtą tolesniems baltymo gryninimo tyrimams.
- Nustatyti kokios sąlygos tinka Tau baltymo 2N4R izoformos sulietos su SUMO-His gryninimui IMAC metodu.

1 LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Tau baltymas

1.1.1 Tau baltymo struktūra ir biologinė reikšmė

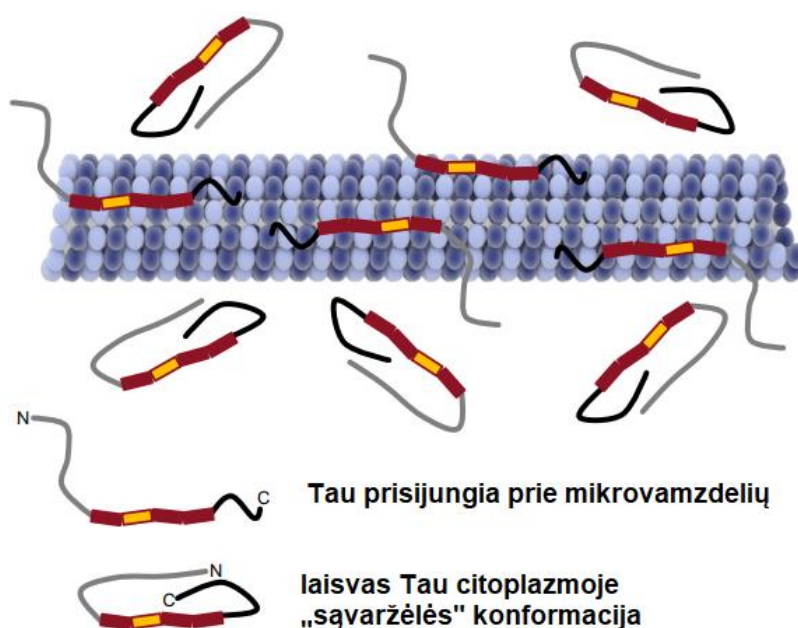
Tau yra citozolinis, su mikrovamzdeliais susijęs baltymas, o mikrovamzdeliai (MT) vaidina pagrindinį vaidmenį daugelyje gyvybiškai svarbių procesų, tokių kaip nervinių ląstelių dalijimasis ir viduląstelinis transportas. Tau baltymas randamas neuronuose ir mažesniu kiekiu glijos ląstelėse. Tau randamas ląstelių branduolyje, mitochondrijose, dendrituose, ir plazminėje membranoje. Pastarosios lokalizacijos rodo, kad, be pagrindinės MT reguliavimo funkcijos, Tau gali turėti ir kitų funkcijų ląstelėse (Brunello et al., 2019). MT yra pagrindiniai aksonų struktūriniai ir funkciniai elementai, palaikantys nervinių ląstelių diferenciaciją ir augimą, taip pat transportuojantys motorinius baltymus išilgai aksonų, kurie kaip atraminius takus naudoja MT (Ramkumar, 2008). Tau yra MT stabilizuojantis baltymas (**pav. 1.1 A**), kurio funkcijas daugiausia reguliuoja fosforilinimas. Tau baltymo funkcijų praradimas sukelia MT tinklo pažeidimą (**pav. 1.1 B**). Tokie sutrikimai, sukelti dėl Tau disfunkcionalumo, vadinami tauopatijomis, tarp šių ligų yra ir geriausiai žinoma AD. (Barbier et al., 2019).



pav. 1.1 Tau biologinė reikšmė. A – sveikas neuronas, kuriame taisyklingai Tau baltymas prisijungęs prie mikrovamzdelio ir jį stabilizuoja. B – pažeisto neurono vaizdas, Tau baltymas yra neurofibrilinio raizginio būsenoje, kuris neprisijungia prie mikrovamzdelio ir jis disocijuoja. (pritaikyta iš Chen et al., 2013).

Biofizikiniai tyrimai parodė, kad natyvus Tau neturi tretinės ir ketvirtinės struktūrų (Fitzpatrick et al., 2017) ir netgi mažai antrinės struktūros fragmentų (Sibille et al., 2012). Tačiau apibrėžtos antrinės struktūros trūkumas neužkerta kelio Tau baltymui susilankstyti molekulės viduje sąveikaujant skirtingai įkrautiems jo domenams. Be to, rentgeno struktūrinė analizė, Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija, žiedinio dichroizmo ir fluorescencijos spektroskopija taip pat patvirtina lokalizuotą Tau susilankstymą (Jeganathan et al., 2008).

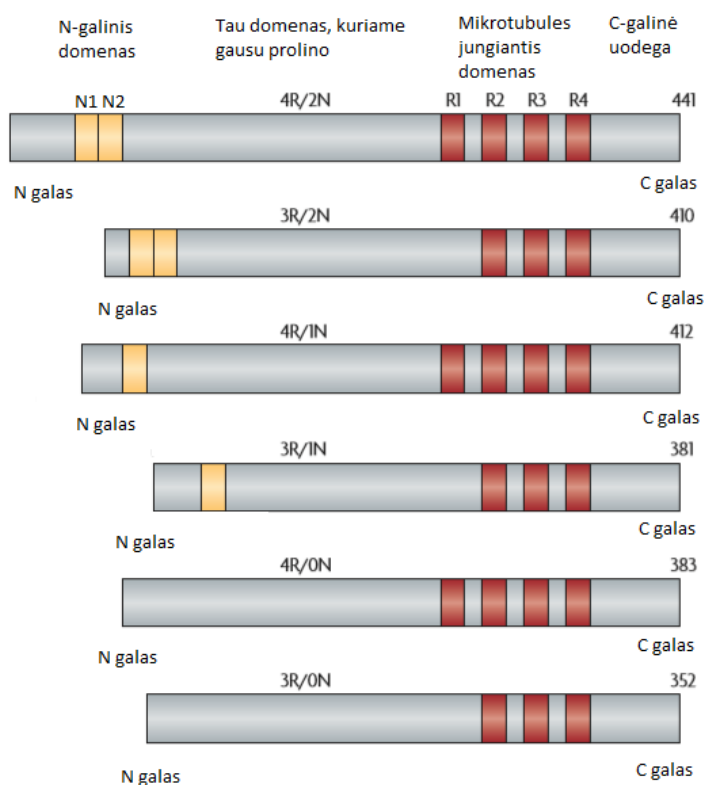
Laisvas Tau baltymas citoplazmoje yra būsenoje, kai C-domenas priartėjęs prie MT jungiančio domeno (Jeganathan et al., 2006), o jį uždengia N-galinis domenas, tokia Tau konformacija pavadinta „sąvaržėlės“ (**pav. 1.2**). Tokia N ir C galų sąveika susilpnėja, kai Tau prisijungia prie MT. C-galui prisitvirtinus prie mikrovamzdelio, N-galinis domenas išsikiša iš jo (Guo et al., 2017). Nors šis Tau regionas tiesiogiai nesijungia su mikrovamzdeliais, jis yra susijęs su mikrovamzdelių dinamikos reguliavimu, įtakoja mikrovamzdelių ir kitų ląstelių ar jų dalių prisirišimą ir/arba atstumus tarp jų. Pavyzdžiui, N-gale sutrumpinti Tau fragmentai parodė pakitusią mikrovamzdelių sąveiką, net esant nepažeistam mikrovamzdelių surišimo domenui (Matsumoto et al., 2015). Nustatyta, kad N-galo regionas dalyvauja signalų perdavime, jis slopina signalo aksonalinį transportą neuronuose (Kanaan et al., 2011). N-galo intarpų funkcijos dar nėra visiškai išaiškintos, tačiau manoma, kad jos daro įtaką Tau baltymo pasiskirstymui, nes 0N, 1N ir 2N Tau izoformos turi skirtingas viduląstelines vietas pelių smegenyse (Liu et Götz, 2013)



pav. 1.2 Tau baltymo prisijungimas prie mikrovamzdelių. (pritaikyta iš Guo et al., 2017).

1.1.2 Tau baltymo izoformos

Žmogaus centrinėje nervų sistemoje (CNS) yra randamos šešios mažos molekulinės masės Tau baltymo izoformos, kurių ilgis yra nuo 352 iki 441 aminorūgščių, kurios formuojasi dėl 2, 3 ir 10 egzonų alternatyvaus splaisingo. Susidaro izoformos, turinčios 0, 1 arba 2 N-galinius intarpus (0N, 1N ir 2N) ir tris (3R) arba keturis (4R) pasikartojančius fragmentus mikrovamzdelius rišančiame domene (**pav. 1.3**). Žmogaus vaisiaus smegenyse vyrauja trumpiausia 3R izoforma, o suaugusiųjų smegenų audinyje 3R ir 4R izoformos egzistuoja ekvimoliariniu santykiu. Tuo tarpu, suaugusių pelių smegenyse užfiksuotos tik 4R izoformos, o jų embrionuose pagrindinė izoforma yra 0N3R (Liu et Götz, 2013).



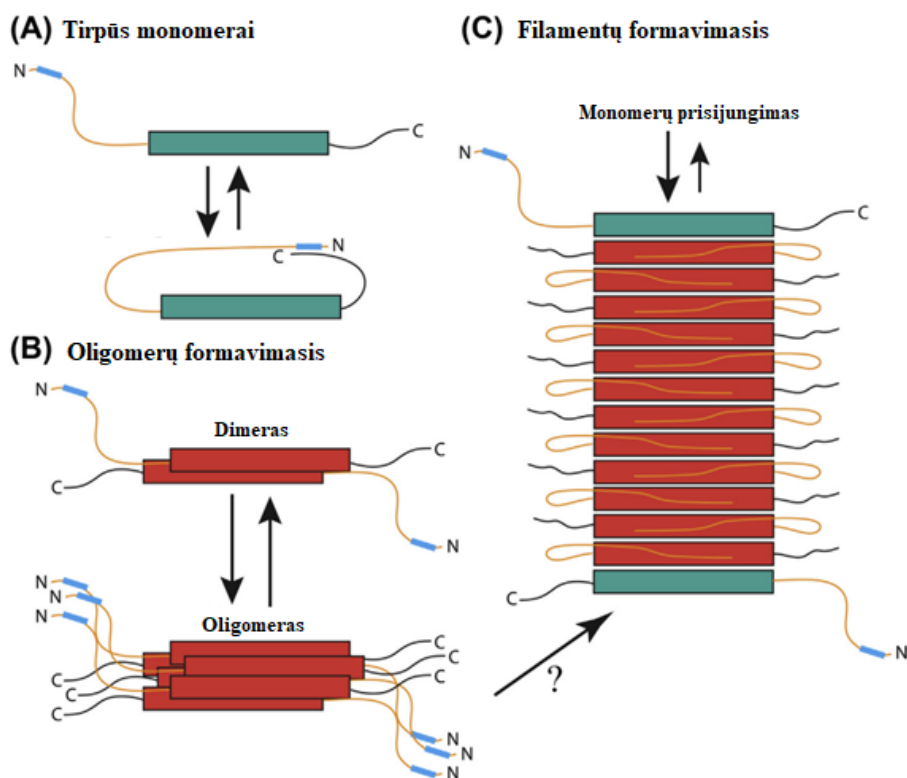
pav. 1.3 Tau baltymo izoformos (pritaikyta iš Guo et al., 2017).

Ilgiausios žmogaus CNS Tau izoformos aminorūgščių seka (2N4R, 441 aminorūgštys), lyginant su kitais baltymais, turi tik nedidelę hidrofobinių aminorūgščių dalį, todėl bendrai Tau yra hidrofilinis baltymas (Avila et al., 2016). Tau molekulę galima suskirstyti į keturis pagrindinius domenus, kurie skiriami pagal jų biochemines savybes. N-galinio rūgštinio domeno (1–150 aminorūgštys) sudėtyje yra du atskiri N-galiniai intarpai. Tau regionas, apimantis 151–243 amino rūgštis yra domenas, kuriame yra gausu prolino (Mandelkow et Mandelkow, 2012). Mikrovamzdelių surišimo domeną sudaro keturi pasikartojantys motyvai, atskirti flanšinėmis (ang. flanking) sritimis, be to per tas sritis Tau jungiasi ir stabilizuoja

mikrovamzdelius. Priešingai nei didžioji dalis Tau molekules, mikrovamzdelius jungiančio domeno pasikartojimai linkę sudaryti tvarkingą β -klostės struktūrą. Galiausiai 370–441 aminorūgštys sudaro Tau C-galinę uodegą (Mukrasch et al., 2009)

1.1.3 Amiloidiniai baltymai

Su amiloidinių fibrilių susidarymu siejama daugybė mirtinų neurodegeneracinių sutrikimų, tokių kaip Alzheimerio ir Parkinsono ligos ir užkrečiamos spongiforminės encefalopatijos. Nepaisant to, kad skirtingi baltymai gali sukelti skirtingų ligų išsivystymą, visi jie turi panašias fizikochemines ir struktūrinės savybes. Amiloidiniai baltymai turi beta-klosčių turtingą antrinę struktūrą bei į fibriles panašius baltymų agregatus (**pav. 1.4**). Daugybė baltymų gali sudaryti fibriles *in vitro*, primenančias su ligomis susijusius amiloidinius darinius (Šneideris et al., 2015).

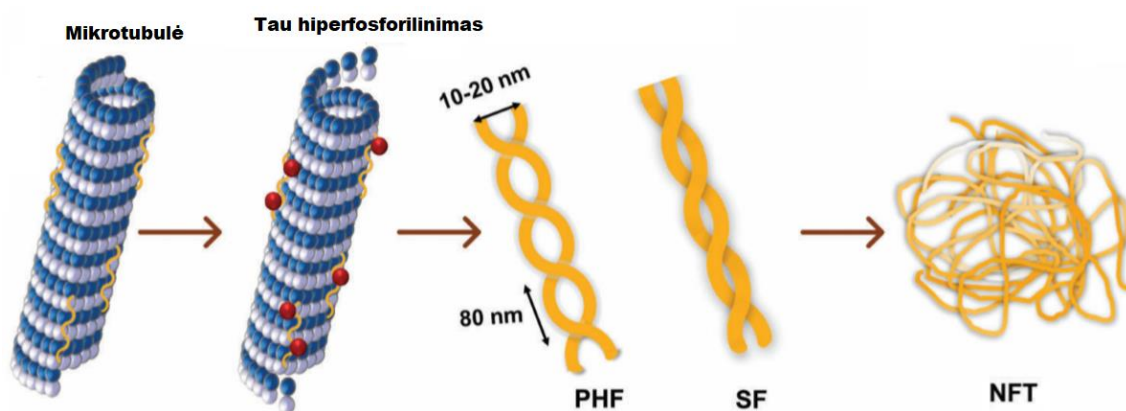


pav. 1.4 Galimų Tau baltymo būsenų schema (pritaikyta iš Kanaan et al., 2011).

Tikėtina, kad tirpūs Tau monomerai (**pav. 1.4A**) egzistuoja dinaminėje pusiausvyroje tarp išplėstinės atsitiktinės ritės ir sulankstytų formų, įskaitant „sąvaržėlės“ konformaciją. Kai Tau pradeda formuoti agregatus (**pav. 1.4 B**), manoma, kad dimerai ir oligomerai yra vienos iš pirmųjų agregatinių struktūrų. Lieka neaišku, ar dimerai ir oligomerai yra ta Tau forma, kuri būna prieš fibrilių (filamentų) susidarymą, ar visiškai atskiras agregacijos kelias. Tau fibrilės (**pav. 1.4 C**) yra Tau agregatas, manoma, sukeliantis taupatijas. Daugybė tyrimų rodo, kad Tau

monomerai gali prisijungti prie Tau filamentų galo, tačiau vis dar nežinoma, ar fibrilės gali pailgėti dėl oligomerų/multimerų, kurie sujungia Tau vieną su kitu (**pav. 1.4** rodyklė su klaustuku). Dvigubos rodyklių kryptys yra skirtos parodyti, kad pusiausvyra gali egzistuoti tarp skirtingų Tau būsenų (Kanaan et al., 2011).

