

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos magistrantė

Aurelija Šileikaitė

Magistrinis darbas

**Augalinių alergenų sintezė *Nicotiana benthamiana* laikinos
raiškos sistemoje**

Darbo vadovas:

Dr. Raimundas Ražanskas

Vilnius 2019

Augalinių alergenų sintezė *Nicotiana benthamiana* laikinos raiškos sistemoje

Darbas atliktas Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriuje

Aurelija Šileikaitė

/parašas/

Darbo vadovas:

Leisti/neleisti gintis:

Dr. Raimundas Ražanskas

/parašas/

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1 Alergija.....	11
1.1.1 Alerginių reakcijų veikimo mechanizmas.....	11
1.1.2 Alergenų kryžminės reakcijos	13
1.2 Augalinių alergenų klasifikacija	14
1.2.1 Prolaminų superšeima	14
1.2.2 „Cupin“ superšeima	16
1.2.3 Bet v 1 superšeima.....	17
1.2.4 Profilinų superšeima	19
1.3 Diagnostika.....	20
1.4 Augalų raiškos sistemos.....	20
1.4.1 Nevirusinės raiškos sistemos.....	21
1.4.2 Virusinės raiškos sistemos	23
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	27
2.1 Medžiagos ir aparatūra.....	27
2.1.1 Medžiagos ir reagentai.....	27
2.1.2 Rinkiniai.....	28
2.1.3 Naudota aparatūra.....	28
2.1.4 Naudota DNR kilmė	28
2.1.5 Plazmidės	29
2.1.6 Oligonukleotidai	29
2.1.7 Mikroorganizmų kamienai	32
2.1.8 Tirpalai	32
2.1.9 Mitybinės terpės ir tirpalai bakterijų auginimui	33
2.1.10 Baltymų (Western) hibridizacija tirpalai.....	33
2.2 Metodai	33
2.2.1 Polimerazės grandininė reakcija (PGR).....	33
2.2.2 DNR elektroforezė agaroziniame gelyje.....	34
2.2.3 DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio	34
2.2.4 DNR ligavimas	34

2.2.5	Šaldytų kompetentinių <i>E.coli</i> bakterijų paruošimas	35
2.2.6	<i>E.coli</i> bakterijų transformacija	35
2.2.7	Plazmidinės DNR skyrimas iš bakterijų	36
2.2.8	DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis	36
2.2.9	Šaldytų kompetentinių <i>Agrobacterium tumerfaciens</i> bakterijų paruošimas	36
2.2.10	<i>A. tumerfaciens</i> transformacija	36
2.2.11	Agrobakterijų infiltracija į <i>Nicotiana benthamiana</i> augalų lapus	37
2.2.12	Baltymų išskyrimas iš <i>N. benthamiana</i> augalų lapų	37
2.2.13	Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis	37
2.2.14	Baltymų (Western) hibridizacija	38
3.	REZULTATAI	39
3.1	Tikslinių baltymų klonavimas	39
3.2	Raiškos vektorių konstravimas	42
3.3	Sukonstruotų raiškos vektorių patikrinimas	45
3.4	Rekombinantinių augalinių alergenų raiška	48
3.5	Baltymų imuninė (Western) hibridizacija	52
4.	REZULTATŲ APTARIMAS	54
	IŠVADOS	58
	SANTRAUKA	59
	SUMMARY	60
	PADĖKA	61
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	62

SANTRUMPOS

Act d – *Actinidia deliciosa*;

Aln g – *Alnus glutinosa*;

Ana c – *Ananas comosus*;

Angl. – angliškai;

Api m - *Apis mellifera*;

APS - amonio persulfatas;

aps. – apsisukimai;

Ara h – *Arachis hypogaea*;

Art v – *Artemisia vulgaris*;

AtACT2 - *A. thaliana* aktino 2 promotorius;

Bet v – *Betula pendula*;

Bla g – *Blattella germanica*;

BMV – bromo mozaikos virusas;

bp – bazių pora;

C5a – komplemento 5a faktorius;

Can f – *Canis familiaris*;

Cys – cisteinas;

Cor a – *Corylus avellana*;

CP – paviršiaus baltymas (angl. *coat protein*);

Cuc m – *Cucumis melo*;

Der f – *Dermatophagoides farinae*;

Der p – *Dermatophagoides pteronyssinus*;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

dNTP – deoksiribonukleotidtrifosfatas;

dpi – diena po infiltracijos;

DTT – DL-ditiotreitolis;

EDTA – Etilendiamintetraacto rūgštis;

Fel d – *Felis domesticus*;

GFP – žaliai fluorescuojantis baltymas;

Gly m – *Glycine max*;

GMO – genetiškai modifikuotas organizmas;

Hel a - *Helianthus annuus*;

HEPES – (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfoninė rūgštis;

His-tag – šešių histidinių liekanų seka;

Hor v – *Hordeum vulgare*;

IgE – imunoglobulinas E;

IL – interleukinas;

Jug r – *Juglans regia*;

kb – kilobazė, tūkstantis bazių porų;

kDa – kilodaltonas, tūkstantis daltonų;

kDNR – kopijinė DNR;

kV – kilovoltas;

LB – Luria-Bertani mitybinė terpė;

LPS – Lipopolisacharidas;

LTP – lipidų pernašos baltymai;

mA – miliamperas;

Mal d – *Malus domestica*;

MBP – maltozę surišantis baltymas;

MES – 2-(N-morfolino)etanosulfatas;

MP – judėjimo baltymas (angl. *movement protein*);

NLS – branduolio lokalizacijos signalas (angl. *nuclear localization signal*);

nsLTP – nespecifiniai lipidų pernašos baltymai;

Ole e – *Olea europaea*;

PAR – proteazių aktyvuojamas receptorių;

Pen c - *Penicillium citrinum*;

PGR – Polimerazinė grandininė reakcija;

Phl p – *Phleum pratense*;

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

Poa p – *Poa pratensis*;

PPI – polifosfoinosifidai;

PR – su patogenezė susiję baltymai (angl. *Pathogenesis-related proteins*);

Pro j – *Prosopis juliflora*;

Pru av – *Prunus avium*;

Pru du – *Prunus dulcis*;

Pru p – *Prunus persica*;

PVDF – Polivinildifluorido membrana;

RT-PGR – atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija;

SDS – natrio dodecilsulfatas;

SDS-PAGE - natrio dodecilsulfato denatūruojanti poliakrilamidinio gelio elektroforezė;

Ses i – *Sesamum indicum*;

SOB – super optimal broth mitybinė terpė;

TAE – Tris, acto rūgštis, EDTA buferis;

TB – Tris-borato buferis;

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

Th – T limfocitai pagalbininkai;

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

TLR – *toll-like* receptorius;

TMV – tabako mozaikos virusas;

Tri a – *Triticum aestivum*;

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

TSLP – užkrūčio stromos limfopoetinas;

UV - Ultravioletiniai spinduliai;

ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas;

ĮVADAS

Įvairios alergijos dažnai apsunkina daugelio pasaulio gyventojų kasdienybę. Per daug stiprią imuninę reakciją žmogaus organizme gali sukelti skirtingi baltymai, kurie paprastai nėra kenksmingi (Schmidt *et al.*, 2008). Iki šiol diagnostikoje ir terapijos tikslais paprastai naudojami tik alergenų ekstraktai, kurie yra gaunami iš gamtinės žaliavos – alergenų šaltinio (Ferreira *et al.*, 2014). Tačiau produktai iš natūralių šaltinių dažnai susideda iš daugiau nei vieno komponento, gali turėti įvairių alergijų nesukeliančių priemaišų ar molekulių patekusių iš kito alergenų šaltinio (Schmidt *et al.*, 2008). Dabartinėje diagnostikoje naudojami ekstraktai leidžia nustatyti alergijos šaltinius, tačiau nėra tinkami atskirų molekulių atpažinimui. Dėl dažnos alerginių baltymų homologijos pacientams, kurių imunitetas stipriau reaguoja į daugiau nei vieną alergijos šaltinį, pasireiškia kryžminės reakcijos. Tokiu atveju IgE antikūnai jungiasi ne tik prie jam specifinio baltymo, bet ir prie homologišku, kurie gali būti patekę iš visai kito šaltinio (Ferreira *et al.*, 2014).

Nepaisant to, jog per pastaruosius du dešimtmečius, didelė dalis alergenų buvo charakterizuota ir standartizuota, o diagnostikoje plačiai naudojamų alergenų ekstraktų kokybė stipriai pagerėjo (Schmidt *et al.*, 2008), vis dar reikia didelių atskirų alergenų molekulių kiekių, kad juos būtų galima taikyti praktikoje.

Baltymų, reikalaujančių potransliacinių modifikacijų, raiškai ne visada tinka prokariotinės sistemos, kadangi jose baltymas netinkamai susilanksto ar negauna reikiamų potransliacinių modifikacijų. Nemaža dalis alergijas iššaukiančių baltymų yra augalinės kilmės, todėl jų gamybai tinkamiausia turėtų būti augalų raiškos sistema (Schmidt *et al.*, 2008). Vienos perspektyviausių augalinių raiškos sistemų yra *Nicotiana benthamiana* rekombinantinių virusinių vektorių sistemos, pasižyminčios didele tikslinio baltymo išeiga, trumpu laikotarpiu nuo geno iki produkto ir pigumu (Hefferon, 2014).

Šiame darbe buvo siekiama patikrinti, ar *N. benthamiana* augalai yra tinkama raiškos sistema rekombinantinių juodalksnio (lot. *Alnus glutinosa*) Aln g 1, Europinio alyvmedžio (lot. *Olea europaea*) Ole e 1, pievinės miglės (lot. *Poa pratensis*) Poa p 1, valgomojo ananaso (lot. *Ananas comosus*) Ana c 2, persiko (lot. *Prunus persica*) Pru p 1, paprastojo lazdyno (lot. *Corylus avellana*) Cor a 2, paprastosios saulėgražos (lot. *Helianthus annuus*) Hel a 3 bei paprastojo kiečio (lot. *Artemisia vulgaris*) Art a 6 baltymų gamybai, užkrečiant augalus modifikuotu tabako mozaikos virusu.

Darbo tikslas: sukonstruoti *Nicotiana benthamiana* augalų laikinos raiškos sistemą ir panaudoti ją pasirinktų alergenų sintezei.

Darbo uždaviniai:

1. Išskirti iš natūralių šaltinių pasirinktų alergenų koduojančias sekas;
2. Sukonstruoti laikinos raiškos vektorius su skirtingais baltymineis inkarais;
3. Sukonstruoti reporterinius genų raiškos vektorius, leidžiančius vizualiai įvertinti jų efektyvumą;
4. Sukonstruoti pasirinktų alergenų raiškos vektorius;
5. Vykdyti alergenų raišką *N. benthamiana* lapuose, ją optimizuoti ir įvertinti tikslinių baltymų sintezės efektyvumą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

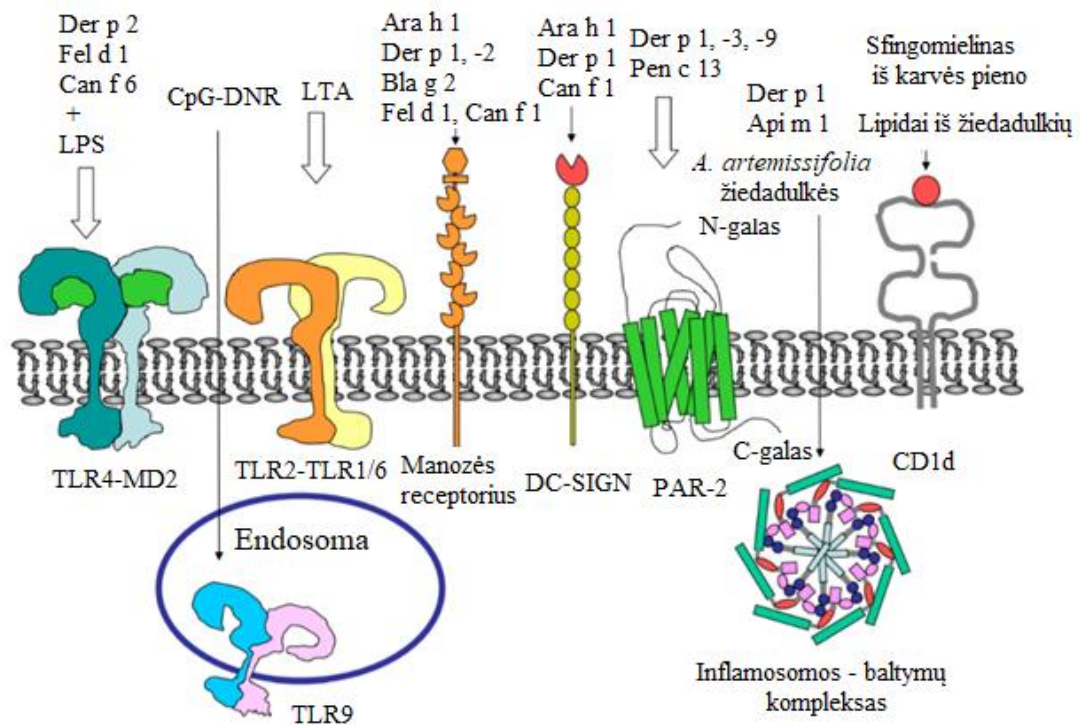
1.1 Alergija

Alergija yra pernelyg stipri imuninių procesų sukelta reakcija į svetimus baltymus, kurie paprastai daugumai žmonių nėra kenksmingi, pavyzdžiui, augalų žiedadulkės ar kai kurie maisto produktai (Kavaliūnas *et al.*, 2010). Alerginės reakcijos gali atsirasti bet kurioje kūno vietoje, tačiau dažniausiai pastebimos ant odos ar gleivinės, nes tai yra pagrindiniai barjerai, skiriantys organizmą nuo aplinkos (Akdis *et al.*, 2014). Alerginiai sutrikimai tampa vis aktualesne problema. Net 30 % pasaulio gyventojų kenčia nuo pernelyg stiprios organizmo reakcijos į tam tikrus alergenų (Anto *et al.*, 2017).

Dažniausi alergenų šaltiniai yra namų dulkių erkės, įvairių žolių, medžių žiedadulkės, maisto produktai (riešutai, žuvis, pienas, kiaušiniai, kviečiai, vaisiai), pelėsiai, gyvūnų pleiskanos ir daug kitų (Giangieco *et al.*, 2012).

1.1.1 Alerginių reakcijų veikimo mechanizmas

Alergenai sąveikauja su įgimtos imuninės sistemos komponentais sukeldami įgytos imuninės sistemos atsaką (1.1 pav.). Įgimtą imuninę sistemą sudaro įvairaus tipo ląstelės, turinčios atpažinimo receptoriai (angl. *recognition receptors*), kurie atpažįsta patogeną ar grėsmę keliančias molekules (Akdis *et al.*, 2014).



1.1 pav. Alergenų aktyvuotas igimtos imuninės sistemos veikimo mechanizmas. Pateikiami kai kurių alergenų sąveikos pavyzdžiai su *toll-like* receptoriais, C tipo lektino receptoriais per angliavandenių liekanas, esančias alergenuose, su proteazių aktyvintu receptoriumi (PAR-2) per alergenų proteolitinį aktyvumą ir su inflamosomų kompleksu. Pagal Akdis *et al.*, 2014

Ląstelės paviršiuje yra įvairių atpažinimo receptorių. Tokie alergenai kaip Der p 2 (namų dulkių erkė), Fel d 1 (katė) bei Can f 6 (šuo) rišasi su lipopolisacharidais (LPS) ir sąveikauja su TLR4 receptoriumi (angl. *toll-like receptor*), kuris sužadina imuninio atsako pradininkus T pagalbininkus (Th). C tipo lektino receptoriai turi angliavandenių atpažinimo sritis, kurios riša glikozilintus alergenus ir sukelia T ląstelių susitelkimą. Ara h 1 (žemės riešutai), Der p 1 (namų dulkių erkė) bei Can f 1 alergenai sąveikauja su C tipo lektino receptoriais – DC-SIGN. Ara h 1, Der p 1, Der p 2, Fel d 1, Can f 1 bei Bla g 2 (tarakonas) sąveikauja su manozės receptoriais. Proteazių aktyvuojamų receptorių (PAR) signalas reaguoja į ekstraląstelines proteazes. Namų dulkių erkučių (Der p 1, -3, -9) bei pelėsių (Pen c 13) alergenai aktyvuoja PAR-2, kas indukuoja interleukiną IL25 bei užkrūčio stromos limfopoetinas (TSLP), inicijuojančius Th2 atsaką. Der p 1, Api m 4 (bitė) bei *Ambrosia artemisiifolia* žiedadulkės aktyvuoja inflamosomas – baltymų kompleksus, kurie pradeda uždegimo reakciją (Akdis *et al.*, 2014).

Epitelio ląstelės veikia kaip fizikinis barjeras, kurio jungiamieji baltymai gali būti skaidomi proteazių, tokių kaip Der p 1 ar Act d 1 (kivis). Po alergeno kontakto epitelio ląstelės

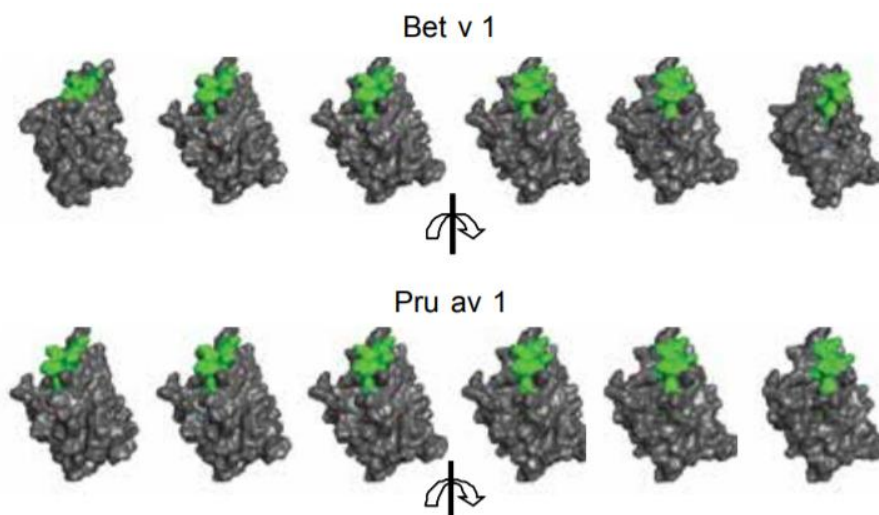
gamina TSLP, IL25 ir IL-33, kurie aktyvina dendritines ląsteles, o pastarosios sukelia Th2 atsaką (Anto *et al.*, 2017). Th2 ląstelės gamina citokinus, tokius kaip interferoną IL4 bei IL3. Šie indukuoja specifinių antikūnų, imunoglobulinų E (IgE), gamybą (Valenta *et al.*, 2015).

Paprastai alerginės reakcijos nesukelia rimtesnių simptomų, tačiau pasireiškus sunkioms reakcijoms, svarbu tinkamai nustatyti alergenų šaltinius, į kuriuos pacientas reaguoja (Giangieco *et al.*, 2012).

1.1.2 Alergenų kryžminės reakcijos

Alergenai yra skirstomi į baltymų šeimas pagal esmines savybes, pavyzdžiui, aminorūgščių panašumą ar molekulės struktūrą. Tai pačiai baltymų šeimai priklausantys nariai gali jungtis prie tų pačių IgE bei T ląstelių epitopų, kas sukelia kryžmines reakcijas. Geriausiai ištirtos maisto alergenų kryžminės reakcijos su beržų žiedadulkių alergenu Bet v 1. Tokia reakcija pasireiškia daugiau nei 70 % beržo žiedadulkėms alergiškiems pacientams bei yra dažniausia alergijos tam tikram maistui priežastis (Akdis *et al.*, 2014).

Bet v 1 homologų randama įvairiame maiste: Mal d 1 obuoliuose, Pru av 1 trešnėse, Gly m 4 sojoje (lot. *Glycine max*), Ara h 8 žemės riešutuose. Nepaisant to, kad paminėti alergenai nepriklauso beržo medžiams, jų pirminė bei tretinė struktūros yra homologiškos Bet v 1 molekulei (1.2 pav.)



1.2 pav. Bet v 1 ir Pru av 1 molekulių homologiniai konformaciniai epitopai, sukeliantys IgE kryžminį reaktyvumą. Prognozuojamas IgE epitopas molekulėse pavaizduotas žalia spalva. Pagal Akdis *et al.*, 2014.

Dėl Bet v 1 ir Pru av 1 molekulių panašumo, žmogus alergiškai reaguoja ne tik į beržo žiedadulkes, bet ir į trešnių uogas (Akdis *et al.*, 2014).

Alergenų kryžminės reakcijos gali nulemti klaidingas išvadas diagnostikoje, kadangi kiekvieno alergeno šaltinio komponentas turi skirtingą charakteristiką. Būtent dėl šios priežasties, labai svarbu identifikuoti atskiras alergeno šaltinio molekules, suteikiančias svarbią informaciją tiriant alergišką pacientą.

