



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biotechnologijos institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos II kurso studentė

Rugilė DRULYTĖ

Magistro baigiamasis darbas

**Rekombinantinių augalinių alergenų sintezė augalų ir bakterijų raiškos  
sistemose**

Darbo vadovas: dr. Raimundas  
Ražanskas

Vilnius, 2020

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	4
ĮVADAS .....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	8
1.1 Alergija ir jos diagnostika .....	8
1.1.1 Alerginių reakcijų veikimo mechanizmas .....	9
1.2 Heterologinių genų raiškos sistemos .....	11
1.3 <i>Escherichia coli</i> raiškos sistema .....	12
1.3.1 Vektoriai T7 promotoriaus pagrindu .....	13
1.3.2 Rekombinantinių baltymų sintezės <i>E. coli</i> ląstelėse problemos ir jų sprendimo būdai.....	15
1.4 Augalų raiškos sistemos.....	17
1.4.1 Agrobakterijų vykdoma augalų transformacija .....	18
1.4.2 Augalų virusiniai vektoriai .....	21
2. METODIKA.....	23
2.1 Medžiagos ir prietaisai.....	23
2.1.1 Medžiagos ir reagentai.....	23
2.1.2 Rinkiniai .....	24
2.1.3 Naudotos genetinės medžiagos kilmė.....	24
2.1.4 Mikroorganizų kamieniai.....	24
2.1.5 Bakterijų kultivavimo terpės .....	25
2.1.6 Tirpalai .....	25
2.1.7 Plazmidės.....	26
2.1.8 Oligonukleotidai .....	26
2.1.9 Naudoti prietaisai.....	29
2.2 Darbe naudoti metodai.....	29
2.2.1 Polimerazės grandininė reakcija (PGR) .....	29
2.2.2 DNR elektroforezė agaroziniame gelyje .....	30
2.2.3 DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio.....	30
2.2.4 DNR ligavimas .....	30
2.2.5 Šaldytų kompetentinių <i>E.coli</i> bakterijų paruošimas .....	30
2.2.6 <i>E.coli</i> bakterijų transformacija .....	31
2.2.7 Plazmidinės DNR skyrimas iš bakterijų.....	31
2.2.8 DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis .....	31

2.2.9	Šaldytų kompetentinių <i>Agrobacterium tumefaciens</i> bakterijų paruošimas .....	31
2.2.10	<i>A. tumefaciens</i> transformacija .....	32
2.2.11	Agrobakterijų infiltracija į <i>Nicotiana benthamiana</i> augalų lapus .....	32
2.2.12	Visos ląstelės lizato mėginių paruošimas iš <i>N. benthamiana</i> augalų lapų baltyminei forezei .....	33
2.2.13	Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis.....	33
2.2.14	Šviežių <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Star kompetentinių ląstelių paruošimas .....	34
2.2.15	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Star ląstelių auginimas baltymų raiškai .....	34
2.2.16	Tirpios ir nuosėdų frakcijų tikrinimas baltymų elektroforezėje ultragarsu suardytuose bakterijų mėginiuose .....	35
2.3	Numatyti metodai .....	36
2.3.1	Baltymų (Western) hibridizacija .....	36
2.3.2	Augaluose susintetintų baltymų tirpumo tikrinimas.....	36
3.	REZULTATAI .....	38
3.1	Rekombinantinių augalinių alergenų sintezė <i>E. coli</i> raiškos sistemoje .....	38
3.1.1	Baltymų tirpumo tikrinimas .....	40
3.2	Rekombinantinių augalinių alergenų sintezė <i>N. benthamiana</i> raiškos sistemoje .....	42
3.2.1	Raiškos vektorių tikrinimas .....	42
3.2.2	Augalinius alergenus koduojančių sekų klonavimas.....	45
3.2.3	Rekombinantinių augalinių alergenų raiška .....	47
3.3	Numatyti eksperimentai .....	52
3.3.1	Baltymų imuninė (Western) hibridizacija .....	52
3.3.2	Baltymų tirpumo tikrinimas .....	52
4.	REZULTATŲ APTARIMAS .....	53
	IŠVADOS.....	56
	PADĖKA .....	57
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	58
	SANTRAUKA .....	65
	SUMMARY .....	66

## SANTRUMPOS

APL – antigeną pateikiančios ląstelės;

APS – amonio persulfatas;

aps. – apsisukimai;

bp – bazių pora;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

dNTP – deoksiribonukleotidtrifosfatas;

dpi – diena po infiltracijos;

DTT – DL-ditiotreitolis;

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

GFP – žaliai fluorescuojantis baltymas;

His-tag – šešių histidinių liekanų seka;

IgE – imunoglobulinas E;

IL – interleukinas;

IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas;

kb – kilobazė, tūkstantis bazių porų;

kDa – kilodaltonas, tūkstantis daltonų;

kDNR – kopijinė DNR;

kV – kilovoltas;

LB – Luria-Bertani mitybinė terpė;

mA – miliamperas;

MBP – maltozę surišantis baltymas;

NK – netirpūs kūneliai;

PGR – polimerazinė grandininė reakcija;

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

RA – rekombinantinis alergenai;

RT-PGR – atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija;

SDS – natrio dodecilsulfatas;

SDS-PAGE - natrio dodecilsulfato denatūruojanti poliakrilamidinio gelio elektroforezė;

SOB – super optimal broth mitybinė terpė;

T4SS – ketvirto tipo sekrecijos sistema;

TAE – tris, acto rūgštis, EDTA buferis;

TB – tris-borato buferis;

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

TEV – tabako etch virusas;

Th – T limfocitai pagalbininkai;

Ti – auglį inicijuojanti plazmidė (angl. *tumor induction plasmid*);

TMV – tabako mozaikos virusas;

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

U – fermento aktyvumo vienetas;

UV – ultravioletiniai spinduliai.

## IVADAS

Pastaruoju metu visame pasaulyje yra stebimas padidėjęs sergamumas alerginėmis ligomis. Pagrindiniai rizikos veiksniai, didinantys alerginių ligų paplitimą, yra įvairūs: genetinis polinkis, alergenų gausa, aplinkos tarša, sumažėjęs imuninės sistemos atsakas kritiniais individo vystymosi periodais (Gilles et al., 2018).

Alergenų gali tapti bet kuri medžiaga, gebanti sukelti organizme alerginę reakciją. Alergeno sudėtis gali būti labai skirtinga – nuo palyginti paprastų junginių iki sudėtingų daugiakomponenčių struktūrų, į kurias įeina specifiniai ir kryžminės reakcijas sukelti galintys komponentai, dėl kurių taip pat pasireiškia alergija (Bublin ir Breiteneder, 2019). Imunoterapijos tikslais ir diagnostikoje (IgE antikūnų nustatymui) paprastai naudojami alergenų ekstraktai, kurie leidžia išsiaiškinti alergijos šaltinius, tačiau nepadedą nustatyti, kuris baltymo komponentas (molekulė) sukėlė alerginę reakciją, todėl yra svarbu gauti atskirų alergenų molekules, kurias taikant tyrimuose galima pasiekti didesnę diagnostikos testų ir alergijų gydymo specifiškumą ir efektyvumą (Matricardi et al., 2019).

Atliekant biomedicininis tyrimus ar biotechnologijos pramonėje norint panaudoti įvairius baltymus yra reikalingi dideli kokybiškai išgryninti jų kiekiai, tačiau tik nedaugelis baltymų natūraliuose šeiminiukuose yra sintetinami pakankamai gausiai. Atsiradus ir vystantis rekombinantinės DNR technologijoms buvo pradėtos kurti heterologinių genų raiškos įvairiuose organizmuose (mielėse, augaluose, vabzdžių ir žinduolių ląstelių kultūrose, bakterijose ir t.t.) sistemos, leidžiančios gauti efektyvią tam tikro baltymo sintezę. Priklausomai nuo baltymo prigimties, dydžio, potransliacinių modifikacijų ir nuo to, kokiam tikslui jis bus naudojamas, priklauso, kurią sistemą pasirinkti jo sintezei, norint gauti reikiamą rezultatą kartais tenka išbandyti ir kelias iš jų (Clark ir Pazdernik, 2016).

Šiame darbe buvo siekiama susintetinti paprastojo kiečio (lot. *Artemisia vulgaris*) Art v 1 ir Art v 5, karpotojo beržo (lot. *Betula pendula*) Bet v 1 ir kietinės ambrozijos (lot. *Ambrosia artemisiifolia*) Amb a 3 rekombinantinius baltymus bakterijų raiškos sistemoje. Augalų laikinos raiškos sistemoje buvo bandoma susintetinti paprastojo kiečio Art v 6, juodalksnio (lot. *Alnus glutinosa*) Aln g 4, kietinės ambrozijos Amb a 4, europinio alyvmedžio (lot. *Olea europaea*) Ole e 7, Ole e 9 ir Ole e 10, paprastosios kriaušės (lot. *Pyrus communis*) Pyr c 1 ir Pyr c 3, pašarinio motiejuko (lot. *Phleum pratense*) Phl p 13 bei persiko (lot. *Prunus persica*) Pru p 3 rekombinantinius baltymus.

**Darbo tikslas** – atlikti pasirinktų rekombinantinių augalinių alergenų sintezę *Escherichia coli* raiškos ir *Nicotiana benthamiana* laikinos raiškos sistemose.

**Uždaviniai:**

1. Sukonstruoti bakterinius alergenų raiškos vektorius;
2. Vykdyti rekombinantinių alergenų sintezę bakterijų raiškos sistemoje;
3. Išskirti pasirinktus alergenus koduojančias sekas iš augalų audinių;
4. Sukonstruoti vektorius alergenų laikinai raiškai augaluose;
5. Vykdyti ir tirti rekombinantinių alergenų raišką *N. benthamiana* augaluose.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

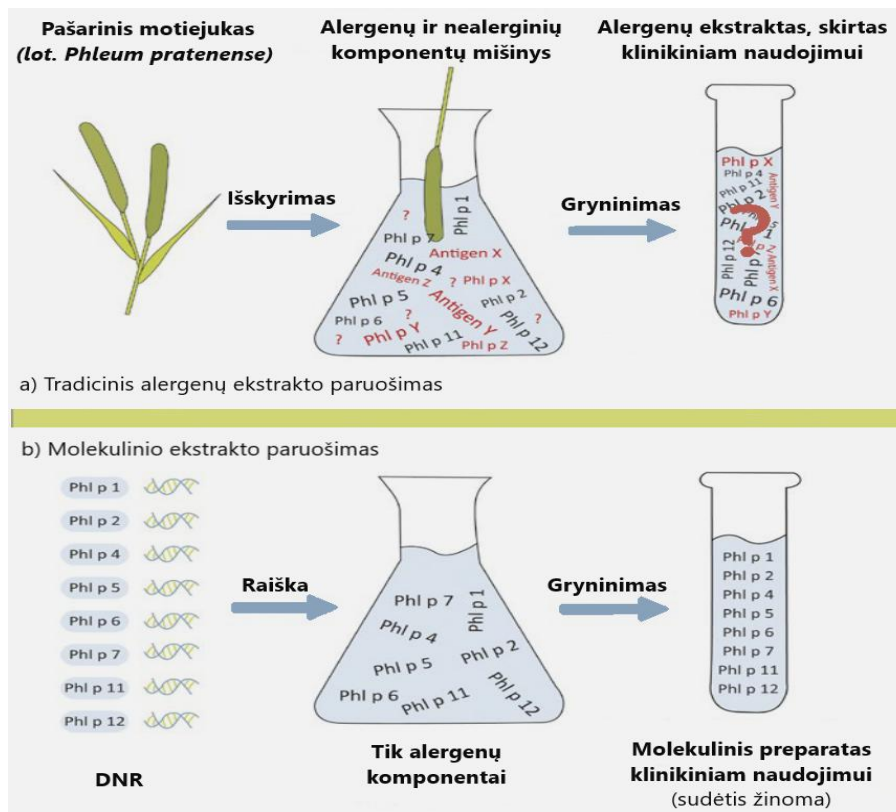
### 1.1 Alergija ir jos diagnostika

Labiausiai paplitęs imuninės sistemos sutrikimas – su imunoglobulinu E (IgE) susijusi alergija, kuria serga 30% viso pasaulio gyventojų. Ji sukelia kvėpavimo, širdies ir kraujagyslių, virškinimo organų sistemų uždegimus bei gali būti pavojinga gyvybei (Valenta et al., 2018). Alergiją sukelia įvairios medžiagos, kurios yra vadinamos alergenais, jais gali būti įvairios medžiagos, esančios žmogaus aplinkoje. Daugelis alergenų yra baltymai, dažnai su šoninėmis angliavandenių grandinėmis. Baltymo gebėjimas sukelti alergines reakcijas priklauso nuo epitopų skaičiaus (alergeno dalių, sąveikaujančių su specifiniais antikūnais ar T limfocitais) (Kavaliūnas et al., 2010).

Augalinės kilmės alergenai yra labiausiai paplitę ir gali sukelti įvairius simptomus – nuo odos bėrimų, alerginio rinito iki anafilaksinio šoko. Beržų žiedadulkės yra vienos iš dažniausiai alergiją sukeliančių alergenų (Kitzmuller et al., 2015). Daugybė mokslinių ir klinikinių studijų atskleidžia tiesioginį ryšį tarp įsijautrinimo beržams ir vaisiams, daržovėms, uogoms, riešutams. Žinoma, kad pagrindinis alergijos beržams sukėlėjas yra ne visa žiedadulkė, o joje esantis baltymas – Bet v 1. Tiek obuoliai, tiek ir kriaušės, morkos, salierai, riešutai, soja ir kai kurie kiti augalinės kilmės produktai turi baltymus, kurie savo sandara yra labai panašūs į beržo žiedadulkių Bet v 1 baltymą. Jų panašumas siekia net 88% , todėl net 70% pacientų, alergiškų beržų žiedadulkėms, kenčia nuo su tuo susijusios alergijos vaisiams, daržovėms ir riešutams. Šis įsijautrinimas yra vadinamas kryžminėmis reakcijomis (Vieths et al., 2002). Tai reiškia, kad pagrindinis alergijos sukėlėjas yra beržo žiedadulkių alergeno molekulė Bet v 1, o to pasekoje žmogus jaučia alergijos simptomus valgydamas vaisius, daržoves, uogas ir riešutus.

Daugiau nei 90 metų diagnostikai ir gydymui naudojami alergenų ekstraktai gaminami iš natūralių pirminių alergenų šaltinių. Tačiau tokie ekstraktai gali turėti įvairių molekulių patekusių iš kito alergenų šaltinio, taip pat dėl minėto dažno alerginių baltymų panašumo pasitaiko kryžminės reakcijos. Dėl šių priežasčių yra sudėtinga identifikuoti atskiras alergiją sukeliančias molekules. Daugelį problemų susijusių su natūraliais alergenų ekstraktais galima išspręsti naudojant genų inžineriniu būdu gautus rekombinantinius alergenų (RA) (1.1 pav) (Matricardi et al., 2019).



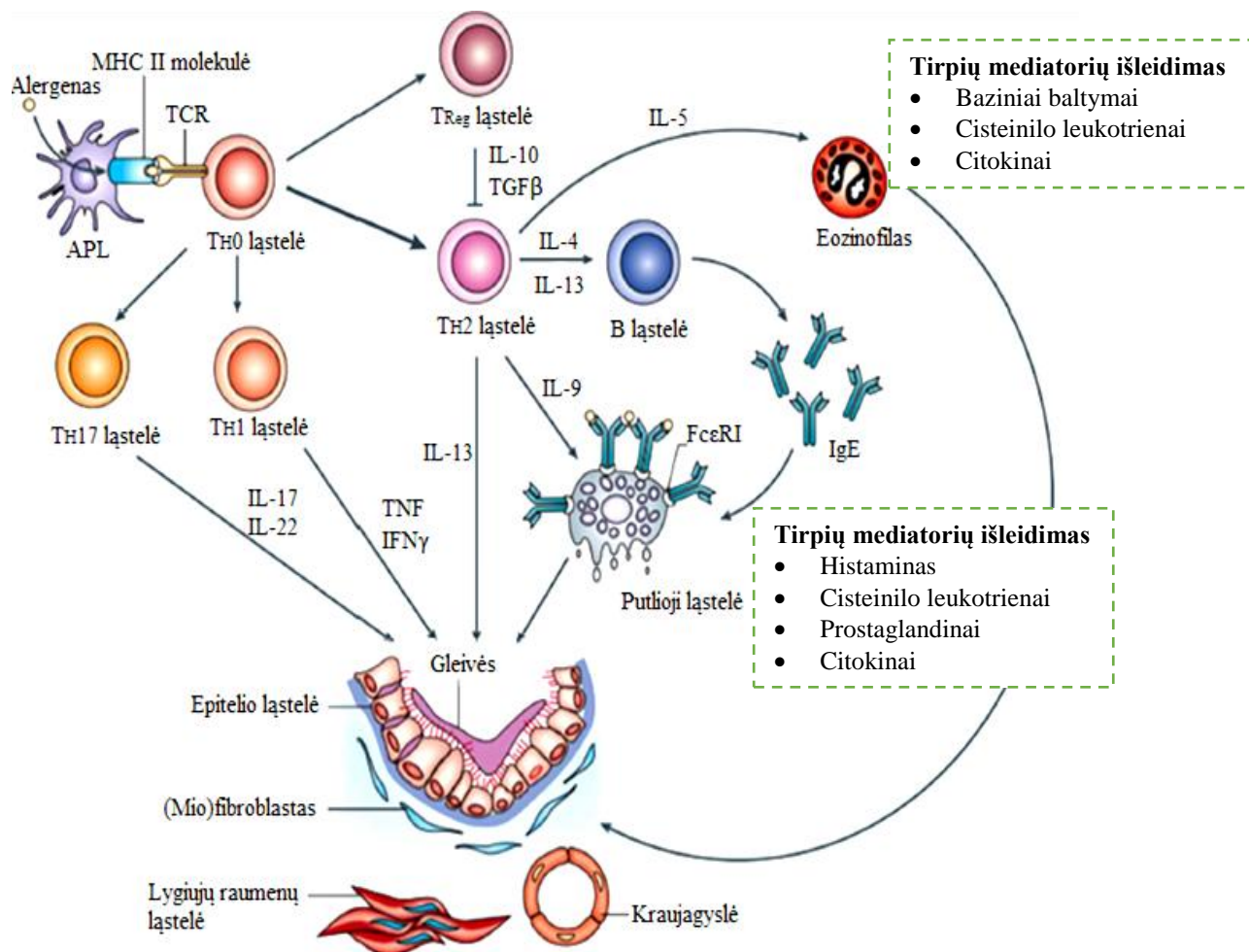


**1.1 pav.** Įprastiniai alergenu ekstraktai ir molekuliniai ekstraktai skirti alergijos diagnostikai ir terapijai. **a)** galutinis produktas yra alergeno komponentų ir daugybės kitų komponentų, neturinčių diagnostinės vertės, mišinys. Ekstrakto sudėtis yra bandoma nustatyti tik gavus galutinį reagentą, tačiau dažniausiai tiksli kokybinė ir kiekybinė sudėtis būna apibrėžta netiksliai. **b)** molekuliniai ekstraktai – iš anksto nustatyti, identifikuoti ir klonuoti alergenu molekulių, mišiniai (Matricardi et al., 2019).

### 1.1.1 Alerginių reakcijų veikimo mechanizmas

Alergijos biocheminis mechanizmas yra gana sudėtingas ir kol kas nėra iki galo supastas. Be to, alergijų patofiziologija priklauso nuo daugelio veiksnių (Akdis et al., 2014). Bendras alerginio imuninio atsako mechanizmas pavaizduotas 1.2 paveiksle (Holgate ir Polosa, 2008; Frossard, 2020).

Imuninės sistemos jautrumas specifiniam antigenui atsiranda tada, kai alergeno molekulė yra įsisavinama antigeną pateikiančių ląstelių (APL). Įvairių rūšių ląstelės gali veikti kaip APL, tačiau dažniausiai jos yra dendritinės ląstelės, esančios odoje, kvėpavimo sistemoje ir virškinamajame trakte. APL savo paviršiuje pristato antigeną naudodamosis II klasės audinių suderinamumo komplekso molekulėmis (MHCII). Kai naiviosios pagalbinės T ląstelės (Th0, CD4+) atpažįsta antigenus, susijungusius su MHC II molekulėmis, jos pavirsta interleukinus (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) gaminančiomis ląstelėmis – Th2 (Janeway et al., 2001; Oettgen ir Broide, 2012).



**1.2 pav.** Alergijos veikimo mechanizmas. Antigeną pateikiančios ląstelės (APL) pristato alergeną naiviosioms pagalbinėms T ląstelėms (Th0). Kai Th0 ląstelės atpažįsta antigeną, Th2 ląstelės gamina citokinus, kurie indukuoja specifinių antikūnų, imunoglobulinų E (IgE), gamybą. Putliosios ląstelės ir bazofilai savo paviršiuje suriša antigenui specifinius IgE per jų FcεRI – sritis. Alergenui patekus į šeimininko organizmą antrą kartą, jis jungiasi prie specifinių IgE, esančių ant putliųjų ląstelių, aktyvintos ląstelės išlaisvina granulėse sukauptus uždegimo tarpininkus – mediatorius, kurie lemia kraujagyslių pralaidumo padidėjimą, gleivių susidarymą, lygiųjų raumenų susitraukimą ir edemos formavimąsi. Th0 ląstelių kontaktas su APL taip pat gali lemti jų brendimą iki Th1 arba Th17, o reguliatorinės T ląstelės (Treg) veikia alergijos mechanizmą, nes sumažina Th ląstelių proliferaciją ir slopina Th1 citokinų gamybą, atpalaiduodamos IL-10 ir transformuojantį augimo faktorių β (TGF-β) (Holgate ir Polosa, 2008; Mikael et al., 2020).

IL-4 yra atsakingas už B limfocitų klasių pakeitimą, dėl kurio pradedami sintetinti ir yra išlaisvinami alergenui specifiniai IgE. Kiti interleukinai (IL-4, IL-9 ir IL-13) taip pat atsakingi už putliųjų ląstelių telkimą ir proliferaciją, bazofilų (IL-3 ir IL-4) brendimą ir eozinofilų brendimą kaulų čiulpuose (IL-3 ir IL-5) (Holgate ir Polosa, 2008). Putliosios ląstelės ir bazofilai savo paviršiuje suriša antigenui specifinius IgE per jų FcεRI sritis (Gould ir Sutton, 2008).














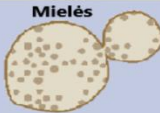
















Alergenui patekus į šeimininko organizmą antrą kartą, jis jungiasi prie specifinių IgE, esančių ant putliųjų ląstelių, aktyvintos ląstelės greitai išlaisvina granulėse sukauptus

uždegimo tarpininkus – mediatorius. Išlaisvintos cheminės medžiagos yra histaminas, prostaglandinai ir proteazės, atsakingos už ankstyvuosius alergijos simptomus. Putliosios ląstelės taip pat išskiria citokinus ir chemokinus, dėl to eozinofilai ir bazofilai yra suaktyvinami, tada susidaro histaminas, proteoglikanas 2 (pagrindinis bazinis baltymas), heparinas ir citokinai (Holgate ir Polosa, 2008; Paul, 2013). Tokių cheminių mediatorių, proteazių ir citotoksinių cheminių medžiagų poveikis yra įvairus ir priklauso nuo vietos, kurioje atsiranda alerginė reakcija. Tai apima kraujagyslių išsiplėtimą, kraujagyslių pralaidumo padidėjimą, gleivių susidarymą, lygiųjų raumenų susitraukimą ir edemos formavimąsi (Janeway et al., 2001).

Th0 ląstelių kontaktas su APL taip pat gali lemti jų brendimą iki Th1 arba Th17 ląstelių ir vienas po kito einančius Th1/Th17 atsakus, turinčius priešūždegiminį poveikį. Toks atsakas nėra laikomas alergine reakcija, nes jo metu neišskiriami IgE. Regulatorinės T ląstelės (Treg) veikia alergijos mechanizmą, nes sumažina Th ląstelių proliferaciją ir slopina Th1 citokinių gamybą, atpalaiduodamos IL-10 ir transformuojantį augimo faktorių  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Braga et al., 2011; Zhang et al., 2014).

