



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Aliona Voroncova

**GLUTATIONO-S-TRANSFERAZĖS SISTEMOS PANAUDOJIMAS Į
POLO PANAŠIŲ KINAZIŲ EKSPRESIJAI *ESCHERICHIA COLI***
**EXPRESSION OF POLO-LIKE KINASES IN *ESCHERICHIA COLI* USING
GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE SYSTEM**

Baigiamasis bakalauro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vilnius, 2008

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(parašas)

Juozas Kulys

(vardas, pavardė)

(data)

Aliona Voroncova

**GLUTATIONO-S-TRANSFERAZĖS SISTEMOS PANAUDOJIMAS Į
POLO PANAŠIŲ KINAZIŲ EKSPRESIJAI *ESCHERICHIA COLI***

**EXPRESSION OF POLO-LIKE KINASES IN *ESCHERICHIA COLI* USING
GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE SYSTEM**

Baigiamasis bakalauro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vadovai:

dr. Jurgita Matulienė

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantas dr. doc. Jolanta Sereikaitė

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2008

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN
Egz. sk.
Data-.....-.....

Pagrindinės studijų **Bioinžinerijos** programos baigiamasis darbas

Pavadinimas **Glutatio-S-transferazės sistemos panaudojimas į Polo panašių kinazių ekspresijai
Escherichia coli**

Autorius **Aliona Voroncova**

Vadovas

doc. dr. Jolanta Sereikaitė

Kalba: lietuvių

Anotacija

Į Polo panašios kinazės (PLK) – svarbūs ląstelės ciklo reguliatoriai. PLK1 yra gerai žinomas priešvėžinis taikynys. Šio darbo tyrimo objektas – žmogaus PLK genai – PLK1, PLK2, PLK3 ir PLK4, jų klonavimas į glutatio-S-transferazės seką koduojantį pGEX-4T-2 vektorių, ekspresijos patikrinimas Escherichia coli BL21 (DE3) kamieno ir tikslių baltymų tirpumo optimizavimas. Darbo metu gautos keturios ekspresinės genetinės konstrukcijos, pasižyminčios tiksline baltymo raiška E. coli ląstelėse, atrastos sąlygos, kurioms esant GST-PLK baltymų tirpumas yra geriausias. Išgrynintus PLK baltymus bus galima panaudoti reguliacinio domeno įtakai į Polo panašių kinazių funkcijai tirti, junginių, slopinančių kinazių reguliacinį domeną, kurimui ir poveikiui vėžinių ląstelių dauginimuisi tirti.

Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, tyrimo rezultatai ir jų aptarimas, išvados ir literatūros sąrašas.

Darbo apimtis – 63 p. teksto be priedų, 27 pav., 1 lent., 47 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai

genų ekspresija, GST, į Polo panašios kinazės, Polo domenai

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN ISSN
Copies No.
Date-.....-.....

Bachelor Degree Studies **Bioengineering** study programme Final Thesis

Title **Expression of Polo-like kinases in Escherichia coli using Glutathione-S-transferase System**

Author **Aliona Voroncova**

Academic supervisor **Assoc Prof Dr Jolanta Sereikaitė**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Polo-like kinases (PLK) – important cell cycle regulators. PLK1 is a well known anticancer target. The purpose of this work was human PLK genes – PLK1, PLK2, PLK3, and PLK4, their cloning into pGEX-4T-2 vector, which has glutathione-S-transferase sequence, testing the expression in the Escherichia coli BL21 (DE3) strain, and optimizing the solubility of proteins. During the course of the work four expression plasmids were created, and all of them showed expression of the proteins of interest in E. coli cells. The best conditions for the solubility of GST-PLK proteins were determined. Purified PLK proteins can be employed into Polo-like kinases function investigation of regulatory domain, and to the development of compounds, which can suppress the regulatory domain of the kinases and influence cancer cells proliferation.

Work consists of introduction, literature part, materials and methods, results and discussion, conclusions, and references.

There are 63 pages text without extras, 27 fig., 1 table, 47 bibliographical entries.

Keywords

gene expression, GST, Polo-box domain, Polo-like kinases

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	7
PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS	10
ĮVADAS	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. Į Polo panašios kinazės	14
1.1.1. PLK vaidmuo ir paplitimas	14
1.1.2. PLK baltymų struktūra	15
1.1.2.1. PLK kinazės domenas	16
1.1.2.2. PLK reguliacinis Polo domenas	17
1.1.3. PLK padėtis ląstelėje	19
1.1.4. PLK funkcijos	20
1.1.5. PLK ir vėžys	22
1.2. GST sistema	24
1.2.1. Glutatio-S-transferazė	24
1.2.2. GST genų suliejimo sistema	24
1.2.3. Klonavimas panaudojant pGEX ekspresijos vektorius	25
1.2.4. GST seką turinčių baltymų gryninimas ir GST sekos pašalinimas	26
1.3. Bakterinė raiškos sistema	27
1.3.1. Genų raiškos reguliavimas prokariotinėse sistemose	27
1.3.2. Rekombinantinis <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) ląstelių kamienas	28
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	29
2.1. Aparatūra ir medžiagos	29
2.1.1. Aparatūra	29
2.1.2. Medžiagos ir reagentai	29
2.1.3. Tirpalai ir buferiniai tirpalai	30
2.1.4. Rinkiniai	31
2.1.5. Terpės	32
2.1.6. Rekombinantinis <i>E. coli</i> producentas	33
2.1.7. Genetinis vektorius pGEX-4T-2	33
2.1.8. Kitos genetinės konstrukcijos	33
2.2. Metodai	34
2.2.1. Polimerazės grandininė reakcija	34
2.2.2. DNR fragmentų elektroforezė 1 % agaroziniame gelyje	34

2.2.3. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozinio gelio.....	35
2.2.4. DNR koncentracijos nustatymas	35
2.2.5. Analitinis plazmidės DNR išskyrimas iš <i>E. coli</i> ląstelių biomasės šarminės lizės metodu	35
2.2.6. Plazmidinės DNR išskyrimas sekvenavimui iš <i>Escherichia coli</i> ląstelių biomasės.....	36
2.2.7. DNR fragmentų restrikcija specifinėmis restrikcijos endonukleazėmis.....	36
2.2.8. DNR lipnių galų bukinimas	36
2.2.9. Vektoriaus DNR 5' ir 3' galų defosforilinimas	36
2.2.10. Ligavimas	37
2.2.11. Kompetentinių <i>E. coli</i> ląstelių transformacija	37
2.2.12. Tikslinio baltymo ekspresijos patikrinimas.....	38
2.2.13. Tikslinio baltymo ekspresijos indukcija	38
2.2.14. Tikslinio baltymo ekspresija, esant skirtingoms temperatūroms.....	38
2.2.15. Baltymų SDS-PAGE	39
2.2.16. Tirpių ir netirpių baltymų nustatymas	40
2.2.17. DNR nukleotidinės sekos nustatymas	41
2.3. Darbo eiga	42
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	43
3.1. Pirmojo darbo etapo rezultatai.....	43
3.1.1. Genetinio klonavimo rezultatai	43
3.1.1.1. PLK1 (PBD) geno klonavimo rezultatai	43
3.1.1.2. PLK2 (PBD) geno klonavimo rezultatai	45
3.1.1.3. PLK3 (PBD) geno klonavimo rezultatai	46
3.1.1.4. PLK4 (PBD) geno klonavimo rezultatai	48
3.1.2. PLK/pGEX-4T-2 ekspresijos patikrinimas	49
3.2. Antrojo darbo etapo rezultatai	50
3.2.1. PLK1 ir PLK3 baltymų tirpumo nustatymo rezultatai	50
3.2.2. PLK2 ir PLK4 baltymų tirpumo nustatymo rezultatai	55
3.2.3. GST-PLK baltymų tirpumo optimizavimo rezultatai.....	57
4. IŠVADOS.....	60
LITERATŪROS SĄRAŠAS	61

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- a. r. – aminorūgštis
- AA – akrilamidas
- Amp^r* – atsparumo ampicilinui genas
- APC/C – anafazę skatinantis kompleksas (angl. *anaphase-promoting complex/cyclosome*)
- APS – amonio persulfatas
- aps. – apsisukimai
- ATP – adenzintrifosfatas
- b. p. – bazių poros
- BAA – Bis-akrilamidas
- BL21 (DE3) – išvestinis *E. coli* kamienas
- BTI – Biotechnologijos institutas
- C nukleotidas – citozinas
- Cdc25C – baltymas, fosforinamas PLK1
- Cdc5 – į Polo panaši kinazė, esanti pumpuruojančiose mielėse
- CHO – kinietiško žiurkėno kiaušidžių ląstelės (angl. *Chinese Hamster Ovary cells*)
- Ciklino B/Cdk1 – kompleksas, skatinantis mitozės pradžia
- Da – daltonas
- DH5α – išvestinis *E. coli* kamienas
- dNTP – deoksiribonukleotidai
- DTT – ditionitrietolis
- E. coli* – *Escherichia coli* bakterija
- EC – fermento numeris (angl. *Enzyme Commission number*)
- EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis
- Fnk – PLK3
- G nukleotidas – guaninas
- G1 – ląstelės ciklo fazė
- G2 – ląstelės ciklo fazė
- GST – glutationo-S-transferazė
- GST-PLK – su GST baltymo seka sulietas PLK baltymas
- HEPES – N-2-hidroksietilpiperazanas-N'-2-etano sulfonrūgštis
- IPTG – isopropil-β-D-tiogalaktozidazė
- kb. p. – kilobazių poros
- kDa – kilodaltonas

lac – promotorius
lacA – β-tiogalaktozido transacetilazę kodojantis genas
lacI – *lac* promotoriui represinį baltymą kodojantis genas
lacY – β-galaktozido permeazę kodojantis genas
lacUV5 – *lac* tipo promotorius
lacZ – β-galaktozidazę kodojantis genas
LB – Luria-Bertani mitybinė terpė
MCS – daugybinio klonavimo regionas (angl. *multiple cloning site*)
mRNR – matricinė RNR
Nlp – centrosomos baltymas
O.V. – optiniai vienetai
ori – plazmidės replikacijos pradžios taškas (angl. *origin of replication initiation*)
PB domenas – Polo „dėžučių“ domenas (angl. *Polo Box domain*)
PBD – Polo „dėžučių“ domenas (angl. *Polo Box domain*)
Pc – Polo „kepurėlė“ (angl. *Polo cap*)
PEG – polietilenglikolis
Pfu – DNR polimerazė iš *Pyrococcus furiosus*
pGEX 3' – pradmuo, prikabinamas prie pGEX-4T-2 vektoriaus
pGEX 5' – pradmuo, prikabinamas prie pGEX-4T-2 vektoriaus
pGEX-4T-2 – plazmidė
Plc1 – PLK1 analogas
Plc2 – PLK2 analogas
Plc3 – PLK3 analogas
PLK – į Polo panašios kinazės
PLK1/pOTB7 – plazmidė, nešanti PLK1 geną
PLK1_FI – pradmuo, prikabinamas prie PLK1/pOTB7 plazmidės
PLK1_R – pradmuo, prikabinamas prie PLK1/pOTB7 plazmidės
PLK2 (PBD)/pCMV-HA – plazmidė, nešanti PLK2 geną
PLK3/pOTB7 – plazmidė, nešanti PLK3 geną
PLK4/pFRT/TO-V5 – plazmidė, nešanti PLK4 geną
Plo1 – į Polo panaši kinazė, esanti nelytiškai besidauginančiose mitozės būdu mielėse
Plx1 – PLK1 analogas
Plx2 – PLK2 analogas
Plx3 – PLK3 analogas
PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas

Prk – PLK3

S – ląstelės ciklo fazė

S.O.C. – mitybinė terpė

SAK – PLK4

SAP – krevečių šarminė fosfatazė (angl. *Shrimp Alkaline Phosphatase*)