NFT susidarymas priklauso nuo neįprastų Tau baltymo posttransliacinių modifikacijų (**pav. 1.5**). Visų pirma, iš NFT išskirti Tau baltymai pasižymi didesniu fosforilinimo laipsniu. Natūralūs baltymai žmogaus smegenyse vidutiniškai turi dvi fosfatų grupes (Wang et Mandelkow, 2016), o iš NFT išskirstuose Tau nustatyta, kad gali turėti iki 8 fosfato liekanų. Nors tikslus šio hiperfosforilinimo mechanizmas yra mažai žinomas, labai tikėtina, kad jis atsirado dėl fosfoproteinų homeostazės trikdžių. Iš tikrųjų nustatyta, kad PP2A, stipriausia Tau baltymų fosfatazė, turi žymiai sumažintą aktyvumą esant AD (Arendt et al., 2016). Be to, rasta, kad posttransliacinių modifikacijų, tokių kaip karpymas, N-glikozilinimas, O-Glc-N-Acilinimas ir nitrifikacija, kiekis skiriasi tirpiose ir netirpiose Tau formose. Visų pirma, manoma, kad trunkacija didina polinkį savarankiškai susirinkti, nes pašalina vietinę plaukų segtuko formą. Taip pat nustatyta, kad N-glikozilinimas stabilizuoja raizginio būseną bei skatina gretimų vietų hiperfosforilinimą (Verwilt et al., 2018).

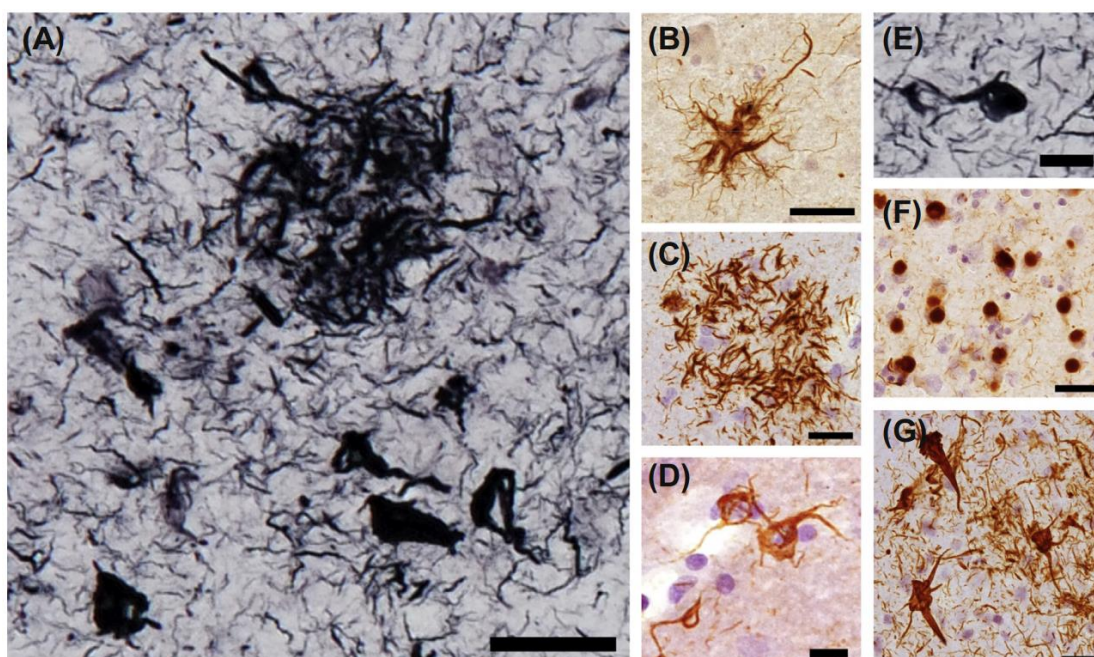


pav. 1.5 Schema parodanti Tau baltymo kelią nuo hiperfosforilinimo iki neurofibrilinių raizginių susiformavimo. (PHF - suporuotos β -klosčių fibrilės, SF – tiesiosios fibrilės, NFT – neurofibriliniai raziginiai) (pritaikyta iš Verwilt et al., 2018).

1.1.4 Alzheimerio liga

Alzheimerio liga (AD) yra labiausiai paplitusi ir geriausiai ištirta amilodinių baltymų sukeliama liga. AD yra progresuojantis neurodegeneracinis susirgimas, kuriam būdingi atminties ir kognityviniai sutrikimai. Pirmą kartą ši liga buvo aprašyta vokiečių psichiatro ir patologo Aloiso Alzheimerio 1907 metais. Dažniausiai pirmieji požymiai pasireiškia žmonėms senesniems negu 65 metų (Chen et al., 2013).

Alzheimerio liga yra pagrindinė demencijos priežastis ir jai būdingas laipsniškas pažintinių funkcijų blogėjimas, kuris paprastai prasideda blogėjant atminčiai. Sergantys šiuo sutrikimu, paprastai tampa iki mirties priklausomi nuo globėjų. Pagrindiniai patologiniai pokyčiai, pastebimi AD smegenų audinyje (**pav. 1.6**), yra padidėjęs amiloido- β (A β) peptido, kuris yra išdėstytas tarpląstelinio būdu difuzinėse ir neurologinėse plokštelėse, ir hiperfosforilinto Tau baltymo, kuris kaupiasi kaip neurofibriliniai mazgai, kiekis. Šias patologijas dažnai lydi reaktyvi mikrogliozė ir neuronų, baltosios medžiagos ir sinapsių praradimas. Etiologiniai mechanizmai, kuriais grindžiami neuropatologiniai AD pokyčiai, išlieka neaiškūs, tačiau juos tikriausiai veikia tiek aplinkos, tiek genetiniai veiksniai (Reitz et al., 2011).



pav. 1.6 Smegenų, paveiktų skirtingomis taupatijomis, vaizdas. A – Alzheimerio liga, B – progresuojantis supranuklearinis paralyžius, C ir D– kortikobazalinė degradacija, E ir F- Piko liga, G – lėtinė trauminė encefalopatija (paveikslų skalė A, B, C,F, G yra 25 μ m, o B, D, E - 10 μ m) (pritaikyta iš Kanaan et al., 2015).

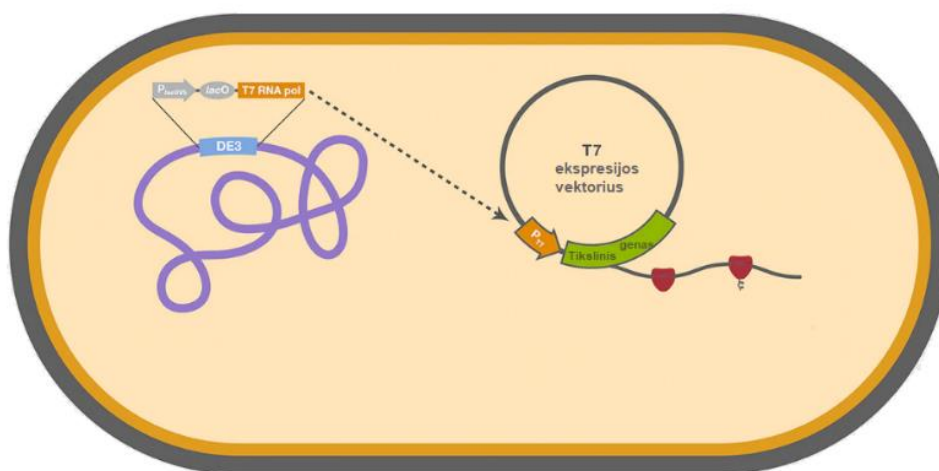
1.2 Rekombinantinių baltymų sintezė *E. coli* ląstelėse

Ląstelės-šeimininkės pasirinkimas, kurios baltymų sintezės mechanizmas gamins tikslinius baltymus, lems visą procesą. Mikroorganizmų raiškos sistemos yra bakterijos, mielės, filamentiniai grybai ir vienaląsčiai dumbliai. Visi turi stiprias ir silpnas puses, todėl pasirinkimas turėtų priklausyti nuo tikslinio baltymo. Pavyzdžiui, jei reikia eukariotinių postransliacinių modifikacijų (pvz., baltymų glikozilinimas), prokariotų raiškos sistema gali būti netinkama (Rosano et Ceccarelli, 2014).

E. coli kaip raiškos sistemos naudojimo pranašumai yra gerai žinomi. Pirma, jos turi nepaprastą greito augimo kinetiką. Atsižvelgiant į optimalias aplinkos sąlygas, gliukozės druskų terpėse jos padvigubėjimo laikas yra apie 20 min. Tai reiškia, kad kultūra, inokuluota praskiedžiant 100 kartų, stacionariąją fazę gali pasiekti per kelias valandas. Tačiau reikia pažymėti, kad rekombinantinio baltymo sintezė gali užkrauti metabolinę naštą mikroorganizmams, todėl ilgėja dalijimosi laikas. Antra, lengvai pasiekiamas didelis ląstelių tankis (Adrio et Demain, 2010). Apskaičiuota, kad teorinė *E. coli* skystos kultūros tankio riba yra apie 200 g sausų ląstelių vienam litrui terpės arba 10¹³ gyvybingų bakterijų vienam mililitrui (Shiloach et Fass, 2005). Trečia, praturtinta terpė gali būti pagaminta iš lengvai prieinamų ir nebrangių komponentų. Ketvirta, greitai ir lengvai įvykdoma transformacija su egzogenine DNR (Rosano et Ceccarelli, 2014).

1.2.1 *E. coli* geno ekspresijos kamienas BL21(DE3)

Escherichia coli yra lazdelės formos Gram neigiama, fakultatyviai anaerobinė bakterija. 2005 metais Studier pirmą kartą sukūrė protokolą, kuriame aprašė autoindukciją naudodamas T7 ekspresijos sistemą su *E. coli* BL21(DE3) (pav. 1.7) ir pET vektoriais, tačiau šį metodą galima pritaikyti kitiems kamienams ir vektoriams, kurie naudoja lac operoną tikslinio baltymo transkripcijos kontrolei.



pav. 1.7 *E. coli* bakterijų BL21(DE3) kamienas (pritakytas iš Thermo Fisher tinklapio).

Kamienai, turintys (DE3) lizogeną, koduoja fago T7 RNR polimerazę, integruotą bakterijos chromosomoje. Tikslinio geno transkripciją kontroliuoja T7 promotorius, kuris savo ruožtu priklauso nuo T7 RNR polimerazės ekspresijos, kurią DE3 lizogene reguliuoja *E. coli* L8-UV5 lac promotorius. Jei nėra represoriaus (gliukozės) ir nėra induktoriaus (IPTG arba

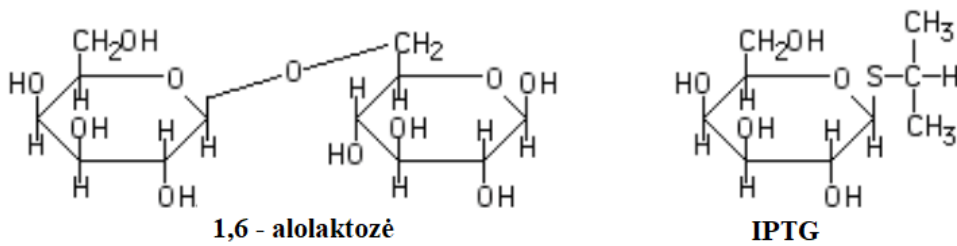
laktozės), T7 RNR polimerazė yra ekspresuojama ir selektyviai transkribuos iš vektorių, turinčių T7 promotorių (Crowley et Rafferty, 2019).

Siekiant išvengti ląstelių, kuriose nėra transformuotų plazmidžių, į plazmidę įvedamas atrankos markeris. *E. coli* raiškos sistemoje šiam tikslui įprastai naudojami atsparumo antibiotikams genai. Atsparumą ampicilinui suteikia *bla* genas, jo produktas yra periplazminis fermentas, kuris inaktyvuoja β -laktaminių antibiotikų β -laktamo žiedą (Rosano et Ceccarelli, 2014).

1.2.2 Baltymo raiškos indukcija

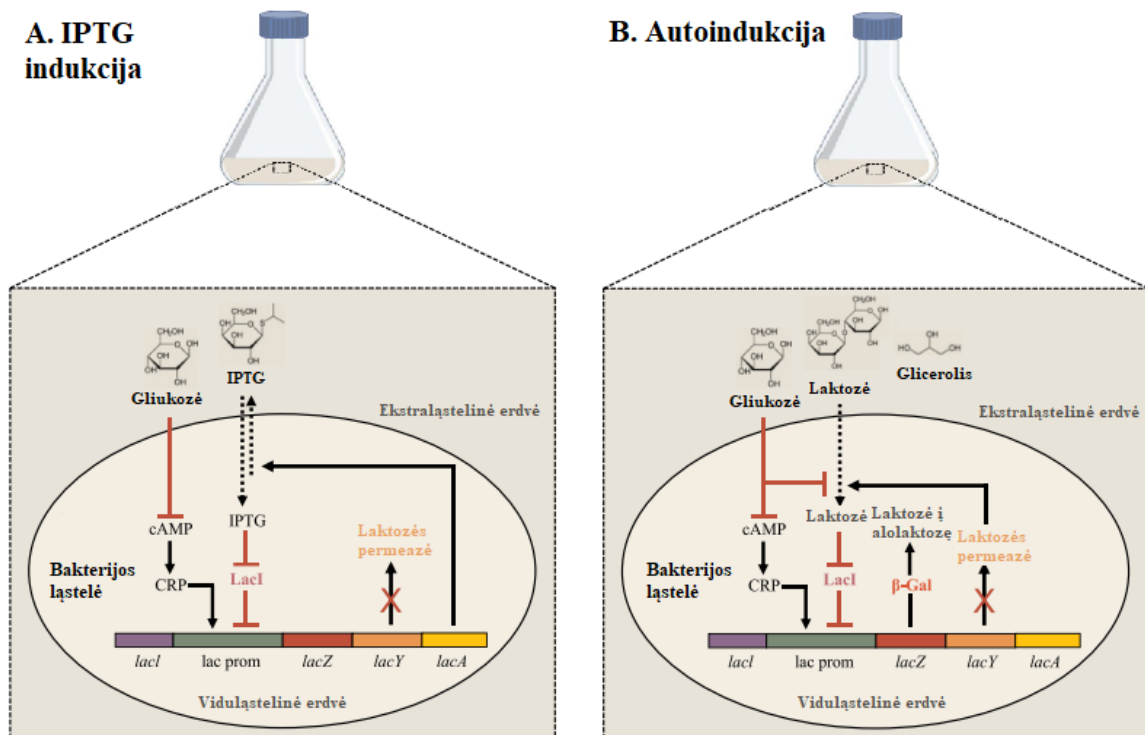
E. coli ekspresijos sistemos paprastai yra pagrįstos indukuojamu lac operonu, kurio veikla priklauso nuo laktozės buvimo terpėje. Lac operone yra trys genai: *lacZ*, koduojantis β -galaktozidazę (β -Gal); *lacY*, koduojantis β -galaktozido permeazę; ir *lacA*, koduojantis β -galaktozido transacetilazę (Xu et al., 2012). β -Gal yra atsakingas už glikozidinio ryšio hidrolizę laktozėje, kad gautų gliukozės ir galaktozės monosacharidus. β -galaktozido permeazė acetyl-CoA acetilo grupes perkelia į β -galaktozidus. *E. coli* raiškos sistemoje, alolaktozė yra pagrindinis lac operono induktorius, kuris derepresuoja lac represorių LacI, kad jis atsiskirtų nuo lac promotoriaus. Baltymų, priklausomų nuo Lac operono, ekspresija bus tęsiama per teigiamą grįžtamąjį ryšį, kol visa alolaktozė bus metabolizuota (Crowley et Rafferty, 2019).