## 1.2 Heterologinių genų raiškos sistemos

Vykdamas biomedicininis tyrimus ar norint panaudoti biotechnologijos pramonėje įvairius baltymus yra labai svarbu išsiaiškinti jų biochemines savybes, struktūrą ir gebėti gauti kuo didesnę kiekį tirpaus bei funkciškai aktyvaus produkto. Deja, tik nedaugelis baltymų natūraliuose šeiminiukuose yra sintetiniai pakankamai gausiai, todėl vis ieškoma naujų būdų, leidžiančių gauti efektyvią rekombinantinių baltymų sintezę ir išgryninti didelius tikslinio baltymo kiekius. Šiuo metu galima išskirti dažniausiai naudojamą heterologinių genų raiškos sistemas: bakterijas, mielės, vabzdžių ir žinduolių ląstelių kultūras, transgeniniai gyvūnai, augalai. Kiekviena šių sistemų turi savo privalumų ir trūkumų (1.3 pav.) (Clark ir Pazdernik, 2016). Svarbiausi kriterijai, kuriuos turėtų atitikti gera raiškos sistema yra šie: lengvai prižiūrima ir kontroliuojama, sintetinti taisyklingos konformacijos tikslinį baltymą, saugi, nebrangi, produktyvi.

	Blogiausias			Geriausias		
Produkcijos trukmė	 Transgeniniai gyvūnai	 Augalai	 Žinduolių ląstelės	 Vabzdžiai	 Mielės	 Bakterijos
Kaina	 Transgeniniai gyvūnai	 Žinduolių ląstelės	 Augalai	 Vabzdžiai	 Mielės	 Bakterijos
Glikozilinimas	 Bakterijos	 Mielės	 Augalai	 Vabzdžiai	 Transgeniniai gyvūnai	 Žinduolių ląstelės
Baltymų sulankstymas	 Bakterijos	 Mielės	 Augalai	 Vabzdžiai	 Transgeniniai gyvūnai	 Žinduolių ląstelės
Institucijų kontrolė	 Transgeniniai gyvūnai	 Augalai	 Vabzdžiai	 Mielės	 Bakterijos	 Žinduolių ląstelės

**1.3 pav.** Raiškos sistemų, naudojamų žmogaus rekombinantinių baltymų sintezei, palyginimas. Atsižvelgiant į tokius kriterijus kaip produkcijos trukmė, kaina, glikozilinimas, baltymų lankstymas ar skirtingų institucijų kontrolė, baltymų raiškos sistemas galima išskirstyti nuo blogiausios iki geriausios. Bakterijų ląstelės yra pats pigiausias ir greičiausias metodas rekombinantinių baltymų raiškai, tačiau jos negali tinkamai atlikti baltymų glikozilinimo ir dažnai eukariotinių baltymų teisingo sulankstymo. Baltymų produkcija augaluose trunka gana ilgai, tačiau augalų laikinos raiškos atveju procesas gali būti greitesnis, pigesnis ir saugesnis. Žinduolių ląstelės gali geriausiai atlikti žmogaus baltymų potransliacines modifikacijas, tačiau jos yra gana brangi raiškos sistema. Todėl rekombinantinių baltymų raiškos sistemos pasirinkimas priklauso nuo baltymo prigimties ir jo savybių (Clark ir Pazdernik, 2016).

Atsižvelgiant į baltymo prigimtį, dydį, potransliacines modifikacijas ir tikslą, kuriam jis bus naudojamas, parenkama sistema jo sintezei. Norint gauti reikiamą rezultatą kartais tenka išbandyti ir kelias iš jų (Neubauer et al., 2006).

### 1.3 *Escherichia coli* raiškos sistema

*E. coli* kultūros heterologinių baltymų sintezei yra naudojamos plačiausiai dėl šių privalumų: nesudėtingas kultivavimas, greitas ląstelių augimas, nebrangios auginimo terpės. *E. coli* yra plačiai naudojama, todėl per ilgą laiką buvo gerai išaiškinti įvairūs heterologinių baltymų sintezės šiose bakterijose aspektai. Be daugelio privalumų šis mikroorganizmas turi ir trūkumų, kadangi susintetinti baltymai gali būti greitai degraduojami, netirpūs arba

neaktyvūs. Dažniausiai problemos kyla, jei baltymas yra labai didelis (>500 aminorūgščių) arba labai mažas (<80 aminorūgščių), jei jis yra didelis ir sekretuojamas, jei turi daug cisteinų (*E. coli* citoplazmos redukuojančioje aplinkoje nesiformuoja disulfitinės jungtys ir tokie baltymai negali tinkamai susivynioti) arba, jei tai eukariotinis baltymas, kuriam būtinos tokios potransliacinės modifikacijos kaip glikozilinimas ar adenilininimas, nes šios modifikacijos *E. coli* ląstelėse paprasčiausiai nėra vykdomos (Neubauer et al., 2006; Rosano et al., 2019). Heterologinių genų raiškos efektyvumas priklauso nuo daugelio veiksnių, kuriuos pagal kilmę galima sugrupuoti į:

- ◇ susijusius su genų raiškos vektoriaus savybėmis;
- ◇ susijusius su geno ar baltymo prigimtinėmis savybėmis;
- ◇ susijusius su naudojamu *E. coli* kamieno ypatumais;
- ◇ susijusius su naudojamomis kultūrų auginimo ir baltymų sintezės sąlygomis.

Siekiant parinkti optimalias heterologinių genų raiškos sąlygas yra vis dar kuriama daugybė genų raiškai *E. coli* ląstelėse skirtų vektorių, siūlomi įvairūs mutantiniai kamieniai. Tai rodo, kad ir šiandien dar nėra universalios genų raiškos *E. coli* ląstelėse sistemos, kuri būtų tinkama visiems arba bent jau daugumai heterologinių baltymų. Nepaisant didelės genų raiškos vektorių įvairovės didžiąją jų dalį sudaro vektoriai, kuriuose naudojami tik kelių genetinių sistemų elementai. Tai elementai, paimti iš lac operono, iš araBAD operono, iš atsparumo tetraciklinui raiškos reguliacijos sistemos bei iš dviejų fagų –  $\lambda$  ir T7, o vieni dažniausiai naudojamų vektorių yra pET serijos plazmidės (Clark ir Pazdernik, 2016).

### 1.3.1 Vektoriai T7 promotoriaus pagrindu

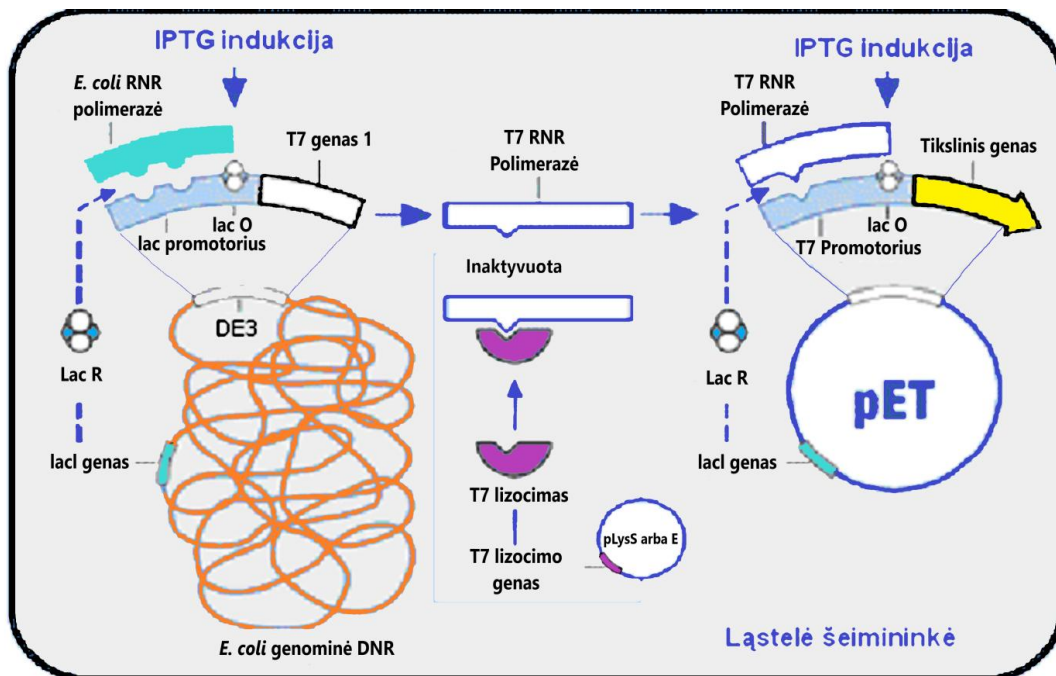
Daugiakopijiniai genų raiškos vektoriai, tokie kaip pET serijos plazmidės, kuriuose panaudotas iš bakteriofago T7 paimtas promotorius ir už jo įterptas LacR operatorius lacO (šis promotoriaus ir operatoriaus junginys vadinamas T7lac), yra šiuo metu plačiausiai naudojami heterologinių genų raiškai *E. coli* ląstelėse (Rosano et al., 2019; Hausjell et al., 2020).

*E. coli* RNR polimerazė negali atpažinti T7 promotorinės sekos, todėl ląstelėse turi būti sintetinama T7 promotorių atpažįstanti T7 RNR polimerazė ir inaktyvuotas LacR, kad T7lac būtų atpažintas ir nuo jo prasidėtų tikslinio geno transkripcija. Ši T7lac hibridinė sistema yra labai produktyvi (tikslinio baltymo išeigos gali pasiekti net 50% nuo visų ląstelės baltymų) ir tinka ypač didelių baltymo kiekių sintezei, tačiau dažnai dėl efektyvios baltymo sintezės susiformuoja netirpūs kūneliai (Neubauer et al., 2006).

### 1.3.1.1 Reguliacija

Kamienuose be T7 RNR polimerazės geno transkripcija nuo T7lac promotoriaus praktiškai nevyksta, todėl norint išvengti bazinės genų raiškos neigiamos įtakos patariama rekombinantines plazmides konstruoti kamiene be šios polimerazės. Šioje sistemoje genų raiška gali būti gaunama dviem būdais:

1. įvedant plazmidę į specialų kamieną, kuriame T7 RNR polimerazės genas profago DE3 sudėtyje yra įterptas į chromosomą ir nurašomas nuo Plac arba PlacUV5 promotorių (šiuo atveju baltymų sintezė indukuojama pridodant IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas – sintetinis laktozės analogas);
2. užkrečiant ląsteles bakteriofagu λCE6, kuriame yra nuo λ PL promotoriaus nurašomas T7 RNR polimerazės genas (Neubauer et al., 2006; Rosano et al., 2019).



**1.4 pav.** Genų raiškos reguliavimo strategija naudojant pET – raiškos sistemą. Raiškos vektoriuje pET esantis tikslinis genas yra kontroliuojamas T7 RNR polimerazės promotoriaus. Vektorius transformuojamas į *E. coli* kamieną, kurio genome yra integruota T7 RNR polimerazės geno kopija (T7 genas 1), kontroliuojama lac promotoriaus. Tikslinio geno ir T7 geno 1 promotoriai taip pat turi lacO operatoriaus seką, todėl juos slopina lac represorius (lacR). Indukcija su IPTG leidžia transkribuoti T7 RNR polimerazės geną (T7 genas 1), gauta T7 RNR polimerazė vėliau suaktyvina tikslinio geno raišką. Papildoma plazmidė (pLysS arba pLysE) *E. coli* ląstelėje koduoja T7 lizocimą, kuris inaktyvuoja bet kokią T7 RNR polimerazę, susintetintą neindukuojančiose sąlygose (Clark ir Pazdernik, 2016).

Raiškos vektoriaus ir kamieno koduojamas LacR represorius, rišdamasis su operatorine seka greta PlacUV5, blokuoja T7 RNR (T7 genas 1) polimerazės geno transkripciją, o tuo pačiu, susirišdamas su šalia PT7lac esančia operatorine seka, blokuoja ir

T7 RNR polimerazės sąveiką su vektoriuje esančiu T7 promotoriumi. Pridėjus į terpę IPTG, jis jungiasi prie LacR represoriaus ir jį inaktyvuoja, tada *E. coli* RNR polimerazė gali pradėti T7 geno 1 transkripciją nuo atlaisvinto PlacUV5, o susintetinta T7 RNR polimerazė pradeda tikslinio geno transkripciją nuo atlaisvinto PT7lac esančio vektoriuje.

Siekiant griežčiau kontroliuoti transkripcijos reguliavimą, galima į kamieną įvesti pagalbines plazmides pLysS arba pLysE su genu, kuris koduoja T7 lizocimą (1.4 pav.). Lizocimas rišdamasis su T7 RNR polimeraze ją inaktyvuoja, tokiu būdu išjungdamas pavienes T7 RNR polimerazės molekules, kurios buvo susintetintos neindukuojančiose sąlygose dėl bazinio PlacUV5 aktyvumo. Su IPTG aktyvavus T7 RNR polimerazės sintezę lizocimas gali surišti tik mažą dalį susintetintų T7 RNR molekulių ir žymesnės įtakos genų raiškos efektyvumui nuo PT7lac neturi.

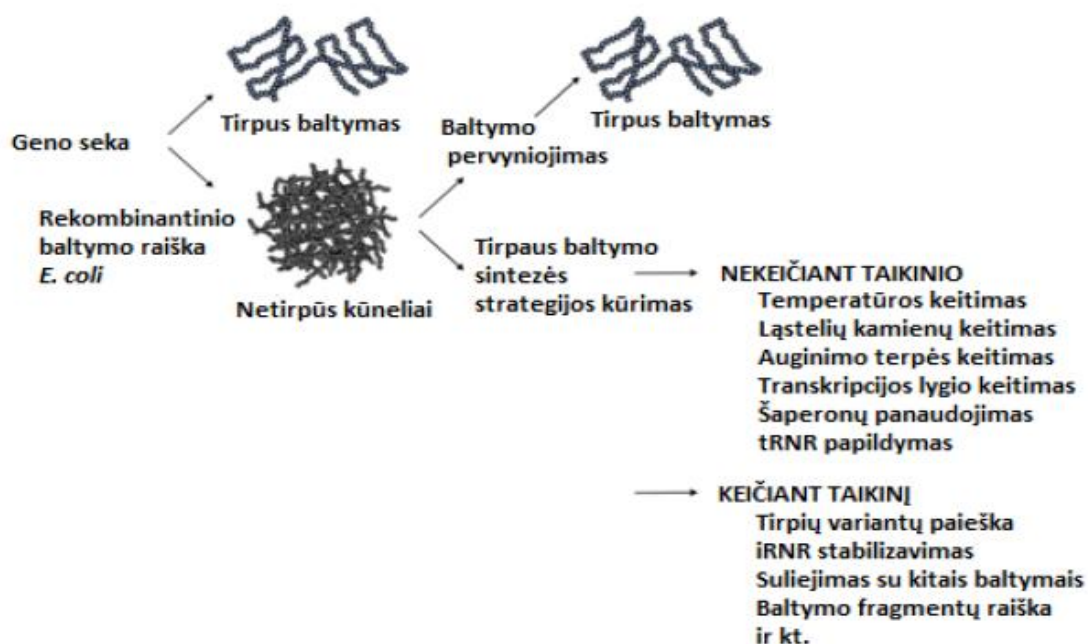
Genų raiškai naudojant pET vektorius su PT7lac promotoriumi tinka tik tie kamieniai, kuriuose į chromosomą yra įterptas T7 RNR polimerazės genas. Šiuo metu tam naudojami trys kamieniai, iš jų vienas sukonstruotas *E. coli* K-12 pagrindu (HMS174(DE3)), o kiti du – *E. coli* B pagrindu: ER2256 ir BL21(DE3) (Neubauer et al., 2006; Rosano et al., 2019; Hausjell et al., 2020).

### **1.3.2 Rekombinantinių baltymų sintezės *E. coli* ląstelėse problemos ir jų sprendimo būdai**

#### **1.3.2.1 Neteisingas baltymų vyniojimas/agregacija**

*E. coli* ląstelėse rekombinantinių baltymų sintezės metu dažnai susiduriama su baltymų agregacijos ar neteisingo baltymų susivyniojimo problema. Kai baltymo sintezės lygis aukštas ir baltymų koncentracija citoplazmoje pasiekia 200 – 300 mg/ml, sukuriama nepalanki aplinka taisyklingam baltymų susivyniojimui ir dalinai susivynioję baltymai ima jungtis į amorfinės baltymų granules, vadinamas netirpiaisiais kūneliais (NK) (Neubauer et al., 2006).

Yra keletas skirtingų būdų, leidžiančių išvengti netaisyklingo baltymų susivyniojimo ir jų agregacijos. Vienas iš jų paremtas tinkamų auginimo ir baltymų sintezės sąlygų parinkimu, dažniausiai – baltymų sintezės lygio sumažinimas pažeminant auginimo temperatūrą, pridėdant mažiau induktoriaus, keičiant transkripcijos lygį ar auginimo terpę. Kita strategija paremta šaperonų – specialių ląstelės baltymų, kurie aktyviai dalyvauja baltymų susivyniojimo procese, panaudojimu. Naudojant šias strategijas, baltymas-taikinys nėra keičiamas (Hartley, 2006). Dar vienai grupei priklauso metodai, kurių metu atliekamos tikslinio baltymo-taikinio modifikacijos (1.5 pav.).



**1.5 pav.** Tirpių baltymų gavimo strategijos *E. coli* (Sorensen ir Mortensen, 2005).

### 1.3.2.2 Ląstelių auginimas žemoje temperatūroje

*E. coli* ląstelių auginimas žemoje temperatūroje pagerina baltymų, linkusių agreguoti, tirpumą ir stabilumą. Yra žinoma, kad sumažinus ląstelių auginimo temperatūrą nuo 37°C – 25°C iki 15°C ar net 4°C gaunamas didesnis aktyvaus baltymo kiekis. Šis efektas stebimas dėl sumažėjusios ląstelinio baltymų koncentracijos, lemiančios palankesnes sąlygas taisyklingam baltymų klostymuisi. Sumažinus auginimo temperatūrą taip pat dalinai sumažinamas šiluminio šoko proteazių, kurių sintezė suaktyvėja padidintos baltymų raiškos metu, kiekis. Todėl, auginant ląsteles 15 – 23°C, galima sumažinti tikslinio baltymo degradaciją (Rosano ir Ceccarelli, 2014).

### 1.3.2.3 Rekombinantinio baltymo suliejimas su pagalbinais baltymais

Tai viena iš baltymų tirpinimo *in vivo* strategijų, keičiančių baltymą-taikinį. Sulietus baltymus dažniausiai sudaro suliejimo partneris, arba inkaras, ir specifinės proteazės atpažinimo seka sujungta su tiksliu baltymu. Prie rekombinantinio baltymo prilietas pagalbinis baltymas gali apsaugoti tikslinį baltymą nuo proteolizės ar padidinti tirpumą. Baltymų-partnerių pavyzdžiai: MBP (angl. *maltose binding protein*), NusA (angl. *N-utilizing substance A*), tioredoksinas, baltymų disulfido izomerazė (angl. *protein disulfide isomerase*, *PDI*), DsbA, DsbB (Rosano ir Ceccarelli, 2014).

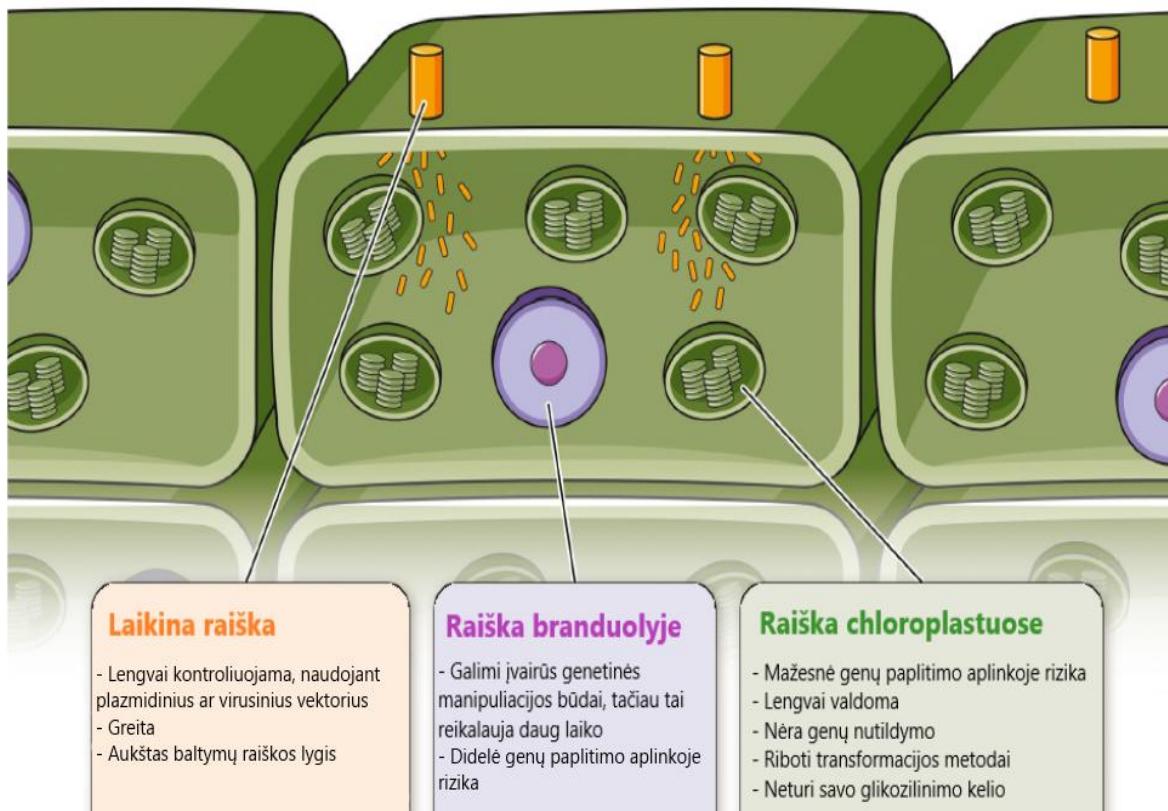


#### 1.3.2.4 Rekombinantinių baltymų toksiškumas

Dažniausiai toksinis heterologinių genų raiškos poveikis pasireiškia dėl metabolinės perkrovos, kai ląstelė sunaudoja pernelyg didelę dalį savo medžiagų ir energijos išteklių rekombinantinio baltymo sintezei. Ląstelės atsakas į energijos trūkumą yra sudėtingas ir įvairialypis, jo metu aktyvuojami alternatyvūs energijos gavimo keliai ir pakinta energiją generuojančių fermentų lygis. Kai heterologinio baltymo sintezės lygis būna aukštas, ląstelėje ima trūkti aminorūgščių, tada pastebimai sumažėja daugumos genų, dalyvaujančių transkripcijoje, translacijoje ir aminorūgščių biosintezėje, raiška. Toks platus genų raiškos perprogramavimas vadinamas privalomuoju arba būtinuoju (angl. *stringent*) atsaku. Todėl, vykdant heterologinių genų raišką, dažnai stebimas ląstelių augimo greičio kritimas, plazmidės kopijų skaičiaus sumažėjimas ir mažesnės biomasės išėigos. Kai kurių būtinųjų aminorūgščių pridėjimas į augimo terpę gali padėti sušvelninti šį atsaką. Kitas ląstelių atsakas į stresą gali būti proteolitinių fermentų sintezės padidėjimas ir rekombinantinio baltymo proteolizės suaktyvėjimas. Apsisaugoti nuo tokio atsako gali padėti kamienai su mutacijomis kai kurių proteazių ar šiluminio šoko baltymų genuose ir papildoma kai kurių šaperonų genų raiška. Rekombinantinių baltymų toksiškas poveikis (jį sukeliama stresas) kartais gali būti sumažintas, leidžiant ląstelėms laipsniškai prisitaikyti prie kintančių sąlygų ir atsirandančių dirgiklių. Tai galima pasiekti laipsniškai didinant induktoriaus kiekį ar keliant plazmidės kopijų skaičių kultūros auginimo metu (Hartley, 2006; Rosano ir Ceccarelli, 2014).

