

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Molekulinės biologijos studijų programos magistrantė

Viktorija PREITAKAITĖ

Magistrinis darbas

**Bakterinių izocitozino deaminazių tyrimai**

**Darbo vadovė:**

Dr. Agota Aučynaitė

**Vilnius, 2020 m.**

## **Bakterinių izocitozino deaminazių tyrimai**

Darbas atliktas Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje

Viktorija Preitakaitė

/parašas/

Darbo vadovė:

Leisti / neleisti gintis:

Dr. Agota AUČYNAITĖ

/parašas/

2020 m. sausio 14 d.

# TURINYS

SANTRUMPOS .....	5
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	8
1.1. Citozino deaminazės .....	8
1.2. Izocitozino deaminazės .....	10
1.3. Deaminazių pritaikymas vėžio gydymui .....	11
1.4. Fermentų evoliucija.....	15
1.5. Fermentų evoliucija <i>in vitro</i> .....	17
1.6. Fermentų atrankos strategijos.....	21
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	27
2.1. Medžiagos .....	27
2.1.1. Fermentai ir reagentai.....	27
2.1.2. PGR naudoti pradmenys.....	27
2.1.3. Bakterijų kamienai .....	29
2.1.4. Bakterijų auginimo sąlygos, terpės bei plazmidės .....	29
2.1.5. Tirpalai .....	30
2.2. Metodai .....	30
2.2.1. DNR amplifikacija PGR metodu.....	30
2.2.2. DNR išskirstymas agarozės gelyje vykdant elektroforezę .....	30
2.2.3. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio .....	31
2.2.4. <i>Escherichia coli</i> chemokompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija .....	31
2.2.5. <i>Escherichia coli</i> elektrokompetentinių ląstelių paruošimas ir elektroporacija.....	32
2.2.6. Plazmidinės DNR skyrimas iš <i>E. coli</i> ląstelių .....	32
2.2.7. Rekombinantinės DNR konstravimas .....	33
2.2.8. DNR išsodinimas.....	33
2.2.9. Atsitiktinė plazmidinės DNR mutagenezė .....	33
2.2.10. Tikslinė plazmidinės DNR mutagenezė .....	34
2.2.11. <i>E. coli</i> kamienų konstravimas .....	34
2.2.12. Rekombinantinių 6× His žymę turinčių baltymų sintezė .....	35
2.2.13. Bakterijų ardyimas ultragarsu.....	35
2.2.14. 6× His žymę turinčių rekombinantinių baltymų gryninimas.....	36
2.2.15. Baltymų elektroforezė .....	36
2.2.16. Baltymų dializė .....	36
2.2.17. Substratinio specifiškumo tyrimas .....	37
2.2.18. Plonasluoksni chromatografija .....	37
2.2.19. Fermentinio aktyvumo matavimai.....	37

2.2.20.	Didelio efektyvumo skysčių chromatografija–masių spektrometrija.....	38
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	39
3.1.	Plazmidinio vektoriaus pQE70-Vcz konstravimas.....	39
3.2.	Atsitiktinė Vcz izocitozino deaminazės mutagenezė .....	42
3.3.	Tikslinė Vcz izocitozino deaminazės mutagenezė .....	44
3.4.	KANOS deaminazės aminorūgščių sekos analizė.....	47
3.5.	<i>E. coli</i> HMS174 $\Delta$ pyrF $\Delta$ codA kamieno konstravimas.....	49
3.6.	Plazmidinio vektoriaus pET28a-KANOS konstravimas .....	50
3.7.	Rekombinantinės KANOS deaminazės gryninimas bei substratinio specifškumo tyrimai .	52
3.8.	Rekombinantinės KANOS deaminazės fermentinio aktyvumo matavimai .....	56
3.9.	Dviejų fermentų-vieno provaisto sistemos analizė .....	57
3.10.	Plazmidinių vektorių, koduojančių Vcz-D8 baltymų hibridus, kūrimas .....	59
3.11.	Rekombinantinio Vcz-D8 baltymo gryninimas bei fermentinio aktyvumo analizė .....	62
	IŠVADOS .....	67
	SANTRAUKA .....	68
	SUMMARY .....	69
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	70
	PRIEDAI .....	76

## SANTRUMPOS

4-AAP – 4-aminoantipirinas	FRT – flipazės atpažinimo taikiny
5-FC – 5-fluorocitozinas	H – hibridas
5-FdUMP – 5-fluoro-2'-deoksiuridin-5'-monofosfatas	HPLS-MS – didelio efektyvumo skysčių chromatografija–masių spektrometrija (angl. <i>high-performance liquid chromatography–mass spectrometry</i> )
5-FdUTP – 5-fluoro-2'-deoksiuridin-5'-trifosfatas	IC/iC – izocitozinas
5-FiC – 5-fluoroizocitozinas	LB – Luria Broth
5-FU – 5-fluorouracilas	PGR – polimerazės grandininė reakcija
5-FUDP – 5-fluorouridin-5'-difosfatas	RE – restrikcijos endonukleazė
5-FUTP – 5-fluorouridin-5'-trifosfatas	RNR – ribonukleorūgštis
A – N <sup>2</sup> -acetil-izocitozinas	SDS-PAGE – elektroforezė natrio dodecilsulfato poliakrilamidiniame gelyje (angl. <i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
Adipil-7-ADCA – adipil-7-aminodesacetoksicefalosporaninė rūgštis	TAE – TRIS-acetatas-EDTA
AHS – aminohidrolazė	TLC – plonasluoksnė chromatografija (angl. <i>thin-layer chromatography</i> )
B – N <sup>4</sup> -benzoi-2'-deoksicitidinas	TRIS – tris(hidroksimetil)aminometanas
C – citozinas	TRIS-HCL – tris(hidroksimetil)aminometano hidrochloridas
CD – citozino deaminazė	U – uracilas
CDA – citidino deaminazė	UTP – uridino-5'-trifosfatas
CTP – citidino trifosfatas	UV – ultravioletas
dCt – deoksicitidinas	
DNR – deoksiribonukleorūgštis	
DTT – ditioneitolis	
EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis	
FLP – rekombinazė flipazė	

## ĮVADAS

Besivystantys molekulinės biologijos tyrimų metodai įgalino ne tik jau gerai žinomų bei išanalizuotų fermentų savybių tobulinimą, bet ir palengvino naujų, pasižyminčių pageidaujamosiomis savybėmis, atranką. Gamtoje ieškoma neįprastų junginių, savo savybėmis pranokstančių jau žinomų fermentų katalizines charakteristikas. Tokius variantus galima pritaikyti ne tik biotechnologijoje, bet ir pasitelkiant juos spręsti medicinos srities problemas (Gurung et al., 2013).

Vieni iš fermentų, identifikuotų Vilniaus universiteto Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje, yra izocitozino deaminazės Vcz ir KANOS. Vcz deaminazė įdomi tuo, jog citozinas nėra jos substratas, tačiau šis fermentas katalizuoja izocitozino virsmą uracilu, o taip pat kaip substratą geba panaudoti 5-fluoroizocitoziną (5-FiC), susidarant 5-fluorouracilui (5-FU). 5-FU – jau ilgą laiką pasaulyje plačiai taikomas chemoterapinis vaistas, taip pat naudojamas ir vėžio tikslinėje terapijoje.

Vienas iš tikslinės terapijos variantų yra fermento-provaisto poros panaudojimas lokalizuotai naikinti vėžines ląsteles. Tarp šiuo metu intensyviai tiriamų fermento-provaisto porų yra ir citozino deaminazės/5-fluorocitozino (CD/5-FC) pora. Citozino deaminazė (CD) yra nukreipiama į vėžines ląsteles ir sistemiškai į organizmą teikiamas netoksiškas provaistas 5-fluorocitozinas jos fermentinio aktyvumo dėka virsta toksišku 5-fluorouracilu tik prie vėžinių ląstelių. Deja, ši strategija turi trūkumų. Vienas jų atsiranda dėl to, kad natūrali organizmo mikroflora taip pat turi šiuos fermentus ir 5-fluorouracilas gaminamas ne ten kur skirta, todėl patiriamas bendras toksiškumas visam organizmui.

Vcz izocitozino deaminazė, pagerinus jos katalizines savybes, gali būti pritaikyta efektyviai sintetinti 5-FU iš 5-FiC vėžio tikslinėje terapijoje. Izocitozino deaminazės/5-FiC fermento-provaisto pora yra pranašesnė už šiuo metu aktyviai kliniškai tyrinėjamą klasikinę CD/5-FC porą jau vien dėl to, jog nei šis substratas nei fermentas nėra plačiai paplitę gamtoje, jų taip pat nėra aptinkama ir žinduolių ląstelėse. Šiame darbe bandoma atrinkti geresnėmis fermentinėmis savybėmis pasižyminčius Vcz izocitozino deaminazės variantus, panaudojant evoliucijos *in vitro* metodus. Tikėtina, jog padidinus Vcz deaminazės specifiškumą izocitozinui lygiagrečiai padidėtų ir 5-FiC deaminavimo efektyvumas, kas leistų tokią pagerintą Vcz izocitozino deaminazę pritaikyti tikslinei genų terapijai.

Tuo tarpu KANOS deaminazė kaip substratą geba naudoti tiek izocitoziną, tiek citoziną. Pagal aminorūgščių seką šis fermentas artimiausias citozino deaminazėms, tačiau

pirminiais duomenimis izocitoziną kaip substratą naudoja efektyviau negu klasikinė *E. coli* citozino deaminazė CodA. Dėl šios priežasties KANOS fermentas yra įdomus tarpinis variantas tarp Vcz izocitozino deaminazės bei klasikinių citozino deaminazių. Išsamiau ištyrus jo katalizines savybes ir substratinį specifiškumą paaiškėtų, ar KANOS deaminazę galima panaudoti 5-fluorouracilo gavimui iš 5-fluoroizocitozino ar 5-fluorocitozino.

Svarbu paminėti, jog tobulinant fermento-provaisto strategiją substrato aktyvavimui galima panaudoti daugiau nei vieną fermentą. Literatūroje yra keletas tokių substratų pavyzdžių, vienas iš jų – provaistas kapecitabinas, iš kurio 5-FU gaunamas veikiant net trimis fermentais: karboksilesterazei, citidino deaminazei bei timidino fosforilazei (Shimma et al., 2000). Vcz izocitozino deaminazė kartu su D8 amidohidrolaze (Urbelienė et al., 2019; nepublikuota) analogiškai gali būti pritaikytos 5-FU gavimui iš kompleksiškesnio substrato – 5-fluoro- $N^2$ -acetilizocitozino. Vcz-D8 hibridinis baltymas, išlaikantis abu fermentinius aktyvumus, dar labiau padidintų tokio vėžio terapijos varianto specifiškumą, t.y. leistų minimalizuoti bendro toksiškumo organizmui problemą.

**Darbo tikslas** buvo ištirti izocitoziną deamininančius fermentus Vcz bei KANOS ir įvertinti jų pritaikomumą vėžio terapijai.

Tikslui pasiekti iškelti 3 pagrindiniai **darbo uždaviniai**:

1. Atlikti izocitozino deaminazę Vcz koduojančio geno mutagenezę.
2. Nustatyti KANOS deaminazės katalizines savybes bei substratinį specifiškumą.
3. Sukurti veikiančią Vcz-D8 fermentų hibridinę sistemą.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

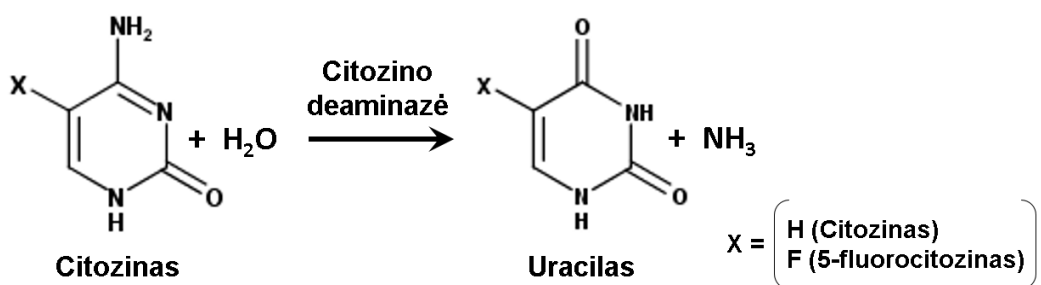
Literatūros apžvalgoje trumpai aprašomi citoziną modifikuojantys fermentai – citozino deaminazės. Taip pat aptariamas ir citozino izomeras – izocitozinas – bei pagrindinis šio darbo objektas – izocitozino deaminazės, galimas jų pritaikymas vėžio terapijoje. Paskutinės literatūros apžvalgos dalys yra skirtos aptarti fermentinių savybių gerinimui taikomą evoliuciją *in vitro* bei pagerintų fermentų atrankai ar naujų fermentų paieškai naudojamą atrankos sistemas.

## 1.1. Citozino deaminazės

Citozinas yra viena iš 5 nukleobazių, esančių nukleorūgščių (DNR bei RNR) sudėtyje. Šis ląstelinis pirimidinas ne tik prisideda prie informacijos saugojimo genome, bet ir yra citidino trifosfato (CTP) dalis, kuris organizme gali būti naudojamas kaip energijos turinti molekulė arba veikti kaip kofaktorius įvairiuose metaboliniuose procesuose (Aučynaitė et al., 2018a). Citozinas, kaip ir kitos nukleobazės, ląstelėje yra modifikuojamas įvairiais būdais: deaminavimo, metilinimo, oksidacijos bei demetilinimo procesų metu. Šie pokyčiai svarbūs generuojant įvairius citozino analogus, kurie organizme gali turėti įtakos koduojančioms sekoms, genų raiškai bei ląsteliniam identitetui (Nabel et al., 2012). Už citozino modifikacijas yra atsakingi skirtingų organizmų ląstelėse randami fermentai, kurie keisdami atitinkamas nukleobazės dalis suteikia jai ne tik akivaizdžių su paveldimos informacijos saugojimu susijusių funkcijų, bet ir tam tikrų unikalių ląstelei privalumą suteikiančių savybių.

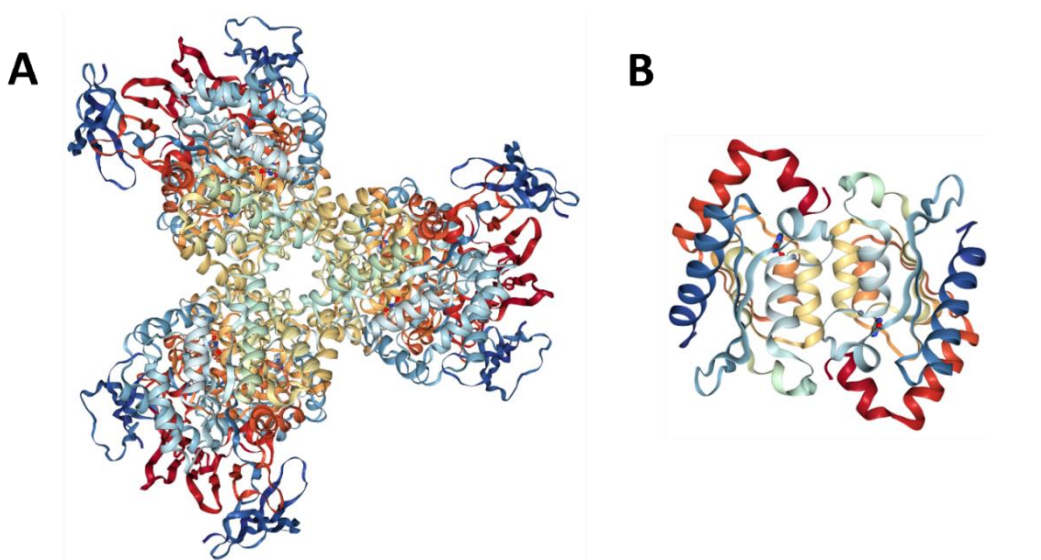
Citozino deaminazės yra fermentai, katalizuojantys hidrolizinį citozino deaminimą, dėl kurio susidaro uracilas ir amoniakas (1.1 pav.). Šios deaminazės atsižvelgiant į struktūrinius jų skirtumus gali būti padalintos į dvi pagrindines grupes: aminohidrolazės (AHS) bei citidino deaminazės tipo (CDA) superšeimas. Skirtingoms grupėms priklausančių fermentų kilmė taip pat nevienoda – didžioji dalis CDA fermentų buvo rasta grybiniuose organizmuose, o AHS šeimos deaminazės yra daugiausiai bakterinės kilmės. Ir nors abeiose šeimose esantys fermentai naudoja tapatų katalizės būdą, kuomet katalizinis aktyvumas priklauso nuo divalenčių metalų jonų, deaminazių sekų bei struktūros skirtumai yra ypač ryškūs (Gaded and Anand, 2018; Porter and Austin, 1993).





**1.1 pav.** Citozino deaminazės katalizuojama reakcija (Gaded and Anand, 2018)

Reikšmingi skirtumai tarp bakterinių ir grybinių fermentų buvo aptikti lyginant *Escherichia coli* ir *Saccharomyces cerevisiae* citozino deaminazes. Besiskirianti pirminė aminorūgščių seka, ketvirtinė struktūra, molekulinė masė bei specifiskumas ir afiniškumas substratui parodė, jog šie fermentai evoliucijos eigoje vystėsi nepriklausomai vienas nuo kito. Bakterinė citozino deaminazė, koduojama *codBA* operono, yra heksameras (1.2A pav.), kiekviename subvienete turintis maždaug 426 aminorūgščių radikalus, suteikiančius aktyviajam fermento kompleksui 300 kDa masę, tuo tarpu FCY1 geno koduojamas mielių fermentas yra homodimeras (1.2B pav.), kurio kiekvieno subvieneto masė yra 17 kDa (Hayden et al., 1998; Ireton et al., 2001; Portsmouth et al., 2007).



**1.2 pav.** *Escherichia coli* (A) ir *Saccharomyces cerevisiae* (B) citozino deaminazių struktūra (Ireton et al., 2002; Ko et al., 2003)

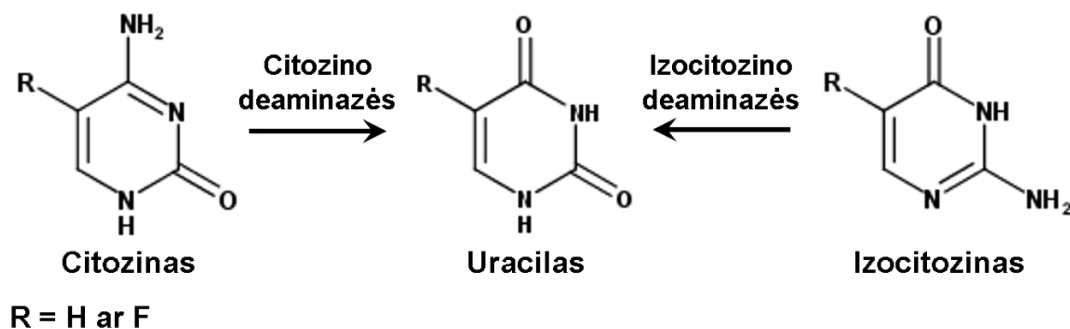
Įdomu tai, jog citozino deaminazės tiek prokariotuose, tiek grybuose atlieka ypač svarbų vaidmenį pirimidinų atkūrimo keliuose, tačiau žinduolių ląstelėse jos nėra randamos.

Ši ypatybė suteikė galimybę vystyti tyrimams, kuriuose citozino deaminazės bandoma panaudoti antimikrobinų vaistų kūrimui bei genų terapijai (Ireton et al., 2002).

## 1.2. Izocitozino deaminazės

Plėtojant nukleobazių tyrimus buvo naudojamos ir izomerinės nukleobazių formos, viena iš jų – izocitozinas (2-aminouracilas). Ši netipinė nukleobazė, kartu su izoguaninu, buvo naudinga pirmuosiuose tyrimuose, kurie padėjo išsiaiškinti, jog bazės gali sėkmingai poruotis ir ne pagal tradicinį A-T bei G-C porų modelį. Nustatyta, jog nenatūrali izocitozino-izoguanino pora gali stabiliai įsiterpti į DNR bei RNR replikacijos ar transkripcijos procesų metu. Taip pat kiek vėliau ši pora panaudota ir *in vitro* transliacijos tyrimuose, kurių metu susintetinti nestandartinių aminorūgščių turintys peptidai (Hirao et al., 2012). Galiausiai izocitozinas buvo ir yra naudojamas daugelyje fizikinių-cheminių studijų, tokių kaip vandenilinių ryšių (Camacho-García et al., 2015), metalo komplekso surišimo nukleobazėse (Gupta et al., 2004) ar tautomerizacijos proceso tyrimuose (Delchev and Mikosch, 2007).

Naujų fermentų, kurie gebėtų izocitoziną paversti uracilu, paieškose svarbų vaidmenį atliko metagenominės bibliotekos (Aučynaitė et al., 2018a), kurios ne tik sudaro sąlygas analizuoti nekultivuojamus mikroorganizmus, naudojantis aplinkos pavyzdžių visumine DNR (Handelsman, 2004), bet ir yra puikus kitais būdais sunkiai pasiekiamų genų, kurių produktai turi naujų dar nežinomų katalizinių aktyvumų, šaltinis (Popovic et al., 2015). Tyrimo metu buvo aptikti keli fermentai, kurie sugebėjo tapachiai citozino deaminazėms produkuoti uracilą, tačiau kaip substratą naudodami izocitoziną (1.3 pav.). Atliekant sekų analizę nustatyta, jog šios deaminazės priklauso AHS fermentų superšeimai bei jų kataliziniam aktyvumui taip pat, kaip ir citozino deaminazėms, reikalingi metalų jonai.

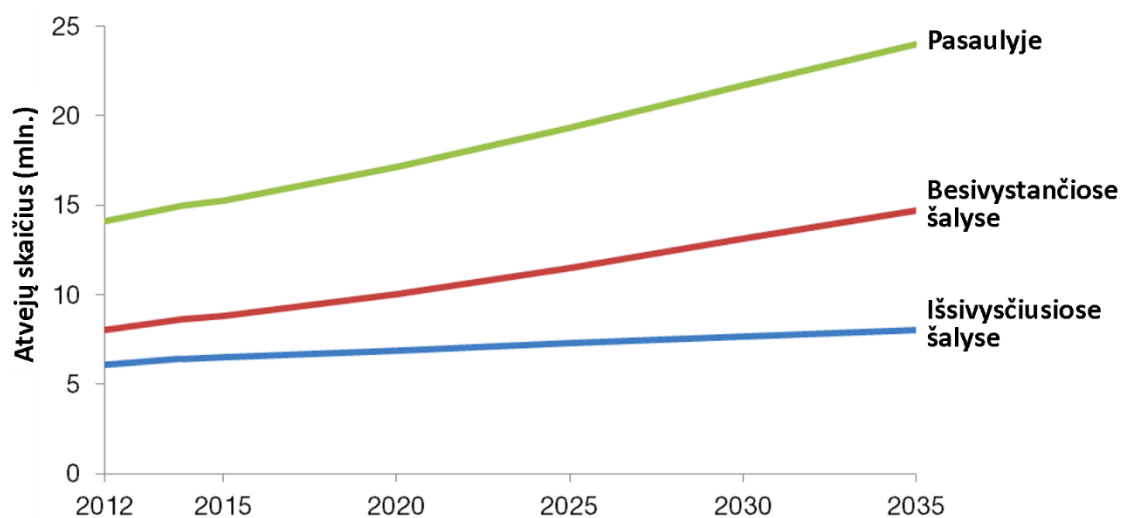


1.3 pav. Citozino ir izocitozino deaminazių substratai bei produktas

Įdomu tai, jog atrasti baltymai pasižymi gebėjimu katalizuoti ne tik izocitozino, bet ir 5-fluoroizocitozino deamininimą. Pastarąjį naudojant kaip substratą gaunamas 5-fluorouracilas, kuris jau ilgą laiką yra pritaikomas kaip chemoterapijos agentas. Keletas iš naujų deaminazių taip pat pasižymi dar vienu svarbiu privalumu – jos nekatalizuoja citozino virtimo uracilu (Aučynaitė et al., 2018a). Toks fermentinis specifiskumas gali pasitarnauti tobulinant tikslią vėžio terapiją, pavyzdžiui, panaudojant šias deaminazes ir 5-fluoroizocitoziną kaip naują fermento-provaisto porą, kuri plačiau aptariama šio darbo 1.3. poskyryje.

### 1.3. Deaminazių pritaikymas vėžio gydymui

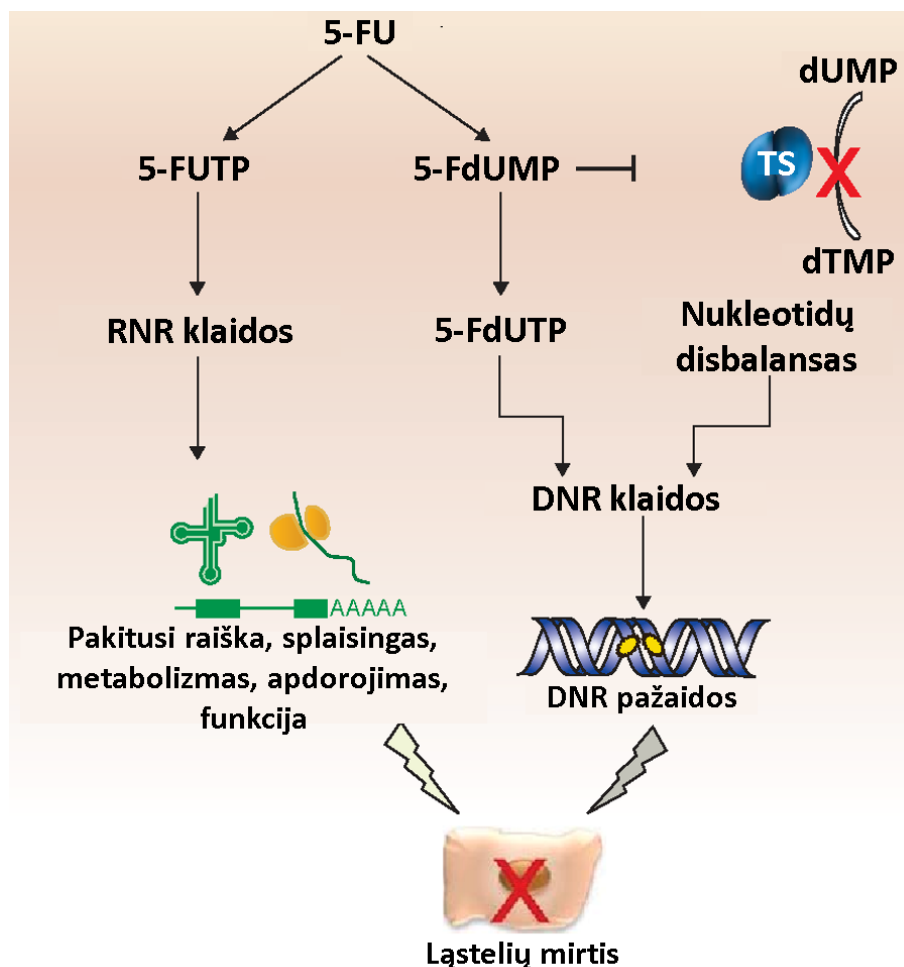
Vėžys pasauliniu mastu yra viena pagrindinių visuomenės sveikatos problemų. Remiantis demografinėmis charakteristikomis prognozuojama, jog ateinančiais dešimtmečiais vėžinių susirgimų dažnis ir toliau smarkiai didės – nuo 2025 metų tikimasi daugiau nei 20 milijonų naujų vėžio atvejų kasmet (1.4 pav.) (Zugazagoitia et al., 2016). Deja, šiuo metu vėžio gydymas yra tarsi šventasis Gralis, kadangi dauguma esamų gydymo būdų nėra pakankamai veiksmingi ir negali užtikrinti visiškos apsaugos nuo šios ligos (Chakraborty and Rahman, 2012). Vėžio terapija lyginant su kitų pagrindinių ligų gydymu kol kas turi mažiausią klinikinių tyrimų pasisekimo dažnį. Taigi akivaizdus veiksmingų priešvėžinių vaistų trūkumas iš dalies nulemia tai, jog vėžys išsivysčiusiose šalyse greitai taps pagrindine mirštamumo priežastimi (Cagan and Meyer, 2017).



1.4 pav. Prognozuojamas naujų vėžio atvejų skaičiaus pokytis iki 2035 metų (National Academies of Sciences, 2017)

Siekiant pakeisti dabartinę situaciją visame pasaulyje skiriama vis daugiau dėmesio bei lėšų naujų vėžio terapijos variantų kūrimui. Nepaisant to, pavienis ar kombinuotas chemoterapijos, radioterapijos bei chirurgijos taikymas net ir šiuo metu vis dar išlieka kertinis akmuo vėžio gydyme. Didžiausia problema yra tai, jog paminėti būdai turi daugybę nepageidaujamų poveikių, neišvengiamai padarančių ganėtinai daug papildomos žalos organizmui (Zarogoulidis et al., 2013). Tačiau kartu su greitu molekulinės biologijos vystymusi atsiranda ir naujų strategijų, kurios progresuoja į daug patrauklesnius bei saugesnius gydymo būdus. Vienas iš pavyzdžių yra genų terapija, tikslingai sukelianti vėžinių ląstelių žūtį (angl. *suicide gene therapy*, *Gene-Directed Enzyme/Prodrug Therapy (GDEPT)*). Tokiai terapijai naudojami genai paprastai koduoja žinduolių ląstelėse neaptinkamus fermentus, galinčius netoksiškus junginius (provaistus) paversti ypač toksiškais veikliais metabolitais (vaistais). Provaistų ir šių genų koduojamų fermentų panaudojimas navikiniame audinyje nulemia aktyvaus vaisto susidarymą vėžinėse ląstelėse, dėl ko jos žūsta (Lv et al., 2009).