SDS – natrio dodecilsulfatas

SDS-PAGE – natrio dodecilsulfato denatūruojanti poliakrilamidinio gelio elektroforezė (angl. *sodium dodecylsulphate polyacrylamidic gel electrophoresis*)

Snk – PLK2

tac – indukuojamas promotorius

TAE – tris-acetato ir EDTA buferinis tirpalas

TE – Tris-EDTA buferinis tirpalas

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

TRIS – (hidroksimetil)-aminometanas

vnt. – vienetai

XL1-blue – išvestinis *E. coli* kamienas

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

- 1 pav.** PLK šeimos narių filogenetinė analizė (p. 15).
- 2 pav.** Žmogaus į Polo panašių kinazių baltymų struktūra (p. 15).
- 3 pav.** PLK1 kinazės domeno struktūra (p. 16).
- 4 pav.** PLK1 PB domeno struktūra (p. 18).
- 5 pav.** PLK4 PB domeno struktūra (p. 18).
- 6 pav.** Du galimi substrato nukreipimo į PB domeną modeliai (p. 19).
- 7 pav.** Įvairių PLK1 ląstelės ciklo metu funkcijų apibendrinimas (p. 21).
- 8 pav.** Glutationas (GSH) (p. 24).
- 9 pav.** pGEX-4T-2 vektoriaus konstrukcija (p. 25).
- 10 pav.** Galutinė glutationo sefarozės struktūra (p. 26).
- 11 pav.** *lac* operono induktoriai: alolaktozė ir IPTG (p. 27).
- 12 pav.** Bendra pirmojo darbo etapo schema (p. 42).
- 13 pav.** Principinė PLK1 (PBD) geno klonavimo schema (p. 44).
- 14 pav.** Principinė PLK2 (PBD) geno klonavimo schema (p. 45).
- 15 pav.** Principinė PLK3 (PBD) geno klonavimo schema (p. 47).
- 16 pav.** Principinė PLK4 (PBD) geno klonavimo schema (p. 48).
- 17 pav.** *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-4T-2/PLK kamienų auginimų +37 °C temperatūroje SDS-PAGE rezultatai (p. 50).
- 18 pav.** PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2 ir PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2 ekspresijos ir tirpumo rezultatai, auginant 2 val +37 °C temperatūroje (p. 51).
- 19 pav.** PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2 ir PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2 ekspresijos ir tirpumo rezultatai, auginant 4 val +30 °C temperatūroje (p. 52).
- 20 pav.** PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2 ir PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2 ekspresijos ir tirpumo rezultatai, auginant 6 val +20 °C temperatūroje (p. 53).
- 21 pav.** PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2 ir PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2 ekspresijos ir tirpumo rezultatai, auginant 16 val +20 °C temperatūroje (p. 53).
- 22 pav.** PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2 ir PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2 ekspresijos ir tirpumo rezultatai, auginant 16 val +16 °C temperatūroje (p. 54).
- 23 pav.** PLK2 (PBD)/pGEX-4T-2 ekspresijos ir tirpumo rezultatai, auginant 2 val +37 °C temperatūroje ir 16 val +16 °C temperatūroje (p. 55).
- 24 pav.** PLK4 (PBD)/pGEX-4T-2 ekspresijos ir tirpumo rezultatai, auginant 2 val +37 °C temperatūroje ir 16 val +16 °C temperatūroje (p. 56).

25 pav. GST-PLK1 (PBD) baltymo lygis procentais, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų (p. 57).

26 pav. GST-PLK3 (PBD) baltymo lygis procentais, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų (p. 58).

27 pav. GST-PLK2 (PBD) ir GST-PLK4 (PBD) baltymų lygis procentais, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų (p. 58).

ĮVADAS

Kinazės (fosfotransferazės, EC 2.7) – baltymų šeimos dalis, kuri perneša fosforą turinčias grupes nuo energijos turinčių donorinių molekulių (pvz., ATP) prie specifinių serino, treonino arba tirozino molekules turinčių baltymų [22]. Toks procesas vadinasi fosforiliniu; jo tikslas – aktyvuoti molekulę, suteikti jai papildomos energijos, kad ji galėtų dalyvauti tolymesnėse reakcijose, kurių metu ta energija bus panaudota.

Į Polo panašios kinazės – tai grupė svarbių serino/treonino kinazių, kontroliuojančių įvairius perėjimus ląstelės ciklo metu [20]. Jos dalyvauja centrosomos brendime, ląstelės ciklo sustabdyme po DNR pažeidimų, mitotinės verpstės susidaryme, chromosomų judėjime ir išsiskyrimo, anafazės aktyvavime bei citokinezėje [10]. Žinduolių ląstelėse aptinkamos PLK1, PLK2, PLK3 ir PLK4 fosfotransferazės. Geriausiai ištyrinėta yra PLK1. Šis baltymas yra būtinas ląstelių dalinimuisi ir sparčiai proliferacijai. Padidėję šios kinazės kiekiai randami daugelyje vėžinių audinių, todėl šis baltymas jau seniai naudojamas kaip taikynys priešvėžiniams vaistams kurti. Biotechnologijos institute Biotermodynamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje yra kuriami junginiai PLK1 reguliaciniam domenui slopinti. Šiu junginių sąveikai su Polo kinazėmis tirti yra reikalingi dideli kiekiai išgrynintų PLK baltymų.

Šio darbo tyrimo tikslas – pasitelkiant Glutathiono-S-transferazės genų suliejimo ir ekspresijos *E. coli* sistema, gauti tirpius žmogaus į Polo panašių kinazių rekombinantinius baltymus, kuriuos vėliau būtų galima išgryninti ir panaudoti tolimesniems jungimosi su ligandais tyrimams.

Glutathiono-S-transferazės (GST) genų suliejimo sistema (angl. *Glutathione-S-transferase Gene Fusion System*) yra universali sistema, pritaikyta su GST sulietų baltymų ekspresijai *Escherichia coli* ir gryninimui. Ši raiškos sistema pilnai išlaiko GST baltymo fermentinį aktyvumą. GST baltymas ne tik pagerina su juo sulietų baltymų tirpumą, bet ir suteikia galimybę efektyviai išgryninti baltymą afininės chromatografijos būdu, panaudojant imobilizuotą glutationą. GST genų suliejimo sistema jau buvo sėkmingai pritaikyta molekulinėje imunologijoje, vakcinų gamyboje, baltymo-baltymo ir DNR-baltymo sąveikų tyrimuose [15].

Escherichia coli bakterijos yra plačiausiai naudojamos rekombinantinių baltymų gavimui. Tačiau daugelis eukariotinių baltymų tokiose sistemose gaunami neteisingos struktūros, netirpūs, sukaupti intarpiniuose kūneliuose, kuriuos po to reikia tirpinti, naudojant denatūruojančius reagentus ir vėliau renatūruoti, o tai žymiai mažina tikimybę gauti aktyvų baltymą. BTI Biotermodynamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje žmogaus PLK genus buvo bandoma klonuoti į ekspresinį pSUMO vektorių, tačiau po to gauti sulieti SUMO-PLK baltymai buvo aptikti intarpiniuose kūneliuose. Šią problemą bandoma išspręsti šiame darbe –

sukonstruoti su GST sulietus baltymus, patikrinti GST-PLK baltymų ekspresiją *E. coli* ir optimizuoti tikslinių baltymų tirpumą.

Darbo metu gautos keturios žmogaus PLK genus nešančios ekspresinės pGEX-4T-2 plazmidės, patikrinta GST-PLK baltymų raiška ir nustatyta, kad, esant palankioms sąlygoms, 25–47 % tikslinio baltymo, skaičiuojant nuo visų tirpios frakcijos baltymų, yra būtent tirpioje baltymų frakcijoje. Tai yra geras rodyklis, nes šiuo atveju PLK baltymų gryninimas yra daug lengvesnis, baltymas išsaugoja savo struktūrą ir aktyvumą.

Darbo metu sukonstruotas plazmidės bus galima panaudoti rekombinantinių PLK baltymų ekspresijai ir gryninimui iš *E. coli*. Šie baltymai suteiks galimybę reguliacinių PLK domenų funkcijų ir jų jungimosi su slopikliais tyrimui.

Darbo tikslas:

- panaudojant GST sistemą, sukurti keturias genetines konstrukcijas su PLK1, PLK2, PLK3 ir PLK4 genais, patikrinti jų raišką ir tikslinių baltymų tirpumą *E. coli* BL21 (DE3) bakterinėje sistemoje.

Darbo uždaviniai:

- klonuoti keturis žmogaus PLK reguliacinių Polo domenų genus į ekspresinį pGEX-4T-2 vektorių;
- atlikti gautų genetinių konstrukcijų restrikcinę analizę;
- patikrinti tikslinių genų ekspresiją gautose genetinėse konstrukcijose;
- teigiamus klonus sekvenuoti;
- atlikti gautų plazmidžių tikslinių genų baltymų tirpumo optimizavimą, esant kelioms skirtingoms temperatūroms ir skirtingam indukcijos laikui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Į Polo panašios kinazės

Į Polo panašios kinazės (angl. *Polo-like kinases, PLKs*) – serino/treonino kinazių šeima (EC 2.7.10–11). Savo pavadinimą jos gavo dėl funkcinio ir struktūrinio panašumo su būdingiausia *polo* kinaze iš *Drosophila melanogaster* [29]. Mielių, drozofilų ir žinduolių PLKs yra pagrindiniai mitozės reguliatoriai, kontroliuojantys mitozės pradžią, perėjimą iš metafazės į anafazę ir mitozės sėkmingą užbaigimą [47].

1.1.1. PLK vaidmuo ir paplitimas

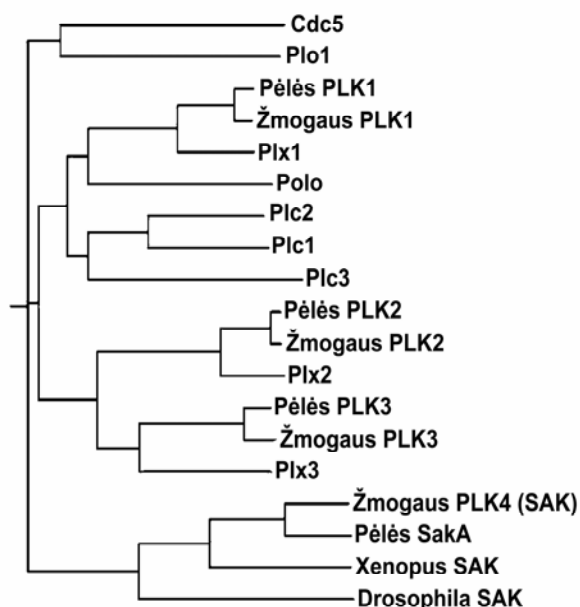
Į Polo panašios kinazės – svarbūs ląstelės ciklo reguliatoriai. Jos dalyvauja centrosomos brendime, ląstelės ciklo sustabdyme po DNR pažeidimų, mitotinės verpstės susidaryme, chromosomų judėjime ir išsiskyrimo, anafazės aktyvavime bei citokinezėje [10]. Žinduolių ląstelėse aptinkamos PLK1, PLK2, PLK3 ir PLK4 fosfotransferazės.

Polo šeimos kinazės buvo ištyrinėtos ir aprašytos pagrindiniuose eukariotiniuose organizmuose, tokiuose kaip *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, pelė ir žmogus [8; 41]. Pirmiausia Polo kinazė buvo nustatyta *Drosophila* šeimoje ir aprašyta kaip serino-treonino kinazė, kuri yra būtina mitozėje [26]. Drozofilos Polo genas yra būtinas verpsčių formavimesi ląstelės dalijimosi metu ir citokinezėje [8].