#### 1.4 Augalų raiškos sistemos

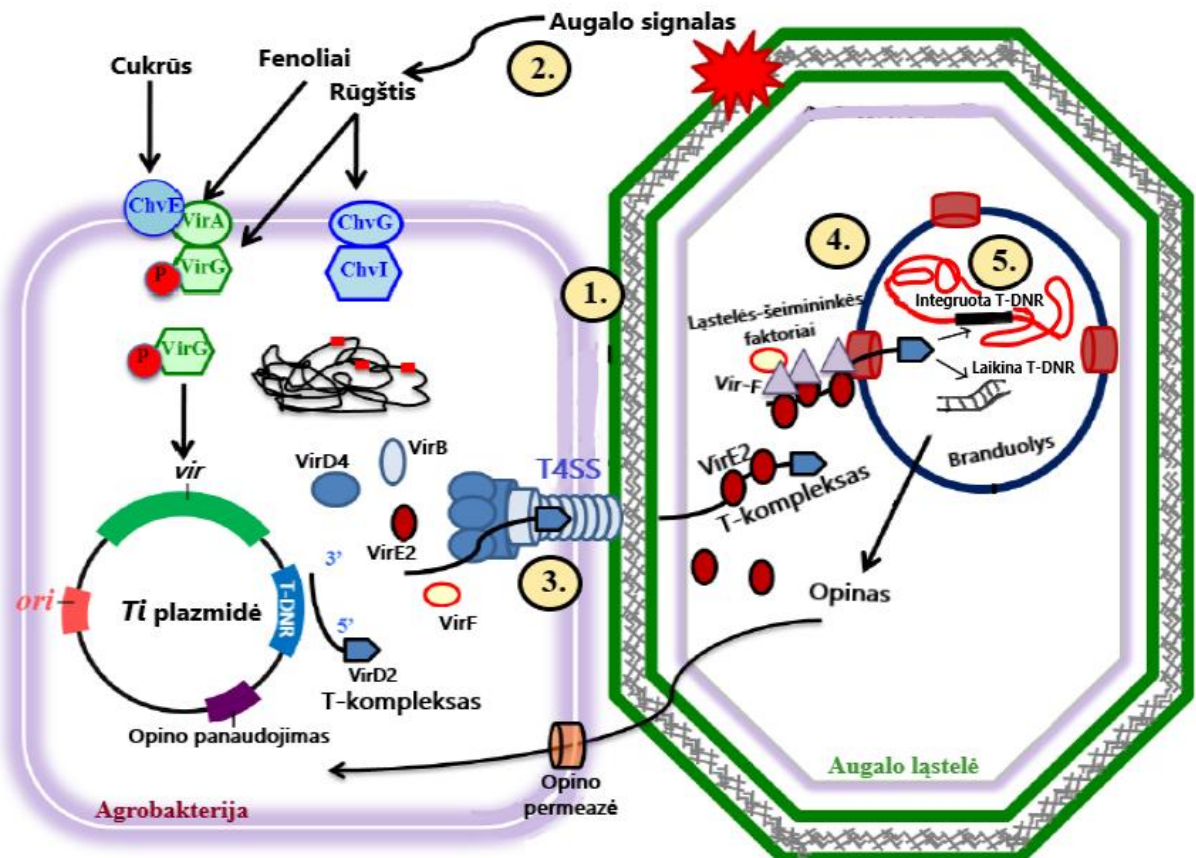
Augalų, kaip raiškos sistemų, naudojimas vis didėja dėl paprastų auginimo sąlygų, jie yra daug pigesnė ir produktyvesnė heterologinių genų raiškos sistema lyginant su žinduolių ar vabzdžių ląstelių kultūromis. Svarbu ir tai, kad didelė dalis alergenų yra kilusi iš augalinių šaltinių (tai žiedadulkės, maistui naudojami augalai ir jų vaisiai bei sėklos), todėl akivaizdu, kad iš augalų išskirti rekombinantiniai alergenai yra struktūriškai ir funkciškai artimiausi natyviems augalinių alergenų šaltiniams, o jų kokybė yra tinkama naudoti juos individualizuotam alergijų gydymui. Dažniausiai yra naudojamos įvairios *Nicotiana* genties rūšys, bet taip pat gali būti naudojamos bulvės, pomidorai ar kiti augalai (Desai et al., 2010). Heterologinių baltymų raiška augaluose gali būti vykdoma skirtingais būdais, paprastai išskiriama: laikina raiška, transgeninių augalų raiška chloroplastuose arba branduolyje (pav. 1.6) (Burnett M. ir Burnett A., 2019).



**1.6 pav.** Supaprastinta augalų ląstelių diagrama, rodanti laikinos raiškos (geltona), raiškos branduolyje (violetinė) ir chloroplastuose (žalia) pagrindines ypatybes (Burnett M. ir Burnett A., 2019).

#### 1.4.1 Agrobacterijų vykdoma augalų transformacija

Laikinos genų raiškos augaluose metu per gana trumpą laiką susintetinamas didelis rekombinantinių baltymų kiekis. Agrobacterijų vykdoma augalų transformacija šiuo metu yra vienas iš daugiausiai taikomų ir paplitusių svetimės genetinės medžiagos perdavimo į augalų ląsteles būdų. Šios dirvožemio fitopatogeninės gramneigiamos bakterijos yra natūralūs genų inžinerijos įrankiai, kurių vidinę DNR transportavimo sistemą tyrėjai naudoja jau daugiau nei kelis dešimtmečius. Po sąveikos su augalo ląstele ir prisitvirtinimo prie jos paviršiaus, *Agrobacterium* gali perkelti dalį (T-DNR) savo didžiosios plazmidės į augalo ląstelę ir integruoti į augalo chromosomą. Gamtoje šis procesas skatina augalų auglių formavimąsi. Paveikslėlyje 1.7 vaizduojami *Agrobacterium* vykdomos genetinės transformacijos augaluose etapai (Hwang et al., 2017).



**1.7 pav.** Pagrindiniai *Agrobacterium tumefaciens* vykdomos augalų transformacijos proceso etapai. (1) *A. tumefaciens* prisitvirtina prie augalų ląstelių. (2) *Agrobacterium* vir-sritį indukuoja specifinės augalų signalinės molekulės. (3) T-DNR sintezė, T-DNR-VirD2 komplekso susidarymas ir jo pernešimas su kitais Vir baltymais į augalų ląstelių citoplazmą. (4) T-komplekso pernešimas į branduolį. (5) T-DNR integracija ir raiška augalų genome (konstitutyvi raiška), esant laikinai raiškai viengrandės T-DNR pavertimas į dvigrandę DNR formą. Opinai agrobakterijoms tarnauja kaip azoto ir anglies šaltinis. Patys augalai opinų nenaudoja (Hwang et al., 2017).

*A. tumefaciens* vykdomai augalų genetinei transformacijai yra reikalingi du genetiniai komponentai, esantys bakterinėje dvigrandėje žiedinėje Ti-plazmidėje. Pirmasis esminis komponentas yra T-DNR, o antrasis yra virulentiškumo (*vir*) sritis, susidedanti iš mažiausiai septynių pagrindinių lokusų (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* ir *virG*), koduojančių bakterinius baltymus, tarpininkaujančius T-DNR apdorojime ir perdavime. *VirA* ir *VirG* baltymai yra dvikomponenčiai reguliatoriai, kurie aktyvuoja kitų *vir* genų raišką Ti-plazmidėje. *VirB*, *VirC*, *VirD*, *VirE* ir galimai *VirF* dalyvauja apdorojant, perduodant ir integruojant T-DNR iš *A. tumefaciens* į augalo ląstelę.

Buvo nustatyti keli chromosomos virulentiškumo (*chv*) genai – *chvA*, *chvB* ir *pscA*, reikalingi prisijungimo procesams. *chvA*, *chvB* ir *pscA* dalyvauja ciklinio  $\beta$ -1,2-gliukano ir kitų cukrų sintezėje, perdirbime ir eksporte. Prisijungimo metu *A. tumefaciens* ląstelės sintetina celiuliozės pluoštus, kurie į pažeistą augalo vietą pritraukia dar daugiau bakterijų.

Optimaliai vir genų indukcijai svarbios aplinkos sąlygos, įskaitant rūgštingumą, mažą fosfatų kiekį, temperatūrą ir cukrų, tačiau fenoliai yra vienintelis būtinas signalas (Brencic et al., 2003; Gao ir Lynn, 2005; McCullen ir Binns, 2006; Lin et al., 2008; Subramoni et al., 2014). Vir genų indukcijai reguliuoti *A. tumefaciens* naudoja dvikomponentę VirA/VirG sistemą. Signalinis kelias inicijuojamas augalų fenoliams tiesiogiai arba netiesiogiai sąveikaujant su transmembraniniu sensoriniu baltymu VirA. ChvE, gliukozę/galaktozę surišantis baltymas, sąveikauja su VirA ir padidina vir genų aktyvaciją, jungdamasis su cukrumi. *A. tumefaciens* naudoja ChvG/ChvI dvikomponentę sistemą, kad suaktyvintų virG transkripciją ir skatina kitų bakterijų genų, susijusių su chemotaksium, judrumu ir virulentiškumu, raišką (Yuan et al., 2007; Wu et al., 2008; Wu et al., 2012).

Virulentiškumo genų raiška lemia viengrandės T-DNR, vadinamos T-kompleksu, sintezę, kuri vėliau pernešama į ląstelę-šeimininkę. VirD1 ir VirD2 baltymai kartu funkcionuoja kaip tam tikrai vietai specifiška endonukleazė, kuri jungiasi prie Ti plazmidėje esančios T-DNR ir kerpa tarp trečiosios ir ketvirtosios T-DNR bazės apatinėje grandinėje. Dėl šio proceso susidaro viengrandės T-DNR molekulės (T-kompleksas) su vienu bakteriniu VirD2 baltymu kovalentiškai prijungtu prie 5' galo. T-DNR penešimui į augalo ląstelę yra naudojama ketvirto tipo sekrecijos sistema (T4SS). VirD4 baltymas yra integralinis vidinės membranos baltymas, turintis ATPazės aktyvumą, veikiantis kaip jungiamasis baltymas, atsakingas už DNR ir baltymų substratų pateikimą VirB transporteriui (Guo et al., 2007).

VirD2 baltymas prisitvirtina prie T-komplekso 5' galo ir nukreipia T-DNR iš bakterijų į augalo ląstelę. T-DNR integracija į augalų ląstelių genomą yra paskutinis *Agrobacterium* vykdomos transformacijos proceso etapas. Skirtingai nuo kitų mobiliųjų DNR elementų, tokių kaip transpozoni ir retrovirusai, T-DNR nekoduoja fermentinio aktyvumo, reikalingo integracijai. Taigi, T-DNR įterpime į augalo DNR turi tarpininkauti baltymai, gabenami iš *A. tumefaciens*, būtent VirD2 ir VirE2 ir (arba) ląstelės-šeimininkės faktoriai. Po to, kai T kompleksas patenka į augalo branduolį, būtina pašalinti su T-DNR susijusius bakterinius ir ląstelės šeimininkės baltymus, kad būtų galima veiksmingai integruoti T-DNR. T-kompleksas išardomas proteolizės būdu, kurią atlieka VirF baltymas ir augalų ubikvitino proteasomų kompleksas (Tzfira et al., 2004; Zaltsman et al., 2010a, 2010b). Esant laikinai raiškai augalo ląstelės branduolyje viengrandė T-DNR gali būti susintetinta į dvigrandę T-DNR, kuri lengvai transkribuojama ir transliuojama be integracijos į genomą (McHale et al., 2013).

Svarbu paminėti, kad Ti plazmidė yra gana didelė ir paprastai gaunamas mažas kopijų skaičius, todėl Ti plazmidės išskyrimas ir klonavimas gali būti sudėtingas. Šiuo metu sukurta ir kitokių sistemų darbai su Ti plazmidėmis. Viena iš tokių yra dviejų besireplikuojančių plazmidžių sistema, dar vadinama binarinių vektorių sistema (Sasnauskas 2006; Anami et al.,

2013). Iš natyvos agrobakterijų Ti plazmidės T-DNR dalis yra pašalinama, o visi T-DNR pernešimui į augalų ląsteles reikalingi genai paliekami. Kitoje plazmidėje yra komponentai, kurie reikalingi replikacijai, atsparumo antibiotikams suteikimui *E. coli* ir *A. tumefaciens* bakterijose ir T-DNR, iš kurios pašalinti visi buvę genai, o jų vietoje įterpti tiksliniai, heterologinio baltymo raiškai reikalingi, genai.

#### 1.4.2 Augalų virusiniai vektoriai

Daug laikinos raiškos sistemų yra sukurti augalų virusų pagrindu (Canto, 2016). Augalų virusai turi mažus genomus ir labai lengvai replikuojasi šeimininko ląstelėse (Chen et al. 2013). Naudojant augalų virusų raiškos vektorius galima per labai trumpą laiką susintetinti didelį kiekį tikslinių baltymų. Virusiniai vektoriai skirstomi į du tipus: pilni (angl. *complete*) vektoriai ir išmontuoti (angl. *deconstructed*) vektoriai.

Pilni virusiniai vektoriai yra funkcionuojantys virusai, į kuriuos įterptas tikslinis genas (Dawson, 2014). Pagrindiniai šių vektorių trūkumai yra neefektyvus ir netolygus augalų užkrėtimas, kadangi natūraliai virusus į augalus perneša vabzdžiai, bakterijos bei kiti tarpininkai, taip pat ir mažas saugumas, nes pilnai funkcionalios virusinės dalelės gali patekti į kitus augalus ir juos užkrėsti.

Išmontuoti vektoriai yra sukurti taip, kad juose būtų tik būtiniausi viruso elementai, užtikrinantys virusinio vektoriaus replikaciją ir kontroliuojantys jo koduojamų genų raišką augaluose. (Klimyuk et al. 2014). Viruso kapsidės baltymas šiuose vektoriuose yra pašalintas, kad nesiformuotų virusinės dalelės ir vektorius neperšoktų į kitus augalus, bet paliktas judėjimo baltymas (angl. *movement protein*), atsakingas už vektoriaus plitimą iš vienos augalo ląstelės į kitą. Kadangi toks vektorius neformuoja virusinių dalelių ir pats negali užkrėsti augalo, jis yra įterpiamas į agrobakterijų vektoriaus T-DNR sritį ir jo pernešimui į augalo ląsteles naudojama agrobakterijų infiltracija. Pastaruoju metu laikinai genų raiškai plačiai naudojami magnICON® vektoriai, sukurti tabako mozaikos viruso (TMV) pagrindu, kuris turi RNR genomą ir replikuojasi augalinės ląstelės citoplazmoje (Gleba et al., 2014). Šiuose vektoriuose yra: (1) pašalintas viruso apvalkalo baltymo genas, (2) įvestos virusinės kDNR modifikacijos, pašalinant galimus natyvos sekos splaisingo signalus ir pridėdant sintetinių intronų, tokiu būdu užtikrinant tikslų RNR replikono atkūrimą ir pernešimą į citoplazmą po agrobakterijų atlikto vektoriaus T-DNR pernešimo į augalinės ląstelės branduolį, (3) virusinis vektorius suskaidytas į 5'-provektorių, turintį visus reikiamus virusinius baltymus bei norimą signalinę seką ir 3'-provektorių, turintį tikslinį geną bei viruso 3'-nekoduojančią seką, o provektorius į pilną vektorių augalinės ląstelės branduolyje rekombinuoja specifinė rekombinazė, kurios genas įterptas į trečios plazmidės T-DNR sritį

(Marillonnet et al., 2005; Werner et al., 2011) . Ši RNR virusinių vektorių sistema užtikrina efektyvią transgenų raišką, leidžia greitai išbandyti skirtingas signalines sekas, nukreipiančias tikslinį baltymą į skirtingus ląstelės kompartmentus ir yra saugesnė dėl vektoriaus padalijimo į skirtingas plazmides (Mortimer et al. 2015).

## 2. METODIKA

### 2.1 Medžiagos ir prietaisai

#### 2.1.1 Medžiagos ir reagentai

**Thermo Fisher Scientific:** 2 mM dNTP mišinys, 5 kartus koncentruotas Phusion HF buferis, Phusion DNR polimerazė, dejonizuotas vanduo, DreamTag DNR polimerazė, 10 kartų koncentruotas DreamTag buferis, 50 kartų koncentruotas TAE elektroforezės buferis, 6 kartus koncentruotas DNR Gel Loading Dye dažas, T4 DNR ligazė, 10 kartų koncentruotas T4 DNR ligazės buferis, restrikcijos endonukleazės ir jų buferiai, LB terpės milteliai, agaras, ditionitriolis (DTT), PageRuler™ Prestained Protein ladder, oligonukleotidiniai pradmenys, izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas (IPTG) milteliai, fenilmetilsulfonilchlorido (PMSF) milteliai, MassRuler DNA Ladder Mix, GeneRuler DNA Ladder Mix.

**dDbioLab:** mielių ekstraktas, triptonas.

**Chempur:** natrio chloridas.

**Amresco:** kalio chloridas, kumasi brilijantinis mėlis R-250.

**Sigma-Aldrich:** magnio sulfatas, magnio chloridas, kalcio chloridas, kalio hidroksidas, mangano chloridas, dimetilsulfoksidas (DMSO), (hidroksi-metil)-amino metanas (TRIS), etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska (EDTA), kanamicinas.

**Roth:** etidžio bromidas, piperazino-N,N'-bis(2-etansulfoninė rūgštis) (PIPES), natrio dodecilsulfatas (SDS), amonio persulfatas (APS), N,N,N',N'-tetrametiletildiaminas (TEMED).

**Emprove:** glicerolis.

**Merck:** bromfenolio mėlis.

**Vilniaus Degtinė:** 96% etanolis.

**Biochrom:** ampicilinas.

**Duchefa Biochemie:** rifampicinas.

**Pharmacia:** agarozė.

### 2.1.2 Rinkiniai

GeneJET™ Plant RNA Purification Mini Kit („Thermo Fisher Scientific“), RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit („Thermo Fisher Scientific“), GeneJET™ Plant Genomic DNA Purification Kit („Thermo Fisher Scientific“), GeneJET Gel Extraction Kit („Thermo Fisher Scientific“), GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit („Thermo Fisher Scientific“).

### 2.1.3 Naudotos genetinės medžiagos kilmė

Genetinės medžiagos išskyrimui naudoti alergenų sintetinantys augalų lapai arba vaisių žievelės. Paprastojo kiečio lapai bei žiedynai ir juodalksnio žiedynai surinkti Vilniaus apylinkėse. Europinio alyvmedžio lapai gauti iš medelio, auginamo Babtų sodininkystės ir daržininkystės instituto šiltnamyje. Pašarinio motiejuko lapai užauginti vazonėlyje iš sėklų (pirktos „Nojaus sėklos“, veislė „Žolis“). Persiko ir paprastosios kriaušės vaisiai pirkti PALIK UAB „IKI“ prekybos tinklo parduotuvėse; persiko kilmės šalis Ispanija (veislė „Sagitaria“), o paprastosios kriaušės – Čilė (veislė „Forelle“). Darbe naudota DNR skirta iš europinio alyvmedžio (lot. *Olea europaea*) lapų, pašarinio motiejuko (lot. *Phleum pratense*) lapų. RNR skirta iš persiko (lot. *Prunus persica*) sunokusio vaisiaus žievelės ir paprastosios kriaušės (lot. *Pyrus communis*) sunokusio vaisiaus žievelės. Aukščiau išvardintų augalų DNR išskirti naudotas GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit („Thermo Fisher Scientific“) rinkinys. RNR išskirta naudojant GeneJET™ Plant RNA Purification Mini Kit („Thermo Fisher Scientific“) rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas. Atvirkštinė transkripcija atlikta naudojant RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit („Thermo Fisher Scientific“) rinkinį.

### 2.1.4 Mikroorganizų kamienai

Darbe naudoti bakterijų kamienai:

- *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star;
- *Escherichia coli* DH5α: F– Φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK–, mK+) *phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1*;
- *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.



## 2.1.5 Bakterijų kultivavimo terpės

**YT** terpė: 2 % mielių ekstrakto, 3,5 % triptono, 0,5 % NaCl. Sterilizuojama autoklavuojant.

**SOB** terpė: 0,5 % mielių ekstrakto, 2 % triptono, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>;

**LB** terpė: 25 g/l LB terpės miltelių. Sterilizuojama autoklavuojant. Atvėsus terpei pridedama reikiamų antibiotikų;

**Agarizuota LB** terpė: 25 g/l LB terpės miltelių, 1,5 % agarų. Sterilizuojama autoklavuojant. Prieš pilant į Petri lėkštes, įdedama reikiamų antibiotikų.

## 2.1.6 Tirpalai

2.1 lentelė. Darbe naudoti tirpalai

<b><i>E. coli</i> kompetentinių ląstelių ruošimui ir transformacijai</b>	TB buferis: 10 mM PIPES, 15 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM KCl, KOH naudojamas pH nustatymui iki 6,7. Tuomet pridedama 55 mM MnCl <sub>2</sub> ir sterilizuojama filtruojant.	[Na] buferinis tirpalas: 5 mM Tris (pH 7,4–8,0), 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl.	[Ca] buferinis tirpalas: 5 mM Tris (pH 7,4–8,0), 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM CaCl <sub>2</sub> .
<b><i>A. tumefaciens</i> kompetentinių ląstelių ruošimui, transformacijai ir infiltracijai į augalus</b>	<u>10 % glicerolio tirpalas:</u> 10 ml glicerolio į 100 ml dejonizuoto vandens.	<u>30 % glicerolio tirpalas:</u> 30 ml glicerolio į 100 ml dejonizuoto vandens.	<u>1 M MgSO<sub>4</sub></u> (100 ml): 12 g MgSO <sub>4</sub> ištirpinama 100 ml vandens.
<b>Antibiotikų tirpalai</b>	<u>50 mg/ml ampicilino tirpalas:</u> 0,5 g ampicilino ištirpinama 10 ml vandens, sterilizuojama filtruojant.	<u>50 mg/ml kanamicino tirpalas:</u> 0,5 g kanamicino ištirpinama 10 ml vandens, sterilizuojama filtruojant.	<u>25 mg/ml rifampicino tirpalas:</u> 0,25 g rifampicino tirpinama 10 ml metanolio. Sterilizuoti nereikia.
<b>Elektroforezės tirpalai</b>	<u>1 % agarozės gelis:</u> 1g agarozės ištirpinama 100 ml TAE buferyje. Tirpalas pakaitinamas, kad ištirtų agarozės milteliai. Į atvėsusį agarozės tirpalą dedama 5 µl/100 ml etidžio bromido.		
<b>Baltymų raiškai <i>E. coli</i> bakterijų ląstelėse</b>	<u>100 mM arba 1 M IPTG tirpalas indukcijai:</u> IPTG milteliai tirpinami vandenyje, pageidautina sterilinti prafiltruojant per sterilų 0,2 µm filtrą.	<u>Suspendavimo tirpalas:</u> 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 10 % glicerolis. <u>Suspendavimo tirpalas su 1 % SDS:</u> Suspendavimo tirpalas +1 % SDS.	

<b>Ląstelių ardymo ultragarsu tirpalai</b>	<u>Lizavimo buferis:</u> 50 mM Tris-HCl pH = 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM DTT.	<u>Fenilmetilsulfonilchloridas (PMSF):</u> PMSF milteliai ištirpinami izopropanolyje, sterilinti nereikia.
--	--	---

### 2.1.7 Plazmidės

2.2 lentelė. Darbe naudotos plazmidės

Vektorius	Šaltinis
pJET1.2 – klonavimo vektorius	Thermo Fisher Scientific
pRR-PEV1 – raiškos vektorius	Konstruota eukariotų genų inžinerijos laboratorijoje
pET28-MBP-TEV – raiškos vektorius	AddGene

### 2.1.8 Oligonukleotidai

2.3 lentelė. Darbe naudoti oligonukleotidai

Pavadinimas	Seka	Aprašymas
ArtV6SS_dir	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAG GTA <b>TGG</b> AAA AAC ATT ATT TTG TTA TAT TGT TCA C – 3'	Tiesioginis pradmuo su start kodonu Art v 6 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
ArtV6-1_rev	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAA GCA CAA GGT TTT CCA GGA ACG CA – 3'	Atvirkštinis pradmuo Art v 6 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios
AlnG4-1_dir	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAG GTG CTG ACG ATC ATC CAC AGG AC – 3'	Tiesioginis pradmuo Aln g 4 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
AlnG4(1)_rev	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAA GCT <b>TAG</b> AAT ATC TTG GCA ACA TCC TTC ACT – 3'	Atvirkštinis pradmuo su stop kodonu Aln g 4 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.
AmbA4-1_dir	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAG GTA AAC TAT GTG AAA AAC CGA GTG TAA C – 3'	Tiesioginis pradmuo Amb a 4 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.