Viena iš geriausiai ištirtų bei plačiausiai naudojamų tokio tipo genų terapijos sistemų yra fermento citozino deaminazės (CD) ir provaisto 5-fluorocitozino (5-FC) pora. Žinduolių ląstelėse ekspresuojamas CD fermentas geba paversti mažai toksišką pirimidiną – 5-FC, dažnai naudojamą grybelinėms infekcijos suvaldyti (Vermes et al., 2000), į plačiai taikomą chemoterapinį vaistą 5-fluorouracilą (5-FU). Tikslingai sukelta CD ekspresija vėžinėse ląstelėse veikia kaip chemoterapija, nukreipta tiesiogiai į navikinį audinį (Negroni et al., 2007). Šis procesas vyksta dėl to, kad citozino deaminazės aktyvuotas 5-FU ląstelinių fermentų yra toliau verčiamas į keletą metabolitų, tokių kaip 5-fluoro-2'-deoksiuridin-5'-monofosfatą (5-FdUMP), pasižymintį negrįžtamu timidilato sintazės slopinimu, ar 5-fluorouridin-5'-trifosfatą (5-FUTP) (1.5 pav.). Dėl 5-FdUMP sukulto timidilato sintazės slopinimo atsiranda timidino trūkumas, kuris užkerta kelią tolimesniems DNR sintezės procesams. 5-FUTP yra linkęs įsiterpti į RNR vietoje uridino-5'-trifosfato (UTP), dėl ko slopinamas ribosominės bei informacinės RNR apdorojimas branduolyje. Be to, 5-FUTP pirmtakas 5-fluorouridin-5'-difosfatas (5-FUDP) gali būti metabolizuojamas į 5-fluoro-2'-deoksiuridin-5'-trifosfatą (5-FdUTP), kuris įsiterpdamas į besiformuojančią DNR lemia pažaidų susidarymą (Portsmouth et al., 2007). Visi įvardinti procesai prisideda prie ląstelių augimo slopinimo bei galiausiai nulemia vėžinių ląstelių apoptozę (Karjoo et al., 2016). Tyrimais *in vitro* ir *in vivo* buvo parodyta, jog šio tipo terapija, pasitelkianti fermento-provaisto strategiją, gali būti naudojama daugeliui navikinių ląstelių tipų, tarp jų ir storosios žarnos, prostatos ar tiesiosios žarnos vėžio gydymui (Gaded and Anand, 2018).



**1.5 pav.** 5-fluorouracilo molekuliniai mechanizmai. 5-FU – 5-fluorouracilas; 5-FUTP – 5-fluorouridinin-5'-trifosfatas; 5-FdUMP – 5-fluoro-2'-deoksiuridinin-5'-monofosfatas; 5-FdUTP – 5-fluoro-2'-deoksiuridinin-5'-trifosfatas; TS – timidilato sintazė; dUMP – deoksiuridino monofosfatas; dTMP – deoksitimidino monofosfatas (adaptuota pagal Ceilley, 2012).

Nepaisant to, jog daugelyje klinikinių tyrimų CD/5-FC sistema buvo efektyvi, jos taikymas visgi yra ribotas. Pirmiausia šio tipo terapija pasižymi stipriu „stebėtojo efektu“ (angl. *bystander effect*), dėl ko vaistas gali būti nespecifiškai nukreipiamas į šalia vėžinių esančias normalias ląsteles (Yata et al., 2012). Dėl šios priežasties tikslingas sistemos pristatymas į naviką tampa viena pagrindinių terapijos problemų. Laimei, yra keletas perspektyvių sprendimo būdų – fermento-provaisto sistemos nešikliais panaudoti adenovirusus (Kambara et al., 2002) ar naviko tropizmu pasižyminčias mezenchimines kamienines (Sage et al., 2016) bei nervines kamienines ląsteles (Aboody et al., 2013). Kita CD/5-FC sistemos problema yra tai, jog bakterinės citozino deaminazės pasižymi gana žemu specifiškumu provaistui 5-FC, dėl ko bendras terapinis atsakas yra ribotas. Iš mielių gautoms citozino deaminazėms būdingas geresnis afiniškumas substratui, tačiau šie baltymai mažiau

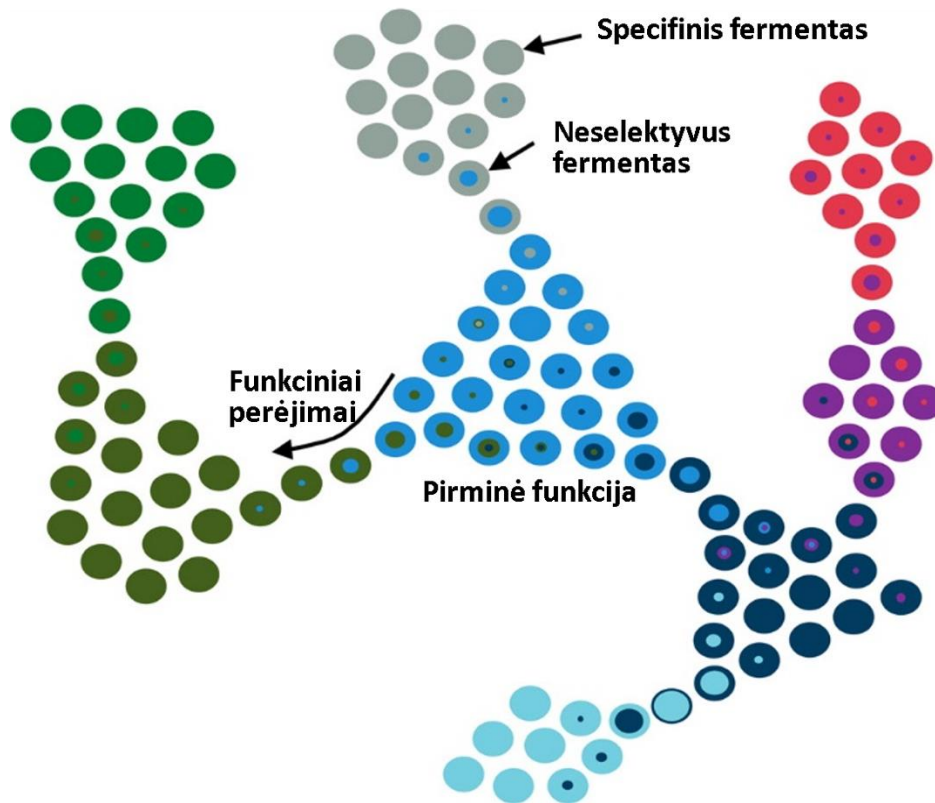
termostabilūs (Raza et al., 2015). 5-FC provaisto prieinamumą naviko vietoje dar labiau apriboja greitas jo pusinės eliminacijos laikas (angl. *half-life*) kraujyje (Fuchita et al., 2009). Viena rimčiausių kliūčių, su kuria susiduriama taikant CD/5-FC sistema paremtą gydymą, yra tai, jog 5-FC nėra visiškai nekenksminga molekulė. Atliekant klinikinės studijas pastebėtas žalingas 5-FC poveikis pradedant nedideliais sutrikimais, kaip pykinimas, vėmimas ar viduriavimas, ir baigiant kepenų bei kaulų čiulpų pažeidimais (Vermes et al., 2000). Manoma, taip vyksta dėl normalios žmogaus žarnyne esančios mikrofloros, kuri taip pat sintetina citozino deaminazės ir geba 5-FC paversti į 5-FU, dėl ko ir atsiranda šalutinis poveikis organizmui (Malekshah et al., 2016). Šie CD/5-FC terapijos trūkumai skatina ieškoti tam tikrų gydymo modifikacijų, galinčių padėti pašalinti efektyvumą ribojančius veiksnius bei sukurti minimalų šalutinį poveikį turinčią gydymo strategiją.

Viena naujausių idėjų, kuria vadovaujantis būtų galima modifikuoti bei, tikėtina, pagerinti CD/5-FC paremtą vėžio gydymo būdą, siūlo citozino deaminazės pakeisti izocitozino deaminazėmis (Kazlauskas et al., 2019). Atsižvelgiant į tai, jog izocitozino deaminazių substratas yra ne tik izocitozinas, bet ir 5-fluoroizocitozinas (5-FiC), šie fermentai gali būti greitai bei veiksmingai pritaikyti terapijos tobulinimui. Manoma, jog izocitozino deaminazės/5-FiC fermento-provaisto poros panaudojimas turi geresnį gydymo potencialą dėl tam tikrų priežasčių. Pirmiausia, tikėtina, jog žarnyno mikroflora nemetabolizuoja 5-FiC taip efektyviai kaip 5-FC. Nors *E. coli* citozino deaminazės geba modifikuoti izocitoziną, kinetiniai parametrai lyginant citozino bei izocitozino deamininimą skiriasi bent 10 kartų (Hall et al., 2011). Dar vienas privalumas yra tai, jog izocitozino deaminazių homologų žmogaus ląstelėse taip pat nebuvo rasta. Atlikti pirmieji tyrimai, kuriuose izocitozino deaminazę koduojančiu lentivirusu transdukuotos pelių kaulų čiulpų mezenchiminės ląstelės, kartu su provaistu 5-FiC, buvo suleistos navikus turinčioms pelėms. Terapiją patyrusių gyvūnų, lyginant su kontroliniais, išgyvenamumas siekė daugiau nei 50 %. Tiesa, šis tyrimas buvo įvardintas tik kaip bandomasis, kadangi egzistuoja labai daug eksperimentinių sąlygų, kurias pakeitus būtų galima pasiekti kur kas geresnius rezultatus (Kazlauskas et al., 2019). Todėl tikimasi, jog šios naujos fermento-provaisto poros panaudojimas vėžio gydymui (modifikavus keletą papildomų veiksnių) sėkmingai sušvelnintų ar net visiškai eliminuotų CD/5-FC sukeltas problemas, kritiškai svarbias visapusiškam terapijos pritaikymui (Aučynaitė et al., 2018a).

## 1.4. Fermentų evoliucija

Fermentų evoliucija yra atsitiktinis procesas, generuojantis įmanomus patobulinimus, susijusius su organizmo patiriamais aplinkos sukeltais iššūkiais (Tyzack et al., 2017). Kitaip tariant, fermentų funkcijos atsiranda, keičiasi ar išnyksta tuomet, kai organizmas turi prisitaikyti prie cheminių pokyčių savo aplinkoje (Copley, 2012). Moksliniai tyrimai atskleidė, jog fermentų funkcijų kitimas – adaptaciją skatinanti genetinė įvairovė – daugeliu atvejų priklauso nuo taškinių mutacijų kaupimosi. Nors dauguma jų yra neutralios ar žalingos, funkcijos įgijimo mutacijos gali sukurti naują jau egzistuojančio fermento aktyvumą. Be to, papildomos mutacijos gali padidinti naujo fermentinio aktyvumo lygį arba, pakaitoms atsiradus reguliatoriniuose regionuose, sustiprinti genų raišką, dėl ko fermento koncentracija ląstelėje gali pakilti iki fiziologinio lygmens (Schulenburg and Miller, 2014). Jei naujas fermentinis aktyvumas organizmui suteikia selektyvų pranašumą atliekant svarbų biologinį procesą, pavyzdžiui, gelbsti konkuruojant dėl išteklių, tai jis įsitvirtins populiacijoje – t.y., tokia mutacija bus perduodama palikuoniui, o papildomų naudingų mutacijų kaupimasis paspartins organizmo prisitaikymą prie naujų sąlygų. Taip atsiradusi funkcija gali išlikti kaip daugiafunkcinio fermento aktyvumas arba atsiskirti kaip pagrindinis naujo fermento veiklumas (Glasner et al., 2006).

Aštuntajame dešimtmetyje įsigalėjusi modernioji fermentų evoliucijos teorija teigia, jog evoliucija nesukuria naujovių nuo nulio, priešingai, ji veikia tai, kas jau egzistuoja (Jacob, 1977). Remiantis šiuo požiūriu nauja fermento funkcija išsivysto iš jau egzistuojančio fermento, atliekančio neselektyvius (angl. *promiscuous*) veiksmus, apibūdinamus kaip antrinės, fermento natyvius ir fiziologinius aktyvumus papildančios funkcijos. Taigi, pirminiai fermentai galimai buvo daugiafunkciniai (nespecializuoti) arba neselektyvūs, o pasikeitus aplinkos sąlygoms neselektyvus aktyvumas galėjo tapti tiksliu atrankos atžvilgiu ir būti toliau gerinamas kaupiantis mutacijoms, suteikiančioms didesnę katalizinę aktyvumą šiai funkcijai (1.6 pav.) (Baier et al., 2016). Galiausiai genų duplikacija (vykstanti prieš adaptacines mutacijas ar po jų) ilgainiui lemia naujos fermento funkcijos įsitvirtinimą (Innan and Kondrashov, 2010). Pavyzdžiui, keletas ksenobiotikus ardančių fermentų, tokių kaip organofosfato hidrolazė ar atrazino chlorohidrolazė, išsivystė iš fermentų pirmtakų, kurie turėjo šias funkcijas kaip neselektyvius aktyvumus (Afriat-Jurnou et al., 2012; Seffernick et al., 2001). Be to, naujas katalizinis aktyvumas vėliau taip pat gali pakisti – tai nulemia platų fermentinių funkcijų spektrą, stebimą šiuolaikinėse fermentų superšeimose.



**1.6 pav.** Evoliucijos metu teorinio fermento superšeimoje vykstantys funkciniai pokyčiai. Apskritimai žymi vieną seką (fermentą), spalvos – natyvią fiziologinę funkciją, apskritimų viduje esantis taškas – neselektyvų aktyvumą. Funkcinis nukrypimas nuo bendro protėvio (šviesiai mėlyna spalva) atsiranda stiprinant neselektyvų aktyvumą ir dėl evoliucinio šios funkcijos optimizavimo kuriant naują specializuotą fermentą (pilka, tamsiai mėlyna ir alyvuogių spalvos). Adaptacinio proceso ar genų dreifo metu gautoje šeimoje gali atsirasti nauja neselektyvi funkcija, skatinanti tolimesnį funkcinio spektro plėtimąsi superšeimoje (žalia, blyški mėlyna, violetinė ir rausva spalvos) (Baier et al., 2016).

Siekiant suprasti sekų ir funkcinę įvairovę superšeimoje bei evoliucinius ryšius tarp jos narių ypač svarbios yra tikslios klasifikavimo sistemos, priskiriančios sekas funkcinėms šeimoms (Brown and Babbitt, 2012). Tradicinė filogenetinė analizė yra naudojama nustatant grupes, pagrįstas sekų panašumu, kurios gali būti klasifikuojamos remiantis ankstyvomis šakomis superšeimos filogenijoje (Dunwell et al., 2001). Tačiau šis būdas gali būti problemiškas, kadangi viena superšeima gali lengvai viršyti 10000 sekų, o fermentų, priklausančių skirtingoms funkcinėms šeimoms, aminorūgščių sekų tapatumas gali būti labai mažas išsaugojant tik kelias konservatyvias katalizei svarbias aminorūgščių liekanas. Taip pat visos sekomis paremtos klasifikacijos yra tipiška naudojamos sugrupuoti šeimas, atsiskyrusias ankstyvoje evoliucijos istorijos stadijoje, todėl mažai tikėtina, jog naujausi ar tebevykstantys funkciniai skirtumai bus užfiksuoti. Nepaisant to, filogenetinė analizė yra



stiprus metodas išsamiam sekų apibūdinimui – t.y., superšeimos narių grupavimui pagal jų sekų giminingumą bei evoliucinę funkcinių pokyčių istoriją (Brown and Babbitt, 2014).

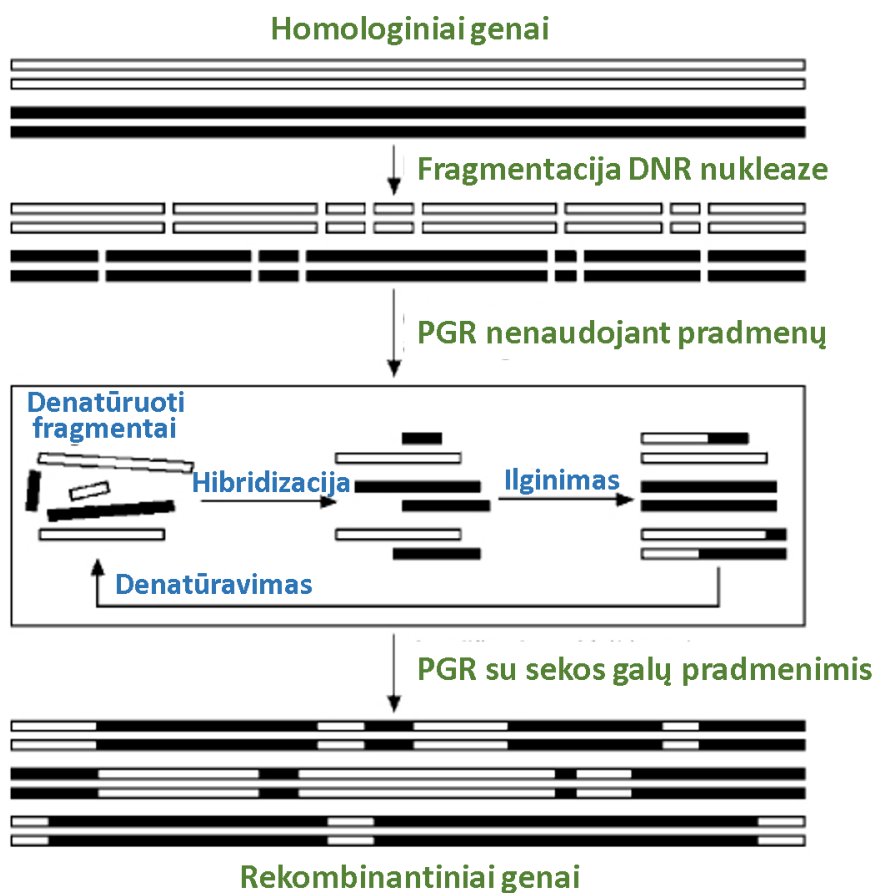
### 1.5. Fermentų evoliucija *in vitro*

Įvairūs fermentai su naujomis ar pageidaujamomis savybėmis gali būti generuojami laboratorinėmis sąlygomis pasitelkiant evoliuciją *in vitro*. Šis procesas įgyvendinamas, kai natūraliai gamtoje vykstanti evoliucija yra paspartinama. Pasirinkto fermento aminorūgščių sekos įvairovė sukuriama dirbtinai ir naudingos (sukeliančios pageidaujamą efektą) pakaitos atrenkamos per žymiai trumpesnę laikotarpį negu tai įvyksta gamtoje (Labrou, 2010). Tokia kryptinga evoliucija paremta pasikartojančiu Darvino optimizavimo procesu, pagal kurį didžiausią tinkamumą turintis fermento variantas yra atrenkamas iš atsitiktinių mutacijų visumos (Sen et al., 2007). Pastaruoju metu evoliucija *in vitro* yra tapusi ypač naudinga įrankiu baltymų inžinerijoje (Turner, 2009), kurio dėka buvo pagerintos daugelio fermentų savybės, tokios kaip aktyvumas (Giger et al., 2013) ar specifiškumas substratui (Shaikh and Withers, 2008).

Fermentų evoliucija *in vitro* leidžia konstruoti fermentus pasitelkiant milžiniškas skirtingų baltymų variantų bibliotekas, gerokai viršijančias *in vivo* metodų galimybes (Golynskiy et al., 2013). Vienos didžiausių publikacijose paskelbtų *in vitro* bibliotekų turi net iki  $10^{14}$  DNR sekų (Cho et al., 2000), dėl ko tampa įmanoma aptikti ypač retas naudingą pokytį fermentams suteikiančias mutacijas. Evoliucija *in vitro* pranašesnė ir tuo, jog galima naudoti įvairias sąlygas, kurios turi žalingą poveikį gyvoms ląstelėms, jų išgyvenamumui. Taip gali būti atrinkti fermentai, pasižymintys geresniu stabilumu prie ekstremalių pH, temperatūros ar jonų koncentracijos verčių, o, svarbiausia, galima naudoti substratus ar fermentus, kurie ląstelėms būtų toksiški (Renesto and Raoult, 2003). Galiausiai evoliucija *in vitro* leidžia tiesiogiai manipuliuoti DNR biblioteka po kiekvieno evoliucijos etapo. Priešingai *in vivo* metodams, kuriems reikia daug laiko tikslinio geno grynimui, per evoliuciją *in vitro* DNR amplifikuojama tiesiogiai PGR būdu, o įvairovės įvedimą žymiai palengvina tokie metodai, kaip klaidinga PGR (angl. *error-prone PCR*) ar *in vitro* rekombinacija (Golynskiy et al., 2013). Tačiau, derinant atranką su metodais, kuriais sukuriama genetinė įvairovė, visa Darvino evoliucija gali būti atlikta kur kas patogesniu keliu *in vitro*.

Evoliucijai *in vitro* naudojami du pagrindiniai metodai: genų rekombinacija bei atsitiktinė mutagenėzė. Atliekant genų rekombinaciją vykdomi tam tikrų sekų blokų mainai tarp dviejų ar daugiau DNR grandinių. Pirmasis rekombinacijos *in vitro* metodas, DNR

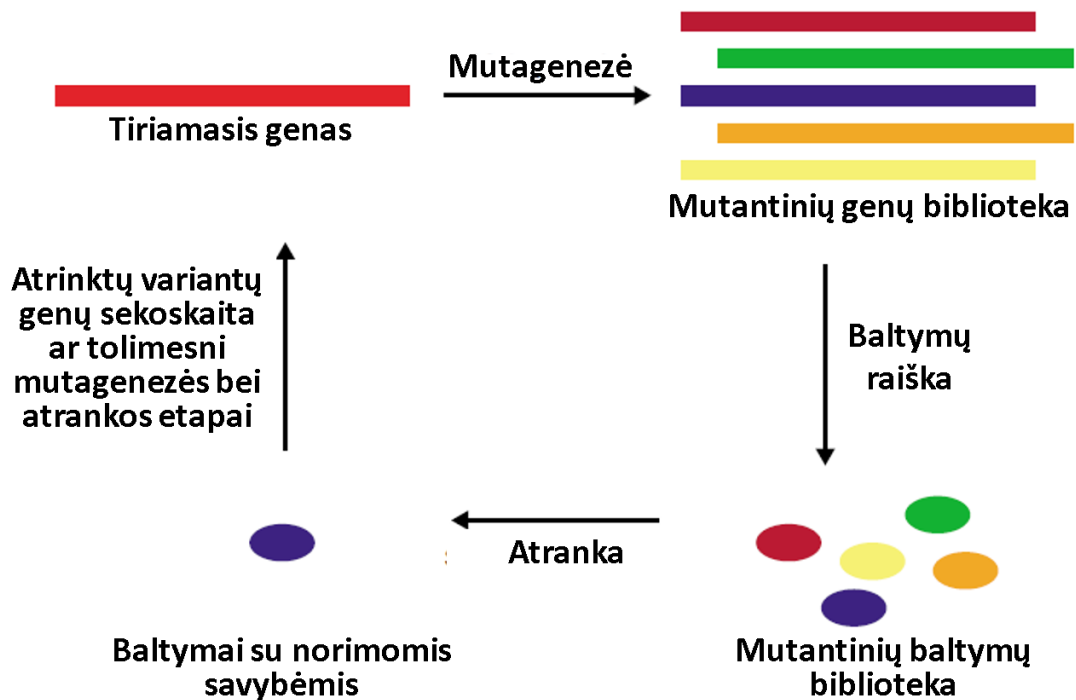
maišymas (angl. *DNA shuffling*), buvo pristatytas dar 1994 metais (Stemmer, 1994), po ko sekė spartus šios metodikos vystymasis bei naujų rekombinacijos strategijų kūrimas. DNR maišymas remiasi tuo, jog keletas homologinių genų DNR nukleazės yra sukarpomi į nedidelius fragmentus, kuriuos galima iš naujo surinkti į pilno ilgio geną pakartotiniaisi hibridizacijos ciklais esant DNR polimerazei (1.7 pav.) (Arkin, 2001). Jei tarp skirtingos kilmės DNR fragmentų persidengiančių regionų yra pakankamas sekų panašumas, fragmentai hibridizuojasi vienas su kitu formuodami grandinės pokytį ir taip sukurdami rekombinantinį geną. Net ir naudojant didelio tikslumo polimerazę rekombinacijos metu atsiranda keletas atsitiktinių taškinių mutacijų, todėl mokslininkai dažnai sąmoningai vietoje įprasto pasitelkia klaidingą PGR taip dar labiau padidindami genų bibliotekos įvairovę (Cirino and Qian, 2013). Šis metodas buvo pritaikytas žmogaus interferono alfa genui: vykdyta atranka pagal antivirusinius ir antiproliferacinius požymius. Taip gautų signalinio baltymo variantų aktyvumas padidėjo net 285 tūkstančius kartų (Chang et al., 1999). Taip pat, sumaišius 26 homologinius proteazės genus buvo gauti chimeriniai fermentai, kurių požymiai reikšmingai pagerėjo lyginant su bet kuria pirmine proteaze net pagal 4 skirtingas savybes (Ness et al., 1999). Galiausiai, DNR maišymas buvo naudojamas siekiant optimizuoti ne tik pavienių baltymų, bet ir visų operonų ar net virusų aktyvumus (Arkin, 2001).



1.7 pav. DNR maišymo metodo eiga (adaptuota pagal Joern, 2003)

Kita evoliucijos *in vitro* strategija – atsitiktinė mutagenezė – paremta atsitiktinių taškinių mutacijų įvedimu į tiriamus genus. Šiuo būdu gaunamos DNR mutacijos, kurias galima suskirstyti į 5 grupes: tranzicijas, transversijas, delecijas, insercijas bei inversijas (Salazar and Sun, 2003). Atsitiktinė mutagenezė genetinės įvairovės kūrimui atliekama pasitelkiant daugybę metodų, tokių, kaip DNR ar net visų bakterijų apdorojimas įvairiais cheminiais mutagenais (Deshler, 1992), klonuotų genų perkėlimas į mutatorinius bakterijų kamienus (Greener et al., 1996), klaidinga PGR (Patrick and Firth, 2005) ar įsotinamoji mutagenezė (angl. *saturation mutagenesis*) (Kotzia and Labrou, 2009). Nepaisant metodų gausos eksperimentinė evoliucijos *in vitro* eiga naudojant atsitiktinę mutagenezę remiasi bendra procedūrų schema (1.8 pav.). Pirmiausia į pasirinktą DNR seką, koduojančią tikslinį baltymą, įvedamos atsitiktinės taškinės mutacijos taip sukuriant mutantinių genų biblioteką. Šie genai įterpiami į raiškos vektorių ir transformuojami į ląsteles šeimininkes, kurios sintetina mutantinį baltymą. Atsižvelgiant į norimą savybę baltymai yra atrenkami ir

nustatomos juos koduojančių genų sekos arba toliau atliekami DNR mutagenėzės bei atrankos etapai (Tao and Cornish, 2002). Šio tipo mutagenėzė naudojama pagerinti fermentų katalizinį aktyvumą bei efektyvumą, modifikuoti (apriboti arba išplėsti) specifiškumą substratui, pakeisti specifiškumą kofaktoriui bei pagerinti stabilumą įvairiomis sąlygomis (Labrou, 2010).



**1.8 pav.** Fermentų evoliucijos *in vitro* atsitiktinės mutagenėzės metodu eiga (Tao and Cornish, 2002)

Vienas iš konkrečių pavyzdžių, parodantis atsitiktinės mutagenėzės veiksmingumą, yra jos panaudojimas kurti naujas bakterines citozino deaminazes, pasižyminčias didesniu afiniškumu 5-fluorocitozinui (5-FC) negu natūraliam substratui citozinui. Tyrimo metu gautas mutantas buvo net 10 kartų jautresnis 5-FC, lyginant su laukinio tipo citozino deaminaze (Mahan et al., 2004a). Ši studija įrodo, jog naudojant atsitiktinę mutagenėzę ir tikslingą gautų mutantinių fermentų atranką galima žymiai pagerinti kinetinius citozino deaminazės parametrus. Tokios deaminazės gali būti pritaikytos tobulinant fermento-provaisto vėžio terapiją. Tyrimai kaip šis suteikia pagrindą manyti, jog izocitozino deaminazių kinetiniai parametrai taip pat gali būti pagerinti pasitelkiant fermentų evoliuciją *in vitro*. Patobulinto

izocitozino deaminazės varianto gavimas leistų greičiau vystytis naujam potencialiai veiksmingesniam ir saugesniam vėžio gydymo būdui.

## 1.6. Fermentų atrankos strategijos

Fermentų, turinčių pakitusį aktyvumą, specifiškumą ar stabilumą, kūrimas pasitelkiant evoliucijos *in vitro* metodus šiuo metu yra gana gerai išanalizuotas bei išvystytas. Tokių eksperimentų sėkmė priklauso nuo dviejų pagrindinių aspektų: genetinės įvairovės ir patikros (angl. *screening*) arba atrankos (angl. *selection*) sistemų. Molekulinės biologijos pažanga padėjo sukurti tokias metodikas, kaip atsitiktinė mutagenėzė bei genų rekombinacija, kuriomis naudojantis galima nesunkiai sudaryti pakankamą genetinę įvairovę (Ruff et al., 2013). Tačiau norimų mutantų identifikavimas kol kas yra labiausiai evoliucijos *in vitro* eksperimentus ribojantis veiksnys (Yuan et al., 2005). Siekiant maksimaliai išnaudoti evoliucijos *in vitro* galimybes yra kuriamos didelio našumo patikros bei atrankos strategijos, kurių skaičius per pastaruosius kelerius metus gerokai padidėjo (van Rossum et al., 2013).