E. coli ekspresijos sistemoje paprastai naudojamas IPTG (izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozidas). IPTG (**pav. 1.8 ir 1.9 A**) į ląstelę gali patekti difuzijos arba aktyvaus transporto būdu (Marschall et al., 2017). Didelės IPTG koncentracijos leidžia jam savarankiškai patekti į ląstelę; mažoms IPTG koncentracijoms į ląstelę patekti reikia laktozės permeazės (Faust et al., 2015). Gliukozė paprastai naudojama kaip anglies šaltinis, nes ji slopina ciklinio adenozino monofosfato (cAMP) gamybą ir vėlesnį C-reaktyvaus baltymo (CRP) aktyvavimą, kad lac operonas nebūtų indukuojamas, kol nebus pridėtas IPTG (Görke et Stülke, 2008). Skirtingai nuo alolaktozės, IPTG turi tioglikozidinį ryšį, kurio negali hidrolizuoti glikozidazės ir tai apsaugo IPTG nuo skilimo, tačiau IPTG gali būti acetilinamas β -galaktozidetransacetilazės (*lacA*), tada IPTG nebegali sąveikauti su represoriumi ir yra pašalinamas iš ląstelės (Marbach et Bettenbrock, 2012). Kultūras, kuriuos indukuojamos IPTG būtina stebėti ir optimizuoti matuojant optinį tankį, esant 600 nm bangos ilgiui (Glazyrina et al., 2010), kad raiškos indukcija būtų sukelta esant optimaliam ląstelių tankiui (Crowley et Rafferty, 2019).



pav. 1.8 Baltymo raiškos induktorių, 1,6-alolaktozės ir IPTG, cheminės formulės (pritaikyta iš Narang et Oehler, 2017):

Autoindukcija yra alternatyvus metodas (**pav. 1.9 B**), kai laktozė automatiškai indukuoja baltymų sintezę be tyrėjo įsikišimo. Nustatyta, kad taikant tokį indukcijos būdą, iš lac išvestose sistemose, tokiose kaip T5, T7 ir T7lac, susidaro didelis ląstelių tankis bei baltymų išeiga (Fox et Blommel, 2009). Autoindukcinėje terpėje naudojami trys anglies šaltiniai – gliukozė, laktozė ir glicerolis. Pradžioje, kultūrai auginti iki tinkamo ląstelių tankio, naudojamas minimalus gliukozės kiekis terpėje; nes bakterijos pirmiausia metabolizuoja gliukozę prieš kitus cukrus, jos buvimas taip pat slopina lac operono indukciją. Kai gliukozė terpėje išsekvojama, tada aktyvaus transporto būdu, padedant laktozės permeazei, laktozė patenka į ląstelę, tada glikozilinant beta-glikozidazei (β -Gal) virsta alolaktoze. Terpėje esantis glicerolis palaiko augimą, kaip ir gliukozė, tačiau jis netrukdo raiškos indukcijai (Studier, 2005).



pav. 1.9 Baltymo raiškos indukcijos schema A – su IPTG, B – autoindukcija. (pritaikyta iš Crowley et Rafferty, 2019).

1.2.3 Bakterijų augimo sąlygos

1.2.3.1 Temperatūra ir pH

Temperatūra ir laikas yra svarbūs veiksniai optimizuojant naują baltymų sintezės protokolą, nes baltymai gali būti sintetinami skirtingu greičiu įvairiose temperatūrose ir, prieš pasiekiant maksimalią raišką, gali reikėti skirtingo laiko (Li et al., 2011). Tiksliau, tyrėjai paprastai kontroliuoja geno ekspresiją, OD₆₀₀ įvairiomis temperatūromis laikui bėgant. Temperatūra, kuri įprastai naudojama svyruoja nuo 15 ° C iki 37 ° C, žemesnė temperatūra paprastai siejama su ilgesniu ekspresijos laiku, tačiau kartais gali būti labai efektyvi (Crowley et Rafferty, 2019).

Optimizuojant auginimą autoindukcinėse terpėse svarbu stebėti pH, nes rūgštis, susidaranti metabolizuojant gliukozę, gali viršyti terpės buferinę galią ir sulėtinti arba užkirsti kelią tolesniam augimui (Bocharova et al., 2013). 2005 metais Studier aprašytos autoindukcinės terpės (pvz. ZYM-5052) sukurtos taip, kad gliukozės kiekis būtų pakankamai mažas ir ji yra išseikvojama prieš kultūrai tampant negrįžtamai rūgštinei. Geriausia, jei kultūros pH yra didesnis nei 6,0, nes tai turėtų atitikti autoindukcinės terpės buferines savybes. Sivashanmugam 2009 metais nustatė, kad pradinio pH terpėje padidinimas iki 8,2 buvo veiksmingas padidinant buferinę talpą, kad viso auginimo metu kultūros pH išliktų aukščiau 6,0. Be to, Studier rekomendavo naudoti aminorūgščių mišinius - aspartatą ar sukcinatą - tam, kad stabilizuotų tam tikrų terpių pH, tačiau tos aminorūgštys suteikia papildomų anglies šaltinių (Crowley et Rafferty, 2019).

1.2.3.2 Aeracija ir terpės tūris

Aeracija arba deguonies prisotinimas įtakoja baltymų ekspresijos lygį (Studier, 2005). Esant nepakankamam deguonies kiekiui, gali padidėti organinių rūgščių ir fermentacijos produktų gamyba. Pakankamas aeracijos lygis yra reikalingas, kad būtų palaikomas metaboliškai subalansuotas pH ir skatinamas ląstelių augimas iki didelio ląstelių tankio. Be to, būtina atkreipti dėmesį, kad dėl didelio deguonies tiekimo, padidėja ląstelių tankis, todėl terpei reikia didesnių anglies ir azoto šaltinių kiekių. Studier autoindukcinių terpių recepte yra 0,2% laktozės ir 0,5% glicerolio, tokie kiekiai yra pakankamai dideli, todėl yra pritaikyti prie beveik bet kokių aeracijos greičių. Jei aeracija prasta, laktozės ir glicerolio koncentraciją galima sumažinti siekiant kompensuoti per didelę rūgščių gamybą (Li et al., 2011), be to laikui bėgant, paprastai rūgštingumas yra neutralizuojamas skaidant terpėje esančius junginius, tokius kaip

acetatas. Ieškant optimalių deguonies tiekimo sąlygų, galima išbandyti įvairius kolbos ir joje esančios terpės tūrio santykius bei purtymo greičius. Studier didelius kiekius augino panaudojus 1,8 L kolbas pripildytas 400-500 mL bakterijų kultūros (kultūros ir kolbos tūrių santykis 0,22-0,27). Praktikoje būdingi įvairūs tūrio santykiai, naudojama nuo: 50 mL kultūros 250 mL kolbose iki 1 L kultūros 4 L kolbose (Crowley et Rafferty, 2019).

1.2.4 SUMO-tag

Rekombinantinių baltymų didelių kiekių gavimas yra pagrindinis daugelio mokslinių tyrimų sričių, įskaitant struktūrinę proteomiką ir terapinių vaistų atradimą, iššūkis. Baltymų suliejimo technologijos naudojimas suteikia galimybę supaprastinti ir palengvinti rekombinantinių baltymų sintezę, aptikimą ir gryninimą (Yan et al., 2009).

SUMO yra eukariotų ląstelių baltymas ir jis reguliuoja tikslinių baltymų aktyvumą ir lokalizaciją ląstelėje modifikavimo proceso metu, panašiu į ubikvitilinimą (Rosano et Ceccarelli, 2014). Keli baltymai, kurie sunkiai sintetunami įprastose sistemose, tokie kaip SARS-CoV struktūriniai baltymai, metaloproteinazė (MMP13), brazeinas ir antikūnų fragmentai buvo sėkmingai sintetinti *E. coli*, naudojant SUMO suliejimo technologiją. Gao aprašyti duomenys parodė, kad su SUMO sulieto baltymo sintezės išeiga padidėjo nuo 5 iki 20 kartų, palyginus su baltymais neturinčiais SUMO žymens. Taip pat baltymas buvo efektyviai sintetinamas tirpios formos *E. coli* citoplazmoje, o tai patvirtina, kad SUMO žymiai palengvina heterologinių baltymų tirpią sintezę *E. coli*. SUMO yra sintezės žymuo, tačiau išeigos didinimo ir tirpumo pagerinimo mechanizmas vis dar nėra aiškus. Keli tyrimai rodo, kad jis gali veikti kaip šaperonas (Gao et al., 2010).

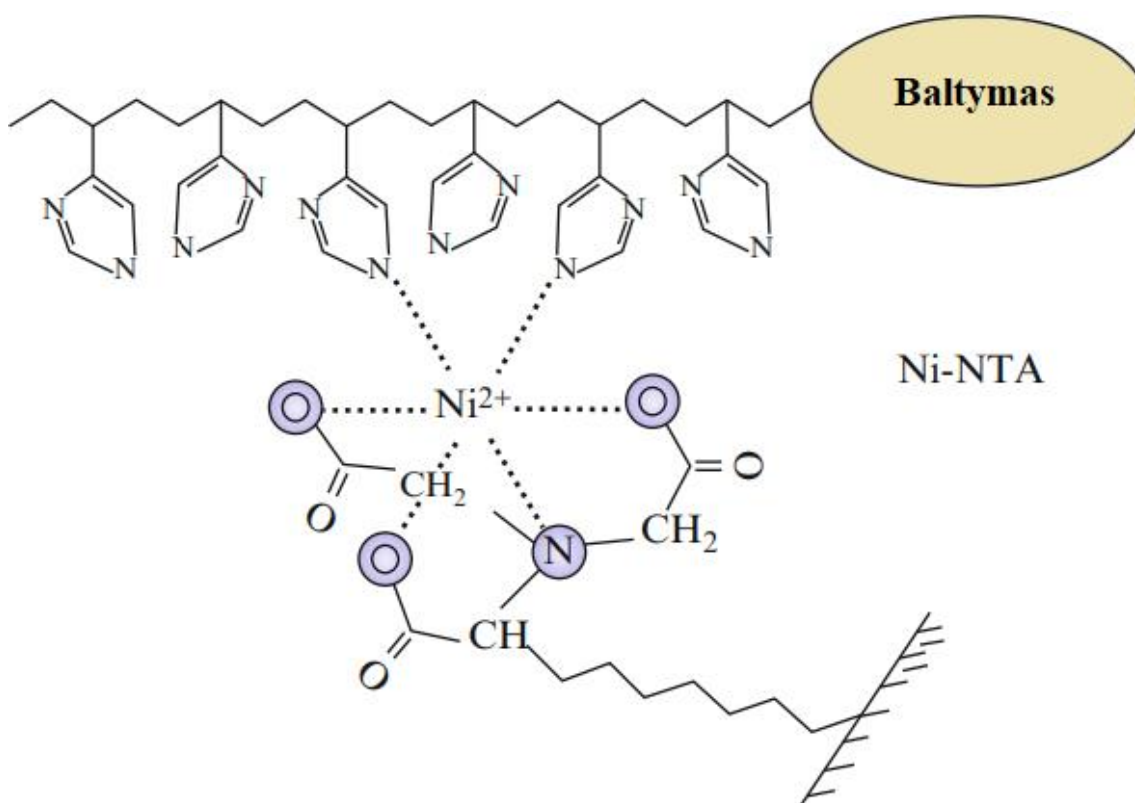
1.3 His-tag pažymėtų rekombinantinių baltymų gryninimas IMAC metodu

Įmobilizuotų metalų jonų chromatografijos (IMAC) metodą pirmasis pasiūlė 1975 metais Jerker Porath. Šis gryninimo būdas remiasi specifine imobilizuotų metalų jonų ir aminorūgščių liekanų (Kuo et Chase, 2011), tokių kaip histidinas, triptofanas ir cisteinas, sąveika su baltymais ar peptidais. IMAC tapo svarbia metaloproteinų, histidinu žymėtų baltymų ir fosforilintų baltymų detekcijos ir valymo priemone. Sritis, kuriose dabar naudojamas šis metodas, apima proteomiką, darbą su rekombinantiniais baltymais ir ligų diagnozes (Hage et al., 2013).

Rekombinantiniai baltymai, turintys histidino žymenį (His-tag), gali būti išgryninti naudojant IMAC. His-tag gali būti prikabinamas ant baltymo N- arba C-galo. (Dong et al., 2010).

His-tag turi stiprų afiniškumą metalų jonams (pvz. Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} ir Zn^{2+}) (Tovar et Odunuga, 2019).

Vienas iš pirmųjų ligandų buvo imobilizuota imino diacto rūgštis, kuri gali surišti metalo jonus ir sudaryti koordinacinį kompleksą su polihistidinių uodega žymėtu baltymu (Cheung et al., 2012), tačiau imino diacto rūgštis turi didelį trūkumą – yra galimybė, kad metalo jonai išsiplaus ir dėl to sumažės baltymo išeiga. Šiuolaikinėje biotechnologijoje naudojami ligandai, tai nikelio-nitrilo triacto rūgštis (Ni-NTA) ir kobalto-karboksimetil-aspartatas (Co-CMA), pasižymi nežymiu metalų išplaunamumu, todėl baltymų gryninimas yra efektyvus. Ni-NTA ir His-tag kompleksas pavaizduotas **1.10 paveiksle**. Kai baltymas specifiškai prisijungia prie imobilizuoto metalo komplekso, jis gali būti atplautas taikant konkurencinę eliuciją, tai reiškia įvedant reagentą, kuris sudarys kompleksą su metalo jonu, pvz. imidazolas, ir išstums tikslinį baltymą (Hage et al., 2013).



pav. 1.10 Baltymo su His-tag prisijungimas prie Ni-NTA (pritaikyta iš Block et al., 2009).

Baltymų gryninimas panaudojant histidinių liekaną turi daug pranašumų, vienas iš jų yra mažas specifinės uodegos dydis, kuris minimaliai įtakoja baltymo susilankstymą, be to, jeigu His-tag yra N-gale jis yra lengvai nukerpamas endoproteaze (Block et al., 2009). Kitas His-tag pažymėtų baltymų gryninimo metodo naudojimo privalumas yra tas, kad polihistidino žymės gali surišti baltymus tiek natūraliomis, tiek denatūruojančiomis sąlygomis. Denatūruojančios

sąlygos tampa svarbios, kai baltymai sintetinami į intarpinius kūnelius ir turi būti denatūruoti 8 M UREA arba 6M GuHCl, kad juos būtų galima tirpinti (Hage et al., 2013).

Iš kitos pusės IMAC gryninimas gali turėti trūkumų. Pirmiausia, kai histidino liekanos yra skaidomos proteolitiškai, žymiai sumažėja žymėto baltymo giminingumas, o tai lemia mažą baltymo išeią. Antra, kai prie baltymo struktūros prikabinamas His-tag, tai molekulė, esant metalo jonams, gali sudaryti dimerus ir tetramerus. Trečia, baltymų gryninimo naudojant His-tag trūkumas yra baltymų, kurie natūraliai turi dvi ar daugiau gretimų histidino liekanų, sutraukimas (Hage et al., 2013).