AmbA4_rev	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAA <b>GCT CAC</b> CTT TCA CCT CCT CCT TC – 3'	Atvirkštinis pradmuo su stop kodonu Amb a 4 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.
OleE7-1_dir	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAG GTG CTG CAC CTT CAT GCT CGA C – 3'	Tiesioginis pradmuo Ole e 7 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
OleE7m_rev	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAA <b>GCT CAC</b> GGG AAA TAC CAA GAA ATC – 3'	Atvirkštinis pradmuo su stop kodonu Ole e 7 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.
OleE9-1_dir	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAG GTC AAT CAT TTT TGG GAG TAA ATT ATG GG – 3'	Tiesioginis pradmuo Ole e 9 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
OleE9_rev	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAA <b>GCT CAG</b> TTA CTG CCA CTG GGA AAA TTG – 3'	Atvirkštinis pradmuo su stop kodonu Ole e 9 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.
OleE10-1_dir	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAG GTG CCG TGA ATT CCG TCG GAG – 3'	Tiesioginis pradmuo Ole e 10 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
OleE10_rev	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAA <b>GCT CAA</b> GAG AGG AAT GAG CAT GAT CC – 3'	Atvirkštinis pradmuo su stop kodonu Ole e 10 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.
PhlP13-2_dir	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAG GTA AGA AGG AGG AGA AGA AGG AG – 3'	Tiesioginis pradmuo Phl p 13 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
PhlP13_rev	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAA <b>GCT CAG</b> GCG GCG CAG GTG TTAG – 3'	Atvirkštinis pradmuo su stop kodonu Phl p 13 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.

PruP3SS_dir	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAG GTA <b>TGG</b> CTT ACT CTG CCA TGA CTA – 3'	Tiesioginis pradmuo su start kodonu Pru p 3 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
PruP3-1_rev	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAA GCC TTC ACG GTG GCG CAG T – 3'	Atvirkštinis pradmuo Pru p 3 ir Pyr c 3 genų koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.
MalD3_dir	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAG GTA <b>TGG</b> CTA GCT CTG CAG TGA TC – 3'	Tiesioginis pradmuo su start kodonu Pyr c 3 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
MalD1_dir	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAG GTA <b>TGG</b> GTG TCT ACA CAT TTG AGA ACG – 3'	Tiesioginis pradmuo su start kodonu Pyr c 1 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
MalD1_rev	5' – TTT <b>GGT CTC</b> AAA <b>GCT TAG</b> TTG TAT GCG TCG GGG T – 3'	Atvirkštinis pradmuo su stop kodonu Pyr c 1 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.
70Bsp120I_dir	5' – TTG <b>GGC CCA</b> TCT TTT ATT ACA TGT TTG AAC – 3'	Tiesioginis pradmuo naudotas nustatant CHis linkerio įsistatymą.
70Bsp120I_rev	5' – CCG CTG <b>GGC CCC</b> TAC C-3'	Atvirkštinis pradmuo naudotas nustatant CHis linkerio įsistatymą.
HisMBPE31_dir	5' – TTT GGT CTC AAG GTA TGG GCA GCA GCC ATC A – 3'	Tiesioginis pradmuo transformantų su MBP kolonijų PGR atlikimui.
HisMBP31_rev	5' – TTT GGT CTC AAC CTT GGA AGT ATA GAT TTT CAC CCT – 3'	Atvirkštinis pradmuo transformantų su MBP kolonijų PGR atlikimui.
Pro-NHis-rev	5' – ACC TGA GTG ATG GTG ATG GTG ATG CAT – 3'	Atvirkštinis pradmuo naudotas nustatant NHis linkerio įsistatymą.
Pro-CHis-dir	5' – GCT TCT GGC CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA – 3'	Tiesioginis pradmuo naudotas nustatant CHis linkerio įsistatymą.

## 2.1.9 Naudoti prietaisai

Maišyklė „Scientific Industries Vortex Genie<sup>®</sup> 2“, centrifuga „Eppendorf<sup>®</sup> Microcentrifuge 5415D“, centrifuga „Eppendorf<sup>®</sup> Microcentrifuge 5415R“, centrifuga „Eppendorf<sup>®</sup> Centrifuge 5810R, purtyklė „New Brunswick<sup>™</sup> Innova<sup>®</sup> 44“, srovės šaltinis „omniPAC Maxi CS-3AMP Power Supply“, vertikalus elektroforezės aparatas „Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Electrophoresis System“, termocikleris „Biometra TProfessional Thermocycler“, elektroporatorius „Eppendorf<sup>®</sup> Multiporator<sup>®</sup>“, kaitinimo blokas „Biosan Dry Block Heating Thermostat“, pH matuoklis „Oakton“, magnetinė maišyklė „Rotilabo<sup>®</sup>-Mini Magnetic Stirrer R1000“, transiliuminatorius „Herolab EASY“, spektrofotometras „Eppendorf<sup>®</sup> Biophotometer Plus<sup>®</sup>“, vakuomo aparatas (eksikatorius Duran 300 mm, diafragminis siurbliukas Vacuubrand ME 2 NT), ultragarsinis dezintegratorius Bandelin „Sonoplus“.

## 2.2 Darbe naudoti metodai

### 2.2.1 Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

PGR metodas buvo naudojamas genomines DNR bei kopijinės DNR (kDNR) fragmentų pagausinimui ir restrikcijos taikinių įvedimui. Visi PGR reakcijose naudoti reagentai įsigyti iš „Thermo Fisher Scientific“. Reakcijos vykdomos termocikleryje „Biometra TProfessional Thermocycler“. Vienai PGR reakcijai atlikti naudotas dNTP mišinys, Phusion HF buferis, Phusion polimerazė, dejonizuotas vanduo, 20 pmol koncentracijos tiesioginiai bei atvirkštiniai pradmenys ir atitinkama DNR. Atsižvelgiant į pradmenų prilipimo temperatūras, buvo parenkamos tinkamiausios sąlygos reakcijoms atlikti.

Siekiant įsitikinti ar užaugusiuose *A. tumefaciens* bakterijų transformantuose yra plazmidės su įterptais genais, buvo atliekama kolonijų PGR. Reakcijai atlikti iš vakaro atsisėjama į lėkšteles po vieną koloniją ir paliekama nakčiai 30 °C temperatūroje. Naktinė išaugusi *A. tumefaciens* bakterijų kolonija paimama steriliu dantų krapštuku nuo kietos terpės ir suspenduojama mėgintuvėlyje su 20 μl sterilaus vandens. Mėgintuvėlis 10 min. pakaitinamas verdančiame vandenyje ir stalinėje centrifugoje nucentrifuguojamas 1 min. 13 000 aps./min. greičiu. Vienai PGR reakcijai imta 5 μl supernatanto, 20 pmol tiesioginio pradmens, 20 pmol atvirkštinio pradmens, DreamTag buferio, DreamTag DNR polimerazės, dNTP mišinio ir dejonizuoto vandens.

### **2.2.2 DNR elektroforezė agaroziniame gelyje**

DNR fragmentų, gautų po PGR reakcijos arba restrikcijos, atskyrimui ir analizei naudojamas 1 % agarozės gelis. 1 g agarozės užpilamas vienkartinio TAE buferiniu tirpalu (40 mM Tris-acetatas, 20 mM acto rūgštis, 1 mM EDTA, „Thermo Fisher Scientific“) ir kaitinamas kol tampa skaidrus. Atvėsus tirpalui, į jį įdedamas etidžio bromidas (5 µl/100 ml agarozės tirpalo) ir supilamas į gelio formavimo talpą. Elektroforezės mėginiai paruošiami juos sumaišant su šešis kartus koncentruotu užnešimo dažu. Elektroforezė vykdoma įdėjus gelį į elektroforezės vonelę ir užpylus vienkartinio TAE buferinio tirpalo, esant 120 V įtampai 200 mA srovės stipriui, elektroforezės kamerą prijungus prie srovės šaltinio „Cleaver CS-3AMP“. Rezultatai vizualizuojami ir dokumentuojami naudojant elektroforezės gelių dokumentacijos sistemą „MiniBIS Pro<sup>®</sup>“.

### **2.2.3 DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio**

Siekiant išgryninti DNR fragmentus iš agarozės gelio, pagaminamas storesnis gelis su platesniais šulinėliais. Elektroforezė vykdoma 2.2.2 skyrelyje paminėtomis sąlygomis. Gelis patalpinamas transiliumatoriuje „Herolab EASY“ ir reikiami fragmentai skalpelio pagalba išpjaunami bei sudedami į 1,5 ml talpos Eppendorf tipo mėgintuvėlius ir skiriami pagal rinkinio „GeneJET Gel Extraction Kit“ („Thermo Fisher Scientific“) rekomendacijas.

### **2.2.4 DNR ligavimas**

DNR intarpai liguojami į pJET1.2-blunt klonavimo arba pRR-PEV1 ir pET28-MBP-TEV raiškos vektorius naudojant T4 ligazę („Thermo Fisher Scientific“). Reakcija atliekama 1,5 val. kambario temperatūroje. Į 10 µl bendro ligavimo mišinio dedama 1 U T4 DNR ligazės, 20-100 ng linearizuoto vektoriaus DNR, intarpo DNR santykiu 3:1 su vektoriumi, 1 µl 10X T4 DNR ligazės buferio („Thermo Fisher Scientific“) bei vandens iki 10 µl.

### **2.2.5 Šaldytų kompetentinių *E.coli* bakterijų paruošimas**

*E. coli* DH5α kamienas užsėjamas į 5 ml skystos LB terpės be antibiotikų ir auginamas per naktį purtyklėje 37 °C temperatūroje, purtant 180-200 aps./min. greičiu. Į paruoštą 100 ml SOB skystą terpę įpilama naktinės kultūros, kad optinis tankis būtų apie 0,1. Bakterijos toliau auginamos purtyklėje, esant 30 °C temperatūrai bei 180-200 aps./min. greičiui. Optinis tankis matuojamas kas valandą, kol pasiekia 0,5. Pasiekus reikiamą tankį, bakterijos 10 min. šaldomos lede, po to perpilamos į sterilius 50 ml talpos flakonus ir centrifuguojamos iki 4 °C atšaldytoje centrifugoje 10 min. 3000 aps./min. greičiu.

Supernatantas nupilamas, o likusios bakterijos suspenduojamos 0,5 ml TB buferio. Po to į flakonus su bakterijomis papildomai įpilama 1,5 ml to paties buferio. Bakterijos supilamos į vieną flakoną ir įpilama dar 30 ml TB buferio ir 10 min laikoma ant ledo. Bakterijos centrifuguojamos 10 min. iki 4 °C atšaldytoje centrifugoje, 3000 aps./min. greičiu. Supernatantas nupilamas. Į flakoną pilama 0,5 ml TB buferio ir suspendavus įpilama dar 4,5 ml to paties buferio. Įpilama 350 µl DMSO ir po 150 µl bakterijų išpilstoma į sterilius 1,5 ml tūrio mėgintuvėlius. Užšaldoma ir laikoma –80 °C temperatūroje.

### **2.2.6 *E.coli* bakterijų transformacija**

Kompetentinės ląstelės apie 30 min. laikomos lede, kad atitirptų. Į mėgintuvėlį su atitirpusiomis ląstelėmis pilamas ligavimo mišinys ir laikoma lede 1 val. Tuomet atliekamas termošokas – mišinys laikomas 42 °C laipsniuose 1-2 min. Po to dar 5 min. palaikomas lede. Galiausiai bakterijos gaivamos įpylus 1 ml LB terpės ir laikomos 37 °C purtyklėje 1 val. purtant 200-220 aps./min. greičiu. Centrifuguojama stalinėje centrifugoje 13 000 aps./min. greičiu 1 minutę. Nupilamas supernatantas, o bakterijos suspenduojamos likusiame laše ir išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su 50 mg/ml atitinkamu antibiotiku. Lėkštelės laikomos 37°C termostate per naktį.

### **2.2.7 Plazmidinės DNR skyrimas iš bakterijų**

Steriliu dantų krapštuku nuo LB terpės paimama pasirinkta bakterijų kolonija ir užsėjama į 5 ml skystos LB terpės su reikiamu antibiotiku. Per naktį auginama 37 °C temperatūroje purtyklėje, purtant 200-220 aps./min. greičiu. Skiriamos plazmidės iš naktinės kultūros naudojant „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ („Thermo Fisher Scientific“) rinkinį.

### **2.2.8 DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis**

Atsižvelgiant į norimą sukarpyti DNR kiekį, parenkamas tinkamas reakcijos tūris. Reakcijos mišinį sudaro: 10X buferinis tirpalas, priklausantis nuo naudojamos restriktazės, restrikcijos endonukleazė, DNR bei distiliuotas vanduo. Sumaišius komponentus, mišinys inkubuojamas 37 °C temperatūroje 1 val. 30 min.

### **2.2.9 Šaldytų kompetentinių *Agrobacterium tumefaciens* bakterijų paruošimas**

*A. tumefaciens* GV3101 bakterijų kamienas užsėjamas į 5 ml LB terpės su 50 mg/ml rifampicinu ir auginamas 24 valandas purtyklėje 30 °C purtant 220 aps./min. greičiu. Naktinė bakterinė kultūra skiedžiama 2 litrų talpos kolboje su 200 ml LB terpės, turinčios 50 µg/ml

rifampicino, auginama 30 °C temperatūroje, 220 aps/min. purtyklėje 24 h. Naktinė kultūra išpilstoma į sterilius 50 ml talpos flakonus ir 10 min, centrifuguojama mikrocentrifugoje 3000 aps./min. greičiu, 4°C temperatūroje. Supernatantas nupilamas, o likusios ląstelės keletą kartų praplaunamos su 10 ml šaltu 10 % glicerolio tirpalu. Po antro plovimo ląstelės suspenduojamos 10 ml glicerolio tirpale ir centrifuguojamos anksčiau minėtomis sąlygomis. Nupylus supernatantą, ląstelės suspenduojamos 250 µl 10% glicerolio tirpale. Po 25 µl suspenduotų ląstelių išpilstoma į sterilius 1,5 ml talpos Ependorf tipo mėgintuvėlius ir užšaldoma skystu azotu. Laikoma –80°C temperatūroje.

#### **2.2.10 *A. tumefaciens* transformacija**

Šaldytos *A. tumefaciens* kompetentinės ląstelės atitirpinamos lede. Į atšilusias kompetentines ląsteles pilama 1 µl plazmidinės DNR. Mišinys supilamas į atšaldytą elektroporacijos kiuvetę, kuri įstatoma į elektroporatorių ir bakterijos paveikiamos 2,5 kV įtampos elektros srove. 1 ml skystos LB terpės įpilamas į kiuvetę ir mikropipetės pagalba suspenduojamas. Mišinys perkeliamas į sterilų 1,5 ml talpos mėgintuvėlį ir inkubuojamas purtyklėje 30 °C, purtant 220 aps./min. greičiu 2-3 valandas. Ląstelės centrifuguojamos stalinėje centrifugoje 1 min. 13 000 aps./min. greičiu. Supernatantas nupilamas, o bakterijos suspenduojamos ir išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su 50 mg/ml rifampicinu bei kitais reikiamais antibiotikais. Lėkštelės inkubuojamos 30 °C termostate 2-3 dienas.

#### **2.2.11 Agrobakterijų infiltracija į *Nicotiana benthamiana* augalų lapus**

Infiltracijai naudojami 5-6 savaičių *N. benthamiana* augalai auginami 22-25 °C ilgos dienos režimu – 16 val. šviesa ir 8 val. tamsa. Šviežios agrobakterijų kolonijos užsėjamos į skystą LB terpę su reikiamais antibiotikais ir auginamos purtyklėje 30 °C, esant 220 aps./min. greičiu per naktį. Naktinė bakterijų kultūra skiedžiama vandentiekio vandeniu 100 arba 500 kartų. Taip paruoštos bakterijos steriliais 1 ml talpos švirkštais be adatos suleidžiamos į apatinę augalo lapo pusę. Po kiekvieno mėginio infiltracijos pakeičiamos pirštinės siekiant išvengti mėginių užsikrėtimo.

Infiltraciją atliekant vakuumu, augalų vazonėlis įdedamas į atitinkamo dydžio plastikinį maišelį ir užklijuojamas lipnia juostele taip, kad apverčiant augalą lapais žemyn, infiltracijos mišinys nebūtų užteršiamas žemėmis. Atitinkamo dydžio inde (turi laisvai tilpti žemyn apverstas augalo stiebas su lapais) naktinė bakterijų kultūra (5 ml), anksčiau minėtomis sąlygomis, skiedžiama 3-juose litruose vandentiekio vandens. Į bakterijų ir vandens mišinį įpilama 150 µl Silvet L-77 surfaktanto, viskas atsargiai išmaišoma ir



perkeliami į vakuuminį indą. Augalas panardinamas į mišinį taip, kad visi lapai būtų pilnai apsemti, indas uždengiamas dangčiu ir vykdoma infiltracija (įjungiamas vakuminis siurbliukas, kai slėgis nukrenta iki 150-200 mPa, siurbliukas išjungiamas ir atsukamas kranelis, įleidžiantis į indą orą). Augalą išėmus iš indo patikrinama ar visi lapai tolygiai infiltravosi. Po kiekvieno mėginio infiltracijos pakeičiamos pirštinės siekiant išvengti mėginių užsikrėtimo.

### **2.2.12 Visos ląstelės lizato mėginių paruošimas iš *N. benthamiana* augalų lapų baltyminei forezei**

Infiltruotų *N. benthamiana* lapų mėginiai užšaldomi skystame azote ir grūstuvėliu sutrinami. Baltymų raiškos analizei ištirti naudojama apie 100-150 mg infiltruotų lapų. Ant susmulkintų audinių užpilamas išskyrimo buferinis tirpalas – Laemmli, susidedantis iš 240 mM Tris-HCl, pH 6,8, 30 % glicerolio, 0,02 % (w/v) bromfenolio mėlio, 6 % SDS bei 350 mM DDT. DTT į buferį pilamas tik prieš pat naudojimą. Lapų medžiagos ir buferinio tirpalo santykis atitinka 1 g lapų : 3 ml buferinio tirpalo. Mišinys sumaišomas ir inkubuojamas 10-15 min. kambario temperatūroje. Mėginiai denatūruojami 95 °C 10 min., o po to centrifuguojami 10 min. 13 000 aps./min. greičiu kambario temperatūroje. Supernatantas perkeliamas į švarų 1,5 ml mėgintuvėlį ir naudojamas baltymų elektroforezei.

### **2.2.13 Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis**

Baltymų analizei naudojamas vertikalus elektroforezės aparatas. Priklausomai nuo baltymo dydžio, gaminami Tris-Tricine arba Tris-Glycine SDS-poliakrilamidiniai geliai. Jei baltymų molekulinė masė yra <35-40 kDa, ruošiamas 10-12% Tris-Tricine gelis, jei baltymai didesni – Tris-Glycine 8 %-10 % gelis. Pradžioje daromas skiriamasis gelis (Tris-Glycine: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 30 % akrilamido/bisakrilamido tirpalo, distiliuoto vandens, 10 % APS, TEMED; Tris-Tricine: 2,5 M Tris, pH 8,8, 30 % akrilamido/bisakrilamido tirpalo, distiliuoto vandens, 10 % APS, TEMED), kurį paruošus ant viršaus užpilamas distiliuotas vanduo ir laikomas apie 30 min. kambario temperatūroje. Sustingus geliui, vanduo nupilamas ir pilamas 6 % koncentruojamasis gelis (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (jei ruošiamas Tris-Tricine dedamas 2,5 M Tris, pH 8,8), 30 % akrilamido/bisakrilamido tirpalo, distiliuoto vandens, 10 % APS, TEMED). Tam, kad būtų suformuojami šulinėliai, įstatomos šukos, kurios, sustingus geliui, ištraukiamos. Sustingęs gelis perkeliamas į vertikalų elektroforezės aparatą ir užpilamas atitinkamai Tris-glicino-SDS elektroforezės buferiu (250 mM Tris, 1,92 M glicinas, 1 % SDS, pH 8,3) arba Tris-tricino-SDS elektroforezės buferiu (250 mM Tris-base,

250 mM tricine, 0,05% (w/v) SDS). Į atskirus šulinėlius įnešamas reikalingas baltymo kiekis. Elektroforezė vykdoma esant 100 mA srovės stipriui, o bromfenolio dažui perėjus į koncentruojamąjį gelį srovė padidinama iki 150 mA.

Pasibaigus elektorforezei gelis 10 min. dažomas Kumasi briliantinio mėlio dažo tirpale (50 % metanolis, 0,5 % Kumasi briliantinis mėlis R-250, 10 % acto rūgštis), o paskui plaunamas 10 % acto rūgšties tirpale per naktį.

#### **2.2.14 Šviežių *E. coli* BL21 (DE3) Star kompetentinių ląstelių paruošimas**

BL21 (DE3) Star ląstelės užsėjamos į skystą LB terpę (4 ml) ir auginamos purtyklėje 37 °C, esant 220 aps./min. greičiui per naktį. Kitą dieną naktinė kultūra skiedžiama 100 kartų su šviežia LB terpe ir ląstelės auginamos tomis pačiomis sąlygomis iki kol optinis tankis pasiekia 0,5. Pasiekus reikiamą tankį, bakterijos 10 min. šaldomos lede ir ir centrifuguojamos iki 4 °C atšaldytoje centrifugoje 10 min. 3000 aps./min. greičiu. Supernatantas nupilamas ir ant ląstelių nuosėdų užpilama 3-4ml [Na] tirpalo, suspenduojama ir vėl centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis, supernatantas nupilamas. Ląstelės resuspenduojamos 3 ml [Ca] tirpale. Mėgintuvėlis su ląstelėmis inkubuojamas 40 min. ledo vonioje. Po inkubacijos ląstelės nucentrifuguojamos tokiomis pačiomis sąlygomis, supernatantas nupilamas. Ląstelės resuspenduojamos likusiame tirpalo laše. Taip paruoštos ląstelės naudojamos transformacijai.

#### **2.2.15 *E. coli* BL21 (DE3) Star ląstelių auginimas baltymų raiškai**

Bakterijų kolonija užsėjama į skystą LB terpę su reikiamu antibiotiku. Per naktį auginama 37 °C temperatūroje purtyklėje, purtant 200-220 aps./min. greičiu. Reikiamas kiekis auginimo terpės (YT) užsėjamas 2%-ais naktinės kultūros ir pridamas tinkamas antibiotikas. Bakterijos auginamos purtyklėje, gerai aeruojant 37 °C, esant 250 aps./min. greičiui, iki optinis tankis pasiekia 0,6-0,8. Paimamas kontrolinis mėginys prieš indukciją (1 ml ląstelių) ir nusukamas 1 min maksimaliu greičiu stalinėje centrifugoje, supernatantas nupilamas, o ląstelės užšaldomos ir laikomos –20 °C temperatūroje.

Vykdoma indukcija, pridant IPTG iki 1-0,5 mM galutinės koncentracijos į auginimo terpę (naudojamas 100 mM arba 1 M tirpalą). Toliau indukuota kultūra auginama 3-4 val. 37 °C 250 aps./min. greičiu arba 12 °C 24 h 250 aps./min. greičiu, jeigu baltymas 37 °C temperatūroje netirpus. Galimi tarpiniai variantai (30°C, 20 °C), bet atitinkamai keisis ir auginimo laikas iki stacionarios fazės, kai bakterijų optinis tankis beveik nebedidėja.

Paimamas dar vienas kontrolinis mėginys po indukcijos (1 ml ląstelių) ir nusukamas 1 min. maksimaliu greičiu stalinėje centrifugoje, supernatantas nupilamas, o ląstelės

užšaldomos ir laikomos  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Likusi kultūra centrifuguojama 10 min. 3000 aps./min. greičiu ir užšaldoma  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, vėliau galima ardyti.

Toliau atliekamas mėginių paruošimas baltymų elektroforezei. Nucentrifuguotos kontrolinių mėginių ląstelės suspenduojamos 100  $\mu\text{l}$  suspendavimo tirpale su 1 % SDS. Virinama 5-10 min.  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Į 40  $\mu\text{l}$  mėginio įnešama 10  $\mu\text{l}$  5x Lane Marker Reducing Sample Buffer (Thermo Scientific) arba atitinkamą kiekį Laemmli buferio ir dar pakaitinama 5-10 min.  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Į gelio šulinėlį įnešama 20-24  $\mu\text{l}$  paruošto mėginio prieš indukciją ir 8-12  $\mu\text{l}$  paruošto mėginio po indukcijos.