Visų patikros ir atrankos strategijų pagrindas yra ryšys tarp geno, jo koduojamo fermento ir produkto, gauto dėl šio fermento aktyvumo (Aharoni et al., 2005). Patikros metu kiekvienas bibliotekoje esantis baltymas yra įvertinamas individualiai pagal pasirinktą savybę, tuo tarpu atranka vienu metu veikia visą mutantų fondą ir savaime pašalina nefunkcionuojančius variantus (Leemhuis et al., 2009). Nepaisant to, abi metodikos turi atitikti tam tikrus bendrus reikalavimus. Pirmiausia, jeigu įmanoma, jos turi būti tiesiogiai nukreiptos į dominančią savybę – „gauni tai, pagal ką rinkaisi“ yra viena pagrindinių evoliucijos *in vitro* taisyklių (Schmidt-Dannert and Arnold, 1999). Tokiu atveju naudojamas substratas turėtų būti identiškas arba kiek įmanoma artimesnis tiksliniam substratui. Taip pat patikros ar atrankos procesas turi pasižymėti pakankamai dideliu našumu (Boersma et al., 2007).

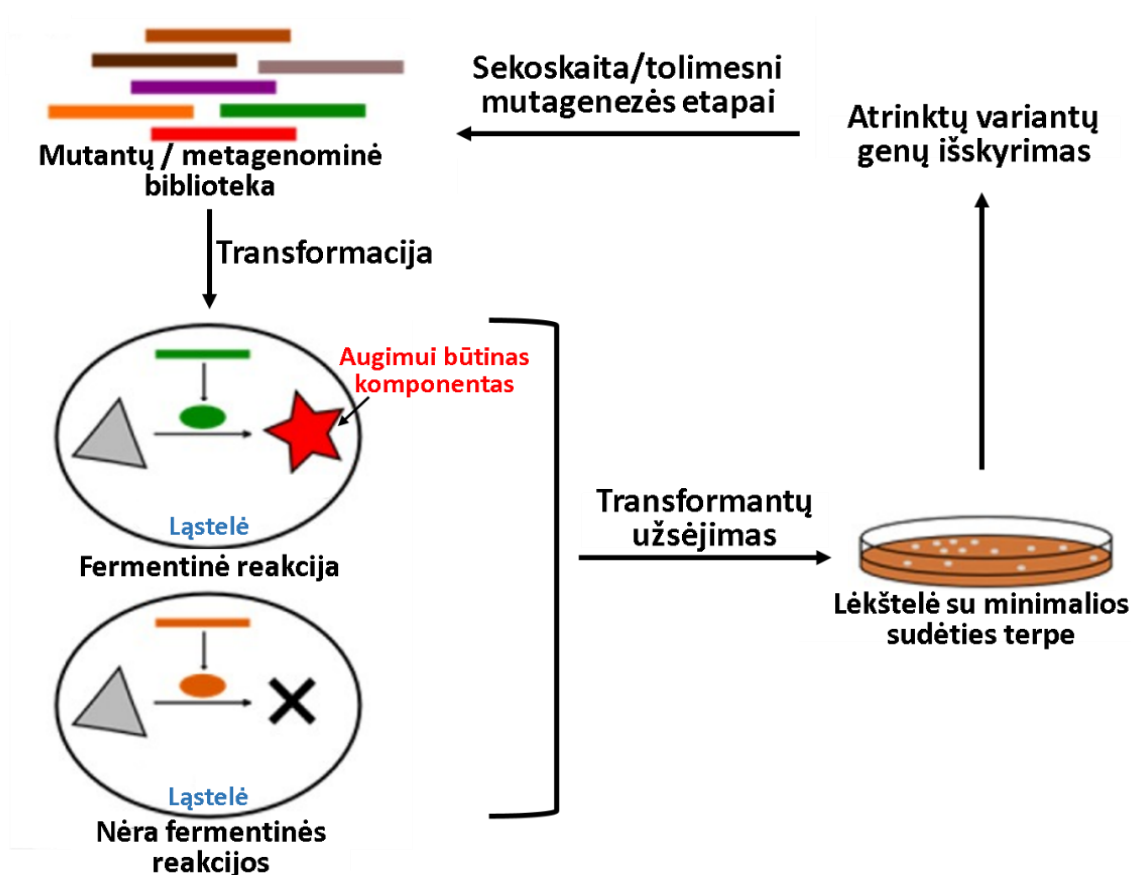
Tarpusavyje lyginant patikrą bei atranką, abi metodikos turi ir privalumų, ir trūkumų. Patikra gera tuo, jog skirtumas tarp fermentinės reakcijos substrato bei produkto gali būti nustatomas tiesiogiai ar netiesiogiai beveik kiekvienu atveju. Dauguma patikros metodų remiasi fluorogeniniais ar chromogeniniais fermentų substratais, kurie reakcijos metu paverčiami į spektroskopiškai besiskiriančius produktus (Wahler and Reymond, 2001). Tačiau patikros metu dėl norimos fermentinės reakcijos reikia patikrinti kiekvieną mutantą, net ir tuos, kurie gali būti neaktyvūs ar neteisingai susilankstę, o tokių variantų, priklausomai nuo genetinės įvairovės sukūrimui naudojamų metodų, bibliotekose galima aptikti 50–80 %

(Otten and Quax, 2005). Atrankos metodai reikalauja šiek tiek mažiau darbo ir yra efektyvesni, nes leidžia vienu metu analizuoti daugiau mutantų. Šioje strategijoje naudojamos sąlygos išskirtinai palankios tik pageidaujamiems variantams, todėl netinkami ar nepakitę mutantai lieka visiškai nepastebėti. Dauguma atrankos sistemų yra paremtos mutantiniais organizmais – auksotrofais – negalinčiais sintetinti tam tikrų augimui būtinų junginių. Pavyzdžiui, naudojant uracilo auksotrofos atrinkti bus tik tie fermentai, kurie sugebės katalizuoti pateikto substrato vartimą uracilu (Kitamoto et al., 1990). Tačiau visuomet egzistuoja tikimybė gauti klaidingai teigiamus rezultatus, dėl kurių gali tekti panaudoti ir efektyvų patikros žingsnį ar net pertvarkyti visą atrankos procedūrą. Vis dėlto, vienas didžiausių fermentinio aktyvumo atrankos minusų yra prastas genetinei komplementacijai tinkamų auksotrofų prieinamumas (Taylor et al., 2001).

Šiuo metu egzistuoja įvairios patikros bei atrankos strategijos, kurios gali būti suskirstytos į *in vivo* bei *in vitro* sistemas. Svarbu paminėti, jog tokios metodikos yra taikomos ne tik evoliucijos *in vitro* metu gautų mutantų bibliotekoms analizuoti, bet ir dominančiu aktyvumu pasižyminčių naujų natūraliai gamtoje egzistuojančių fermentų paieškai metagenominėse bibliotekose (Carreño and de Lorenzo, 2010). *In vivo* sistemos daugeliu atvejų yra bakterijų ląstelės, gaminančios į jas transformuotą dominančio baltymo variantų ar metagenominę biblioteką. Atranka šiuo atveju yra pagrįsta kataliziniu aktyvumu: geriau auga tie mikroorganizmai, kurie gamina specifinį aktyvumą turintį fermentą. Pagrindinis *in vivo* sistemų pranašumas yra funkcionuojančių baltymų gamyba, kadangi taip gaunami fermentai yra teisingai susilankstę ir turi reikalingus kofaktorius. Tačiau *in vivo* atranką dažnai riboja žemas transformacijos efektyvumas, atrankos spaudimui nepasiduodančios ląstelės ar substrato pateikimo fermentui problemos (Cipolla, 2004). Tuo tarpu *in vitro* sistemose transformacija neatliekama, dėl ko bibliotekos gali būti kur kas didesnės, atranka gali vykti griežtesnėmis sąlygomis, kadangi nėra priklausoma nuo gyvybingų ląstelių, taip pat nebelieka ir tam tikrų membraninių barjerų tarp fermento ir substrato (Dower and Mattheakis, 2002).

Vienas populiariausių bei ilgą laiką visame pasaulyje naudojamų *in vivo* atrankos metodų yra genetinė arba augimo komplementacija. Ši strategija paremta norimo aktyvumo metabolinio poreikio įvedimu į šeimininko ląsteles (auksotrofija). Plazmidės, koduojančios dominančio baltymo mutantų ar metagenominę bibliotekas, įterpiamos į atrankai tinkamą šeimininką, kuris dažniausiai būna gerai charakterizuotų bakterijų, pvz., *E. coli*, mutantinis kamienas (1.9 pav.). Tokios ląstelės auginamos ant minimalios sudėties terpės, kuri neturi pasirinkto ląstelių išgyvenimui reikalingo junginio, bet turi substratą, kurį pageidaujamas

fermentas verstų į išgyvenimui reikalingą junginį. Tokiu būdu (pagal augimo fenotipą) atrinkamos tik aktyvius fermentų variantus sintetinančios bakterijos (van Sint Fiet et al., 2006).



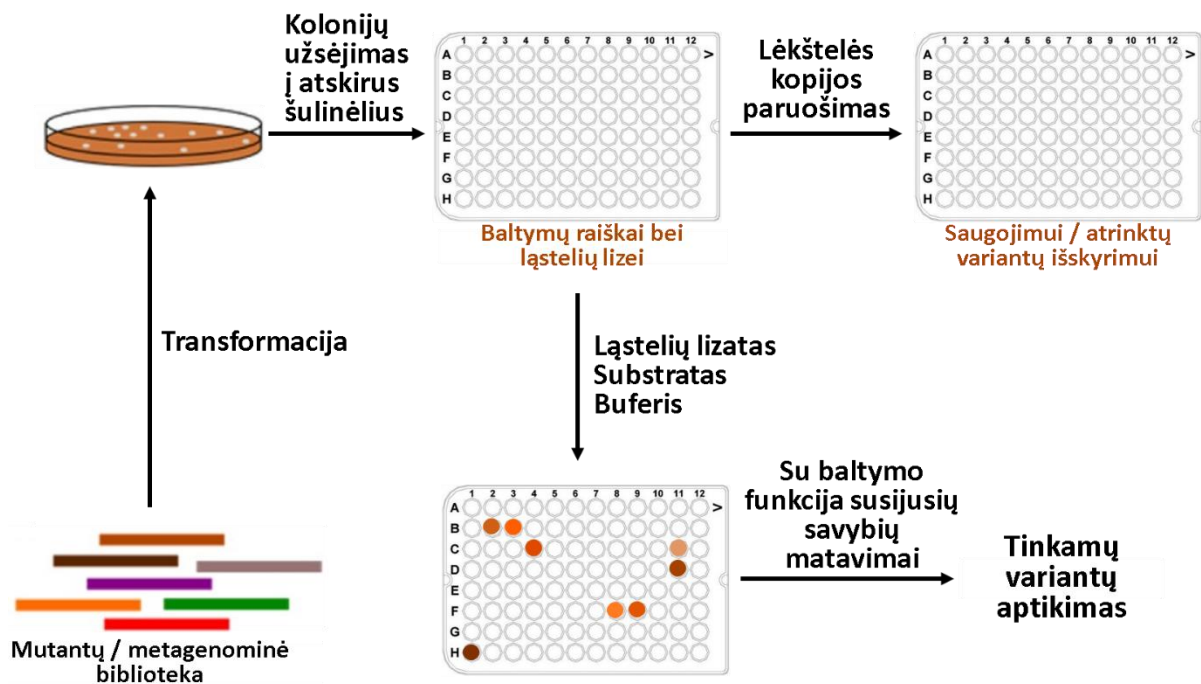
**1.9 pav.** Augimo komplementacijos metodo schema. Mutantinių genų ar metagenominė biblioteka transformuojama į ląsteles šeimininkes, kuriose aktyvus mutantinis baltymas (žalias ovalas) paverčia augimui būtino komponento pirmtako molekulę (pilkas trikampis) į augimui būtiną komponentą (raudona žvaigždė), tuo tarpu neaktyvus mutantinis baltymas (rudas ovalas) to padaryti negali. Visus transformantus užsėjus ant terpės, neturinčios augimui būtino komponento, tik ląstelės, turinčios aktyvų mutantinį baltymą, išgyvens ir bus atrinktos. Tuomet aktyvūs genai yra išgaunami bei nustatomos jų sekos arba naudojami tolimesniuose mutagenėzės etapuose (adaptuota pagal Xiao et al., 2015).

Vienas iš daugelio šios atrankos sistemos efektyvumo pavyzdžių – auksotrofijos komplementacijos taikymas siekiant paversti *Pseudomonas* SY-77 glutarilo acilazę į adipilo acilazę, pasižyminčią geresniu aktyvumu adipil-7-aminodesacetoksicefalosporaninės rūgšties (adipil-7-ADCA) atžvilgiu. Šis fermentas galėtų būti pritaikytas atliekant paprastesnę bei ekologiškesnę (lyginant su šiuo metu taikoma) vieno žingsnio adipil-7-ADCA biokonversiją į

7-aminodesacetoksicefalosporaninę rūgštį, kuri yra ypač svarbi pusiau sintetinių cefalosporinų – vienu iš plačiausiai pasaulyje naudojamų antibiotikų – sintezei. Šiame tyrime substrato komponentas  $\beta$ -laktamas buvo pakeistas kitu panašiu komponentu leucinu taip sukuriant atrankos sąlygas. Tuomet leucino auksotrofinės *E. coli* ląstelės, vykdančios glutarilo acilazės bibliotekos, gautos klaidingos PGR metodu, raišką, augintos terpėje esant adipil-leucino – vienintelio leucino šaltinio. Tokiu būdu tik fermentinė adipil-leucino hidrolizė leidžia bakterijoms augti minimalios sudėties terpėje. Be to, mutantai, geriau augantys esant adipil-leucinui taip pat pasižymėjo ir padidėjusiu aktyvumu savo tikrojo substrato –  $\beta$ -laktamo – atžvilgiu (Otten et al., 2002). Šis bei kiti panašūs tyrimai ne tik įrodė metodo našumą, bet ir atskleidė jo privalumus: galimybę dirbti su didelėmis bibliotekomis ir paprastumą – nereikia jokios specialios įrangos, be to, gaunami tik pageidaujami fermentų variantai (Leemhuis et al., 2009).

Be atrankos sistemų, fermentų identifikavimui mokslininkai ne rečiau naudoja ir patikros strategijas. Viena populiariausių yra mikrotitro plokštelių patikra – metodas remiasi transformantų auginimu mikrotitro plokštelėse: šulinėliuose vykdoma pavienių fermentų variantų raiška (1.10 pav.) (Leemhuis et al., 2009). Vėliau lizavus ląsteles fermentinis aktyvumas yra vizualizuojamas ir pageidaujamomis savybėmis pasižymintys variantai gali būti nesunkiai atrinkti, o išskirti genai toliau analizuojami (Xiao et al., 2015). Pagrindinis metodo reikalavimas – dominančio baltymo savybė mikrotitro plokštelėje turi būti tiesiogiai ar netiesiogiai išmatuojama. Tipiškai šis metodas atliekamas standartinėse 96 šulinėlių plokštelėse, tačiau egzistuoja ir kur kas daugiau šulinėlių turinčių plokštelių (384, 1536), dėl kurių pagerėja metodo našumas.





**1.10 pav.** Mikrotitro plokštelių patikros metodo schema. Genų biblioteka transformuojama į ląsteles šeimininkes, galinčias vykdyti fermentų variantų raišką. Pavienės kolonijos (reprezentuojančios pavienius klonus) užsėjamos į atskirus mikrotitro plokštelių šulinėlius. Paruošiama tokios lėkštelės kopija, kuri bus saugojama bei vėliau naudojama atrinktų variantų išskyrimui. Sukuriamos baltymų raiškai tinkamos auginimo sąlygos ir po kurio laiko ląstelių lizatas perkeliamas į kitą mikrotitro plokštelę, kurioje matuojamos su baltymo funkcija susijusios savybės (adaptuota pagal Leemhuis et al., 2009).

Mikrotitro plokštelių patikrai įmanoma pasitelkti platų analitinių metodų spektrą – naudojama kolorimetrija, skysčių ar dujų chromatografija, branduolių magnetinis rezonansas bei masių spektrometrija (van Rossum et al., 2013). Strategija leidžia tikrinti ir mutantų, ir metagenomines bibliotekas (Dietrich et al., 2010). Tačiau metodas yra tinkamas tik nedidelių bibliotekų, turinčių iki  $\sim 10^4$  variantų, patikrai bei yra apribotas reakcijų, kuriose produktas turi keletą išmatuojamų charakteristikų. Ir nors nenatūralūs substratai gali padidinti pritaikomumą, tačiau, kadangi jie visgi skiriasi nuo tikrųjų substratų, atsiranda tikimybė aptikti kitus fermentus vietoje pageidaujamų, kurie nekatalizuos norimų substratų konversijos (van Rossum et al., 2013). Vis dėlto mikrotitro plokštelėmis paremta patikra buvo pritaikyta daugelyje tyrimų. Vienas iš jų – citochromo P450 BM3 variantų, galinčių hidroksilinti antiuždegiminį vaistą naprokseną, paieška. Šiuo atveju klaidingos PGR metodu gauti fermento variantai buvo transformuoti į *E. coli* kamieną, atskiros kolonijos auginamos 96 šulinėlių mikrotitro plokštelėse, ląstelės lizuojamos bei lizatai kartu su substratu perkelti į

naują plokštelę. Vėliau hidroksilintas naproksenas buvo aptiktas pasitelkiant 4-aminoantipirino (4-AAP) detekcijos sistemą (Otey and Joern, 2003), leidžiančią aptikti hidroksilintus aromatinius junginius, bei matuojant absorbciją plokštelių skaitytuve (Bloom et al., 2006). Taip pat mikrotitro plokštelės buvo panaudotos ir ciklodekstrino gliukanotransferazės, nejautrios inhibitoriui akarbozei, patikrai (Kelly et al., 2008) bei glikoziltransferazės substratų gausos praplėtimui (Williams et al., 2007).

Apibendrinant, literatūros apžvalgoje buvo aprašyti metagenominėse bibliotekose aptikti fermentai – izocitozino deaminazės. Dėl jų gebėjimo katalizuoti 5-fluoroizocitozino vartimą 5-fluorouracilu, šie fermentai galėtų būti panaudoti modifikuojant aptartą vėžio gydymo variantą – fermento-provaisto terapiją. Pastebėtas izocitozino deaminazės/5-FiC poros pranašumas CD/5-FC poros atžvilgiu galimai padėtų pašalinti bent vieną iš daugelio problemų, trukdančių visapusiškam terapijos pritaikymui. Pagerinus analizuojamų deaminazių katalizines savybes fermentus panaudoti terapijoje būtų dar paprasčiau – dėl to ir fermentų evoliucijos *in vitro* metodai bei efektyvios atrankos sistemos tolimesniuose tyrimuose gali praversti. Atsižvelgiant į tai, jog izocitozino deaminazės gali tapti naudingu įrankiu vėžio gydymui, šio darbo tikslas yra ištirti izocitoziną deamininančius fermentus Vcz bei KANOS ir įvertinti jų pritaikomumą vėžio terapijai.

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos

#### 2.1.1. Fermentai ir reagentai

DNR polimerazė (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific)	Glicerolis (Thermo Scientific)
Restrikcijos endonukleazės <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI, <i>Nhe</i> I, <i>Nco</i> I ir <i>Xho</i> I (Thermo Scientific)	Fenolis-chloroformas (Carl Roth)
T4 DNR ligazė (Thermo Scientific)	Natrio acetatas (Thermo Scientific)
Etidžio bromidas (Thermo Scientific)	IPTG (Izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas) (Thermo Scientific)
Agarozė (TopVision Agarose Tablets, Thermo Scientific)	TRIS (Sigma-Aldrich)
DNR fragmentų molekulinį masių standartas („GeneRuler DNA Ladder Mix“, #SM0333, Thermo Scientific)	Imidazolas (Carl Roth)
Kalcio chloridas (CaCl <sub>2</sub> , Thermo Scientific)	„Coomassie Brilliant Blue R-250“ dažas (Thermo Scientific)
Ampicilinas (Thermo Scientific)	„PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ standartas (Thermo Scientific)
Kanamicinas (Thermo Scientific)	Natrio karboksimetilceliuliozė (Sigma-Aldrich)
	Acetonitrilas (Sigma-Aldrich)

#### 2.1.2. PGR naudoti pradmenys

VczICD pQ-FW: 5'-TATAGGATCCCACAAAAGAACGCTGC-3'  
VczICD pQ-RV: 5'-AATTAAGCTTTTACAGCCGATGCC-3'  
Vcz Q79N: 5'-CTGATCAACACGCATCATCATATGTTTNNKTCTTTGACGCGAGT-3'  
Vcz Y136N: 5'-CCTCCAGCGATCATCTCENNKGTTTACCCAAACGGTTG-3'  
Vcz C213N: 5'-GTATCGCGTTGGCACCTNNKTCGCCTTTCTCCGTT-3'  
Vcz S214N: 5'-CGCGTTGGCACCTTGCNNKCCTTTCTCCGTTAGC-3'  
Vcz C213N S214N: 5'-GTATCGCGTTGGCACCTNNKNNKCCTTTCTCCGTTAGC-3'  
KANOS pQ FW: 5'-TCAGTGCATGCAAACGAAAGCGTTAC-3'  
KANOS pQ RV: 5'-ACTGTAGATCTCTATTCGCCCTGCGA-3'  
KANOS pET FW: 5'-AGTCACCATGGAAACGAAAGCGTTAC-3'

KANOS pET RV: 5'-TGACCTCGAGTTCGCCCTGCGATTTGC-3'  
 pQE-F: 5'-CCCGAAAAGTGCCACCTG-3'  
 pQE-R: 5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG-3'  
 T7 promoter: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'  
 T7 terminator: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG -3'  
 pyrF\_kan\_Fw: 5'-TTTACCTGTTTCGCGCCACTTCCGGTGCCCATCATCAAGAAGGTC  
 TGGTCAATTAACCCTCACTAAAGGGCG-3'  
 pyrF\_kan\_Rv: 5'-AATACGTCCGGTTTCCGTTGAGTAGACCAGACGGCTGTTGGAAT  
 CACTCATAATACGACTCACTATAGGGCTC-3'  
 dCodAF: 5'-CGCTATGAGCACTTTGCGAC-3'  
 dCodAR: 5'-TGTTGCGGCGGAAAAATAGC-3'  
 1\_Vcz\_FW: 5'-TGACCCATGGGAGGATCCATAGGATC-3'  
 1\_3\_Vcz\_RV: 5'-TGACAAGCTTAGAACCACCACCCAGCCGATGCCGGTTCAC-3'  
 1\_3\_D8\_FW: 5'-TGACAAGCTTGAACAATTAATAATTTCAAAG-3'  
 1\_D8\_RV: 5'-TGACCTCGAGGCCATCGTGTGCT-3'  
 2\_Vcz\_FW: 5'-TGACAAGCTTGGTGGTGGTTCACGAGGATCCATAGGATC-3'  
 2\_Vcz\_RV: 5'-TGACCTCGAGCAGCCGATGCCGGTTCCTAA-3'  
 2\_D8\_FW: 5'-TGACCCATGGAACAATTAATAATTTCAAAG-3'  
 2\_D8\_RV: 5'-TGACAAGCTTGCCATCGTGTGCT-3'  
 3\_Vcz\_FW: 5'-TGACATGGCACATCATCATCATCTCACCGAGGATCCATAG  
 GATC-3'  
 3\_D8\_RV: 5'-TGACCTCGAGTTAGCCATCGTGTGCT-3'  
 4\_Vcz\_FW: 5'-TGACAAGCTTCGAGGATCCATAGGATC-3'  
 4\_Vcz\_RV: 5'-TAGCCTCGAGTTACAGCCGATGCCGGT-3'  
 4\_D8\_FW: 5'-TGACATGGCACATCATCATCATCACGAACAATTAATAATTT  
 AAAA-3'  
 4\_D8\_RV: 5'-TGACAAGCTTAGACCCACCACCGCCATCGTGTGCT-3'

### 2.1.3. Bakterijų kamienai

2.1 lentelė. Tyrimo metu naudoti *Escherichia coli* kamienai

<i>E. coli</i> kamienai	Genotipas	Šaltinis
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> str. B F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB</i> <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> )	Avidis, Prancūzija
DH10B	F <sup>-</sup> <i>endA1 deoR<sup>+</sup> recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ</i> ( <i>lac</i> )X74 φ80 <i>lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 m</i> <i>crA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Str<sup>R</sup> λ<sup>-</sup></i>	Invitrogen, JAV
BW25113	<i>lacI<sup>+</sup>rrnBT14 ΔlacZWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33</i> <i>ΔrhaBADLD78 rph-1 Δ(araB-D)567 Δ(rhaD-</i> <i>B)568 ΔlacZ4787(::rrnB-3) hsdR514 rph-1</i>	Keio kolekcija, Japonija
HMS174(DE3)	F <sup>-</sup> <i>recA1 hsdR</i> (r <sub>K12</sub> <sup>-</sup> m <sub>K12</sub> <sup>+</sup> ) (DE3) (Rif <sup>R</sup> )	Novagen, Vokietija
DH10BΔ <i>pyr</i> , negalintis augti ant terpės, neturinčios uracilo šaltinio, kadangi jo pirimidinų <i>de novo</i> biosintezės kelias buvo sutrikdytas (Aučynaitė et al., 2018b)		
HMS174Δ <i>pyrFΔcodA</i> su sutrikdytu pirimidinų <i>de novo</i> biosintezės keliu bei neturintis citozino deaminazės (sukurtas šio darbo metu)		

### 2.1.4. Bakterijų auginimo sąlygos, terpės bei plazmidės

Tyrimo metu bakterijos buvo auginamos agarizuotoje, skystoje LB (Luria Broth) terpėje arba M9 minimalioje terpėje 37 °C temperatūroje. Transformantų atrankai ir auginimui į terpes pridedama 0,1 g/l ampicilino bei 0,015 g/l kanamicino, taip pat M9 terpė papildoma 20 g/l leucino bei 0,00625 g/l substrato (izocitozino, citozino, uracilo, N<sup>4</sup>-acetil-izocitozino arba N<sup>4</sup>-benzoiil-2'-deoksicitidino priklausomai nuo tyrimo tikslų) ir 0,02338 g/l IPTG, reikalingo pQE70 bei pET28a vektoriuose esančio baltymą koduojančio geno raiškos indukcijai.

- LB terpė: 10 g/l peptonas, 5 g/l mielių ekstraktas, 7,5 g/l NaCl.
- Agarizuota LB terpė: 20 g/l agaras, 10 g/l peptonas, 5 g/l mielių ekstraktas, 7,5 g/l NaCl.
- M9 terpė: M9 agaras, 5× M9 druskų, gliukozės tirpalai ruošiami atskirai. M9 agaras – 0,2 g/l MgSO<sub>4</sub>, 0,01 g/l CaCl<sub>2</sub>, 15 g/l agarozė; 5× M9 druskų (pH 7,4) tirpalas – 35 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 g/l NaCl, 5 g/l NH<sub>4</sub>Cl; 20 g/l gliukozė.
- SOB: 20 g/l triptonas, 5 g/l mielių ekstraktas, 1 g/l NaCl, 0,25 g/l KCl, 1 g/l MgCl<sub>2</sub>.

- SOC: SOB, 1 g/l MgSO<sub>4</sub>, 2 g/l gliukozė.

Skysta ir agarizuota LB, SOB terpės, M9 agaras, 5× M9 druskų, gliukozės tirpalai, leucinas sterilinami 30 min 121 °C temperatūroje esant 1 atm slėgiui.

Rekombinantinių DNR kūrimui naudoti Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje iš metagenominių bibliotekų atrinkti pUC19 vektoriai su Vcz ir KANOS deaminazes koduojančiais DNR fragmentais (Aučynaitė et al., 2018a), pQE70 (Qiagen) raiškos vektorius, pET28a bei pET21b (Novagen) indukuojamos raiškos vektoriai.

### **2.1.5. Tirpalai**

TAE buferis (pH 8,3): 0,04 M TRIS-acetatas, 0,1 mM EDTA.

HA mutagenizės tirpalas: 50 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 M hidroksilamino-HCl (NH<sub>2</sub>OH · HCl).

2× SDS-PAGE baltymų elektroforezės pavyzdžių buferis (pH 6,8): 8 % SDS (natrio dodecilsulfatas), 20 % glicerolis, 75 mM DTT, 0,01 % bromfenolio mėlis, 0,25 M TRIS-HCl.

SDS-PAGE baltymų elektroforezės buferis: 0,3 % TRIS, 1,44 % glicinas, 0,1 % SDS.

Kumasi mėlis: 40 % etanolis, 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 10 % acto rūgštis.

Blukinantis tirpalas: 5 % acto rūgštis.

50 mM TRIS-HCl (pH 8)

## **2.2. Metodai**

### **2.2.1. DNR amplifikacija PGR metodu**

Amplifikacijos mišiniai bei reakcijos sąlygos sudarytos pagal gamintojo pateikiamą protokolą (Thermo Scientific). Vcz ir KANOS deaminazių genų pagausinimui buvo naudota „Phusion“ DNR polimerazė, tiesioginiai bei atvirkštiniai pradmenys. PGR vykdyta „Eppendorf“ amplifikatoriuje atsižvelgiant į gamintojo rekomendacijas.

### **2.2.2. DNR išskirstymas agarozės gelyje vykdant elektroforezę**

DNR elektroforezė vykdyta 0,8–1,0 % agarozės, kaitinant ištirpintos TAE buferyje, geliuose, turinčiuose 1 µg/ml etidžio bromido. Geliai ruošiami naudojant gelio liejimo rėmelį bei įvairaus dydžio šulinėlius formuojančias šukas. Metodui naudota horizontalaus lauko

elektroforezės vonelė („Mupid-One electrophoresis system“), užpildyta TAE buferiu. DNR mėginiai suleidžiami į gelio šulinėlius ir išskirstomi esant 100 V elektros įtampai. Pasibaigus elektroforetiniam frakcionavimui geliai analizuoti UV šviesoje transiliumatoriuje („Herolab MiniDoc“).

### **2.2.3. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio**

Norint iš gelio išskirti DNR fragmentus agarozės gelis (0,8 %) paruošiamas naudojant plačius šulinėlius formuojančias šukas. Į vieną iš šulinėlių įpilama DNR fragmentų molekulinį masių standarto, likę užpildomi analizuojamais DNR mėginiais. Po elektroforezės naudojant sterilų skalpelį agarozės gelyje išskirstyti DNR fragmentai, apšviečiant juos silpna UV šviesa, išpjaunami (atsižvelgiant į jų teorinius dydžius), sudedami į 1,5 ml tūrio mėgintuvėlius ir pasveriami. Tolimesnis fragmentų išskyrimas iš gelio vykdomas pagal „GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit“ rinkinio (Thermo Scientific) protokolą.