1.2 Augalinių alergenų klasifikacija

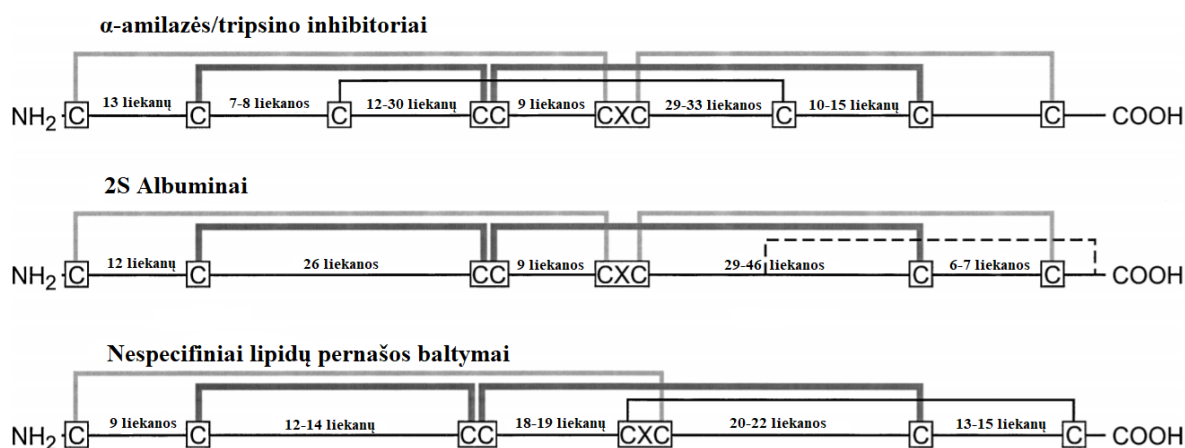
Nuo devintojo dešimtmečio pabaigos, pradėjus nagrinėti pirmuosius alergenus molekulinio lygiu, buvo identifikuota šimtai alergenų iš įvairių šaltinių. Šiuo metu egzistuoja nemažai duomenų bazių, kaupiančių informaciją apie alergenus: *International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Subcommittee* (<http://www.allergen.org>), *The Allergome* (<http://www.allergome.org>), *the Food Allergy Research and Resource Program Allergen Database* (<http://www.allergenonline.com>) bei *InFormAll* duomenų bazė (<http://foodallergens.ifr.ac.uk/>). Daugelis iš jų alergenų klasifikuoja pagal šaltinius. Dėl plačiai atliekamų tyrimų bei didėjančio skaičiaus prieinamų alergenų sekų ir struktūrų, pastarieji pradėti klasifikuoti pagal baltymų šeimas (Breiteneder, 2008). Baltymai, turintys >30 % sekos panašumą arba labai panašias funkcijas ir struktūrą, priskiriami vienai šeimai. Baltymai su mažu sekos panašumu, tačiau pagal struktūros ir funkcines savybes, rodantys bendrą evoliucijos kilmę, priskiriami superšeimoms (L Lo Conte *et al.*, 2002).

Pagal *InFormAll* duomenų bazę, yra išskiriama 151 alergenų baltymų šeima, augalų alergenai priklauso 67 baltymų šeimoms. Daugiausiai augalinių alergenų priklauso vienai iš keturių superšeimų: prolaminų, *Cupin*, Bet v 1 bei profilinų.

1.2.1 Prolaminų superšeima

Prolaminai – tai savitą aminorūgščių sudėtį bei fizikines-chemines savybes turintys augalinės kilmės baltymai. Sudaro pagrindinę glitimo masę grūduose. Išskirtinė prolaminų savybė – tirpumas 60-80 % vandeniliniame alkoholio tirpale, kai tuo tarpu kiti baltymai iškrenta nuosėdomis. Šiai superšeimai priklausantys baltymai turi jiems būdingą alfa-spiralės domeną. Pastarajame yra konservatyvių cisteino liekanų, formuojančių nuo trijų iki penkių disulfidinių tiltelių. Dauguma baltymų turi būdingą aminorūgščių sekos Cys-Cys ir Cys-X-Cys motyvą, kuriame X yra bet kokia aminorūgštis, išskyrus cisteiną (1.3 pav.). Be konservatyvių cisteino

liekanų, prolaminų superšeimai priklausantys baltymai tarpusavyje neturi didelio sekų panašumo (Matricardi *et al.*, 2016).



1.3 pav. Prolaminų šeimos nariams priklausančios konservatyvios cisteino liekanos, formuojančios disulfidinius tiltelius. Ištinės linijos vaizduoja nustatytus disulfidinių tiltelių ryšius, o numanomos disulfidinių tiltelių jungtys pavaizduotos punktyrine linija. Pagal Mills *et al.*, 2004

Kelios prolaminams priklausančios baltymų šeimos buvo apibūdintos kaip alergenai: grūdiniai prolaminai (gliadinai ir gliuteninai), bifunkciniai inhibitoriai, 2S albuminai bei nespecifiniai lipidų pernašos baltymai (Matricardi *et al.*, 2016).

Grūdiniai (angl. *cereal*) prolaminai – grūdų sėklose kaupiami baltymai. Šiai šeimai priklauso gliadinai ir glutaninai. Gliadinai yra tirpūs alkoholyje ir skirstomi į α , β , γ bei ω -glutaminus. Glutaninai yra disulfidinėmis jungtimis sujungti polimeriniai baltymai (Shewry *et al.*, 2002), skirstomi į didelės ir mažos molekulinės masės grupes. Kviečiuose (lot. *Triticum aestivum*) randama keletas prolaminų: **Tri a 19** (ω -5 gliadinas), **Tri a 21** (α / β gliadinas) bei gliuteninas **Tri a 26** (Matricardi *et al.*, 2016).

Bifunkciniai inhibitoriai – tai 12-16 kDa baltymai, tarpusavyje sujungti nuo keturių iki šešių disulfidinių tiltelių (Shewry *et al.*, 2002). Pagal jų subvienetų agregacijos laipsnį, baltymai gali egzistuoti skirtingų formų: monomeriniai, heterodimeriniai ar heterotetrameriniai (Salcedo *et al.*, 2011). Kaip ir grūdiniai prolaminai, randami tik grūduose, alergizuoja kvėpavimo takus bei virškinamąjį traktą (Shewry *et al.*, 2002). Bifunkcinių inhibitorių šeimai priklauso miežių (lot. *Hordeum vulgare*) monomerinis α -amilazės inhibitorius **Hor v 15**, dimeriniai **Tri a 28** bei tetrameriniai **Tri a 29** kviečių inhibitoriai (Matricardi *et al.*, 2016).

2S albuminai – pagrindinė augalų sėklose saugomų baltymų grupė. Dauguma 2S albuminų sintetinami kaip vienos grandinės baltymai, kurie vėliau skyla į mažus ir didelius subvienetus. Tokios dvi dalys yra laikomos kartu kaip kompaktiškos α spiralės molekulės,

turinčios nuo keturių iki penkių disulfidinių jungčių (Moreno *et al.*, 2008). Dauguma svarbių augalų sėklų bei riešutų alergenų priklauso 2S albuminų šeimai: **Ara h 2**, **Ara h 6** iš žemės riešutų (lot. *Arachis hypogaea*), **Ses i 1** iš sezamo sėklų (lot. *Sesamum indicum*), **Cor a 14** iš paprastojo lazdyno riešutų (lot. *Corylus avellana*) (Matricardi *et al.*, 2016).

Nespecifiniai lipidų pernašos baltymai (nsLTPs) – geba pernešti skirtingų tipų fosfolipidus iš liposomų į mitochondrijas (Breiteneder, 2005). Nepaisant to, naujesnėje literatūroje, nsLTP baltymų funkcija siejama su augalo apsauga prieš grybelius ir bakterijas (Matricardi *et al.*, 2016). Dėl šios priežasties dažnai priskiriami su patogenezė susijusių (PR) baltymų superšeimai. LTP šeimai priklausantys baltymai pasižymi bazinėmis savybėmis, yra maži su dideliu atsparumu karščio fermentinei denatūracijai (Lindorff-Larsen *et al.*, 2001). Atsižvelgiant į skirtingą baltymų molekulinę masę yra skirstomi į du pogrupius - LTP1 (9 kDa) ir LTP2 (7 kDa). Šie pogrupiai nepasižymi didele aminorūgščių sekos homologija, išskyrus aštunto cisteino motyvą, tačiau turi panašią erdvinę struktūrą (Carvalho *et al.*, 2007). LTP1 pogrupio baltymams būdingos keturios alfa spirālės, sujungtos disulfidiniais tilteliais, taip sudarydamos centrinį hidrofobinį tunelį, sąveikaujantį su lipidų molekulėmis (Hauser *et al.*, 2010). LTP2 baltymų struktūra yra labai panaši, tačiau šie baltymai turi tris alfa spirales bei sritį su dviem viengrandėmis spirālėmis (Poznanski *et al.*, 1999).

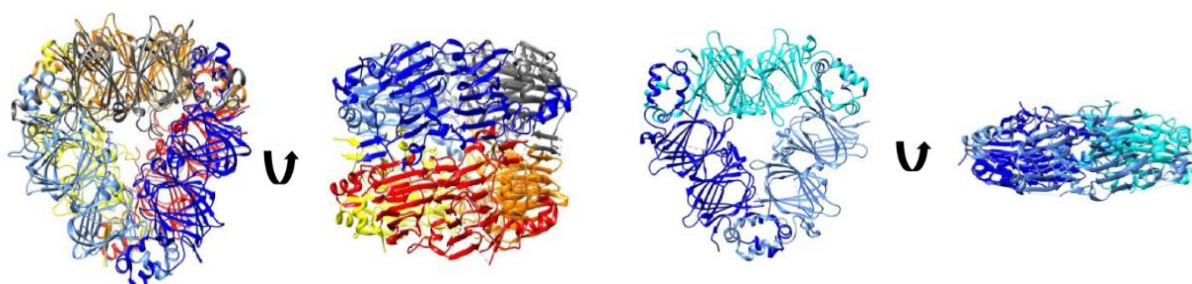
Šiai šeimai priskiriama daug alergenų: Mal d 3 bei Mal d 2 iš obuolio (lot. *Malus domestica*), Pru p 3 iš persiko (lot. *Prunus persica*), Cor a 8 iš paprastojo lazdyno (lot. *Corylus avellana*), Art v 3 iš paprastojo kiekčio (lot. *Artemisia vulgaris*) ir kt. (Matricardi *et al.*, 2016).

1.2.2 „Cupin“ superšeima

Tai didelė baltymų grupė su 57 šeimomis. Didžiausios šeimos – 7/8S ir 11S globulinai, kaupiami augalų sėklose (Matricardi *et al.*, 2016). Galimos dvi „Cupin“ funkcinės klasės: monokupiniai ir bikupiniai, atitinkamai turintys vieną arba du konservatyvius domenų (Dunwell *et al.*, 2004). Šiai alergenų superšeimai priskiriami viciliniai, leguminai.

Vicilinių (7S globulinai) kartu su leguminų (11S globulinai) struktūroms būdingos β statinės. Paprastai šie glikoproteinai yra apdorojami proteolitinu būdu, kad būtų gautos įvairios izoformos. Natūraliai gamtoje randami viciliniai yra homotrimeriniai baltymai, kurių bendra molekulinė masė apie 150-190 kDa (Roux *et al.*, 2013). Šios molekulės turi nedaug cisteinų, todėl nesudaro disulfidinių tiltelių. Pagrindiniai atstovai: žemės riešutų alergenai – Ara h 1, Gly m 5 iš sojų, Jug r 2 iš riešutmedžio (lot. *Juglans regia*) bei Ses i 3 iš sezamų sėklų (Matricardi *et al.*, 2016).

Leguminai yra didelės molekulinės masės (apie 350 kDa) baltymai, susidedantys iš šešių subvienetų (1.4 pav.). Pirmiausia šie baltymai apdorojami, kad endoplazminiame tinkle susidarytų trimerai, o po to būtų perkeltami į ląstelės vakuoles. Čia kiekvienas subvienetas yra suskirstytas į rūgštinį (40 kDa) ir bazinį (20 kDa) polipeptidą, kurie yra sujungiami disulfidiniais tilteliais, sudarydami heksamerinę struktūrą (Shewry *et al.*, 1995).



Leguminas: kokosas (PDB: 1XGF)

Vicilinas: pekano riešutas (PDB: 5E1R)

1.4 pav. Legumino ir vicilino 3D molekulių struktūros. Pagal Roux *et al.*, 2013

1.2.3 Bet v 1 superšeima

Bet v 1 superšeimai priklauso 14,065 baltymų, aptinkamų visuose trijuose evoliuciniuose domenuose: bakterijose, archėjose, eukariotuose. Visų Bet v 1 superšeimai priklausančių baltymų struktūra yra labai panaši: septynios beta klostės ir trys alfa spirалės, sudarančios V formos struktūrą (Matricardi *et al.*, 2016). Bet v 1 superšeimos nariai suskirstyti į 14 šeimų, sudarančių subšeimas (Radauer *et al.*, 2008). Didžiausia baltymų šeima, priklausanti Bet v 1 superšeimai, su patogenezė susijusių baltymų šeima (PR) (Fernandes *et al.*, 2013).

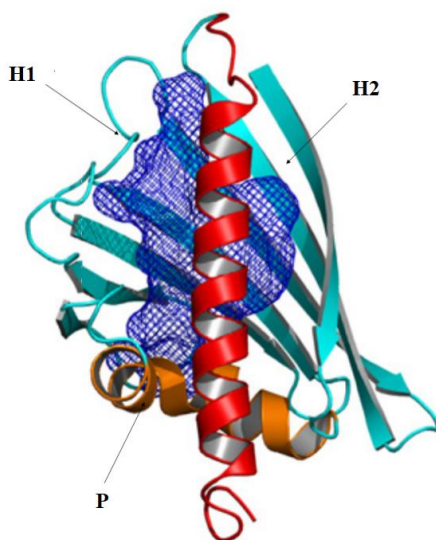
1.2.3.1 Su patogenezė susiję baltymai (PR)

PR baltymai yra įgimtos imuninės sistemos komponentai augaluose. Jie dalyvauja apsaugoje prieš patogenus. PR baltymų šeimai priklausantys nariai neturi didelio sekų panašumo, tačiau turi kitų panašių biocheminių savybių, tokių kaip maža molekulinė masė, hidrofobinių ermtių buvimas, ligandų jungimosi savybės bei antimikrobinis aktyvumas. Dauguma PR-10 ir PR-14 šeimų nariai yra visur randami augalų panaalergenai, kurie sukelia žmogaus imuninį atsaką bei pasižymi kryžminėmis alerginėmis reakcijomis maisto produktams ir žiedadulkėms (Fernandes *et al.*, 2013).

PR baltymai yra suskirstyti į 17 šeimų (PR 1-17) pagal sekų panašumą bei biologinį aktyvumą. Daugelis PR baltymų yra sintetinami skirtinguose augalo audiniuose bei organuose, esant abiotiniam ar biotiniam stresui. PR baltymai veikia patogenų ląstelės sienelę bei plazminę

membraną. Kai kurie iš jų turi taikinius tarpląstelinėje ertmėje ar stabdo fermentų aktyvumą. PR šeimai priklauso β -1,3-glikanazės, chitinazės, proteinazės inhibitoriai, taumatininiai baltymai, peroksidazės, defensinai, teoninai, oksalato oksidazės, taip pat Bet v 1 homologai (PR-10) ir lipidų pernašos baltymai (LTPs, PR-14) (Sinha *et al.*, 2014).

Bet v 1 alergeno homologai, išskirti iš baltojo beržo (lot. *Betula pendula*), yra geriausiai apibūdinantys PR-10 baltymų šeimą. Bet v 1 homologai yra silpnai rūgštinės, mažos (153-163 aminorūgščių liekanų), apie 17 kDa dydžio molekulės. Baltymas sudarytas iš septynių susisukusių antiparalelinių beta klostių, gaubiančių alfa spiralę C gale. Beta 1 ir beta 2 klostės yra atskirtos dviem alfa spiralėmis (1.5 pav.). Bet v 1 homologų sekos turi konservatyvų 47-55 aminorūgščių liekanų motyvą (G-X-G-G-X-G-X-X-K), kuris formuoja P kilpą, žinomą kaip daug glicino turintį motyvą. P kilpa yra struktūrinis elementas, atsakingas už sąveiką su nukleotidais kai kuriems nukleotidus rišantiems baltymams (Radauer *et al.*, 2008). Pati svarbiausia Bet v 1 erdvinės struktūros savybė – hidrofobinė Y formos ertmė, kurią sudaro trys tuneliai (H1, H2 ir P) (1.5 pav.) (Markovic-Housley *et al.*, 2003). Šioje molekulės ertmėje jungiasi įvairūs ligandai, pavyzdžiui, steroidai ar lipopolisacharidai. Dėl to, manoma, kad viena iš Bet v 1 molekulės funkcijų yra pernešti steroidus augale, o lipopolisacharidų ar kitų riebalų rūgščių jungimasis sužadina įgimtą imuninį atsaką, kas lemia didesnę Bet v 1 molekulės alergiškumą (Kofler *et al.*, 2012).



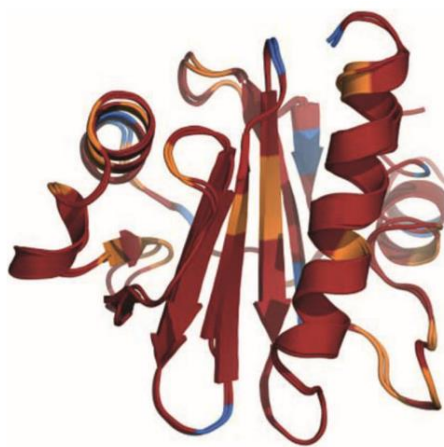
1.5 pav. Bet v 1 molekulės 3D struktūra. Žydra spalva pavaizduota beta klostės, raudona bei oranžinė – alfa spiralės, mėlyna spalva pavaizduota hidrofobinė ertmė, sudaryta iš H1, H2, P tunelių. Pagal Kofler *et al.*, 2012

Iki šiol dar nėra labai aiškūs PR-10 bei PR-14 narių vaidmuo augaluose, tačiau atsižvelgiant į jų sintezę esant stresinėms sąlygoms spėjama, kad jie galėtų atlikti apsauginę funkciją augaluose. Nepaisant tam tikrų skirtumų, baltymai, priklausantys šioms šeimoms, turi panašų biologinį aktyvumą ir dažnai dalyvauja tuose pačiuose procesuose augaluose, įskaitant atsaką į stresą, simbiozę, apoptozę bei kituose. PR baltymai turi antibiotinių, fermentus stabdančių savybių, reaguoja į stresą, riša ligandus, veikia kaip signaliniai peptidai augalo reprodukcijoje, simbiozėje bei apoptozėje (Fernandes *et al.*, 2013).

1.2.4 Profilinų superšeima

Profilinai – tai 12-15 kDa monomeriniai aktiną rišantys baltymai, dalyvaujantys citoskeleto susidaryme bei signalo perdavime visose eukariotinėse ląstelėse. Svarbių procesų, tokių kaip citokinezė, signalo perdavimo, ląstelės judėjimo, metu profilinai reguliuoja aktino filamentų judėjimą. Aukštesniuose augaluose profilinai yra identifikuojami kaip alergiją sukeltantys baltymai (Matricardi *et al.*, 2016).

Profilinų struktūra yra labai konservatyvi (1.6 pav.). Šių baltymų molekulės centras sudarytas iš kompaktiškų beta klosčių, kurias dengia alfa spiralės (Matricardi *et al.*, 2016).



1.6 pav. Phl p 12 (lot. *Phleum pratense*) ir Cuc m 2 (lot. *Cucumis melo*) 3D alergenu struktūros. Raudona spalva vaizduoja identišką aminorūgštį, konservatyvios sritys pavaizduotos oranžine spalva, o mėlyna spalva pažymi nesutampančias aminorūgštis. Pagal Matricardi *et al.*, 2016

Profilinai rišasi su polifosfoinozidais (PPI) bei daug prolino turinčiais baltymais. Sąveika su PPI buvo susieta su signalo perdavimu tarp ląstelės membranos ir citoskeleto, o rišimasis su daug prolino turinčiais baltymų domenais siejamas su profilinų funkcija padėti įvairių makromolekulių judėjimui transportinėse pūslelėse (Krishnan *et al.*, 2009).

1.3 Diagnostika

Neretai alergijos yra siejamos su padidėjusiu jautrumu, tačiau kartais padidėjęs jautrumas į tam tikras medžiagas neturi nieko bendro su alergijomis, pavyzdžiui, tam tikro maisto produkto netoleravimas. Kadangi simptomai dažnai yra panašūs, pacientui turi būti atliktas išsamus medicininis patikrinimas, patvirtinantis alerginę reakciją (Ferreira *et al.*, 2014).

Iki šiol diagnostikoje ir terapijos tikslais paprastai naudojami tik alergenų ekstraktai, kurie yra gaunami iš gamtinės žaliavos – alergenų šaltinio. Šiuos ekstraktus sunku standartizuoti dėl didelio alergenų kiekio jame. Tokie diagnostikoje naudojami alergenų ekstraktai gali pateikti nevisiškai tikslius rezultatus, pirmiausiai, dėl didelės jų gausos, kai kurie gali būti degradavę, o taip pat jame gali būti ir kitų alergenų komponentų, patekusių iš kitų šaltinių. Alergenų ekstraktu pagrįsta diagnostika leidžia identifikuoti alergijos šaltinius, bet neleidžia atskirti atskirų molekulių. Vadinasi, negalima identifikuoti alergiją sukeliančių komponentų esant kryžminėms reakcijoms pacientuose, kuriems pasireiškia nepageidaujamos reakcijos į daugiau nei vieną alergijos šaltinį. Alergenų kryžminės reakcijos atsiranda tada, kai IgE antikūnai jungiasi ne tik prie vieno pagrindinio jam specifinio baltymo, bet ir prie tam baltymui homologiškų, kurie gali būti ir iš kito alergenų šaltinio (Ferreira *et al.*, 2014). Tam, kad atskiros molekulės būtų taikomos diagnostikoje, reikia didelių jų kiekių. Rekombinantinės alergenų gamybos ir genų inžinerijos metodų sistemos suteikia unikalius įrankius naujų molekulių pagrįstų produktų gamybai (Schmidt *et al.*, 2008).