2 MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos, aparatūra

2.1.1 Reagentai

- **AB Vilniaus degtinė:** Etanolis 96 %
- **Acros Organics:** 98,5 % NaOH, 99 % NaH₂PO₄, 37 % HCl tirpalas, 50 % NaOH tirpalas, 99,5 % APS, NiCl₂ · 6H₂O
- **Carl Roth:** 99,9 % TRIS, 99 % ampicilino natrio druska, LB mitybinė terpė, 99% izopropanolis, KCl, NaCl
- **Fischer Scientific:** imidazolas, , TEMED, NDS, molekulinės masės žymuo „Unstained Protein Marker“, elektroforezėgelių dažas „Ez-Run Protein Gel Staining Solution“, mielių ekstraktas; DMSO, peptonas, 99,5 % MgSO₄, gliukozė, MgCl₂
- **Sigma-Aldrich:** PIPES, 99% urea

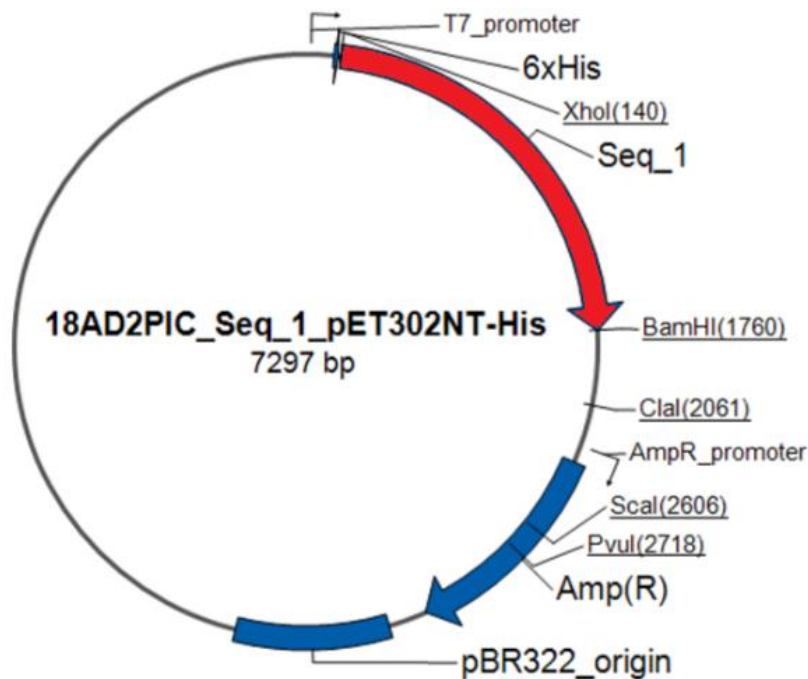
2.1.2 Genetinis konstruktas

Sintetinis genas Seq_1 buvo surinktas iš sintetinių oligonukleotidų ir/arba PGR produktų. Geno seka (**pav. 2.1**), kurios ilgis 1626 bp buvo įterptas į pET302NT-His_A160 vektorių tarp XhoI (140) ir BamHI (1760) restrikcijos endonukleazijų kirpimo vietų.

```
TCGGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTTCAGAGATCTT
CTTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTTCGCTAAAAGACAGGGTAAGGAAATGGACTCCTTAAGATTCTTGTACGACGGTATTA
GAATTC AAGCTGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATGGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACAGAGAACAGATTGGTGGGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTT
CGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGACGTACGGGTTGGGGGACAGGAAAGATCAGGGGGGCTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTG
GCCTGAAAGAATCTCCCTGCAGACCCCCACTGAGGACGGATCTGAGGAACCGGGCTCTGAAACCTCTGATGCTAAGAGCACTCCAACAGCGGAAGATGTGAC
AGCACCCTTAGTGGATGAGGGAGCTCCCGGCAAGCAGGCTGCCGCGCAGCCCCACACGGAGATCCAGAAAGGAACACAGCTGAAGAAGCAGGCATTGGAGA
CACCCCCAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTACGTGACCCAAGCTCGCATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAAGGG
GGCTGATGGTAAAACGAAGATGCCACACCGCGGGAGCAGCCCTCCAGGCCAGAGGGCCAGGCCAACGCCACAGGATCCAGCAAAAACCCCGCCCGC
TCCAAAGACACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCGAGGCACTCCCGGCAGCCGCTCCCGCACCC
CGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTACTCCACCAAGTCGCGCTTCCGCAAGAGCCGCTGCAGACAGCCCCC
GTGCCATGCCAGACTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCAAGTGAAGACCTGAAGCACCAGCCGGGAGCGGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAG
CTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGCGGCAAGTGTGCAAATAGTCTACAAAACAGTTGACCTGA
GCAAGGTGACCTCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGT
CCAGTCGAAGATTGGGCTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCC
AAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCCAGTGGTGTCTGGGGACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCTCCACCGGCAGCATCGACA
TGGTAGACTCGCCCCAGCTCGCCACGCTAGCTGACGAGGTGTCTGCCCTCCCTGGCCAAGCAGGGTTTG
```

pav. 2.1 Tau baltymo 2N4R izoformos sulietos su SUMO-His-tag geno seka. Geltonai pažymėta SUMO žymenį koduojanti nukleotidų seka (pritaikyta iš Thermo Fisher „Quality Assurance Documentation“).

Genetinis konstruktas (**pav. 2.2**) buvo pagamintas Invitrogen by Thermo Fisher pagal užsakymą.



pav. 2.2 Tau baltymo 2N4R izoformos sulietos su SUMO-His-tag geno raiškai naudojamą konstrukto schema. Raudonai pažymėtas tikslinio baltymo genas. (pritaikyta iš produkto „Quality Assurance Documentation“)

2.1.3 Raiškos sistema

E. coli BL21 (DE3) kamienas yra išvestas iš laukinio *E. coli* B kamieno, neturi F plazmidės, turi *dcm* mutaciją, nesintetina *ompT* ir *lon* proteazių. Kamienas turi lizogeninį λ profagą DE3 ir *lacUV5* promotoriumi valdomą T7 RNR polimerazės geną.

2.1.4 Mitybinės terpės

Agarizuota LB mitybinė terpė. 2,5 g LB mitybinės terpės miltelių ir 1,5 g agaro ištirpinama 100 mL dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje ir 121 °C temperatūroje. Atvėsinus pridedama ampicilino (100 mg/mL), kad jo galutinė koncentracija būtų 100 μ g/mL. Mišinys išpilstomas į Petri lėkštes ir kambario temperatūroje paliekamas sustingti.

S.O.C. mitybinė terpė. 2 g peptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 10 mM NaCl, 3,5 mM KCl, ištirpinama 100 mL dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje ir 121 °C temperatūroje. Ataušinus pridedama 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, ir 20 mM gliukozės. Mitybinė terpė išpilstoma į mėgintuvėlius po 1 mL ir laikoma -20 °C temperatūroje.

Skysta LB mitybinė terpė. 2,5 g LB mitybinės terpės miltelių ištirpinama 100 mL dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje ir 121 °C temperatūroje. Atvėsinus, pridedama ampicilino (100 mg/mL), kad jo galutinė koncentracija būtų 100 μ g/mL.

2.1.5 Tirpalų standartai

20 % etanolio tirpalas. 52,08 mL 96 % etanolio praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 250 mL.

IPTG. 238,3 mg IPTG ištirpinami 1 mL dejonizuoto vandens.

0,1 NiCl₂. 23,77 g NiCl₂ ištirpinama 1 L dejonizuoto vandens.

1,5 NaCl. 87,66 g NaCl ištirpinama 1 L dejonizuoto vandens.

30 % izopropanolio tirpalas. 75,76 mL 99 % izopropanolio praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 250 mL.

1 M HCl. 8,3 mL 37 % HCl tirpalo praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

1 M NaOH. 5,3 mL 50 % NaOH tirpalo praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

0,5 M PIPES. 15,1 g PIPES tirpinama 80 mL dejonizuoto vandens, . Tirpalo pH koreguojamas 1 M NaOH iki 6,7 ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL

0,5 M NaH₂PO₄. 68,99 g NaH₂PO₄ ištirpinama 1 L dejonizuoto vandens.

0,5 M Na₂HPO₄. 70,98 g Na₂HPO₄ ištirpinama 1 L dejonizuoto vandens.

AA/BIS 40 %. 38,93 g akrilamido ir 1,07 g N,N-metilen-bisakrilamido ištirpinama 60 mL dejonizuoto vandens.

Ampicilino tirpalas 100mg/mL. 1 g ampicilino tirpinamas 10 mL dejonizuoto vandens. Išpilstoma po 1 mL ir užšaldoma.

APS 10 %. 100 mg amonio persulfato tirpinama 900 µL dejonizuoto vandens. Išpilstoma po 50 µL ir užšaldoma.

1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8. 18,21 g TRIS tirpinama 80 mL dejonizuoto vandens. Tirpalo pH koreguojamas 1 M HCl ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

1 M TRIS-HCl, pH 6,8. 15,76 g TRIS tirpinama 80 mL dejonizuoto vandens. Tirpalo pH koreguojamas 1 M NaOH ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

0,1 M NaOH. 0,53 mL 50 % NaOH tirpalo praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

6X pavyzdžio dažas. 1,2 g NDS ištirpinama 6 mL glicerolio, 3,75 mL 1 M TRIS pH 6,8 ir 0,93 mL 2-merkaptoetanolio bei 6 mg bromfenolio mëllo.

2.1.6 Buferiniai tirpalai

- A. 10X baltymų elektroforezės buferinis tirpalas.** 30,2 g TRIS-HCl, 144 g glicino ir 10 g NDS tirpinama 900 mL dejonizuoto vandens, pH nekoreguojamas ir praskiedžiama iki 1 L. Leidžiant elektroforezę, buferinis tirpalas praskiedžiamas 10 kartų dejonizuotu vandeniu.
- B. Transformacijos buferinis tirpalas.** 2,18 g $\text{MnCl} \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,44 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 3,73 KCl tirpinama 180 mL dejonizuoto vandens, pridedama 4 mL 0,5 M PIPES. skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 200 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per regeneruotos celiuliozės filtrą, kurio porų dydis 0,22 μM .
- C. 10 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO_4^{3-} pH 7,4.** 87,66 g NaCl ir 2,04 g imidazolo tirpinama 92,88 mL 0,5 M Na_2HPO_4 ir 27,12 mL 0,5 M NaH_2PO_4 , skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 2900 mL.
- D. 50 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, 20 mM PO_4^{3-} pH 7,4.** 87,66 g NaCl ir 10,21 g imidazolo tirpinama 92,88 mL 0,5 M Na_2HPO_4 ir 27,12 mL 0,5 M NaH_2PO_4 , skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 2900 mL.
- E. 100 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, 20 mM PO_4^{3-} pH 7,4.** 87,66 g NaCl ir 20,42 g imidazolo tirpinama 92,88 mL 0,5 M Na_2HPO_4 ir 27,12 mL 0,5 M NaH_2PO_4 , skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 2900 mL.
- F. 200 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, 20 mM PO_4^{3-} pH 7,4.** 87,66 g NaCl ir 40,85 g imidazolo tirpinama 92,88 mL 0,5 M Na_2HPO_4 ir 27,12 mL 0,5 M NaH_2PO_4 , skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 2900 mL.
- G. 300 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, 20 mM PO_4^{3-} pH 7,4.** 87,66 g NaCl ir 61,27 g imidazolo tirpinama 92,88 mL 0,5 M Na_2HPO_4 ir 27,12 mL 0,5 M NaH_2PO_4 , skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 2900 mL.
- H. 2 M urea, 10 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO_4^{3-} pH 7,4.** 0,12 g urea tirpinama 200 mL C buferinio tirpalo.
- I. 2 M urea, 50 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO_4^{3-} pH 7,4.** 4,02 g urea tirpinama 200 mL D buferinio tirpalo.
- J. 2 M urea, 100 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO_4^{3-} pH 7,4.** 24,02 g urea tirpinama 200 mL E buferinio tirpalo.
- K. 2 M urea, 200 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO_4^{3-} pH 7,4.** 24,02 g urea tirpinama 200 mL F buferinio tirpalo.

- L. 2 M urea, 300 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 24,02 g urea tirpinama 200 mL G buferinio tirpalo.
- M. 4 M urea, 10 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 48,04 g urea tirpinama 200 mL C buferinio tirpalo.
- N. 4 M urea, 50 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 48,08 g urea tirpinama 200 mL D buferinio tirpalo..
- O. 4 M urea, 100 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 48,08 g urea tirpinama 200 mL E buferinio tirpalo.
- P. 4 M urea, 200 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 48,08 g urea tirpinama 200 mL F buferinio tirpalo.
- Q. 4 M urea, 300 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 48,08 g urea tirpinama 200 mL G buferinio tirpalo.
- R. 6 M urea, 10 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 72,07 g urea tirpinama 200 mL C buferinio tirpalo.
- S. 6 M urea, 50 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 72,07 g urea tirpinama 200 mL D buferinio tirpalo.
- T. 6 M urea, 100 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 72,07 g urea tirpinama 200 mL E buferinio tirpalo.
- U. 6 M urea, 200 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 72,07 g urea tirpinama 200 mL F buferinio tirpalo.
- V. 6 M urea, 300 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 72,07 g urea tirpinama 200 mL G buferinio tirpalo.
- W. 8 M urea, 10 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 96,10 g urea tirpinama 200 mL C buferinio tirpalo.
- X. 8 M urea, 50 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 96,10 g urea tirpinama 200 mL D buferinio tirpalo.
- Y. 8 M urea, 100 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 96,10 g urea tirpinama 200 mL E buferinio tirpalo.
- Z. 8 M urea, 200 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 96,10 g urea tirpinama 200 mL F buferinio tirpalo.
- AA. 8 M urea, 300 mM imidazolo, 0,5 M NaCl, PO₄³⁻ pH 7,4.** 96,10 g urea tirpinama 200 mL G buferinio tirpalo.
- BB. 50 mM EDTA, 0,5 M NaCl, 20 mM PO₄³⁻, pH 7,4.** 87,66 g NaCl ir 2,04 g imidazolo tirpinama 92,88 mL 0,5 M Na₂HPO₄ ir 27,12 mL 0,5 M NaH₂PO₄, skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 2900 mL.

C-G ir BB buferiniai tirpalai: gaminami prieš pat naudojimą. Tirpalo pH koreguojamas 1 M HCl ir praskiedžiama iki 3000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per regeneruotos celiuliozės filtrą, kurio porų dydis 0,22 μM .

H – AA buferiniai tirpalai: filtruojami per regeneruotos celiuliozės filtrą, kurio porų dydis 0,22 μM ir matuojama urea koncentracija refraktometru.