### **2.2.4. *Escherichia coli* chemokompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija**

*E. coli* kolonija užsėjama į 5 ml skystos LB terpės ir inkubuojama 37 °C temperatūroje, purtyklėje („Eppendorf Innova 44 Incubator Shaker“), kratant 180 apsisukimų/min greičiu. Po tam tikro laiko auganti bakterijų kultūra pradedama periodiškai tikrinti spektrofotometru („Eppendorf BioPhotometer“) pagal gamintojo rekomendacijas – laukiama, kol OD<sub>600</sub> (optinis tankis prie 600 nm bangos ilgio) pasieks 0,5–0,7. Auginimą nutraukus tolimesnės procedūros vykdomos ledo vonelėje. 1,5 ml bakterijų kultūros perkeliama į centrifugavimui tinkamą mėgintuvėlį ir centrifuguojama 10000× g pagreičiu 1 min. Supernatantas nupilamas, bakterijos resuspenduojamos 750 μl atvėsinto 0,1 M CaCl<sub>2</sub> ir laikomos 20 min. Bakterijos pakartotinai centrifuguojamos, pašalinus supernatantą resuspenduojamos 100 μl 0,1 M CaCl<sub>2</sub>.

Paruoštos kompetentinės bakterijos sumaišomos su 1 μg plazmidinės DNR arba 20 μl ligavimo mišinio ir inkubuojamos ledo vonelėje 30 min. Atliekamas temperatūrinis šokas – bakterijos inkubuojamos 42 °C temperatūroje 1,5 min, po to nedelsiant perkeliama į ledo vonelę ir laikomos 3 min. Galiausiai bakterijos išsėjamos ant agarizuotos LB terpės,

priklausomai nuo tyrimo tikslo, papildytos arba nepapildytos atrankos antibiotikais, ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje, inkubatoriuje („BINDER“), per naktį (arba kiek reikia).

### **2.2.5. *Escherichia coli* elektrokompetentinių ląstelių paruošimas ir elektroporacija**

Siekiant kuo didesnio transformacijos efektyvumo, *E. coli* kamienai transformuoti pasitelkiant elektroporacijos metodą. Bakterijų kolonija užsėjama į 10 ml skystos LB terpės bei inkubuojama per naktį 37 °C temperatūroje, purtyklėje kratant 180 apsisukimų/min greičiu. 2 ml naktinės kultūros užsėjama į 200 ml skystos LB terpės ir auginama tomis pačiomis sąlygomis iki kol bakterijų OD<sub>600</sub> pasieks 0,5–0,7. Augimas stabdomas kultūrą vėsinant ledo vonelėje 15 min, toliau visos procedūros atliekamos lede. Bakterijos centrifuguojamos 4000× g pagreičiu 15 min. Supernatantas nupilamas ir ląstelės suspenduojamos 50 ml sterilaus atvėsinto 10 % glicerolio, vėl centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Taip bakterijos plaunamos dar du kartus vis mažinant glicerolio kiekį pusiau. Galiausiai ląstelės suspenduojamos 1 ml 10 % glicerolio ir elektroporuojamos arba saugomos –80 °C temperatūroje.

Elektroporacijai į 90 µl elektrokompetentinių ląstelių pridedama 1 µg plazmidinės DNR ir inkubuojama lede 30 min. Mišinys perkeliamas į iš anksto atšaldytą 1 mm Eppendorf elektroporacijos kiuvetę, ji patalpinama į Eppendorf 2510 elektroporatorių, mėginys paveikiamas 1,8 kV/cm elektros impulsu. Į kiuvetę nedelsiant pridedama 910 µl SOC terpės, mišinys perkeliamas į 1,5 ml tūrio mėgintuvėlį bei inkubuojamas 37 °C temperatūroje 1 val. Centrifuguojant pašalinama SOC terpė, bakterijos pagal poreikį plaunamos 0,9 % NaCl tirpalu, sėjamos ant lėkštelių su agarizuota M9 arba LB terpe bei inkubuojamos per naktį (arba kiek reikia) 37 °C temperatūroje.

### **2.2.6. Plazmidinės DNR skyrimas iš *E. coli* ląstelių**

Tiriamoji kolonija užsėjama į 5 ml skystos LB terpės ir inkubuojama 37 °C temperatūrą palaikančioje purtyklėje per naktį. Gauta bakterijų kultūra centrifuguojama 14000× g pagreičiu 1 min, pašalinamas supernatantas. Tolimesnis plazmidinės DNR išskyrimas vykdomas pagal „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Scientific) rinkinio protokolą.



### **2.2.7. Rekombinantinės DNR konstravimas**

PGR metodu pagausintas DNR fragmentas bei vektorius, į kurį norima įterpti gautą fragmentą, hidrolizuojami restrikcijos endonukleazėmis. DNR išvaloma nuo reakcijos mišinio komponentų pasitelkiant 2.2.2. ir 2.2.3. skyreliuose aprašytas metodikas. Toliau DNR fragmentai naudojant T4 DNR ligazę yra sujungiami ir gautas ligavimo mišinys transformuojamas į kompetentines bakterijas (žiūrėti 2.2.4. skyrelį). Išaugusios *E. coli* kolonijos tikrinamos PGR naudojant įterptą fragmentą apsupančius pradmenis (pQE-F ir pQE-R (klonuojant į pQE70 vektorių) arba T7 promoter ir T7 terminator (klonuojant į pET28a vektorių). Iš kolonijų, turinčių reikiamo dydžio DNR fragmentą, išskiriama plazmidinė DNR (lygiagrečiai PGR metodui tos pačios kolonijos yra užsėjamos ant agarizuotos LB terpės su antibiotikais), padauginama (žiūrėti 2.2.6 sk.) ir siunčiama į MacroGen firmos sekoskaitos centrą (Pietų Korėja). DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis bei ligavimo reakcija atliekama pagal gamintojo (Thermo Scientific) pateiktus protokolus. DNR sekos analizuojamos naudojant „Benchling“ platformą.

### **2.2.8. DNR išsodinimas**

Siekiant sukcentruoti DNR, ji išsodinama bei vėl ištirpinama kelis kartus mažesniame už pradinį tūryje vandens. Pirmiausia turimas mėginys papildomas steriliu H<sub>2</sub>O iki 150 μl tūrio, pridedama tiek pat fenolio-chloroformo, supurtoma bei centrifuguojama 16000× g pagreičiu 7 min. Taip gaunamas susisluoksniavęs mėginys, kurio viršutinė frakcija (joje yra ištirpusi DNR) perkeliama į kitą mėgintuvėlį atsikratant mėginyje buvusių baltymų priemaišų. Pridedama ~17 μl (1/10 dalis surinkto tūrio) 3M natrio acetato (pH 5,2), 1 ml atvėsinto 96 % etanolio, supurtoma bei laikoma 20 min –20 °C temperatūroje. Mėginys centrifuguojamas tomis pačiomis sąlygomis, pašalinus supernatantą pridedama 1 ml 70 % atvėsinto etanolio, supurtoma bei vėl centrifuguojama. Pašalinus visą supernatantą pradaryti mėgintuvėliai džiovinami 10–15 min. DNR nuosėdos tirpinamos reikalingame kiekyje H<sub>2</sub>O.

### **2.2.9. Atsitiktinė plazmidinės DNR mutagenezė**

Protokolas adaptuotas remiantis Sikorski ir Boeke (Sikorski and Boeke, 1991). Atsitiktinė plazmidinės DNR mutagenezė atliekama naudojant mutagenizuojantį agentą

hidroksilaminą. Į 250 µl šviežiai paruošto HA mutagenezės tirpalo pridedama 5 µg plazmidinės DNR, mišinys inkubuojamas 75 °C temperatūroje. Praėjus 60 min 50 µl reakcijos mišinio perkeliama į kitą mėgintuvėlį ir laikoma lede. Procedūra pakartojama po 90 bei 120 min. Naudojant „GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit“ rinkinį skirtingu laiku gauta plazmidinė DNR išvaloma nuo reakcijos mišinio komponentų ir visi 3 jos variantai transformuojami į atskiras kompetentines bakterijas (žiūrėti 2.2.5. sk.) bei išsėjami ant M9 terpės su izocitozinu.

### **2.2.10. Tikslinė plazmidinės DNR mutagenezė**

Tikslinė sukonstruotos rekombinantinės pQE70-Vcz plazmidinės DNR mutagenezė vykdyta naudojantis „QuikChange™ Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Agilent Technologies) rinkiniu, remiantis gamintojo rekomendacijomis. Naudojant ciklinius temperatūros pokyčius nuo dvigrandinio DNR šablono susintetinama viengrandinė mutantinė DNR. Mutacijos sugeneruojamos tikslinėje vietoje pasinaudojant sintetiniais oligonukleotidų pradmenimis. Rinkinyje esantis fermentų mišinys pasižymi Pfu DNR polimerazės savybėmis, taip pat geba suliguoti sintezės metu DNR grandinėje atsiradusius trūkius. Temperatūrinių ciklų metu sugeneruotas produktas veikiamas metilintoms ir hemimetilintoms DNR specifiška *DpnI* restrikcijos endonukleaze, kuri hidrolizuoja šabloninę, pageidaujamų mutacijų neturinčią DNR grandinę. Likusi mutacijas turinti viengrandinė DNR pagal poreikį sukonzentruojama (žiūrėti 2.2.8. skyrelį) arba iškart transformuojama į rinkinyje esančias XL10-Gold kompetentines bakterijas pagal gamintojo rekomendacijas. Šiose ląstelėse mutantinė žiedinė viengrandinė DNR konvertuojama į dvigrandinę ir padauginama. Gauta ląstelių biomasė surenkama, iš jos įvairias mutacijas turinti plazmidinė DNR bendrai išskiriama (pagal 2.2.6. sk.) bei sukonzentruojama (2.2.8.sk.). Koncentruota mutantine plazmidine DNR transformuojamas DH10BΔ*pyr* kamienas, bakterijos išsėjamos ant M9 terpės su izocitozinu.

### **2.2.11. *E. coli* kamienų konstravimas**

*PyrF* ir *codA* genai iš *E. coli* HMS174 kamieno pašalinti naudojant „The Quick and Easy *E. coli* Gene Deletion Kit“ (Gene Bridges) remiantis gamintojo pateikiamu protokolu (2.3 versija, birželis, 2012). Rinkinys paremtas fagų gaminamų baltymų poromis (RecE/RecT

arba Red $\alpha$ /Red $\beta$ ), valdančiomis homologinę rekombinaciją tarp pasirinkto taikinio *E. coli* chromosomoje ir atsparumą kanamicinui suteikiančios kasetės, kurią supa flipazės atpažinimo taikinio (FRT) sekos. Rinkinyje naudojami trumpi homologiniai fragmentai (50 bp), ilgais PGR pradmenimis (šalinant *pyrF* geną – *pyrF\_kan\_Fw* ir *pyrF\_kan\_Rv*) pridedami prie atsparumą kanamicinui suteikiančios kasetės (*codA* geno atveju kanamicino kasetė su ją supančiais homologiniais fragmentais buvo pagausinta (naudojant dCodAF ir dCodAR pradmenis) nuo BW25133 *codA::kan* kamieno (Keio kolekcija)). Vėliau pagal gamintojo pateikiamą protokolą kanamicino atrankos žymuo pašalinamas pasitelkiant 708-FLPe plazmidę (Gene Bridges). Ši plazmidė leidžia vykdyti taikiniui specifinės rekombinazės flipazės (FLP) raišką, kuri iš tikslinio lokuso pašalina su FRT sekomis apsuptą kanamicino atrankos žymenį.

### **2.2.12. Rekombinantinių 6 $\times$ His žymę turinčių baltymų sintezė**

Rekombinantinių baltymų sintezei naudotas pET28a vektorius, koduojantis C galinę 6 histidinių žymę turinčius deaminazių baltymus. Vektorius transformuojamas į *E. coli* BL21(DE-3) arba HMS174 $\Delta$ *pyrF* $\Delta$ *codA* kamienus (pagal 2.2.4. sk.). Viena iš transformantų kolonijų užsėjama į 10 ml skystos LB terpės, turinčios 50 mg/l kanamicino, bei inkubuojama per naktį 37 °C temperatūroje, purtyklėje kratant 180 apsisukimų/min greičiu. 2 ml naktinės kultūros užsėjama į 200 ml skystos LB terpės ir kultūra auginama tomis pačiomis sąlygomis iki kol OD<sub>600</sub> pasieks 0,5–0,6. Kultūra atšaldoma ledo vonelėje, pridedama galutinė 0,1–1 mM induktoriaus IPTG (izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozido) koncentracija ir inkubuojama purtyklėje 20 °C temperatūroje per naktį. Bakterijos surenkamos centrifuguojant 4000 $\times$  g pagreičiu 15 min, supernatantas nupilamas, gauta biomasė užšaldoma –20 °C temperatūroje arba ruošiama ardymui ultragarsu.

### **2.2.13. Bakterijų ardymas ultragarsu**

Po rekombinantinių baltymų sintezės surinkta bakterijų biomasė suspenduojama 5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8) buferio, perkeliama į ardymui skirtą metalinį mėgintuvėlį, kuris merkiamas į ledo vonelę. Bakterijos, naudojant VC-750 ultragarso procesorių (Sonics & Materials, Inc.), 2 minutes ardamos ultragarsu kas 20 sekundžių siunčiant trumpus 2–3 s

750 W impulsus. Ląstelių nuolaužos pašalinamos centrifuguojant 4 °C temperatūroje 20 min 16000× g pagreičiu. Gautas *E. coli* lizatas naudojamas rekombinantinių baltymų gryninimui.

#### **2.2.14. 6× His žymę turinčių rekombinantinių baltymų gryninimas**

*E. coli* lizatuose esantys baltymai gryninti metalų chelatinės giminingumo (afininės) chromatografijos metodu naudojant Ni-NTA kolonėlę (GE Healthcare), skirtą bakterijose sintetintų 6× His žymę turinčių rekombinantinių baltymų gryninimui. Kolonėlė nulygsvarinama 50 mM TRIS-HCl (pH 8) buferiu, į ją įnešamas *E. coli* ląstelių lizatas, adsorbavę baltymai nuo kolonėlės pašalinami naudojant linijinį 0–500 mM imidazolo gradientą. Frakcijos surenkamos, gryninimo efektyvumas tikrinamas baltymų elektroforezės metodu. Tikslinį baltymą turinčios frakcijos apjungiamos.

#### **2.2.15. Baltymų elektroforezė**

Baltymų elektroforezė natrio dodecilsulfato poliakrilamidiniame gelyje (angl. *SDS-PAGE*) atliekama pagal standartinį protokolą (Laemmli, 1970) elektroforezės sistemoje (Thermo Scientific). Tyrimo metu naudojamas 4,5 % koncentruojantysis bei 12 % skirstantysis geliai. Mėginiai prieš elektroforezę paruošiami: sumaišoma 10 µl mėginio su 10 µl baltymų elektroforezės pavyzdžių buferio (sudėtį žiūrėti 2.1.5.), kaitinama 5 min verdančio vandens vonelėje. Gelis su išskirstytais mėginiais dažomas „Coomassie Brilliant Blue R-250“ dažu ~5 min, po to blukinamas 5 % acto rūgštyje. Baltymų dydžio nustatymui naudojamas „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific) standartas.

#### **2.2.16. Baltymų dializė**

Po rekombinantinių baltymų gryninimo gautame tirpale be tikslinių baltymų lieka ir metodui naudoto imidazolo, galinčio trukdyti tolimesniems eksperimentams. Siekiant jį pašalinti vykdoma mėginių dializė. 12 kDa dydžio poras turinti dializės žarnelė (Carl Roth) sudrėkinama distiliuotu H<sub>2</sub>O, vienas jos galas užspaudžiamas spaustuku, žarnelė atsargiai nepaliekant oro burbuliukų užpildoma baltymo tirpalu bei užspaudžiamas kitas jos galas. Taip paruoštas maišelis merkiamas į 50 mM TRIS-HCl (pH 8) buferį, kurio tūris yra bent 100 kartų didesnis už dializuojamo tirpalo tūrį. Dializė vykdoma 12–16 val. 4 °C temperatūroje 2–3

kartus pakeičiant buferį. Po dializės siekiant sukcentruoti baltymo tirpalą, maišelis apibarstomas natrio karboksimetilceliuliozės milteliais bei laukiama, kol tirpalo tūris sumažės iki norimos ribos. Rekombinantinio baltymo koncentracija tirpale išmatuojama pasitelkiant Lowry metodą (Lowry et al., 1951), jaučio serumo albuminą naudojant kaip standartą.

### **2.2.17. Substratinio specifiškumo tyrimas**

Siekiant patikrinti, ar išgrynintas rekombinantinis baltymas yra aktyvus ir sėkmingai atlieka savo fermentinę funkciją, bei norint sužinoti galimus tiriamojo baltymo substratus atliekami substratinio specifiškumo matavimai. Paruošiami 20 mM substratų tirpalai miltelius tirpinant 50 mM TRIS-HCl (pH 8) buferyje bei kiekvienas jų sumaišomas su 1 µg rekombinantinio fermento galutiniame 20 µl tūryje. Reakcija vykdoma 1 val 37 °C temperatūroje, rezultatai analizuojami plonasluoksnės chromatografijos metodu.

### **2.2.18. Plonasluoksnė chromatografija**

Plonasluoksnės chromatografijos (angl. *TLC*) analizei ant aliuminio plokštelės, padengtos silikageliu 60 F254 (Merck Millipore, MA, JAV), uždedama po 1 µl analizuoti norimų mėginių (žiūrėti 2.2.17. sk.) bei gerai išdžiovinama. Plokštelės apatinis kraštas merkiamas į tirpiklių mišinį – judrią fazę – taip, kad nesiektų užneštų mėginių, bei laukiama, kol skystis pakils iki plokštelės viršaus. Vcz ir KANOS baltymų analizės atveju judriai fazei naudota metanolio:chloroformo (santykiu 1:9) sistema. Rezultatai analizuojami vizualizuojant plokštelę 254 nm UV šviesoje.

### **2.2.19. Fermentinio aktyvumo matavimai**

KANOS baltymo aktyvumas tirtas spektrofotometriškai 22 °C temperatūroje matuojant absorbcijos sumažėjimą 285 nm bangos ilgyje, stebint izocitoziną ( $\epsilon = 3918,75 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) arba 275 nm, stebint citoziną ( $\epsilon = 5090,67 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Matavimai atlikti kvarcinėse kiuvetėse (optinio kelio ilgis = 1 cm) naudojant Helios Gamma UV-Vis spektrofotometrą (Thermo Scientific). Reakcijos ( $V = 1 \text{ ml}$ ) inicijuojamos pridant atitinkamą kiekį (izocitozino atveju 0,0002 µM, citozino atveju 0,0001 µM) fermento į 50 mM TRIS-HCl (pH 8) buferį, kuriame yra substratų izocitozino (30–450 µM) arba citozino

(25–400  $\mu\text{M}$ ). Substratų sugerties pokytis registruojamas tam tikrame laiko intervale. Kinetiniai parametrai ( $k_{\text{cat}}$  ir  $K_{\text{M}}$ ) nustatyti remiantis trijų nepriklausomų eksperimentų duomenimis, pritaikant Michaelis–Menten lygtį, naudojantis GraphPad Prism 6 programine įranga.

### **2.2.20. Didelio efektyvumo skysčių chromatografija–masių spektrometrija**

Didelio efektyvumo skysčių chromatografijos–masių spektrometrijos (HPLC-MS) tyrimai atliekami naudojant didelio efektyvumo skysčių chromatografijos sistemą, turinčią fotodiodų detektorių (SPD-M20A), bei masių spektrometrą (LCMS-2020) su elektrinio purškimo jonizacijos (ESI) šaltiniu (Shimadzu, Japonija). Chromatografinis atskyrimas atliekamas naudojant YMC Pack Pro kolonėlę (YMC, Japonija), 3 masių spektrometrą  $\times 150$  mm esant 40 °C temperatūrai, ir mobilią fazę, susidedančią iš 0,1 % skruzdžių rūgšties vandeninio tirpalo (A tirpiklis) bei acetonitrilo (B tirpiklis). Masių spektrometrijos duomenys gaunami ir teigiamos, ir neigiamos jonizacijos būdu bei analizuojami naudojant LabSolution LCMS programinę įrangą.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame skyriuje aprašomi bei aptariami eksperimentai, skirti išanalizuoti bei modifikuoti metagenominėse bibliotekose aptiktų izocitozino deaminazių savybes ir įvertinti jų pritaikomumą vėžio genų terapijoje. Visa darbo eiga yra suskirstyta į 3 pagrindines dalis: Vcz izocitozino deaminazės kinetinių parametrų gerinimas, siekiant šį fermentą ateityje panaudoti fermento-provaisto vėžio terapijos tyrimuose (1), KANOS izocitozino/citozino deaminazės kinetinių parametrų nustatymas, leidžiantis įvertinti jos pritaikomumą vėžio gydymui, palyginti deaminazes tarpusavyje ir galimai nuspėti jų evoliucinius ryšius (2) bei dviejų fermentų hibridinės sistemos kūrimas siekiant patobulinti fermento-provaisto terapiją (3).

#### 3.1. Plazmidinio vektoriaus pQE70-Vcz konstravimas

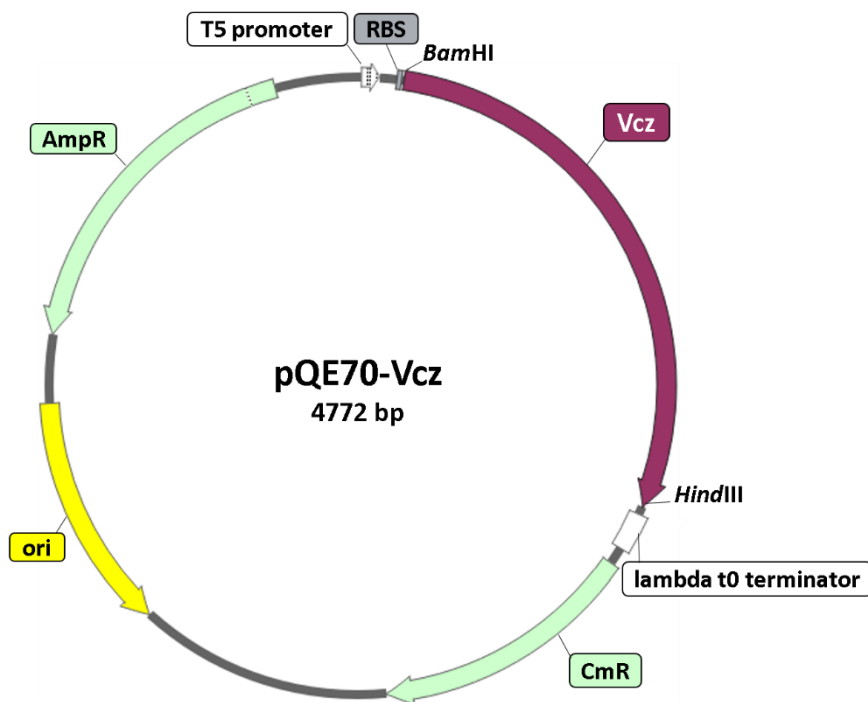
Pradiniame tyrimo etape darbui reikalingas vektorius pQE70-Vcz buvo virtualiai sukonstruotas naudojantis „Benchling“ platforma Vcz izocitozino deaminazę koduojantį geną įterpiančią pQE70 plazmidę. Išanalizavus teorinį vektoriaus modelį darbas toliau buvo vykdomas pagal 2.2.7. skyrelyje aprašytą metodiką. Vcz geno DNR seka gauta PGR metodu iš metagenominės bibliotekos naudojant specifinius oligonukleotidų pradmenis (VczICD pQ-FW ir VczICD pQ-RV), 5' DNR gale sukuriančius *Bam*HI bei 3' gale – *Hind*III restrikcijos endonukleazių (RE) atpažinimo sekas (3.1 pav.).



**3.1 pav.** Vcz izocitozino deaminazės geną koduojantis fragmentas iš Vcz metagenominės bibliotekos. Žaliai pažymėta Vcz deaminazė, pilkai – kitų fragmente esančių genų dalinės sekos, mėlynai – schematiškai pavaizduota Vcz geno pagausinimui naudotų PGR pradmenų, turinčių RE atpažinimo sekas, prikibimo vieta.

Pagausintas Vcz DNR fragmentas hidrolizuotas *Bam*HI bei *Hind*III restriktazėmis, vektorius pQE70 lygiagrečiai paveiktas tomis pačiomis RE. Po hidrolizės abu produktai

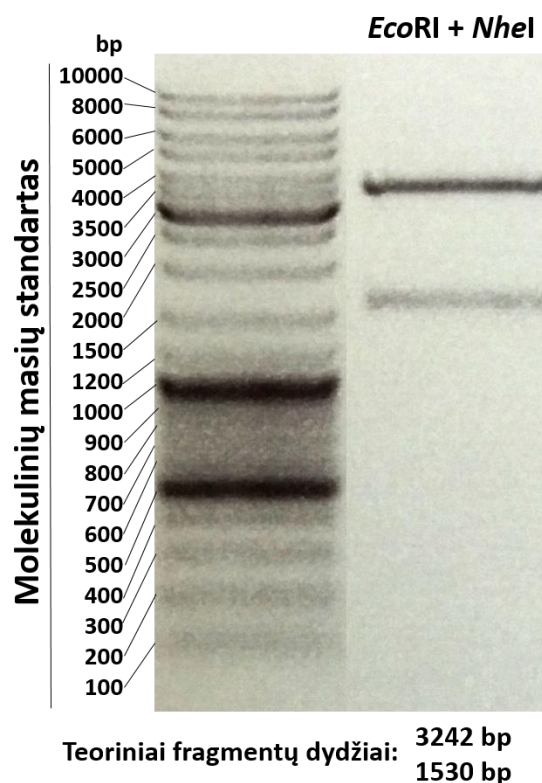
atliekant elektroforezę išvalyti nuo priemaišų (pagal 2.2.2. ir 2.2.3. metodų skyrelius) ir dėka T4 ligazės, skatinančios fosfodiesterinio ryšio tarp 5'-fosfato ir 3'-hidroksi grupių susidarymą, sujungti. Tikėtina, jog po šio žingsnio ligavimo mišinyje esantis konstruktas, kuriuo transformuojamos kompetentinės DH10B $\Delta$ pyr bakterijos, atitinka 3.2 paveiksle pavaizduotą schemą.



**3.2 pav.** Vektoriaus pQE70-Vcz schema. Vcz – į vektorių įterptas Vcz deaminazės genas; AmpR – bakterijų atsparumo ampicilinui genas; CmR – atsparumo chloramfenikoliui genas; ori – didelio kopijų skaičiaus plazmidžių ColE1/pMB1/pBR322/pUC replikacijos pradžios seka; RBS – stipri bakterinė ribosomos prisijungimo vieta; T5 promoter – bakteriofago T5 promotorius *E. coli* RNR polimerazei; lambda t0 terminator – lambda fago transkripcijos terminacijos seka; BamHI, HindIII – restrikcijos endonukleazių sekos, per kurias į vektorių įterptas Vcz genas.

Ant agarizuotos LB terpės su antibiotiku ampicilinu užaugusioms transformuotų bakterijų kolonijoms atliekama dviguba patikra, kadangi nėra aišku, ar į plazmidę, kuri ir lemia atsparumą ampicilinui, įsiterpė Vcz genas bei ar gauto vektoriaus konstrukcija tikrai atitinka teorinį modelį. Pirmiausia naudojant įterptą fragmentą apsupančius pradmenis (pQE-F ir pQE-R) atlikta PGR (žiūrėti 2.2.1. sk.) – jei tiriamoji kolonija turėjo reikiamo dydžio fragmentą, jos plazmidinė DNR buvo išskirta bei padauginta (pagal 2.2.6. sk.). Toliau gautas konstruktas patikrintas atliekant restrikcinę analizę (3.3 pav.).

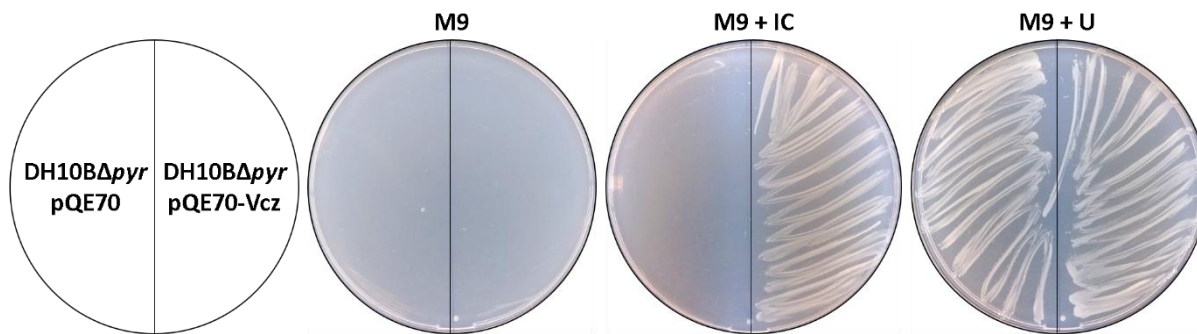




**3.3 pav.** Plazmidinio vektoriaus pQE70-Vcz restriktinė analizė (Molekulinių masių standartas: „GeneRuler DNA Ladder Mix“, #SM0333, Thermo Scientific).

Plazmidę hidrolizavus *EcoRI* bei *NheI* RE gauti fragmentai, elektroforetiškai išskirstyti 1 % agarozės gelyje (pagal 2.2.2. sk.), atitiko teorinius dydžius (3242 bp ir 1530 bp), nustatytus vektorių virtualiai hidrolizuojant tomis pačiomis RE kompiuterine „Benchling“ platforma. Tai patvirtina, jog vektoriaus konstravimas atliktas sėkmingai. Patikrinti, ar geno seka atitinka teorinę, gautas vektorius pateiktas į Macrogen firmos sekoskaitos centrą (Pietų Korėja).