1.4 Augalų raiškos sistemos

Didelis procentas alergenų baltymų yra augalinės kilmės, todėl augalai yra tinkama ir alternatyvi gyvųjų organizmų grupė biologiškai svarbios produkcijos gamybai (Gleba *et al.*, 2014). Rekombinantinių baltymų raiška augaluose gali būti vykdoma tiek tradiciniais metodais, kuriant stabilius transgeninius augalus, tiek kuriant laikinas genų raiškos sistemas. Tam tikri aspektai, pavyzdžiui, visuomenės suvokimas apie GMO, stabdo platesnę produkcijos gamybą naudojant transgeninius augalus. Taip pat tradiciniai metodai nėra ekonomiškai perspektyvūs, reikalauja daug laiko, yra pakankamai brangūs, o produktų raiškos lygis augalų sistemose nėra didelis (Hefferon, 2014). Taigi, reikalingos naujos pažangesnės technologijos produktų raiškai augaluose, kurios įveiktų šias problemas (Mortimer *et al.*, 2015). Šiuo metu yra sukurta keletas skirtingų genų raiškos sistemų – taikomų augaluose: i) nevirusinės raiškos sistemos ii) virusinės raiškos sistemos (Kamimura *et al.*, 2011).

1.4.1 Nevirusinės raiškos sistemos

Nevirusinėms raiškos sistemoms priklauso agrobakterijos, kurios genetiškai transformuoja dviskilčius augalus, perduodamos savo DNR segmentą, esantį auglių inicijuojamoje Ti – (angl. *tumor induction*) plazmidėje. Ti plazmidę turi agrobakterijos *Agrobacterium tumefaciens*. Tai yra dvigrandė žiedinė DNR. Natūraliai gamtoje perduodama DNR (T-DNR) turi onkogenų rinkinį bei opino katabolizmo geną, kurių raiška augalo ląstelėse veda prie nekontroliuojamo ląstelių dalijimosi, o opiną ir aminorūgštis bakterijos naudoja kaip azoto ir anglies šaltinį. Rekombinantiniai *Agrobacterium* kamienai turi tiksliniais genais pakeistą T-DNR ir yra efektyviausia priemonė geno įvedimui į augalus bei transgeninių augalų kūrimui (Sasnauskas, 2006).

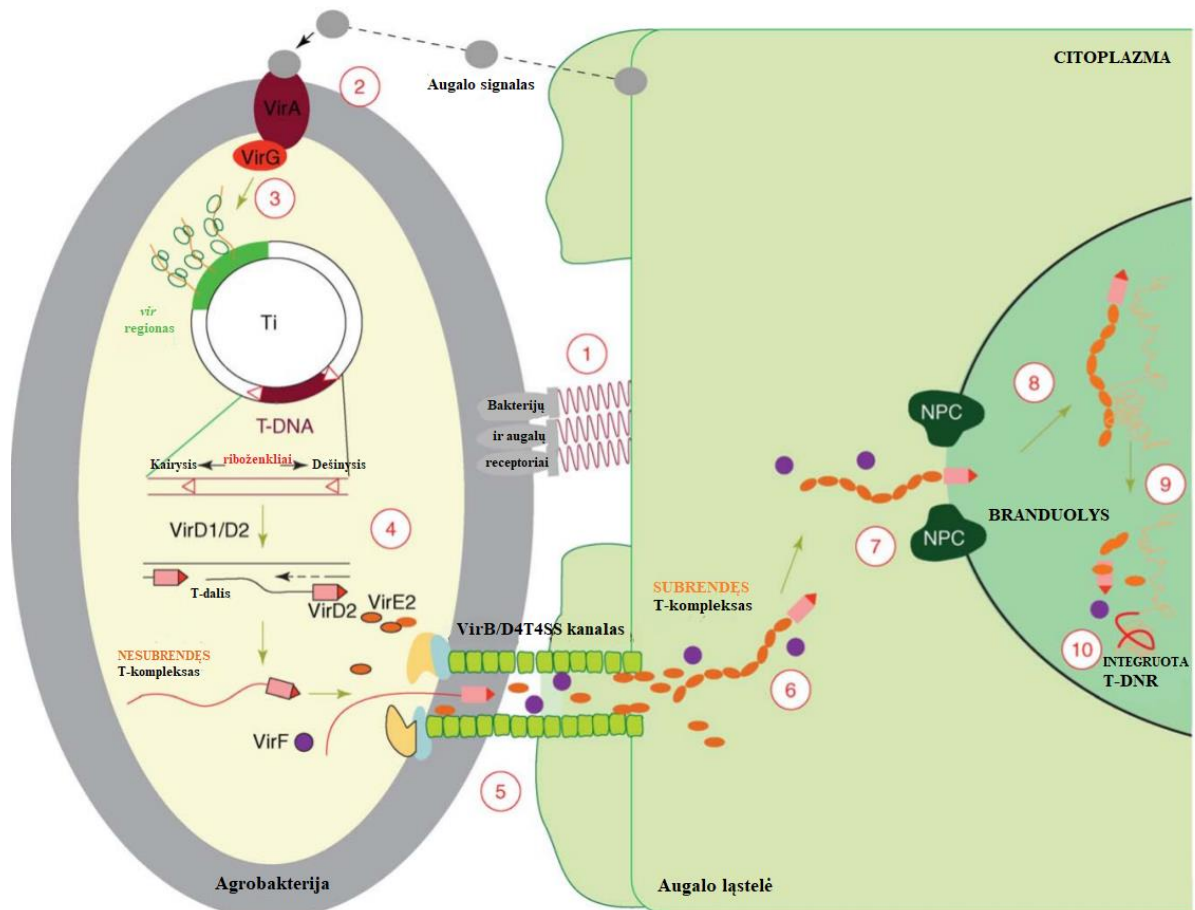
Agrobacterium Ti plazmidė turi struktūriškai bei funkciškai besiskiriančias T ir *vir* sritis. Visų agrobakterijų Ti plazmidžių *vir* dalyje yra *vir*, *tra*, *inc* genai ir oriV sritis (Sasnauskas, 2006). Didelė *vir* genų grupė koduoja daugumą virulentinių baltymų, kuriuos bakterija naudoja savo T-DNR pristatymui į augalo ląsteles. *Tra* genai atsakingi už plazmidės pernešimą tarp bakterijų konjugacijos metu, *inc* – lemia Ti plazmidžių nesuderinamumą, o oriV yra replikacijos pradžios vieta (Tzfira *et al.*, 2006).

Ti plazmidės T dalis aptinkama tarp dviejų 25 nt beveik identiškų sekų, vadinamų riboženkliais (angl. *border*), ir yra apie 10-30 kb dydžio. Infekcijos metu T dalis yra integruojama į augalo genomą ir indukuoja auglio vystymąsi. Ti plazmidės T ir *vir* sričių genai yra organizuoti skirtingai. T srityje genų išdėstymas panašus į eukariotų, kadangi kiekvienas genas turi savo promotorių ir yra pritaikytas funkcionuoti augalo ląstelėse. T dalyje esantys genai sintetina augalų fitohormonus, tokius kaip indolilakto rūgštį ir vieną iš augalų citokinų, kurie skatina ląstelių mitozinį aktyvumą bei auglių susidarymą (Sasnauskas, 2006).

Vir regionas turi prokariotams būdingą savybę – genai organizuoti į operonus: *virA* – koduoja acetosiringono receptorių *VirA*, *virB* – koduoja baltymus *Vir1-11* formuojančius kanalą tarp bakterijos ir augalo ląstelių, *virG* – transkripcijos veiksnį *VirG*, *virC* – baltymus *VirC1-2*, *virD* – baltymus *VirD1-2*, *virE* – baltymą *VirE2*. *virB*, *virC*, *virD*, *virE* ir *virG* operonai kartu sudaro sritį, vadinamą *vir* regionu, kurio transkripcija yra reguliuojama *VirA/VirG* dviejų komponentų sistema (Sasnauskas, 2006).

Transformacijos procesas prasideda po augalo kontakto su bakterija (1.7 pav. 1 žingsnis). Pažeidus augalą, jo ląstelės pradeda gaminti fenolinį junginį – acetosiringoną, o bakterijose esantis *VirA* baltymas yra jo receptorius. *VirA* baltymas po prisijungimo su acetosiringonu autofosforilinasi, kas iššaukia *VirG* baltymo fosforilinimą (1.7 pav. 2 žingsnis).

Fosforilintas VirG yra transkripcijos veiksnys, kuris aktyvina *vir* operonų promotorių transkripciją (1.7 pav. 3 žingsnis) (Sasnauskas, 2006). Veikiant VirD1/D2 baltymams, sukuriama T-DNR kopija (1.7 pav. 4 žingsnis). Bakterijų ląstelėse T-DNR egzistuoja kaip ssDNR–baltymų kompleksas su vienu kovalentiškai prisijungusiu VirD2 baltymu bei kitais Vir baltymais. Toks kompleksas pernešamas į augalo ląstelę per VirB/D4 IV tipo sekrecijos sistemą (1.7 pav. 5 žingsnis). Genetinei medžiagai patekus į augalo ląstelės citoplazmą, susiformuoja subrendęs T kompleksas, kurį apgaubia VirE2 molekulės (1.7 pav. 6 žingsnis). Prie DNR prisijungęs VirE2 bei lydintysis VirD2 baltymai turi branduolio lokalizacijos signalus (NLS), kurie nuneša DNR į ląstelės branduolį (1.7 pav. 7 žingsnis). VirE2 molekulės stabilizuoja ir apsaugo DNR grandinę tol, kol ji patenka į ląstelės branduolį. Tai yra tol, kol pernešama pro citoplazmą, branduolį ir jame (1.7 pav. 8 žingsnis). T-DNR nusirengimas (1.7 pav. 9 žingsnis) bei integracija (1.7 pav. 10 žingsnis) (Tzfira *et al.*, 2006).



1.7 pav. Agrobakterijų vykdoma genetinė augalo transformacija. Šis procesas apima 10 pagrindinių žingsnių. Transformacija prasideda *Agrobacterium* prisijungimu prie augalo ląstelės (1) bei specifiniu augalo signalų atpažinimo per VirA/VirG dviejų komponentų sistemą (2). Aktyvavus *vir* srities genes (3) sukuriama T-DNR kopija, kuri pernešama į augalo ląstelę (5) pro citoplazmą (6), branduolio membraną (7) ir jame (8). T-DNR nusirengimas (9) ir integracija į augalo genomą (10). Pagal Tzfira *et al.*, 2006

Išsiaiškinus, kad *Agrobacterium* Ti plazmidės virulentiškumo genai, nukreipiantys T-DNR į augalų ląsteles bei integruojantys ją į augalų genomą, gali būti atskirti nuo pačios T-DNR, šios bakterijos pradėtos plačiai naudoti biotechnologijoje. Tokia *Agrobacterium* savybė reiškia, kad viruso genai gali būti įterpiami į vieną plazmidę, o T-DNR gali būti įterpiama į atskirą mažą plazmidę, kuria būtų galima lengva manipuliuoti *in vitro*. Tokie vektoriai su įterpta T-DNR buvo pavadinti binariniais vektoriais. Jie gali būti modifikuojami įterpiant atrankos geną (atsparumo tam tikram antibiotikui geną) bei klonavimo vietas norimam heterologiniam genui įterpti (Bevan *et al.*, 1984).

1.4.2 Virusinės raiškos sistemos

Ankstyvieji tyrimai parodė, kad virusinės sistemos gali natūraliai keisti užkrėstos ląstelės baltymų transliaciją taip, kad virusiniai baltymai būtų sintetiniai pirmiausia. Gauti rezultatai paskatino manyti, kad tokia virusų savybė galėtų būti panaudota kuriant raiškos vektorius rekombinantinių baltymų gamybai užkrėstuose augaluose (Siegel *et al.*, 1983). Tam, kad patvirtinti šią hipotezę, virusų genomai pirmiausia turėjo būti klonuojami ir apibūdinami (Ahlquist *et al.*, 1984). Sukonstravus pirmuosius teigiamos grandinės RNR augalų viruso klonus bei ankstyvasias transgenines sistemas, virusiniai vektoriai buvo paversti į raiškos vektorius (French *et al.*, 1986), pakeičiant viruso paviršiaus baltymą (angl. *capsid protein*) norimu genu. French R., *et al.* pasitelkę augalų bromo mozaikos virusą (BMV), sėkmingai sukonstravo raiškos sistemą įterpę į jį chloramfenikolio acetiltransferazės geną. Nepaisant to, jog tokie ankstyvieji vektoriai buvo sėkmingi rekombinantinių baltymų raiškai augaluose, tačiau tokios sistemos nebuvo pajėgios gaminti didelius tikslinio baltymo kiekius (Pogue *et al.*, 2012). Jiems trūko tam tikrų viruso funkcijų, kas sąlygojo nepilną jų aktyvumą. Pavyzdžiui, pašalinus paviršiaus baltymą jau minėtam bromo mozaikos virusui, jis infekuotame lape negalėjo judėti iš ląstelės į ląstelę (French *et al.*, 1986). Priešingai, tabako mozaikos viruso (TMV) paviršiaus baltymo pakeitimas nepažeidžia šios funkcijos, tačiau neleidžia virusui sistemingai judėti infekuotame augale (Dawson *et al.*, 1988). Didėjanti biomedicininė produktų paklausa vis labiau skatino kūrybiškumą tobulinant bei bandant virusines raiškos sistemas (Pogue *et al.*, 2012). Pagrindinis virusinių vektorių panaudojimo privalumas yra tas, kad norimas genas nėra įterpiamas į augalo genomą ir dėl to nėra paveldimas, o sukelia tik laikiną raišką augale (Gleba *et al.* 2007).

Šiuo metu yra sukonstruota daug įvairių tipų augalinių raiškos vektorių skirtų baltymų gamybai. Aštuonios skirtingos augalų RNR virusų gentys buvo modifikuotos į vektorius, įskaitant *poteksvirusus*, *tombusvirusus*, *tobamovirusus*, *bromovirusus*, *comovirusus*,

benyvirusus, *potyvirusus* bei *kukomovirusus*. (Mortimer *et al.*, 2015). Be to, augalų virusinių vektorių tobulinime buvo panaudoti mažiausiai 12 *Geminiviridae* šeimos narių mažos žiedinės DNR. Šie virusiniai vektoriai buvo taikomi kaip laikinos genų raiškos sistemos tam, kad padidinti transgeno raiškos lygį naudojant agroinfiltraciją tikslinio geno pristatymui į augalo ląsteles (Hefferon, 2017).

Augalų virusiniai vektoriai buvo konstruojami taip, kad norimo produkto (vakcinos, monokloninių antikūnų ar kitų baltymų) raiška būtų didžiausia. Pastaruoju metu augalų virusinių vektorių naudojimas pademonstravo perspektyvius rezultatus, ypač dideliais pagamintų baltymų kiekiais (Mortimer *et al.*, 2015) (Gleba *et al.*, 2014). Augalų virusų raiškos vektoriai konstruojami pasitelkiant tiek viengrandės teigiamos RNR, tiek viengrandės DNR virusų genomus (Gleba *et al.* 2007). Yra išskiriamos kelios virusinių raiškos vektorių kartos.

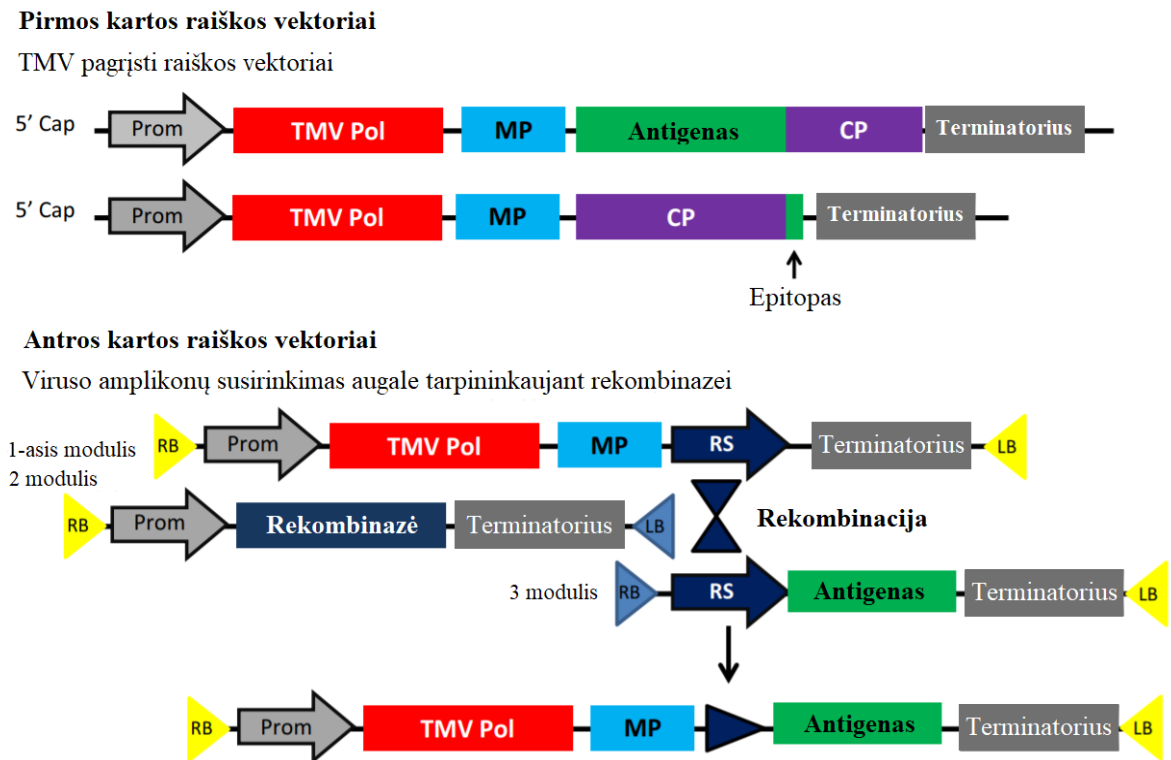
Pirmoji virusinių raiškos vektorių karta – po jau minėtų French *et al.*, 1986 bei Dawson *et al.*, 1988 pirmųjų bandymų kuriant virusinių vektorių raiškos sistemas naujai sukauptos žinios apie virusus ir jų funkcijas skatino toliau tobulėti šioje srityje. Tai iš esmės funkcionalūs virusai, kurie koduoja įterptą baltymą, tačiau kartu su visais viruso baltymais (1.8 pav.) (Hefferon, 2017). Tokie virusiniai vektoriai dar vadinami „pilno viruso“ vektoriais. Norimo baltymo raišką reguliuoja stiprus viruso promotorius (pvz., paviršiaus baltymo subgenominis promotorius). Tokie vektoriai išlaiko nepakitusį replikacijos ciklą, įskaitant šeimininko infekciją, transliaciją, subrendusio viruso susirinkimą, judėjimą tiek iš ląstelės į ląstelę, tiek sistemingai po visą augalą, šeimininko biosintezės perprogramavimą bei genų nutildymo slopinimą (Gleba *et al.*, 2014).

Pagrindinės šių vektorių problemos: silpna augalo infekcija, kas lemia nedidelį norimo baltymo raiškos bei kaupimosi lygį, ribotas norimo gauti baltymo dydis (Hefferon, 2017).

Antroji virusinių raiškos vektorių karta – tai išmontuoti virusai, modeliuojami taip, kad juose būtų tik būtini virusiniai elementai, reikalingi viruso replikacijai, o kai kurios kitos funkcijos, pavyzdžiui, DNR įterpimas į augalą, yra pasiekiamas nevirusiniais metodais, tokiais kaip agrobakterijų infiltracija (Gleba *at al.*, 2005). Pagrindinis išmontuotų virusinių vektorių privalumas yra labai greita laikinoji tikslinio geno raiška augale (Mortimer *et al.* 2015), tačiau juose trūksta vienos ar daugiau funkcijų, reikalingų sisteminei infekcijai. Dėl šios priežasties virusiniai vektoriai turi būti pristatomi į kiekvieną augalo lapą atskirai. Vienas iš populiariausių metodų tai pasiekti – augalų agroinfiltracija (Marillonnet, 2004). Šio metodo pagalba galima įvesti DNR plazmidę, turinčią viruso vektorių. Vektoriaus išnešiojimas po visą augalą yra greitesnis bei sinchroniškesnis, palyginus su nepriklausomų virusų vektoriais. Būtent tai ir lemia didesnę pagaminamų rekombinantinių baltymų kiekį per trumpesnę laikotarpį.

Didžiausias gauto baltymo kiekis yra 5 g rekombinantinio baltymo kg biomasės per 4-15 dienų. Antrasis privalumas yra tikslinės sekos dydis, siekiantis 2 kb inserto dydį arba 80 kDa baltymus (Salazar-González *et al.*, 2015).

Veiksniai galintys nulemti šios raiškos sistemos efektyvumą yra pasirinktas virusas, tikslinio geno dydis, augalas, į kurį infiltruojami vektoriai, bei agrobakterijų tankis (Salazar-González *et al.*, 2015).



1.8 pav. Pirmos ir antros kartos vektorių pavyzdžiai. Kaip pirmos kartos vektoriiaus pavyzdys parodytas TMV vektoriūs, susidedantis iš TMV polimerazės, judėjimo baltymo (MP) bei tikslinio antigeno sekos, sulietos su paviršiaus baltymu (CP) arba su tiksliniu epitopu, prijungtu prie CP C-galo. Kaip antros kartos vektoriiaus pavyzdys pavaizduota virusų raiškos sistema, paremta viruso pristatymu naudojant *Agrobacterium tumefaciens*.