2.1.7 Laboratorinė įranga

- Autoklavas „AHS-75N“ (Raypa)
- Centrifuga „Fischer Scientific technico Maxi“
- Chromatografinė kolonėlė „GE Healthcare HisTrap HP 5 mL“
- Elektroforezės aparatas „Biometra Minigel-Twin“ su „Biometra PS 300 T“ srovės šaltiniu
- Filtrai: 0,22 μm porų dydžio „Millipore“, 0,45 μm porų dydžio „Sartorius Stedim Biotech“
- Homogenizatorius Potter-Elvehjem „Sigma-Aldrich“
- Laminarinis boksas „Telstar Bio II Advance“
- Magnetinė maišyklė „BioSAN Magnetic stirrer MSH 300“
- Mėgintuvėlių maišyklė „Microspin FV-2400 bioSan“
- Peristaltinis siurbliukas „Thermo Fisher Standard Digital Pumps“
- pH metras „Thermo Fisher Orion Dual Star pH/ISE“
- Purtyklė „HLC by DITABIS“
- Purtyklė „IKA°KS 4000i control“
- Realus laiko fermentatorius „BioSan RTS-1C“
- Refraktometras „RL3“ (PZO)
- Rotatorius „Bio RS-24 Mini-Rotator“
- Spektrofotometras: „Shimadzu UV-1800“
- Svarstyklės „Kern PCB 1000-2“, „Denver Instruments TP-214“
- Švirkštiniai filtrai „Carl Roth GmbH+Co“
- Termostatas „Fisher Scientific IB-15G“
- Ultragarsinis dezintegratorius „BANDELIN SONOPULS“
- Vakuuminė filtravimo sistema „Sigma-Aldrich“
- Vandens valymo sistema: „Simplicity system“

2.2 Metodai

2.2.1 Kompetentinių ląstelių ruošimas

- 1) *E. coli* ląstelės atšildomos palaikant kambario temperatūroje. 1 μ l ląstelių praskiedžiamas LB terpe iki 1000 μ l.
- 2) 20 μ l praskiestų ląstelių užsėjama ant standžios LB terpės Petri lėkštelėje. Lėkštelė inkubuojama per naktį termostate 37 °C.
- 3) Viena užaugusi ląstelių kolonija vienkartinė kilpele užsėjama į 10 mL skystos LB terpės. Auginama per naktį purtyklėje (220 aps./min) esant 37 °C temperatūrai.
- 4) Ryte 2,5 mL bakterijų kultūros persėjama į 250 mL LB terpės ir auginama kol O.D.₆₀₀ pasieks 0,6 O.V.
- 5) Ląstelių kultūra centrifuguojama 2500 x g, 10 min esant 4 °C temperatūrai. Supernatantas nupilamas, o ląstelės resuspenduojamos 80 mL **B** buferinio tirpalo.
- 6) Ląstelės pakartotinai centrifuguojamos 2500 x g, 10 min esant 4 °C temperatūrai. Supernatantas nupilamas, o ląstelės resuspenduojamos 20 mL **B** buferinio tirpalo ir pridedama 1,5 mL DMSO.
- 7) Mišinys laikomas 10 min ledo vonioje. Po to ląstelės išpilstomos po 100 μ l į atšaldytus sterilius mėgintuvėlius ir užšaldomos -80 °C temperatūroje.

2.2.2 Kompetentinių ląstelių transformacija

I būdas: greitoji transformacija

- 1) *E. coli* BL21(DE3) kompetentinės ląstelės išimamos iš šaldiklio (- 80 °C) ir atšildomos palaikant 15 min kambario temperatūroje.
- 2) Į 100 μ L *E. coli* BL21(DE3) kompetentinių ląstelių įdedamas 1 μ L DNR plazmidės su įklonuotu genu koduojančiu Tau baltymo 2N4R izoformą ir lengvai sumaišoma.
- 3) Mišinys laikomas 30 min ledo vonioje.
- 4) Daromas karščio šokas, mišinys laikomas 90 s 42 °C temperatūroje ir perkeliamas į ledo vonią, inkubuojamas 2 min.
- 5) 100 μ L transformuotų ląstelių steriliai užsėjama ant standžios LB terpės Petri lėkštelėje. Lėkštelė inkubuojama termostate 37 °C temperatūroje 16 val.

II būdas: standartinė transformacija

- 1) *E. coli* BL21(DE3) kompetentinės ląstelės išimamos iš šaldiklio (- 80 °C) ir atšildomos palaikant apie 15 min kambario temperatūroje.
- 2) Į 100 µL *E. coli* BL21(DE3) kompetentinių ląstelių įdedamas 1 µL DNR plazmidės su įklonuotu genu koduojančiu Tau baltymo 2N4R izoformą ir lengvai sumaišoma.
- 3) Mišinys laikomas 30 min ledo vonioje.
- 4) Daromas karščio šokas, mišinys laikomas 90 s 42 °C temperatūroje ir perkeliamas į ledo vonią, inkubuojamas 2 min.
- 5) Į transformacijos mišinį pridedama 400 µL S.O.C. mitybinės terpės ir 45 min auginama purtyklėje (220 aps./min) esant 37 °C temperatūrai.
- 6) 150 µL transformuotų ląstelių steriliai užsėjama ant standžios LB terpės Petri lėkštelėje. Lėkštelė inkubuojama termostate 37 °C temperatūroje 16 val.

2.2.3 Geno raiškos optimizavimas

Indukcija su IPTG (optimizavimas):

- 1) Viena užaugusi transformuotų ląstelių kolonija vienkartinė kilpele užsėjama 20 mL skystos LB terpėje su ampicilinu. Auginama per naktį purtyklėje (220 aps./min) esant 37 °C temperatūrai.
- 2) Ryte 1 mL naktinės kultūros perkeliama į 40 mL skystos LB terpės. Bakterijų kultūra auginama mažame realaus laiko bioreaktoriuje (**pav. 2.3**).
- 3) Nuolat stebimas kultūros optinis tankis prie 600 nm ilgio bangos.
- 4) Pasirenkamos kelios IPTG koncentracijos, temperatūra bei O.T. prie kurio bus indukuojama bakterijų kultūra.
- 5) Pasirinktos auginimo sąlygos **1 lentelėje** :

1 lentelė. Geno raiškos optimizavimo sąlygos.

30 °C temperatūra			37 °C temperatūra		
Auginimo sąlygos	O.T. kada pradėta indukcija	IPTG koncentracija	Auginimo sąlygos	O.T. kada pradėta indukcija	IPTG koncentracija
A	0,6	0,4 mM	D	0,6	0,4 mM
B	0,6	0,5 mM	E	0,6	0,5 mM
C	0,7	0,6 mM	F	0,7	0,6 mM
G	0,7	0,7 mM	J	0,7	0,7 mM
H	0,8	0,8 mM	K	0,8	0,8 mM
I	0,8	0,9 mM	L	0,8	0,9 mM



pav. 2.3 Realus laiko bioreaktorius su auginimui naudojamu mėgintuvėliu (pritaikyta iš BioSan tiktlapio).

Indukcija su IPTG (didelio kiekio auginimas):

- 1) Viena užaugusi transformuotų ląstelių kolonija vienkartinė kilpele užsėjama skystoje LB terpėje su ampicilinu. Auginama per naktį purtyklėje (220 aps./min) esant pasirinktai temperatūrai.
- 2) Ryte 10 mL naktinės kultūros perkeliama į 200 mL skystos LB terpės (kolbos tūris 2 L). Bakterijų kultūra auginama purtyklėje (220 aps./min) esant pasirinktai temperatūrai. Kelis kartus, kas valandą paimamas mėginys baltymo raiškai įvertinti.
- 3) Nuolat stebimas kultūros optinis tankis prie 600 nm ilgio bangos ir bakterijų kultūrai pasiekus tinkamam OT indukuojama su IPTG. (OT ir IPTG koncentracija pasirenkami iš prieš tai gautų bandymų rezultatų).
- 4) Užauginta *E.coli* bakterijų kultūra centrifuguojama 20 min, 6000 x g, esant 4 °C temperatūrai. Supernatantas nupilamas, o nuosėdos surenkamos, pasveriamos ir užšaldomos - 80 °C temperatūroje.

2.2.4 NDS-PAAG elektroforezė

Viso auginimo metu, buvo imami mėginiai geno raiškos laipsniui įvertinti. Norint palyginti geno raiškos intensyvumą, ląstelių kiekis frakcijose turi būti vienodas, todėl mėginio reikiamas tūris paskaičiuojamas pagal lygtį:

$$V_1 \times O.T._1 = V_2 \times O.T._2$$

kur:

V_1 – mažiausio optinio tankio mėginio tūris

O.T.₁ – mažiausio optinio tankio mėginio optinis tankis

V_2 – kitų mėginių tūris

O.T.₂ – kitų mėginių optinis tankis

Apskaičiuoti tūriai išpilstomi į 1,5 mL mėgintuvėlius ir centrifuguojami 5 min, 6000 x g. Supernatantas pašalinamas, o nuosėdos resuspenduojamos 50 μ L H₂O ir 10 μ L 6X baltymo dažo. Mišiniai inkubuojami 10 min 98 °C temperatūroje.

Pagal **2 lentelę**, sumaišomi reagentai ir gaminami skiriamasis ir koncentruojamasis geliai. Paskutiniai įdedami APS ir TEMED, nes šie reagentai skatina polimerizacijos reakciją. Pirmas ruošiamas skiriamasis gelis (16 %), įpilamas tarp elektroforezės stiklų ir užpilamas iš viršaus H₂O, laukiama 30 min. Kai skiriamasis gelis sustingsta, nupilamas vanduo ir ant viršaus užpilamas koncentruojamasis gelis (4 %), į jį įdedamos „šukos“ ir vėl laukiama 30 min, kol gelis sustings.

2 lentelė. Skiriamojo ir koncentruojamojo gelių ruošimas.

Skiriamasis gelis (16 %)		Koncentruojamasis gelis (4 %)	
Reagentas	Tūris	Reagentas	Tūris
H ₂ O	1,94 mL	H ₂ O	1,270 mL
1,5 M Tris-HCl pH=8,8	1,53 mL	1 M Tris-HCl pH=6,8	500 μ L
40 % AA/BAA	2,44 mL	40 % AA/BAA	201 μ L
10 % NDS	61 μ L	10 % NDS	20 μ L
10 % APS	30,5 μ L	10 % APS	10 μ L
TEMED	3,65 μ L	TEMED	2 μ L

Kai geliai sustingsta, elektroforezės plokštelės įdedamos į elektroforezės aparatą ir jis pripildomas A buferiniu tirpalu. Išimamos „šukos“ ir į šulinėlius įpilama po 10 μ L paruoštų mėginių bei 5 μ L „Unstained Protein Marker“. Pasirenkami nustatymai 30 mA srovė ir 150 mV įtampa bei prietaisas pajungiamas prie elektros šaltinio. Elektroforezė vykdoma kol baltymo dažas pasieks gelio apačią. Pasibaigus procesui, elektroforezės plokštelės išimamos ir praplaunamos H₂O, išimamas tarp jų esantis poliakrilamido gelis. Gelis ryškinamas „Ez-Run“ dažų 1 valandą kambario temperatūroje ant svyruojančios platformos, vėliau blukinamas dejonizuotu vandeniu.

2.2.5 Baltymo gryninimo optimizavimas

2.2.5.1 Kolonos „pakrovimas“

- 1) Kolonėlė (**pav. 2.4**) „iškraunama“ plaunant ją 10 CV (kolonos tūris) **BB** buferiniu tirpalu, toliau plaunama 10 CV **C** buferiniu tirpalu
- 2) Kolonėlė „pakraunama“ įpilant į ją 2,5 mL 0,1 M NiCl₂ tirpalo.
- 3) Kolonėlė praplaunama 5 CV distiliuoto vandens ir 5 CV **C** buferiniu tirpalu, kad būtų išlaikytas tinkamas kolonėlės pH.
- 4) Galiausiai koloną galima naudoti gryninimui arba ji praplaunama 20 % etanoliu 5 CV ir laikoma šaldytuve + 4 °C temperatūroje.



pav. 2.4 HiTrap™ IMAC kolonėlė, kurios turis 5 mL (1,6 x 2,5 cm). Kolonoje yra Sepharose™ 6 Fast Flow sorbentas, Rekomenduojamas pratekėjimo greitis 5 mL/min. (pritaikyta iš Sigms Aldrich tinklapio).

2.2.5.2 Baltymo gryninimas

Optimizavimas:

- 1) Tau baltymo 2N4R izoformos biomasė išsiimama iš šaldiklio ir paimamas jos kiekis 1 g. Atšildoma ir užpilama 20 mL **C** buferinio tirpalo. Homogenizuojama rankiniu homogenizatoriumi ir ardoma ultragarsiniu sonikatoriumi (VS70T antgaliu, 20 min, 60 s ardymo/poilsio ciklais, 70 % amplitudė). Suardyta biomasė centrifuguojama 30 min, 17000 x g, esant 4 °C temperatūrai. Surenkamas supernatantas ir praskiedžiamas iki 30 mL.
- 2) Mišinys užnešamas ant HiTrap™ IMAC FF kolonėlės. Vykdoma įmobilizuotų metalų jonų giminingumo chromatografija.
- 3) Kolonėlė plaunama 15 CV **C** buferinio tirpalo, kad atsiplautų nespecifiškai prisijungę baltymai.
- 4) Pradedama eliucija, kolonėlė plaunama po 5 CV buferinio tirpalo. Iš eilės **D, E, F, G**. Ieškoma esant kokiai imidazolo koncentracijai atsiplauna grynas baltymas.

- 5) Surenkamos visos frakcijos ir NDS-PAAG elektroforezės metodu tikrinama, kuriose frakcijose yra grynas tikslinis baltymas.

Gryninant kitomis sąlygomis, esant 2 M, 4 M, 6 M ir 8 M urea koncentracijoms, C buferinis tirpalas visose žingsniuose pakeičiamas atitinkamai **H, M, R, W** buferiniais tirpalais.

Penktas žingsnis keičiamas eliuacija vykdant buferiniais tirpalais su urea. Pakeitimai:

- 2 M urea: kolonėlė plaunama po 5 CV buferinio tirpalo. Iš eilės **I, J, K, L**
- 4 M urea: kolonėlė plaunama po 5 CV buferinio tirpalo. Iš eilės **N, O, P, Q**
- 6 M urea: kolonėlė plaunama po 5 CV buferinio tirpalo. Iš eilės **S, T, U, V**
- 8 M urea: kolonėlė plaunama po 5 CV buferinio tirpalo. Iš eilės **X, Y, Z, A**

Didelio kiekio baltymo gryninimas:

- 1) Tau baltymo 2N4R izoformos biomasė išsiimama iš šaldiklio. Atšildoma ir užpilama 50 mL „prikabinimo“ buferinio tirpalo (parenkamas pagal anksčiau gautus rezultatus). Homogenizuojama rankiniu homogenizatoriumi ir ardoma ultragarsiniu sonikatoriumi (VS70T antgaliu, 20 min, 60 s ardymo/poilsio ciklais, 70 % amplitudė). Suardyta biomasė centrifuguojama 30 min, 17000 x g, esant 4 °C temperatūrai. Surenkamas supernatantas.
- 2) Mišinys užnešamas ant HiTrap™ IMAC FF kolonėlės. Vykdoma įmobilizuotų metalų jonų giminingumo chromatografija.
- 3) Kolonėlė plaunama 20 CV „prikabinimo“ buferinio tirpalo („prikabinimo“ buferinis tirpalas parenkamas pagal anksčiau gautus rezultatus), kad atsiplautų nespecifiškai prisijungę baltymai.
- 4) Pradedama eliuacija, kolonėlė plaunama 15 CV eliuacijos buferinio tirpalo (eliuacijos buferinis tirpalas parenkamas pagal anksčiau gautus rezultatus).
- 5) Surenkamos visos frakcijos ir NDS-PAAG elektrolizės metodu tikrinamas baltymo grynumas.