### **2.2.16 Tirpios ir nuosėdų frakcijų tikrinimas baltymų elektroforezėje ultragarsu suardytuose bakterijų mėginiuose**

Nucentrifuguotos ląstelės, kuriose buvo vykdyta rekombinantinio baltymo raiška, suardomos ultragarsu (sonikuojant). Mėgintuvėlis įstatomas į ledą, ląstelės suspenduojamos atšaldytame lizavimo buferyje (paprastai taikomas ląstelių ir buferio santykis 1:1) ir vienam mililitrui mėginio pridedama po 10  $\mu\text{l}$  PMSF (100 Mm) tirpalo. Mėgintuvėlis su ledu patalpinamas po sonikavimo zonu (zondas turi būti įdedamas į mėginį ir neliesi mėgintuvėlio kraštų ar dugno). Sonikavimui pasirinktas ciklinis režimas, atliekant 16 ciklų (2 min. sonikuojama, 2 min. pertrauka).

Atsipilamas 1 ml suardytų ląstelių suspensijos. Mėginys laikomas lede. Centrifuguojama iki  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  atšaldytoje centrifugoje 5 min. 13 000 aps./min. greičiu. Supernatantas perpilamas į kitą mėgintuvėlį, laikomas lede (iš jo bus daromas tirpios frakcijos mėginys baltymų elektroforezei). Nuosėdos praplaunamos jas suspenduojant 300  $\mu\text{l}$  suspendavimo tirpale. Suspenduotos nuosėdos centrifuguojamos prieš tai minėtomis sąlygomis. Praplovimo žingsnis kartojamas antrą kartą. Supernatantas pašalinamas. Nuosėdos suspenduojamos 1 ml suspendavimo tirpalo su 1 % SDS. Į 40  $\mu\text{l}$  suspenduotų nuosėdų ir 40  $\mu\text{l}$  supernatantą įpilama 10  $\mu\text{l}$  Laemmli buferio. Virinama 5-10 min.  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Į gelio šulinėlį įnešama po 12  $\mu\text{l}$  paruoštų mėginių.

## 2.3 Numatyti metodai

### 2.3.1 Baltymų (Western) hibridizacija

Atliekama baltymų elektroforezė, kaip nurodyta 2.2.13 skyrelyje, tačiau pasibaigus elektroforezei gelis ne dažomas Kumasi briliantiniu mėliu, o įmerkiamas į vonelę su PTB buferiu. Iškerpami gelio dydžio du vatmano tipo filtrinio popieriaus lapeliai, kurie taip pat inkubuojami PTB buferyje. Polivinildifluorido (PVDF) membrana mirkoma etanolyje, paskui plaunama vandeniu ir merkiama į PTB buferį. Visi minėti komponentai buferyje laikomi 10 min. Ant pernešimo aparato dedamas filtrinio popieriaus lapelis, kuris išlyginamas stikline lazdele, kad neliktų oro burbulų. Ant filtrinio popieriaus lapelio dedama membrana ir taip pat išlyginama stikline lazdele. Ant viršaus dedamas gelis ir galiausiai uždengiama antru filtrinio popieriaus lapeliu. Dar kartą išlyginama. Uždėjus dangtį, įjungiamo 12-13 V srovė. Pernešimas vyksta 40 min.

Praėjus nustatytam laikui membrana blokuojama blokavimo buferiu (Roti<sup>®</sup>-Block „Roth“) 1 val., praplaunama PBS-T tirpalu ir dedama į 50 ml talpos flakoną. Įpilama 4 ml PBS- T buferio ir, priklausomai nuo konstrukty, 2000 kartų skiestų pirminių antikūnų prieš 6x His arba 4000 kartų skiestų atikūnų prieš MBP baltymą. Flakonas besisukančiame rotoriuje inkubuojamas per naktį. Kitą dieną membrana plaunama PBS-T buferiu. Vieną kartą 15 min, ir du kartus po 5 min. Po to į flakoną pilama vėl 4 ml PBS-T buferio ir įdedami antriniai antikūnai. Kadangi, pirminiai monokloniniai antikūnai buvo gaminami pelėse, todėl pasirinkti antriniai antikūnai prieš pelės IgE gauti iš BioRad. Inkubuojama 2 val. Praėjus nustatytam laikui, membrana vėl plaunama tuo pačiu PBS-T buferiu tris kartus, tik paskutinį kartą pakeičiant jį į TBS tirpalą.

Ruošiamas ryškalas (į 10 ml etanolio įberama 0,03 g chlornaftolio miltelių). Į pasiruoštą vonelę pilama 10 ml TBS tirpalo, 2 ml pasiruošto ištirpinto chlornaftolio bei 15 µl vandenilio peroksido. Membrana merkiama į ryškala ir palaikoma tol, kol išryškėja signalas, o paskui perkeliama į vandenį.

### 2.3.2 Augaluose susintetintų baltymų tirpumo tikrinimas

Augaluose susintetintų baltymų tirpumui tikrinti naudojama keletas skirtingų buferių: modifikuotas Oey buferis, fosfatinis arba trisinis buferiai, turintys skirtingą pH. Paprastai bandomi dviejų skirtingų pH buferiai – pH 7,5-8 arba pH 5. Augalinėje fotosintetančioje ląstelėje tirpių baltymų yra nedaug, gausiausias jų yra pagrindinis fotosintezės komplekso baltymas RuBisCo, kuris esant pH 5 iškrinta į nuosėdas. Tuo tarpu naudojant pH 7-8 buferius,

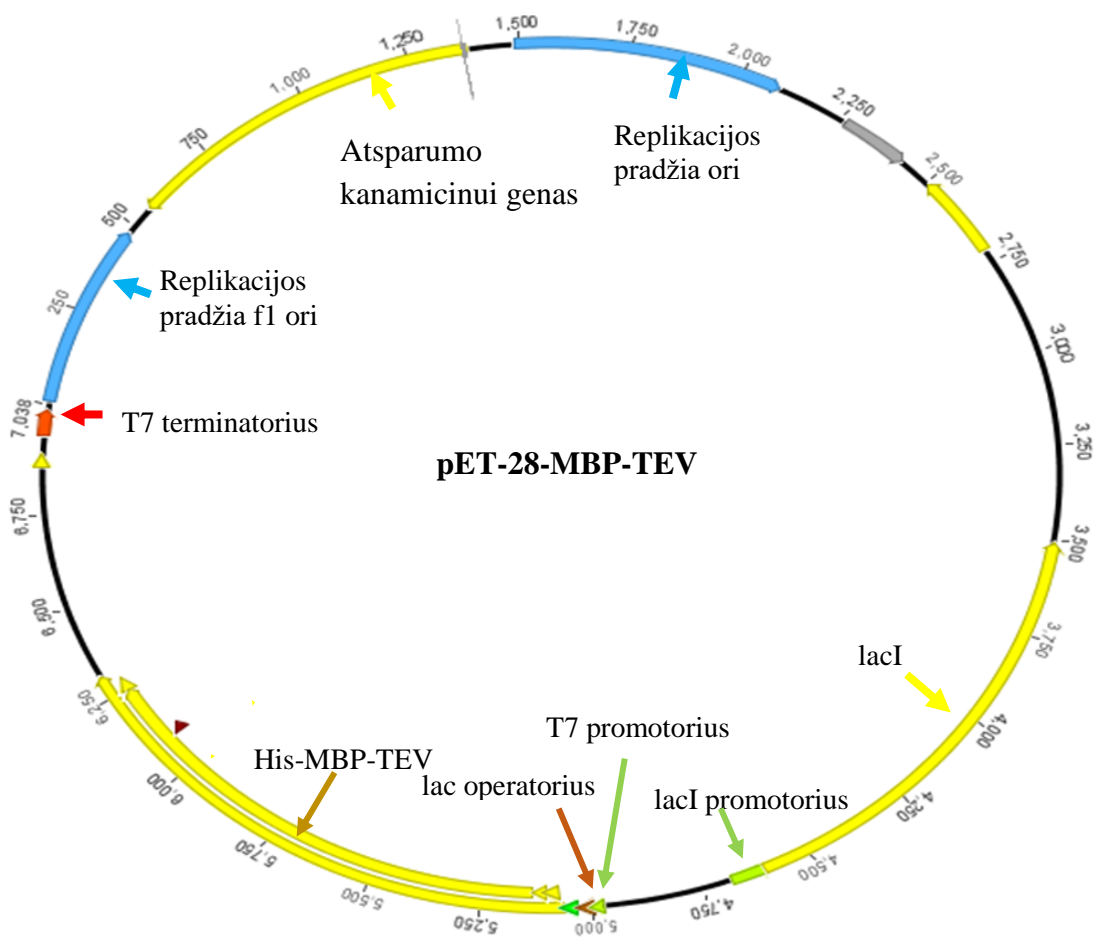
ekstrahuojama dauguma tirpių ląstelės baltymų. Tai įvertinus, tinkamai parinktu buferiu galima gauti neblogai išgrynintą rekombinantinio baltymo preparatą jau pirmame ekstrakcijos etape. Infiltruotų *N. benthamiana* lapų mėginiai užšaldomi skystame azote ir grūstuvėliu sutrinami iki smulkių miltelių. Baltymų raiškos analizei ištirti naudojama apie 0,1-0,2 g infiltruotų lapų. Ant susmulkintų mėginių užpilamas ekstrakcijos buferis, viskas sumaišoma ir švelniai maišant laikoma 10-20 min. kambario temperatūroje. 0,2 g augalų audinių naudojama 0,2-0,5 ml buferio. Ląstelių nuosėdos pašalinamos centrifūguojant 13 000 aps./min. greičiu, 4 ° C temperatūroje, 20 min. Supernatantas nupilamas į naują Ependorf tipo mėgintuvėlį, o nuosėdas galima bandyti ekstrahuoti kitu buferiu. Vėl centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Surinkti supernatantų pavyzdžiai ir likusios nuosėdos sumaišomi su 0,5 (supernatantas) ir 2 (nuosėdos) tūriais 3x Laemmli buferiu. Įpilamas DTT (2M) iki 100 mM galutinės koncentracijos. Mėginiai denatūruojami 10 min. 95° C temperatūroje. Į SDS-PAGE gelį leidžiama ~3 µg baltymų (arba ~5 µl).

### 3. REZULTATAI

#### 3.1 Rekombinantinių augalinių alergenų sintezė *E. coli* raiškos sistemoje

Alergenų sintezei bakterijų raiškos sistemoje buvo pasirinkti baltymai iš kelių skirtingų alergenų šaltinių: paprastojo kiekio (lot. *Artemisia vulgaris*) Art v 1 ir Art v 5, karpotojo beržo (lot. *Betula pendula*) Bet v 1 ir kietinės ambrozijos (lot. *Ambrosia artemisiifolia*) Amb a 3.

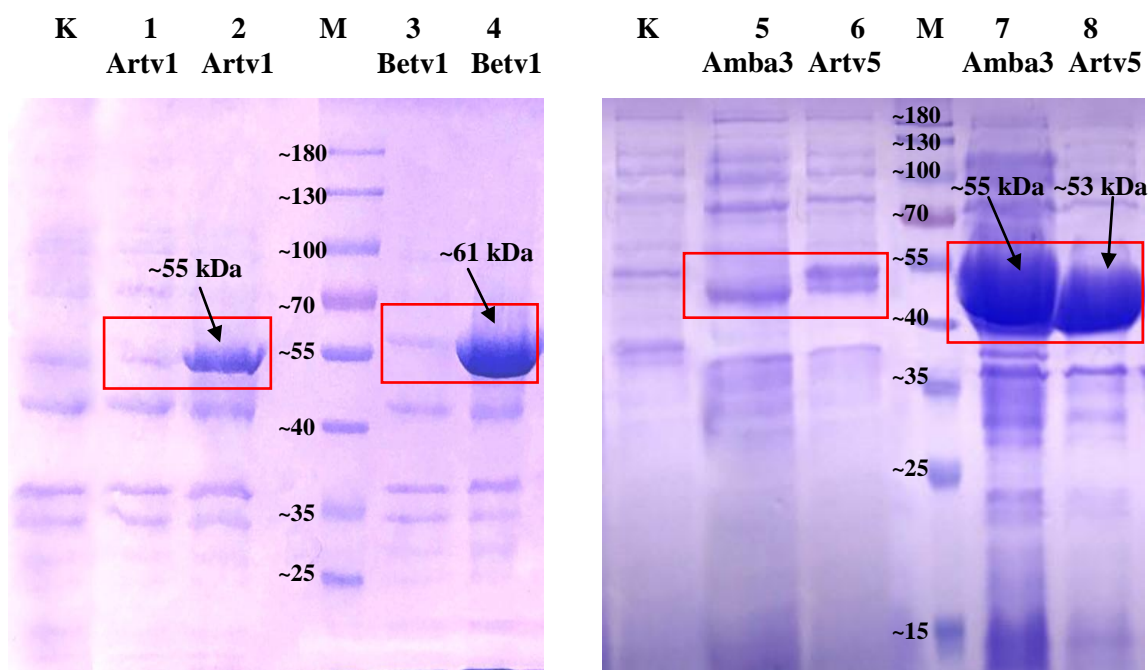
Tikslinių baltymų sintezei gauti *E. coli* ląstelėse buvo naudojamas raiškos vektorius pET28-MBP-TEV (3.1 pav.), kuris turi labai efektyvų indukuojamą T7 bakteriofago promotorių. Už promotoriaus yra MBP baltymą koduojanti seka N-gale sulieta su histidino inkarine seka, o prieš suliejamą tikslinį baltymą koduojančią seką yra TEV (tabako etch viruso) proteazės atpažįstamą motyvą ENLYFQG koduojanti seka, skirta atidalinti MBP ir RA baltymus, esant tokiam poreikiui. Rekombinantinį baltymą naudojant diagnostiniams tikslams dažnai šios galimybės neprireikia, nes inkarinis baltymas MBP dažniausiai niekaip nepaveikia RA sąveikos su specifiniais IgE.



3.1 pav. pET28-MBP-TEV raiškos vektoriaus genolapis. Sumodeliuota naudojant “Geneious” programą.

Į raiškos vektorių buvo įterpiami sintetiniai genai su optimizuotais kodonais bakterijoms, kurie buvo iškirpti specifinėmis restriktazėmis iš plazmidžių. Išgryninti fragmentai liguoti į tomis pačiomis restriktazėmis perkirptą vektorių ir transformuoti į *E. coli* DH5 $\alpha$  kompetentines ląsteles. Atrinkti galutiniai konstruktai: pET28-MBP-TEV-ArtV1, pET28-MBP-TEV-ArtV5, pET28-MBP-TEV-BetV1, pET28-MBP-TEV-AmbA3, kurie patikrinti restrikcine analize įsitikinimui, kad tiksliniai genai įsistatė į vektorių tinkamai. Raiškos vektoriai transformuoti į šviežias *E. coli* BL21 (DE3) Star kompetentines ląsteles. Toliau *E. coli* BL21 (DE3) Star ląstelių transformantai buvo auginami baltymų raiškai, indukuojant IPTG tirpalu.

Siekiant išsiaiškinti ar baltymų raiška įvyko, atlikta baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis. Atliktas ląstelių mėginių, imtų prieš ir po indukcijos, paruošimas. Gauti baltymų mėginiai atskirti SDS-PAGE poliakrilamidiniame gelyje (3.2 pav.).

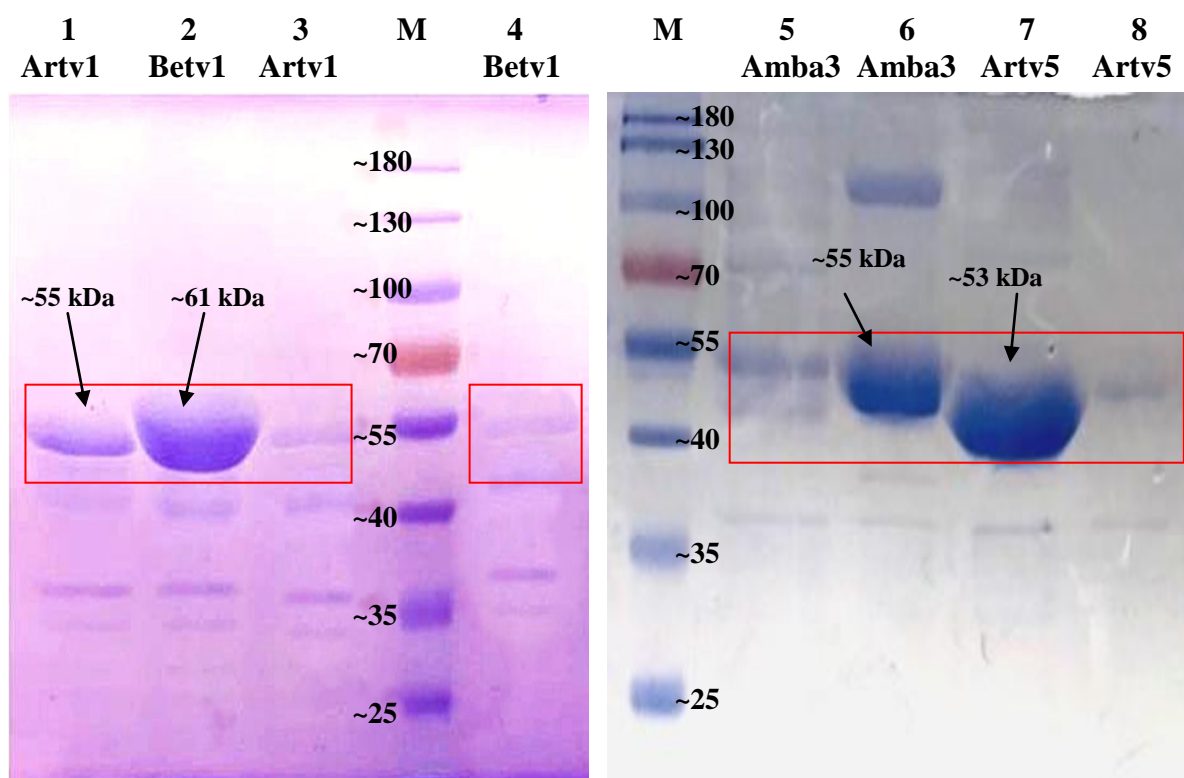


**3.2 pav.** Alergenų sulietų su MBP baltymu sintezės lygio įvertinimas elektroforezės būdu, 12% poliakrilamido gelyje. **1, 3, 5, 6 takeliuose** – mėginiai paruošti iš biomasių, surinktų prieš baltymo sintezės indukciją; **2, 4, 7, 8 takeliuose** – mėginiai paruošti iš biomasių, surinktų po indukcijos. **K** – pET28-MBP-TEV. Rodyklėmis nurodyta kokio dyžio rekombinantiniai baltymai turėjo gautis. Markeris – PageRuler™ Prestained Protein ladder, kDa.

Iš 3.2 pav. matyti, kad pavyko visų baltymų raiška, didžiausias kiekis gautas Bet v 1, Amb a 3 ir Art v 5 baltymų, o mažesnis Art v 1 baltymo.

### 3.1.1 Baltymų tirpumo tikrinimas

Gavus tikslių baltymų raišką, toliau buvo tikrinamas jų tirpumas. Tirpios ir nuosėdų frakcijų tikrinimas vykdytas sonikuojant nucentrifuguotas ląstelės, kuriose buvo vykdyta rekombinantinio baltymo raiška. Gauti mėginiai analizuoti SDS-PAGE poliakrilamidiniame gelyje (3.3 pav.).

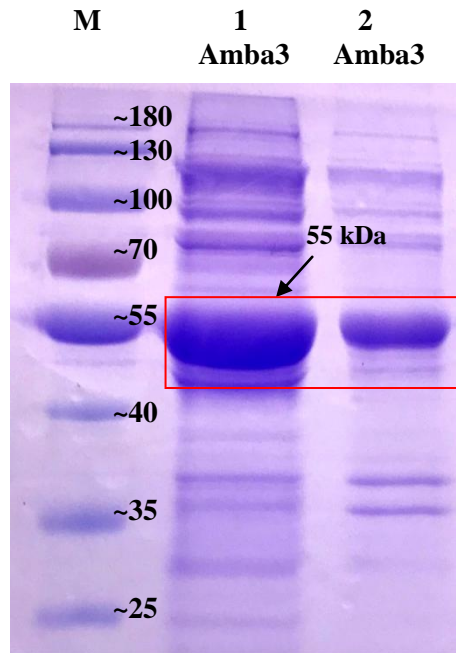


**3.3 pav.** Baltymų tirpumo įvertinimas elektroforezės būdu, 12% poliakrilamido gelyje. **1, 2, 5, 7 takeliuose** – tirpių baltymų frakcija; **3, 4, 6, 8 takeliuose** – netirpių baltymų frakcija. Rodyklėmis nurodyta kokio dyžio rekombinantiniai baltymai turėjo gautis. Markeris – PageRuler™ Prestained Protein ladder, kDa.

Art v 1, Bet v 1 ir Art v 5 baltymai daugiausia matomi supernatanto frakcijoje, tai rodo, kad tiksliniai baltymai yra tirpūs, o Amb a 3 baltymas – netirpus, matomas nuosėdų frakcijoje.

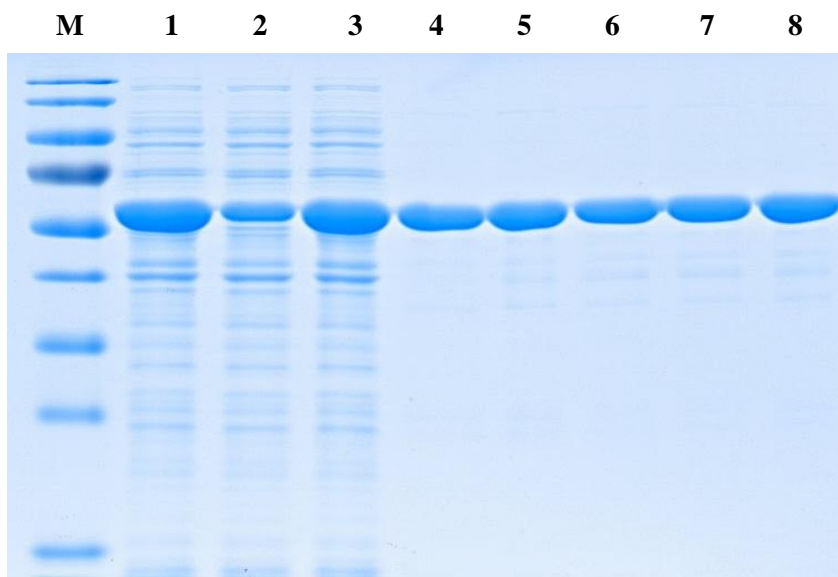
Siekiant padidinti Amb a 3 baltymo tirpumą buvo pakeistos *E. coli* BL21 (DE3) Star ląstelių auginimo sąlygos: sumažinta temperatūra iki 12 °C ir prailgintas inkubavimo laikas nuo 4 iki 24 valandų, tai padėjo gauti didesnę tirpaus baltymo kiekį (3.4 pav.).





**3.4 pav.** Amb a 3 baltymo tirpumo įvertinimas elektroforezės būdu, 12% poliakrilamido gelyje. **1 takelyje** – tirpių baltymų frakcija; **2 takelyje** – netirpių baltymų frakcija. Markeris – PageRuler™ Prestained Protein ladder, kDa.

Vėliau buvo užauginti didesni visų rekombinantinių baltymų biomasės kiekiai (~2 g) gryninimui. MBP-Bet v 1 ir MBP-Art v1 baltymai sėkmingai išgryninti kolegų panaudojant afininę chromatografiją prieš MBP inkarą. Žemiau parodytos MBP-Bet v 1 gryninimo frakcijos (3.5 pav.).



**3.5 pav.** MBP-Bet v 1 po gryninimo per MBPTrap HP (pH 7.4), elektroforės SDS-PAGE vaizdas. **1 takelyje** – lizatas, įnešta 8 µg. **2, 3 takeliuose** – nesorbuoto baltymo frakcijos, po 8 µg. **5-9 takeliuose** – baltymo desorbuoto maltozės tirpalu frakcijos, po 8 µg. Markeris – PageRuler™ Prestained Protein ladder, kDa.