Dalyvauja trys atskiri pro-vektorių moduliai, kurie susirenka augale. Pagal Salazar-González *et al.*, 2015

Pažangiausia išmontuotų virusų sistema – magnICON®. Pastaruoju metu magnICON® vektoriai yra plačiai naudojami kaip platforma laikinai genų raiškai augaluose (Gleba *et al.*, 2014). Ši technologija gana dažnai taikoma įvairių rekombinantinių baltymų raiškai, įskaitant citokinus, interferonus, bakterinius ar virusinius antigenus, augimo hormonus (Gleba *et al.*, 2007). Taikant agroinfiltraciją galima įvesti į augalą daugiau nei vieną raiškos vektorių, o tai ir yra labai svarbus aspektas magnICON® technologijai. Tai vienintelė RNR virusinių vektorių sistema, galinti reguliuoti tiek transgeno raišką, tiek amplifikaciją, kas sąlygoja didesnę rekombinantinio baltymo kaupimąsi augale (Mortimer *et al.*, 2015). Pasitelkus

magnICON® virusinių vektorių sistemą buvo gauta nemažai biofarmacinių produktų. Pavyzdžiui, susintetintas labai nestabilus žmogaus rekombinantinis baltymas – komplemento 5a (C5a) faktorius (Nausch *et al.*, 2012), alergenai, išskirti iš dulkių erkučių, sėkmingai ekspresuoti tabako augaluose (Li *et al.*, 2013). Monokloniniai antikūnai prieš ŽIV-1, dar žinomi kaip VRCO1, taip pat buvo gauti naudojant šią sistemą (Hamorsky *et al.*, 2013).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos ir aparatūra

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, ditionitrietolis (DTT), PageRuler™ Prestained Protein ladder, anti-6x His antikūnai, Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, oligonukleotidiniai pradmenys.

dDbioLab: mielių ekstraktas, triptonas.

Chempur: natrio chloridas, natrio vandenilio fosfatas.

Amresco: kalio chloridas, kumasi briljantinis mėlis R-250.

Sigma-Aldrich: magnio sulfatas, magnio chloridas, kalcio chloridas, kalio hidroksidas, mangano chloridas, dimetilsulfoksidas (DMSO), (hidroksi-metil)-amino metanas (TRIS), kalio acetatas, etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska (EDTA), polisorbatas 20, kanamicinas, 4-chlor-1-naftolio milteliai.

Roth: etidžio bromidas, piperazino-N,N'-bis(2-etansulfoninė rūgštis) (PIPES), natrio dodecilsulfatas (SDS), N-2-hidroksietilpiperazan-N'-2-etano sulfonrūgštis (HEPES), amonio persulfatas (APS), N,N,N',N'-tetrametiletildiaminas (TEMED), dešimt kartų koncentruotas blokavimo buferis (Roti®-Block).

Emprove: glicerolis.

Merck: bromfenolio mėlis.

Fluka: magnio acetatas.

Vilniaus Degtinė: 96% etanolis.

Biochrom: ampicilinas.

Duchefa Biochemie: rifampicinas.

Pharmacia: agarozė.

Acros organics: vandenilio peroksidas.

BioRad: antriniai pelės IgE antikūnai.

BTI imunologijos ir ląstelės biologijos skyrius: anti-MBP monokloniniai antikūnai.

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™ Genomic DNA Purification Kit („Thermo Fisher Scientific“), GeneJET Gel Extraction Kit („Thermo Fisher Scientific“), CloneJET™ PCR Cloning Kit („Thermo Fisher Scientific“), GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit („Thermo Fisher Scientific“).

2.1.3 Naudota aparatūra

Maišyklė „Scientific Industries Vortex Genie® 2“, centrifuga „Eppendorf® Microcentrifuge 5415D“, centrifuga „Eppendorf® Microcentrifuge 5415R“, centrifuga „Eppendorf® Centrifuge 5810R, purtyklė „New Brunswick™ Innova® 44“, elektroporatorius „omniPAC Maxi CS-3AMP Power Supply“, vertikalus elektroporatorius „Mini-PROTEAN® Electrophoresis System“, termocikleris „Biometra TProfessional Thermocycler“, elektroporatorius „Eppendorf® Multiporator®“, kaitinimo blokas „Biosan Dry Block Heating Thermostat“, pH matuoklis „Oakton“, magnetinė maišyklė „Rotilabo®-Mini Magnetic Stirrer R1000“, transiliuminatorius „Herolab EASY“, spektrofotometras „Eppendorf® Biophotometer Plus®“, baltymų pernešimo aparatas „Clever Scientific Ltd MP-300 V“.

2.1.4 Naudota DNR kilmė

Darbe naudota RNR ir DNR skirta iš pievinės miglės (lot. *Poa pratensis*) varpos ir lapų, juodalksnio (lot. *Alnus glutinosa*) žirgino ir lapų, europinio alyvmedžio (lot. *Olea europaea*) bei paprastojo kiečio (lot. *Artemisia vulgaris*) lapų, lazdyno (lot. *Corylus avellana*) riešutų, paprastosios saulėgražos (lot. *Helianthus annuus*) sėklų, persiko (lot. *Prunus persica*) bei valgomojo ananaso (lot. *Ananas comosus*) vaisių. Aukščiau išvardintų augalų DNR išskirti naudotas GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit („Thermo Fisher Scientific“) rinkinys. Tų pačių augalų 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.

2.1.5 Plazmidės

2.1 lentelė. Darbe naudotos plazmidės

Vektorius	Aprašymas	Šaltinis
pJET1.2	Klonavimo vektorius	Thermo Fisher Scientific
pRR-PEV1	Raiškos vektorius	Konstruota eukariotų genu inžinerijos laboratorijoje

2.1.6 Oligonukleotidai

2.2 lentelė. Darbe naudoti oligonukleotidai

Pavadinimas	Seka	Aprašymas
AlnG1-2_dir	5' – TTT GGT CTC AAG GTG TTT TCA ATT ACG AAG CGG A – 3'	Tiesioginis pradmuo Aln g 1 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
AlnG1_rev	5' – TTT GGT CTC AAA GCT TAG TTG TAG GCA TCA GAG TGT GC – 3'	Atvirkštinis pradmuo Aln g 1 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.
AnaC2-1_dir	5' – TTT GGT CTC AAG GTT CTC GTG ACG AAC CCA GTG – 3'	Tiesioginis pradmuo Ana c 2 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.

AnaC2_rev	5' – TTT GGT CTC AAA GCT CAA GTT TCA GAA ACC ATC TTA ATA AC – 3'	Atvirkštinis pradmuo su stop kodonu Ana c 2 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.
ArtV6-1_dir	5' – TTT GGT CTC AAG GTC GGG CTG ACA TTG GTG AT – 3'	Tiesioginis pradmuo Art v 6 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
ArtV6_rev	5' – TTT GGT CTC AAA GCT TAA CAA GGT TTT CCA GGA ACG-3'	Atvirkštinis pradmuo su stop kodonu Art v 6 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.
CorA2-1_dir	5' – TTT GGT CTC AAG GTT CGT GGC AAA CGT ACG TGG – 3'	Tiesioginis pradmuo Cor a 2 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
CorA2-1_rev	5' – TTT GGT CTC AAA GCC TAC AGG CCC TGG TCA ATA AGG T – 3'	Atvirkštinis pradmuo su stop kodonu Cor a 2 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.
OleE1-1_dir	5' – TTT GGT CTC AAG GTG AAG ACG TTC CCC AAC CTC C – 3'	Tiesioginis pradmuo Ole e 1 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
OleE1_rev	5' – TTT GGT CTC AAA GCT CAC ATA TTT GGG GGA TAC ATA CC – 3'	Atvirkštinis pradmuo su stop kodonu Ole e 1 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.

PruP1-2_dir	5' – TTT GGT CTC AAG GTG TCT TCA CAT ATG AGA GCG AG – 3'	Tiesioginis pradmuo su start kodonu Pru p 1 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
PruP1_rev	5' – TTT GGT CTC AAA GCT TAG TTG TAG GCA TCG GGG TGG – 3'	Atvirkštinis pradmuo su stop kodonu Pru p 1 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.
HelA3-1_dir	5' – TTT GGT CTC AAG GTG CGC TAA CCT GTG GTG ATG – 3'	Tiesioginis pradmuo Hel a 3 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui prieš koduojančią seką.
HelA3_rev	5' – TTT GGT CTC AAA GCT CAC TTT ATC TTG TTG CAG TCA GTG TG – 3'	Atvirkštinis pradmuo su stop kodonu Hel a 3 geno koduojančios sekos amplifikavimui ir Eco31I taikinio įvedimui už koduojančios sekos.
70Bsp120I_dir	5' – TTG GGC CCA TCT TTT ATT ACA TGT TTG AAC – 3'	Tiesioginis pradmuo naudotas nustatant CHis linkerio įsistatymą.
70Bsp120I_rev	5' – CCG CTG GGC CCC TAC C -3'	Atvirkštinis pradmuo naudotas nustatant NHis linkerio įsistatymą.
Pro-NHis-dir	5' – AGG TAT GCA TCA CCA TCA CCA TCA CTC – 3'	Tiesioginis pradmuo naudotas nustatant NHis linkerio įsistatymą.
Pro-CHis-rev	5' – AAG CTT AGT GAT GGT GAT GGT GAT GGC CAG – 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_r ev 5' – TTT GGT CTC AAC CTT GGA
AGT ATA GAT TTT CAC CCT – 3' Atvirkštinis pradmuo
transformantų su MBP
kolonijų PGR atlikimui.

2.1.7 Mikroorganizmų kamienai

Escherichia coli DH5a F– Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)
U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK–,
mK+) *phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1*

Agrobacterium tumefaciens GV3101

2.1.8 Tirpalai

***E. coli* kompetentinių ląstelių ruošimui ir transformacijai**

TB buferis: 10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, KOH naudojamas pH nustatymui iki 6,7. Tuomet pridedama 55 mM MnCl₂ ir sterilizuojama filtruojant.

***A. tumefaciens* kompetentinių ląstelių ruošimui, transformacijai ir infiltracijai į augalus**

10 % glicerolio tirpalas: 10 ml glicerolio į 100 ml dejonizuoto vandens;

30 % glicerolio tirpalas: 30 ml glicerolio į 100 ml dejonizuoto vandens;

1 M MgSO₄ (100 ml): 12 g MgSO₄ ištirpinama 100 ml vandens.

Antibiotikų tirpalai

50 mg/ml ampicilino tirpalas: 0,5 g ampicilino ištirpinama 10 ml vandens, sterilizuojama filtruojant;

50 mg/ml kanamicino tirpalas: 0,5 g kanamicino ištirpinama 10 ml vandens, sterilizuojama filtruojant;

25 mg/ml rifampicino tirpalas: 0,25 g rifampicino tirpinama 10 ml metanolio. Sterilizuoti nereikia.

2.1.9 Mitybinės terpės ir tirpalai bakterijų auginimui

SOB terpė: 0,5 % mielių ekstrakto, 2 % triptono, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂;

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 % agaro. Sterilizuojama autoklavuojant. Prieš pilant į Petri lėkštes, įdedama reikiamų antibiotikų;

Elektroforezės tirpalai

1 % agarozės gelis: 1g agarozės ištirpinama 100 ml TAE buferyje. Tirpalas pakaitinamas, kad ištirtų agarozės milteliai. Į atvėsusį agarozės tirpalą dedama 5 µl/100 ml etidžio bromido.

2.1.10 Baltymų (Western) hibridizacija tirpalai

PBS tirpalas: 11,5 g Na₂HPO₄, 3,8 g NaH₂PO₄ x 2H₂O, 5,84 g NaCl ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens. Nustatomas 7,5 pH. Tirpalas sterilizuojamas autoklavuojant;

PTB tirpalas: 1,51 g Tris, 7,2 g Glicino, 100 ml etanolio ir pilama iki 500 ml dejonizuoto vandens. Sterilizuoti nereikia.

TBS tirpalas: 2,4 g Tris, 8 g NaCl ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens. Nustatomas 7,6 pH.

PBS-T tirpalas: paruošiamas PBS tirpalas kaip nurodyta aukščiau ir pripilama 0,1 % Tween-20 10 % tirpalo.

2.2 Metodai

2.2.1 Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

PGR metodas buvo naudojamas DNR fragmento pagausinimui, kopijinės DNR (kDNR) amplifikacijai bei restrikcijos endonukleazių taikinių įvedimui prieš/už koduojančios sekos. Visi PGR reakcijose naudoti reagentai gauti 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 bei plazmidinė DNR.

Atsižvelgiant į pradmenų prilipimo temperatūras, buvo parenkamos tinkamiausios sąlygos reakcijoms atlikti.

Tam, kad būtų įvertinta ar *A. tumefaciens* bakterijų transformacija įvyko sėkmingai ir užaugusiuose transformantuose yra plazmidės su įterptais genais, buvo atliekama kolonijų PGR. Reakcijai atlikti steriliu dantų krapštuku nuo kietos terpės paimama *A. tumefaciens* bakterijų kolonija ir suspenduojama mėgintuvėlyje su 20 µl sterilaus vandens. Mėgintuvėlis įdedamas į verdantį vandenį ir pakaitinamas 10 min, po to nucentrifuguojamas stalinėje centrifugoje 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 polimerazė, 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[®]“.

2.2.3 DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio

Siekiant gauti DNR fragmentus iš agarozės gelio, pagaminamas storesnis gelis su platesniais šulinėliais. Elektroforezė vykdoma 2.2.2 skyrelyje paminėtomis sąlygomis. Reikiami fragmentai skalpelio pagalba išpjaunami bei patalpinami į 1,5 ml talpos Ependorfo 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 vektorių, naudojant „CloneJET[™] PCR Cloning Kit“ („Thermo Fisher Scientific“) rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas.

Fragmentai, gauti hidrolizuojant plazmidės restrikcijos endonukleazėmis, liguojami 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 *Escherichia coli* bakterijų paruošimas

E. coli DH5a 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 resuspenduojamos 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 gaivinamos įpilus 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 sukarchyti DNR kiekį, parenkamas tinkamas reakcijos tūris. Reakcijos mišinį sudaro: 10X buferinis tirpalas, priklausantis nuo naudojamos restriktažės, 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

0,5 ml *A. tumefaciens* bakterijų GV3101 kamienas užsėjamas į 200 ml LB terpės su 50mg/ml rifampicinu ir auginamas 24 valandas purtyklėje 30 °C, purtant 220 aps./min greičiu. Naktinė bakterijų kultūra išpilstoma į sterilius 50 ml talpos flakonus ir centrifuguojama iki 4 °C temperatūros atšaldytoje centrifugoje 10 min 3000 aps./min greičiu. Supernatantas nupilamas, o likusios ląstelės keletą kartų praplaunamos su 10 ml šaltu 10 % glicerolio tirpalu. Tuomet ląstelės suspenduojamos 10 ml glicerolio tirpale ir centrifuguojamos anksčiau minėtomis sąlygomis. Nupylus supernatantą, ląstelės suspenduojamos 250 µl 10% glicerolio tirpalo ir išpilstomos į sterilius Ependorfo mėgintuvėlius po 25 µl. Taip paruoštos kompetentinės *A. tumefaciens* bakterijos laikomos -80 °C temperatūroje.

2.2.10 *A. tumefaciens* transformacija

Į atitirpusias *A. tumefaciens* kompetentines ląsteles pilama 1 µl plazmidinės DNR. Mišinys perkliamas į atšaldytą elektroporacijos kiuvetę. Tuomet įstatoma į elektroporatorių, kur bakterijos paveikiamos 2,5 kV įtampos elektros srove. 1 ml skystos LB terpės įpilamas į kiuvetę ir mikropipetės pagalba suspenduojamas. Mišinys perkliamas 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, likusios bakterijos suspenduojamos ir išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su 50 mg/ml rifampicinu bei kitais tinkamais 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 auginti 24-25 °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 vandeniui 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.

2.2.12 Baltymų išskyrimas iš *N. benthamiana* augalų lapų

Infiltruotų *N. benthamiana* lapų mėginiai užšaldomi skystame azote ir grūstuvėliu sutrinami. Baltymų raiškos analizei ištirti naudojama apie 0,2 g infiltruotų lapų. Ant susmulkintų audinių užpilama išskyrimo buferinis tirpalas – Laemmli, susidedantis iš 240 mM Tris-HCl, pH 6,8, 30 % glicerolio, 0,06 % 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 : 5 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. SDS-poliakrilamidinis gelis ruošiamas iš 12 % arba 15 %, priklausomai nuo baltymo dydžio, skiriamojo gelio (1,5 M Tris-HCl, 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, 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 Tris-glicino-SDS elektroforezės buferiu (250 mM Tris, 1,92 M glicinas, 1 % SDS, pH 8,3). Į atskirus šulinėlius įnešamas reikalingas baltymo kiekis. Elektroforezė vykdoma esant 100 mA srovės stipriui, o bromfenolio dažui perėjus į koncentruojamąjį gelį srovė padidinama iki 170 mA.

Pasibaigus elektorforezei gelis 10 min dažomas Kumasi brilijantinio mėlio dažo tirpale (50 % etanolis, 0,25 % Kumasi brilijantinis mėlis R-250, 10 % acto rūgštis), o paskui plaunamas 5 % acto rūgšties tirpale per naktį.

2.2.14 Baltymų (Western) hibridizacija

Atliekama baltymų elektroforezė, kaip nurodyta 2.2.13 skyrelyje, tačiau pasibaigus elektroforezei gelis ne dažomas Kumasi brilijantiniu 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 pirma mirkoma etanolyje, paskui plaunama vandeniu ir merkiama į PTB buferį. Visi minėti komponentai buferyje laikomi apie 10 min.

Ant pernešimo aparato dedamas filtrinio popieriaus lapelis ir stikline lazdele išlyginama, kad neliktų oro burbulų. Ant filtrinio popieriaus lapelio dedama membrana, kuri taip pat išlyginama stikline lazdele. Ant viršaus dedamas gelis ir galiausiai uždengiama antru filtrinio popieriaus lapeliu. Dar kartą išlyginama. Uždėjus dangtį, įjungiami 12-13 V srovė. Pernešimas vyksta 40 min.

Praėjus nustatytam laikui membrana blokuojama blokavimo buferiu (Roti[®]-Block „Roth“) 1 val., praplaunama PBS-T tirpalu ir dedama į 50 ml talpos flakoną. Įpilama 4 ml PBS- T buferio ir, priklausomai nuo konstrukto, 2000 kartų skiestų pirminių antikūnų prieš 6x His arba 4000 kartų skiestų antikūnų 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 įberiama 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 ryškalą ir palaikoma tol, kol išryškėja signalas, o paskui perkeliama į vandenį.

3. REZULTATAI

3.1 Tikslinių baltymų klonavimas

Šiam darbui pasirinkti skirtingi baltymai iš įvairių alergenų šaltinių: juodalksnio (lot. *Alnus glutinosa*) Aln g 1, Europinio alyvmedžio (lot. *Olea europaea*) Ole e 1, pievinės miglės (lot. *Poa pratensis*) Poa p 1, valgomojo ananaso (lot. *Ananas comosus*) Ana c 2, persiko (lot. *Prunus persica*) Pru p 1, paprastojo lazdyno (lot. *Corylus avellana*) Cor a 2, paprastosios saulėgražos (lot. *Helianthus annuus*) Hel a 3 bei paprastojo kiečio (lot. *Artemisia vulgaris*) Art v 6.

Augalinių alergenų raišką buvo nuspręsta vykdyti panaudojant natyvias genų ar jų koduojančių dalių sekas, o sekretuojamiems baltymams ir natyvias tų baltymų signalines sekas. Buvo stengiamasi susintetinti alergenų kDNR nuo išskirtos RNR, o jei nesigavo (alergeno raiška vyksta tik žiedadulkėse, o jų neturima) – raiškos kasečių konstravimui panaudoti genus. Oligonukleotidiniai pradmenys genų klonavimui kurti remiantis duomenų bankuose esančiomis sekomis. Jeigu sekų yra ne viena, pradmenys kurti dažniau pasitaikančiom sekos atmainom. Jeigu reikiamo organizmo alergeno geno ar iRNR sekų nėra, pradmenys kurti remiantis evoliuciškai artimiausių organizmų homologiškų sekų palyginio konsensusu. Kai kurių alergenų, kurių sekų genų bankuose nerasta, genų sekų fragmentus pavyko aptikti analizuojant duomenis, esančius neužbaigtų atitinkamų organizmų genomo sekoskaitos projektų tinklalapiuose.

Genomų išskyrimui naudoti augalų lapai, o RNR skirta iš alergenų sintetinančių audinių arba iš lapų. Juodalksnio, pievinės miglės, paprastojo kiečio žiedynai ir lapai buvo surinkti Lietuvos pievose ir miškuose. Ananaso bei persiko vaisiai, saulėgražos sėklos bei lazdyno riešutai pirkti PALIK UAB „IKI“ prekybos tinklo parduotuvėse, o alyvmedžio lapai gauti iš Babtų sodininkystės ir daržininkystės instituto. Persiko kilmės šalis – Ispanija, o ananaso – Kosta Rika, saulėgražų – Ukraina, lazdyno riešutų - Sakartvelas.