2.2.5.3 Kolonos valymas

- 1) Kolonėlė plaunama 5 CV 1,5 M NaCl tirpalu ir 10 CV distiliuoto vandens. Šiuo būdu pašalinami joninių būdu prisikabinę baltymai.
- 2) Kolonėlė užpildoma 1 M NaOH tirpalu ir laikoma 2 valandas. Vėliau praplauna 10 CV C buferiniu tirpalu bei 10 CV distiliuoto vandens. Kolonėlė praplaunama 10 CV 30 %

izopropanolio tirpalu ir paliekama 15 minučių, vėliau 10 CV distiliuoto vandens. Šiuo būdu pašalinami hidrofobiškai prisikabinę baltymai.

- 3) Galiausiai kolona praplaunama 20 % etanoliu 5 CV ir laikoma šaldytuve + 4 °C temperatūroje.

3 REZULTATAI IR JŲ APITARIMAS

3.1 Įvadas

Laboratorija gavo naują genetinį konstruklą koduojanti 2N4R Tau baltymo izoformą su SUMO-His tag. Magistrinio darbo tikslas buvo gauti gryną 2N4R Tau izoformą su SUMO-His žymeniu, tam projektas buvo išskirstytas į dvi dalis. Pirmoje dalyje reikėjo rasti ir optimizuoti sąlygas tinkamas Tau baltymo 2N4R izoformai sintetinti, o antroje dalyje optimizuoti gryninimo sąlygas, galiausiai paruošti naują gamybos protokolą, kuris būtų naudojamas, 2N4R izoformai gaminti, Amiloidų tyrimų laboratorijoje.

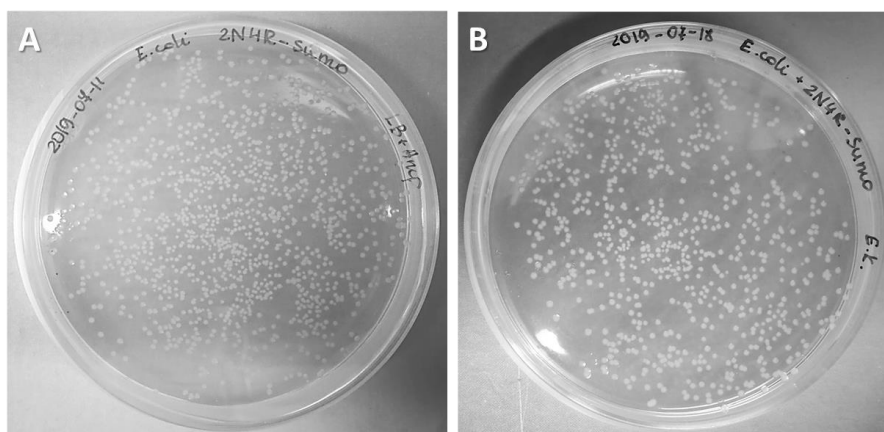
Prasidėjus COVID-19 pandemijai nuo kovo 13 dienos 2020 m. darbas gyvybės mokslų centre, įskaitant ir amiloidų tyrimų laboratoriją buvo nutrauktas. Dėl pastarosios priežasties magistrinio darbo empirinės dalies ruošimas turėjo būti taip pat nutrauktas. Dėl susiklosčiusios situacijos, skyrius „Rezultatai ir jų aptarimas“ yra padalintas į du poskyrius – „Atlikti eksperimentai“ bei „Planuoti eksperimentai“. 3.2 poskyryje pateikiami tyrimų rezultatai, kurie gauti atlikus tyrimus laboratorijoje, o 3.3 – galimi rezultatai, kuriuos tikėtasi gauti atlikus suplanuotus tyrimus.

3.2 Atlikti eksperimentai

3.2.1 Rekombinantinės Tau baltymo 2N4R izoformos sintezė

3.2.1.1 Kompetentinių ląstelių ruošimas ir transformacija

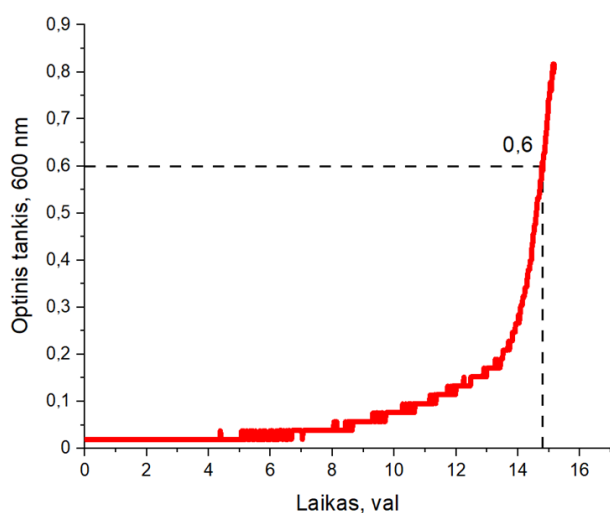
Plazmidė pET302NT-His, su įklonuotu 18AD2PIC_Seq_1_ Tau baltymo 2N4R izoformą koduojančiu genu, sėkmingai transformuota į kompetentines *E. coli* BL21(DE3) ląsteles. Transformacija buvo atlikta dviem būdais, pagal standartinę transformacijos protokolą (darant karščio šoką bei pridedant SOC terpės) ir greituoju būdu, atliekant tik karščio šoką. Transformantai buvo užsėti ant standžios Luria Bertani terpės su ampicilinu. Transformantai turi ampicilino atsparumo geną, todėl užaugo *E. coli* kolonijos. Žemiau pateiktame paveiksle (**pav 3.1**) matome užaugusias *E. coli* kolonijas, todėl galima teigti, kad kompetentinės ląstelės pagamintos gerai, yra imlios plazmidėms. Taip pat, parodytas palyginimas tarp transformacijų būdų, kadangi abu būdai buvo sėkmingi, tolesniuose tyrimuose buvo atliekama transformacija greituoju būdu, siekiant taupyti tyrėjo darbo laiką, nes prieš kiekvieną naują optimalių sąlygų paieškos auginimą, reikia turėti šviežias bakterijų kolonijas.



pav. 3.1 Užauginti transformantai Petri lėkštelėse. A – transformacija vykdyta pagal standartinį protokolą, B – transformacija vykdyta greituoju būdu.

3.2.1.2 Baltymo sintezės sąlygų optimizavimas

Užaugusių transformantų kolonija iš Petri lėkštelės buvo perkelta į 20 mL LB mitybinės terpės. Buvo auginama naktinė kultūra, mėgintuvėlis buvo purtomas 220 aps./min greičiu ir palaikyta pastovi temperatūra 37 °C bei pH ~ 7. Remiantis literatūra, geriausias laikas naktinę ląstelių kultūrą persėti tolesniam auginimui, kai bakterijų augimas yra logaritminėje fazėje, **3.2** paveiksle matoma, kad bakterijų kultūra buvo būtent sparčiojo augimo fazėje. Naktinė kultūra buvo auginta, kol pasiekė 0,6 O.T. ir tada 1 mL naktinės kultūros pridedama į auginimui skirtą mėgintuvėlį su 40 mL LB mitybinės terpės.

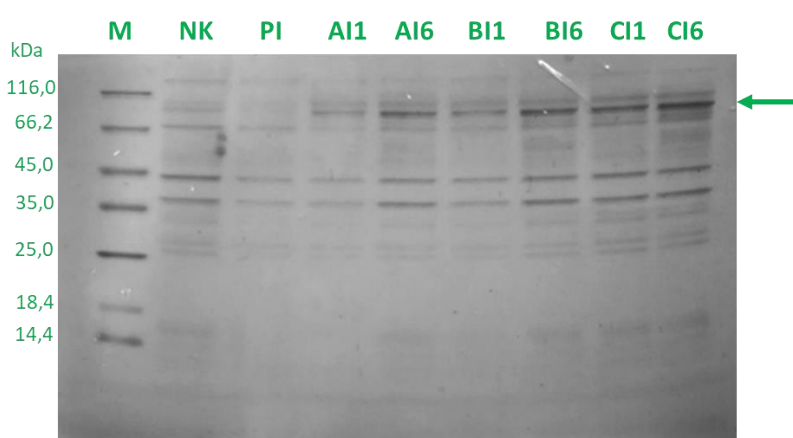


pav. 3.2 Naktinės *E. coli* kultūros auginimas LB mitybinėje terpėje. Grafike pažymėta kada naktinė kultūra buvo persėta.

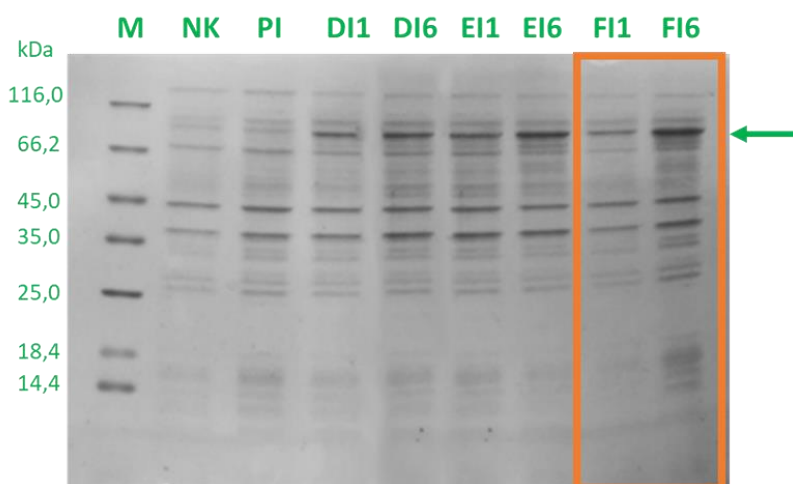
Ląstelių kultūra toliau buvo auginama realaus laiko reaktoriuje pagal **1 lentelėje** aprašytas sąlygas. Visos ląstelės buvo augintos iki IPTG indukcijos ir dar 6 valandas po

indukcijos. Nuolat buvo stebimas bakterijų kultūros optinis tankis, bei imami mėginiai, geno raiškai įvertinti NDS-PAAG elektroforezės būdu.

Prieš atliekant NDS-PAAG gelių analizę, kad būtų žinoma kokių rezultatų tikėtis ir juos įvertinti, buvo nustatytas teorinis tikslinio baltymo dydis. Turima geno seka (**pav. 2.1**), naudojantis transliacijos įrankiu „EXPASy translate tool“ (<https://web.expasy.org/translate/>), buvo transliuota į aminorūgščių seką. Gauta aminorūgščių seka buvo analizuojama „EXPASy ProtParam“ įrankiu (<http://web.expasy.org/protparam/>), kur buvo apskaičiuota teorinė tikslinio baltymo su SUMO-His žymeniu molekulinė masė – 56 831,18 Da bei grynos 2N4R Tau baltymo izoformos masė – 45 832,82 Da.

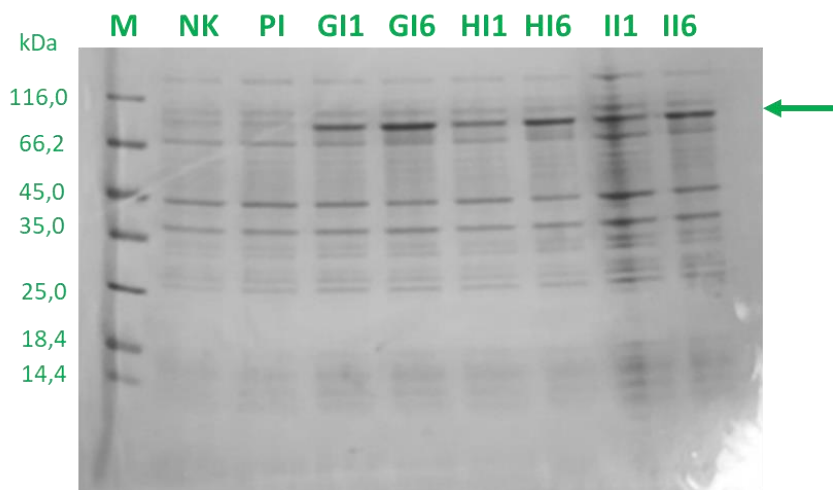


pav. 3.3 Rekombinantinės Tau baltymo 2N4R izoformos su SUMO-His žymeniu sintezės elektroforegrama. M – molekulinės masės žymuo, NK – naktinės kultūros mėginys, PI – bakterijų kultūra prieš pat indukcija; AI1 – A sąlygomis viena valanda po indukcijos, AI6 – A sąlygomis šešias valandas po indukcijos, BI1 – B sąlygomis viena valanda po indukcijos, BI6 – B sąlygomis šešias valandas po indukcijos, CI1 – C sąlygomis viena valanda po indukcijos, CI6 – C sąlygomis šešias valandas po indukcijos. Žalia rodyklė pažymi tikslinio baltymo juostą.

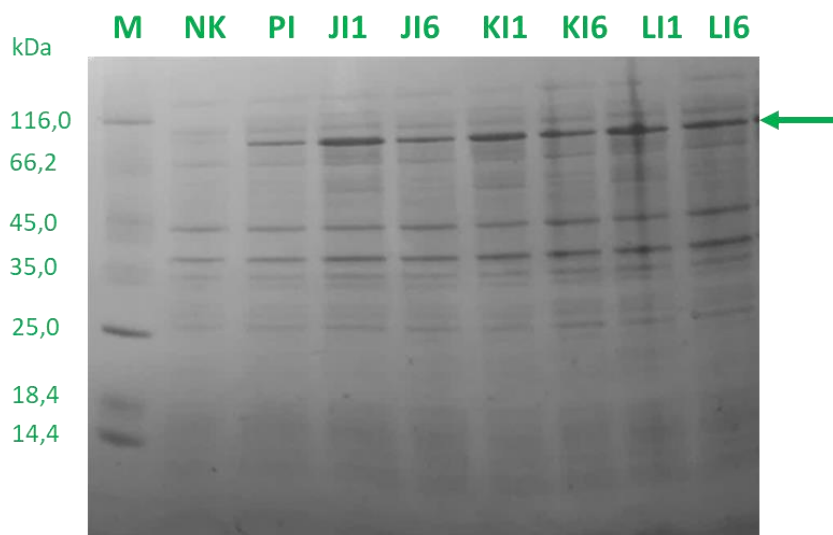


pav. 3.4 Rekombinantinės Tau baltymo 2N4R izoformos su SUMO-His žymeniu sintezės elektroforegrama. M – molekulinės masės žymuo, NK – naktinės kultūros mėginys, PI – bakterijų

kultūra prieš pat indukcija; DI1 – D sąlygomis viena valanda po indukcijos, DI6 – D sąlygomis šešias valandas po indukcijos, EI1 – E sąlygomis viena valanda po indukcijos, EI6 – E sąlygomis šešias valandas po indukcijos, FI1 – F sąlygomis viena valanda po indukcijos, FI6 – F sąlygomis šešias valandas po indukcijos. Žalia rodyklė pažymi tikslinio baltymo juostą, o oranžine spalva apibrauktos sąlygos pasirinktos tolesniems baltymo sintezės etapams.



pav. 3.5 Rekombinantinės Tau baltymo 2N4R izoformos su SUMO-His žymeniu sintezės elektroforegrama. M – molekulinės masės žymuo, NK – naktinės kultūros mėginys, PI – bakterijų kultūra prieš pat indukcija; GI1 – G sąlygomis viena valanda po indukcijos, GI6 – G sąlygomis šešias valandas po indukcijos, HI1 – H sąlygomis viena valanda po indukcijos, HI6 – H sąlygomis šešias valandas po indukcijos, II1 – I sąlygomis viena valanda po indukcijos, II6 – I sąlygomis šešias valandas po indukcijos. Žalia rodyklė pažymi tikslinio baltymo juostą.



pav. 3.6 Rekombinantinės Tau baltymo 2N4R izoformos su SUMO-His žymeniu sintezės elektroforegrama. M – molekulinės masės žymuo, NK – naktinės kultūros mėginys, PI – bakterijų kultūra prieš pat indukcija; JI1 – J sąlygomis viena valanda po indukcijos, JI6 – J sąlygomis šešias valandas po indukcijos, KI1 – K sąlygomis viena valanda po indukcijos, KI6 – K sąlygomis šešias valandas po indukcijos, LI1 – L sąlygomis viena valanda po indukcijos, LI6 – L sąlygomis šešias valandas po indukcijos. Žalia rodyklė pažymi tikslinio baltymo juostą.