Musės, pumpuruojančios bei nelytiškai besidauginančios mitozės būdu mielės turi tikrai vieną PLK šeimos narį (atitinkamai Polo, Cdc5 ir Plo1). Žmogus, pelė, varlė ir kirmėlė turi tris PLK šeimos narius, pažymėtus kaip PLK1/Plx1/Plc1, PLK2/Plx2/Plc2 (pradžioje žinoma kaip Snk) ir PLK3/Plx3/Plc3 (pradžioje žinoma kaip Fnk arba Prk) [27; 46].

Ketvirtas PLK šeimos narys – PLK4 arba SAK – buvo charakterizuotas žmoguje ir pelėje, o taip pat nusekvenuotas varlėse ir musėse. PLK4 nuo kitų trijų žmogaus PLK skiriasi savo sandara, o tiksliau – C- terminalinės sekos struktūra [27].

Panaudojant *ClustalW* programą buvo palygintos pilnos žinomų PLK šeimos narių sekos [27]. Filogenetinė analizė parodo, kad kiekviena PLK grupė buriasi atskirai (1 pav.).

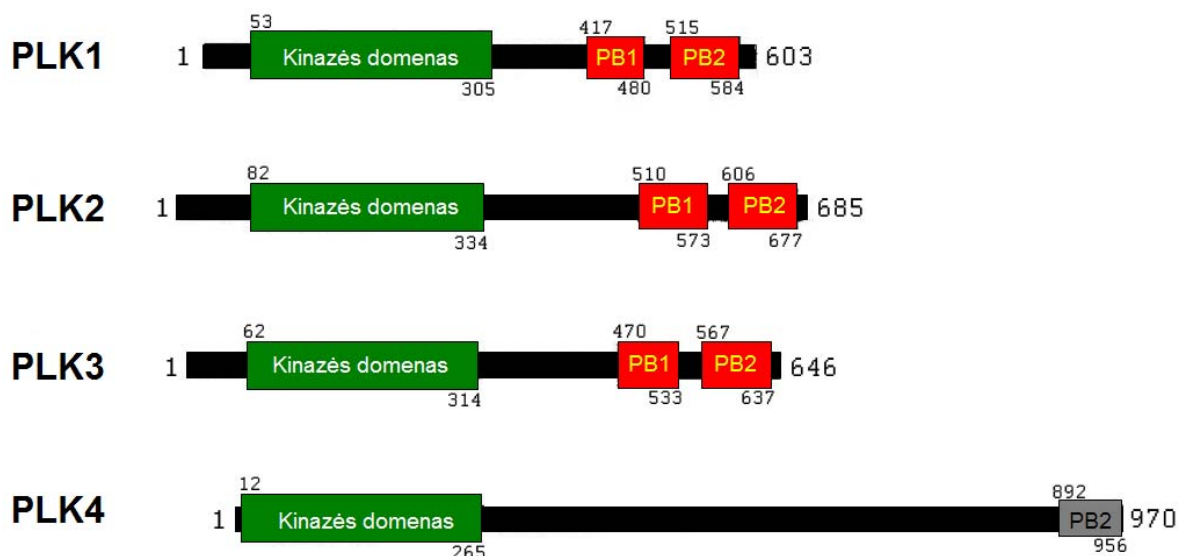


1 pav. PLK šeimos narių filogenetinė analizė [27]

Kol kas nėra aptikta baltymų, homologinių PLK bakterijose, archėjose ir augaluose. Stebina tai, kad augalai neturi, nes juose yra nuo ciklino priklausomų kinazių (angl. *cyclin-dependent kinases*) ir daug tų pačių ląstelinų mechanizmų, kaip ir mielėse bei gyvūnuose.

1.1.2. PLK baltymų struktūra

Visos PLK savo sudėtyje turi N- galinį Ser/Thr kinazės katalitinį domeną ir C- galinę sritį, susidedančią iš vienos ar dviejų Polo „dėžučių“ (toliau PB – „Polo box“) (2 pav.).

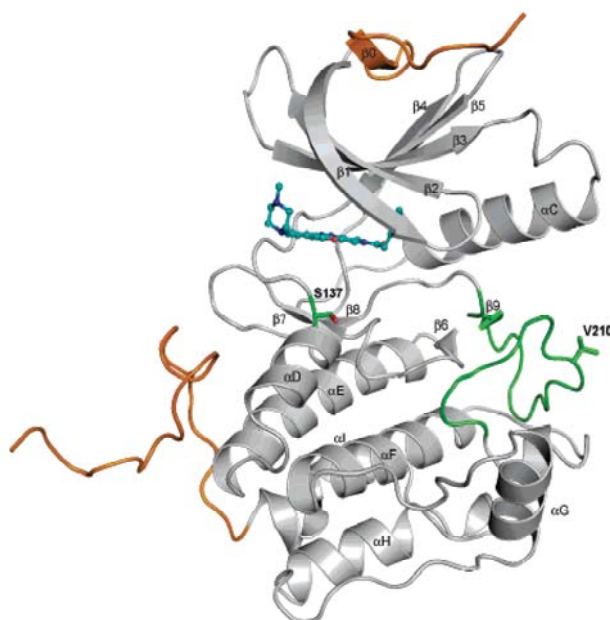


2 pav. Žmogaus į Polo panašių kinazių baltymų struktūra [29]

PLK1, PLK2, PLK3 bei jų homologų C- galas susideda iš dviejų Polo „dėžučių“, kurios funkcionuoja kaip vientisas PB domenas, atpažįstantis specifinius substratus – fosforilintus (Ser/Thr) baltymus, pagrindinai dalyvaujančius ląstelių dalijimesi. PLK4 turi tikrai vieną Polo „dėžutę“ PB domene, kuris homodimerizacijos dėka gali funkcionuoti panašiai kaip PB domenai, sudaryti iš dviejų Polo „dėžučių“ [20; 27].

1.1.2.1. PLK kinazės domenas

Ilgai PLK kinazės domeno struktūros negalėjo išaiškinti, tačiau šiuo metu ji jau yra žinoma. Žmogaus į Polo panašių kinazių katalitinį domeną sudaro 253–254 a. r. Geriausiai ištyrinėta yra PLK1, jos kinazės domėno struktūra pateikta 3 paveiksle.



3 pav. PLK1 kinazės domeno struktūra. Pilka spalva pažymėtas kinazės domenas, oranžine – kinazės domeno tęsinys N- ir C- galų kryptimis, žalia – aktyvacijos kilpa, mėlyna – ATP molekulė [23]

Pirmoji fosforilinimo vieta PLK1 katalitiniame domene – Thr-210 aminorūgšties liekana, kuri yra taip vadinamoje aktyvacijos kilpoje. Įvedus šios aminorūgšties mutaciją, pavyzdžiui, pakeitus ją į aspartatą arba valiną, pasikeičia PLK1 aktyvumas. Thr-210 fosforilinimas aktyvacijos kilpoje padidina PLK1 aktyvumą. Manoma, kad to pasėkmė – teisinga aktyvacijos kilpos konformacija, ir tada svarbūs aktyvūs radikalai yra tinkamai išsidėstę, kad galėtų prijungti substratą bei pagerinti katalitinį kinazės aktyvumą [23].

Kita fosforilinimo vieta – Ser-137, kurios fosforilinimas sukelia stiprų neigiamą krūvį ir padidina selektyvumą teigiamai įkrautiems aminorūgščių radikalams – Arg arba Lys. Ser-137

mutacija į aspartatą padidina PLK1 aktyvumą net septynis kartus. Įdomu tai, kad PLK1 Ser-137 aminorūgštis yra išsaugota PLK2 (Ser-166) ir PLK3 (Ser-107), o PLK4 ji yra pakeista į glutamo rūgšties liekaną (Glu-96) [27].

3 paveiksle pateiktoje schemeje Thr-210 yra pakeista į Val-210. Tokia PLK1 kinazės domeno mutacija yra pageidautina, norint gauti PLK1 katalitinio domeno kristalą. Pateikta PLK1 struktūra parodo tipišką kinazės susisukimą, kur ATP prisijungimo vieta yra lokalizuota plyšyje tarp N- galinės skilties (37–131 a. r.), sudarytos daugiausia iš antilygiagrečių β -klosčių, ir α -spiralizuotos C- galo skilties (138–330 a. r.). 306–330 aminorūgščių liekanos yra kinazės ir PB domenų jungianti grandis [23].

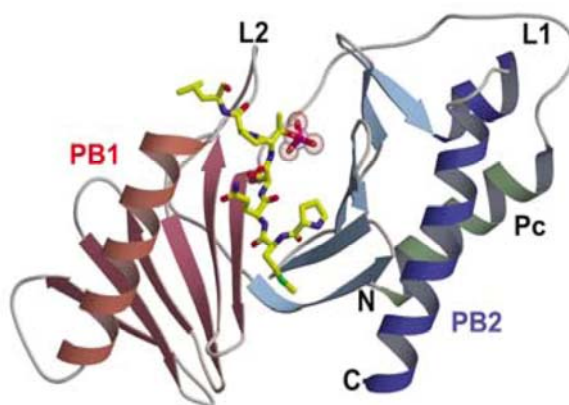
Žmogaus PLK kinazės modelio aktyvių vietų palyginimas rodo, kad PLK1, PLK2 ir PLK3 fosforilina panašius substratų motyvus, o PLK4 fosforilinama seka žymiai nuo jų skiriasi.

1.1.2.2. PLK reguliacinis Polo domenas

C-galinis PLK PB domenas yra svarbus teisingai PLK lokalizacijai ir veikimui. Profazės-metafazės metu PLK1 išsidėsto centrosomose ir kinetochoruose, o vėlesnių mitozės stadijų metu – centrinėje verpstėje. Tokią PLK buvimo vietą sąlygoja būtent kinazės PB domenas. Atlikti eksperimentai su pašalintu N- galu parodė teisingą kinazių lokalizaciją, tačiau, pašalinant nors vieną PB domeno Polo „dėžutę“, fermentas lieka citoplazmoje [29].

C- gale įvestos aminorūgščių mutacijos parodė, kad PLK1 nesugeba teisingai reguliuoti mitozės ir atlikti visų savo ląstelinių funkcijų. Per didelę atskiro PB domeno raišką neleidžia sėkmingai iki galo baigtis citokinezei pumpuruojančiose mielėse, o žinduolių ląstelėse sukelia ankstyvosios anafazės sustabdymą. Reguliacinio PB domeno funkcijos molekulinis pagrindas paaiškėjo neseniai, kai buvo įrodyta, kad pilnas PB domenas, susidedantis iš abiejų Polo „dėžučių“, regiono tarp jų ir dalies grandinės tarp kinazės domeno galo ir pirmos Polo „dėžutės“, funkcionuoja kaip vientisas su fosfoserinu/treoninu sąveikaujantis elementas. Taigi, reguliacinis PB domenas sąveikauja su daugeliu ląstelės dalinimesi dalyvaujančių baltymų, turinčių savo sekoje fosforilintą jungimosi prie PLK motyvą. Ši sąveika yra būtina teisingai PLK ir jos fosforilintam substratų viduląstelinei lokalizacijai, ir, tuo pačiu, tiksliai ląstelės ciklo eigos kontrolei ir ląstelių proliferacijai [27; 28].

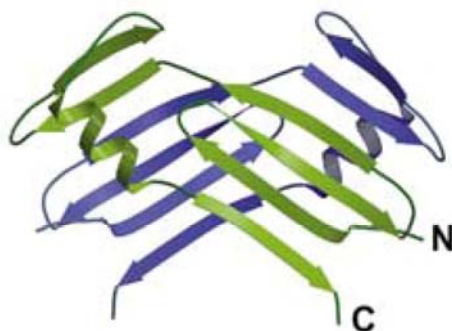
Kiekviena PLK1 Polo „dėžutė“ susideda iš šešių β -klosčių ir α -spiralių (4 pav.). Teisingai orientacijai abiejų Polo „dėžučių“ palaikyti padeda Polo „kepurėlė“ (angl. *Polo cap*, *Pc*), susidedanti iš α -spiralės, sujungtos per L1 jungtį su pirma PB1 β -grandine, ir prijungtos prie L2 grandinės, jungiančios abi Polo „dėžutes“ [12; 27].