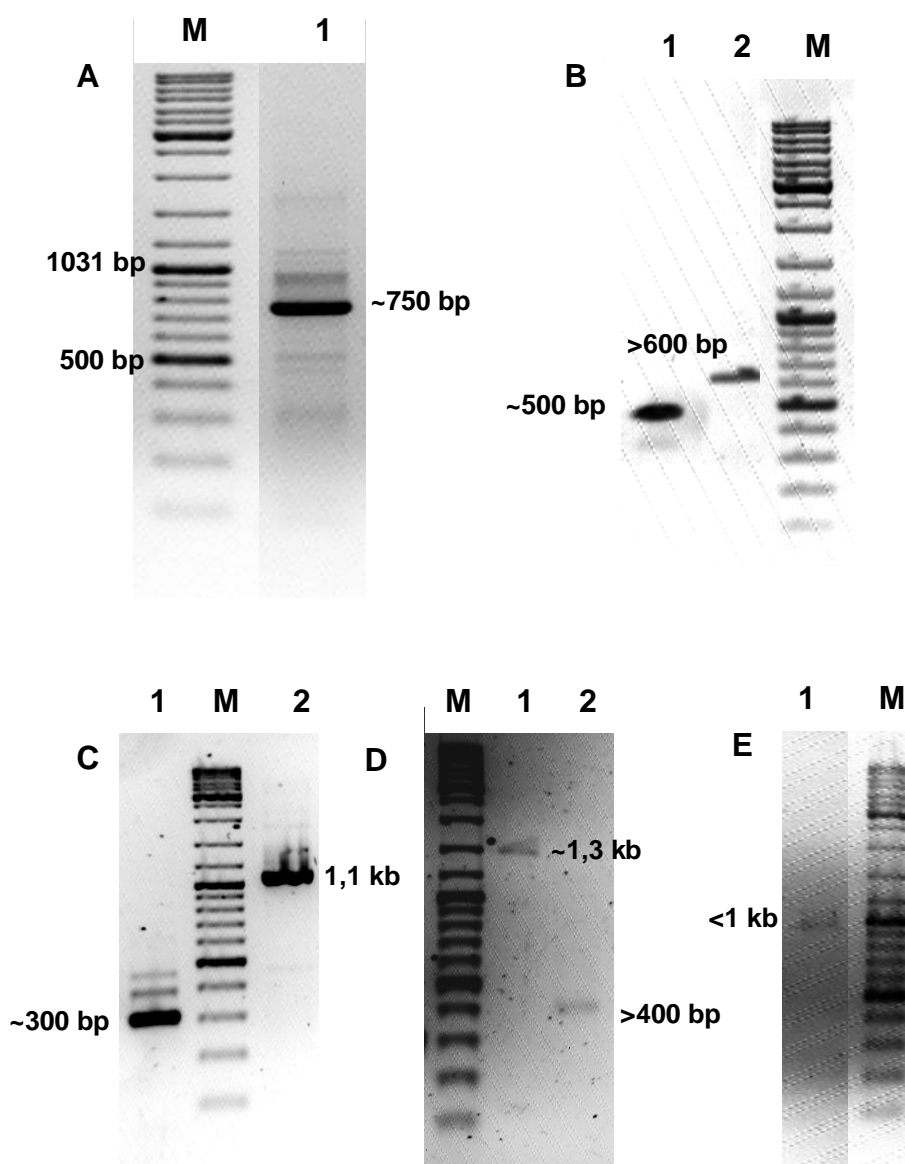
Alergenus koduojančios sekos pagausintos polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu. Naudoti pradmenys, kurių pagalba taip pat įvesti Eco31I restrikcijos endonukleazių taikiniai koduojančių sekų galuose, nurodyti „medžiagos ir aparatūra“ skyrelyje, 2.2 lentelėje. PGR reakcijos metu gautų fragmentų 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>Poa pratensis</i>	Poa p 1	kDNR	PoaP1_dir	PoaP1_rev	~750
<i>Alnus glutinosa</i>	Aln g 1	DNR	AlnG1_dir	AlnG1_rev	>600
<i>Ananas comosus</i>	Ana c 2	kDNR	AnaC2SS_dir	AnaC2_rev	1100
<i>Prunus persica</i>	Pru p 1	kDNR	PruP1_dir	PruP1_rev	~500
<i>Olea europaea</i>	Ole e 1	DNR	OleE1_dir	OleE1_rev	<1000
<i>Ananas comosus</i>	Cor a 2	kDNR	CorA2_dir	CorA2_rev	>400
<i>Helianthus annuus</i>	Hel a 3	kDNR	HelA3_dir	HelA3_rev	~300
<i>Artemisia vulgaris</i>	Art v 6	DNR	ArtV6_dir	ArtV6_rev	>1300

Aln g 1, Ole e 1 bei Art v 6 alergenų koduojančių sekų pagausinimui teko panaudoti iš augalų išskirta genomine DNR, o Poa p 1, Ana c 2, Pru p 1, Cor a 2 ir Hel a 3 – koduojančias sekas pavyko gauti iš išskirtos RNR. Išskyrus iš ląstelių RNR, atlikta atvirkštinės transkriptazės reakcija (RT-PGR), kurios metu susintetinta kDNR. Tikslinius baltymus koduojančios sekos pagausintos PGR metodu naudojant oligonukleotidus, komplementarius tikslinei DNR sekai bei tinkamiausią pradmenų prilydimo temperatūrą.

Gauti amplikonai agaroziniame elektroforezės gelyje matomi 3.1 pav.



3.1 pav. PGR produktų vaizdavimas 1 % elektroforezės gelyje. **A.** **1 takelyje** matomas apie 750 bp Poa p 1 alergena koduojančios sekos fragmentas; **B.** **1 takelis** – apie 500 bp Pru p 1 fragmentas, **2 takelis** – Aln g 1 fragmentas, kurio ilgis >600 bp; **C.** **1 takelis** – apie 300 bp Hel a 3 fragmentas, o **2 takelis** – apie 1,1 kb Ana c 2; **D.** **1 takelyje** matomas Art v 6 alergena koduojančios sekos fragmentas, kurio ilgis yra apie 1,3 kb, o **2 takelyje** – Cor a 2, kurio ilgis >400 bp; **E.** **1 takelis** – <1 kb Ole e 1 fragmentas; markeris – GeneRuler DNA Ladder Mix, kb.

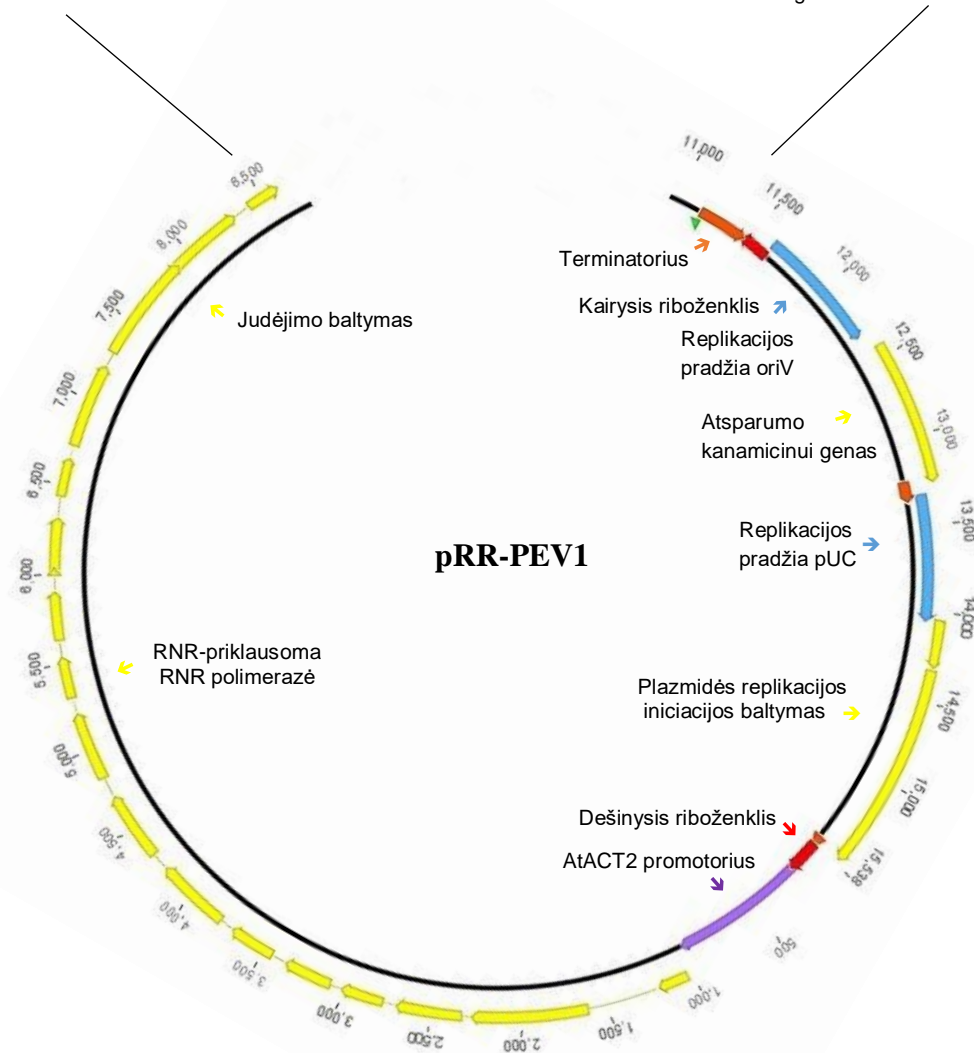
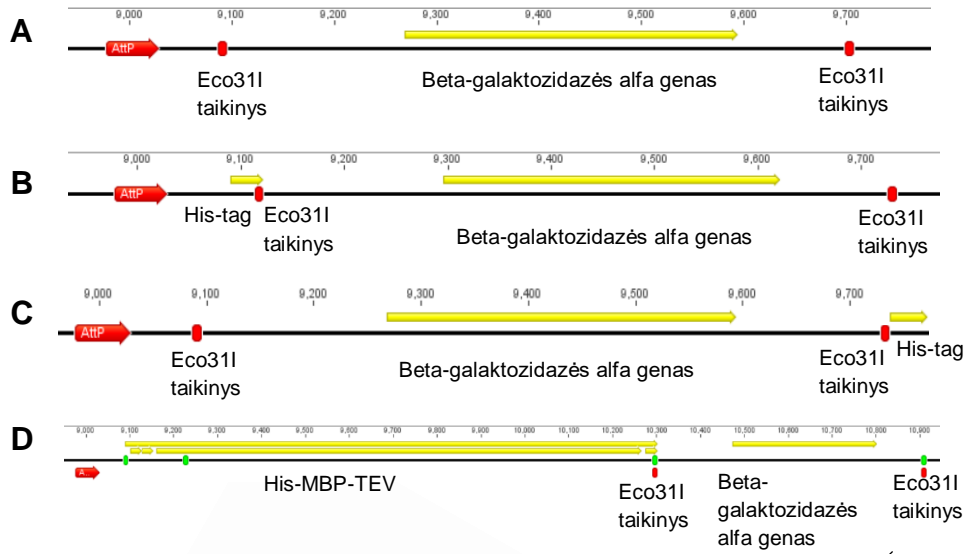
Siekiant patikrinti ar gauti fragmentai koduoja reikiamus baltymus ir neturi natūralių mutacijų metu įvykusių ar PGR metu įvestų klaidų, trikdančių baltymo transliaciją ar keičiančių aminorūgštis konservatyviose pozicijose (atvejais, kai homologiškų sekų yra genų bankuose), reikia nustatyti šių fragmentų nukleotidų seką. Šiuo tikslu gauti reikiamo ilgio fragmentai (3.1 pav.) išgryninti, liguoti į pJET1.2 klonavimo vektorių ir nustatytos jų sekos. Įsitikinus, jog PGR reakcijos metu gauta reikiamą alergena 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 raiškos vektorius, kurie aprašyti tolimesniame skyrelyje.

3.2 Raiškos vektorių konstravimas

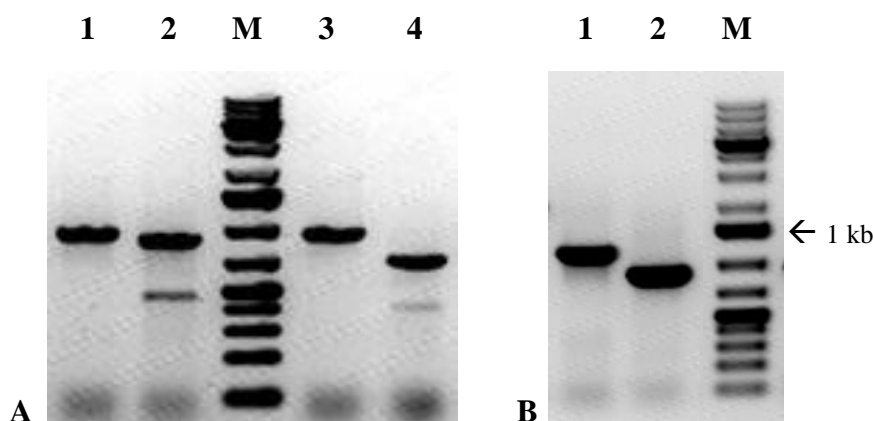
Siekiant gauti tikslinio baltymo sintezę *N. benthamiana* laikinos raiškos sistemoje buvo naudojamas anksčiau eukariotų genų inžinerijos laboratorijoje sukonstruotas pRR-PEV1 raiškos vektorius su konstitutyviu *A. thaliana* aktino 2 (AtACT2) promotoriumi, užtikrinančiu nuolatinę modifikuoto tabako mozaikos viruso baltymų rinkinio ir po jų koduojamo tikslinio geno transkripciją (3.2 pav. A). Vektorius turi dvi replikacijos pradžios sritis: pUC ir oriV. DNR sintezės pradžios taškas – pUC, atsakingas už replikaciją *E. coli* ląstelėse, o oriV – agrobakterijose. Klonavimo srityje įvesti Eco31I restrikcijos endonukleazių taikiniai. Siekiant užtikrinti transformantų atranką bei į ląstelę įvesto vektoriaus stabilumą, įterptas atsparumo kanamicinui genas.

Kadangi tolimesniuose darbuose numatytas paprastesnis išskirtų baltymų gryninimas panaudojus baltyminius inkarus, į pRR-PEV1 raiškos vektorių įterpta šešias histidino liekanas (His-tag) koduojanti seka, turinti atsikurti baltymo N arba C gale, o patys vektoriai pavadinti atitinkamai pRR-PEV1-NHis (3.2 pav. B) ir pRR-PEV1-CHis (3.2 pav. C). Tam pačiam tikslui pasiekti, prie pirminio vektoriaus prijungtas bakterinis maltozę surišantis baltymas (MBP), o raiškos vektorius pavadintas pRR-PEV1-MBP (3.2 pav. D). His-tag bei MBP taip pat naudingi jautresniam ir specifiskam baltymo aptikimui, Western blot hibridizacijos metodu naudojant antikūnus. Į pRR-PEV1-NHis ir pRR-PEV1-MBP vektorius buvo įterpiami nesekretuojami baltymai ir natūraliai sekretuojami, bet su pašalinta signaline seka, neturintys transliacijos iniciacijos kodono ATG ir turintys natyvius Stop kodonus. pRR-PEV1-CHis vektorius naudotas konstruoti raiškos kasetes, sintetinančias sekretuojamas baltymų atmainas. Tuo tikslu į jį buvo įterpiami signalines sekas turintys sekretuojami baltymai su pašalintais Stop kodonais. Stop kodonas šiame vektoriuje yra iš karto už šešių histidinių kodonų, prieš kuriuos įterpiamas tikslinis baltymas.



3.2 pav. pRR-PEV1 raiškos vektoriaus konstruktų genolapis. **A** – originalaus pRR-PEV1 vektoriaus fragmentas; **B** – pRR-PEV1-NHis raiškos konstruktas; **C** – pRR-PEV1-CHis raiškos konstruktas. **D** – pRR-PEV1-MBP raiškos konstruktas. Sumodeliuota naudojant “Geneious” programą.

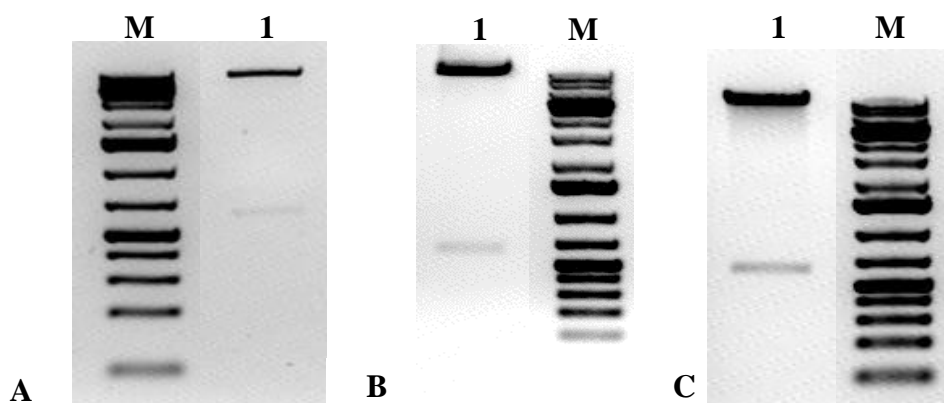
Įvertinti, ar į vektorių įsiterpė linkeriai, MBP baltymą koduojanti seka bei nustatyti įsistatymo orientaciją, buvo atliekama kolonijų PGR naudojant 2.2 lentelėje nurodytus skirtingus pradmenis, skirtus tikslinio fragmento pagausinimui (3.3 pav.).



3.3 pav. A ir B paveikslai vaizduoja PGR produktus 1 % elektroforezės gelyje. **A. 1 ir 3 takeliuose** – PGR su kontroliniais pradmenimis, gautas originalus pRR-PEV1 vektoriaus fragmentas, kurio dydis yra apie 960 bp; **A. 2 takelis** – PGR darytas nuo pRR-PEV1-NHis, gauto amplifikono dydis apie 891 bp; **4 takelis** – PGR nuo pRR-PEV1-CHis, gauto produkto dydis yra 720 bp; **B. 2 takelis** – PGR nuo pRR-PEV1-MBP, gauto produkto dydis - > 800 bp; markeris – GeneRule Plus DNR Ladder.

NHis linkerio įsistatymui nustatyti buvo naudotas tiesioginis pradmuo specifiskai kimbantis prie NHis sekos, o atvirkštinis pradmuo specifiskas pRR-PEV1 vektoriaus Bsp120I restrikcijos endonukleazės taikinio įvedimo sekai. CHis linkeriu nustatyti naudotas tiesioginis pradmuo specifiskas pRR-PEV1 vektoriaus Bsp120I restrikcijos endonukleazės taikinio įvedimo sekai bei atvirkštinis pradmuo specifiskas CHis sekai. MBP nustatymui buvo naudotas tiesioginis bei atvirkštinis pradmuo kimbantis prie MBP baltymą koduojančios specifinės sekos.

Atrinkus tinkamus transformantus, plazmidės išskirtos ir hidrolizuotos įvestuose Eco3II restrikcijos endonukleazės taikiniuose. Gauti reakcijos produktai analizuoti elektroforetiškai (3.4 pav.).



3.4 pav. pRR-PEV1-NHis, pRR-PEV1-CHis ir pRR-PEV1-MBP konstruktų restrikcinės analizės vizualizavimas 1 % elektroforezės gelyje. Plazmidžių hidrolizei naudota Eco3II restrikcijos endonukleazė. **A.** pRR-PEV1-NHis vektoriaus gauti 616 bp ir 13,751 bp dydžių fragmentai; **B.** pRR-PEV1-CHis vektoriaus gauti 616 bp ir 13, 754 bp dydžių fragmentai; **C.** pRR-PEV1-MBP vektoriaus gauti 616 bp ir 14,930 bp dydžių fragmentai. Markeris – GeneRule Plus DNR Ladder.

Eco3II hidrolizuoja plazmidės į du skirtingo dydžio fragmentus. Vektoriuose tiek su His-tag linkeriu, tiek su MBP, iškirptas 616 bp fragmentas su beta-galaktozidazės alfa genu, yra nereikalingas. Didieji vektorių pRR-PEV1-NHis (13,751 bp), pRR-PEV1-CHis (13,754 bp) bei pRR-PEV1-MBP (14,930 bp) fragmentai – tai raiškos vektorių karkasai, kurie bus naudojami tikslinio gero raiškai.

Šie fragmentai išgryninti preparatyvinės elektroforezės būdu ir liguoti su tiksliniais genais, kurie aprašyti 3.1 skyrelyje.