Preliminariais duomenimis, abu sulieti baltymai yra antigeniški ir reaguoja su atitinkamais serumais.

## 3.2 Rekombinantinių augalinių alergenų sintezė *N. benthamiana* raiškos sistemoje

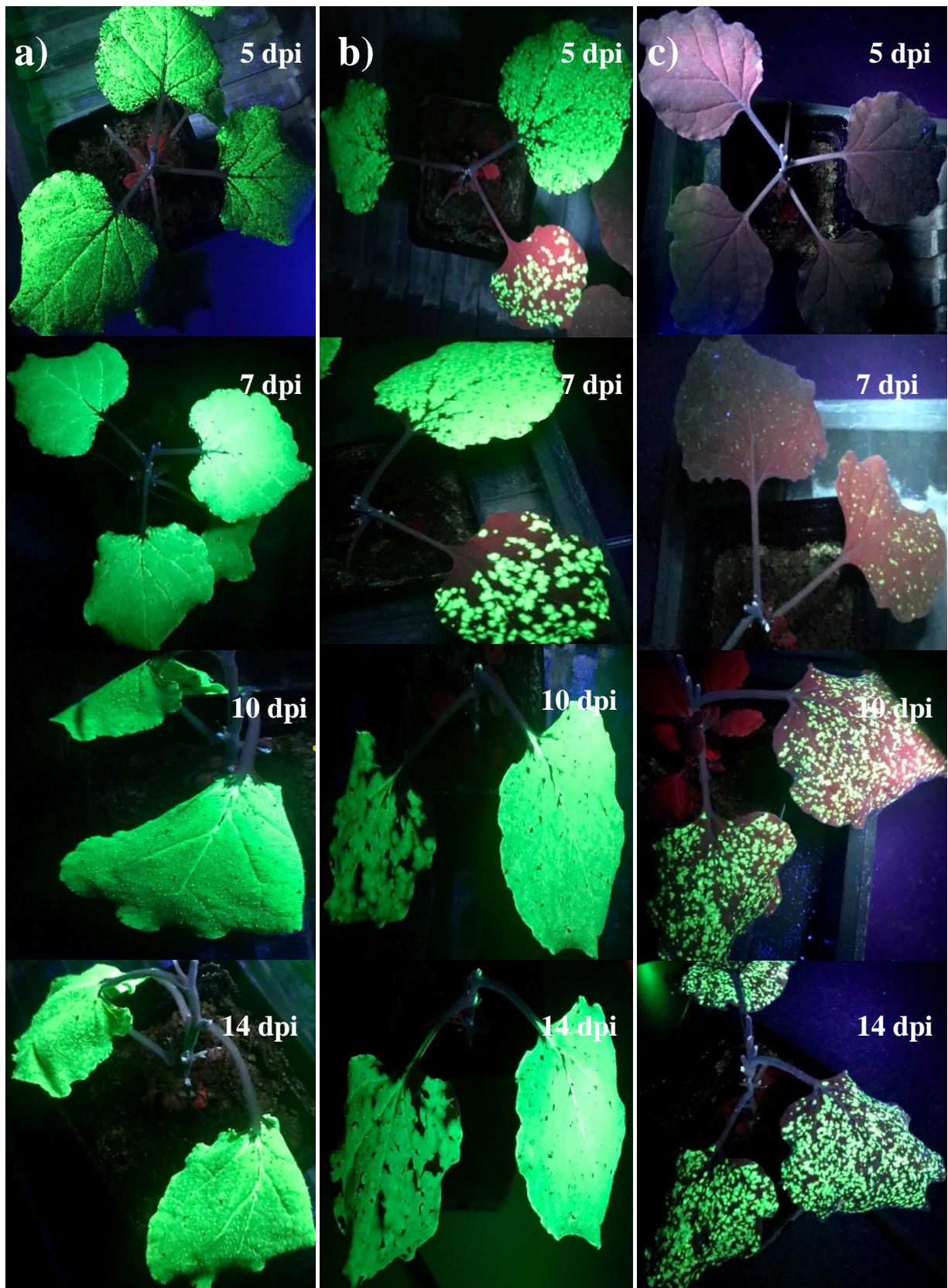
### 3.2.1 Raiškos vektorių tikrinimas

Visi alergenai buvo konstruojami su MBP N-gale, kad būtų galima baltymus gryninti pagal tą pačią schemą, kaip ir bakterijose sintetintus alergenų. Tačiau žinant, kad MBP yra bakterinis baltymas ir su juo sulieti baltymai gali blogai sintetintis augaluose, paraleliai buvo daromos konstrukcijos tik su His inkaru N-gale. Taip pat, kai kurie alergenai yra natūraliai sekretuojami augaluose, todėl sintetinant juos citoplazmoje jų išėiga gali būti maža, jie gali blogai susilankstyti ar dėl glikozilimo arba kitų modifikacijų nebuvimo gali būti neantigeniški. Todėl natūraliai sekretuojamiems alergenams buvo daromos ir konstrukcijos su nepašalinta sava signaline seka N-gale, o jų aptikimui ir gryninimui pridėtas His inkaras C-gale.

Kadangi raiškos vektorius su His inkaru C-gale dar nebuvo tikrintas, buvo sukonstruota kontrolinė plazmidė, į šį vektorių įterpant reporterinį GFP baltymą. Norint gauti GFP-His konstrukta, pirmiausia buvo atliekama PGR reakcija nuo plazmidėje esančio GFP geno sekos. Vėliau GFP genas su atitinkamų restriktazių atrpažinimo sekomis galuose buvo išgrynintas ir liguotas į pJET1.2 klonavimo vektorių bei transformuotas į *E. coli* DH5α kompetentines ląsteles. Atrinktus transformantus patikrinus restriktinės analizės būdu ir atlikus sekvenavimą, naudojant Eco31I restriktazę GFP genas iškirptas ir liguotas į pRR-PEV1-CHis raiškos vektorių.

Sukonstruota reporterinė plazmidė buvo patikrinta, ją lyginant kartu su jau anksčiau laboratorijoje sukonstruotomis reporterinėmis plazmidėmis, koduojančiomis His-GFP ir His-MBP-GFP baltymus. Virusiniai vektoriai buvo transformuoti į *A. tumefaciens* ląsteles, o transformantai infiltruoti naudojant vakuumą – taigi ne tik išbandyta naujai sukonstruota reporterinė plazmidė, bet ir patikrinta reporterinių genų reiška agrobakterijas infiltruojant vakuumu, kadangi anksčiau laboratorijoje augalai buvo infiltruojami tik švirkšto pagalba. Kiekvienai konstrukcijai skirta po vieną atskirą augalą.

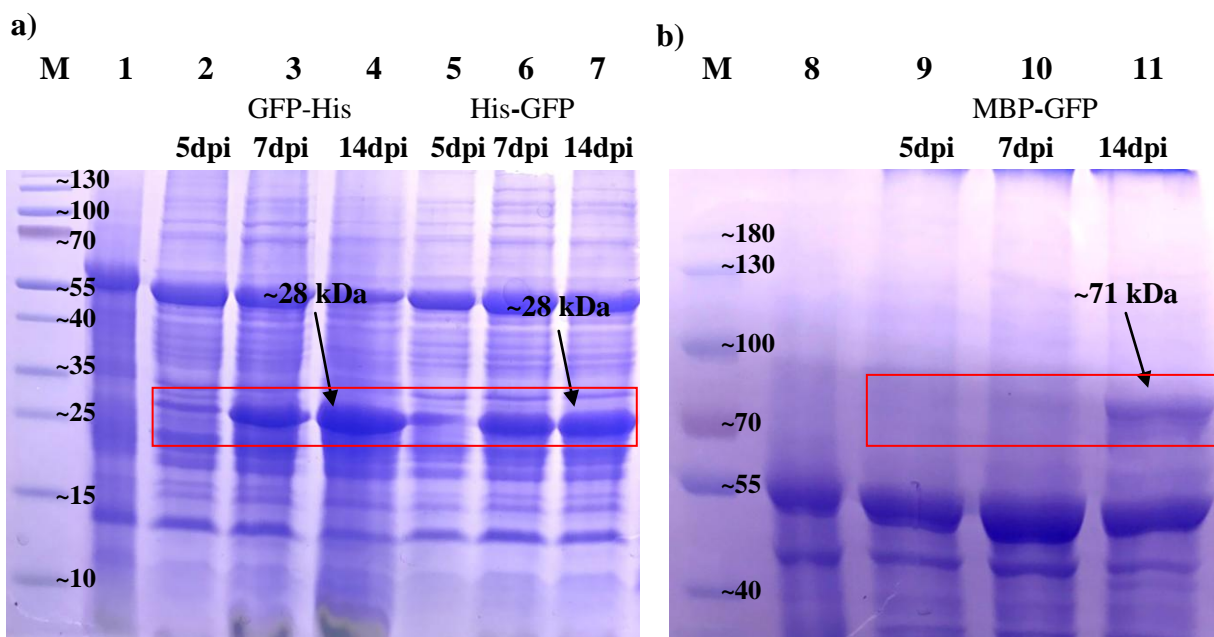
Vektorių ir infiltracijos efektyvumas nustatytas pagal GFP baltymo raiškos lygį įvertinant fluorescencijos intensyvumą apšvietus augalus ultravioletine (UV) šviesa, penktą, septintą, dešimtą ir keturioliktą dienomis po infiltracijos (dpi) (3.7 pav.). Žemiau pateiktame paveiksle pagal fluorescencijos ryškumą galima matyti, kad dauguma lapų infiltruoti tolygiai ir yra nepažeisti. Infiltracijai naudojant švirkštą gana dažnai yra pažeidžiami augalo audiniai, mėginys netolygiai pasiskirsto lapuose, tai gali lemti prastesnę raišką ir dažnesnę lapų nekrozę. Vertinant šiuos aspektus, infiltracija vakuumu yra pranašesnė už infiltraciją naudojant švirkštą.



**3.6 pav.** GFP baltymo raiška *N. benthamiana* laikinos raiškos sistemoje. Nuotraukose matoma GFP baltymo fluorescencija skirtingomis dienomis po infiltracijos su *A. tumefaciens* transformantais, turinčiais skirtingų konstrukčių plazmidus: **a** – pRR-PEV1-CHis-GFP; **b** – pRR-PEV1-NHis-GFP; **c** – pRR-PEV1-MBP-GFP.

Augaluose, infiltruotuose skirtingomis plazmidžių konstrukcijomis, pastebimas skirtingas fluorescencijos intensyvumas, apšvietus augalus UV šviesa. Didelis GFP baltymo raiškos lygis gautas su pRR-PEV1-CHis-GFP ir pRR-PEV1-NHis-GFP plazmidėmis. Rezultatai rodo, kad bent jau GFP baltymo atveju nėra svarbu kuriame baltymo gale yra His inkaras. Augaluose, kurie buvo infiltruoti vektoriumi su MBP baltymu, matomas GFP baltymo švytėjimas yra silpnesnis. Fluorescencijos intensyvumas taip pat nevienodas ir skirtingomis dienomis po infiltracijos. Augaluose su pRR-PEV1-CHis-GFP ir pRR-PEV1-NHis-GFP plazmidėmis intensyvus švytėjimas pastebimas jau penktą ir septintą dienomis po agrobakterijų infiltracijos, o su MBP sulietų baltymų intensyvesnis švytėjimas matomas vėlesnėmis dienomis. Tai lemia MBP baltymas, kuris yra apie 44 kDa dydžio ir gali apsunkinti tikslinio baltymo raišką. Svarbu paminėti ir tai, kad MBP baltymo kodonų sudėtis būdinga bakterijoms, kas gali smarkiai sulėtinti šio baltymo transliaciją augaluose.

Norint išsiaiškinti kaip lapų fluorescencija koreliuoja su GFP baltymų raiška, įvertinta tikslinio baltymo koncentracija lapuose. Baltymai ekstrahuoti iš skirtingomis konstrukcijomis infiltruotų lapų mėginių, imtų penktą, septintą ir keturioliktą dienomis po infiltracijos. Gauti baltymų mėginiai atskirti SDS-PAGE poliakrilamidiniame gelyje (3.8 pav.).



**3.7 pav.** a) baltymų elektroforezė 12 % poliakrilamido gelyje; b) baltymų elektroforezė 10 % poliakrilamido gelyje penktą, septintą bei keturioliktą dieną po infiltracijos (dpi); **2, 3, 4 takeliuose** – pRR-PEV1-CHis-GFP raiškos konstruktas; **5, 6, 7** – pRR-PEV1-NHis-GFP raiškos konstruktas; **9, 10, 11** – pRR-PEV1-MBP-GFP raiškos konstruktas; **1, 8 takeliuose** – kontrolė, pRR-PEV1. Rodyklėmis nurodyta kokio dydžio rekombinantiniai baltymai turėjo gautis. Markeris – PageRuler™ Prestained Protein ladder, kDa.

Elektroforezės poliakrilamido geliuose matyti dideli GFP-His ir His-GFP baltymų kiekiai ypač septintą ir keturioliktą dienomis po infiltracijos. Konstrukto, koduojančio MBP baltymą, raiška žymiai silpnesnė, lyginant su kitais konstruktais ir atsiranda keturioliktą dieną po infiltracijos.

### 3.2.2 Augalinius alergenų koduojančių sekų klonavimas

Sintezai *N. Benthamiana* raiškos sistemoje buvo pasirinkti baltymai iš skirtingų alergenų šaltinių: paprastojo kiečio (lot. *Artemisia vulgaris*) Art v 6, juodalksnio (lot. *Alnus glutinosa*) Aln g 4, kietinės ambrozijos (lot. *Ambrosia artemisiifolia*) Amb a 4, europinio alyvmedžio (lot. *Olea europaea*) Ole e 7, Ole e 9 ir Ole e 10, paprastosios kriaušės (lot. *Pyrus communis*) Pyr c 1 ir Pyr c 3, pašarinio motiejuko (lot. *Phleum pratense*) Phl p 13, persiko (lot. *Prunus persica*) Pru p 3.

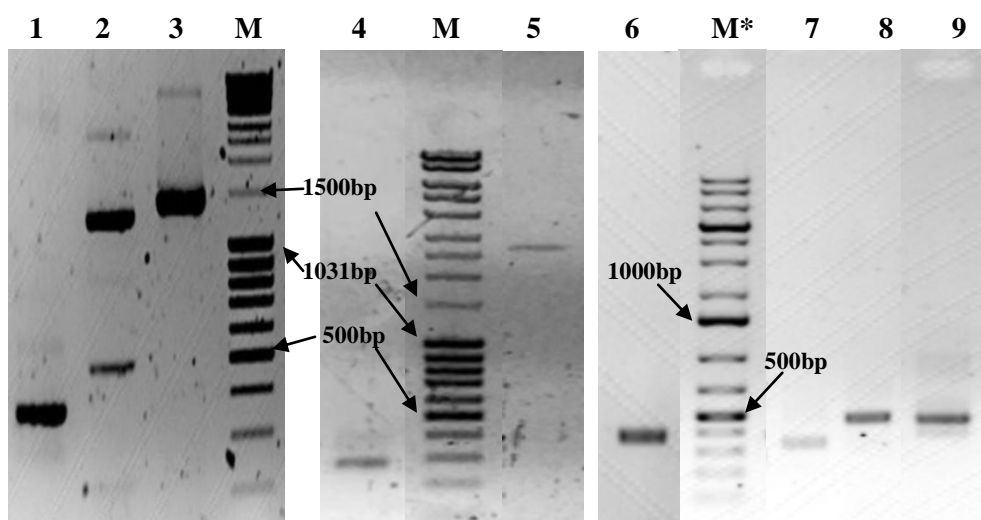
Alergenų koduojančios sekos pagausintos polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu. Naudoti pradmenys, kurių pagalba taip pat įvesti Eco31I restrikcijos endonukleazių taikiniai koduojančių sekų galuose, nurodyti „medžiagos ir reagentai“ skyrelyje, [2.3](#) lentelėje. PGR reakcijos metu gautų fragmentų apytiksliai ilgiai nurodyti 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. PGR metodu gauti apytiksliai produktų ilgiai

Alergeno šaltinis	Alergenas	Šablonas	Tiesioginio pradmens pavadinimas	Atvirkštinio pradmens pavadinimas	Apytikslis gauto produkto ilgis, bp
<i>Artemisia vulgaris</i>	Art v 6	DNR	ArtV6SS_dir	ArtV6-1_rev	~1469
<i>Alnus glutinosa</i>	Aln g 4	kDNR	AlnG4-1_dir	AlnG4(1)_rev	<300
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Amb a 4	kDNR	AmbA4-1_dir	AmbA4_rev	>427
<i>Olea europaea</i>	Ole e 7	DNR	OleE7-1_dir	OleE7m_rev	~390
	Ole e 9	DNR	OleE9-1_dir	OleE9_rev	~1900
	Ole e 10	DNR	OleE10-1_dir	OleE10_rev	>2500
<i>Pyrus communis</i>	Pyr c 1	kDNR	MalD1_dir	MalD1_rev	500
	Pyr c 3		MalD3_dir	PruP3-1_rev	<400
<i>Phleum pratense</i>	Phl p 13	DNR	PhlP13-2_dir	PhlP13_rev	~1285

<i>Prunus persica</i>	Pru p 3	kDNR	PruP3SS_dir	PruP3-1_rev	<400
-----------------------	---------	------	-------------	-------------	------

Art v 6, Ole e 7, Ole e 9, Ole e 10 bei Phl p 13 alergenų koduojančių sekų pagausinimui teko panaudoti iš augalų išskirta genomine DNR, o Aln g 4, Amb a 4, Pyr c 1, Pyr c 3, ir Pru p 3 – koduojančias sekas pavyko gauti iš išskirtos RNR. Išskyrus iš ląstelių RNR, susintetinta kDNR, atliekant atvirkštinės transkriptazės reakciją (RT-PGR). Tikslinius baltymus koduojančios sekos pagausintos PGR metodu naudojant oligonukleotidus, komplementarius tikslinei DNR sekai. Gauti ampliconai agaroziniame elektroforezės gelyje matomi 3.9 pav.



**3.8 pav.** PGR produktų vaizdavimas 1 % elektroforezės gelyje. **1 takelyje** – apie 390 bp Ole e 7 alergeną koduojančios sekos fragmentas, **2 takelyje** – apie 1285 bp Phl p 13 fragmentas, **3 takelyje** – apie 1469 bp dydžio Art v 6 fragmentas, **4 takelis** – <300 bp dydžio Aln g 4 fragmentas, **5 takelyje** – Ole e 10 fragmentas, kurio dydis >2500 bp, **6 takelyje** matoma <400 bp ilgio fragmento seka, koduojanti Pru p 3 alergeną, **7 takelyje** – Pyr c 3 fragmentas, kurio dydis <400bp; **8 takelis** – 500 bp dydžio Pyr c 1 fragmentas; **9 takelis** – >427 bp Amb a 4 fragmentas, M – MassRuler DNA Ladder Mix, M\* – GeneRuler DNA Ladder Mix, kb.

Norint išsiaiškinti ar gauti fragmentai koduoja reikiamus baltymus ir neturi PGR metu arba natūralių mutacijų metu įvykusių klaidų, trikdančių baltymo translacią ar keičiančių aminorūgštis konservatyviose pozicijose, nustatytos šių fragmentų nukleotidų sekos. Šiam tikslui pasiekti buvo išgryninti fragmentai (3.7 pav.), liguoti į pJET1.2 klonavimo vektorius ir nustatytos jų sekos. Įsitikinus, jog PGR reakcijos metu gauta reikiamą alergeną koduojanti DNR ir koduojamoje sekoje nėra reikšmingų klaidų, tiksliniai genai, naudojant įvestus Eco31I restrikcijos endonukleazės taikinius, perkelti į pRR-PEV1-MBP, pRR-PEV1-NHis bei pRR-PEV1-CHis (sekretuojamų alergenų su nepašalinta signaline seka) raiškos vektorius.

### 3.2.3 Rekombinantinių augalinių alergenų raiška

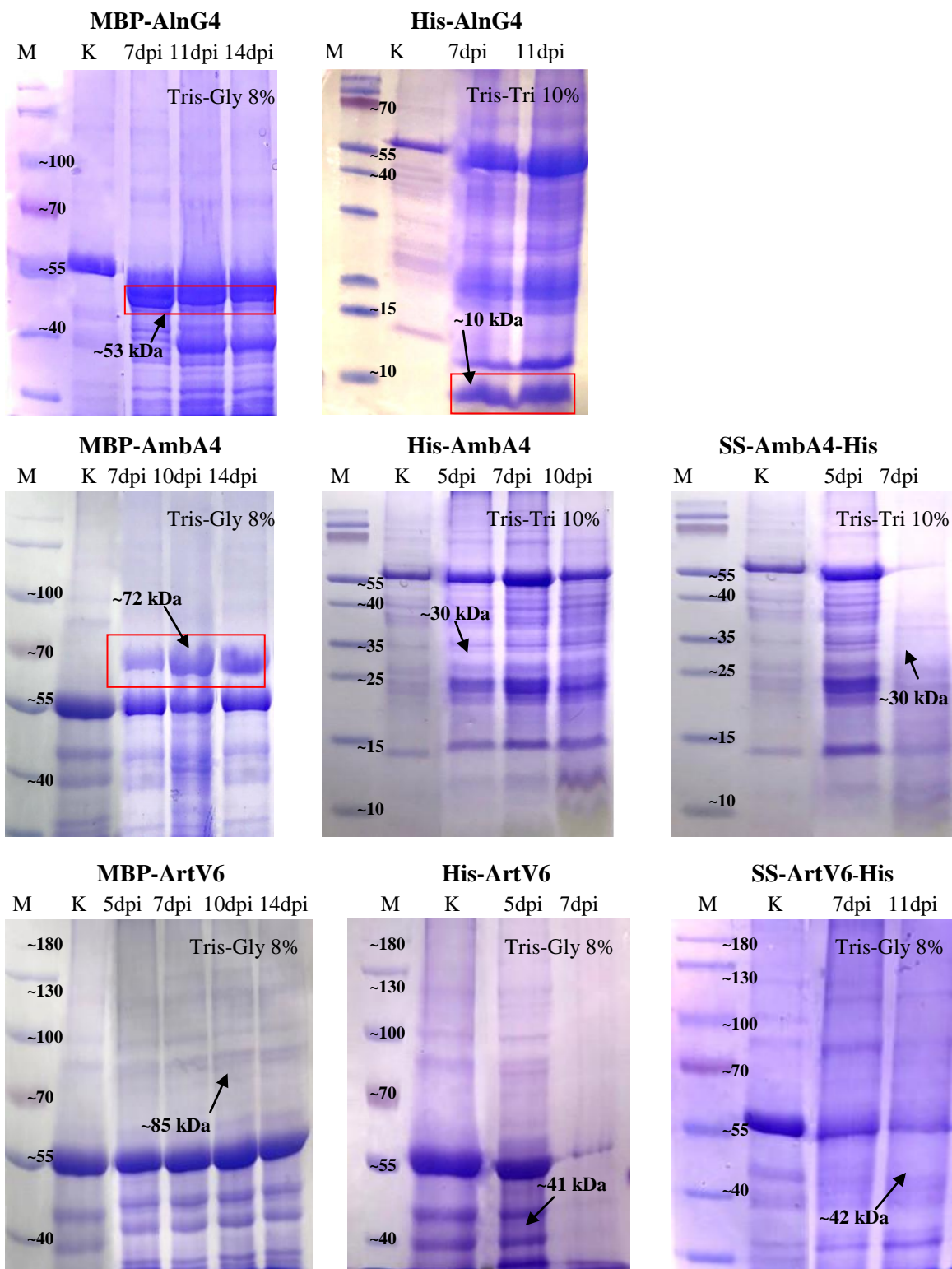
Sukonstruoti augalų raiškos vektoriai nurodyti 3.2 lentelėje.