4 pav. PLK1 PB domeno struktūra. Raudona ir mėlyna spalva pažymėtos dvi Polo „dėžutės“, žalia – Polo „kepurėlė“, geltona ir rausva spalva – fosforilintas peptidas [27]

PLK1 fosfotransferazės PB domeno kristalinė struktūra parodė, kad pSer/pThr jungimosi vieta yra suformuojama negiliume plyšyje tarp dviejų Polo „dėžučių“. Su fosfato grupėmis čia tiesiogiai sąveikauja tikrai His-538 ir Lys-540. Iš kristalinės PLK1 PB domeno struktūros ir mutantų analizės pastebėta, kad Trp-414 taip pat vaidina svarbų vaidmenį ligando prisijungime, o hidrofobinės aminorūgštys – Val-415 ir Leu-427 – yra būtinos ne tiesioginei sąveikai su ligandu, o struktūrinio PLK1 stabilumo palaikymui.

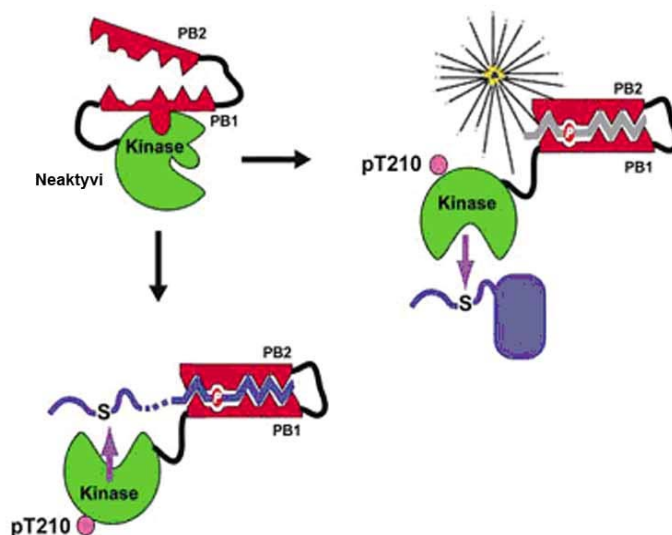
PLK4 PB domenai skiriasi nuo kitų žmogaus PLK, nes turi tikrai vieną Polo „dėžutę“. Kristalinė PLK4 PB domeno struktūra yra dimerinė, sudaryta iš dviejų α -spiralių ir šešių β -klosčių (5 pav.) [24].



5 pav. PLK4 PB domeno struktūra. Žalia ir mėlyna spalva pažymėti atskiri monomerai sudaro PLK4 PB domeno homodimerą [27]

Atlikti tyrimai parodė, kad pašalinus C- galą, kinazinis aktyvumas išauga septynis kartus, o tai reiškia, kad PB domenai gali inhibuoti kinazės katalitinį domeną. PB domeno jungimasis su ligandu ne tik sustiprina katalitinio domeno sąveiką su substratu, bet ir tuo pačiu metu padidina jo aktyvumą, garantuodamas pilnos PLK1 aktyvacijos jos substratais teisingoje vietoje tam tikru

reikiamu momentu. PB domeno sąveika su kinazės katalitiniu domenu vyksta tik tuomet, kai PLK1 yra nefosforilinta, pavyzdžiui, G1 ląstelės ciklo fazėje. Kinazės domeno aktyvavimas – specifinis aktyvacijos kilpoje esančio Thr-210 fosforilinimas – gali apsaugoti aktyvacijos kilpą nuo inhibicijos C- galu (6 pav.) [12; 46].



6 pav. Du galimi substrato nukreipimo į PB domeną modeliai [27]

PLK2 PB domenas yra būtinas kinazės prisijungimui prie centrosomų ir centriolių padvigubėjimui [19].

Atlikti tyrimai su PLK3, kurios katalitinis domenas buvo pašalintas, atskleidė defektus citokinezėje, įskaitant chromosomų neteisingą atsiskyrimą bei kitas citokinezės ydas, dvibranduolių ir poliploidinių ląstelių susidarymą. PLK3 PB domenas kontroliuoja centrosomų išsidėstymą; išreguluota šio domeno ekspresija sukelia ląstelių apoptozę [20].

1.1.3. PLK padėtis ląstelėje

Žmogaus PLK1, PLK2 ir PLK3 yra ekspresuojamos visuose audiniuose, o PLK4 mRNR suaugusio žmogaus organizme yra tik sėklidėse ir užkrūčio liaukoje [29]. Serino/treonino kinasės, dalyvaujančios ląstelių proliferacijoje, yra lokalizuotos arba citoplazmoje, arba branduolyje [45].

Pirmiausia PLK1 buvo įtraukta į centrosomų ciklą dėl jos viduląstelinės lokalizacijos. Rekombinantinio žaliai fluorescuojančio baltymo raiška patvirtino, kad interfazėje ir mitozėje PLK1 yra susikoncentravusi centrosomoje. Profazės-metafazės metu ji jungiasi prie verpstės

polinių siūlų ir kinetochorų. Ankstyvoje anafazėje PLK1 persikelia į centrinę verpstę ir išlieka joje iki ląstelės dalijimosi pabaigos [3; 8; 46].

Ankstyvoje G1 ląstelės ciklo fazėje PLK2 išsidėsto centriolėse, kur ji yra susijungusi su motinine centriole, o vėliau S fazės pradžioje pasiskirsto abiejose motininėse ir dukterinėse centriolėse [19].

Pirmiausia buvo nustatyta, kad PLK3, kaip ir PLK1, yra lokalizuota centrosomose, po to verpsčių poliuose, o paskui išsidėsto centrinėje verpstėje [10; 20]. Vėliau atlikti tyrimai parodė, kad PLK3 išsidėsto būtent branduolėlyje, kuriame jos kiekis išauga iki maksimalaus ląstelės ciklo G1 stadijos metu [47].

Taip į Polo panašių kinazių lokalizacija yra susijusi su jų atliekamomis funkcijomis.

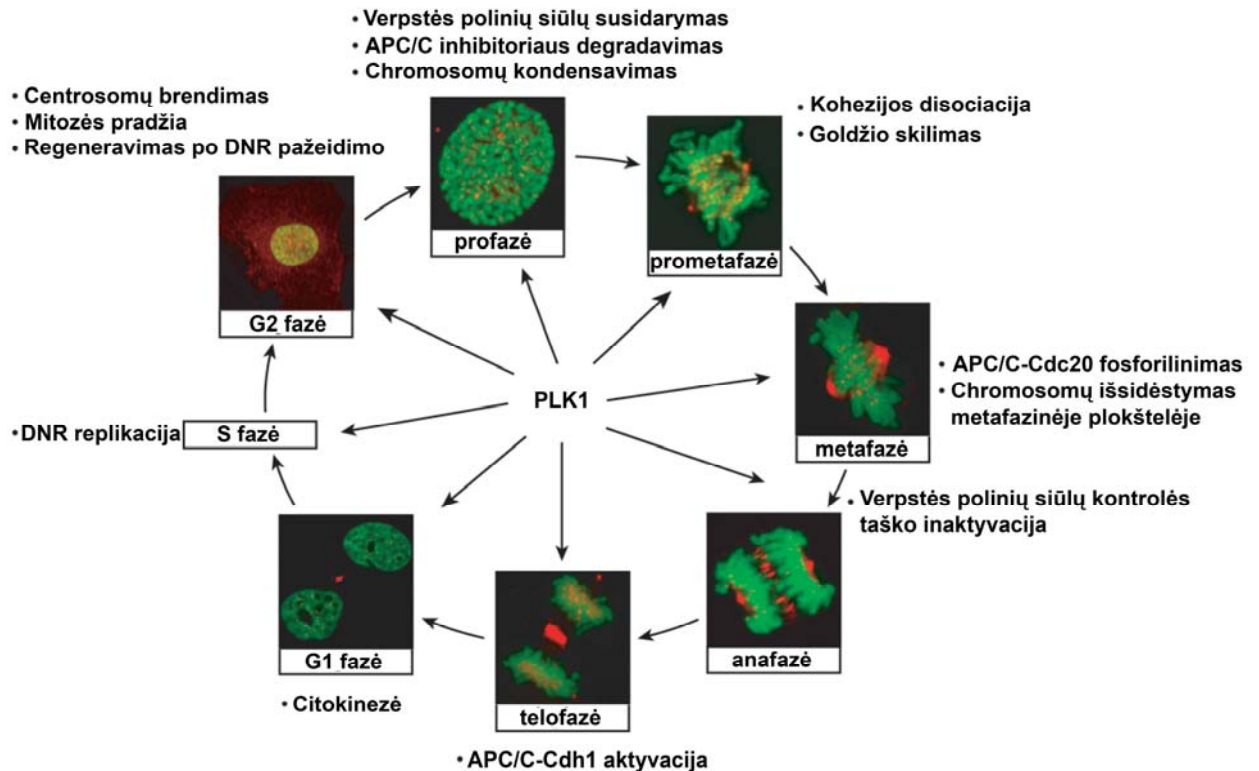
1.1.4. PLK funkcijos

Į Polo panašios kinazės yra ląstelės ciklo reguliatoriai. Kiekviena PLK atlieka savo funkcijas, jos yra būtinos ląstelės gyvavimo ir dalijimosi metu.

Daugiausia PLK1 aptinkama greitai proliferuojančiuose audiniuose, kurių ląstelėse atlieka savo pagrindines funkcijas (7 pav.). Be šios kinazės ląstelių pasidalijimas nėra įmanomas. Ji skatina mitozės pradžią aktyvuodama Ciklino B/Cdk1 kompleksą ir fosforilindama Cdc25C fosfatazę. PLK1 reaguoja į DNR pažeidimą G2 ląstelės ciklo metu, tuo atveju kinazės aktyvumas yra slopinamas. PLK1 taip pat dalyvauja centrosomų bredime ir atsiskyrimo. Ji fosforilina centrosomos baltymą Nlp, kuris sukelia verpstės polinių siūlų susidarymą. PLK1 pilnai pašalina kohezino baltymų kompleksą, kuris palaiko seserines chromatides kartu iki jų atsiskyrimo anafazėje [37; 46]. Nustatyta, kad PLK1 išsėmimas sukelia verpstės monopolinių siūlų susidarymą [9; 30; 46], o per didelę jos raišką – daugiabranduolių ląstelių atsiradimą [10]. Atlikti eksperimentiniai tyrimai parodė, kad PLK1 aktyvumas inhibuojamas G2 ląstelės ciklo metu žmogaus navikinėse ląstelėse, veikiant jas jonizuojančia spinduliuote [2].

Neseniai PLK1 buvo įtraukta į chromosomų išsidėstymo metafazinėje plokteleje kontrolę. Ji yra būtina mikrovamzdelių-kinetochorų saveikos stabilizavimui, nes sukelia mikrovamzdelių išsitempimą [10; 46]. Taip pat PLK1 aktyvuoja anafazę skatinantį kompleksą (angl. *anaphase-promoting complex/cyclosome*, APC/C), kuris yra nukreiptas į ląstelės reguliatorinių baltymų degradavimą, kas sukelia mitozės pabaigą ir perėjimą į G1 ląstelės ciklo stadiją [11; 39; 46].

Kelios PLK šeimos narės, tame tarpe ir PLK1, buvo įtrauktos į citokinezę. Nustatyta, kad PLK1 nėra būtina, kad prasidėtų citokinezė, tačiau ji fosforilina kelis kitus baltymus, dalyvaujančius citokinezėje ir yra būtina sėkmingam jos užbaigimui [3; 9; 46].