Visų pirma, buvo įvertinta ar baltymas iš vis yra sintetinamas bakterijose. Pažiūrėjus į gautus NDS-PAAG elektroforezės gelius (**pav. 3.3 – 3.6**), atrodo, kad baltymo masė su žymeniu yra daug didesnė nei tikimasi, tai yra >66,2 kDa. Tačiau, išanalizavus literatūrą, nustatyta, kad tai yra dažnas neatitikimas. Rasta straipsnių, kurie aprašo, kad leidžiant Tau baltymo izoformas poliakrilamidiniame gelyje, jų molekulinės masės gaunamos nuo 45 iki 65 kDa (Goedert et Jakes, 1990; Liu et Götz, 2013; Tolnay et al., 2002). Šiame darbe pateiktose elektroforeogramose geno raiškos juosta vis tiek yra aukščiau nei aprašoma literatūroje. Būtina pabrėžti, kad aprašytas baltymas yra sulietas su SUMO-His žymeniu, todėl reikia pridėti 10 998,36 Da. Perskaičiavus, Tau izoformų su SUMO-His-tag molekulinė masė, gaunama NDS-PAAG geliuose, turėtų būti 56-76 kDa ribose. Atsižvelgus į visą aukščiau aprašytą informaciją, daroma prielaida, kad geno raiška transformantuose vyksta, o NDS-PAAG elektroforezės gelyje gauta raiškos juosta yra tikslinio baltymo.

3 lentelė. Mėginių ištirtų NDS-PAAD elektroforezės metodų optiniai tankiai. Oranžine spalva pažymėti mėginiai, kurių optiniai tankiai didžiausi.

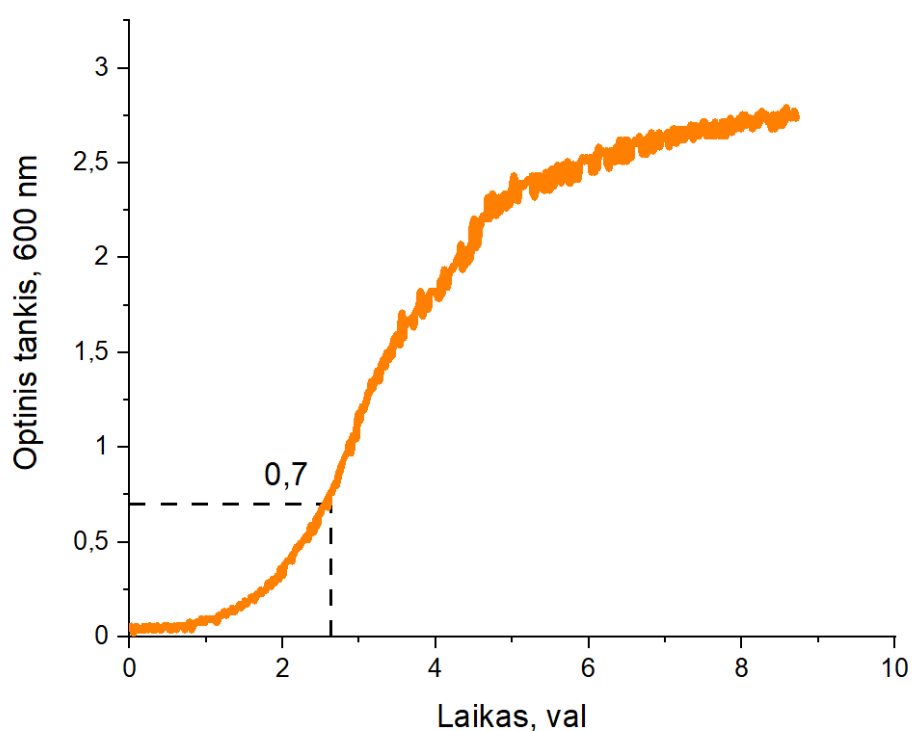
Mėginys	Optinis tankis, 600 nm	Mėginys	Optinis tankis, 600 nm
AI1	0,99 ± 0,02	GI1	1,07 ± 0,01
AI6	2,22 ± 0,04	GI6	2,38 ± 0,02
BI1	0,97 ± 0,03	HI1	1,03 ± 0,04
BI6	2,31 ± 0,01	HI6	2,29 ± 0,03
CI1	1,11 ± 0,01	II1	1,12 ± 0,03
CI6	2,34 ± 0,02	II6	2,21 ± 0,03
DI1	1,42 ± 0,03	JI1	1,28 ± 0,01
DI6	2,36 ± 0,04	JI6	2,47 ± 0,02
EI1	1,51 ± 0,03	KI1	1,14 ± 0,02
EI6	2,38 ± 0,03	KI6	2,09 ± 0,03
FI1	1,39 ± 0,02	LI1	1,01 ± 0,04
FI6	2,49 ± 0,01	LI6	2,24 ± 0,04

Antra, iš gautų rezultatų buvo pasirinktos sąlygos tolesnei baltymo sintezei, tai buvo vertinama pagal du veiksnius – elektroforezės gelius, parodančius geno raiškos intensyvumą ir išmatuotus optinius tankius, kurie parodo ląstelių santykinį kiekį kultūroje. Pagal gautus NDS-PAAG gelius (**pav. 3.3-3.6**), matoma, kad visos bakterijų kultūros vykdė baltymo sintezę, tačiau A-C ir G-I sąlygose geno raiška yra šiek tiek silpnesnė, šiuo atveju ląstelės buvo augintos 30 °C temperatūroje. Toliau buvo išanalizuoti 37 °C temperatūroje auginamų bakterijų mėginiai, juose pastebima intensyvesnė geno raiška, ypač matomas FI1 ir FI6 mėginiuose, kur baltymo raiškos juostelė ženkliai suintensyvėjo po 6 valandų nuo indukcijos. Pagal **3 lentelę** matoma, kad bakterijų optinis tankis yra didesnis auginat esant 37 °C temperatūrai (auginimo sąlygos pateiktos **1 lentelėje**). Įvertinus visus gautus rezultatus, nuspręsta, kad bakterijų

biomasė bus toliau auginama F sąlygose, nes bakterijos indukuotos pasiekus 0,7 O.T. su 0,6 mM IPTG ir auginamos 37 °C temperatūroje, turėjo ryškiausia baltymo raiškos juostą elektroforezės gelyje bei didžiausią optinį tankį.

3.2.1.3 Baltymo sintezė optimaliomis sąlygomis

Atkartojant anksčiau aprašytas sąlygas, sintetinama Tau baltymo 2N4R izoforma dideliu kiekiu F sąlygose, nes daug bakterijų biomasės reikės optimizuojant tikslinio baltymo gryninimą.



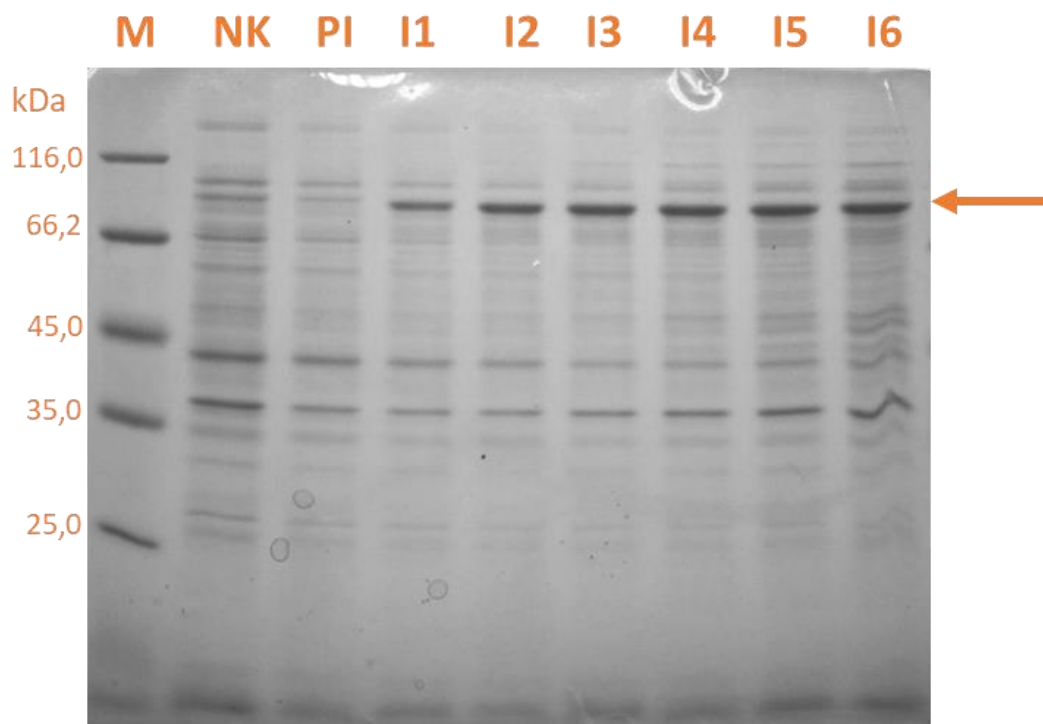
pav. 3.7 *E. coli* transformantų auginimas LB mitybinėje terpėje, esant 37 °C temperatūrai. Grafike pažymėta, kad esant 0,7 O.T. bakterijų kultūra buvo indukuota IPTG.

Iš viso atlikti trys transformantų auginimai. Kiekvieno auginimo metu, buvo auginamos 9 kolbos po 200 mL mitybinės terpės. Taigi iš viso gauta 5,4 L *E. coli* ląstelių kultūros LB mitybinėje terpėje. Gautos biomasės kiekiai, kiekvieno auginimo metu, pateikti **4 lentelėje**.

4 lentelė. *E. coli* transformantų auginimas ir gauti biomasės kiekiai.

Auginimas Nr.	Gautos biomasės kiekis, g
1	7,9 ± 0,1
2	6,5 ± 0,1
3	8,2 ± 0,1

Auginimo metu kas valandą buvo imti mėginiai iš auginamos ląstelių kultūros tam, kad būtų patikrinta tikslinio baltymo raiška.



pav. 3.8 Rekombinantinės Tau baltymo 2N4R izoformos su SUMO-His žymeniu sintezės elektroforegrama. M – molekulinės masės žymuo, NK – naktinės kultūros mėginys, PI – bakterijų kultūra prieš pat indukciją; I1 – viena valanda po indukcijos, I2 – dvi valandas po indukcijos, I3 – trys valandos po indukcijos, I4 – keturios valandos po indukcijos, I5 – penkios valandos po indukcijos, I6 – šešios valandos po indukcijos. Oranžinė rodyklė pažymi tikslinio baltymo juostą.

Elektroforegramoje aiškiai matoma, kad naktinėje ląstelių kultūroje tikslinio baltymo buvo labai mažai, o persėjus į LB mitybinę terpę ir pridėjus IPTG, sintezė, bakterijų kamiene *E. coli* BL21(DE3), vyko sėkmingai.

3.3 Planuoti eksperimentai

Paruošus pakankamą kiekį biomasės, toliau buvo planuota ieškoti optimalių sąlygų išgryninti tikslinį baltymą. Tau baltymo 2N4R izoforma turi SUMO-His žymenį (po gryninimo žymuo nekerpamas), kuris specifiskai prisijungia prie „Ni Sepharose 6 Fast Flow“ sorbento, todėl gryninimas vykdomas IMAC metodu.

Išanalizavus literatūrą, nustatyta kad gaminamas tikslinis baltymas nėra išskiriamas į terpę (Ferrari et Rüdiger, 2018), todėl 1 g užaugintos biomasės ardomas ultragarsu, ląstelių nuolaužos yra nucentrifuguojamos, o supernatantas sumaišomas su C buferiniu tirpalu. „Pakraunama“ kolona ir vykdomas IMAC gryninimas, kurio metu ieškoma imidazolo

koncentracija, esant kuriai atsiplauna grynas tikslinis baltymas. Tam, visų pirmą kolonėlė plaunama **C** buferiniu tirpalu, kuriame yra 10 mM imidazolo, kad atsijungtų nespecifiškai prisijungę baltymai. Tikslinio baltymo eliucija vykdoma žingsniniu (laiptiniu) būdu, tai reiškia, kad didinama imidazolo koncentracija eliucijos buferiniuose tirpaluose. Per kolonėlę leidžiami paeiliui buferiniai tirpalai **D** (50 mM imidazolo), **F** (100 mM imidazolo), **G** (200 mM imidazolo) ir galiausiai **H** (300 mM imidazolo).

Kiekviena gryninimo frakcija surenkama ir analizuojama NDS-PAAG metodu. Rezultatuose turėtų būti pavaizduota elektroforeograma, kurioje yra takeliai: M – molekulinės masės žymuo, LZ – ląstelių lizatas, P – „prašokimas“, C – baltymo praplovimo frakcija, ED – eliucija **D** buferiniu tirpalu, EF – eliucija **F** buferiniu tirpalu, EG - eliucija **G** buferiniu tirpalu bei EH - eliucija **H** buferiniu tirpalu.

Remiantis literatūra, yra tikimybė, kad šis metodas galėjo nebūti idealus baltymo gryninimui, tai reiškia, kad elektroforezės gelyje tikslinio baltymo juostos būtų matomos LZ, P, C ir D takeliuose. Nors baltymas yra sulietas su His-tag ir jis turėtų išsigryninti per vieną IMAC etapą, tačiau Tau baltymo 2N4R SUMO-His-tag yra gan didelis (56 831,18 Da) sulietas baltymas, kuris neturi apibrėžtos (tretinės ir ketvirtinės) struktūros. Toks baltymas gali laisvai plaukioti ir lankstytis, todėl dažnai histidinių uodegą būna uždengiama arba pasislepia baltymo viduje. To pasekoje, tikslinis baltymas neprisikabina arba prisikabina jo mažas kiekis prie IMAC kolonėlės. Literatūra aprašo, kad tokį reiškinį galima išspręsti pridedant denatūrantą į gryninimo buferinius tirpalus (Makarava et Baskakov, 2008). IMAC metoduose plačiausiai naudojami denatūrantai urea ir GuHCl. Tolimesniuose tyrimuose planuota naudoti urea, nes GuHCl yra trukdantis junginys (ang. interfering compound) ir prieš leidžiant NDS-PAAG elektroforezę turi būti pašalintas iš mėginių, o urea gali būti tirpale tiriant mėginius elektroforetiškai (Grabski et Burgess, 2004).

Tolesniuose tyrimuose buvo planuota nustatyti kokia denatūrantų koncentracija yra optimali, tiksliniam baltymui išgryninti. Visas gryninimo procesas kartojamas keičiant denatūrantų koncentraciją buferiniuose tirpaluose – 2 M, 4 M, 6 M ir 8 M urea (visa metodika aprašyta 2.2.5.2).