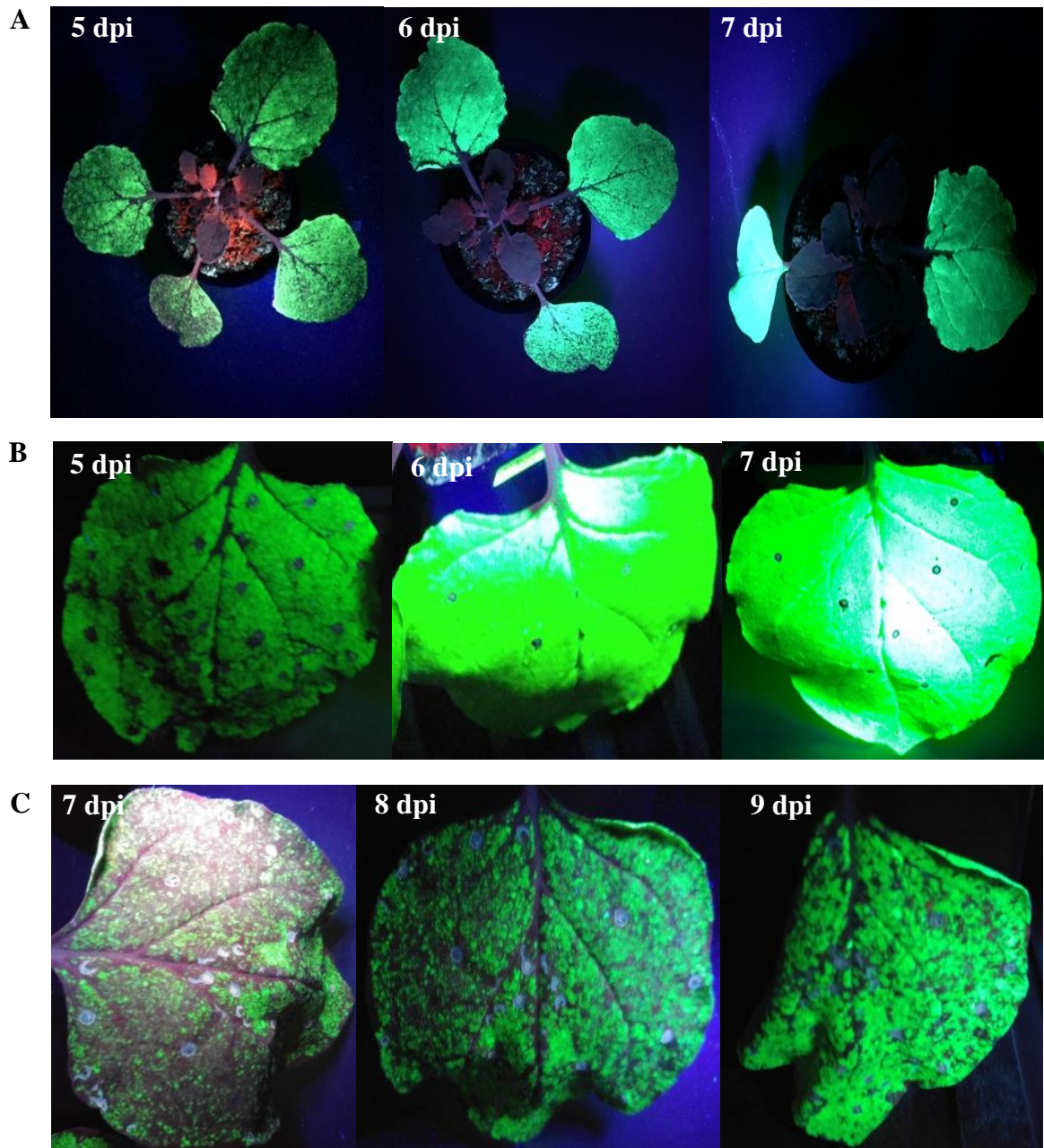
3.3 Sukonstruotų raiškos vektorių patikrinimas

Raiškos vektorių veikimo patikrinimui sukonstruoti pRR-PEV1, pRR-PEV1-NHis ir pRR-PEV1-MBP vektoriai sulieti su žaliai fluorescuojančio baltymo (GFP) koduojančia seka. Vektorių efektyvumas nustatytas pagal GFP baltymo raiškos lygį įvertinant fluorescencijos intensyvumą apšvietus augalus ultravioletine (UV) šviesa.

Atlikus raiškos vektorių su įterptais tiksliniais genais restrikcinę analizę ir gavus teigiamus rezultatus, virusiniai vektoriai transformuoti į *Agrobacterium tumefaciens* ląsteles. Užaugintos agrobakterijų kolonijos tikrintos PGR būdu, naudojant „medžiagos ir aparatūra“ skyrelyje, 2.2 lentelėje nurodytus pradmenis. Atrinkti teisingi transformantai infiltruoti į *N. benthamiana* augalų lapus. Agroinfiltracijai naudoti 5-6 savaičių augalai. Kiekvienai konstrukcijai – po vieną atskirą augalą.

Konstruktai su GFP baltymu prieš mėginių paėmimą analizuoti apšvietus augalus ultravioletine šviesa (3.5 pav.). Naktinės agrobakterijų transformantų kultūros skiestos x20,

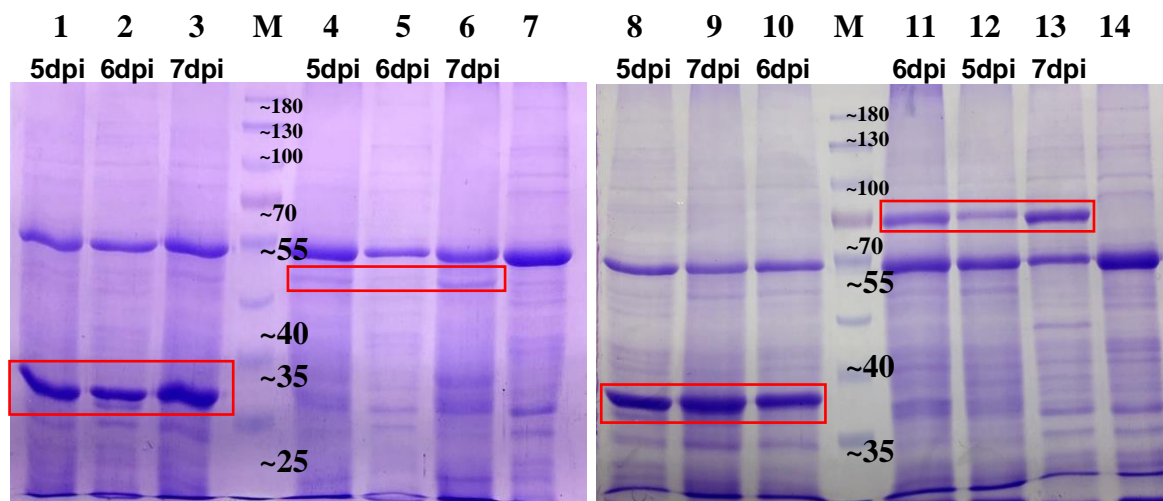
x100 arba x500 kartų vandentiekio vandeniu. Nepriklausomai nuo agrobakterijų transformantų skiedimo, GFP fluorescencija buvo panaši. 3.5 pav. vaizduojama x500 kartų skiestų agrobakterijų transformantų infiltracijos. GFP bei His-GFP fluorescencija penktą, šestą bei septintą dieną po infiltracijos (3.5 pav. A ir B), o MBP-GFP baltymas pradėjo šviesti vėliau, todėl paveiksluose matomas septintos, aštuntos bei devintos dienos švytėjimas.



3.5 pav. GFP baltymo raiška *N. benthamiana* augalų laikinos raiškos sistemoje. Paveiksluose vaizduojama GFP baltymo fluorescencija skirtingomis dienomis po infiltracijos x500 kartus skiestais *A. tumefaciens* transformantais, turinčiais **A** – pRR-PEV1-GFP; **B** – pRR-PEV1-His-GFP; **C** - pRR-PEV1-MBP-GFP konstrukto plazmidės.

Pasitelkus *A. tumefaciens* ląsteles ir infiltravus augalus skirtingomis plazmidžių konstrukcijomis, tai yra *pRR-PEV1-GFP*, *pRR-PEV1-His-GFP* bei *pRR-PEV1-MBP-GFP*, pastebimas nevienodas fluorescencijos intensyvumas, apšvietus augalus UV šviesa. Didelis GFP baltymo raiškos lygis gautas su originalia *pRR-PEV1* bei *pRR-PEV1-His-GFP* plazmide. Pastebimas blausesnis GFP baltymo švytėjimas augaluose, kurie buvo infiltuoti vektoriumi su MBP baltymu. Taip pat matomi fluorescencijos intensyvumo pokyčiai skirtingomis dienomis po infiltracijos. Ryškiausia žalia spalva matoma šeštą bei septintą dieną po agrobakterijų infiltracijos augaluose su *pRR-PEV1-GFP*, *pRR-PEV1-His-GFP*, o su MBP sulietų baltymų intensyvus švytėjimas pastebimas vėliau. Tokią priklausomybę galima paaiškinti tuo, jog šešių histidino liekanų seka nėra didelė ir neapsunkina tikslinio baltymo raiškos, o MBP baltymas yra gana didelis, apie 44 kDa, kas gali lemti mažesnę tikslinio baltymo kiekį. Be to, MBP baltymas yra neoptimizuotas raiškai augaluose, jo kodonų sudėtis būdinga bakterijoms, ir tai gali smarkiai sulėtinti šio baltymo transliaciją augaluose.

Siekiant išsiaiškinti ar lapų fluorescencija koreliuoja su GFP baltymų raiška, įvertinta tikslinio baltymo koncentracija baltymų mišinyje. Tam tikslui pasiekti, atlikta baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis. Baltymai ekstrahuoti iš skirtingomis konstrukcijomis infiltuotų lapų audinių. Gauti baltymų mėginiai atskirti SDS-PAGE poliakrilamidiniame gelyje (3.6 pav.).



3.6 pav. GFP ir MBP baltymo elektroforezė 12 % poliakrilamido gelyje penktą, šeštą bei septintą dieną po infiltracijos (dpi); **1, 2, 3 takeliuose** –*pRR-PEV1-GFP* raiškos konstruktas; **4, 5, 6** – *pRR-PEV1-MBP* raiškos konstruktas; **7, 14 takeliuose** – kontrolė, *pRR-PEV1*; **8, 9, 10** – *pRR-PEV1-His-GFP* raiškos konstruktas; **11, 12, 13** – *pRR-PEV1-MBP-GFP* raiškos konstruktas. Markeris – PageRuler™ Prestained Protein ladder, kDa.

Skirtingais konstruktais infiltuotų augalų lapų mėginiai imti 5, 6 bei 7 dienomis po infiltracijos. Pirmiausiai tikrintas sukonstruotų vektorių efektyvumas, įvertinant GFP bei MBP

baltymų raiškos lygį (3.6 pav.). Iš elektroforezės poliakrilamido gelyje nuotraukos matyti, kad pavyko gauti didelį GFP baltymo kiekį. Tačiau konstrukto, koduojančio MBP baltymą, raiška buvo ženkliai silpnesnė, lyginant su kitais konstruktais.

3.4 Rekombinantinių augalinių alergenų raiška

Sukonstravus pRR-PEV1-NHis, pRR-PEV1-CHis bei pRR-PEV1-MBP raiškos vektorius, į juos įterpti tiksliniai genai, nurodyti 3.2 lentelėje.

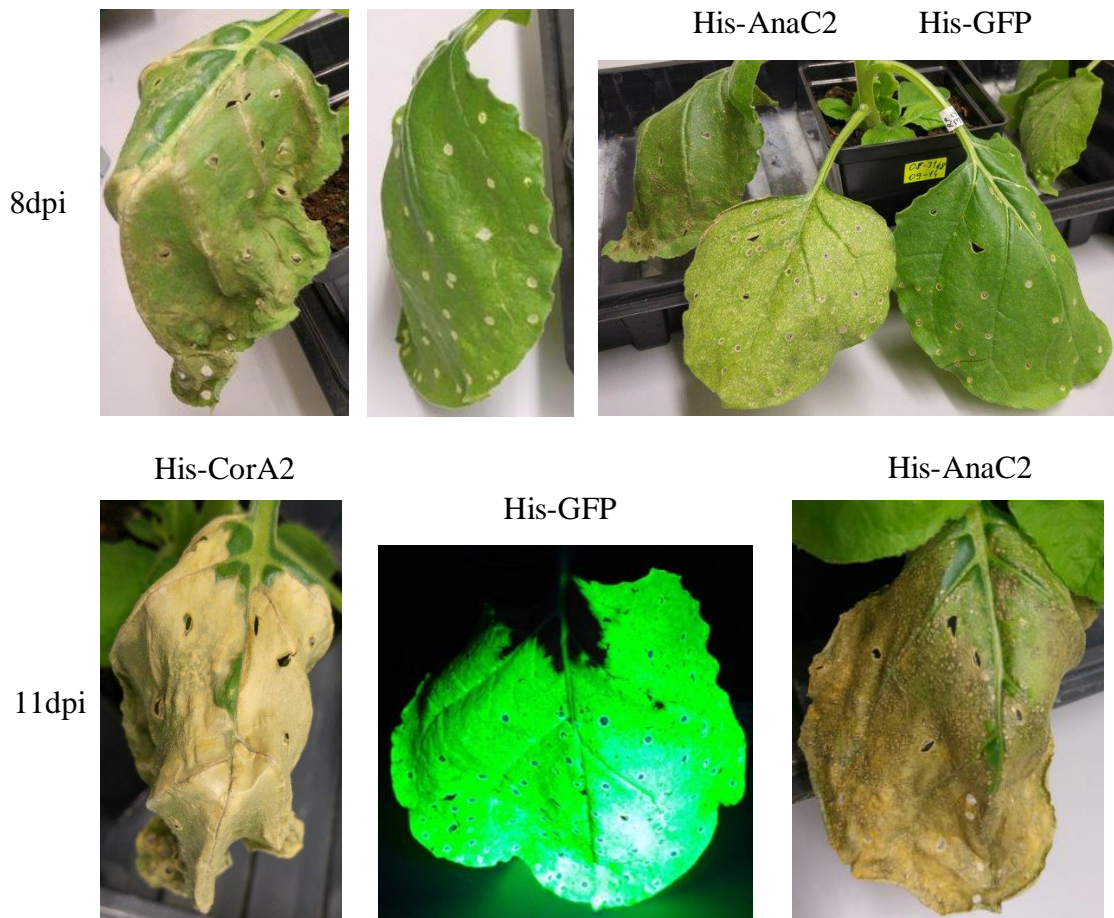
3.2 lentelė. Galutiniai raiškos vektoriai su įterptais tiksliniais genais

Pavadinimas	Aprašymas
pRR-PEV1-NHis-AlnG1/ pRR-PEV1-MBP-AlnG1	Raiškos vektoriai skirti Aln g 1 baltymo sintezei.
pRR-PEV1-NHis-AnaC2/ pRR-PEV1-CHis-AnaC2 pRR-PEV1-MBP-AnaC2/	Raiškos vektoriai skirti Ana c 2 baltymo sintezei.
pRR-PEV1-NHis-ArtV6/ pRR-PEV1-MBP-ArtV6	Raiškos vektoriai skirti Art v 6 baltymo sintezei
pRR-PEV1-NHis-CorA2/ pRR-PEV1-MBP-CorA2	Raiškos vektoriai skirti Cor a 2 baltymo sintezei.
pRR-PEV1-NHis-OleE1/ pRR-PEV1-CHis-OleE1 pRR-PEV1-MBP-OleE1	Raiškos vektoriai skirti Ole e 1 baltymo sintezei.
pRR-PEV1-NHis-PruP1/ pRR-PEV1-MBP-PruP1	Raiškos vektoriai skirti Pru p 1 baltymo sintezei.
pRR-PEV1-NHis-HelA3/ pRR-PEV1-CHis-HelA3 pRR-PEV1-MBP-HelA3	Raiškos vektoriai skirti Hel a 3 baltymo sintezei.

Įsitikinus sukonstruotų raiškos vektorių efektyvumu, *N. benthamiana* augalai infiltruoti 3.2 lentelėje nurodytais raiškos konstruktais su įterptais tiksliniais genais. Dauguma konstrukto nepaveikė infiltruotų lapų, tačiau Ana c 2, Cor a 2 bei Hel a 3 baltymai pasižymėjo neigiamu poveikiu augalams, šiais baltymais infiltruoti lapai jau po kelių dienų pradėjo vysti ir džiuoti. Cor a 2 bei Ana c 2 alergenų poveikis augalams pavaizduotas 3.7 pav.

His-CorA2

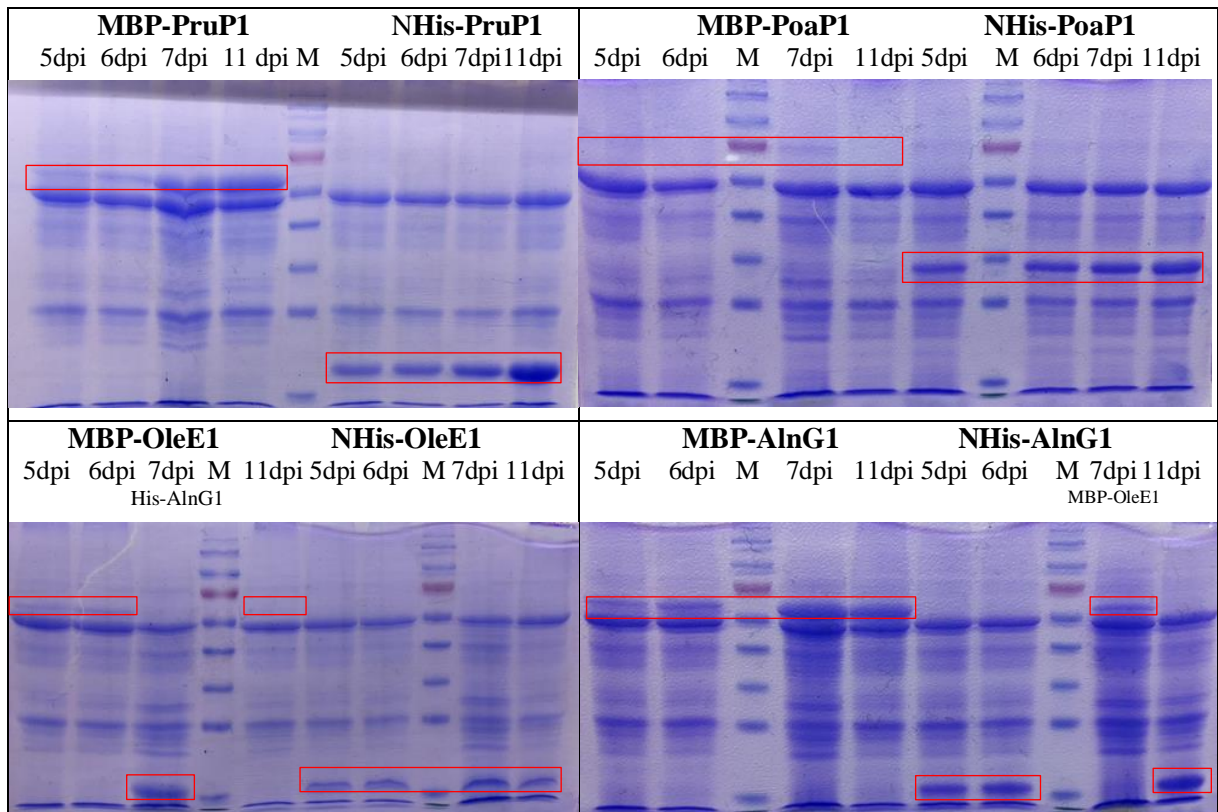
His-GFP



3.7 pav. CorA2 ir AnaC2 baltymų poveikis *N. benthamiana* augalams aštuntą ir vienuoliką dieną po infiltracijos.

3.7 pav. vaizduoja Cor a 2 bei Ana c 2 alerginių baltymų raiškos poveikį infiltruotiems *N. benthamiana* augalų lapams. Nuotraukose aiškiai matosi fiziologiniai augalo sutrikimai, Cor a 2 atveju pasireiškiantys lapo deformacija, audinių nekroze, o Ana c 2 – dėmėtumu, lapo džiūvimu.

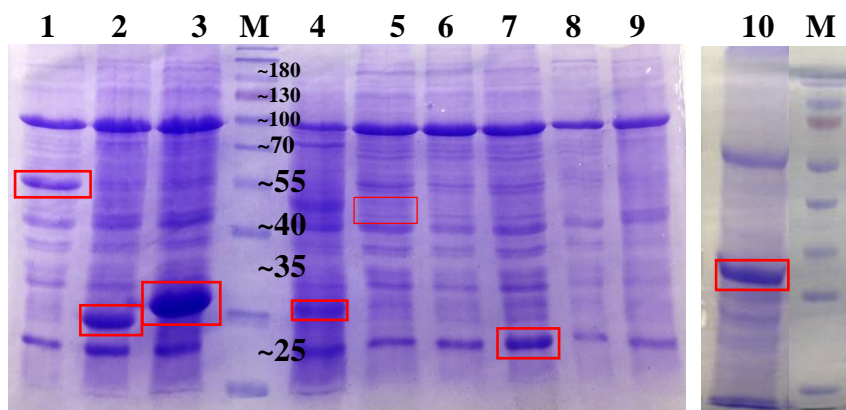
Siekiant patikrinti alergėnų raiškos rezultatų priklausomybę nuo dpi, infiltruotų lapų mėginiai imti skirtingomis dienomis po infiltracijos ir analizuojami SDS-PAGE poliakrilamidine gelyje. Pru p 1, Poa p 1, Ole e 1 bei Aln g 1 alergėnų pavyzdžiai pateikti 3.8 pav.



3.8 pav. MBP-PruP1 (~62 kDa), NHis-PruP1 (~19 kDa), MBP-PoaP1 (~70 kDa), NHis-PoaP1 (~28 kDa), MBP-OleE1 (~61 kDa), NHis-OleE1 (~18 kDa), MBP-AlnG1 (~62 kDa), NHis-AlnG1 (~18 kDa) alergenu raiškos rezultatų priklausomybė nuo dienos po infiltracijos. Markeris – PageRuler™ Prestained Protein ladder, kDa.

Iš 3.8 pav. matosi didžiausias tirtų baltymų kiekis vienuoliktą dieną po infiltracijos agrobakterijų transformantais. MBP-PruP1 alergeno kiekis panašus septintą ir vienuoliktą dieną, o NHis-PruP1 daugiausiai vienuoliktą dieną. MBP-PoaP1 baltymas matosi tik septintą dieną po infiltracijos, tuo tarpu NHis-PoaP1 konstrukto raiška skirtingomis dienomis tolygiai didėjo, o gausiausias kiekis pasiektas vienuoliktą dieną. MBP-OleE1 alergeno kiekis penktą, šeštą bei septintą dieną didėjo, panašus baltymo kiekis išlieka ir vienuoliktą dieną, kadangi, lyginant su 7 dpi mėginiu, 11 dpi bendrojo baltymo kiekio užnešta mažiau, kaip ir su beveik visais kitais mėginiais. NHis-OleE1 bei MBP-AlnG1 panašus baltymų kiekis išvelgiamas visomis tirtomis dienomis, bet gausiausiai matomas vienuoliktą dieną. NHis-AlnG1 konstrukto sintezė taip pat vyko gerai, didžiausias baltymo kiekis yra vienuoliktą dieną po infiltracijos šio konstrukto agrobakterijų transformantais.