7 pav. Įvairių PLK1 ląstelės ciklo metu funkcijų apibendrinimas [46]

Daugelyje rūšių PLK1 aktyvuojama ankstyvoje mitozėje. Manoma, kad jos aktyvavimas priklauso nuo ankstesnės Cdk1 aktyvacijos, bet aktyvavimo esminiai mechanizmai kol kas nėra išaiškinti. PLK1 sintezė išauga ankstyvoje G2 fazėje, kai vyksta padidinta geno raiška. Šios kinazės fermentinis aktyvumas taip pat išauga mitozėje turbūt kaip rezultatas specifinių aktyvuojamų vietų fosforilinimo. Jau yra nustatytos kelios kai kurių rūšių PLK1 baltymų fosforilinimo vietos, tačiau, ar šios kinazės taip pat veikia ir *in vivo*, kol kas nėra žinoma [8].

PLK1 aktyvumo slopinimo rezultatas, panaudojant antikūnų injekcijas, – dvigubos ląstelės su neatsirtomis chromosomomis. Tai įrodo, kad PLK1 gali būti įtraukta į centrosomų brendimo reguliavimą, bet ne padvigubėjimą. PLK1 antikūnų injekcijos neblokuoja DNR sintezės, o DNR replikacija ir centrosomų padvigubėjimas ir padėtis ląstelėje yra reguliuojama kitų fermentų [8].

PLK2 yra aktyvuojama G1/S fazių perėjimo metu ir vaidina svarbų vaidmenį centrosomų padauginime ląstelės ciklo metu, todėl buvo pavadinta centrosominiu baltymu. PB domenas padeda PLK2 prisijungti prie centrosomų ir dalyvauti centriolių padvigubėjime kartu su PLK4 kinaze [17; 19; 46]. PLK2 nėra būtina ląstelių dalijimuisi, tačiau turi įtakos ląstelės G1 fazės progresavimui [10].

PLK1 ir PLK2 kartu reguliuoja centrosomų funkcijas, tačiau skirtingu ląstelės ciklo metu. Pirmiausia PLK2 reguliuoja centriolių padvigubėjimą S fazėje, o paskui PLK1 užtikrina centrosomų brendimą vėlesnėje G2 fazėje. PLK2 taip pat dalyvauja ląstelės ciklo sustabdyme po DNR pažeidimų [46]. Esant taksolui arba nokodazolui, PLK2 yra slopinama, o tai žymiai paskatina apoptozę, nes ši kinazė užkerta kelią mitozės katastrofai, kuri įvyksta dėl verpsčių pažeidimo [46].

Žmogaus PLK3 (Prk) pasižymi gana žemu kinaziniu aktyvumu mitozėje, G1 ir G1/S fazių metu ir pasiekia aukščiausią tašką vėlesnėse S/G2 ląstelės ciklo stadijose [13]. Be to, yra nustatyta, kad PLK3 atlieka ląstelines adhezijos funkcijas [46].

Bendrai, biologinės PLK1 ir PLK3 funkcijos yra priešingos viena kitai. Pavyzdžiui, per didelę pelių PLK1 raiška baigiasi onkogeneze, tuo tarpu padidinta PLK3 ekspresija stabdo ląstelių augimą ir sukelia jų apoptozę. Esant DNR pažeidimui, PLK3 kiekis nesikeičia, žymiai išauga tik tai jos aktyvumas [46]. Šiuo atveju PLK3 veikia kaip Cdc25C baltymo ir G2/M fazių perėjimo inhibitorius [10].

PLK4 mRNA kiekis padidėja G1 fazėje ir toks išlieka S fazės ir mitozės metu prieš sumažėjimą G1 fazės pradžioje. Šios kinazės funkcijos yra susijusios su ląstelių dalijimusi mejozės ir mitozės būdu, ji yra būtina ląstelių išgyvenimui. Per didelę pelių PLK4 raiška stabdė kolonijų formavimąsi CHO ląstelėse, be to, buvo pastebėtas daugiabranduolių ląstelių padidėjęs kiekis [10; 13; 46].

1.1.5. PLK ir vėžys

Tarp ląstelių proliferacijos ir diferenciacijos yra tam tikra pusiausvyra. Norint paskatinti onkogenezę, reikia tą pusiausvyrą pastumti į proliferacijos pusę. Nustatyta, kad padidėjęs PLK1 aktyvumas/kiekis ląstelėje skatina ją dalytis. Priešingai, mieloidinės baltakraujystės atveju prieš galutinę ląstelių diferenciaciją PLK1 kinazės mRNA kiekis staigiai sumažėja. Remiantis gausybe ištirtų žmogaus navikų duomenimis, nutarta, kad PLK1 gali būti geru ženklu ląstelių proliferacijai. Padidėjęs PLK1 kiekis buvo aptiktas plaučių, kasos, krūties, kiaušidžių vėžio, melanomoje ir daugelyje karcinomų atvejais. Atlikti įvairūs skaičiavimai parodė, kad PLK1 raiška koreliuoja su galima navikų metastaze ir sergančių vėžiu pacientų prognoze [10; 24].

Mutantinės PLK1 su pakeistais aminorūgščių radikalais, reikalingais kinazės aktyvacijai, raiška stabdo PLK1 inaktyvaciją ir nukreipia ląsteles į G2 fazės valdymą, gydant doksorubicinu. Taip pat PLK1 aktyvumas išlieka vėžinėse ląstelėse, kai gydant kafeinu yra apeinamas G2 fazės kontrolės taškas. Keli nesusiję tyrimai rodo, kad normalios epitelinės ląstelės ir fibroblastai patiria G2 fazės areštą, kai yra inaktyvuojama PLK, nesant DNR degradacijai [2].

PLK1 slopinimas, panaudojant antikūnus prieš PLK1, dominuojančius neigiamus mutantus, oligonukleotidus arba mažas įterptas RNR, gali baigtis mitozės katastrofa. PLK1 išsėjimas inhibuoja seserinių chromatidžių atsiskyrimą ir sukelia citokinezės žlugimą [16]. Be to, mitozės areštas buvo aptiktas tuo atveju, kai ląstelės patyrė nebaigtą citokinezę ir apoptozę. Nustatyta, kad dauguma ląstelių su sumažintu PLK1 kiekiu patiria dalijimosi nesėkmę būtent prometafazės metu. Šios ląstelės su PLK1 trūkumu negali išrikiuoti savo chromosomų į vieną eilę metafazinėje plokštumoje ir nukreipti centrioles į priešingus polius. Šias ydas sukelia būtent nesubrendusių centrosomų defektai. Tačiau, mažinant PLK1 kiekius visame organizme, išlieka tikimybė galimų pašalinių efektų, ypač normaliai proliferuojančiuose audiniuose [10].

PLK4 yra išskirtinė PLK šeimos narė. Ji yra įtraukta į centrosomų atskyrimą ir mitozės tikslumą. Pelių tyrimai parodė, kad šios kinazės trūkumas baigiasi embriono mirtimi. Be to, PLK4 apsaugo ląstelės genominį vientisumą [5].

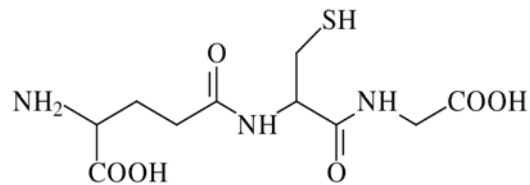
Per didelę žinduolių PLK raiška yra tiesiogiai susijusi su ląstelių proliferacija ir onkogeneze [20]. Kuriant mažas molekules-inhibitorius prieš PLK1, kurie yra nukreipti į ATP prisijungimo vietą, buvo susidurta su viena problema, susijusia su tuo, kad šios molekulės slopina daugelį kitų ląstelės kinazių, o tai lemia didelį junginių toksiškumą [16]. PB domenas yra būdingas tik į Polo panašioms kinazėms, todėl inhibitoriai, besijungiantys prie PB domeno, būtų žymiai specifiskesni. Tokių slopiklių dar nėra, jų sukūrimas būtų didelis žingsnis į priekį priešvėžinių vaistų kūrime [20; 24].

Kadangi yra manoma, jog kai kurios į Polo panašios kinazės, pavyzdžiui, PLK3, gali funkcionuoti kaip naviko supresoriai, yra pageidautina, kad prieš PLK1 kuriami slopikliai būtų kuo specifiskesni šiam baltymui ir kuo mažiau slopintų kitas PLK.

1.2. GST sistema

1.2.1. Glutathiono-S-transferazė

Glutathionas yra tripeptidas, susidedantis iš glutamo rūgšties, cisteino ir glicino (8 pav.). Jis gali būti oksiduotoje arba redukuotoje formoje [22].



8 pav. Glutathionas (GSH) [43]

Transferazė (EC 2) – tai fermentas, katalizuojantis metilo, glikozilo, acilo, fosforą turinčios ar kitos grupės pernešimą nuo vieno junginio (donoro) prie kito (akceptorius) [4].

Glutathiono-S-transferazės (GST) (EC 2.5.1.18) – fermentai, padedantys junginiams jungtis su glutathionu. Jos katalizuoja įvairias nuo glutathiono priklausančias reakcijas [4]. GST baltymo molekulinė masė yra 26 kDa, jis gali būti ekspresuojamas *E. coli*, nes taip pilnai išlaiko savo fermentinį aktyvumą [15].

Glutathiono-S-transferazės pripažintos kaip didelę endogeninių ir ksenobiotinių junginių grupę detoksikuojantys fermentai, katalizuojantys šių medžiagų jungimąsi su glutathionu. Jos taip pat pasižymi peroksidaziniu ir izomeraziniu aktyvumu bei bioaktyvuoja kai kurias kancerogenines medžiagas. GST aptinkamos daugelyje audinių, ypač smegenyse, hipofizėje, širdyje, plaučiuose, kepenyse, inkstuose, antinksčiuose, kasoje ir lytinėse liaukose [14].

1.2.2. GST genų suliejimo sistema

Glutathiono-S-transferazės genų suliejimo sistema (angl. *Glutathione-S-transferase Gene Fusion System*) yra universali sistema, pritaikyta su GST sulietų baltymų ekspresijai *Escherichia coli* ir jų gryninimui. Sistemos pagrindą sudaro indukuojama su *Schistosoma japonicum* GST seka sulietų baltymų ekspresija. Šių baltymų N- gale yra tirpaus GST baltymo seka, o C- gale – tikslinis baltymas.

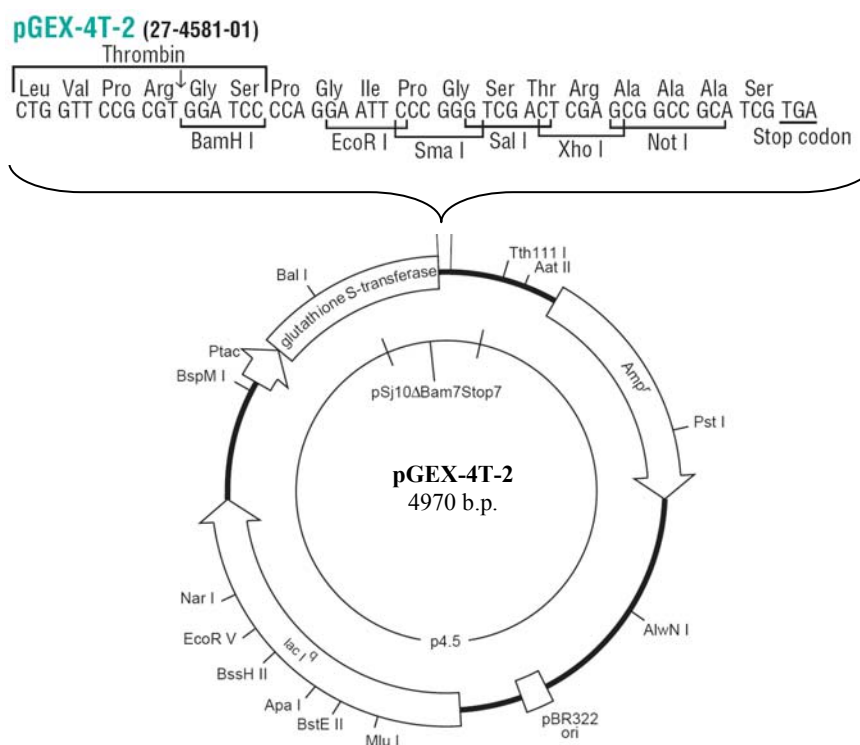
Glutathiono-S-transferazės genų suliejimo sistema pilnai išlaiko ekspresuoto *E. coli* ląstelėse GST baltymo fermentinį aktyvumą. Pats GST baltymas ne tik pagerina su juo sulietų baltymų tirpumą, bet ir suteikia galimybę efektyviai išgryninti baltymą afininės chromatografijos

būdu, panaudojant imobilizuotą glutationą. GST genų suliejimo sistema jau buvo sėkmingai pritaikyta molekulinėje imunologijoje, vakcinų gamyboje, baltymo-baltymo ir DNR-baltymo sąveikų tyrimuose [15].