Tikėtasi rasti sąlygas, urea koncentraciją, kuri leidžia tiksliniam baltymui prisikabinti prie sorbento bei imidazolo koncentraciją, esant kuriai atsiplauna grynas tikslinis baltymas. Tai būtų vertinama pagal elektroforetiškai ištirtus mėginius (frakcijas). Jei NDS-PAAG gelyje „prašokimo“ takelyje nebūtų tikslinio baltymo juostos arba būtų labai nežymi, tai reikštų, kad denatūrantų koncentracija yra tinkama ir tai skatina baltymo prisijungimą ant kolonėlės.

Imidazolo koncentracija būtų nustatoma, vertinant kuriame gelio takelyje yra tik viena juosta (tikslinio baltymo), tai reikštų, kad atsiplovė grynas baltymas, be priemaišų.

Galiausiai išgrynintas baltymas būtų patikrintas masių spektrometrijos būdu. Jeigu ištirto baltymo molekulinė masė sutaptų su teoriškai apskaičiuota baltymo mase, galima būtų teigti, kad tikslinis baltymas būtų išgrynintas sėkmingai. Jei pavyktų gauti tokius rezultatus, būtų įvykdyti visi planuoti magistrinio darbo tikslai. Laboratorijoje būtų sukurtas Tau 2N4R SUMO-His-tag baltymo izoformos gamybos protokolas.

IŠVADOS

1. Gauta geno, koduojančio Tau baltymo 2NR4 izoformą sulietą su SUMO-His, raiška *E. coli* 21BL(DE3) bakterijų ląstelėse. Nustatyta, kad geriausia geno raiška gaunama kultivuojant bakterijas 37 °C temperatūroje, indukuojant 0,6 mM IPTG, kai ląstelių optinis tankis yra 0,7.
2. Užauginta 5,4 L *E. coli* bakterijų kultūros iš kurios gauta 22,6 g biomasės.
3. Dėl paskelbtos COVID-19 pandemijos, baltymo gryninimo tyrimai nebuvo atlikti, o tikėtini rezultatai yra aprašyti 3.3 poskyryje.

PADĖKA

Dėkoju savo vadovui dr. Vytautui Smirnovui už priėmimą į Amiloidų tyrimų grupę, suteiktas žinias bei pagalbą planuojant ir atliekant magistro darbą. Dr. Tomui Šneideriui, dr. Zigmantui Toleikiui, doktorantams Mantui Žiauniui bei Andriui Sakalauskui už vertingas pastabas, idėjas bei patarimus. Dėkoju visiems laboratorijos kolegoms už malonų bendradarbiavimą bei įvairiapusę pagalbą.

SANTRAUKA

Elžbieta Kulicka

Tau baltymo (2N4R izoformos) sintezė ir gryninimas

Alzheimerio liga yra labiausiai paplitusi ir geriausiai ištirta amilodinių baltymų sukeliama liga. Žmonėms sergantiems šia liga yra būdingos amiloidinių plokštelių ir neurofibrilinių raizginių sankaupos smegenyse, su tuo susijęs sinapsių ir neuronų praradimas, sukeliantis kognityvinį deficitą ir galiausiai demenciją. Tau baltymas yra neurofibrilinių raizginių pagrindinis komponentas. Iki šiol nėra vaistų, kurie išgydytų susirgimą. Ieškant potencialių ligos slopiklių, tyrimams atlikti reikia didelių kiekių baltymų.

Šio darbo tikslas buvo pagaminti Tau baltymo 2N4R izoformą sulietą su SUMO-His žymeniu. Darbo metu buvo sėkmingai gauta geno, koduojančio Tau baltymo 2NR4 izoformą sulietą su SUMO-His, raiška *E. coli* BL21(DE3) bakterijų ląstelėse. Nustatyta, kad geriausia geno raiška gaunama kultivuojant bakterijas 37 °C temperatūroje, indukuojant 0,6 mM IPTG, kai ląstelių optinis tankis yra 0,7. Užauginta 5,4 L *E. coli* bakterijų kultūros iš kurios gauta 22,6 g biomasės. Dėl paskelbtos COVID-19 pandemijos, baltymo gryninimo tyrimai nebuvo atlikti, bet aprašyti laukiami hipotetiniai rezultatai.

SUMMARY

Elżbieta Kulicka

Tau Protein (2N4R Isoform) Synthesis and Purification

Alzheimer's disease is the most common and best-studied disease caused by amyloid proteins, it is characterized by amyloid plaques and neurofibrillary tangles in the brain, with associated loss of synapses and neurons, resulting in cognitive deficits and dementia. Tau protein is the main component of neurofibrillary tangles. Up to now, there are no drugs to treat this disease. Research of the potential inhibitors of the disorder requires large amounts of protein.

The aim of this thesis was to synthesize and purify the Tau protein 2N4R isoform fused with SUMO-His tag. The expression of the gene encoding the Tau protein 2NR4 isoform fused with SUMO-His-tag was successfully obtained in *E. coli* BL21(DE3) bacterial cells. The best gene expression was found by culturing bacteria at 37 °C temperature and inducing with 0,6 mM IPTG at 0,7 optical density. 5,4 L of *E. coli* bacterial culture was grown and 22,6 g of biomass was obtained. Due to the declared COVID-19 pandemic, protein purification studies have been not performed, but the expected results have been described.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Adrio, J. L., Demain, A. L. (2010). Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered Bugs*, 1(2), 116–131. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.2.10484>
- Arendt, T., Stieler, J. T., Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Research Bulletin*, 126, 238–292. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018>
- Avila, J., Jiménez, J. S., Sayas, C. L., Bolós, M., Zabala, J. C., Rivas, G., Hernández, F. (2016). Tau Structures. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8(NOV), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00262>
- Barbier, P., Zejneli, O., Martinho, M., Lasorsa, A., Belle, V., Smet-Nocca, C., Tsvetkov, P. O., Devred, F., Landrieu, I. (2019). Role of tau as a microtubule-associated protein: Structural and functional aspects. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00204>
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., Schäfer, F. (2009). Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC). A Review. *Methods in Enzymology*, 463(C), 439–473. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63027-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63027-5)
- Bocharova, O. v., Urban, A. S., Nadezhdin, K. D., Bocharov, E. v., Arseniev, A. S. (2013). Bacterial and cell-free production of APP671-726 containing amyloid precursor protein transmembrane and metal-binding domains. *Biochemistry (Moscow)*, 78(11), 1263–1271. <https://doi.org/10.1134/S0006297913110060>
- Brunello, C. A., Merezhko, M., Uronen, R. L., Huttunen, H. J. (2019). Mechanisms of secretion and spreading of pathological tau protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03349-1>
- Chen, S., Ge, X., Chen, Y., Lv, N., Liu, Z., Yuan, W. (2013). Advances with RNA interference in Alzheimer's disease research. *Drug Design, Development and Therapy*, 7, 117–125. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S40229>
- Cheung, R. C. F., Wong, J. H., Ng, T. B. (2012). Immobilized metal ion affinity chromatography: A review on its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(6), 1411–1420. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4507-0>

- Congdon, E. E., Sigurdsson, E. M. (2018). Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, *14*(7), 399–415. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0013-z>
- Crowley, E. L., Rafferty, S. P. (2019). Review of lactose-driven auto-induction expression of isotope-labelled proteins. *Protein Expression and Purification*, *157*(January), 70–85. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.01.007>
- Dong, X. Y., Feng, X. D., Sun, Y. (2010). His-tagged protein purification by metal-chelate affinity extraction with Nickel-chelate reverse micelles. *Biotechnology Progress*, *26*(4), 1088–1094. <https://doi.org/10.1002/btpr.428>
- Faust, G., Stand, A., Weuster-Botz, D. (2015). IPTG can replace lactose in auto-induction media to enhance protein expression in batch-cultured *Escherichia coli*. *Engineering in Life Sciences*, *15*(8), 824–829. <https://doi.org/10.1002/elsc.201500011>
- Ferrari, L., Rüdiger, S. G. D. (2018). Recombinant production and purification of the human protein Tau. *Protein Engineering, Design and Selection*, *31*(12), 447–455. <https://doi.org/10.1093/protein/gzz010>
- Fitzpatrick, A. W. P., Falcon, B., He, S., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., Crowther, R. A., Ghetti, B., Goedert, M., Scheres, S. H. W. (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*, *547*(7662), 185–190. <https://doi.org/10.1038/nature23002>
- Fox, B. G., Blommel, P. G. (2009). Autoinduction of protein expression. *Current Protocols in Protein Science*, *SUPPL. 56*, 1–18. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0523s56>
- Gao, X., Chen, W., Guo, C., Qian, C., Liu, G., Ge, F., Huang, Y., Kitazato, K., Wang, Y., Xiong, S. (2010). Soluble cytoplasmic expression, rapid purification, and characterization of cyanovirin-N as a His-SUMO fusion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(4), 1051–1060. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2078-5>
- Glazyrina, J., Materne, E. M., Dreher, T., Storm, D., Junne, S., Adams, T., Greller, G., Neubauer, P. (2010). High cell density cultivation and recombinant protein production with *Escherichia coli* in a rocking-motion-type bioreactor. *Microbial Cell Factories*, *9*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-42>

- Goedert, M., Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *The EMBO Journal*, 9(13), 4225–4230. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07870.x>
- Görke, B., Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 613–624. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1932>
- Grabski, A. C., Burgess, R. R. (2004). *Preparation of protein samples for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: procedures and tips*. 10–12.
- Guo, T., Noble, W., Hanger, D. P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 133(5), 665–704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>
- Hage, D. S., Anguizola, J. A., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Sobansky, M., Zheng, X. (2013). Affinity Chromatography. *Liquid Chromatography: Applications*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415806-1.00001-2>
- Jeganathan, S., von Bergen, M., Brumlach, H., Steinhoff, H. J., Mandelkow, E. (2006). Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry*, 45(7), 2283–2293. <https://doi.org/10.1021/bi0521543>
- Jeganathan, S., von Bergen, M., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. (2008). The natively unfolded character of Tau and its aggregation to Alzheimer-like paired helical filaments. *Biochemistry*, 47(40), 10526–10539. <https://doi.org/10.1021/bi800783d>
- Kanaan, N. M., Himmelstein, D. S., Ward, S. M., Combs, B., Binder, L. I. (2015). Tau Protein: Biology and Pathobiology. In *Movement Disorders: Genetics and Models: Second Edition* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405195-9.00056-1>
- Kanaan, N. M., Morfini, G. A., LaPointe, N. E., Pignino, G. F., Patterson, K. R., Song, Y., Andreadis, A., Fu, Y., Brady, S. T., Binder, L. I. (2011). Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent axonal transport through a mechanism involving activation of axonal phosphotransferases. *Journal of Neuroscience*, 31(27), 9858–9868. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0560-11.2011>

- Kuo, W. H. K., Chase, H. A. (2011). Exploiting the interactions between poly-histidine fusion tags and immobilized metal ions. *Biotechnology Letters*, 33(6), 1075–1084. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0554-3>
- Li, Z., Kessler, W., van den Heuvel, J., Rinas, U. (2011). Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based Escherichia coli expression systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 1203–1213. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3407-z>
- Liu, C., Götz, J. (2013). Profiling murine tau with 0N, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus. *PLoS ONE*, 8(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084849>
- Makarava, N., Baskakov, I. v. (2008). Expression and purification of full-length recombinant PrP of high purity. *Methods in Molecular Biology*, 459, 131–143. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-234-2_10
- Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(7), 1–25.
- Marbach, A., Bettenbrock, K. (2012). Lac operon induction in Escherichia coli: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of Biotechnology*, 157(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.10.009>
- Marschall, L., Sagmeister, P., Herwig, C. (2017). Tunable recombinant protein expression in E. coli: promoter systems and genetic constraints. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(2), 501–512. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8045-z>
- Matsumoto, S. E., Motoi, Y., Ishiguro, K., Tabira, T., Kametani, F., Hasegawa, M., Hattori, N. (2015). The twenty-four kDa C-terminal tau fragment increases with aging in tauopathy mice: Implications of prion-like properties. *Human Molecular Genetics*, 24(22), 6403–6416. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv351>
- Mukrasch, M. D., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., Mandelkow, E., Zweckstetter, M. (2009). Structural polymorphism of 441-residue

- Tau at single residue resolution. *PLoS Biology*, 7(2), 0399–0414. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000034>
- Narang, A., Oehler, S. (2017). *crossm Effector Overlap between the lac and. 199*(9), 1–7.
- Ramkumar. (2008). Patterns Phenotypes e D evelopmental Dynamics DOI 10.1002/dvdy 23825. *Gastroenterology and Hepatology*, 4(1), 1–34. <https://doi.org/10.1002/dvdy>
- Reitz, C., Brayne, C., Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 7(3), 137–152. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.2>
- Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Shiloach, J., Fass, R. (2005). Growing E. coli to high cell density - A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, 23(5), 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.04.004>
- Sibille, N., Huvent, I., Fauquant, C., Verdegem, D., Amniai, L., Leroy, A., Wieruszeski, J. M., Lippens, G., Landrieu, I. (2012). Structural characterization by nuclear magnetic resonance of the impact of phosphorylation in the proline-rich region of the disordered Tau protein. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 80(2), 454–462. <https://doi.org/10.1002/prot.23210>
- Šneideris, T., Baranauskienė, L., Cannon, J. G., Rutkienė, R., Meškys, R., Smirnovas, V. (2015). Looking for a generic inhibitor of amyloid-like fibril formation among flavone derivatives. *PeerJ*, 2015(9), 1–17. <https://doi.org/10.7717/peerj.1271>
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
- Tolnay, M., Sergeant, N., Ghestem, A., Chalbot, S., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., Probst, A., Delacourte, A. (2002). Argyrophilic grain disease and Alzheimer's disease are distinguished by their different distribution of tau protein isoforms. *Acta Neuropathologica*, 104(4), 425–434. <https://doi.org/10.1007/s00401-002-0591-z>

Tovar, C. N., Odunuga, O. O. (2019). Size of Protein is a Major Factor that Affects Retention on Preparative IMAC Columns. *Protein Journal*, 38(1), 76–82. <https://doi.org/10.1007/s10930-018-9803-9>

Verwilt, P., Kim, H. S., Kim, S., Kang, C., Kim, J. S. (2018). Shedding light on tau protein aggregation: The progress in developing highly selective fluorophores. *Chemical Society Reviews*, 47(7), 2249–2265. <https://doi.org/10.1039/c7cs00706j>

Wang, Y., Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), 5–21. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>

Xu, J., Banerjee, A., Pan, S. H., Li, Z. J. (2012). Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using E. coli BL21 strains. *Protein Expression and Purification*, 83(1), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.02.014>

Yan, Y., Orcutt, S. J., Strickler, J. E. (2009). The use of SUMO as a fusion system for protein expression and purification. *Chimica Oggi*, 27(6), 42–47.

Thermo Fischer [internetinė svetainė]. [žiūrėta 2020-05-17]. Adresas: <https://www.thermofisher.com/lt/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/competent-cell-selection-applications.html>

BioSan [internetinė svetainė]. [žiūrėta 2020-05-24]. Adresas: <https://biosan.lv/products/rts-1c-real-time-cell-growth-logger-2/>

Sigma Aldrich [internetinė svetainė]. [žiūrėta 2020-05-25]. Adresas: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/affinity-chromatography-tagged-proteins/purification-using-hisrap-hp-and-hisrap-ff.html>

Invitrogen by Thermo Fisher Scientific [genetinio konstrukto kokybės užtikrinimo dokumentas] „Quality Assurance Documentation“