Galiausiai siekiant įsitikinti, kad į vektorių įterptas Vcz izocitozino deaminazės genas atlieka savo funkciją, gauta konstrukcija transformuota į uracilo auksotrofinį DH10BΔ*pyr* kamieną. Šios bakterijos negali augti be uracilo šaltinio, nes jų pirimidinų *de novo* biosintezės kelias yra sutrikdytas pašalinant *pyrF*, *pyrE* ir *pyrC* genus, kurie atitinkamai koduoja orotidino-5'-fosfato dekarboksilazę, orotato fosforibosiltransferazę bei dihidrorotazę (Aučynaitė et al., 2018b). DH10BΔ*pyr* bakterijos, turinčios pQE70-Vcz plazmidinį vektorių, išsėtos ant M9 terpės (sudėtį žiūrėti 2.1.4. sk.), kurioje vienintelis galimas uracilo šaltinis yra izocitozinas. Vcz deaminazė izocitoziną verčia uracilu, dėl ko bakterijos geba augti tokioje terpėje (3.4 pav.).



**3.4 pav.** Vcz izocitozino deaminazės veiksmingumo tyrimas. Tuščias pQE70 vektorius naudotas kaip neigiama kontrolė. Bakterijos augintos ant minimalios terpės be substrato (M9), su izocitoziniu (M9 + IC) bei su uracilu (M9 + U, teigiama kontrolė).

Taip įsitikinta, jog gautas plazmidinis vektorius koduoja aktyvią izocitozino deaminazę ir yra tinkamas naudoti tolimesniuose darbuose.

### 3.2. Atsitiktinė Vcz izocitozino deaminazės mutagenėzė

Vcz izocitozino deaminazės kinetinių parametrų gerinimui pasitelktas vienas iš evoliucijos *in vitro* metodų – atsitiktinė mutagenėzė. Daroma prielaida, jog jeigu plazmidės koduojamame Vcz gene atsirastų mutacija, dėl kurios pagerėtų fermentinės šios deaminazės savybės (efektyvumas), tokią deaminazę turinčių *E. coli* bakterijų kolonijos augtų greičiau (būtų didesnės) lyginant su laukinio tipo deaminazę turinčiomis kolonijomis.

Pokyčių įvedimui į ankstesniuose darbuose sukonstruotą plazmidinį vektorių pQE70-Vcz, koduojantį aktyvią izocitozino deaminazę, naudotas mutagenizuojantis agentas hidroksilaminas. Šiai medžiagai reaguoja su dvigrandinine DNR susidaro  $N^4$ -hidroksicitozinas, linkęs formuoti ryšius su adenozinu. Tai galiausiai nulemia tranzicijos mutacijų plazmidinėje DNR atsiradimą: citozino bazės pakeitimą į timino, o guanino – į adenino (Sikorski and Boeke, 1991).

Tyrimo metu hidroksilaminu paveikta plazmidinė DNR (žiūrėti 2.2.9. sk.) buvo transformuota į uracilo auksotrofinį DH10BΔpyr kamieną ir bakterijos išsėtos ant M9 terpės, kurioje vienintelis galimas uracilo šaltinis yra izocitozinas. Po 4-5 dienų lėkštelėje užaugo bakterijų kolonijos, tarp kurių buvo galima pamatyti ir vieną kitą, išsiskiriančią savo dydžiu. Buvo atrinktos 3 didesnės kolonijos, iš kurių išskirta plazmidinė DNR. Siekiant įsitikinti, jog vektoriuje esančiame Vcz gene tikrai atsirado mutacija, dėl kurios ši deaminazė galimai

pasizymimi geresnėmis fermentinėmis savybėmis, buvo nustatytos konstruktyvų nukleotidų sekos. Gauti rezultatai patvirtino, jog visų tikrintų vektorių Vcz genuose yra po vieną mutaciją, dėl kurių pakito baltymo aminorūgštys: E188K pirmame, A335T antrame bei G293R trečiame klone (3.5 pav.).

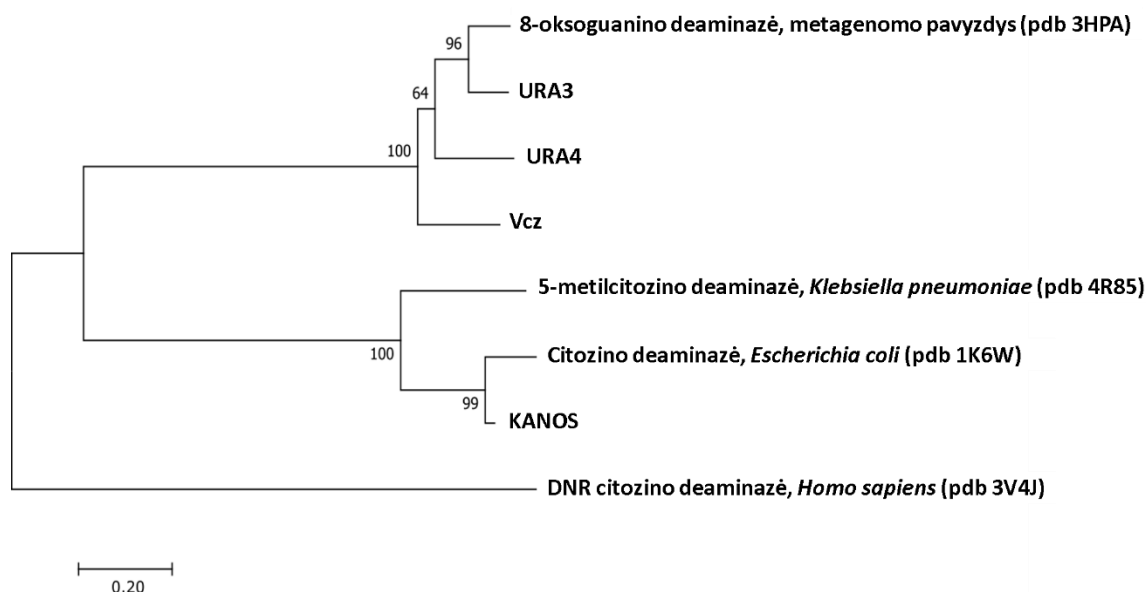
Vcz	MRGSIGSHKRTLLFKNAELLVMTDDERREIRGGCLLVEGNRIVAVGGDELCAAPADEEID	60
Vcz_Mutantas_1	MRGSIGSHKRTLLFKNAELLVMTDDERREIRGGCLLVEGNRIVAVGGDELCAAPADEEID	60
Vcz_Mutantas_2	MRGSIGSHKRTLLFKNAELLVMTDDERREIRGGCLLVEGNRIVAVGGDELCAAPADEEID	60
Vcz_Mutantas_3	MRGSIGSHKRTLLFKNAELLVMTDDERREIRGGCLLVEGNRIVAVGGDELCAAPADEEID	60
*****		
Vcz	LRGHIVIPGLINTHHHMFQSLTRVIPDAQDGELEFDWLNLYPIWAGLTPEMIRISTQTAM	120
Vcz_Mutantas_1	LRGHIVIPGLINTHHHMFQSLTRVIPDAQDGELEFDWLNLYPIWAGLTPEMIRISTQTAM	120
Vcz_Mutantas_2	LRGHIVIPGLINTHHHMFQSLTRVIPDAQDGELEFDWLNLYPIWAGLTPEMIRISTQTAM	120
Vcz_Mutantas_3	LRGHIVIPGLINTHHHMFQSLTRVIPDAQDGELEFDWLNLYPIWAGLTPEMIRISTQTAM	120
*****		
Vcz	AELMLSGCTTSSDHLYVYPNGCRLLDDSIDGAREIGMRFHACRGSMSVGRSKGGLPPDELV	180
Vcz_Mutantas_1	AELMLSGCTTSSDHLYVYPNGCRLLDDSIDGAREIGMRFHACRGSMSVGRSKGGLPPDELV	180
Vcz_Mutantas_2	AELMLSGCTTSSDHLYVYPNGCRLLDDSIDGAREIGMRFHACRGSMSVGRSKGGLPPDELV	180
Vcz_Mutantas_3	AELMLSGCTTSSDHLYVYPNGCRLLDDSIDGAREIGMRFHACRGSMSVGRSKGGLPPDELV	180
*****		
<b>Mut_1: E188K</b>		
Vcz	ENEQAIL <b>E</b> DSLRLIHSYHDAQRYSMRLRIALAPCSPFSVSRELMVKTAQMAREQGVSLHTH	240
Vcz_Mutantas_1	ENEQAIL <b>K</b> DSLRLIHSYHDAQRYSMRLRIALAPCSPFSVSRELMVKTAQMAREQGVSLHTH	240
Vcz_Mutantas_2	ENEQAIL <b>E</b> DSLRLIHSYHDAQRYSMRLRIALAPCSPFSVSRELMVKTAQMAREQGVSLHTH	240
Vcz_Mutantas_3	ENEQAIL <b>E</b> DSLRLIHSYHDAQRYSMRLRIALAPCSPFSVSRELMVKTAQMAREQGVSLHTH	240
***** ; *****		
<b>Mut_3: G293R</b>		
Vcz	LAENDSDVSYSQTHFGMTPAQYAEDLGWVGSVDVWHAHCVKLDRAGISLFART <b>G</b> TGVAHCP	300
Vcz_Mutantas_1	LAENDSDVSYSQTHFGMTPAQYAEDLGWVGSVDVWHAHCVKLDRAGISLFART <b>G</b> TGVAHCP	300
Vcz_Mutantas_2	LAENDSDVSYSQTHFGMTPAQYAEDLGWVGSVDVWHAHCVKLDRAGISLFART <b>G</b> TGVAHCP	300
Vcz_Mutantas_3	LAENDSDVSYSQTHFGMTPAQYAEDLGWVGSVDVWHAHCVKLDRAGISLFART <b>R</b> TGVAHCP	300
***** *****		
<b>Mut_2: A335T</b>		
Vcz	CSNMRLASGIAPIRAMLDEGVSVGLGVDGSASND <b>A</b> GNMIAETRQAMLLQRVGFGPDAMNA	360
Vcz_Mutantas_1	CSNMRLASGIAPIRAMLDEGVSVGLGVDGSASND <b>A</b> GNMIAETRQAMLLQRVGFGPDAMNA	360
Vcz_Mutantas_2	CSNMRLASGIAPIRAMLDEGVSVGLGVDGSASND <b>T</b> GNMIAETRQAMLLQRVGFGPDAMNA	360
Vcz_Mutantas_3	CSNMRLASGIAPIRAMLDEGVSVGLGVDGSASND <b>A</b> GNMIAETRQAMLLQRVGFGPDAMNA	360
***** ; *****		
Vcz	RQALEIATRGGAKVLRDDIGYLATGMAADFVAFDLNTLNLAGAKHDLAALVFCPTPGNV	420
Vcz_Mutantas_1	RQALEIATRGGAKVLRDDIGYLATGMAADFVAFDLNTLNLAGAKHDLAALVFCPTPGNV	420
Vcz_Mutantas_2	RQALEIATRGGAKVLRDDIGYLATGMAADFVAFDLNTLNLAGAKHDLAALVFCPTPGNV	420
Vcz_Mutantas_3	RQALEIATRGGAKVLRDDIGYLATGMAADFVAFDLNTLNLAGAKHDLAALVFCPTPGNV	420
*****		
Vcz	AFSVINGQVVIREGVLQTTIDLPSVVQQHNR LAC LLVNRHRL	461
Vcz_Mutantas_1	AFSVINGQVVIREGVLQTTIDLPSVVQQHNR LAC LLVNRHRL	461
Vcz_Mutantas_2	AFSVINGQVVIREGVLQTTIDLPSVVQQHNR LAC LLVNRHRL	461
Vcz_Mutantas_3	AFSVINGQVVIREGVLQTTIDLPSVVQQHNR LAC LLVNRHRL	461
*****		

**3.5 pav.** Vcz izocitozino deaminazės (1 eil.) ir mutantinių jos variantų (2–4 eil.) sekų palyginimas. Raudonai pažymėtos po mutagenezės pakitusios aminorūgštys.

Vis dėlto, nepaisant įrodyto mutavimo metodo veiksmingumo ir, atrodytų, sėkmingos pradinės mutantų atrankos, pakartotina analizė neparodė reikšmingų augimo skirtumų tarp laukinio tipo Vcz ir mutantinius Vcz genus turinčių bakterijų. Vcz deaminazės gene atsiradusios mutacijos greičiausiai neturi įtakos fermento aktyvumui dėl to, jog jų sukeltos aminorūgščių pakaitos nėra nei prie numanomo aktyvaus fermento centro, nei prie galimų substrato jungimuisi svarbių vietų (žr. 3.3 sk., 3.7 pav.).

### 3.3. Tikslinė Vcz izocitozino deaminazės mutagenezė

Kitas fermentų evoliucijos *in vitro* metodas, pasitelktas, siekiant pagerinti Vcz izocitozino deaminazės kinetinius parametrus – tikslinė šio baltymo mutagenezė. Atlikus Vcz ir kitų anksčiau laboratorijoje aptiktų izocitozino deaminazių sekų analizę (Aučynaitė et al., 2018a) buvo pastebėta, jog tiriamoji Vcz deaminazė yra artima 8-oksoguanino deaminazėms (3.6 pav.). Šie fermentai nėra plačiai ištyrinėti, tačiau dviejų tokių fermentų aktyvumas yra įrodytas, vieno iš jų struktūra yra išspręsta (Hall et al., 2010). Šiame straipsnyje yra demonstruojamas *Pseudomonas aeruginosa* 8-oksoguanino deaminazės (Pa0142, gi|9945972 (Berman et al., 2000)) fermentinis aktyvumas. Taip pat skelbiamas homologiškos šiam fermentui deaminazės (3HPA, gi|44264246 (Berman et al., 2000)), aptiktos Sargaso jūros metagenomo pavyzdyje, aktyvumas bei tretinė struktūra. Straipsnyje taip pat yra apžvelgtas galimas aktyvusis 8-oksoguanino deaminazių centras bei numatytos substrato surišimui svarbios aminorūgštys.



3.6 pav. Evoliuciniai deaminazių ryšiai (Aučynaitė et al., 2018a)

Vcz	-----MRGSIGSHKRTLLFKNAELLVTMDDERREIRGGCLLVEGNR	41
3HPA	MGADRRGERMNLEQHAGARAPNTSSSRPKTLLVKHADVLVTMDDTRRELDRDAGLYIEDNR	60
Pa0142	-----MSRTWI-RNPLAIFT---ANGLDAAGGLVVEDGR	30
	:* : : : : * . . * : * . *	
	<b>Q79</b>	
Vcz	IVAVG-GDELCAAPADEEIDLGRGHIVI PGLINTHHHMFQSLTRVIPDAQDGELEFDWLNNL	100
3HPA	IVAVG-PSAELPETADEVLDRGLHVI PGLVNTHHHMYQSLTRAVPAAQNAELFGWLTNL	119
Pa0142	IVELLGAGQQPAQPCASQFDASRHVVL PGLVNTHHHFYQTLTRAWAPVNVQPLFPWLKTL	90
	** : . . . : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	<b>Y136</b>	
Vcz	YPIWAGLTPEMIRISTQTAMAE LMLSGCTTSSDHL YVYPNGCRL--DDSIDGAREIGMRF	158
3HPA	YKIWAHLTPEMIEVSTLTAMAE LLQSGCTTSSDHL YIYPNGSRL--DDSIGAAQRIGMRF	177
Pa0142	YPVWARLTPEKLELATKVALAE LLLSGCTTAADHYLFPGGLEQAI DVQAGVVEELGMRA	150
	* : * * * * * : : : * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	<b>C213 S214</b>	
Vcz	HACRGSMVGRSKGGLPPDELVENEQAILED SLRLIHSYHDAQRYSMRLIALAPCS PFSV	218
3HPA	HASRGAMSVGQRDGGLPDPSVVEREPDILRDTQR LIETYHDEGRYAMLRVVVAPCS PFSV	237
Pa0142	MLTRGSM LGEKDGGLPPQQT VQEAETILADSERLIARYHQRGD GARVQIALAPCS PFSV	210
	** : * : * . . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	<b>E243</b>	<b>H277</b>
Vcz	SRELMVKTAQMAREQGVSLHTHLAE NDSVSYSQTHFGMTPAQYAEDL GWGSDVWHAHC	278
3HPA	SRDLMRDAAVLAREYGVSLHTHLAE NVNDIAYSREKFGMTPAEYAEDL GWVGHVWHAHC	297
Pa0142	TPEIMRASAEVAARHDVRLHTHLAE TLDEEDFCLQRFGLRTVDYLD SVGWLGPRTWLAHG	270
	: : * : * : * . . * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	<b>D328</b>	
Vcz	VKLDRAGISLFARTGTGVAHCPCSNMRLASGIAPIRAMLDEGVS VGLGVDGSASNDAGNM	338
3HPA	VQLDDAGIGLFARTGTGVAHCPCSNMRLASGIAPVKMRLAGVPVGLGVDGSASNDGAQM	357
Pa0142	IHFNAEEIRRLGEAGTGICHCPSSNMRLASGICPTVELEAAGAPIGLGVDGSASNDASNM	330
	: : : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Vcz	IAETRQAMLLQRVGFDPDAMNARQALE IATRGGAKVLNRDDIGYLATGMAADFVAFDLNT	398
3HPA	VAEVRQALLLQRVGFDPDAMTAREALE IATLGGAKVLNRDDIGALKPGMAADFAAFDLRQ	417
Pa0142	ILEARQALYLQRLRYGAERITPELALGWATRGSARLLGRSDIGELAPGKQADLALFKLDE	390
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Vcz	LNLGAKHDPLAALVFCTPGNVAFSVINGQVVIREGVLQ TIDLPSVVQQHNRLACL LVNR	458
3HPA	PLFAGALHDPVAALVFCAPSQTAYTVVNGKVVVREGRLATLDLPPVIERHNALAHALVEA	477
Pa0142	LRFSG-SHDPLSALLLCAADRADRVVGGAWRVVDGAVEGLDLAALIARHRAAASALIAG	449
	: : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Vcz	HRL 461	
3HPA	AR- 479	
Pa0142	--- 449	

**3.7 pav.** Daugybinis deaminazių sekų palyginimas. Vcz izocitozino deaminazės seka lyginta su Sargaso jūros mėginiuose rastos 8-oksoguanino deaminazės (3HPA) ir *P. aeruginosa* 8-oksoguanino deaminazės (Pa0142) sekomis. Mėlynai pažymėtos galimos 8-oksoguanino deaminazių aktyviojo centro aminorūgštys, raudonai – numanomos substrato surišimui svarbios aminorūgštys (remiantis Hall et al., 2010).

Išanalizavus Vcz deaminazės ir straipsnyje paskelbtų baltymų sekas pamatyta, jog 8-oksoguanino deaminazės substrato surišimo vietose esančias aminorūgštis analogiškose vietose turi ir Vcz deaminazė (3.7 pav.). Remiantis šiomis žiniomis daroma prielaida, jog pakitus substrato surišimo vietoje esančioms aminorūgštims Vcz fermentas galėtų efektyviau deamininti savo substratą ir tokį mutantinį baltymą turinčios bakterijos ant terpės su izocitoziniu augtų greičiau. Nuspręsta pakeisti atsitiktinėmis šias aminorūgštis: Q79, Y136, C213 ir S214.

Šiuo atveju pokyčių įvedimui į pQE70-Vcz plazmidinį vektorių naudotas „QuikChange™ Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit“ rinkinys (žiūrėti 2.2.10. sk.), kurio pagalba naudojant specifinius pradmenis tikslinėse baltymo sekos vietose esančią aminorūgštį galima pakeisti bet kokia kita. Kadangi nežinoma, kuri aminorūgštis yra tinkama gauti pageidaujamus rezultatus, nuspręsta taip sukurti pradmenis, jog norimose vietose būtų sugeneruoti visi įmanomi natūraliai aptinkamų aminorūgščių variantai. Po tokios mutagenezės gautas produktas yra daug skirtingų konkrečioje numatytoje vietoje atsitiktinę mutaciją turinčių pQE70-Vcz vektorių kopijų. Šis vektorių mišinys transformuojamas į komercines rinkinyje esančias *E. coli* XL10-Gold ląsteles pagal gamintojo rekomendacijas. Siekiama gauti kuo daugiau kolonijų, kad bendrai užaugusiuose transformantuose esančios mutacijos apimtų visas 20 aminorūgščių. Šiame darbe mutacijų generavimui naudojama NNK (N – adeninas/citozinas/guaninas/timinas; K – guaninas/timinas) kodonų sistema, kuri apima 32 kodonus, leidžiančius sugeneruoti 20 skirtingų aminorūgščių. Norint gauti transformantus, kurie 95 % padengtų galimus kodonus, teoriškai reikia išauginti bent 94 mutantinę plazmidinę DNR turinčias bakterijų kolonijas keičiant vieną aminorūgštį ir net 3066 transformantus keičiant dvi (Reetz et al., 2008).

Tyrimo metu buvo gauti 5 mutantinių plazmidžių mišinių variantai su atitinkamai pakeistomis aminorūgštimis Vcz sekoje: Q79N, Y136N, C213N, S214N bei dvigubas mutantas C213NS214N (N – bet kokia aminorūgštis). Šios plazmidinės DNR buvo sukonzentruotos ir įterptos į uracilo auksotrofinį DH10BΔpyr kamieną, gauti transformantai išsėti ant M9 terpės su izocitoziniu. Po 4–5 dienų lėkštelėse augančios kolonijos palygintos su kontroliniu pQE70-Vcz vektoriumi transformuotų bakterijų kolonijomis.

Mutantinėmis plazmidėmis transformuotų kolonijų dydis toje pačioje lėkštelėje buvo įvairus. Stebimos ypač mažos kolonijos, kurios plazmidėje galimai turi mutacijas, sutrikdančias Vcz deaminazės aktyvumą, bei vidutinio dydžio kolonijos. Deja, jokie ryškūs skirtumai tarp mutantinių ir kontrolinę plazmidę turinčių bakterijų augimo nebuvo pastebėti. Šie rezultatai taip pat liudija apie pasirinktos efektyvesnių mutantų atrankos sistemos

trūkumus, kurie neleidžia visiškai eliminuoti nereikalingų ar nepakitusių funkcijos Vcz deaminazės variantų. Norint efektyviai atrinkti pakeistos funkcijos fermentus reikalinga griežta atrankos sistema, kurios šio fermento atveju sukurti nepavyko.

Be to, analizuotų pavienių aminorūgščių pokyčių gali nepakakti pagerinti Vcz fermento gebėjimo surišti izocitoziną bei efektyviau katalizuoti jo deaminimą. Nereikia atmesti galimybės, jog vertėtų vienu metu mutuoti kelias substrato surišimui svarbias aminorūgštis bei nustatyti aplinkines vietas aminorūgščių sekoje, galimai svarbias šiam procesui.

### **3.4. KANOS deaminazės aminorūgščių sekos analizė**

Paraleliai Vcz deaminazei šiame darbe nuspręsta išanalizuoti ir kitos anksčiau laboratorijoje aptiktos, tačiau detaliau nenagrinėtos, KANOS izocitozino/citozino deaminazės savybes. Šis fermentas įdomus tuo, jog, kaip ir Vcz izocitozino deaminazė, iš metagenominių bibliotekų buvo atrinktas naudojant substratą izocitoziną, tačiau tolimesni tyrimai parodė, kad citozinas taip pat yra KANOS deaminazės substratas. Pastebėjus šį dvigubą substratinį KANOS specifiškumą nuspręsta palyginti Vcz bei KANOS deaminazių savybes tarpusavyje, taip pat galimai nustatyti jų evoliucinius ryšius bei KANOS pritaikomumą vėžio genų terapijai.

Atlikus KANOS bei kitų laboratorijoje aptiktų deaminazių sekų analizę (Aučynaitė et al., 2018a) nustatyta, jog šis fermentas yra artimas klasikinei *E. coli* citozino deaminazei CodA (3.6 pav.). Nepaisant to, vertinant pirminius duomenis, panašu, jog KANOS izocitoziną deaminina efektyviau, nei tai galėtų daryti CodA sprendžiant iš literatūroje pateiktų pavyzdžių (Hall et al., 2011). Toks pastebėjimas paskatino išsiaiškinti, ar KANOS savybės atitinka literatūroje aprašytas CodA charakteristikas. Siekiant tai patikrinti pirmiausiai (naudojantis Clustal Omega (Sievers et al., 2011) bei ESPript (Robert and Gouet, 2014) platformomis) atliktas CodA bei KANOS aminorūgščių sekų suliginimas (3.8 pav.). Nors šių fermentų sekos nėra identiškos, CodA sekoje esančios aminorūgštys, formuojančios šio fermento aktyvųjį centrą (Ireton et al., 2002), sutampa su KANOS sekoje analogiškose vietose esančiomis aminorūgštimis.

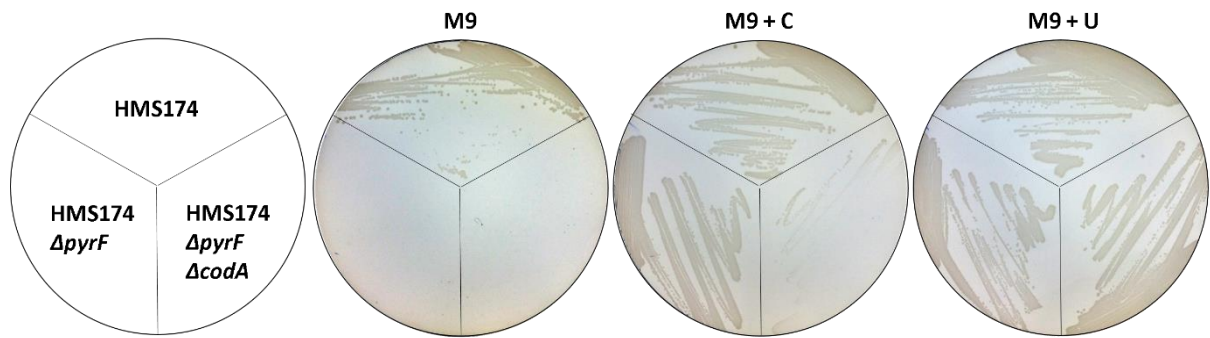




Vis dėlto, *E. coli* CodA bei *Cedecea* genties bakterijose (BLAST analizė, Altschul et al., 1990) randamos KANOS deaminazės sekų panašumai nesuteikia pakankamai informacijos apie šių fermentų ryšius. Jeigu KANOS deaminazė tikrai pasižymi geresnėmis savybėmis katalizuojant izocitozino ir 5-fluoroizocitozino deamininimą, tai leistų ją naudoti tolimesniuose vėžio genų terapijos tyrimuose kaip alternatyvą Vcz izocitozino deaminazei. Svarbu palyginti ir deaminazių gebėjimą katalizuoti citozino vertimą uracilu – jeigu KANOS fermentas pasižymi geresniu aktyvumu, jį būtų galima naudoti vietoje klasikinės citozino deaminazės CD/5-FC pora paremtame terapijos variante, kuris šiuo metu vis dar užima svarbią vietą tiriant vėžio gydymo būdus. Norint tai išsiaiškinti nuspręsta išsamiau išanalizuoti KANOS savybes bei įvertinti jos tinkamumą bei galimą panaudojimą vėžio genų terapijos tyrimuose.

### **3.5. *E. coli* HMS174 $\Delta$ *pyrF* $\Delta$ *codA* kamieno konstravimas**

Siekiant supaprastinti tolimesnę KANOS bei kitų deaminazių tyrimų eigą, nuspręsta sukonstruoti tokį bakterinį kamieną, kuris būtų tinkamas ne tik analizuojamų deaminazių poveikio augančioms kolonijoms stebėjimui ar įvairių DNR manipuliacijų atlikimui, bet ir leistų tiesiogiai vykdyti norimų rekombinantinių baltymų sintezę. Pirmiausiai buvo pasirinktas iškeltus kriterijus atitinkantis *E. coli* kamienas – HMS174. Kadangi naudojama deaminazių atrankos sistema reikalauja, jog bakterijose būtų sutrikdytas pirimidinų *de novo* biosintezės kelias, šiame kamiene esantis *pyrF* genas pasitelkiant homologinę rekombinaciją (žiūrėti 2.2.11. sk.) pakeistas atsparumą kanamicinui suteikiančia kasete. Tokiu būdu gautas HMS174 $\Delta$ *pyrF*::*kan* kamienas patikrintas atliekant PGR, nes šis pokytis nulemia ilgesnio PGR produkto susidarymą nei gausinant natyvų geną. Atsparumą kanamicinui suteikianti kasetė buvo pašalinta bakterijas transformuojant FLP rekombinazės raiškos vektoriumi (2.2.11. sk.) bei gautas HMS174 $\Delta$ *pyrF* kamienas taip pat patikrintas PGR metodu bei fenotipiškai (auginant ant terpės, turinčios bei neturinčios kanamicino). Analogiškai buvo pašalintas ir citozino deaminazę koduojantis genas *codA*, kuris galėtų trukdyti tolimesniuose eksperimentuose analizuojant KANOS deaminazės, gebančios katalizuoti ir citozino deamininimą, savybes. Galiausiai gauto HMS174 $\Delta$ *pyrF* $\Delta$ *codA* kamieno augimas lygintas su pirminiu (HMS174) bei tarpiniu (HMS174 $\Delta$ *pyrF*) kamienais išsėjant bakterijas ant M9 terpės (3.9 pav.).



**3.9 pav.** HMS174 $\Delta$ *pyrF $\Delta$ *codA* kamieno patikra. Palyginimui naudoti pirminis (HMS174) bei tarpinis (HMS174 $\Delta$ *pyrF*) kamienai. Bakterijos augintos ant minimalios terpės be substrato (M9), su citozinu (M9 + C) bei su uracilu (M9 + U, teigiama kontrolė).*

Dėl sutrikdyto pirimidinų *de novo* biosintezės kelio kolonijos neauga be uracilo, o pašalintas *codA* neleidžia bakterijoms katalizuoti citozino vartimo uracilu. Taip įsitikinta, jog sukonstruotas kamienas atitinka nusistatytus reikalavimus bei gali būti naudojamas tolimesniuose eksperimentuose.