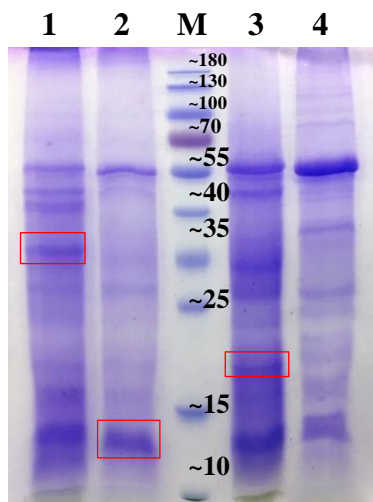
Atrinkti mėginiai, turintys daugiausiai tikslinio baltymo, vaizduojami SDS-PAGE poliakrilamidiniame gelyje (3.9 pav., 3.10 pav.)



3.9 pav. Tiksliniai augaliniai baltymai SDS-PAGE 15 % poliakrilamidiniame gelyje. Paveikslas vaizduoja konstruktus su NHis-tag; **1 takelis** – pRR-PEV1-NHis-PoaP1 (~28 kDa); **2 takelis** – pRR-PEV1-NHis-AlnG1 (~18 kDa); **3 takelis** – pRR-PEV1-NHis-PruP1 (~19 kDa); **4 takelis** – pRR-PEV1-NHis-OleE1 (~18 kDa); **5, 10 takelis** – pRR-PEV1-NHis-AnaC2 (~37 kDa); **6 takelis** – pRR-PEV1; **7 takelis** – pRR-PEV1-NHis-CorA2 (~15 kDa); **8 takelis** – pRR-PEV1-NHis-HelA3 (~11 kDa); **9 takelis** – pRR-PEV1-NHis-ArtV6 (~42 kDa); markeris – PageRuler™ Prestained Protein ladder, kDa.

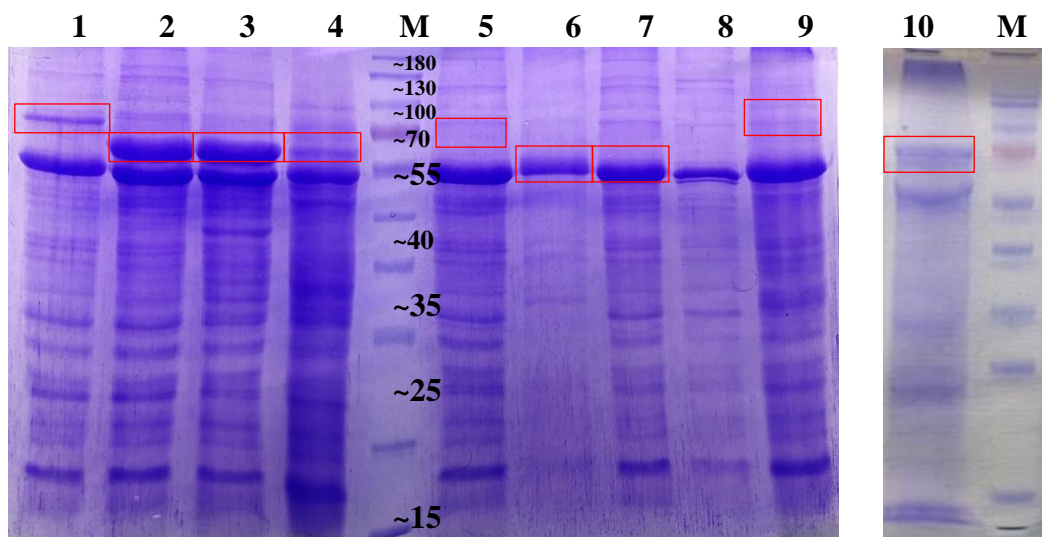
Iš 3.9 pav. matyti, kad daugumos baltymų raiškai sukonstruotų vektorių sistema pasiteisino. Geliuose matomi preliminariai nustatytų dydžių baltymai: NHis-PoaP1, NHis-AlnG1, NHis-PruP1, NHis-OleE1. Tačiau NHis-CorA2, NHis-HelA3 bei NHis-ArtV6 baltymų poliakrilamidiniame gelyje gerai nesimato. NHis-AnaC2 baltymas buvo matomas anksčiau darytame gelyje ir vaizduojamas 10 takelyje, tačiau galutiniame gelyje jo gauti nepavyko. Kadangi Ana c 2 yra proteazė, tai dėl didesnio temperatūrų svyravimo atšildant mėginį, baltymas galėjo degraduoti.

Sekretuojantys Ana c 2, Hel a 3 bei Ole e 1 baltymai įterpti į pRR-PEV1-CHis raiškos kasetes analizuojami SDS-PAGE poliakrilamidiname gelyje (3.10 pav.).



3.10 pav. Tiksliniai augaliniai baltymai SDS-PAGE 15 % poliakrilamidiniame gelyje. Paveikslas vaizduoja konstruktus su CHis-tag; **1 takelis** – pRR-PEV1-CHis-AnaC2 (37,44 kDa); **2 takelis** – pRR-PEV1-CHis-HelA3 (~11 kDa); **3 takelis** – pRR-PEV1-CHis-OleE1 (~18 kDa); **4 takelis** – pRR-PEV1-NHis; Markeris – PageRuler™ Prestained Protein ladder, kDa.

3.10 pav. matomi numanomo dydžio ananaso Ana c 2 (37,44 kDa) bei alyvuogės Ole e 1 (apie 18 kDa) baltymai. Iš gelio nuotraukos sunku pasakyti, ar matomas saulėgražos Hel a 3 (apie 11 kDa) baltymas, ar tai yra tabako mozaikos viruso baltymas. Įsitikinimui atlikta baltymų imunocheminė analizė.

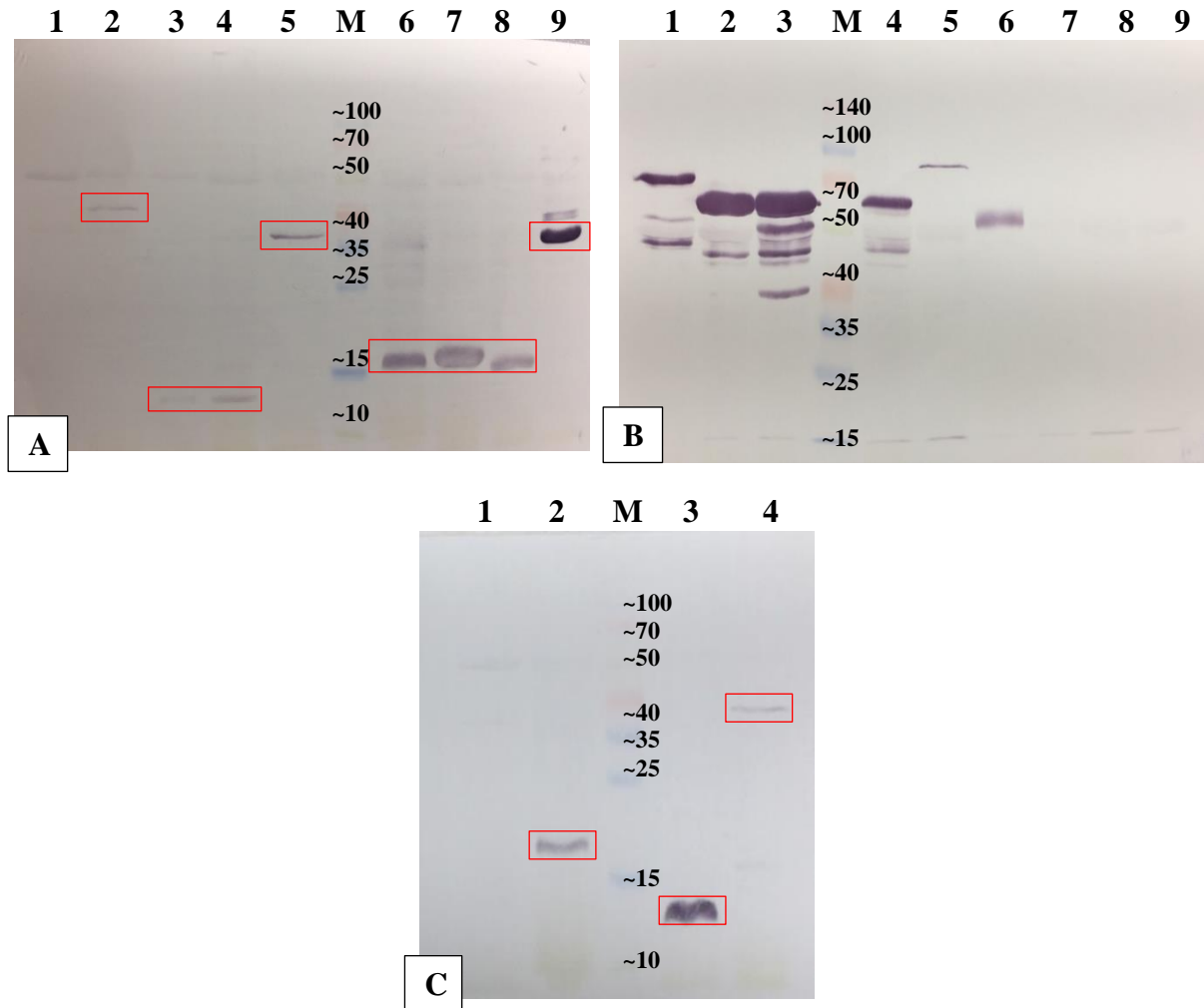


3.11 pav. Tiksliniai augaliniai baltymai SDS-PAGE 12 % poliakrilamidiniame gelyje. A paveikslas vaizduoja konstruktus su MBP baltymu; **1 takelis** – pRR-PEV1-MBP-PoaP1 (~70 kDa); **2 takelis** – pRR-PEV1-MBP-AlnG1 (~62 kDa); **3 takelis** – pRR-PEV1-MBP-PruP1 (~62 kDa); **4 takelis** – pRR-PEV1-MBP-OleE1 (~61 kDa); **5, 10 takelis** – pRR-PEV1-MBP-AnaC2 (~80 kDa); **6 takelis** – pRR-PEV1-MBP-CorA2 (~58 kDa); **7 takelis** – pRR-PEV1-MBP-HelA3 (~54 kDa); **8 takelis** – pRR-PEV1; **9 takelis** – pRR-PEV1-MBP-ArtV6 (~85 kDa); Markeris – PageRuler™ Prestained Protein ladder.

3.11 pav. vaizduoja tikslinius baltymus sulietus su MBP. Kaip ir ankstesniame variante, matoma, jog pRR-PEV1-MBP raiškos vektorius pateisino lūkesčius daugumai tirtų baltymų raiškai. Iš gelio nuotraukos gana aiškiai matosi, jog Poa p 1, Aln g 1, Pru p 1, Ole e 1 baltymų raiška pavyko. O Cor a 2, Hel a 3 ir Art v 6 analizuojami baltymai nuotraukoje yra sunkiai įžvelgiami. Ana c 2 baltymo galutiniame gelyje gauti taip pat nepavyko, tačiau anksčiau daryto gelio 10 takelyje baltymas matosi.

3.5 Baltymų imuninė (Western) hibridizacija

Baltymų tapatybės patvirtinimui bei jautresniam baltymų aptikimui atlikta Western bloto analizė su specifiniais monokloniniais antikūnais prieš His-tag bei MBP epitopus. Baltymų imuninei hibridizacijai atlikti naudoti priminiai antikūnai prieš 6x His uodegėlę bei MBP baltymą, o antriniai antikūnai – prieš pelės IgE. Gauti rezultatai vaizduojami 3.12 pav.



3.12 pav. Analizuojamų baltymų raiškos Wester blot analizės rezultatai, naudojant antikūnus prieš 6x His uodegėlę (A, C) ir prieš MBP (B); **A.** **1 takelis** – pRR-PEV1-NHis; **2 takelis** – pRR-PEV1-NHis-ArtV6 (~42 kDa); **3 takelis** – pRR-PEV1-NHis-HelA3 (~11 kDa); **4 takelis** – pRR-PEV1-NHis-CorA2 (~15 kDa); **5 takelis** – pRR-PEV1-NHis-AnaC2 (~37 kDa); **6 takelis** – pRR-PEV1-NHis-OleE1 (~18 kDa); **7 takelis** – pRR-PEV1-NHis-PruP1 (~19 kDa); **8 takelis** – pRR-PEV1-NHis-AlnG1 (~18 kDa) **9 takelis** – pRR-PEV1-NHis-PoaP1 (~28 kDa); **B.** **1 takelis** – pRR-PEV1-MBP-PoaP1 (~70 kDa); **2 takelis** – pRR-PEV1-MBP-AlnG1 (~62 kDa); **3 takelis** – pRR-PEV1-MBP-PruP1 (~62 kDa); **4 takelis** – pRR-PEV1-MBP-OleE1 (~61 kDa); **5 takelis** – pRR-PEV1-MBP-AnaC2 (~80 kDa); **6 takelis** – pRR-PEV1-MBP-CorA2 (~58 kDa); **7 takelis** – pRR-PEV1-MBP-HelA3 (~54 kDa); **8 takelis** – pRR-PEV1; **9 takelis** – pRR-PEV1-MBP-ArtV6 (~85 kDa); **C.** **1 takelis** – pRR-PEV1-NHis; **2 takelis** – pRR-PEV1-CHis-OleE1 (~18 kDa); **3 takelis** – pRR-PEV1-CHis-HelA3 (~11 kDa); **4 takelis** – pRR-PEV1-CHis-AnaC2 (37,44 kDa); markeris – Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, kDa.

Atliktos Western bloto analizės rezultatai patvirtina, jog Poa p 1, Aln g 1, Pru p 1, Ole e 1, Ana c 2 ir Cor a 2 tikslinių baltymų sintezė, naudojant sukonstruotą pRR-PEV1 virusinį vektorių, sėkmingai vyksta *N. benthamiana* augaluose. Nors Hel a 3 bei Art v 6 baltymų su šešių histidino liekanų seka N gale sintezės aptikti nepavyko, tačiau tų pačių sekretuojamų baltymų rezultatai buvo teigiami.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Iki šiol buvo sukurta nemažai rekombinantinių alergenų savo struktūra, funkcijomis bei imunine reakcija panašių į jų natūralius analogus. Naudojant baltymus pagamintus rekombinantinės technologijos būdu, galima lengviau atlikti molekulinę charakteristiką – nustatyti trimatę struktūrą ar alerginius epitopus (Schmidt *et al.*, 2008).

Tiek prokariotų, tiek eukariotų raiškos sistemos jau ankščiau buvo panaudotos alerginių baltymų gamybai. Daugelio alergenų raiška sėkmingai atlikta panaudojus *E.coli* bakterijas – Pru p 1 bei Pru p 3 (lot. *Prunus persica*) (Gaier *et al.*, 2008), Pru du 4 (lot. *Prunus dulcis*) (Zhang *et al.*, 2014), Pro j 1 (lot. *Prosopis juliflora*) (Dousti *et al.*, 2016) ir daug kitų. Įrodytas baltymų biologinis aktyvumas bei tinkamas susilankstymas, tačiau didelei daliai alerginių baltymų prokariotų raiškos sistemos dažnai nepateisina lūkesčių dėl netinkamo susilankstymo ar silpnos sintezės. Eukariotų raiškos sistemos gali būti panaudotos kaip alternatyva, suteikianti platesnes galimybes baltymų sintezei. Pagrindinis eukariotinių sistemų naudojimo privalumas – postransliacinės modifikacijos, įskaitant tinkamą baltymo sulankstymą, disulfidinių tiltelių formavimą bei lipidų ir angliavandenių prijungimą. *N. benthamiana* augalų raiškos sistema buvo sėkmingai panaudota namų dulkių erkučių (lot. *Dermatophagoides farinae*) Der f 1 bei Der f 2 alergenų sintezei (Ryazantsev *et al.*, 2014). Dažniausiai naudojamos eukariotų sistemos: mielės, vabzdžių ir žinduolių ląstelės, augalai.

Augalinės kilmės alergenų raiškai tinkamiausia turėtų būti augalinė sistema, kadangi ji suteikia palankiausias sąlygas baltymo modifikacijoms. Kitą vertus, augaliniai baltymai turėtų būti funkciškai aktyvūs augalinėse ląstelėse, todėl kai kurie baltymai esant dideliame jų kiekiui gali sutrikdyti augalinės ląstelės funkcijas ar ne sukelti jos žūtį. Bet v 1 (lot. *Betula pendula*) baltymas jau buvo sintetintas tabako augaluose, tačiau nesėkmingai – baltymų raiška nebuvo gauta (Breiteneder *et al.*, 2001). Tuo tarpu Siegert M *et al.*, 2012 m. sėkmingai atliko Art v 1 (lot. *Artemisia vulgaris*) alergeno sintezę tabako augaluose.

Šiame darbe buvo siekiama patikrinti, ar *Nicotiana benthamiana* augalai yra tinkama raiškos sistema rekombinantinių juodalksnio (lot. *Alnus glutinosa*) Aln g 1, Europinio alyvmedžio (lot. *Olea europaea*) Ole e 1, pievinės miglės (lot. *Poa pratensis*) Poa p 1, valgomojo ananaso (lot. *Ananas comosus*) Ana c 2, persiko (lot. *Prunus persica*) Pru p 1, paprastojo lazdyno (lot. *Corylus avellana*) Cor a 2, paprastosios saulėgrąžos (lot. *Helianthus annuus*) Hel a 3 bei paprastojo kiečio (lot. *Artemisia vulgaris*) Art v 6 baltymų gamybai. Aln g 1, Ole e 1, Poa p 1, Ana c 2, Pru p 1, Cor a 2, Hel a 3 bei Art v 6 alergenus koduojančios sekos buvo klonuotos į pRR-PEV1-NHis, pRR-PEV1-MBP raiškos vektorius, o sekretuojančių

Ana c 2, Cor a 2 ir Hel a 3 – į pRR-PEV1-CHis, skirtus *N. benthamiana* augalų infiltracijai *Agrobacterium tumefaciens* pagalba.

Pirmiausiai, patikrintas sukonstruotų raiškos vektorių efektyvumas prijungus GFP baltymą ir stebint fluorescenciją apšvietus augalus UV šviesa. Gauti rezultatai parodė intensyvią GFP baltymo sintezę, tačiau GFP sulieto su MBP raiška buvo lėtesnė. Tai galima sieti su baltymo dydžiu, kadangi MBP-GFP yra gana didelis (44 kDa), palyginus su His-GFP (28 kDa), o tai galėjo prisidėti prie lėtesnės baltymo sintezės. Pastebėta, kad vieno MBP baltymo raiška vyksta labai silpnai, tačiau suliejus jį su GFP, raiška pagerėja. Geriausiai vyksta MBP, sulieto su gausiausiai sintetinamais alergenis, sintezė. Tikėtina, kad neefektyvi MBP baltymo raiška yra dėl to, kad jį koduoja bakterijų seka. MBP sekos optimizavimas parenkant optimalų *N. benthamiana* kodonų rinkinį galėtų padidinti raiškos efektyvumą. Tokiu atveju būtų galima pasiekti geresnių ne tik MBP, bet ir su juo sulietų alergenų, sintezės rezultatų.

Šiame moksliniame darbe pasirinkta sukonstruoti raiškos sistema daugumai tiriamų alerginių baltymų pasiteisino. Modifikuoto tabako mozaikos viruso vektorių dėka gauta efektyvi Ole e 1, Pru p 1, Aln g 1, Poa p 1, Ana c 2, Cor a 2 nesekretuojamų alergenų raiška.

Alyvuogių Ole E 1 baltymo sintezei jau anksčiau buvo naudota *E.coli* bakterijos kaip prokariotų sistema bei *Pichia pastoris* kaip eukariotų sistema. 1994 metais pirmą kartą Ole e 1 baltymas sintetintas *E.coli* bakterijose, suliejus jį su glutationo S transferaze, tačiau nesėkmingai. Afininės chromatografijos būdu išgryninus baltymą, Ole e 1 gautas kaip didelės molekulinės masės agregatas, ir tik nedidelė dalis tirpios monomerinės formos (Villalba *et al.*, 1994). Tokie rezultatai paskatino mokslininkus ieškoti tinkamesnės šio baltymo raiškos sistemos. Tam tikslui, buvo pabandyta *P. pastoris* sistema. Ole e 1 efektyviai sekretuotas į ekstraląstelinę ertmę kaip atskiras baltymas (Huecas *et al.*, 1999). Šiame darbe pabandyta *N. benthamiana* sistema Ole e 1 baltymo raiškai. SDS-PAGE poliakrilamidiniuose geliuose matomas baltymas su visais raiškos konstruktais. Tokius rezultatus patvirtino atlikta baltymų imuninė (Western) analizė, kurioje aptikta antikūnų sąveika prieš His tag bei MBP.

Persiko Pru p 1 bei juodalksnio Aln g 1 baltymai priklauso su patogeneze susijusių baltymų superšeimai ir dalyvauja augalų apsaugoje prieš patogenus. Abiejų baltymų raiška anksčiau buvo sėkmingai atlikta *E.coli* bakterijose. Šiame darbe sukonstruota raiškos sistema taip pat pasiteisino. Gauti laukiamo apytikslio dydžio baltymai su visais naudotais šių alergenų konstruktais. Taip pat sėkmingai pavyko gauti apie 28 kDa dydžio pievinės miglės Poa p 1 baltymą su pRR-PEV-NHis konstruktu bei apie 70 kDa Poa p 1 baltymą sulietą su MBP. Western bloto analizė patvirtino gautus rezultatus.