**3.2 lentelė.** Galutiniai raiškos vektoriai su įterptais tiksliniais genais

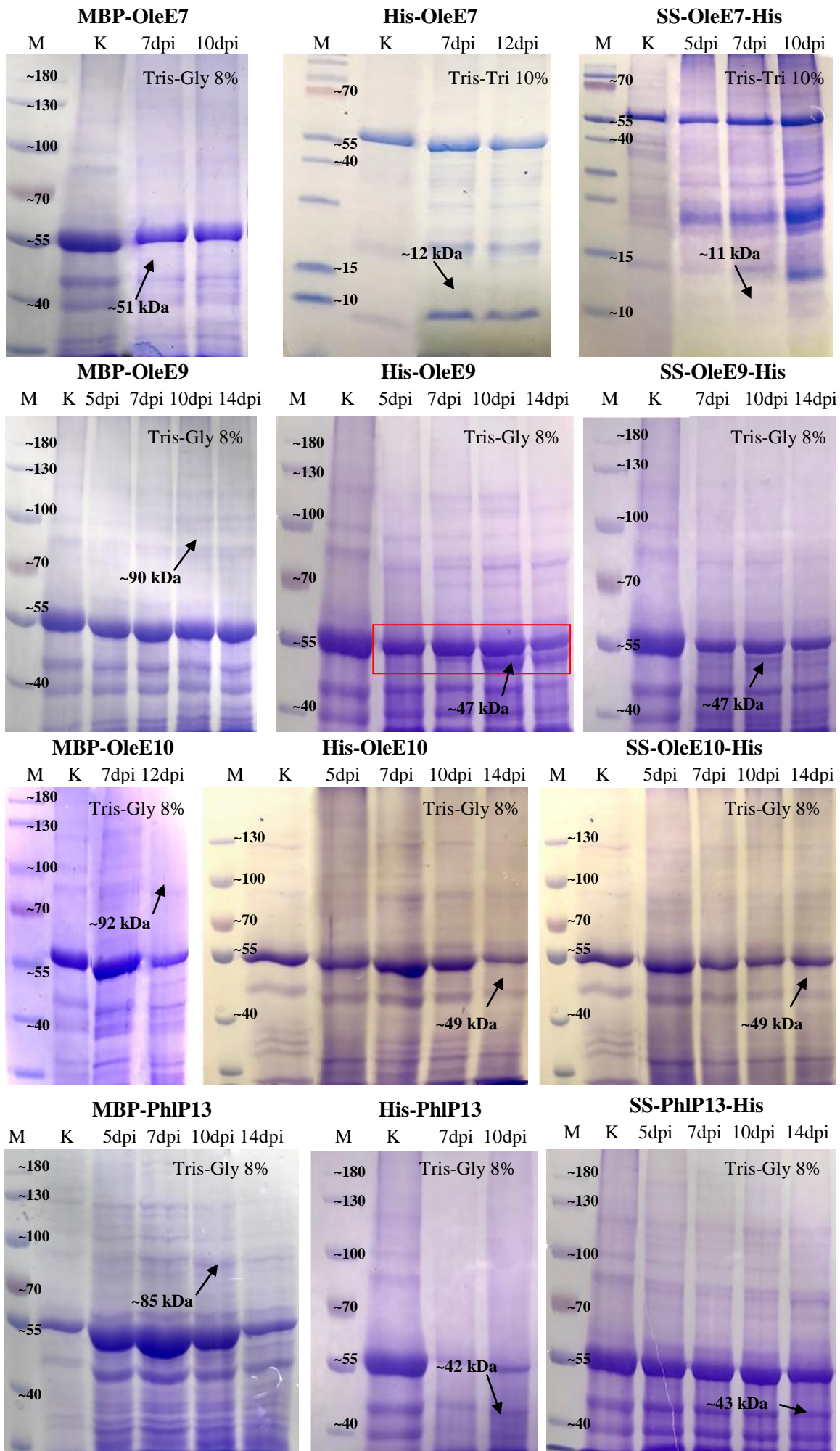
Raiškos vektoriai	Aprašymas
pRR-PEV1-MBP-AlnG4 pRR-PEV1-NHis-AlnG4	Raiškos vektoriai skirti Aln g 4 baltymo sintezei.
pRR-PEV1-MBP-AmbA4 pRR-PEV1-NHis-AmbA4 pRR-PEV1-CHis-SS-AmbA4	Raiškos vektoriai skirti Amb a 4 baltymo sintezei.
pRR-PEV1-MBP-ArtV6 pRR-PEV1-NHis-ArtV6 pRR-PEV1-CHis-SS-ArtV6	Raiškos vektoriai skirti Art v 6 baltymo sintezei.
pRR-PEV1-MBP-OleE7 pRR-PEV1-NHis-OleE7 pRR-PEV1-CHis-SS-OleE7	Raiškos vektoriai skirti Ole e 7 baltymo sintezei.
pRR-PEV1-MBP-OleE9 pRR-PEV1-NHis-OleE9 pRR-PEV1-CHis-SS-OleE9	Raiškos vektoriai skirti Ole e 9 baltymo sintezei.
pRR-PEV1-MBP-OleE10 pRR-PEV1-NHis-OleE10 pRR-PEV1-CHis-SS-OleE10	Raiškos vektoriai skirti Ole e 10 baltymo sintezei.
pRR-PEV1-MBP-PhlP13 pRR-PEV1-NHis-PhlP13 pRR-PEV1-CHis-SS-PhlP13	Raiškos vektoriai skirti Phl p 13 baltymo sintezei.
pRR-PEV1-MBP-PruP3 pRR-PEV1-NHis-PruP3 pRR-PEV1-CHis-SS-PruP3	Raiškos vektoriai skirti Pru p 3 baltymo sintezei.
pRR-PEV1-MBP-PyrC1 pRR-PEV1-NHis-PyrC1 pRR-PEV1-CHis-SS-PyrC3	Raiškos vektoriai skirti Pyr c 1 baltymo sintezei. Raiškos vektoriai skirti Pyr c 3 baltymo sintezei.

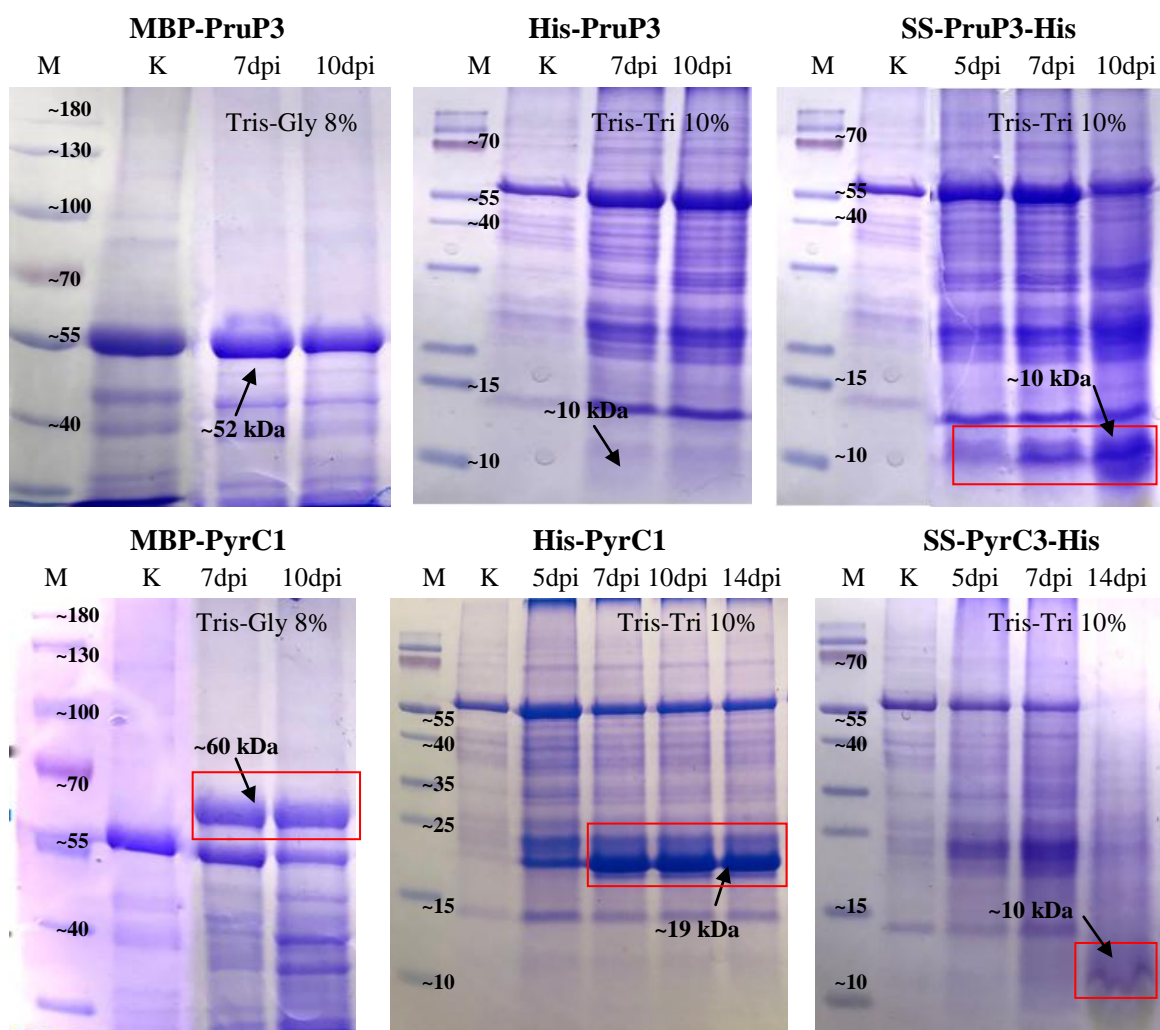
Visi konstruktai transformuoti į *A. tumefaciens* kompetentines ląsteles. Toliau *N. benthamiana* augalai infiltruoti gautais agrobakterijų transformantais.

Siekiant patikrinti alergenų raiškos rezultatus ir priklausomybę nuo dpi, infiltruotų lapų mėginiai imti skirtingomis dienomis po infiltracijos ir analizuojami SDS-PAGE poliakrilamidiname gelyje (3.10 pav.).







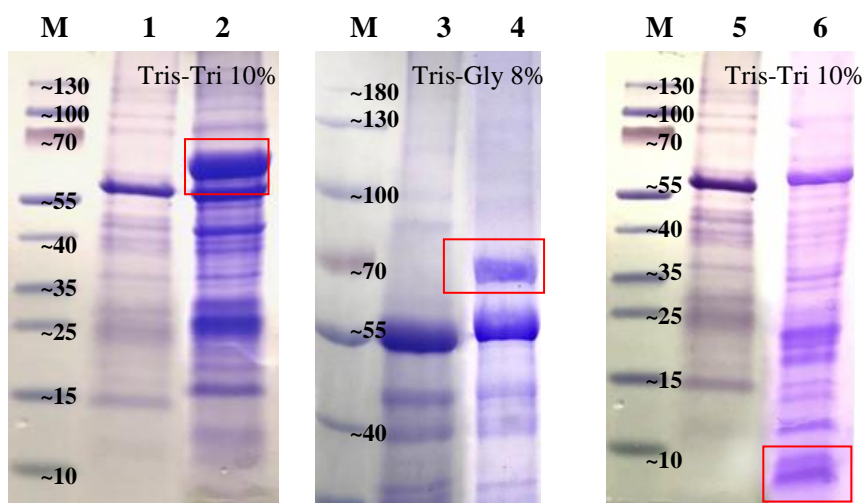


**3.9 pav.** Alergenų raiškos rezultatai ir priklausomybė nuo dienos po infiltracijos. Raudonuose rėmeliuose pažymėti baltymai, kurių raiška buvo gauta: MBP-AlnG4 (~53 kDa), His-AlnG4 (~10 kDa), MBP-AmbA4 (~72 kDa), His-OleE9 (~47 kDa), SS-PruP3-His (~10 kDa), MBP-PyrC1 (~60 kDa), His-PyrC1 (~19 kDa), SS-PyrC3-His (~10 kDa). Rodyklėmis nurodyti gautų baltymų ir baltymų, kurių forezėje nepavyko pamatyti, laukiami dydžiai. K – pRR-PEV1. Markeris – PageRuler™ Prestained Protein ladder, kDa. Tris-Gly – tris-glycininis gelis; Tris-Tri – tris-tricininis gelis.

MBP-AlnG4, His-AlnG4 ir MBP-PyrC1 panašus baltymų kiekis matomas visomis dienomis. MBP-AmbA4 alergeno didžiausias kiekis pastebimas dešimtą ir keturioliktą dienomis. His-OleE9 baltymo nežymi raiška atsiranda septintą dieną, dešimtą dieną kiekis atrodo didžiausias, o keturioliktą kiek mažesnis. SS-PruP3-His raiška tolygiai augo visomis dienomis, o keturioliktą dieną buvo matomas didžiausias kiekis. SS-PyrC3-His raiška pastebima tik keturioliktą dieną po infiltracijos. His-PyrC1 baltymas neryškiai matomas jau penktą dieną, o kitomis dienomis raiška atrodo vienoda.

Art v 6, Ole e 7, Ole e 10, Phl p 13 alergenai baltyminėje forezėje nebuvo matomi nei sulieti su MBP baltymu, nei su histidininiu inkaru N-gale, nei sekretuojamos formos su histidininiu inkaru C-gale. MBP-OleE10 numanomas dydis yra ~92 kDa, o MBP-PhlP13 ~83 kad, todėl neaišku ar tokie dideli baltymai gali gautis šioje sistemoje. His-PhlP13 ir SS-PhlP13-His baltymų dydis yra labai panašus, kaip ir ląstelės baltymų, galimas persidengimas su gausiausio fotosintetinančios augalinės ląstelės baltymo RuBisCo didžiuoju subvienetu (~55 kDa), dėl to yra reikalinga baltymų imuninė hibridizacija. Su His-tag konstruktu taip pat nepavyko aptikti Pru p 3 (~10 kDa) ir Amb a 4 (~30 kDa), sekretuojamos formos su histidininiu inkaru C-gale – Ole e 9 (~47 kDa) bei Amb a 4 (~30 kDa), o su MBP baltymu – Ole e 9 (~90 kDa) ir Pru p 3 (~52 kDa) alergenų. Taip pat svarbu paminėti, kad baltymai, kurių dydis apie 15 kDa gali persidengti su RuBisCo mažuoju subvienetu (~13 kDa).

Atlikus alergenų raiškos ir priklausomybės nuo dpi rezultatų analizę, toliau buvo bandoma sintetinti baltymus didesniais kiekiais. MBP-PyrC1, MBP-AmbA4 ir SS-PruP3-His baltymai buvo infiltruojami į *N. Benthamiana* (kiekvienai konstrukcijai skirta po keturis augalus), lapai nuimami keturioliktą dieną po infiltracijos. Gauti baltymų mėginiai atskirti SDS-PAGE poliakrilamidiniame gelyje (3.11 pav.).



**3.10 pav.** Tikslinių augalinių baltymų sintezė didesniais kiekiais. **1, 3, 5 takelyje** – pRR-PEV1, **2 takelyje** – pRR-PEV1-MBP-PyrC1 (~60 kDa), **4 takelyje** – pRR-PEV1-MBP-AmbA4 (~72 kDa), **6 takelyje** – pRR-PEV1-CHis-PruP3 (~10 kDa), Markeris – PageRuler™ Prestained Protein ladder, kDa.

Iš 3.11 pav. galima spręsti, kad tikslinių augalinių alergenų sintezė dideliais kiekiais sėkmingai pavyksta *N. Benthamiana* augaluose.

### 3.3 Numatyti eksperimentai

#### 3.3.1 Baltymų imuninė (Western) hibridizacija

Atlikus tikslių alerginių baltymų raišką *N. Benthamiana* augaluose, toliau turėjo būti taikomas baltymų imuninės (Western) hibridizacijos metodas. Baltymų imuninei hibridizacijai atlikti turėjo būti naudojami priminiai antikūnai prieš 6x His uodegėlę bei MBP baltymą, o antriniai antikūnai – prieš pelės IgE.

Imuninės hibridizacijos metodu, nurodytu [2.3.1](#) skyrelyje, aptikus juosteles tose pozicijose, kur rekombinantinis baltymas buvo matomas ir SDS-PAGE geliuose, būtų patvirtinta, kad tai tikrai yra tikslinis baltymas, kad su juo sulieti inkarai reaguoja su atitinkamais antikūnais, ir kad tokius baltymus galima bandyti gryninti, panaudojant afininę chromatografiją, nukreiptą į tuos inkarus. Panaudojant šį metodą galima tikėtis aptikti ir tuos tikslius baltymus, kurių juostelių nepavyko išskirti SDS-PAGE geliuose: tuos, kurių raiška yra silpna, tuos, kurie persidengia su gausesniais lapo ląstelės baltymais (pagrindė RuBisCo didžiuoju arba mažuoju subvienetu) ir tuos, kurių migravimas skiriasi nuo apskaičiuoto pagal jų aminorūgščių sudėtį (dėl baltymo fizikocheminių sąvybių arba dėl jo dalinės degradacijos). Silpnai sintetintamų baltymų raišką vėliau galima būtų bandyti optimizuoti, o imuninės hibridizacijos metodu neaptikus net silpno signalo, reikėtų iš naujo patikrinti agrobakterijų transformantus ir pačias konstrukcijas, galbūt konstruoti naujus raiškos vektorius, pavyzdžiui, nukreipiant baltymus į chloroplastus.

#### 3.3.2 Baltymų tirpumo tikrinimas

Patvirtinus alergenų raišką toliau būtų analizuojamas baltymų tirpumas pagal [2.3.2](#) skyrelyje nurodytą metodiką. Nuo to, ar baltymas yra ekspresuojamas tirpus ar netirpus priklausytų baltymų gryninimo metodika.

#### 4. REZULTATŲ APITARIMAS

Šiuo metu didžioji dauguma rekombinantinių alergenų yra sintetinami bakterijų raiškos sistemose. *E. coli* bakterijų raiškos sistema yra viena patogiausių ir ekonomiškiausių platformų rekombinantinių alergenų gamybai (Lin ir Alcocer, 2017). Naudojant šias bakterijas buvo susintetinti Man i 1 (lot. *Mangifera indica*) (Tsai et al., 2017), Ama r 3 (lot. *Amaranthus retroflexus*) (Moghaddam et al., 2019) ir daug kitų augalinės kilmės rekombinantinių alergenų. Tačiau *E. coli* susintetinti baltymai neturi augalinėms ląstelėms būdingų potransliacinių modifikacijų, gali būti netinkamai sulankstyti ir dėl šių priežasčių silpnai atpažįstami specifinių antikūnų, tokiu atveju rekombinantinių alergenų sintezė turi būti atliekama eukariotinėse raiškos sistemose.

Augalų raiškos sistemos taip pat buvo sėkmingai pritaikytos rekombinantinių baltymų sintezėje. Svarbu tai, kad dauguma alergenų yra augalinės kilmės ir gali turėti specifines augalams būdingas potransliacines modifikacijas, kurios yra svarbios IgE atpažinimui (Lin ir Alcocer, 2017). *N. benthamiana* augalų laikinos raiškos sistemoje buvo sėkmingai gautas Bet v 1 (lot. *Betula pendula*) (Yamada et al., 2020) alergenai.

Šiame darbe buvo siekiama susintetinti paprastojo kiečio (lot. *Artemisia vulgaris*) Art v 1 ir Art v 5, karpotojo beržo (lot. *Betula pendula*) Bet v 1 ir kietinės ambrozijos (lot. *Ambrosia artemisiifolia*) Amb a 3 rekombinantinius baltymus bakterijų raiškos sistemoje. Augalų laikinos raiškos sistemoje buvo bandoma susintetinti paprastojo kiečio Art v 6, juodalksnio (lot. *Alnus glutinosa*) Aln g 4, kietinės ambrozijos Amb a 4, europinio alyvmedžio (lot. *Olea europaea*) Ole e 7, Ole e 9 ir Ole e 10, paprastosios kriaušės (lot. *Pyrus communis*) Pyr c 1 ir Pyr c 3, pašarinio motiejuko (lot. *Phleum pratense*) Phl p 13 bei persiko (lot. *Prunus persica*) Pru p 3 rekombinantinius baltymus.

Gauti rezultatai parodė itin intensyvią su MBP sulietų Bet v 1, Amb a 3 ir Art v 5 baltymų sintezę, o Art v 1 baltymo raiška buvo silpnesnė. Toliau buvo atliekamas baltymų tirpumo tikrinimas. Visi baltymai buvo gauti tirpūs išskyrus Amb a 3 alergeną, tačiau sumažinus ląstelių inkubavimo temperatūrą pavyko gauti ir tirpią baltymo formą. Bet v 1, Amb a 3 ir Art v 5 natūraliame šeimininke yra nesekretuojami baltymai, o Art v 1 sekretuojamas, galbūt dėl to pastarojo raiška bakterinėje raiškos sistemoje yra silpnesnė nei kitų. Vėliau buvo užauginti visų bakterijose ekspresuotų baltymų didesni biomasės kiekiai, o su MBP sulieti Bet v 1 ir Art v 1 buvo sėkmingai išgryninti.

Augalų laikinos raiškos sistemoje alergenų raiška bandyta suliejus juos su MBP arba 6xHis inkarais N-gale, o sekretuojamus alergenus ir su natyviomis signalinėmis sekomis bei sulietu 6xHis inkaru C-gale. Skirtingi baltyminiai inkarai ir jų vieta baltyme gali nulemti

skirtingą sulieto baltymo raišką, bet jų įtaką galima patikrinti suliejant su patogiu reporteriniu baltymu. Šiame darbe buvo sukonstruotas kontrolinis vektorius koduojantis GFP-His baltymą, ir jis palygintas su anksčiau sukonstruotais vektoriais, koduojančiais MBP-GFP ir His-GFP baltymus. Rezultatai parodė intensyvią GFP baltymų, sulietų su 6xHis inkaru tiek N-, tiek C-gale, sintezę, tačiau GFP sulieto su MBP raiška vyko lėčiau ir atsirado vėlesnėmis dienomis po infiltracijos. Neefektyvi MBP baltymo raiška gali būti dėl to, kad ji koduoja bakterijų seka su neoptimizuotais kodonais augalų raiškai arba pati bakterinio baltymo struktūra nelabai tinkama raiškai augalinėje ląstelėje.

Kadangi augalinėje raiškos sistemoje turi puikiai veikti iš augalų išskirtos baltymus koduojančios sekos, taip pat siekiant susintetinti alergenų, esančius mus supančiuose ir mūsų valgomuose augaluose, raiškai augaluose buvo panaudota iš prieinamų alergenų šaltinių išskirta genetinė medžiaga. Tuo tikslu iš atitinkamų augalų dalių išskirtos RNR arba DNR, gauti reikiamų alergenų kDNR arba genai ir nustatytos jų sekos. Gautos sekos klonuotos į laikinos raiškos vektorius ir tikrinta rekombinantinių alergenų sintezė.

Modifikuoto tabako mozaikos viruso vektorių pagalba gauta aiški Aln g 4, Amb a 4, Ole e 9, Pyr c 1 nesekretuojamų alergenų raiška, visi šie baltymai iki šiol augaluose sintetinami nebuvo ir šiame darbe jų raiška buvo vykdoma pirmą kartą. MBP-PyrC1, MBP-AmbA4 ir SS-PruP3-His baltymų raiška sėkmingai įvykdyta ir infiltruojant didesnius augalų kiekius, paruoštos biomasės šių baltymų tirpumo tikrinimui ir grynimui. Iš sekretuojamų baltymų buvo gauti tik Pru p 3 ir Pyr c 3 alergenai, priklausantys lipidus pernešančių baltymų grupei.

Atlikus raišką *N. benthamiana* augalų raiškos sistemoje, baltyminėje forezėje nesimatė diskretiškų Art v 6, Ole e 7, Ole e 10 ir Phl p 13 baltymų juostų, nebuvo matomi ir nesekretuojami Pru p 3 bei Pyr c 3 alergenai. Iš ankstesnių laboratorijos darbų jau žinoma, kad nevyksta nesekretuojamų lipidus pernešančių baltymų, Pru p 3 ir Pyr c 3 homologų raiška. MBP-OleE10 numatomas dydis yra ~92 kDa, o MBP-PhIP13 ~83 kDa, todėl neaišku ar tokie dideli baltymai gali gautis šioje sistemoje. His-PhIP13 ir SS-PhIP13-His baltymų dydis yra labai panašus, kaip ir gausiausių augalinės ląstelės baltymų, todėl galimai jie persidengia su RuBisCo didžiuoju subvienetu. Į daugelį rekombinantinių alergenų raiškos klausimų turėtų atsakyti imuninės hibridizacijos prieš sulietus inkarus eksperimentai, kurių nespėta atlikti.