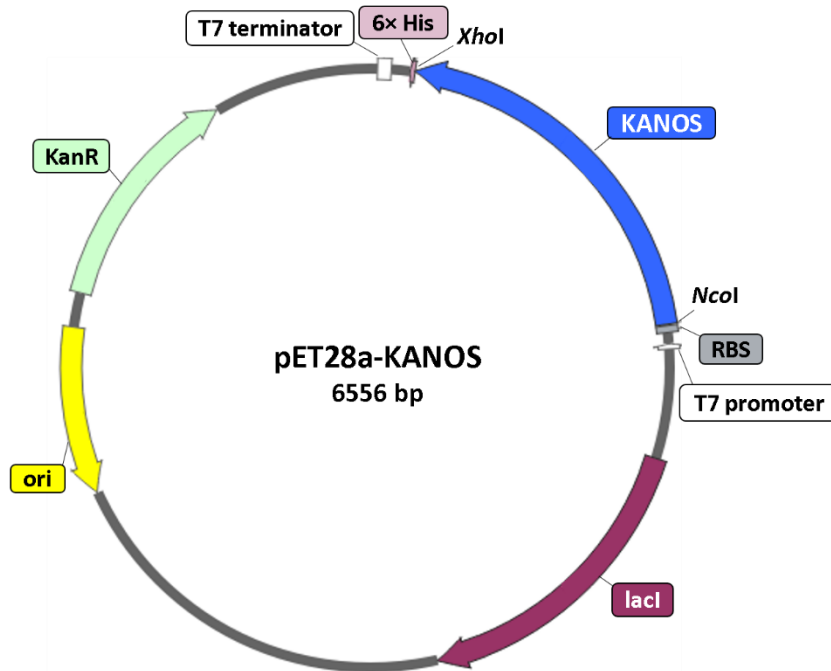
### 3.6. Plazmidinio vektoriaus pET28a-KANOS konstravimas

Tolimesnei KANOS izocitozino/citozino deaminazės analizei reikalingas vektorius pET28a-KANOS buvo sukonstruotas atliekant analogišką procedūrą kaip ir pQE70-Vcz vektoriaus konstravimo atveju (žiūrėti 3.1 poskyrį). KANOS geno DNR seka gauta PGR metodu, padauginant metagenominėje bibliotekoje aptiktą ją koduojantį geną. Naudoti specifiniai oligonukleotidų pradmenys (KANOS pET FW bei KANOS pET RV), DNR galuose sukuriantys *NcoI* bei *XhoI* restrikcijos endonukleazių (RE) atpažinimo sekas (3.10 pav.).



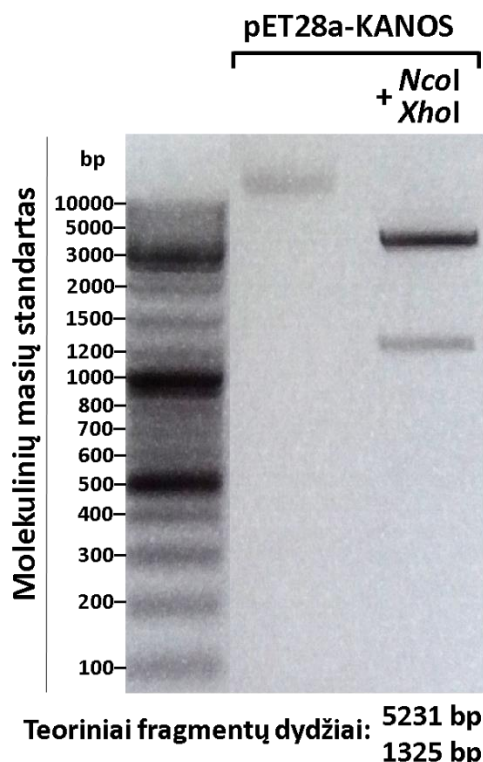
**3.10 pav.** KANOS izocitozino/citozino deaminazės geną koduojantis fragmentas iš KANOS metagenominės bibliotekos. Žaliai pažymėta KANOS deaminazė, pilkai – kita fragmente esanti dalinė geno seka, mėlynai – schematiškai pavaizduotos KANOS geno pagausinimui naudotų PGR pradmenų, turinčių RE atpažinimo sekas, prikibimo vietas.

PGR metodu pagausintas KANOS DNR fragmentas hidrolizuotas *NcoI* bei *XhoI* restriktazėmis, pET28a vektorius lygiagrečiai paveiktas tomis pačiomis RE. Po hidrolizės gauti produktai išvalyti nuo priemaišų (analogiškai 3.1 poskyryje pateiktam aprašymui) bei sujungti į bendrą konstruktą, kuris, tikėtina, atitinka 3.11 paveiksle pavaizduotą schemą.



**3.11 pav.** Vektoriaus pET28a-KANOS schema. KANOS – į vektorių įterptas KANOS deaminazės genas; ori – didelio kopijų skaičiaus plazmidžių ColE1/pMB1/pBR322/pUC replikacijos pradžios seka; RBS – stipri bakterinė ribosomos prisijungimo vieta; 6× His – šešių histidinių žymė; *NcoI*, *XhoI* – restrikcijos endonukleazių sekos, per kurias į vektorių įterptas KANOS genas; KanR – atsparumo kanamicinui genas; lacI – lac represorius; T7 promoter – promotorius T7 bakteriofago RNR polimerazei; T7 terminator – transkripcijos terminacijos seka T7 bakteriofago RNR polimerazei.

Ant agarizuotos LB terpės su antibiotiku kanamicinu užaugusioms šiuo konstruktu transformuotų bakterijų kolonijoms atliekama patikra. Pirmiausia naudojant įterptą fragmentą apsupančius pradmenis (T7 promoter ir T7 terminator) atlikta PGR, iš reikiamo dydžio fragmentą turinčių kolonijų išskirta plazmidinė DNR bei gauti konstruktai patikrinti atliekant restrikcinę analizę (3.12 pav.).



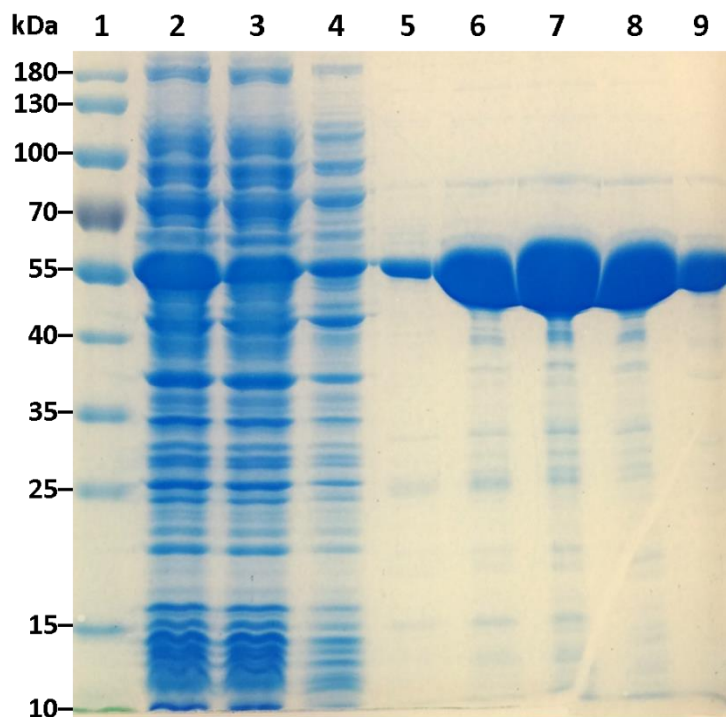
**3.12 pav.** Plazmidinio vektoriaus pET28a-KANOS restrikcinė analizė (Molekulinių masių standartas: „GeneRuler DNA Ladder Mix“, #SM0333, Thermo Scientific).

Plazmidės hidrolizavus *NcoI* bei *XhoI* RE gauti fragmentai, elektroforetiškai išskirstyti 1 % agarozės gelyje, atitiko teorinius dydžius (5231 bp ir 1325 bp). Taip patvirtinus, jog vektorių konstravimas atliktas sėkmingai, gauti konstruktai pateikti sekoskaitai. Atlikus sekoskaitą įsitikinta, jog pET28a-KANOS seka atitinka teorinę.

### **3.7. Rekombinantinės KANOS deaminazės gryninimas bei substratinio specifiškumo tyrimai**

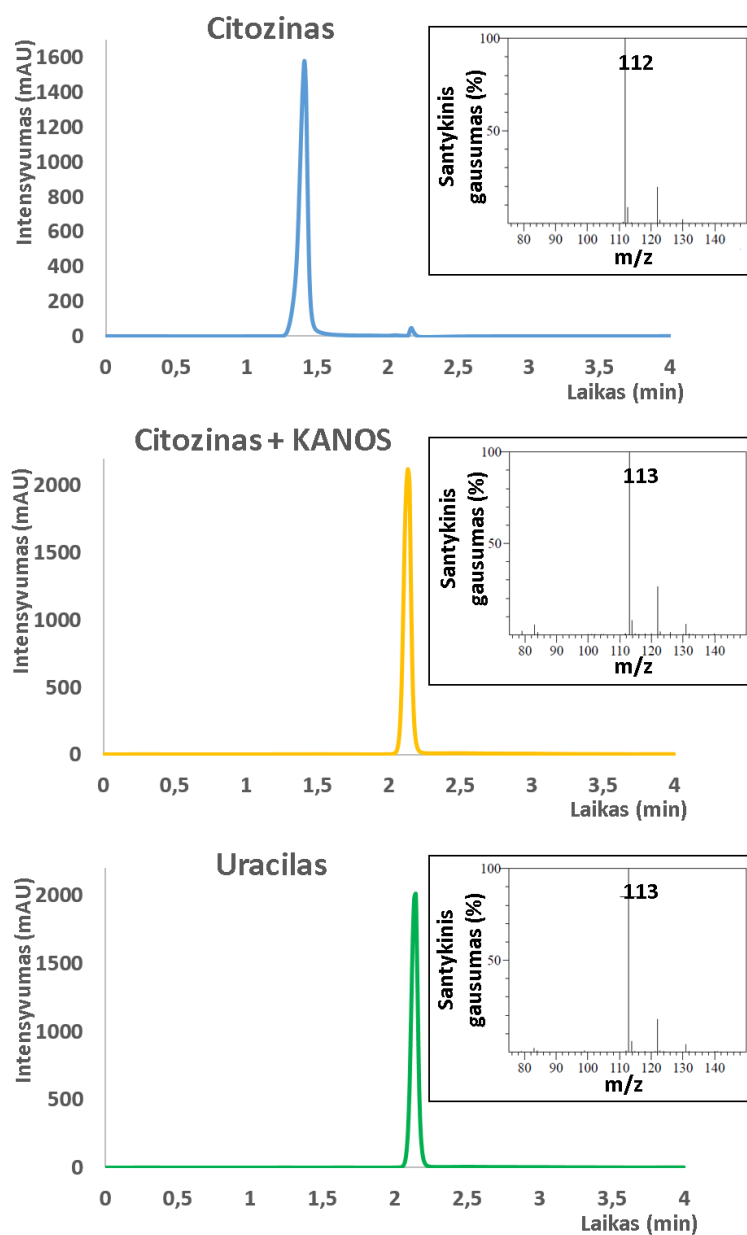
Siekiant išsamiai išanalizuoti KANOS deaminazės katalizines savybes bei įvertinti galimą substratų spektrą, nuspręsta šį fermentą išgryninti. Pirmiausiai pET28a-KANOS plazmidine DNR transformuotas HMS174 $\Delta$ *pyrF* $\Delta$ *codA* kamienas. Gauti transformantai auginti dideliame kiekyje LB terpės ir po tam tikro laiko (žiūrėti 2.2.12. sk.) juose indukuota KANOS geno raiška. Bakterijų susintetintas KANOS baltymas išgrynintas iš ląstelių biomasės metalų chelatinės giminingumo (afininės) chromatografijos metodu (žr. 2.2.14. sk.) pasinaudojant prie C galinės baltymo dalies esančia 6 $\times$  His žyme. Gryninimo sėkmingumas

patikrintas atliekant baltymų elektroforezę (3.13 pav.). Elektroforezės gelyje matomas iš ląstelių lizatų (3.13 pav., 2 takelis) išgrynintas ~50 kDa (teorinis dydis: 48,095 kDa) masės tikslinis KANOS baltymas (3.13 pav., 5–9 takeliai).



**3.13 pav.** KANOS baltymo gryninimo analizė baltymų elektroforezės metodu. Paveiksle pavaizduoti gryninimo žingsnius atitinkantys mėginiai (1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific; 2: ląstelių lizatas; 3, 4: prie kolonėlės nesijungiančių baltymų frakcijos; 5–9: tikslinio KANOS baltymo frakcijos).

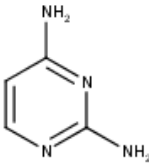
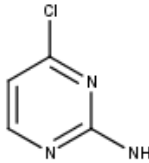
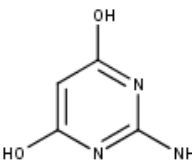
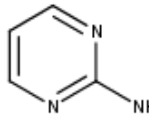
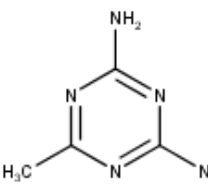
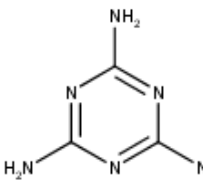
Išgryninus KANOS baltymą, atliktas substratinio specifiškumo tyrimas (2.2.17. sk.), leidžiantis įsitikinti, jog gautas rekombinantinis baltymas yra aktyvus, bei įvertinti galimus šio fermento substratus. Rekombinantinė KANOS deaminazė inkubuota *in vitro* su šiais junginiais: citozinu, izocitozinu, 5-fluorocitozinu bei 5-fluoroizocitozinu. Reakcijų produktai analizuoti HPLS-MS metodu. Gauti rezultatai parodė, jog KANOS efektyviai skaido citoziną (3.14 pav.) bei izocitoziną (priedai, 1.1 pav.) iki uracilo, bei 5-fluorocitoziną (priedai, 1.2 pav.) iki 5-fluorouracilo. Nustatyta, kad 5-fluoroizocitozinas taip pat yra KANOS substratas (priedai, 1.3 pav.), tačiau reakcija vyksta ne taip greitai, kaip anksčiau paminėtų junginių atveju.



**3.14 pav.** UV chromatogramos bei MS spektrai, atitinkantys substrato citozino (mėlynas), KANOS fermentinės reakcijos mišinio (geltonas) bei produkto uracilo (žalias) pikus. MS spektrai (m/z) atitinka  $[M+H]^+$  molekulių jonų aptikimą.

KANOS deaminazės substratinis specifiškumas buvo patikrintas naudojant ir kitus junginius, pateiktus 3.1 lentelėje. Kadangi šie substratai struktūriškai panašūs į pirimidinus, tikėtina, jog KANOS deaminazė taip pat galėtų juos skaidyti. Tačiau išanalizavus HPLC-MS duomenis nei viename reakcijos mišinyje nebuvo pastebėti jokie reikšmingi pokyčiai.

**3.1 lentelė.** Junginiai, tikrinti kaip galimi KANOS deaminazės substratai

Substratas	Struktūra	Aktyvumas
2,4-Diaminopirimidinas		Neaptiktas
2-amino-4-chloropirimidinas		Neaptiktas
2-amino-4,6-dihidropirimidinas		Neaptiktas
2-aminopirimidinas		Neaptiktas
6-metil-1,3,5-triazino-2,4-diaminas		Neaptiktas
Melaminas		Neaptiktas

Vis dėlto, gauti rezultatai patvirtina, jog išgrynintas KANOS baltymas yra aktyvus. Šio fermento gebėjimas katalizuoti ne tik citozino bei izocitozino vartimą uracilu, bet ir 5-fluorocitozino bei 5-fluoroizocitozino konversiją į plačiai naudojamą chemoterapinį vaistą 5-fluorouracilą leidžia manyti, jog KANOS deaminazė gali būti pritaikyta vėžio genų terapijoje.

### 3.8. Rekombinantinės KANOS deaminazės fermentinio aktyvumo matavimai

Siekiant įvertinti KANOS efektyvumą deamininant citoziną bei izocitoziną atlikti šio fermento aktyvumo matavimai. Paruošus substratų bei KANOS reakcijų mišinius spektrofotometriškai prie atitinkamo bangos ilgio (žiūrėti 2.2.19. sk.) stebėtas absorbcijos pokytis laiko atžvilgiu: mažėjanti absorbcija nurodo reakcijos mišinyje bėgant laikui mažėjantį substrato citozino/izocitozino kiekį, kuris KANOS deaminazės yra verčiamas į uracilą. Gauti duomenys leidžia apskaičiuoti kinetinius fermento parametrus:  $k_{cat}$  – substrato molekulių, kurias kiekvienas fermento aktyvusis centras paverčia į produktą, skaičių per laiko vienetą,  $K_M$  – substrato koncentraciją, leidžiančią fermentui pasiekti pusę  $V_{max}$  (didžiausią reakcijos greitį, kuomet fermentas yra prisotintas substratu) bei  $k_{cat}/K_M$  – katalizinį efektyvumą. Nustatyti parametrai, pateikti 3.2 lentelėje, palyginti su klasikinės citozino deaminazės CodA (Hall et al., 2011) bei Vcz izocitozino deaminazės (Aučynaitė et al., 2018a) charakteristikomis.

3.2 lentelė. Kinetiniai CodA, KANOS bei Vcz deaminazių parametrai.

Fermentas	Substratas	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_M$ (mM)	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )
CodA	citozinas	$132 \pm 2$	$0,97 \pm 0,03$	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^5$
CodA	izocitozinas	$5,1 \pm 0,1$	$0,46 \pm 0,04$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^4$
KANOS	citozinas	$13,16 \pm 0,29$	$0,18 \pm 0,01$	$(7,3 \pm 0,4) \times 10^4$
KANOS	izocitozinas	$5,04 \pm 0,25$	$0,31 \pm 0,03$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^4$
Vcz	izocitozinas	$1,64 \pm 0,06$	$1,86 \pm 0,05$	$(8,8 \pm 0,3) \times 10^2$

Gauti rezultatai parodė, jog KANOS bei CodA fermentinis aktyvumas skiriasi. Nors citoziną CodA deaminina ~2 kartus geriau, tačiau KANOS pasižymi geresniu efektyvumu izocitozino atžvilgiu – ~1,5 karto lyginant su CodA ir net ~18 kartų lyginat su Vcz. Šie duomenys įrodo, jog, nepaisant KANOS ir CodA sekų panašumo bei aktyviajam centrui svarbių aminorūgščių visiško sutapimo, fermentai nėra vienodi.

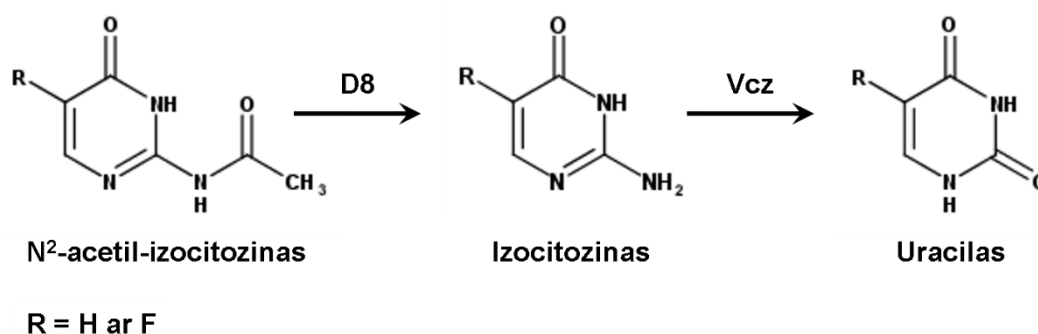


Rezultatai patvirtina, jog KANOS deaminazė yra tinkamas objektas tolimesniems tyrimams. Sukūrus efektyvią atrankos sistemą būtų galima pagerinti šio fermento kinetinius parametrus citozino, izocitozino ir fluorintų jų variantų atžvilgiu. Geresnėmis savybėmis pasižymintis KANOS, tikėtina, įgautų pritaikomumą vėžio genų terapijoje. Vis dėlto, KANOS aktyvumas deamininant 5-fluoroizocitoziną yra daug žemesnis lyginant su Vcz deaminaze, kuri šiuo metu tolimesniems mūsų tyrimams yra tinkamesnis variantas.

### 3.9. Dviejų fermentų-vieno provaisto sistemos analizė

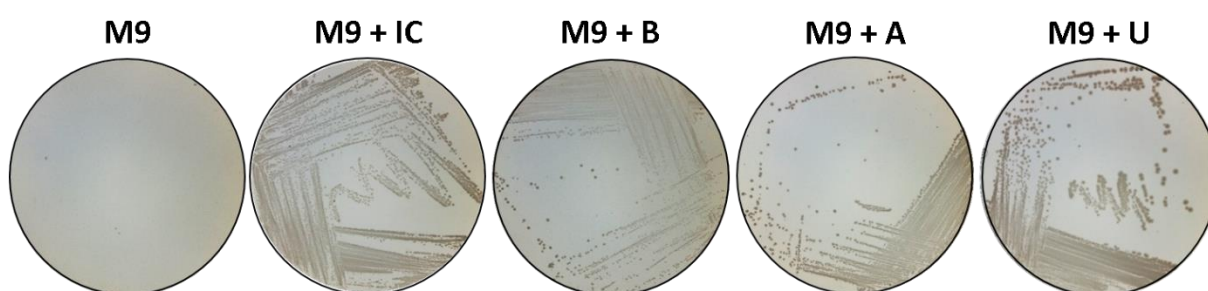
Nors Vcz izocitozino deaminazės kinetinių parametrų pagerinti nepavyko dėl 3.3. poskyryje paminėtų priežasčių, šio fermento panaudojimas fermento-provaisto terapijoje visgi yra daug žadantis. Manome, jog šio tipo vėžio gydymo strategija būtų dar efektyvesnė, jeigu kaip provaistą būtų galima panaudoti specifiškesnį junginį. Tikėtina, jog sudėtingesnės struktūros medžiaga gamtoje nėra paplitusi, kaip ir fermentai, galintys katalizuoti tokio substrato pokyčius tiesiogiai iki terapijoje naudojamos vaisto molekulės. Taip gydymo metu atsirandantis šalutinis poveikis organizmui gali būti sumažintas iki minimalios ribos.

Viena iš idėjų, leidžianti patobulinti vėžio genų terapiją, yra sudėtingesnio substrato pritaikymas, kurio konversijai iki uracilo (ar 5-fluorouracilo) reikėtų dviejų fermentų. Tyrimo metu, kartu su Vcz izocitozino deaminaze, nuspręsta panaudoti D8 amidohidrolazę. Tai metagenominėje bibliotekoje aptiktas fermentas (Urbelienė et al., 2019; nepublikuota), kaip substratą naudojantis  $N^4$ -benzoil-2'-deoksicitidiną, kurį verčia į deoksicitidiną. Geriau išanalizavus fermentą pastebėta, jog  $N^2$ -acetil-izocitozinas (ar 5-fluoro- $N^2$ -acetilizocitozinas) taip pat yra jo substratas. D8 amidohidrolazė katalizuoja šio junginio deacilinimą, po kurio gaunamas izocitozinas – Vcz deaminazės substratas (3.15 pav.). Kartu veikiant Vcz bei D8 fermentams iš provaisto 5-fluoro- $N^2$ -acetilizocitozino chemoterapinį vaistą 5-fluorouracilą galima gauti kur kas kompleksiškesniu būdu.



**3.15 pav.** Vcz ir D8 fermentų katalizuojamų reakcijų schema.

Siekiant patikrinti, ar Vcz bei D8 gali veikti kartu, HMS174 $\Delta$ pyrF $\Delta$ codA kamienas transformuotas anksčiau laboratorijoje sukonstruotais pET28a-Vcz (Aučynaitė et al., 2018a) bei pLATE31-D8 (Urbelienė et al., 2019; nepublikuota) vektoriais, atitinkamai koduojančiais aktyvius Vcz bei D8 fermentus. Bakterijos išsėtos ant M9 terpės su substratais: izocitozinu, N<sup>4</sup>-benzoi-2'-deoksicitidinu bei N<sup>2</sup>-acetil-izocitozinu (3.16 pav.). Vcz deaminazė izocitoziną verčia uracilu, dėl ko bakterijos geba augti terpėje esant izocitozino; D8 amidohidrolazė N<sup>4</sup>-benzoi-2'-deoksicitidiną verčia deoksicitidinu, kuris dėl aktyvaus citidino deaminazės *cdd* geno bakterijų genome gali būti naudojamas kaip uracilo šaltinis; lėkštelėje su N<sup>2</sup>-acetil-izocitozinu augančios kolonijos parodo, jog veikiant fermentams kartu uracilas gali būti gaunamas iš N<sup>2</sup>-acetil-izocitozino.



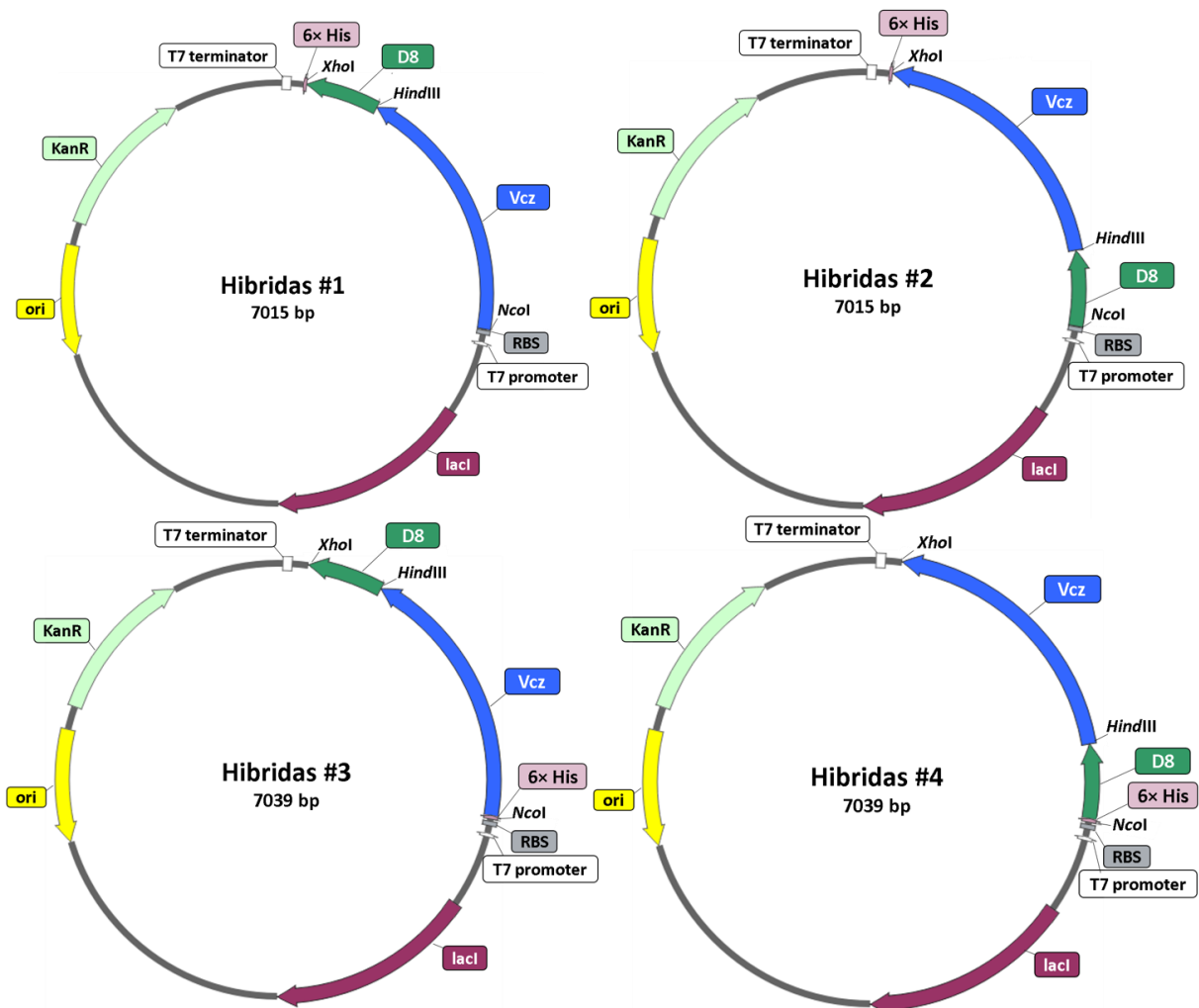
**3.16 pav.** Vcz bei D8 fermentus koduojančiais vektoriais transformuotų bakterijų augimo patikra. Bakterijos augintos ant minimalios terpės be substrato (M9), su izocitozinu (M9 + IC), su N<sup>4</sup>-benzoi-2'-deoksicitidinu (M9 + B), su N<sup>2</sup>-acetil-izocitozinu (M9 + A) bei su uracilu (M9 + U, teigiama kontrolė).

Gauti rezultatai patvirtina, jog vienu metu veikiantys du skirtingi fermentai – Vcz bei D8 – gali pagaminti produktą uracilą iš specifiškesnio substrato. Šios reakcijos sėkmingumas

atskleidžia dviejų fermentų-vieno provaisto terapijos potencialą vėžio gydyme. Tačiau atsiranda papildoma problema – vietoje vieno fermento į vėžines ląsteles ar jų aplinką reikia nugabenti du. Norint to išvengti galima sukonstruoti hibridinį baltymą – Vcz ir D8 fermentus koduojančius genus sujungti į bendrą konstrukta išlaikant abiejų fermentų aktyvumus.