Ana c 2 – tai ananaso vaisiuose randamas baltymas bromelainas. Iki šiol jo sintezė dar nebuvo bandyta jokioje raiškos sistemoje. Šiame darbe gauti rezultatai parodė Ana c 2 baltymo sintezę *N. benthamiana* augaluose. SDS-PAGE poliakrilamidiniuose geliuose gauti laukiamo dydžio baltymai – 37 kDa (NHIS-AnaC2) bei 80 kDa (MBP-AnaC2), tačiau praėjus kuriam laikui, naujai darytuose geliuose jų nebuvo aptikta. Tai galima paaiškinti tuo, jog Ana c 2 yra proteazė, todėl atšildant mėginį dėl temperatūrų svyravimų, baltymas galėjo degraduoti. Western bloto analizė patvirtino tiek sekretuojamo, tiek ir nesekretuojamo bei sulieto su MBP alergeno buvimą. Šios proteazės sintezės laiką riboja jos keliami žala lapams, todėl mėginius reikia paimti anksčiau, septinių dienų laikotarpyje po infiltravimo, tačiau kai kurių kitų baltymų daugiausia buvo praėjus beveik dviem savaitėms po transformuotų agrobakterijų infiltravimo.

Lazdyno riešutų Cor a 2 alergenas priklauso profilinų superšeimai ir ankstesniuose bandymuose buvo sintetintas *E. coli* bakterijose. Šiame darbe infiltravus *N. benthamiana* augalus pRR-PEV1-NHis-CorA2 bei pRR-PEV1-MBP-CorA2 raiškos konstruktais, gauti laukiamų dydžių baltymai – atitinkamai ~15 kDa ir ~58 kDa. Western bloto analizė patvirtino sėkmingą Cor a 2 baltymo raišką. Bet kadangi Cor a 2 sukelia lapų nekrozę, šio baltymo raišką lapuose irgi galima vykdyti tik savaitę ar mažiau.

Tiriama virusinė raiškos sistema *N. benthamiana* augaluose nevisiškai pasiteisino paprastojo kiekio Art v 6 alergeno sintezei. SDS-PAGE poliakrilamidiniuose geliuose nebuvo matomų laukiamo dydžio baltymų tiek su, NHIS konstruktu, tiek su MBP. Atlikta baltymų imuninė analizė parodė antikūnų sąveiką prieš His tag uodegėlę, kas įrodo Art v 6 baltymo sintezę augale, tačiau nebuvo antikūnų signalo prieš MBP baltymą. Panašūs rezultatai buvo gauti su Hel a 3 nesekretuojamos formos baltymu. Kadangi nesekretuojantiems baltymams buvo naudotas natyvūs stop kodonai, manoma, kad galėjo vykti jų supresija ar būti neefektyvi terminacija, kas ir galėjo nulemti silpną alergenu raišką. Nesekreuojami Art v 6 ir Hel a 3 baltymai galėjo degraduoti dėl netinkamo susilankstymo ar neįvykusių potransliacinių modifikacijų, kurios vyksta tik sekretinio kelio kompartmentuose ir galimai stabilizuojančias jų struktūrą.

Iš sekretuojamų baltymų atmainų geriausius rezultatus pademonstravo Hel a 3 alergenas. Atlikus baltymų imuninę analizę matomas antikūnų signalas prieš His tag. NHIS-HelA3 baltymo signalas buvo labai silpnas, o sekretuojančio (CHIS-HelA3) – akivaizdus. Tačiau Ana c 2 bei Ole e 1 baltymų raiška nebuvo tokia efektyvi. Sekretuojamų formų konstruktais buvo naudojamos natyvios signalinės sekos, tai irgi galėjo nulemti silpnesnę raišką. Galbūt verta šių alergenu raiškai pabandyti jau patikrintas signalines sekas, pavyzdžiui, ryžių amilazės signalinę seką. Be to, šių baltymų mėginiams paruošti buvo naudoti tie patys

būdai ir ta pati ląstelių ardymo procedūra, kaip ir citozoliniams baltymams ir dauguma sekretuojamų į periplazmą baltymų galėjo likti neišsekstrahavę iš ląstelių sienelių nuolaužų. Tam patikrinti, reikėtų pabandyti kitas mėginių paruošimo metodikas, labiau pritaikytas periplazminiams baltymams. Taipogi SDS-PAGE geliuose nesimatė pačių mažiausių, ~11 kDa baltymų. Čia gali būti kalti naudoti elektroforezės buferiai ir galbūt per maža akrilamido koncentracija, neleidžiantys efektyviai aptikti tokios mažos molekulinės masės baltymų.

Kai kurie iš analizuojamų alergenų sukėlė neigiamą poveikį infiltruotiems augalams. Nors pavyko gauti nemažą kiekį Ana c 2 bei šiek tiek Cor a 2 bei Hel a 3 baltymų, po *N. benthamiana* augalų infiltracijos šių alergenų agrobakterijų transformantais infiltruoti lapai pradėjo vysti ir džiūti praėjus vos kelioms dienoms. Tokį Ana c 2 poveikį augalui galima paaiškinti tuo, kad šis baltymas yra proteazė, todėl ji galėjo neigiamai paveikti augalo baltymus. Didelis Cor a 2 alergeno kiekis taip pat tapo toksiškas augalo ląstelei. Cor a 2 priklauso profilinei superšeimai. Yra žinoma, kad profilinei rišasi su aktinu ir lemia citoskeleto struktūrą, tačiau esant didelėms koncentracijoms, šie baltymai gali užkirsti kelią aktino polimerizacijai, kas ir galėjo tapti kenksmingumo priežastimi infiltruotiems lapams. Toksišku poveikiu augalams taip pat pasižymėjo ir Hel a 3 baltymas, priklausantis nespecifinių lipidų pernašos baltymų grupei. Nieuwland *et al.* 2005 m. atliktame tyrime nustatyta, kad LTP baltymai gali sąveikauti su hidrofobinėmis ląstelių sienelėmis ir suardyti jas. Tai ir galėjo būti viena iš lapų vytimo priežasčių.

Apibendrintai galima teigti, kad tabako mozaikos viruso pagrindu sukonstruota laikinos raiškos sistema yra potencialus biotechnologinis įrankis alerginių baltymų sintezei *N. benthamiana* augaluose, ypač tuomet, kai prokariotinėse ar žemesniųjų eukariotų sistemose šių baltymų sintezė neefektyvi ar susintetinti baltymai praranda antigeniškumą. O siekiant gauti didesnius baltymo kiekius, augalų laikinos raiškos sistema yra pigesnė, kadangi nereikia bioreaktorių ir gana brangių terpių, jos išplečiamumas yra praktiškai neribotas, kadangi padidinti šiltnamių plotą yra daug pigiau nei reaktorių tūrį. Tokia alerginių baltymų gavimo strategija gali pasitarnauti molekulinėje alergologijoje bei alerginių ligų diagnostikoje.

IŠVADOS

1. Sukonstruota modifikuoto tabako mozaikos viruso laikinos raiškos sistema *Nicotiana benthamiana* augaluose yra funkcionali;
2. Atlikti tyrimai parodė, jog dalies tiriamų baltymų raiška yra pakankamai didelė, kad sukonstruotus vektorius būtų galima panaudoti šių rekombinantinių alergenų produkcijai.
3. Sulietų su MBP alergenų sintezė daugumoje atvejų vyko silpniau nei nesulietų, bet ją pagerinti turėtų sintetinis MBP genas, turintis *N. benthamiana* optimizuotų kodonų rinkinį.
4. Sekretuojamų baltymų raiškai padidinti reikėtų pabandyti kitas signalines sekas, taip pat pritaikyti periplazminiams baltymams labiau tinkamą baltymų ekstrakcijos metodiką.
5. Mažų baltymų aptikimui pagerinti naudoti tam optimizuotus SDS-PAGE komponentus ir sąlygas.
6. Cor a 2, Ana c 2 bei Hel a 3 baltymai turi toksišką poveikį infiltruotiems augalams, todėl reikia optimizuoti augalų auginimo sąlygas ir mėginių paėmimo laiką. Ateityje galima panaudoti baltymų inžineriją, siekiant panaikinti tų baltymų funkcinį aktyvumą išlaikant antigenines savybes.

Aurelija Šileikaitė

Augalinių alergenų sintezė *Nicotiana benthamiana* laikinos raiškos sistemoje

Santrauka

Alergija – tai stipri imuninės sistemos reakcija į tam tikras medžiagas, kurios paprastai nesukelia jokio poveikio žmogaus organizmui. Bet kokia medžiaga savo sudėtyje turinti baltymų gali sukelti alergiją. Šiuo metu populiariausias alergijų diagnozavimo metodas yra pagrįstas iš natūralios žaliavos gautų ekstraktų naudojimu. Žinoma, kad vieną alergijos šaltinį sudaro įvairių komponentų mišinys, o kiekvienas alergeno komponentas turi skirtingas charakteristikas. Neretai diagnostikoje pasitaiko kryžminės IgE antikūnų sąveikos su homologiškais baltymais. Taip pat naudojamuose ekstraktuose gali būti komponentų ir iš kitų alergenų šaltinių. Šie aspektai apsunkina ekstraktų standartizavimą bei alerginių ligų diagnozavimą.

Atskirų alergeno šaltinio baltymų naudojimas galėtų padidinti alergijas nustatančių testų jautrumą, tačiau tam reikalingi dideli alergenų kiekiai. Šį uždavinį galima išspręsti pasitelkiant genų inžinerijos metodus. Augalų raiškos sistemos tampa vis populiariesne platforma įvairių terapinių baltymų sintezei dėl didelės išėigos, pigumo bei tinkamų postransliacinių modifikacijų.

Šiame darbe panaudota tabako mozaikos viruso pagrindu sukurta *Nicotiana benthamiana* augalų laikinos raiškos sistema juodalksnio (lot. *Alnus glutinosa*) Aln g 1, Europinio alyvmedžio (lot. *Olea europaea*) Ole e 1, pievinės miglės (lot. *Poa pratensis*) Poa p 1, valgomąjo ananaso (lot. *Ananas comosus*) Ana c 2, persiko (lot. *Prunus persica*) Pru p 1, paprastojo lazdyno (lot. *Corylus avellana*) Cor a 2, paprastosios saulėgrąžos (lot. *Helianthus annuus*) Hel a 3 ir paprastojo kiečio (lot. *Artemisia vulgaris*) Art v 6 baltymų gamybai.

VILNIUS UNIVERSITY

Life Sciences Center

Aurelija Šileikaite

**The synthesis of plant allergens
in *Nicotiana benthamiana* transient expression system**

Summary

Allergy is a strong immune system reaction to certain substances that normally do not cause any effect to a human body. Any substance that contains protein can cause allergy. Currently, the most popular method of diagnosing allergies is based on the use of extracts from natural materials. It is known that one source of allergies is a mixture of different components and each component has different characteristics. Often cross-interactions of IgE antibodies with homologous proteins occur in diagnostics. The extracts used may also contain components from other sources of allergens. These aspects complicate the standardization of extracts and the diagnosis of allergic diseases.

The use of individual proteins could increase the sensitivity of allergy-detecting tests, but it requires high levels of allergens. This problem can be solved using genetic engineering techniques. Plant expression systems are becoming an increasingly popular platform for the synthesis of various therapeutic proteins due to high yields, affordability and suitable post-transduction modifications.

We used transient expression system of black alder (lot. *Alnus glutinosa*) Aln g 1, olive (lot. *Olea europaea*) Ole e 1, kentucky bluegrass (lot. *Poa pratensis*) Poa p 1, pineapple (lot. *Ananas comosus*) Ana c 2, peach (lot. *Prunus persica*) Pru p 1, hazel (lot. *Corylus avellana*) Cor a 2, sunflower (lot. *Helianthus annuus*) Hel a 3, mugwort (lot. *Artemisia vulgaris*) Art v 6 proteins production that is based on tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana* plants.

PADEKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui dr. Raimundui Ražanskui už suteiktas žinias, pagalbą, skirtą laiką bei didelę kantrybę.

Dėkoju Eukariotų genų inžinerijos skyriaus vedėjai dr. Rasai Burneikienei-Petraitytei už pagalbą atliekant baltymų imunocheminę analizę. Taip pat esu dėkinga dr. Astai Abraitienei už naudingus patarimus bei pagalbą kasdieniniame darbe.

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) Ahlquist P, French R, Janda M, Loesch-Fries LS. Multicomponent RNA Plant Virus Infection Derived from Cloned Viral cDNA. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1984; 81(22): 7066-70.
- 2) Akdis CA, Agache I *et al.* Global atlas of allergy. EAACI. 2014; 60-67.
- 3) Anto J, M, Bousquet J, Akdis M, Auffray C, Keil T, Momas I, et al. Mechanisms of the development of allergy (MeDALL): Introducing novel concepts in allergy phenotypes. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2017; 139(2): 388–399.
- 4) Bevan M. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. Nucleic Acids Res. 1984; 12: 8711–21.
- 5) Breiteneder H, Krebitz M, Wiedermann U, Wagner B, Essl D, Steinkellner H, Turpen TH, Ebner C, Buck D, Niggemann B, Scheiner O. Rapid production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana* and their impact on diagnosis and therapy. Int Arch Allergy Immunol. 2001;124:48–50.
- 6) Breiteneder H, Mills C. Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2005; 5(3): 275-9.
- 7) Breiteneder H. Can any protein become an allergen? Rev. Fr. d'Allergologie d'Immunologie Clin. 2008; 48:135–138.
- 8) Carvalho Ad. O., Gomes V. M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology—A concise review. Peptides. 2007; 28: 1144–53.
- 9) Dawson WO, Bubrick P, Grahtham GL. Modifications of the Tobacco Mosaic Virus Coat Protein Gene Affecting Replication, Movement and Symptomatology. Phytopathology 1988;78: 783-89.
- 10) Dousti F, Assarehzadegan M-A, Morakabati P, Khosravi GR, Akbari B. Molecular Cloning and Expression of Pro J 1: A New Allergen of Prosopis Juliflora Pollen. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2016; 15(2):122-131.
- 11) Fernandes H, Michalska K, Sikorski M, Jaskolski M. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. FEBS J. 2013;280(5):1169–99.
- 12) Ferreira F, Wolf M, Wallner M. Molecular approach to allergy diagnosis and therapy. Yonsei medical journal. 2014; 55(4):839–52.
- 13) French R, Janda M, Ahlquist P. Bacterial Gene Inserted in an Engineered RNA Virus: Efficient Expression in Monocotyledonous Plant Cells. Science 1986; 231:1294-97.

- 14) Gaier S, Marsh J, Oberhuber C, Rigby NM, Lovegrove A, Alessandri S, et al. Purification and structural stability of the peach allergens Pru p 1 and Pru p 3. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52
- 15) Giangrieco I, Rapaioni C, Liso M, et al. Allergens in allergy diagnosis: a glimpse at emerging new concepts and methodologies. *Transl Med UniSa.* 2012; 4:27–33.
- 16) Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. Magniffection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine.* 2005; 23(17–18):2042–2048.
- 17) Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. Viral Vectors for the Expression of Proteins in Plants. *Current Opinion in Biotechnology* 2007;18: 134-41.
- 18) Gleba Y. Y, Tuse D, Giritch A. Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 375:155–92.
- 19) Hamorsky KT, Grooms-Williams TW, Husk AS, Bennett LJ, Palmer KE, and Nobuyuki Matoba N. Efficient single tobamoviral vector-based bioproduction of broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibody VRC01 in *Nicotiana benthamiana* plants and utility of VRC01 in combination microbicides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2013; 57(5):2076–86.
- 20) Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy, asthma, and clinical immunology: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology.* 2010; 6(1):1.
- 21) Hefferon K. Plant virus expression vector development: new perspectives. *BioMed research international.* 2014; 785382:6.
- 22) Hefferon K. Plant Virus Expression Vectors: A Powerhouse for Global Health. *Biomedicines.* 2017; 5(3):2-11.
- 23) Huecas S, Villalba M, González E, Martínez-Ruiz A, Rodríguez R. Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem.* 1999;261:539-46.
- 24) Yuzhu Zhang, Wen-Xian Du, Cécile Fregevu, Mahendra H. Kothary, Leslie Harden, and Tara H. Expression, Purification, and Characterization of Almond (*Prunus dulcis*) Allergen Pru du 4. *McHugh Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2014; 62(52): 12695-700.
- 25) Kamimura K, Suda T, Zhang G, Liu D. Advances in gene delivery systems. *Pharmaceutical medicine.* 2011;25(5):293–306.
- 26) Kavaliūnas A, Šurkienė G, Dubakienė R, Stukas R. Alergijos maistui epidemiologija: rizikos veiksniai, paplitimas, reikšmė. *Visuomenės sveikata.* 2010;4(51):35-44.

- 27) Kofler S, Asam C, Eckhard U, Wallner M, Ferreira F, Brandstetter H. Crystallographically mapped ligand binding differs in high and low IgE binding isoforms of birch pollen allergen bet v 1. *J Mol Biol* 2012; 422:109-23.
- 28) Krishnan K, Moens P. Structure and functions of profilins. *Biophysical reviews*. 2009; 1(2), 71–81.
- 29) Li C Y, Jiang Y, Guo W, and Liu Z. Production of a chimeric allergen derived from the major allergen group 1 of house dust mite species in *Nicotiana benthamiana*. *Human Immunology*. 2013; 74(5):531–37.
- 30) Lindorff-Larsen K., and J. R. Winther. Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS Lett*. 2001; 488:145–148.
- 31) Lo Conte L, Brenner S.E, Hubbard T.J, Chothia C, and Murzin A.G. SCOP database in 2002: refinements accommodate structural genomics. *Nucleic Acid Res*. 2002; 30: 264 – 267.
- 32) Marillonnet S., Giritch A., Gils M., Kandzia R., Klimyuk V. and Gleba Y. In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101:6852–6857.
- 33) Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S, Susani M, et al. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *Journal of molecular biology*. 2003;325(1):123–33.
- 34) Matricardi P. M. *et al.* EAACI Molecular Allergology User’s Guide. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2016; 27:173–208.
- 35) Mills EN, Jenkins JA, Alcocer MJ, Shewry PR. Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004; 44(5):379–407.
- 36) Moreno F. J., & Clemente A. 2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens?. *The open biochemistry journal*. 2008; 2:16–28.
- 37) Mortimer CL, Dugdale B, Dale J.L. Updates in inducible transgene expression using viral vectors: from transient to stable expression. *Current Opinion in Biotechnology*. 2015; 32:85–92.
- 38) Nausch H, Mischofsky H, Koslowski R, Meyer U, Broer I, Huckauf J. Expression and subcellular targeting of human complement factor C5a in *Nicotiana* species. *PLoS ONE*. 2012; 7.

- 39) Nieuwland J, Feron R, Huisman BA, Fasolino A, Hilbers CW, Derksen J, Mariani C. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. *Plant Cell*. 2005; 17(7):2009-19.
- 40) Pogue, Gregory P, Steven Holzberg. Transient Virus Expression Systems for Recombinant Protein Expression in Dicot-and Monocotyledonous Plants. 2012; 191-200.
- 41) Poznanski J, Sodano P, Suh S.W., Lee J.Y, Ptak M, and Vovelle F. Solution structure of a lipid transfer protein extracted from rice seeds. Comparison with homologous proteins. *Eur. J. Biochem*. 1999; 259: 692–708.
- 42) Radauer C, Lackner P, Breiteneder H. The bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evol Biol*. 2008;8:286.
- 43) Riazantsev DIu, Drobiazina PE, Hlgatian SV, Zavriev SK, Svirshchevskaia EV. Expression of house dust mite allergens Der f 1 and Der f 2 in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Russ J Bioorg Chem*. 2014; 40(4): 468-78.
- 44) Roux KH, Teuber SS, Sathe SK. Tree nut allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003; 131(4):234–44.
- 45) Salazar-González J.A., Bañuelos-Hernández B, Rosales-Mendoza S. *Plant Mol Biol*. 2015; 87:203-17.
- 46) Salcedo G, Quirce S, Diaz-Perales A. Wheat allergens associated with Baker’s asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011; 21:81–92.
- 47) Sasnauskas K. Genų inžinerijos pagrindai. 2006; Vilnius
- 48) Schmidt G, Gadermaier G, Pertl H, Siegert M, Oksman-Caldentey K. M, Ritala A, Ferreira F. Production of recombinant allergens in plants. *Phytochemistry reviews : proceedings of the Phytochemical Society of Europe*. 2008; 7(3):539–52.
- 49) Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2002; 357: 133–42
- 50) Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant cell*. 1995; 7(7), 945–56.
- 51) Siegel A. RNA Viruses as Cloning Vehicles. *Phytopathology*. 1983;73: 775.
- 52) Siegert M, Pertl-Obermeyer H, Gadermaier G, Ferreira F, Obermeyer G. Expression of the major mugwort pollen allergen Art v 1 in tobacco plants and cell cultures: problems and perspectives for allergen production in plants. *Plant Cell Rep*. 2012;31(3):561–571.

- 53) Sinha M, Singh RP, Kushwaha GS, Iqbal N, Singh A, Kaushik S, Kaur P, Sharma S, Singh TP. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *Sci World J.* 2014;2014:543195.
- 54) Tzfira T, Citovsky V. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current opinion in biotechnology.* 2006; 17(2):147-54.
- 55) Valenta R, Hochwallner H, Linhart B, Pahr S. Food allergies: the basics. *Gastroenterology.* 2015; 148(6):1120–31.
- 56) Villalba M, Batanero E, Monsalve IR, De la Peña MAG, Lahoz C, Rodríguez R. Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen—Polymorphism analysis and tissue-specificity. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 15217–222.