1.2.3. Klonavimas panaudojant pGEX ekspresijos vektorius

Tiksliniai baltymai, turintys GST seką, konstruojami panaudojant pGEX plazmidės. Genas arba geno fragmentas yra įterpiamas į vektoriaus daugybinio klonavimo regioną. Baltymo raiška kontroliuojama *tac* promotoriumi, kuris indukuojamas laktozės analogu – isopropil-β-D-tiogalaktozidaze (IPTG). Kiekvienoje pGEX plazmidėje yra *lacI^q* genas, kurio produktas – baltymas-represorius, jungiantis prie operatoriaus *tac* promotoriaus vietoje ir stabdantis tikslinio geno raišką, nesant IPTG [15]. Taip yra kontroliuojama tikslinio geno raiška.

Šiame darbe naudojamas vienas iš ekspresinių pGEX šeimos vektorių – pGEX-4T-2 (9 pav.).



9 pav. pGEX-4T-2 vektoriaus konstrukcija [15]

pGEX-4T-2 vektoriaus pagrindinės charakteristikos yra:

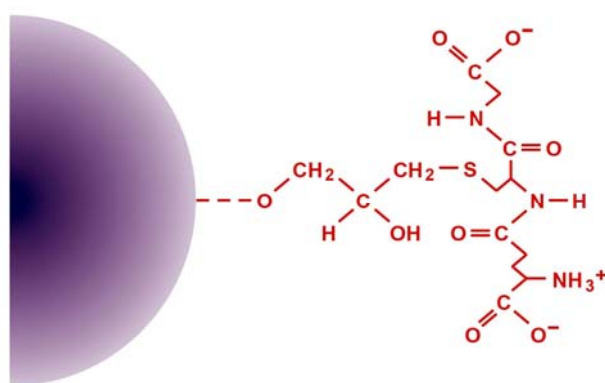
- *Ori* seka – plazmidės replikacijos pradžios seka;
- *tac* promotorius, kuris aktyvuojamas izopropil-β-D-tiogalaktozidu (IPTG);
- *Amp^r* genas, apsprendžiantis atsparumą ampicilinui, koduojantis β-laktamazę;

- $LacI^q$ genas, koduojantis represorinį baltymą, kuris jungiasi su *lac* operatoriaus seka;
- Glutatio-S-transferazės baltymą koduojantis genas, prie kurio prikabinamas klonuojamas genas;
- Daugybinio klonavimo regionas – MCS (angl. *multiple cloning site*) su jame esančiomis daugelio restrikcijos endonukleazių skėlimo sekomis;
- Trombino proteazės skėlimo vieta, esanti tarp GST baltymą koduojančio geno ir daugybinio klonavimo regiono.

Pageidautina, kad įterpiamas DNR geno fragmentas neviršytų 2 kb. p. Be to, karpant ir liguojant, turi būti išlaikytas skaitymo rėmelis.

1.2.4. GST seką turinčių baltymų gryninimas ir GST sekos pašalinimas

Su GST seka sujuntų baltymų gryninimui iš bakterijų lizato naudojama afininė chromatografija su glutationu, imobilizuotu ant matricos, pavyzdžiui, sefarozės (10 pav.). Glutationas prijungiamas prie sorbento per epoksido grupę. Tokia galutinė struktūra yra komplementari glutatio-S-transferazei, sulietai su tiksliniu baltymu. Tiksliniai baltymai, turintys GST seką yra sulaikomi sorbento, o priemaišos yra pašalinamos su skysta baltymų tirpalo frakcija. Sulieti baltymai vėliau eliuojami švelniomis, nedematūruojančiomis sąlygomis, panaudojant redukuotą glutationą. Toks gryninimo procesas išsaugoja baltymo antigeniškumą ir funkcijas [15; 18].



10 pav. Galutinė glutatio sefarozės struktūra [15]

GST seka nuo tikslinio baltymo gali būti atskelta panaudojant specifines proteazes, kurių atpažinimo vieta pGEX plazmidėse yra prieš pat daugybinio klonavimo regioną. Po to grynas baltymas gali būti tiriamas kolorimetriniais ir imunologiniais metodais [15].

1.3. Bakterinė raiškos sistema

1.3.1. Genų raiškos reguliavimas prokariotinėse sistemose

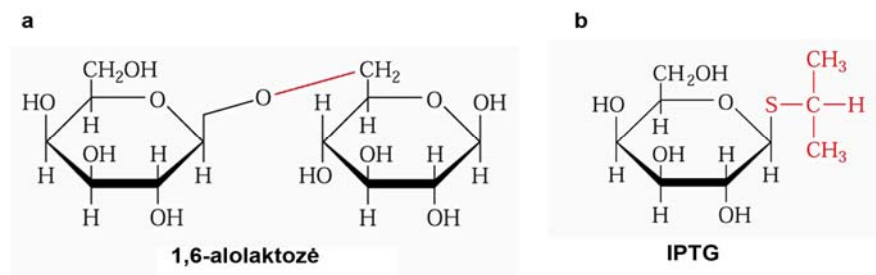
Prokariotuose genų raiška yra reguliuojama keliuose skirtinguose lygmenyse: transkripcijoje, mRNR susidaryme ir veikime, transliacijoje bei fermento veikime. Tačiau geriausi reguliatoriniai mechanizmai veikia transkripcijos lygyje [36].

F. Jakobas ir Ž. Mono 1961 m. išaiškino operono modelį, parodė, kad genų raišką *E. coli* reguliuoja du pagrindiniai elementai – represorius ir operatorius. Susijungęs su operatoriumi represorius neleidžia RNR polimerazei transkribuoti struktūrinių genų, esančių operone. Operoną sudaro grupė šalia esančių struktūrinių genų, promotorius (vieta, prie kurios jungiasi RNR polimerazė) ir operatorius [25; 36].

E. coli veikia laktozės (*lac*) operonas, kurį sudaro promotorius, operatorius, trys struktūriniai genai – *lacZ*, *lacY* ir *lacA*, koduojantys atitinkamai β-galaktozidazę, β-galaktozido permeazę ir β-galaktozido transacetilazę. β-Galaktozido permeazė transportuoja laktozę į ląstelės vidų, β-galaktozidazė skaldo ją iki gliukozės ir galaktozės, β-galaktozido transacetilazė perneša acetilo grupes nuo acetil-CoA ant β-galaktozidų [25; 36].

Regulatorinis *lacI* genas koduoja 360 a. r. ilgio represorių, kuris aktyvioje formoje yra tetrameras, turintis *lacI* geno produkto keturias kopijas. Nesant induktoriui, represorius jungiasi prie *lac* operatoriaus sekos ir neleidžia RNR polimerazei katalizuoti šių trijų struktūrinių genų transkripcijos. Tuo metu sintetinos tik kelios *lacZ*, *lac Y* ir *lacA* genų baltymų molekulės, palaikančios gana žemą fermentinį efektyvumą, kuris yra būtinas *lac* operono indukcijai, nes būtent tuo metu β-galaktozidazės pagalba iš laktozės sintetinama alolaktozė (11 a pav.) – operono induktorius [21; 25; 36].

Remiantis *lac* operono reguliacijos principu buvo sukurta rekombinantinių baltymų indukuojama *E. coli* raiškos sistema. Šiuo metu rekombinantinių baltymų gavimui bakterijų sistemose yra dažnai naudojamas į alolaktozę struktūriškai panašus junginys – izopropil-β,D-tiogalaktopiranozidas (IPTG) (11 b pav.).



11 pav. *lac* operono induktoriai: alolaktozė ir IPTG [42]

Labai svarbi promotoriaus charakteristika – paprastumas ir indukcijos pigumas. IPTG indukuojamų promotorių pagrindinis trūkumas yra tai, kad jie nėra pilnai inaktyvuojami, nesant induktoriaus, ir todėl netinka ląstelėms toksinių baltymų gavimui. Be to, IPTG indukuojami promotoriai nėra optimalūs žmogaus terapinių baltymų masinei gamybai, nes IPTG yra pakankamai brangus induktorius [21].

1.3.2. Rekombinantinis *Escherichia coli* BL21 (DE3) ląstelių kamienas

Escherichia coli buvo pirmas šeimininkas, panaudotas rDNR vaistų gamybai. Tačiau prieš kelis dešimtmečius terapinių baltymų gamyba prasidėjo žinduolių ląstelėse dėl *E. coli* producento pagrindinių trūkumų – neatlieka potransliacinių modifikacijų. Daugelyje atvejų *E. coli* gaunami tiksliniai baltymai neturi savo teisingos struktūros, reikiamo aktyvumo ir kitų svarbių požymių [40].

Darbo metu buvo naudotas rekombinantinis *E. coli* BL21 (DE3) ląstelių kamienas, turintis tokias genetines charakteristikas: *E. coli*, B, F⁻, dcm, ompT, hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻), galλ(DE3) [1].

Rekombinantinis BL21 (DE3) kamienas yra išvestas iš laukinio *E. coli* B kamieno; jis neturi F plazmidės (F⁻ mutacija), nėra metilinami DNR esantys citozinai (*dcm* mutacija) [38]. BL21 (DE3) turi mutacijas savo chromosominėje DNR, dėl kurių nesintetina *Lon* ir *OmpT* proteazių, galinčių suardyti tikslinį baltymą gryninimo metu. Tačiau jame sintetinamos kitos proteazės, galinčios turėti įtakos rekombinantinio baltymo ekspresijai ir kaupimuisi ląstelėje [31].

BL21 (DE3) kamieno ląstelės yra išvesto λ bakteriofago DE3, turinčio imuninį fago 21 regioną, *lacI* geną, *lacUV5* promotorių ir T7 RNR polimerazės geną, lizogenai. Seka yra įterpta į *int* geną, taip apsaugant DE3 nuo fagų padedamos integracijos arba pašalinimo iš chromosominės DNR. DE3 lizogenai savo chromosominėje DNR turi įterptą T7 RNR polimerazės geną, kontroliuojamą *lacUV5* promotoriumi (*gal* λ(DE3) mutacija) [38].