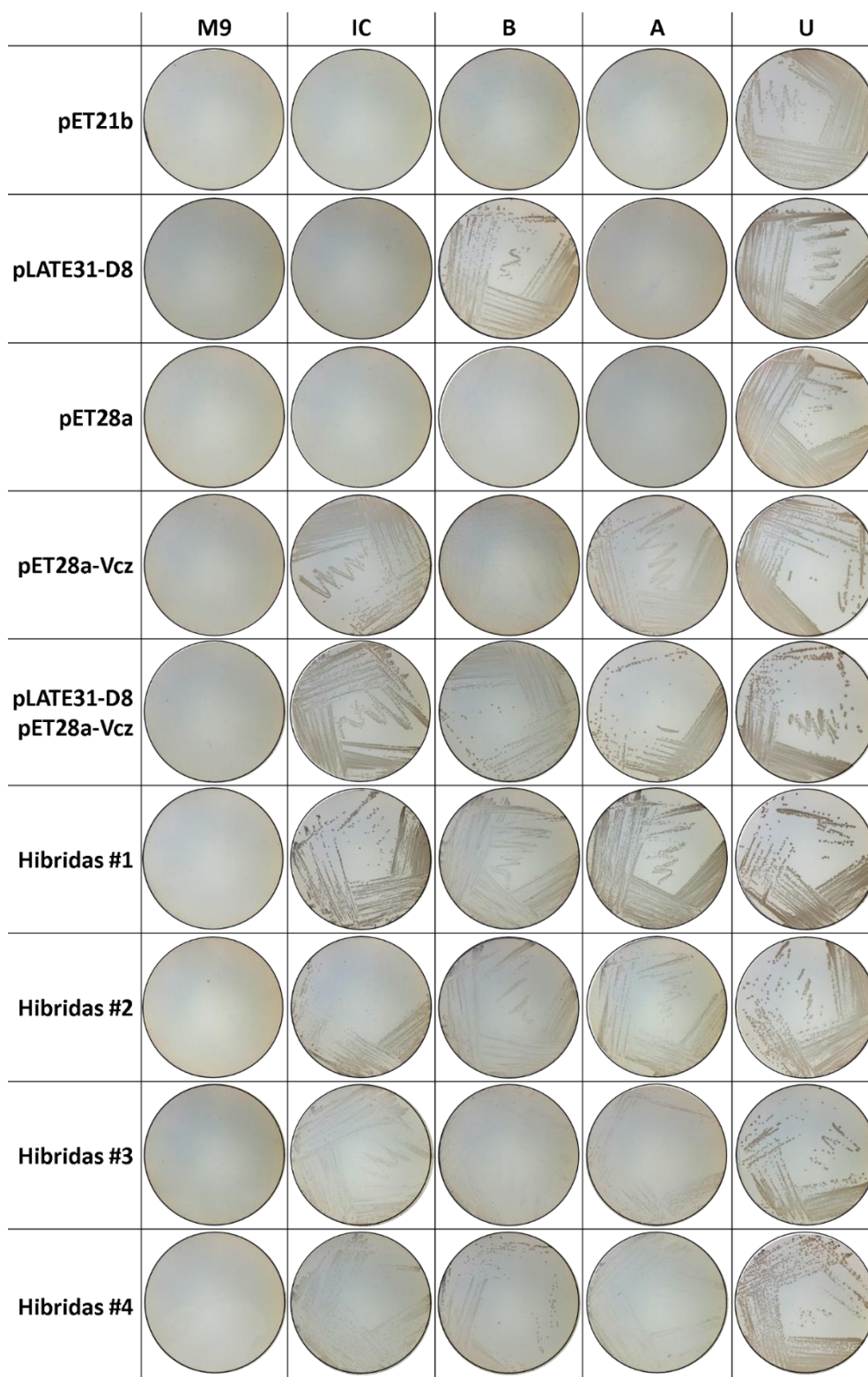
### **3.10. Plazmidinių vektorių, koduojančių Vcz-D8 baltymų hibridus, kūrimas**

Tolimesniems Vcz ir D8 dviejų fermentų-vieno provaisto strategijos tyrimams nuspręsta sukurti 4 konstruktus, besiskiriančius šiuos fermentus koduojančių genų bei 6 histidinių žymės padėtimi vektoriuje. Skirtingi variantai konstruojami siekiant išvengti ateityje galimai iškiliančių sunkumų gryninant hibridus, taip pat genų padėtis gali turėti įtakos teisingam baltymų susilankstymui. Pirmiausiai vektoriai buvo virtualiai sukonstruoti naudojantis „Benchling“ platforma į pET28a plazmidę paeilui įterpiant Vcz bei D8 (ir atvirkščiai) genus bei numatant 6× His žymes hibridų N ir C galuose. Vcz bei D8 genai atskirti 4 aminorūgščių ilgio jungtuku, kurį sudaro 3 glicinai ir 1 serinas (Gly-Gly-Gly-Ser). Tokiame intarpe esančios mažos aminorūgštys užtikrina struktūrų lankstumą, kuris padidina teisingos baltymų konformacijos susidarymo bei sąveikos su substratais tikimybę (Chen et al., 2013). Taip gauti 4 teoriniai vektorių modeliai: pET28a-Vcz-D8-His (toliau hibridas #1), pET28a-D8-Vcz-His (hibridas #2), pET28a-His-Vcz-D8 (hibridas #3) bei pET28a-His-D8-Vcz (hibridas #4). Toliau darbas buvo vykdomas pagal 2.2.7. skyrelyje aprašytą metodiką. Vcz bei D8 genų DNR sekos gautos PGR metodu naudojant specifinius oligonukleotidų pradmenis, DNR galuose sukuriančius atitinkamas restrikcijos endonukleazių (RE) atpažinimo sekas (bei jungtuką vieno iš genų 3' gale). Pagausinti fragmentai ir vektorius hidrolizuoti restriktazėmis bei vienas po kito sujungti į bendrus konstruktus, atitinkančius 3.17 paveiksle pavaizduotas schemas.



**3.17 pav.** Vcz ir D8 baltymų hibridus koduojančių vektorių schemas. Vcz ir D8 – į vektorių įterptų Vcz izocitozino deaminazės ir D8 amidohidrolazės genai; ori – didelio kopijų skaičiaus plazmidžių Cole1/pMB1/pBR322/pUC replikacijos pradžios seka; RBS – stipri bakterinė ribosomos prisijungimo vieta; 6× His – šešių histidinių žymė; *NcoI*, *HindIII*, *XhoI* – restrikcijos endonukleazių sekos, per kurias į vektorių įterpti Vcz bei D8 genai; KanR – atsparumo kanamicinui genas; *lacI* – lac represorius; T7 promoter – promotorius T7 bakteriofago RNR polimerazei; T7 terminator – transkripcijos terminacijos seka T7 bakteriofago RNR polimerazei.

Atlikus restrikcinę analizę bei konstruktų sekas pateikus sekoskaitai įsitikinta, jog vektorių konstravimas atliktas sėkmingai. Toliau siekiant nustatyti, ar į vektorius įterpti Vcz bei D8 fermentų genai atlieka savo funkciją, gautos konstrukcijos transformuotos į HMS174Δ*pyrF*Δ*codA* kamieną. Bakterijas išsėjus ant M9 terpės su skirtingais galimais uracilo šaltiniais (3.18 pav.) stebėtas bei tarpusavyje lygintas kolonijų gebėjimas augti tokioje terpėje.

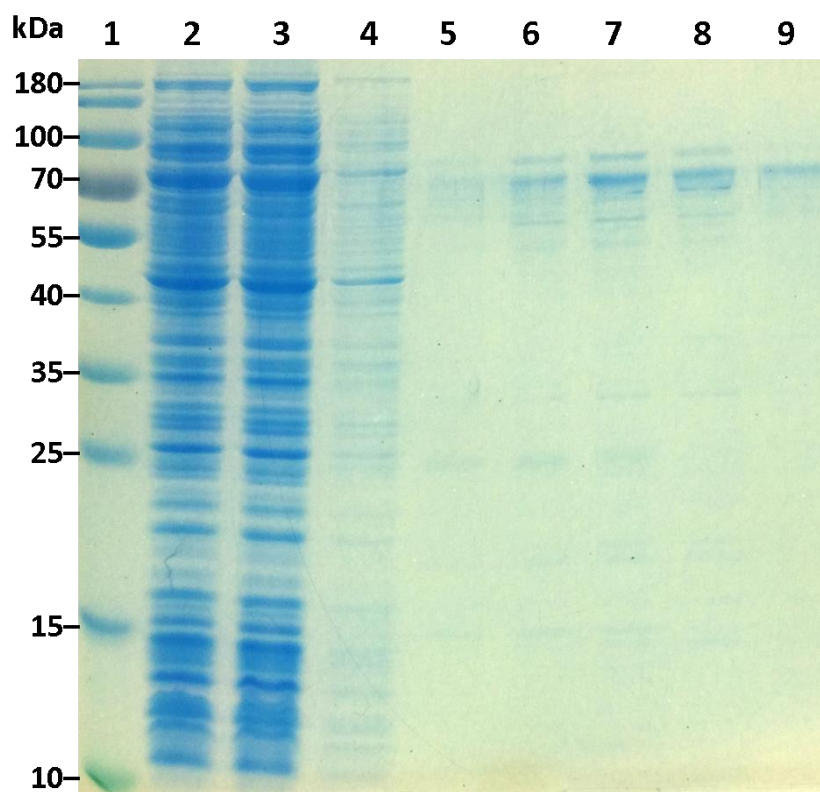


**3.18 pav.** Hibridų poveikio bakterijų augimui tyrimas. pET21b – neigiama kontrolė D8 fermentui; pLATE31-D8 – teigiama kontrolė hibriduose esančiam D8 fermentui; pET28a – neigiama kontrolė Vcz fermentui; pET28a-Vcz – teigiama kontrolė hibriduose esančiam Vcz fermentui; pLATE31-D8 pET28a-Vcz – teigiama kontrolė hibridams. Bakterijos augintos ant minimalios terpės be substrato (M9), su izocitoziniu (M9 + IC), su  $N^4$ -benzoiil-2'-deoksicitidinu (M9 + B), su  $N^2$ -acetil-izocitoziniu (M9 + A) bei su uracilu (M9 + U, teigiama kontrolė).

Rezultatai parodė, jog visuose 4 hibridiniuose konstruktuose koduojamos ir Vcz izocitozino deaminazės, ir D8 amidohidrolazės yra aktyvios *in vivo*. Tai rodo bakterijų gebėjimas augti ant izocitozino bei  $N^4$ -benzoil-2'-deoksicitidino atskirai vertinant Vcz ir D8 aktyvumus, bei  $N^2$ -acetil-izocitozino vertinant fermentų poveikį kartu. Lyginant konstruktus tarpusavyje, geriausiai auga bakterijos, turinčios hibridą #1 – augimas panašus kaip teigiamos kontrolės (bakterijų, transformuotų pET28a-Vcz bei pLATE31-D8 kartu). Šie skirtumai įrodo, jog fermentus koduojančių genų padėtis konstrukte yra svarbi bei turi įtakos jų aktyvumui. Svarbu pabrėžti, jog pET28a-Vcz kontrolinį vektorių turinčios bakterijos taip pat gali augti ant  $N^2$ -acetil-izocitozino. Taip yra todėl, kad mūsų turimas substratas turi šiek tiek izocitozino priemaišų. Nepaisant to, stebimas augimas yra kur kas silpnesnis lyginant su teigiama hibridų kontrole ar hibridu #1, tačiau likusius hibridus reikėtų vertinti atsargiai. Norint gauti tikslesnius rezultatus reikėtų išgryninti rekombinantinius hibridinius baltymus, patikrinti jų aktyvumą *in vitro* bei palyginti gautus duomenis su šiais rezultatais.

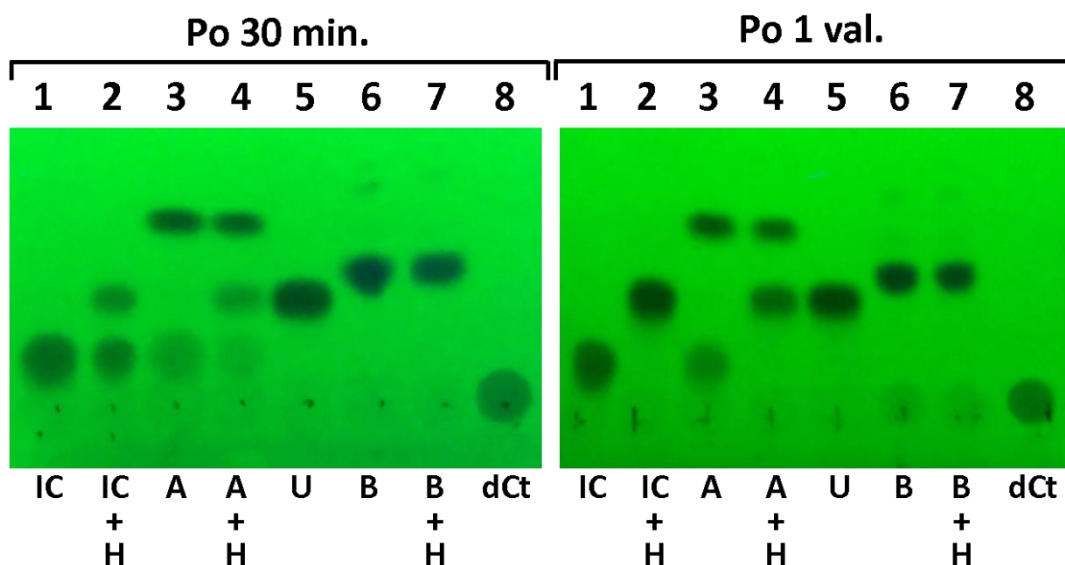
### **3.11. Rekombinantinio Vcz-D8 baltymo gryninimas bei fermentinio aktyvumo analizė**

Aktyvaus Vcz-D8 baltymo gryninimui nuspręsta pasirinkti hibridą #1, parodžiusį geriausius rezultatus analizuojant konstrukto poveikį bakterijų augimui. Šiuo hibridu transformuotos HMS174 $\Delta$ pyrF $\Delta$ codA bakterijos augintos dideliame kiekyje LB terpės, jose indukuota Vcz-D8 geno raiška ir iš ląstelių biomasės šis baltymas išgrynintas metalų chelatinės giminingumo (afininės) chromatografijos metodu pasinaudojant prie C galinės baltymo dalies esančia 6 $\times$  His žyme. Gryninimo sėkmingumas patikrintas atliekant baltymų elektroforezę (3.19 pav.). Elektroforezės gelyje matomas iš ląstelių lizatų (3.19 pav., 2 takelis) išgrynintas ~65 kDa (teorinis dydis: 65,491 kDa) masės tikslinis Vcz-D8 baltymas (3.19 pav, 5–9 takeliai).



**3.19 pav.** Vcz-D8 baltymo gryninimo analizė baltymų elektroforezės metodu. Paveiksle pavaizduoti gryninimo žingsnius atitinkantys mėginiai (1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific; 2: ląstelių lizatas; 3, 4: prie kolonėlės nesijungiančių baltymų frakcijos; 5–9: tikslinio Vcz-D8 baltymo frakcijos).

Nors išgryninto Vcz-D8 baltymo kiekis yra nedidelis bei gryninimas nebuvo ypatingai efektyvus, gautos koncentracijos visiškai užtenka šio rekombinantinio baltymo fermentinio aktyvumo patikrinimui. Siekiant įsitikinti, jog gautas baltymas atlieka savo funkciją, atliktas substratinio specifškumo testas. Rekombinantinis Vcz-D8 fermentas inkubuotas *in vitro* su substratais (koncentracijos nurodytos 2.2.17 sk.): izocitozinu,  $N^4$ -benzoil-2'-deoksicitidinu bei  $N^2$ -acetil-izocitozinu. Reakcijų produktai analizuoti plonasluoksnės chromatografijos metodu vizualizuojant plokštelę UV šviesoje (3.20 pav.).



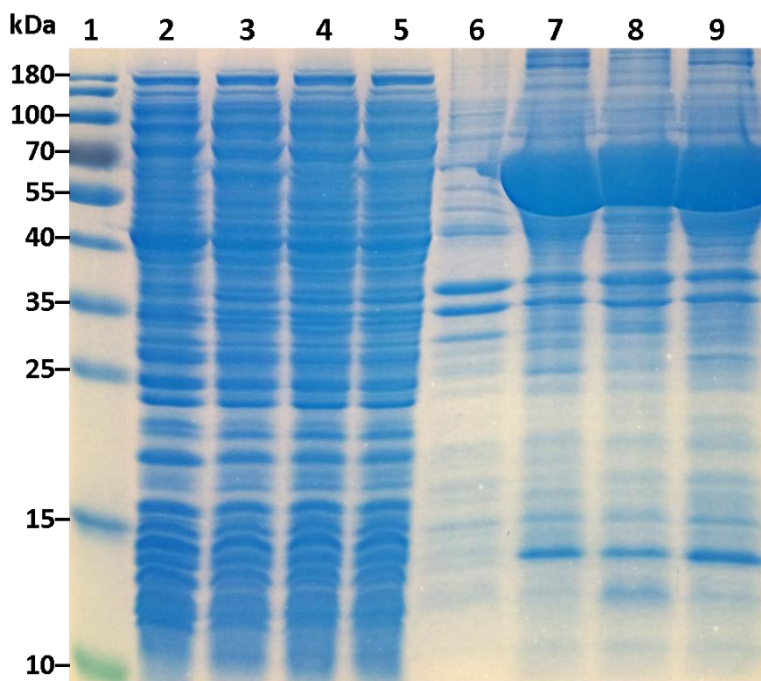
**3.20 pav.** Hibridinio baltymo Vcz-D8 aktyvumo tyrimas (plonasluoksni chromatografija). 1: izocitozinas (IC); 2: izocitozinas su Vcz-D8 fermentu (IC + H); 3:  $N^2$ -acetil-izocitozinas (A); 4:  $N^2$ -acetil-izocitozinas su Vcz-D8 fermentu (A + H); 5: uracilas (U); 6:  $N^4$ -benzoil-2'-deoksicitidinas (B); 7:  $N^4$ -benzoil-2'-deoksicitidinas su Vcz-D8 fermentu (B + H); 8: deoksicitidinas (dCt).

Plokštelių vaizdinimas parodė, jog hibridinis Vcz-D8 fermentas sėkmingai izocitoziną verčia uracilu (2 takelis). Tai įrodo, jog hibride esanti Vcz izocitozino deaminazė po baltymų sujungimo išlaikė savo aktyvumą. Priešingai, D8 amidohidrolazė neverčia  $N^4$ -benzoil-2'-deoksicitidino į deoksicitidiną (7 takelis).  $N^2$ -acetil-izocitozino atveju susidaro nedidelis kiekis uracilo (4 takelis), tačiau tik tiek, kiek substrate yra matoma izocitozino priemaišų (3 takelis), kas tik dar kartą įrodo Vcz deaminazės aktyvumą. Lyginant šią analizę kartu su hibridų poveikio bakterijų augimui tyrimu (3.18 pav.) sunku pasakyti, kodėl D8 amidohidrolazė prarado aktyvumą *in vitro*. Tam tikri pokyčiai greičiausiai įvyksta gryninimo metu. Viena iš išeičių – panaudoti ilgesnį jungtuką, dėl kurio galimai padidėtų teisingo baltymo susilankstymo tikimybė bei jo stabilumas. Tokiu būdu galbūt pavyktų išlaikyti abiejų baltymų aktyvumus.

Toliau nuspręsta patikrinti ir kitus likusius hibridus – nors poveikio bakterijų augimui tyrime jie pasižymėjo silpnesniu aktyvumu, tačiau, kaip pastebėjome analizuojant hibridą #1, *in vivo* ir *in vitro* tyrimų rezultatai skiriasi. Taip pat manome, jog skirtinga baltymus koduojančių genų padėtis vektoriuje turi įtakos jų stabilumui bei, galimai, aktyvumui. Analogiškai hibridui #1, hibridais #2, #3 ir #4 transformuotose HMS174 $\Delta$ pyrF $\Delta$ codA bakterijose indukuota Vcz-D8 geno raiška. Ultragarso suardžius gautą



ląstelių biomasę indukcija patikrinta atliekant baltymų elektroforezę (3.21 pav.). Elektroforezės gelyje matomas gausus Vcz-D8 baltymo kiekis ląstelių nuosėdose (3.21 pav. 7–9 takeliai), tačiau tirpiose frakcijose jo aptikti nepavyko (3.21 pav. 3–5 takeliai).



**3.21 pav.** Vcz-D8 baltymo indukcijos analizė baltymų elektroforezės metodu. 2–5 takelyje – tirpios frakcijos, 6–9 takelyje – ląstelių nuosėdos. 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 2, 6: tuščiu vektoriumi pET28a transformuotų bakterijų mėginiai (kontrolė); 3; 7: hibridas #2; 4, 8: hibridas #3; 5, 9: hibridas #4.

Rezultatai patvirtina, jog hibridinių Vcz-D8 genų raiška bakterijose vyksta, tačiau pagamintas baltymas yra netirpus. Siekiant hibridus gauti tirpiose frakcijose išmėgintos kelios skirtingos sąlygos, keičiant induktoriaus IPTG kiekį, indukcijos trukmę bei temperatūrą, tačiau visais atvejais gauti duomenys buvo panašūs. Nepaisant to, įsitikinta, jog naudojant tokio tipo konstrukcijas įmanoma susintetinti sulietą baltymą, kuris išlaiko abiejų komponentų aktyvumus *in vivo*.

Apibendrinant, šiame darbe atlikti tyrimai parodė, jog analizuotos Vcz ir KANOS deaminazės gali būti pritaikytos tikslinėje vėžio terapijoje. Nors Vcz izocitozino deaminazės kinetinių parametrų pagerinti nepavyko, įrodėme, jog pasitelkti fermentų evoliucijos *in vitro* metodai yra veiksmingi. Panašus tyrimas buvo atliktas ir su klasikine *E. coli* citozino deaminaze – aspartatą 314 baltymo pozicijoje pakeitus alaninu mutantinio fermento aktyvumas deamininant provaistą 5-fluorocitoziną padidėjo 2 kartus, ko užtenka, jog šis

fermento variantas būtų tinkamesnis genų terapijai (Mahan et al., 2004b). Vcz deaminazės atveju, sukūrus tinkamą atrankos sistemą arba nustačius substrato atpažinimui svarbias aminorūgštis, geresnėmis savybėmis pasižyminti Vcz deaminazė būtų nesunkiai atrinkta. Pagerintos Vcz deaminazės ir 5-FiC fermento-provaisto pora leistų sumažinti toksišką poveikį visam organizmui, patiriamą taikant CD/5-FC pora paremtą gydymo būdą (Malekshah et al., 2016). Taip pat šiame darbe buvo įvertintos ir niekur kitur neanalizuotos KANOS deaminazės savybės. Įrodyta, jog nepaisant sekų panašumo, KANOS kinetiniai parametrai deamininant izocitoziną yra geresni lyginant su klasikine *E. coli* citozino deaminaze CodA. Šis pranašumas leidžia tikėtis, jog KANOS, sėkmingai modifikavus kinetinius parametrus, kaip ir Vcz deaminazė galėtų būti panaudota izocitozino deaminazės/5-FiC poroje. Vis dėlto, nustatytas KANOS aktyvumas 5-FiC atžvilgiu šiuo metu yra per mažas ir Vcz deaminazė yra kur kas tinkamesnė tolimesniems tyrimams. Galiausiai šiame darbe buvo sukurta hibridinė Vcz izocitozino deaminazės ir D8 amidohidrolazės fermentų sistema, leidžianti chemoterapinį vaistą 5-FU gauti atliekant dviejų žingsnių reakciją iš kompleksiškesnio junginio  $N^2$ -acetil-izocitozino, kuris, tikėtina, gamtoje nėra paplitęs. Su panašaus tipo provaistu kapecitabinu, kurio vertimą 5-FU katalizuoja net 3 fermentai, jau gana ilgą laiką sėkmingai atliekami klinikiniai tyrimai (Dooley and Goa, 1999). Tolimesnė Vcz-D8 hibridų analizė leistų sukurti efektyvesnę vėžio gydymo strategiją, padėsiančią sumažinti ar net visiškai pašalinti fermento-provaisto terapijos metu patiriamus šalutinius poveikius.

## IŠVADOS

1. Atlikus atsitiktinę ir tikslią izocitozino deaminazę Vcz koduojančio geno mutagenezę geresnėmis katalizinėmis savybėmis pasižyminčių mutantų atrinkti nepavyko todėl, kad naudota mutantinių Vcz fermentų atrankos sistema yra neefektyvi.
2. KANOS citozino deaminazės kinetiniai parametrai naudojant izocitoziną kaip substratą yra geresni negu CodA ir Vcz deaminazių, tačiau reikėtų papildomų eksperimentų norint pagerinti 5-fluoroizocitozino kaip substrato panaudojimą, siekiant pritaikyti šį fermentą vėžio terapijai.
3. Vcz deaminazės–D8 amidohidrolazės hibridiniai fermentai *in vivo* verčia  $N^2$ -acetilizocitoziną uracilu. Atlikus papildomus eksperimentus, tokia hibridinė sistema gali būti pritaikyta 5-fluorouracilo gavimui iš 5-fluoro- $N^2$ -acetilizocitozino.

## SANTRAUKA

Šio darbo pagrindinis objektas yra Vilniaus universiteto Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje tiriamos metagenominėse bibliotekose aptiktos deaminazės Vcz ir KANOS. Atsižvelgiant į tai, kad deaminazių katalizuojamų reakcijų metu galima gauti chemoterapinį vaistą 5-fluorouracilą, nuspręsta išanalizuoti Vcz bei KANOS pritaikomumą tikslinėje vėžio terapijoje. Darbo metu pasitelkus fermentų evoliucijos *in vitro* metodus bandyta pagerinti Vcz deaminazės kinetinius parametrus kaip substratą naudojant izocitoziną. Parodytas taikytų metodų veiksmingumas, tačiau Vcz deaminazės kinetiniai parametrai nebuvo pagerinti dėl to, kad nėra efektyvios mutuotų fermentų atrankos sistemos. KANOS deaminazės gebėjimas katalizuoti tiek citozino, tiek izocitozino deamininimą palygintas su klasikinės *E. coli* citozino deaminazės CodA savybėmis. Nustatyta, jog KANOS kinetiniai parametrai izocitozino atžvilgiu yra ~1,5 karto geresni už CodA. KANOS fermentas yra tinkamas tolimesniems tyrimams ir gali būti pritaikytas tikslinei vėžio terapijai. Taip pat parodyta, jog hibridiniame fermente kartu veikiant Vcz deaminazei bei D8 amidohidrolazei uracilas gali būti gautas iš substrato  $N^2$ -acetilizocitozino *in vivo*, kas atveria galimybę kurti dviejų fermentų (Vcz ir D8) hibrido-vieno provaisto (5-fluoro- $N^2$ -acetilizocitozino) vėžio terapijos sistemą. Galimybė naudoti sudėtingesnės struktūros provaistą, kurio virtimui į vaistą 5-fluorouracilą reikalinga dviejų žingsnių fermentinė reakcija, sumažintų tikslinės vėžio terapijos šalutinio poveikio tikimybę.

## SUMMARY

The two main objects of this master's thesis are enzymes Vcz and KANOS – deaminases from the metagenomic libraries, discovered at the Department of Molecular Microbiology and Biotechnology, Institute of Biochemistry, Vilnius University. It is a well-known fact that the chemotherapeutic drug 5-fluorouracil can be a product of a deaminase-catalyzed reaction. Hence, it was decided to investigate the applicability of Vcz and KANOS deaminases for targeted cancer therapy. *In vitro* enzyme evolution methods were used to improve the kinetic parameters of Vcz deaminase using isocytosine as its substrate. The effectiveness of the methods applied has been demonstrated, but due to the lack of a proper mutant enzyme selection system, the improved variant of Vcz deaminase could not be obtained. The ability of KANOS deaminase to catalyze the deamination of both cytosine and isocytosine was compared with that of a typical cytosine deaminase CodA from *E. coli*. The kinetic parameters of KANOS for isocytosine deamination were ~1.5 times higher than those of CodA, suggesting that this enzyme is suitable for further application in targeted cancer therapy. Also, a hybrid system that uses a two-enzyme (Vcz deaminase and D8 amidohydrolase) hybrid and a single prodrug (5-fluoro-*N*<sup>2</sup>-acetylisocytosine) is proposed. It was shown *in vivo* that uracil can be obtained from *N*<sup>2</sup>-acetylisocytosine in a two-step reaction, using both Vcz deaminase and D8 amidohydrolase in a hybrid enzyme. Using complex prodrugs that need several enzymatic steps to be converted into the active anti-cancer drug (5-fluorouracil) should reduce the severity of the side effects that accompany enzyme-prodrug cancer therapies such as cytosine deaminase / 5-fluorocytosine in their clinical application.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aboody, K.S., Najbauer, J., Metz, M.Z., D'Apuzzo, M., Gutova, M., Annala, A.J., Synold, T.W., Couture, L.A., Blanchard, S., Moats, R.A., et al. (2013). Neural stem cell-mediated enzyme-prodrug therapy for glioma: Preclinical studies. *Sci. Transl. Med.* 5.
2. Afriat-Jurnou, L., Jackson, C.J., and Tawfik, D.S. (2012). Reconstructing a missing link in the evolution of a recently diverged phosphotriesterase by active-site loop remodeling. *Biochemistry* 51, 6047–6055.
3. Aharoni, A., Griffiths, A.D., and Tawfik, D.S. (2005). High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 210–216.
4. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
5. Arkin, M. (2001). In vitro mutagenesis. In *Encyclopedia of Genetics*, S. Brenner, and J.H. Miller, eds. (New York: Academic Press), pp. 1010–1014.
6. Aučynaitė, A., Rutkienė, R., Tauraitė, D., Meškys, R., and Urbonavičius, J. (2018a). Discovery of bacterial deaminases that convert 5-fluoroisocytosine into 5-fluorouracil. *Front. Microbiol.* 9.
7. Aučynaitė, A., Rutkienė, R., Gasparavičiūtė, R., Meškys, R., and Urbonavičius, J. (2018b). A gene encoding a DUF523 domain protein is involved in the conversion of 2-thiouracil into uracil. *Environ. Microbiol. Rep.* 10, 49–56.
8. Baier, F., Copp, J.N., and Tokuriki, N. (2016). Evolution of enzyme superfamilies: Comprehensive exploration of sequence–function relationships. *Biochemistry* 55, 6375–6388.
9. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., and Bourne, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242.
10. Bloom, J.D., Labthavikul, S.T., Otey, C.R., and Arnold, F.H. (2006). Protein stability promotes evolvability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5869–5874.
11. Boersma, Y.L., Dröge, M.J., and Quax, W.J. (2007). Selection strategies for improved biocatalysts. *FEBS J.* 274, 2181–2195.
12. Brown, S.D., and Babbitt, P.C. (2012). Inference of functional properties from large-scale analysis of enzyme superfamilies. *J. Biol. Chem.* 287, 35–42.
13. Brown, S.D., and Babbitt, P.C. (2014). New insights about enzyme evolution from large scale studies of sequence and structure relationships. *J. Biol. Chem.* 289, 30221–30228.
14. Cagan, R., and Meyer, P. (2017). Rethinking cancer: current challenges and opportunities in cancer research. *Dis. Model. Mech.* 10, 349–352.
15. Camacho-García, J., Montoro-García, C., López-Pérez, A.M., Bilbao, N., Romero-Pérez, S., and González-Rodríguez, D. (2015). Synthesis and complementary self-association of novel lipophilic  $\pi$ -conjugated nucleoside oligomers. *Org. Biomol. Chem.* 13, 4506–4513.
16. Carreño, C.A., and de Lorenzo, V. (2010). Genetic traps for surveying new catalysts in (meta) genomic DNA. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, K.N. Timmis, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 4563–4579.
17. Ceilley, R.I. (2012). Mechanisms of action of topical 5-fluorouracil: review and implications for the treatment of dermatological disorders. *J. Dermatol. Treat.* 23, 83–89.
18. Chakraborty, S., and Rahman, T. (2012). The difficulties in cancer treatment. *Ecancermedicalsecience* 6.