Apibendrinant galima teigti, kad *E. coli* bakterijų raiškos sistema yra efektyvi, ją naudojant gaunama intensyvi baltymų raiška. *E. coli* ląstelėse jau ir ankstesniuose tyrimuose buvo sėkmingai susintetinta daug augalinės kilmės alerginių baltymų, tačiau ne visi jie pakankamai antigeniški. Lyginant su bakterijomis, *N. benthamiana* augalų raiškos sistemoje

iki šiol buvo susintetinta daug mažiau alerginių baltymų, tačiau tabako mozaikos viruso pagrindu sukonstruota laikinos raiškos sistema yra perspektyvi, ypač norint gauti alergenų, kurių raiška *E. coli* ląstelėse yra problematiška arba jie nepakankamai antigeniški. Tiek *E. coli* bakterijų, tiek *N. benthamiana* raiškos sistemos yra gana pigios, auginimo sąlygos nereikalauja tokių didelių kaštų kaip žinduolių ląstelių kultūrų sistemos. Naudojant bakterijų ir augalų raiškos sistemas alerginių baltymų gavimui, galima efektyviai pagerinti alergijų diagnostikos kokybę bei ilgalaikėje perspektyvoje užtikrinti geresnę asmens ir visuomenės sveikatą. Be to, augaluose efektyviai sintetinami augaliniai rekombinantiniai alergenai savo savybėmis turėtų būti identiški alergenams, aptinkamiems natūraliuose šaltiniuose, todėl ateityje jie galėtų būti panaudojami alergijų gydymui imunoterapijos būdu.

## IŠVADOS

1. Sukonstruoti augalinių alergenų (Art v 1, Art v 5, Bet v 1, Amb a 3) sulietų su MBP inkaru raiškos bakterijose vektoriai.
2. *E. coli* raiškos sistemoje panaudojant BL21 (DE3) Star ląstelių kamieną pavyko gauti efektyvią visų rekombinantinių augalinių alergenų sintezę. Išbandžius skirtingas auginimo sąlygas pavyko pagerinti Amb a 3 baltymo tirpumą.
3. Iš augalinės medžiagos išskirtos alergenus Ole e 7, Ole e 9, Ole e 10, Phl p 13, Pru p 3, Pyr c 1, Pyr c 3 koduojančios sekos.
4. Sukonstruoti aukščiau išvardintų alergenų raiškos vektoriai su skirtingomis modifikacijomis: bakteriniu MBP genu, su 6xHis inkarine seka prieš tikslinį geną ir su 6xHis inkarine seka už tikslinio geno. Į pirmus du vektorius buvo įterptos nesekretuojamų alergenų sekos arba sekretuojamų alergenų sekos be signalinių sekų, o į trečiąjį – sekretuojamų baltymų sekos su natyviomis signalinėmis sekomis.
5. Vykdyta rekombinantinių alergenų raiška *N. benthamiana* augaluose. SDS-PAGE poliakrilamidiniuose geliuose pavyko aptikti MBP-AlnG4, His-AlnG4, MBP-AmbA4, His-OleE9, MBP-PyrC1, His-PyrC1, SS-PruP3-His ir SS-PyrC3-His baltymus atitinkančias juosteles.



## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui dr. Raimundui Ražanskui už visokeriopą pagalbą, suteiktas vertingas žinias ir skirtą laiką.

Taip pat esu dėkinga dr. Mindaugui Zaveckui už pagalbą atliekant ląstelių ardymą ultragarsiniu dezintegratoriumi.

Dėkoju už Lietuvos mokslo tarybos projekto „Naujos technologijos rekombinantinių alergenų kūrimui“ (01.2.2-LMT-K-718-01-0008) paramą, finansuojamą iš Europos regioninės plėtros fondo lėšų.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Akdis, M.; Akdis, C. A. Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy: Multiple Suppressor Factors at Work in Immune Tolerance to Allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2014, 133 (3), 621–631. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.1088>.
2. Anami, S.; Njuguna, E.; Coussens, G.; Aesaert, S.; Van Lijsebettens, M. Higher Plant Transformation: Principles and Molecular Tools. *Int. J. Dev. Biol.* 2013, 57 (6-7–8), 483–494. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130232mv>.
3. Braga, M.; Quecchia, C.; Cavallucci, E.; Di Giampaolo, L.; Schiavone, C.; Petrarca, C.; Di Gioacchino, M. T Regulatory Cells in Allergy. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011, 24 (1 Suppl), 55S-64S.
4. Brencic, A.; Eberhard, A.; Winans, S. C. Signal Quenching, Detoxification and Mineralization of Vir Gene-Inducing Phenolics by the VirH2 Protein of *Agrobacterium Tumefaciens*: Metabolism of Phenolic Inducers. *Molecular Microbiology* 2004, 51 (4), 1103–1115. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03887.x>.
5. Bublin, M.; Breiteneder, H. Cross-reactivities of Non-homologous Allergens. *Allergy* 2019, all.14120. <https://doi.org/10.1111/all.14120>.
6. Burnett, M. J. B.; Burnett, A. C. Therapeutic Recombinant Protein Production in Plants: Challenges and Opportunities. *Plants People Planet* 2020, 2 (2), 121–132. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10073>.
7. Canto, T. Transient Expression Systems in Plants: Potentialities and Constraints. In *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization*; Vega, M. C., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2016; Vol. 896, pp 287–301. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27216-0\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27216-0_18).
8. Chen, Q.; Lai, H. Plant-Derived Virus-like Particles as Vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2013, 9 (1), 26–49. <https://doi.org/10.4161/hv.22218>.
9. Clark, D. P.; Pazdernik, N. J. Recombinant Proteins. In *Biotechnology*; Elsevier, 2016; pp 335–363. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385015-7.00010-7>.
10. Dawson, W. O. A Personal History of Virus-Based Vector Construction. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014, 375, 1–18. [https://doi.org/10.1007/82\\_2011\\_182](https://doi.org/10.1007/82_2011_182).

11. Desai, P. N.; Shrivastava, N.; Padh, H. Production of Heterologous Proteins in Plants: Strategies for Optimal Expression. *Biotechnology Advances* 2010, 28 (4), 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.005>.
12. Frossard, M. Novel Analytical Methods for Allergy-Related Studies. 2020, 15-18. <https://doi.org/10.5075/EPFL-THESIS-7271>.
13. Gao, R.; Lynn, D. G. Environmental PH Sensing: Resolving the VirA/VirG Two-Component System Inputs for Agrobacterium Pathogenesis. *JB* 2005, 187 (6), 2182–2189. <https://doi.org/10.1128/JB.187.6.2182-2189.2005>.
14. Gilles, S.; Akdis, C.; Lauener, R.; Schmid-Grendelmeier, P.; Bieber, T.; Schäppi, G.; Traidl-Hoffmann, C. The Role of Environmental Factors in Allergy: A Critical Reappraisal. *Exp Dermatol* 2018, 27 (11), 1193–1200. <https://doi.org/10.1111/exd.13769>.
15. Gleba, Y. Y.; Tusé, D.; Giritch, A. Plant Viral Vectors for Delivery by Agrobacterium. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014, 375, 155–192. [https://doi.org/10.1007/82\\_2013\\_352](https://doi.org/10.1007/82_2013_352).
16. Gould, H. J.; Sutton, B. J. IgE in Allergy and Asthma Today. *Nat Rev Immunol* 2008, 8 (3), 205–217. <https://doi.org/10.1038/nri2273>.
17. Guo, M.; Hou, Q.; Hew, C. L.; Pan, S. Q. Agrobacterium VirD2-Binding Protein Is Involved in Tumorigenesis and Redundantly Encoded in Conjugative Transfer Gene Clusters. *MPMI* 2007, 20 (10), 1201–1212. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-10-1201>.
18. Hayek, B.; Vangelista, L.; Pastore, A.; Sperr, W. R.; Valent, P.; Vrtala, S.; Niederberger, V.; Twardosz, A.; Kraft, D.; Valenta, R. Molecular and Immunologic Characterization of a Highly Cross-Reactive Two EF-Hand Calcium-Binding Alder Pollen Allergen, Aln g 4: Structural Basis for Calcium-Modulated IgE Recognition. *J. Immunol.* 1998, 161 (12), 7031–7039.
19. Hartley, J. L. Cloning Technologies for Protein Expression and Purification. *Current Opinion in Biotechnology* 2006, 17 (4), 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.06.011>.
20. Hausjell, J.; Kutscha, R.; Gesson, J. D.; Reinisch, D.; Spadiut, O. The Effects of Lactose Induction on a Plasmid-Free E. Coli T7 Expression System. *Bioengineering* 2020, 7 (1), 8. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7010008>.
21. Holgate, S. T.; Polosa, R. Treatment Strategies for Allergy and Asthma. *Nat Rev Immunol* 2008, 8 (3), 218–230. <https://doi.org/10.1038/nri2262>.

22. Hwang, H.-H.; Yu, M.; Lai, E.-M. *Agrobacterium* -Mediated Plant Transformation: Biology and Applications. *The Arabidopsis Book* 2017, 15, e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>.
23. Yamada, Y.; Kidoguchi, M.; Yata, A.; Nakamura, T.; Yoshida, H.; Kato, Y.; Masuko, H.; Hizawa, N.; Fujieda, S.; Noguchi, E.; Miura, K. High-Yield Production of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 With Allergen Immunogenicity in *Nicotiana Benthamiana*. *Front. Plant Sci.* 2020, 11, 344. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00344>.
24. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease; [Animated CD-ROM Inside]*, 5. ed.; Janeway, C., Ed.; Garland Publ. [u.a.]: New York, NY, 2001.
25. Yuan, Z.-C.; Liu, P.; Saenkham, P.; Kerr, K.; Nester, E. W. Transcriptome Profiling and Functional Analysis of *Agrobacterium Tumefaciens* Reveals a General Conserved Response to Acidic Conditions (PH 5.5) and a Complex Acid-Mediated Signaling Involved in *Agrobacterium*-Plant Interactions. *JB* 2008, 190 (2), 494–507. <https://doi.org/10.1128/JB.01387-07>.
26. Kavaliūnas, A; Šurkienė, G; Dubakienė, R; Stukas, R. Alergijos maistui epidemiologija: rizikos veiksniai, paplitimas, reikšmė. *Visuomenės sveikata* 2010, 4 (51), 35-44.
27. Kitzmüller, C.; Zulehner, N.; Roulias, A.; Briza, P.; Ferreira, F.; Faé, I.; Fischer, G. F.; Bohle, B. Correlation of Sensitizing Capacity and T-Cell Recognition within the Bet v 1 Family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2015, 136 (1), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.12.1928>.
28. Klimyuk, V.; Pogue, G.; Herz, S.; Butler, J.; Haydon, H. Production of Recombinant Antigens and Antibodies in *Nicotiana Benthamiana* Using “magniffection” Technology: GMP-Compliant Facilities for Small- and Large-Scale Manufacturing. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014, 375, 127–154. [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_212](https://doi.org/10.1007/82_2012_212).
29. Léonard, R.; Wopfner, N.; Pabst, M.; Stadlmann, J.; Petersen, B. O.; Duus, J. Ø.; Himly, M.; Radauer, C.; Gadermaier, G.; Razzazi-Fazeli, E.; Ferreira, F.; Altmann, F. A New Allergen from Ragweed (*Ambrosia Artemisiifolia*) with Homology to Art v 1 from Mugwort. *J. Biol. Chem.* 2010, 285 (35), 27192–27200. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.127118>.
30. Lin, Y.-H.; Gao, R.; Binns, A. N.; Lynn, D. G. Capturing the VirA/VirG TCS of *Agrobacterium Tumefaciens*. In *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*; Utsumi, R., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer

- New York: New York, NY, 2008; Vol. 631, pp 161–177. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-78885-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-0-387-78885-2_11).
31. Lin, J.; Alcocer, M. Overview of the Commonly Used Methods for Food Allergens. In *Food Allergens*; Lin, J., Alcocer, M., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2017; Vol. 1592, pp 1–9. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6925-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6925-8_1).
  32. Linhart, B.; Gstoettner, A.; Gamez, C.; Swoboda, I.; Mari, A.; Papadopoulos, N.; Valenta, R. Hypoallergenic Allergen Derivatives of Pru p 3 for Immunotherapy of IgE-Mediated Peach Allergy. *Clin Transl Allergy* 2013, 3 (S3), P177, 2045-7022-3-S3-P177. <https://doi.org/10.1186/2045-7022-3-S3-P177>.
  33. Marillonnet, S.; Thoeringer, C.; Kandzia, R.; Klimyuk, V.; Gleba, Y. Systemic *Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated Transfection of Viral Replicons for Efficient Transient Expression in Plants. *Nat. Biotechnol.* 2005, 23 (6), 718–723. <https://doi.org/10.1038/nbt1094>.
  34. Matricardi, P. M.; Dramburg, S.; Skevaki, C.; Renz, H. “Molecular Extracts” for Allergy Diagnostics and Therapy. *Pediatr Allergy Immunol* 2019, 30 (1), 55–58. <https://doi.org/10.1111/pai.13001>.
  35. Matricardi, P. M.; Dramburg, S.; Skevaki, C.; Renz, H. “Molecular Extracts” for Allergy Diagnostics and Therapy. *Pediatr Allergy Immunol* 2019, 30 (1), 55–58. <https://doi.org/10.1111/pai.13001>.
  36. McCullen, C. A.; Binns, A. N. *Agrobacterium Tumefaciens* and Plant Cell Interactions and Activities Required for Interkingdom Macromolecular Transfer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006, 22 (1), 101–127. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.011105.102022>.
  37. McHale, M.; Eamens, A. L.; Finnegan, E. J.; Waterhouse, P. M. A 22-Nt Artificial MicroRNA Mediates Widespread RNA Silencing in *Arabidopsis*. *Plant J* 2013, 76 (3), 519–529. <https://doi.org/10.1111/tpj.12306>.
  38. Mortimer, C. L.; Dugdale, B.; Dale, J. L. Updates in Inducible Transgene Expression Using Viral Vectors: From Transient to Stable Expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015, 32, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.009>.
  39. Neubauer, A. Expression and Analysis of Recombinant Human Collagen Prolyl 4-Hydroxylase in *E. Coli* and Optimization of Expression, University of Oulu, Oulu, 2006.
  40. Oettgen, H.; Broide, D. Allergy: introduction to mechanisms of allergic disease, fourth ed. Elsevier Limited, 2012, 1-32 p.

41. Paul, W.E. (Ed.),. *Fundamental immunology*, seventh ed. ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013,1313 p.
42. Rivero, L.; Scholl, R.; Holomuzki, N.; Crist, D.; Grotewold, E.; Brkljacic, J. Handling Arabidopsis Plants: Growth, Preservation of Seeds, Transformation, and Genetic Crosses. In *Arabidopsis Protocols*; Sanchez-Serrano, J. J., Salinas, J., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2014; Vol. 1062, pp 3–25. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-580-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-580-4_1).
43. Rosano, G. L.; Ceccarelli, E. A. Recombinant Protein Expression in Escherichia Coli: Advances and Challenges. *Front. Microbiol.* 2014, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>.
44. Rosano, G. L.; Morales, E. S.; Ceccarelli, E. A. New Tools for Recombinant Protein Production in *Escherichia Coli* : A 5-year Update. *Protein Science* 2019, 28 (8), 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>.
45. Sainsbury, F. Innovation in Plant-Based Transient Protein Expression for Infectious Disease Prevention and Preparedness. *Current Opinion in Biotechnology* 2020, 61, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.11.002>.
46. Sørensen, H. P.; Mortensen, K. K. Soluble Expression of Recombinant Proteins in the Cytoplasm of Escherichia Coli. *Microb. Cell Fact.* 2005, 4 (1), 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-1>.
47. Subramoni, S.; Nathoo, N.; Klimov, E.; Yuan, Z.-C. Agrobacterium Tumefaciens Responses to Plant-Derived Signaling Molecules. *Front. Plant Sci.* 2014, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00322>.
48. Tsai, W.-C.; Wu, T.-C.; Chiang, B.-L.; Wen, H.-W. Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Major Mango Allergen Man i 1 in Escherichia Coli. *Protein Expression and Purification* 2017, 130, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.06.009>.
49. Tsuda, K.; Qi, Y.; Nguyen, L. V.; Bethke, G.; Tsuda, Y.; Glazebrook, J.; Katagiri, F. An Efficient Agrobacterium-Mediated Transient Transformation of Arabidopsis: An Efficient Transient Transformation. *The Plant Journal* 2012, 69 (4), 713–719. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04819.x>.
50. Tzfira, T.; Citovsky, V. Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Plants: Biology and Biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2006, 17 (2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.01.009>.

51. Tzfira, T.; Vaidya, M.; Citovsky, V. Involvement of Targeted Proteolysis in Plant Genetic Transformation by *Agrobacterium*. *Nature* 2004, *431* (7004), 87–92. <https://doi.org/10.1038/nature02857>.
52. Vakili Moghaddam, M.; Fallahpour, M.; Mohammadi, M.; Rasi Varae, F. S.; Mokhtarian, K.; Khoshmirsafa, M.; Jafari, R.; Shirzad, N.; Falak, R. Identification of Polcalcin as a Novel Allergen of *Amaranthus Retroflexus* Pollen. *Allergologia et Immunopathologia* 2019, *47* (4), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.12.006>.
53. Valenta, R.; Karaulov, A.; Niederberger, V.; Gattinger, P.; van Hage, M.; Flicker, S.; Linhart, B.; Campana, R.; Focke-Tejkl, M.; Curin, M.; Eckl-Dorna, J.; Lupinek, C.; Resch-Marat, Y.; Vrtala, S.; Mittermann, I.; Garib, V.; Khaitov, M.; Valent, P.; Pickl, W. F. Molecular Aspects of Allergens and Allergy. In *Advances in Immunology*; Elsevier, 2018; Vol. 138, pp 195–256. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.03.002>.
54. Vieths, S.; Scheurer, S.; Ballmer-Weber, B. Current Understanding of Cross-Reactivity of Food Allergens and Pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, *964* (1), 47–68. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04132.x>.
55. Werner, S.; Breus, O.; Symonenko, Y.; Marillonnet, S.; Gleba, Y. High-Level Recombinant Protein Expression in Transgenic Plants by Using a Double-Inducible Viral Vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011, *108* (34), 14061–14066. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102928108>.
56. Wu, C.-F.; Lin, J.-S.; Shaw, G.-C.; Lai, E.-M. Acid-Induced Type VI Secretion System Is Regulated by ExoR-ChvG/ChvI Signaling Cascade in *Agrobacterium Tumefaciens*. *PLoS Pathog* 2012, *8* (9), e1002938. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002938>.
57. Wu, H.-Y.; Chung, P.-C.; Shih, H.-W.; Wen, S.-R.; Lai, E.-M. Secretome Analysis Uncovers an Hcp-Family Protein Secreted via a Type VI Secretion System in *Agrobacterium Tumefaciens*. *JB* 2008, *190* (8), 2841–2850. <https://doi.org/10.1128/JB.01775-07>.
58. Wu, H.-Y.; Liu, K.-H.; Wang, Y.-C.; Wu, J.-F.; Chiu, W.-L.; Chen, C.-Y.; Wu, S.-H.; Sheen, J.; Lai, E.-M. AGROBEST: An Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transient Expression Method for Versatile Gene Function Analyses in *Arabidopsis* Seedlings. *Plant Methods* 2014, *10* (1), 19. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-19>.
59. Zaltsman, A.; Krichevsky, A.; Kozlovsky, S. V.; Yasmin, F.; Citovsky, V. Plant Defense Pathways Subverted by *Agrobacterium* for Genetic Transformation. *Plant*

*Signaling & Behavior* 2010, 5 (10), 1245–1248.  
<https://doi.org/10.4161/psb.5.10.12947>.

60. Zaltsman, A.; Krichevsky, A.; Loyter, A.; Citovsky, V. Agrobacterium Induces Expression of a Host F-Box Protein Required for Tumorigenicity. *Cell Host & Microbe* 2010, 7 (3), 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.02.009>.
61. Zhang, H.; Kong, H.; Zeng, X.; Guo, L.; Sun, X.; He, S. Subsets of Regulatory T Cells and Their Roles in Allergy. *J Transl Med* 2014, 12 (1), 125. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-125>.



VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
BIOTECHNOLOGIJOS INSTITUTAS

Rugilė Drulytė

Magistro baigiamasis darbas

**Rekombinantinių augalinių alergenų sintezė augalų ir bakterijų raiškos  
sistemose**

SANTRAUKA

Dabartinėje alergijų diagnostikoje ir imunoterapijoje paprastai naudojami alergenų ekstraktai, kurie leidžia nustatyti alergijos šaltinius, tačiau nėra tinkami atskirų molekulių identifikavimui. Daugelį problemų, susijusių su natūraliais alergenų ekstraktais, galima išspręsti naudojant genų inžineriniu būdu gautus rekombinantinius alergenus. Norint panaudoti baltymus biomediciniuose tyrimuose yra reikalingi dideli kokybiškai išgryninti jų kiekiai, tačiau tik nedaugelis baltymų natūraliuose šeiminiuose yra sintetinami pakankamai gausiai. Nuo baltymo ypatybių priklauso kokią sistemą pasirinkti jo sintezei, o norint gauti reikiamą rezultatą kartais tenka išbandyti ir kelias iš jų.

Šiame darbe augalinių alergenų sintezei pasirinktos *Escherichia coli* raiškos ir *Nicotiana benthamiana* laikinos raiškos sistemos. Paprastojo kiečio (lot. *Artemisia vulgaris*) Art v 1 ir Art v 5, karpotojo beržo (lot. *Betula pendula*) Bet v 1 ir kietinės ambrozijos (lot. *Ambrosia artemisiifolia*) Amb a 3 rekombinantiniai baltymai sėkmingai susintetinti bakterijų raiškos sistemoje. Paprastojo kiečio Art v 6, juodalksnio (lot. *Alnus glutinosa*) Aln g 4, kietinės ambrozijos Amb a 4, europinio alyvmedžio (lot. *Olea europaea*) Ole e 7, Ole e 9 ir Ole e 10, paprastosios kriaušės (lot. *Pyrus communis*) Pyr c 1 ir Pyr c 3, pašarinio motiejuko (lot. *Phleum pratense*) Phl p 13 bei persiko (lot. *Prunus persica*) Pru p 3 rekombinantiniai baltymai sintetinti augalų raiškos sistemoje. SDS-PAGE poliakrilamidiniuose geliuose aptiktos Aln g 4, Amb a 4, Ole e 9, Pyr c 1, Pru p 3 ir Pyr c 3 baltymus atitinkančios juostelės.

VILNIUS UNIVERSITY  
LIFE SCIENCES CENTER  
INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY

Rugilė Drulytė

Master thesis

**The synthesis of recombinant plant allergens in plant and bacterial  
expression systems**

SUMMARY

In the diagnosis and immunotherapy of allergies, allergen extracts are commonly used, which allow the identification of allergy sources, but are not suitable for the identification of individual molecules. Many of the problems associated with natural allergen extracts can be solved by the use of genetically engineered recombinant allergens. Biomedical researchers need large amounts of high-quality purified protein, but only a small number of proteins in natural hosts are synthesized in sufficient abundance. It depends on the characteristics of the protein which system to choose for its synthesis, and sometimes you have to try several of them to get the required result.

*Escherichia coli* expression and *Nicotiana benthamiana* transient expression systems were chosen for the synthesis of plant allergens in this work. Mugwort (lot. *Artemisia vulgaris*) Art v 1 and Art v 5, birch (lot. *Betula pendula*) Bet v 1 and ragweed (lot. *Ambrosia artemisiifolia*) Amb a 3 recombinant proteins have been successfully synthesized in the bacterial expression system. Mugwort Art v 6, black alder (lot. *Alnus glutinosa*) Aln g 4, ragweed Amb a 4, olive (lot. *Olea europaea*) Ole e 7, Ole e 9 and Ole e 10, pear (lot. *Pyrus communis*) Pyr c 1 and Pyr c 3, timothy grass (lot. *Phleum pratense*) Phl p 13, peach (lot. *Prunus persica*) Pru p 3 recombinant proteins were synthesized in the plant expression system. Aln g 4, Amb a 4, Ole e 9, Pyr c 1, Pru p 3 and Pyr c 3 proteins were detected on SDS-PAGE polyacrylamide gels.