Toks BL21 (DE3) išvestas *E. coli* kamienas gali būti naudojamas nesudėtingiems žinduolių baltymams ekspresuoti.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Aparatūra ir medžiagos

2.1.1. Aparatūra

Darbe naudoti prietaisai ir aparatūra:

1. Šaldoma centrifuga „Beckmann“
2. Šaldoma mikrocentrifuga „Eppendorf Centrifuge 5415 R“
3. Termostatas „Eppendorf TermoStat plus“
4. Termostatuojama purtyklė „LaboChema“
5. Maišyklė (mikseris) „BIOSAN“
6. Magnetinė maišyklė „BIOSAN“
7. „Biometra“ srovės šaltinis
8. „Roth“ srovės šaltinis
9. Horizontalios elektroforezės aparatas „Sigma-Aldrich“ ir jo priedai
10. Poliakrilamidinio gelio elektroforezės aparatas „BIO-RAD“ ir jo priedai
11. Transiluminatorius „ULTRA-LŪM“
12. Laminarinis boksas
13. Ultragarso šaltinis „Bandolin Sonopuls“
14. pH-metras „LaboChema“
15. Analitinės svarstyklės
16. Laboratorinės svarstyklės „Kern 440-35N“
17. Spektrofotometras „Jenway 6305“
18. Autoklavas
19. Elektrinė plytelė

2.1.2. Medžiagos ir reagentai

Darbe naudotos medžiagos ir reagentai:

1. Agarozė
2. Agaras
3. Akrilamidas
4. Akrilamidas-BIS (N,N' – metilen-Bis-akrilamidas)
5. Akrilamidinio gelio dažas (Coomassie Brillinat Blue R-250)
6. Ampicilinas
7. Amonio persulfatas

8. Bromfenolio mēlis
9. β -merkaptoetanolis
10. CH₃COOK
11. dNTP (deoksiribonukleotidai)
12. Druskos rūgštis
13. DTT (ditiotrietolis)
14. EDTA (etilendiaminotetraacto rūgštis)
15. Etidžio bromidas
16. Etilo alkoholis
17. Fermentai ir jų rinkiniai
18. Glicerolis
19. Glicinas
20. HEPES (N-2-hidroksietilpiperazanas-N'-2-etano sulfonrūgštis)
21. IPTG (izopropil- β ,D-tiogalaktozidas)
22. Izopropanolis
23. Kazeino hidrolizatas
24. Ledinė acto rūgštis
25. Mielių ekstraktas
26. Monotioglicerolis
27. NaCl
28. NaOH
29. PMSF (fenil-metil-sulfonilfluoridas)
30. Polietilenglikolis
31. SDS (natrio dodecilsulfatas)
32. TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiaminas)
33. Tritonas X-100
34. TRIS ((hidroksimetil)-aminometanas)
35. Urėja

2.1.3. Tirpalai ir buferiniai tirpalai

1. Ampicilino tirpalas: 1 g ampicilino tirpinama 10 mL dejonizuoto vandens, koncentracija 100 μ g/ μ L.
2. 0,5 M EDTA tirpalas: 37,22 g Na₂EDTA \times 2H₂O tirpinama 140 mL dejonizuoto vandens, NaOH privedamas pH iki 8,0 ir pripildoma dejonizuoto vandens iki 200 mL.

3. TAE buferinis tirpalas (50 kartų koncentruotas): 1 L: 242 g TRIS, 100 mL 0,5 M EDTA, 57,1 mL ledinės acto rūgšties. Prieš naudojimą buferis skiedžiamas.
4. TE buferinis tirpalas: 10 mM TRIS (pH 8,0); 1 mM EDTA.
5. Šarminės lizės tirpalas (P1): 50 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNazė.
6. Šarminės lizės tirpalas (P2): 200 mM NaOH; 1 % SDS.
7. Šarminės lizės tirpalas (P3): 3 M CH₃COOK (pH 5,5).
8. 70 % etanolis (–20 °C).
9. 95 % etanolis (–20 °C).
10. 30 % Akrilamidas/Bis-akrilamidas: 29,2 g AA ir 0,8 g BAA ištirpinama vandenyje, praskiedžiama iki 100 mL ir filtruojama. Laikoma tamsoje +4 °C temperatūroje iki 30 dienų.
11. 1,5 M TRIS-HCl buferinis tirpalas: 18,15 g TRIS ištirpinama 70 mL dejonizuoto vandens, pH iki 8,8 koreguojamas su du kartus praskiesta HCl rūgštimi, praskiedžiama iki 100 mL ir filtruojama. Laikoma tamsoje +4 °C temperatūroje iki 30 dienų.
12. 1,0 M TRIS-HCl buferinis tirpalas: 12,0 g TRIS ištirpinama 50 mL dejonizuoto vandens, pH iki 6,8 koreguojamas su du kartus praskiesta HCl rūgštimi, praskiedžiama iki 100 mL ir filtruojama. Laikoma +4 °C temperatūroje iki 30 dienų.
13. 10 % SDS
14. 10 % APS
15. Kumasi R-250 dažo tirpalas: 0,62 g R-250 ištirpinama 113 mL 95 % etanolio, pridedama 23 mL ledinės acto rūgšties, praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 250 mL ir filtruojama.
16. Elektroforezės buferinis tirpalas: 0,025 M TRIS, pH 8,3–8,6 (nekoreguojamas), 1,9 M glicino, 0,035 M SDS.
17. Pavyzdžio buferinis tirpalas (6 kartus koncentruotas): 350 µL 0,5 M TRIS, pH 6,8, 50 mg SDS, 46 mg DTT, 150 µL glicerolio.
18. Bromfenolio mėlis: 0,05 % (m/V).
19. Ardymo buferinis tirpalas (pH 7,5): 10 mM HEPES; 0,2 mM NaCl; 0,01 % (V/V) monotioglicerolis; 1 % (m/V) Tritonas X-100; 2 mM PMSF; 1 mM β-merkptoetanolis.
20. 8 M urėja, pH 8,0.

2.1.4. Rinkiniai

1. DNR išskyrimui iš agarozinio gelio naudojamas „DNA Extraction Kit“ („Fermentas“) rinkinys.
2. DNR išskyrimui sekvenavimui naudojamas „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ („Fermentas“) rinkinys.

3. Ligavimo rinkinys:
 - Ligavimo buferinis tirpalas (10 kartų koncentruotas);
 - T4 DNR ligazė;
 - PEG₄₀₀₀ (1/10 viso ligavimo mišinio tūrio).
4. Restrikcijos rinkinys:
 - Restrikcijos buferiniai tirpalai (10 kartų koncentruoti);
 - Restrikcijos endonukleazės (*AlwNI*, *BamHI*, *BsaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *Eco31I*, *HincII*, *HindIII*, *Ksp632I*, *NdeI*, *NotI*, *PdmI*, *PvuI*, *PvuII*, *Sall*, *ScaI*, *SmaI*, *StuI*).
5. DNR galų bukinimo rinkinys:
 - Klenow buferinis tirpalas (10 kartų koncentruotas);
 - Klenovo polimerazė (be 5'–3' ir 3'–5' egzonukleazinių aktyvumų).
6. DNR 5'–galinių fosfatų pašalinimo rinkinys:
 - SAP buferinis tirpalas (10 kartų koncentruotas);
 - Krevečių šarminė fosfatazė (SAP).
7. Elektroforezės agaroziniame gelyje priedai:
 - 6 kartus koncentruotas dažas;
 - DNR fragmentų molekulinį masių markeriai (O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix (#SM0334), Lambda DNA/HindIII Marker (#SM0103) („Fermentas“));
8. SDS-PAGE priedai:
 - Baltymų molekulinį masių žymekliai (Unstained Protein Molecular Weight Marker (#SM0431); PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#SM0671) („Fermentas“));
 - Akrilamidinio gelio dažas (Kumasi briliantinis mėlynasis R-250).

2.1.5. Terpės

1. LB (*Luria-Bertani*) mitybinė terpė:

- Kazeino hidrolizatas 10 g;
- Mielių ekstraktas 5 g;
- NaCl 10 g.

Viskas ištirpinamas viename litre distiliuoto vandens ir autoklavuojama 20 min 121 °C temperatūroje.

2. Agarizuota mitybinė terpė:

- Kazeino hidrolizatas 10 g;
- Mielių ekstraktas 5 g;
- NaCl 10 g;
- Bakteriologinis agaras 15 g.

Viskas ištirpinama viename litre distiliuoto vandens kaitinant ir autoklavuojama 20 min 121 °C temperatūroje.

3. S. O. C. mitybinė terpė:

- Bakteriologinis triptonas 2 g;
- Bakteriologinis mielių ekstraktas 0,5 g;
- 1 M NaCl 1 mL;
- 1 M KCl 0,25 mL;
- 2 M Mg šaltinis (1 M MgCl₂•6H₂O, 1 M MgSO₄•7H₂O) 1 mL;
- 2 M gliukozė 1 mL.

Bakteriologinis triptonas, bakteriologinis mielių ekstraktas, NaCl ir KCl tirpinami 97 mL dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 20 min 121 °C temperatūroje ir ataušinama iki kambario temperatūros. Pridedamas 2 M Mg druskų ir 2 M gliukozė iki galutinės 20 mM koncentracijos. Gautas tirpalas filtruojamas. pH turi būti 7,0.

2.1.6. Rekombinantinis *E. coli* producentas

Plk1 ir Plk4 genų klonavimams naudotas *E. coli* XL1-blue, Plk2 ir Plk3 – DH5α kamienas, ekspresijai – *E. coli* BL21 (DE3) kamienas. XL1-blue ir DH5α kamienai yra pasirinkti klonavimams dėl jų jautrumo ampicilinui ir gero transformacijos efektyvumo [44]. Tikslinio baltymo ekspresijai pasirinktas *E. coli* BL21 (DE3) kamienas turi *Lon* ir *OmpT* proteazių genų mutacijas, *lacUV5* promotoriumi valdomą T7 RNR polimerazę [1]. Plačiau žiūrėti 1.3.2. skyrelį.

2.1.7. Genetinis vektorius pGEX-4T-2

Darbe naudojamas ekspresinis vektorius pGEX-4T-2 (BTI). Plačiau vektoriaus charakteristikas žiūrėti 1.2.3. skyrelį.

2.1.8. Kitos genetinės konstrukcijos

Darbe papildomai naudojamos šios genetinės konstrukcijos:

- PLK1/pOTB7 plazmidė (1–603 a. r.), turinti atsparumą chloramfenikoliui (Vokietija);
- PLK2 (PBD)/pCMV-HA plazmidė (340–685 a. r.), turinti atsparumą ampicilinui (BTI);
- PLK3/pOTB7 plazmidė (1–646 a. r.), turinti atsparumą chlotamfenikoliui (Vokietija);
- PLK4/pFRT/TO-V5 plazmidė (1–970 a. r.), turinti atsparumą ampicilinui;

2.2. Metodai

2.2.1. Polimerazės grandininė reakcija

Polimerazės grandininė reakcija atliekama pagal protokolą [33].

Polimerazės grandininė reakcija (PGR) taikoma DNR fragmentų padauginimui, sukuriant jų galuose restrikcijos endonukleazių taikinius, panaudojant atitinkamą seką turinčius pradmenis. Reakcijai panaudota gamtinė *Pfu* DNR polimerazė iš *Pyrococcus furiosus*, pasižyminti 5'→3' polimeraziniu ir stipriu 3'→5' egzozonukleaziniu aktyvumu. Į PGR mišinį įeina (100 µL):

- Stelirus dejonizuotas vanduo;
- 10 kartų koncentruotas *Pfu* buferinis tirpalas su MgSO₄;
- 2 mM dNTP tirpalas (galutinė dNTP koncentracija reakcijos mišinyje yra 0,2 mM);
- Du pradmenys kiekvienai DNR grandinei sintetinti (kiekvieno po 100 ng);
- DNR tirpalas (0,5 ng);
- *Pfu* DNR polimerazė (2,5 vnt.).

PCR atliekama termocikleryje 30 kartų kartojant šiuos tris ciklus:

1. DNR denatūracija 1 min 95 °C temperatūroje;
2. Pradmenų prilydymas prie kopijuojamos DNR 1 min 54 °C temperatūroje (temperatūra priklauso nuo pradmenų dydžio ir G/C nukleotidų sudėties);
3. DNR sintezė 2 min 72 °C temperatūroje.