19. Chang, C.C., Chen, T.T., Cox, B.W., Dawes, G.N., Stemmer, W.P., Punnonen, J., and Patten, P.A. (1999). Evolution of a cytokine using DNA family shuffling. *Nat. Biotechnol.* *17*, 793–797.
20. Chen, X., Zaro, J., and Shen, W.C. (2013). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *65*, 1357–1369.
21. Cho, G., Keefe, A.D., Liu, R., Wilson, D.S., and Szostak, J.W. (2000). Constructing high complexity synthetic libraries of long ORFs using in vitro selection. *J. Mol. Biol.* *297*, 309–319.
22. Cipolla, L. (2004). Combinatorial libraries of biocatalysts: application and screening. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* *7*, 101–114.
23. Cirino, P.C., and Qian, S. (2013). Protein engineering as an enabling tool for synthetic biology. In *Synthetic Biology*, H. Zhao, ed. (Boston: Academic Press), pp. 23–42.
24. Copley, S.D. (2012). Toward a systems biology perspective on enzyme evolution. *J. Biol. Chem.* *287*, 3–10.
25. Delchev, V.B., and Mikosch, H. (2007). Theoretical study of the intermolecular H-bonding and intermolecular proton transfer between isocytosine tautomeric forms and R,S-lactic acid. *J. Mol. Model.* *13*, 19–28.
26. Deshler, J.O. (1992). A simple method for randomly mutating cloned DNA fragments by using chemical mutagens and the polymerase chain reaction. *Genet. Anal. Tech. Appl.* *9*, 103–106.
27. Dietrich, J.A., McKee, A.E., and Keasling, J.D. (2010). High-throughput metabolic engineering: advances in small-molecule screening and selection. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 563–590.
28. Dooley, M., and Goa, K.L. (1999). Capecitabine. *Drugs* *58*, 69–78.
29. Dower, W.J., and Mattheakis, L.C. (2002). In vitro selection as a powerful tool for the applied evolution of proteins and peptides. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *6*, 390–398.
30. Dunwell, J.M., Culham, A., Carter, C.E., Sosa-Aguirre, C.R., and Goodenough, P.W. (2001). Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 740–746.
31. Fuchita, M., Ardiani, A., Zhao, L., Serve, K., Stoddard, B.L., and Black, M.E. (2009). Bacterial cytosine deaminase mutants created by molecular engineering demonstrate improved 5FC-mediated cell killing in vitro and in vivo. *Cancer Res.* *69*, 4791–4799.
32. Gaded, V., and Anand, R. (2018). Nucleobase deaminases: a potential enzyme system for new therapies. *RSC Adv.* *8*, 23567–23577.
33. Giger, L., Caner, S., Obexer, R., Kast, P., Baker, D., Ban, N., and Hilvert, D. (2013). Evolution of a designed retro-aldolase leads to complete active site remodeling. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 494–498.
34. Glasner, M.E., Gerlt, J.A., and Babbitt, P.C. (2006). Evolution of enzyme superfamilies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *10*, 492–497.
35. Golynskiy, M.V., Haugner, J.C., Morelli, A., Morrone, D., and Seelig, B. (2013). In vitro evolution of enzymes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *978*, 73–92.
36. Greener, A., Callahan, M., and Jerpseth, B. (1996). An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *57*, 375–385.
37. Gupta, D., Huelsekopf, M., Morell Cerdà, M., Ludwig, R., and Lippert, B. (2004). Complex formation of isocytosine tautomers with PdII and PtII. *Inorg. Chem.* *43*, 3386–3393.

38. Gurung, N., Ray, S., Bose, S., and Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Res. Int.* *2013*, 329121.
39. Hall, R.S., Fedorov, A.A., Marti-Arbona, R., Fedorov, E.V., Kolb, P., Sauder, J.M., Burley, S.K., Shoichet, B.K., Almo, S.C., and Raushel, F.M. (2010). The hunt for 8-oxoguanine deaminase. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 1762–1763.
40. Hall, R.S., Fedorov, A.A., Xu, C., Fedorov, E.V., Almo, S.C., and Raushel, F.M. (2011). Three-dimensional structure and catalytic mechanism of cytosine deaminase. *Biochemistry* *50*, 5077–5085.
41. Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *68*, 669–685.
42. Hayden, M.S., Linsley, P.S., Wallace, A.R., Marquardt, H., and Kerr, D.E. (1998). Cloning, overexpression, and purification of cytosine deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr. Purif.* *12*, 173–184.
43. Hirao, I., Kimoto, M., and Yamashige, R. (2012). Natural versus artificial creation of base pairs in DNA: origin of nucleobases from the perspectives of unnatural base pair studies. *Acc. Chem. Res.* *45*, 2055–2065.
44. Innan, H., and Kondrashov, F. (2010). The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 97–108.
45. Ireton, G.C., Black, M.E., and Stoddard, B.L. (2001). Crystallization and preliminary X-ray analysis of bacterial cytosine deaminase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *57*, 1643–1645.
46. Ireton, G.C., McDermott, G., Black, M.E., and Stoddard, B.L. (2002). The structure of *Escherichia coli* cytosine deaminase. *J. Mol. Biol.* *315*, 687–697.
47. Jacob, F. (1977). Evolution and tinkering. *Science* *196*, 1161–1166.
48. Joern, J.M. (2003). DNA Shuffling. In *Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols*, F.H. Arnold, and G. Georgiou, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 85–89.
49. Kambara, H., Tamiya, T., Ono, Y., Ohtsuka, S., Terada, K., Adachi, Y., Ichikawa, T., Hamada, H., and Ohmoto, T. (2002). Combined radiation and gene therapy for brain tumors with adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase genes. *Cancer Gene Ther.* *9*, 840–845.
50. Karjoo, Z., Chen, X., and Hatefi, A. (2016). Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *99*, 113–128.
51. Kazlauskas, A., Darinskas, A., Meškys, R., Tamašauskas, A., and Urbonavičius, J. (2019). Isocytosine deaminase Vcz as a novel tool for the prodrug cancer therapy. *BMC Cancer* *19*, 197.
52. Kelly, R.M., Leemhuis, H., Gätjen, L., and Dijkhuizen, L. (2008). Evolution toward small molecule inhibitor resistance affects native enzyme function and stability, generating acarbose-insensitive cyclodextrin glucanotransferase variants. *J. Biol. Chem.* *283*, 10727–10734.
53. Kitamoto, K., Oda, K., Gomi, K., and Takahashi, K. (1990). Construction of uracil and tryptophan auxotrophic mutants from sake yeasts by disruption of *URA3* and *TRP1* genes. *Agric. Biol. Chem.* *54*, 2979–2987.
54. Ko, T.P., Lin, J.J., Hu, C.Y., Hsu, Y.H., Wang, A.H.J., and Liaw, S.H. (2003). Crystal structure of yeast cytosine deaminase. Insights into enzyme mechanism and evolution. *J. Biol. Chem.* *278*, 19111–19117.
55. Kotzia, G.A., and Labrou, N.E. (2009). Engineering thermal stability of L-asparaginase by in vitro directed evolution. *FEBS J.* *276*, 1750–1761.

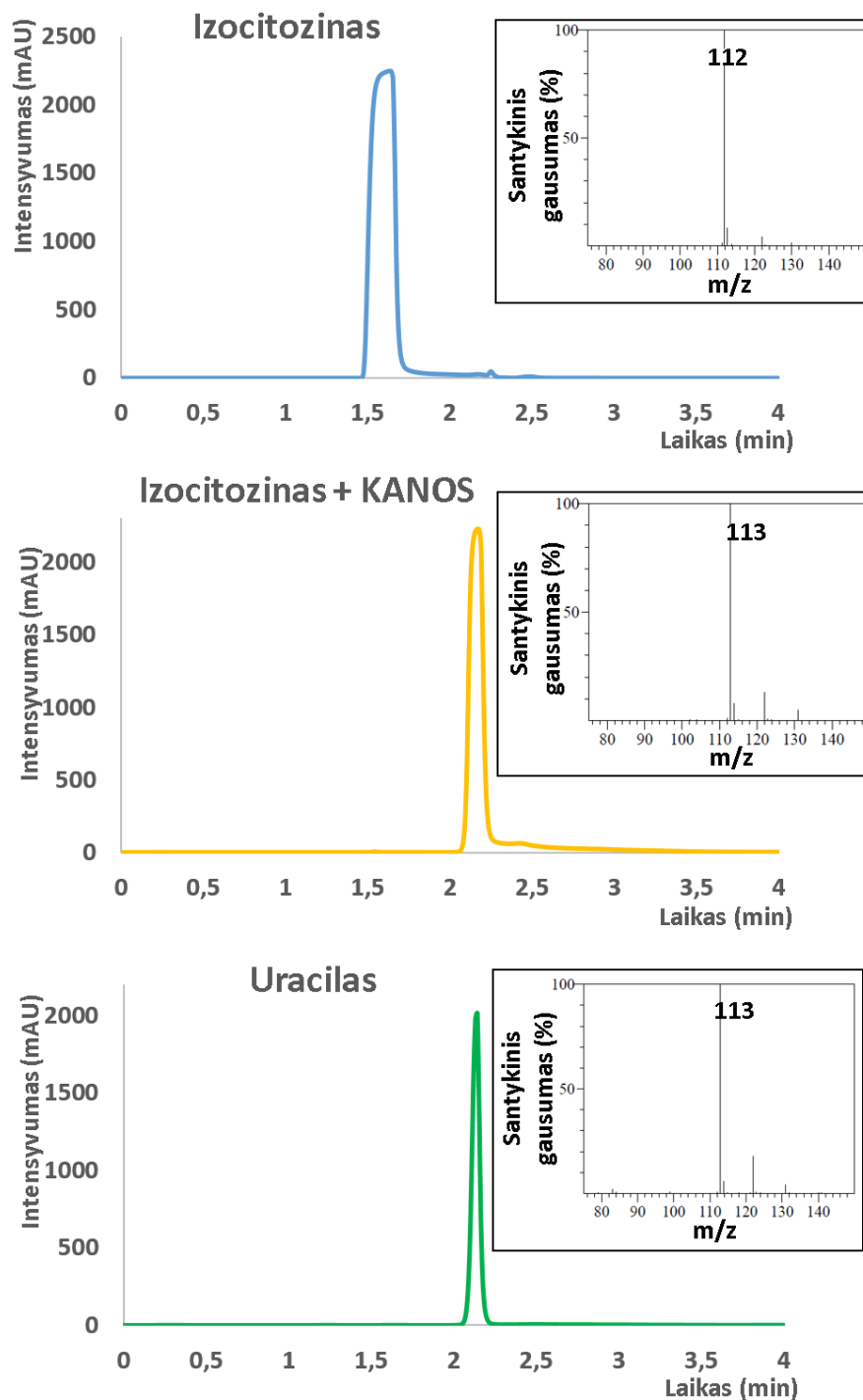


56. Labrou, N. (2010). Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution. *Curr. Protein Pept. Sci.* *11*, 91–100.
57. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
58. Leemhuis, H., Kelly, R.M., and Dijkhuizen, L. (2009). Directed evolution of enzymes: Library screening strategies. *IUBMB Life* *61*, 222–228.
59. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265–275.
60. Lv, S.Q., Zhang, K.B., Zhang, E.E., Gao, F.Y., Yin, C.L., Huang, C.J., He, J.Q., and Yang, H. (2009). Antitumor efficiency of the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system on malignant gliomas: an in vivo study. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *15*, BR13-20.
61. Mahan, S.D., Ireton, G.C., Knoeber, C., Stoddard, B.L., and Black, M.E. (2004a). Random mutagenesis and selection of *Escherichia coli* cytosine deaminase for cancer gene therapy. *Protein Eng. Des. Sel.* *17*, 625–633.
62. Mahan, S.D., Ireton, G.C., Stoddard, B.L., and Black, M.E. (2004b). Alanine-scanning mutagenesis reveals a cytosine deaminase mutant with altered substrate preference. *Biochemistry* *43*, 8957–8964.
63. Malekshah, O.M., Chen, X., Nomani, A., Sarkar, S., and Hatefi, A. (2016). Enzyme/prodrug systems for cancer gene therapy. *Curr. Pharmacol. Rep.* *2*, 299–308.
64. Nabel, C.S., Manning, S.A., and Kohli, R.M. (2012). The curious chemical biology of cytosine: deamination, methylation, and oxidation as modulators of genomic potential. *ACS Chem. Biol.* *7*, 20–30.
65. National Academies of Sciences, E. (2017). Cancer care in low-resource areas: cancer treatment, palliative care, and survivorship Care: Proceedings of a Workshop.
66. Negroni, L., Samson, M., Guignon, J.M., Rossi, B., Pierrefite-Carle, V., and Baudoin, C. (2007). Treatment of colon cancer cells using the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide system induces apoptosis, modulation of the proteome, and Hsp90 $\beta$  phosphorylation. *Mol. Cancer Ther.* *6*, 2747–2756.
67. Ness, J.E., Welch, M., Giver, L., Bueno, M., Cherry, J.R., Borchert, T.V., Stemmer, W.P., and Minshull, J. (1999). DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin. *Nat. Biotechnol.* *17*, 893–896.
68. Otey, C.R., and Joern, J.M. (2003). High-throughput screen for aromatic hydroxylation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *230*, 141–148.
69. Otten, L.G., and Quax, W.J. (2005). Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomol. Eng.* *22*, 1–9.
70. Otten, L.G., Sio, C.F., Vrieling, J., Cool, R.H., and Quax, W.J. (2002). Altering the substrate specificity of cephalosporin acylase by directed evolution of the Beta -subunit. *J. Biol. Chem.* *277*, 42121–42127.
71. Patrick, W.M., and Firth, A.E. (2005). Strategies and computational tools for improving randomized protein libraries. *Biomol. Eng.* *22*, 105–112.
72. Popovic, A., Tchigvintsev, A., Tran, H., Chernikova, T.N., Golyshina, O.V., Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., and Yakunin, A.F. (2015). Metagenomics as a tool for enzyme discovery: hydrolytic enzymes from marine-related metagenomes. *Adv. Exp. Med. Biol.* *883*, 1–20.
73. Porter, D.J., and Austin, E.A. (1993). Cytosine deaminase. The roles of divalent metal ions in catalysis. *J. Biol. Chem.* *268*, 24005–24011.

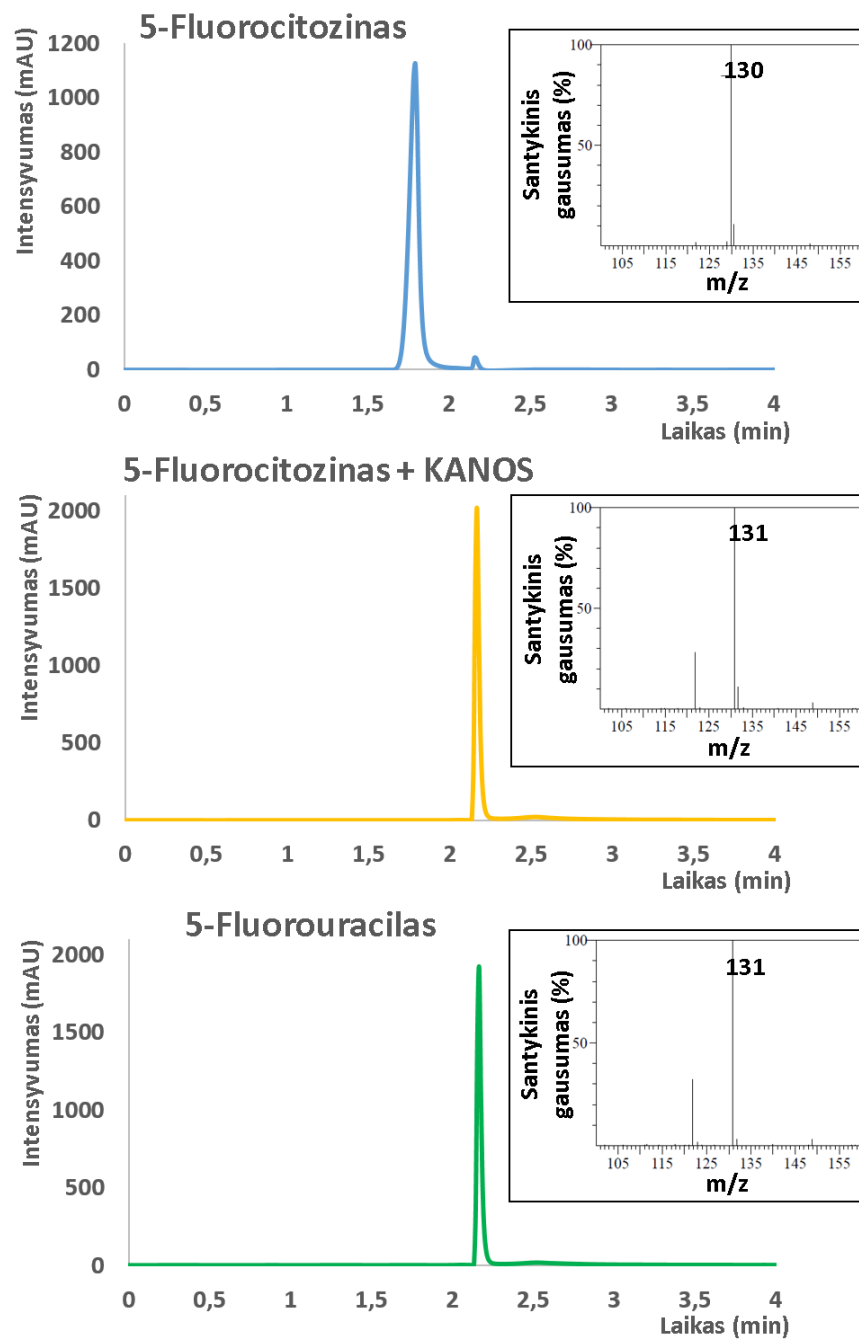
74. Portsmouth, D., Hlavaty, J., and Renner, M. (2007). Suicide genes for cancer therapy. *Mol. Aspects Med.* 28, 4–41.
75. Raza, A., Kohila, V., and Ghosh, S.S. (2015). Redesigned *Escherichia coli* cytosine deaminase: a new facet of suicide gene therapy. *J. Gene Med.* 17, 132–139.
76. Reetz, M.T., Kahakeaw, D., and Lohmer, R. (2008). Addressing the numbers problem in directed evolution. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 9, 1797–1804.
77. Renesto, P., and Raoult, D. (2003). From genes to proteins: in vitro expression of rickettsial proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 642–652.
78. Robert, X., and Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 42, W320–324.
79. van Rossum, T., Kengen, S.W.M., and van der Oost, J. (2013). Reporter-based screening and selection of enzymes. *FEBS J.* 280, 2979–2996.
80. Ruff, A.J., Dennig, A., and Schwaneberg, U. (2013). To get what we aim for – progress in diversity generation methods. *FEBS J.* 280, 2961–2978.
81. Sage, E.K., Thakrar, R.M., and Janes, S.M. (2016). Genetically modified mesenchymal stromal cells in cancer therapy. *Cytotherapy* 18, 1435–1445.
82. Salazar, O., and Sun, L. (2003). Evaluating a screen and analysis of mutant libraries. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 230, 85–97.
83. Schmidt-Dannert, C., and Arnold, F.H. (1999). Directed evolution of industrial enzymes. *Trends Biotechnol.* 17, 135–136.
84. Schulenburg, C., and Miller, B.G. (2014). Enzyme recruitment and its role in metabolic expansion. *Biochemistry* 53, 836–845.
85. Seffernick, J.L., de Souza, M.L., Sadowsky, M.J., and Wackett, L.P. (2001). Melamine deaminase and atrazine chlorohydrolase: 98 percent identical but functionally different. *J. Bacteriol.* 183, 2405–2410.
86. Sen, S., Venkata Dasu, V., and Mandal, B. (2007). Developments in directed evolution for improving enzyme functions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 143, 212–223.
87. Shaikh, F.A., and Withers, S.G. (2008). Teaching old enzymes new tricks: engineering and evolution of glycosidases and glycosyl transferases for improved glycoside synthesis. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 86, 169–177.
88. Shimma, N., Umeda, I., Arasaki, M., Murasaki, C., Masubuchi, K., Kohchi, Y., Miwa, M., Ura, M., Sawada, N., Tahara, H., et al. (2000). The design and synthesis of a new tumor-selective fluoropyrimidine carbamate, capecitabine. *Bioorg. Med. Chem.* 8, 1697–1706.
89. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539.
90. Sikorski, R.S., and Boeke, J.D. (1991). In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: From cloned gene to mutant yeast. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 302–318.
91. van Sint Fiet, S., van Beilen, J.B., and Witholt, B. (2006). Selection of biocatalysts for chemical synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1693–1698.
92. Stemmer, W.P. (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370, 389–391.
93. Tao, H., and Cornish, V.W. (2002). Milestones in directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 858–864.
94. Taylor, S.V., Kast, P., and Hilvert, D. (2001). Investigating and engineering enzymes by genetic selection. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 40, 3310–3335.

95. Turner, N.J. (2009). Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 567–573.
96. Tyzack, J.D., Furnham, N., Sillitoe, I., Orengo, C.M., and Thornton, J.M. (2017). Understanding enzyme function evolution from a computational perspective. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *47*, 131–139.
97. Vermes, A., Guchelaar, H.J., and Dankert, J. (2000). Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* *46*, 171–179.
98. Wahler, D., and Reymond, J.L. (2001). High-throughput screening for biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.* *12*, 535–544.
99. Williams, G.J., Zhang, C., and Thorson, J.S. (2007). Expanding the promiscuity of a natural-product glycosyltransferase by directed evolution. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 657–662.
100. Xiao, H., Bao, Z., and Zhao, H. (2015). High throughput screening and selection methods for directed enzyme evolution. *Ind. Eng. Chem. Res.* *54*, 4011–4020.
101. Yata, V.K., Gopinath, P., and Ghosh, S.S. (2012). Emerging implications of nonmammalian cytosine deaminases on cancer therapeutics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *167*, 2103–2116.
102. Yuan, L., Kurek, I., English, J., and Keenan, R. (2005). Laboratory-directed protein evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *69*, 373–392.
103. Zarogoulidis, P., Darwiche, K., Sakkas, A., Yarmus, L., Huang, H., Li, Q., Freitag, L., Zarogoulidis, K., and Malecki, M. (2013). Suicide gene therapy for cancer – current strategies. *J. Genet. Syndr. Gene Ther.* *4*.
104. Zugazagoitia, J., Guedes, C., Ponce, S., Ferrer, I., Molina-Pinelo, S., and Paz-Ares, L. (2016). Current challenges in cancer treatment. *Clin. Ther.* *38*, 1551–1566.

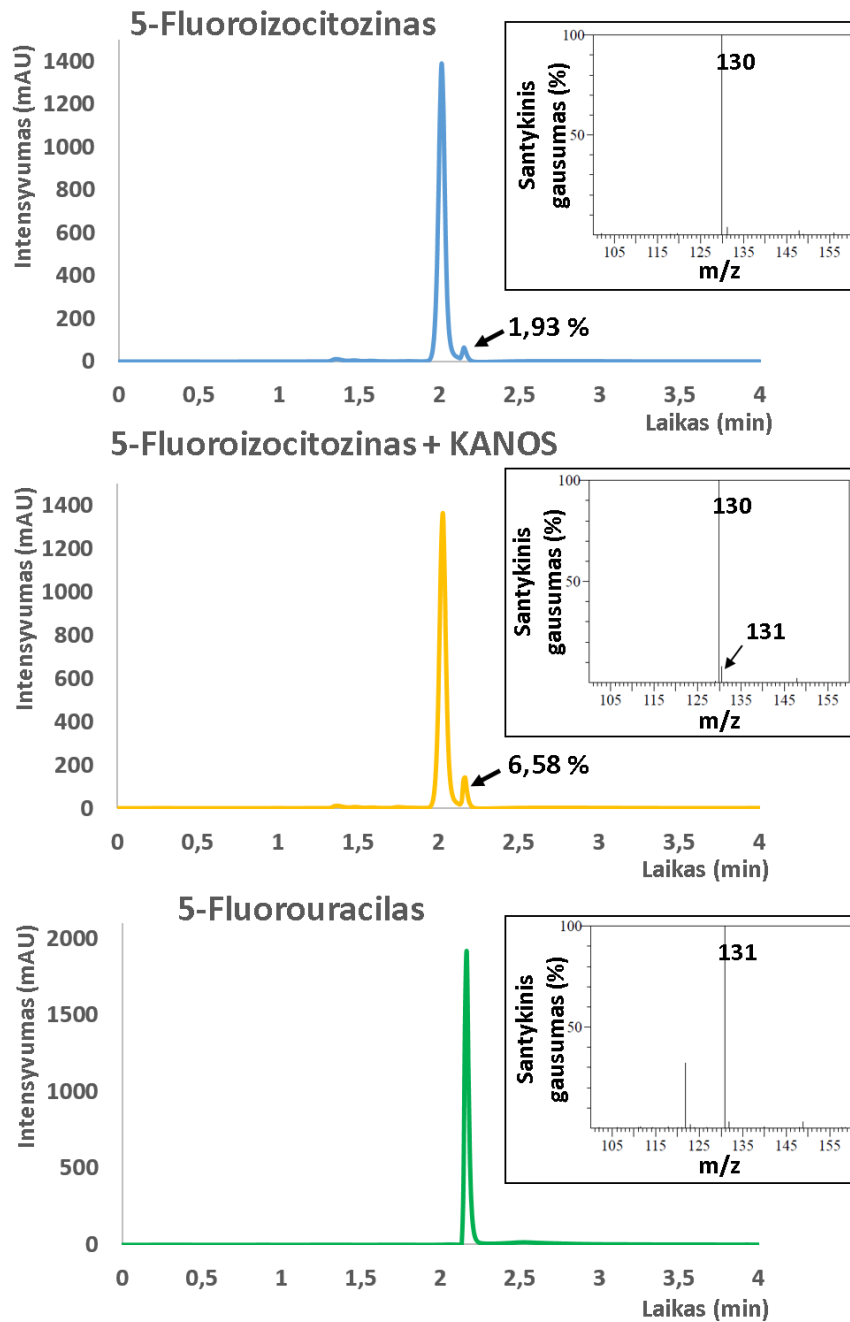
## PRIEDAI



**1.1 pav.** UV chromatogramos bei MS spektrai, atitinkantys substrato izocitozino (mėlynas), KANOS fermentinės reakcijos mišinio (geltonas) bei produkto uracilo (žalias) pikus. MS spektrai (m/z) atitinka  $[M+H]^+$  molekulių jonų aptikimą.



**1.2 pav.** UV chromatogramos bei MS spektrai, atitinkantys substrato 5-fluorocitozino (mėlynas), KANOS fermentinės reakcijos mišinio (geltonas) bei produkto 5-fluorouracilo (žalias) pikus. MS spektrai (m/z) atitinka  $[M+H]^+$  molekulių jonų aptikimą.



**1.3 pav.** UV chromatogramos bei MS spektrai, atitinkantys substrato 5-fluoroizocitozino (mėlynas), KANOS fermentinės reakcijos mišinio (geltonas) bei produkto 5-fluorouracilo (žalias) pikus. MS spektrai (m/z) atitinka  $[M+H]^+$  molekulių jonų aptikimą. Procentais nurodytas 5-fluorouracilą atitinkančio piko plotas.

## **PADĖKA**

Norėčiau padėkoti darbo vadovei dr. Agotai Aučynaitei už skirtą laiką, vertingus patarimus bei visapusišką pagalbą rengiant baigiamąjį darbą.

Taip pat dėkoju skyriaus vadovui dr. Rolandui Meškiui už naudingas idėjas, suteiktas žinias bei galimybę dirbti man nepaprastai įdomioje tyrimų srityje.

Galiausiai ačiū tariau visam Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus kolektyvui už didžiulį norą padėti, kantrybę, šypsenas bei gerus žodžius.