Prieš pirmą ciklą atliekama pradinė DNR denatūracija 2 min 95 °C temperatūroje. *Pfu* DNR polimerazės savybė bukinti išsikišusias DNR grandines panaudojama visų ciklų gale – atliekamas galutinis išsikišusių DNR galų bukinimas 10 min 72 °C temperatūroje.

2.2.2. DNR fragmentų elektroforezė 1 % agaroziniame gelyje

Gauti po restrikcijos DNR fragmentai paruošiami elektroforezei juos sumaišant su 6 katrus koncentruotu elektroforetiniu dažu.

Paruošiamas 1 % agarozinis gelis TAE buferyje. Mišinys kaitinamas, kol ištirpsta agarozė, paskui atvėsinaamas ir supilamas į horizontalią elektroforezės vonelę. Šulinėliai DNR mišiniui suleisti suformuojami šukomis. Sustingus geliui, elektroforezės aparatas pripildomas TAE buferiu su etidžio bromidu. Elektroforezė vykdoma esant 80–120 V įtampai priklausomai nuo gelio dydžio. Po elektroforezės gelis analizuojamas UV spindulių (250 nm bangos ilgio) šaltinyje (transiluminatoriuje „ULTRA-LŪM“) [34].

2.2.3. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozinio gelio

Kai po elektroforezės reikia iš agarozinio gelio išskirti reikalingus DNR fragmentus, vykdoma elektroforezė be etidžio bromido. Gelio dalys, kuriose yra žymeklis, veikiamos TAE buferiu su etidžio bromidu ir analizuojamos UV spindulių šaltinyje. Iš gelio iškerpami reikalingi DNR fragmentai panaudojant išanalizuotą gelio dalį su žymekliu.

DNR iš iškirpto gelio gabaliuko išskiriama panaudojant „DNA Extraction Kit“ („Fermentas“) rinkinį.

2.2.4. DNR koncentracijos nustatymas

DNR koncentracija nustatoma 1 % agarozės gelyje lyginant su DNR kiekio standartais. Šiame darbe naudojamas Lambda DNA/HindIII žymeklis.

2.2.5. Analitinis plazmidės DNR išskyrimas iš *E. coli* ląstelių biomasės šarminės lizės metodu

Analitinis plazmidės DNR išskyrimas iš *E. coli* ląstelių biomasės šarminės lizės metodu atliekamas pagal protokolą [34].

1. Naktinė kultūra pilama į 1,5 mL „Eppendorf“ mėgintuvėlį, nucentrifuguojama 10 000 aps./min, 30 s, +4 °C temperatūroje.
2. Supernatantas pašalinamas, ląstelių nuosėdos suspenduojamos 200 µL P1 šarminės lizės buferinio tirpalo.
3. Pridedama 200 µL P2 tirpalo, atsargiai vartoma 5 kartus. Mėgintuvėlis laikomas ant ledo 5 min.
4. Pridedama 200 µL šalto P3 tirpalo. Uždarytas mėgintuvėlis vartomas kelis kartus, laikomas ant ledo 5 min.
5. Bakterijų lizatas nucentrifuguojamas 13 200 aps./min greičiu, 5 min, +4 °C temperatūroje.
6. Supernatantas atsargiai nupilamas į švarų „Eppendorf“ mėgintuvėlį. Nukleorūgštys nusodinamos pridedant 2 tūrius 96 % etanolio (–20 °C) kambario temperatūroje. Uždarytas mėgintuvėlis atsargiai vartomas kelis kartus ir laikomas 1 valandą –20 °C temperatūroje.
7. Nusodintos nukleorūgštys surenkamos centrifuguojant 13200 aps./min, 5 min, +4 °C temperatūroje.
8. Supernatantas pašalinamas. Pridedama 0,5 mL 70 % etanolio (–20 °C) kambario temperatūroje. Uždarytas mėgintuvėlis vartomas kelis kartus. DNR surenkama centrifuguojant 13 200 aps./min, 2 min, +4 °C temperatūroje.

9. Atsargiai pašalinamas supernatantas. Etanolio likučiai pašalinami džiovinant nuosėdas kambario temperatūroje 15–20 min.
10. Išdžiovintos nuosėdos tirpinamos 10–20 μL TE buferinio tirpalo. DNR laikoma $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ arba $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

2.2.6. Plazmidinės DNR išskyrimas sekvenavimui iš *Escherichia coli* ląstelių biomasės

Plazmidinės DNR išskyrimui iš *E. coli* ląstelių biomasės naudojamas „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ rinkinys („Fermentas“).

2.2.7. DNR fragmentų restrikcija specifinėmis restrikcijos endonukleazėmis

Į restrikcijos mišinį įeina:

- Specifinė restrikcijos endonukleazė, koncentracija 10 vnt./ μL ;
- 10 kartų koncentruotas restrikcijos buferinis tirpalas;
- Restrikuojamos DNR tirpalas (ne daugiau 30 % viso restrikcijos mišinio tūrio);
- Sterilus dejonizuotas vanduo.

Reakcijos mišinys inkubuojamas 0,5–1,5 valandos $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ arba $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, priklausomai nuo specifinės restrikcijos endonukleazės. Fermentas inaktyvuojamas $+65\text{--}+80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, priklausomai nuo tam tikros specifinės restrikcijos endonukleazės.

2.2.8. DNR lipnių galų bukinimas

Po DNR skaldymo restrikcijos endonukleazėmis gauti išsikišę lipnūs DNR galai verčiami dvigrandžiais, atliekant *E. coli* DNR I polimerazės Klenovo fragmento katalizuojamą reakciją. Klenovo fragmentas atstato DNR viengrandžio 5'-galo komplementarius nukleotidus (5'→3' polimerazinis aktyvumas) arba pašalina DNR viengrandį 3'-galą (3'→5' egzonukleazinis aktyvumas).

Darbe naudojama Klenovo polimerazė be 3'→5' egzonukleazinio aktyvumo. Reakcija vykdoma Klenow buferiniame tirpale 30 min $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, esant 0,2 mM dNTP koncentracijai. Fermentas, kurio reakcijos mišinyje yra 3 vnt./ μg DNR, inaktyvuojamas inkubuojant reakcijos mišinį 10 min $+75\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje [6].

2.2.9. Vektoriaus DNR 5' ir 3' galų defosforilinimas

Nuo DNR 5' ir 3' galų fosfato liekaną pašalina šarminės fosfatazės. Darbe panaudota iš krevečių *Pandalus borealis* išskirta šarminė fosfatazė (angl. *SAP* – *Shrimp Alkaline Phosphatase*). Jos privalumas yra tas, kad šis fermentas, priešingai bakterijų šarminėi fosfatazei,

yra pakankamai jautrus temperatūros pokyčiams ir lengvai inaktyvuojamas aukštoje temperatūroje [35].

Reakcija vykdoma 1 val +37 °C temperatūroje, pridedant į DNR mišinį SAP buferinio tirpalo ir 10 % reakcijos mišinio tūrio fermento. SAP inaktyvuojama inkubuojant reakcijos mišinį 15 min +65 °C temperatūroje [7].

2.2.10. Ligavimas

Ligavimo mišinys (20–25 µL):

- Liguojamo geno fragmentas (priklausomai nuo koncentracijos);
- Linearizuota plazmidė (100 ng);
- 10 kartų koncentruotas ligavimo reakcijos buferinis tirpalas (1/10 dalis reakcijos mišinio);
- T4 DNR ligazė (1 µL);
- PEG₄₀₀₀ (dedama tik tada, kai ligavimas vyksta per bukų galus);
- Iki likusio tūrio papildoma steriliu dejonizuotu vandeniu be nukleazių.

Reakcija vykdoma 4 valandas +22 °C temperatūroje arba per naktį +16 °C temperatūroje. T4 ligazė inaktyvuojama 10 min +65 °C temperatūroje, ligavimo mišinys naudojamas transformacijai arba yra laikomas –20 °C temperatūroje.

2.2.11. Kompetentinių *E. coli* ląstelių transformacija

Kompetentinių *E. coli* ląstelių transformacija atliekama pagal protokolą [44].

1. Paruošiamos Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe ir ampicilinu (galutinė ampicilino koncentracija 100 µg/mL).
2. Į 100 µL kompetentinių ląstelių įdedamas 1 µL plazmidinės DNR (arba 5-7 µL ligavimo mišinio).
3. Įdedamas 1 µL PEG₆₀₀₀ (40 %).
4. Transformacijos mišinys inkubuojamas 30 min ledo vonioje.
5. Termošokas vykdomas 90 s +42 °C temperatūroje, po to mišinys laikomas 5 min ledo vonioje.
6. Į reakcijos mišinį pridedama 400 µL šiltos skystos S. O. C. terpės, auginama 45 min +37 °C temperatūroje termostatuojamoje purtyklėje 200 aps./min.
7. Glaistant steriliai išsėjama 100–250 µL ląstelių suspensijos Petri lėkštelėse ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu.

2.2.12. Tikslinio baltymo ekspresijos patikrinimas

1. Į 1 mL LB terpės su ampicilinu (galutinė ampicilino koncentracija 50 µg/mL) užsėjama 50 µL transformuotų ląstelių kultūros ir auginama termostatuojamoje purtyklėje +37 °C temperatūroje per naktį.
2. Į 10 mL LB terpės su ampicilinu (galutinė ampicilino koncentracija 50 µg/mL) užsėjama 200 µL naktinės kultūros ir auginama termostatuojamoje purtyklėje +37 °C temperatūroje apie 2 valandas, kol optinis tankis pasiekia 0,5–1,0 O.V.
3. Prieš indukciją paruošiamas kontrolinis visų ląstelės baltymų preparatas iš 800 µL ląstelių suspensijos. Pamatuojamas optinis tankis.
4. Indukuojama 1 mM IPTG, auginama termostatuojant 2 valandas po indukcijos.
5. Paruošiamas visų ląstelės baltymų preparatas iš 800 µL ląstelių suspensijos.
6. Mėginiai analizuojami SDS-PAGE būdu.

2.2.13. Tikslinio baltymo ekspresijos indukcija

Tikrinant tikslinio baltymo ekspresiją, indukcija atliekama eksponentinio augimo fazės metu (kai optinis tankis pasiekia 0,5–1,0 O.V.) į kultūrinę terpę pridėdant pGEX šeimos vektoriams indukcijai rekomenduojamu 0,1 mM galutinės koncentracijos IPTG tirpalu. Tokia IPTG koncentracija mažina baltymo išėigas, tačiau padidina aktyvaus baltymo gavimo tikimybę [15]. Prieš ir po indukcijos paruošiami mėginiai SDS-PAGE analizei.

2.2.14. Tikslinio baltymo ekspresija, esant skirtingoms temperatūroms

➤ *Naktinės kultūros paruošimas*

Į 4 mėgintuvėlius su 1 mL LB terpės su ampicilinu (galutinė ampicilino koncentracija 50 µg/mL) užsėjamos atskyros kolonijos iš turimų Petri lėkštelių su *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-4T-2/PLK kultūromis ir kultivuojama per naktį (apie 16 val) +37 °C temperatūroje, purtant 260 aps./min.

➤ *PLK producentų kultivavimas, esant +16 °C, +20 °C, +30 °C ir +37 °C temperatūroms*

1. Užsėjama 0,5 mL naktinės kultūros į 25 mL LB mitybinės terpės, turinčios 50 µg/mL ampicilino.
2. Auginama termostatuojamoje purtyklėje +37 °C temperatūroje, purtant 270 aps./min, kol optinis tankis pasiekia 0,5–0,8 O.V. Sugertis matuojama, esant 600 nm bangos ilgiui.
3. Kai optinis tankis pasiekia 0,6–0,8 O.V., indukuojama IPTG iki 0,1 mM galutinės koncentracijos. Prieš indukciją paimamas kontrolinis mėginys SDS-PAGE analizei: 0,8 mL

ląstelių suspensijos necentrifuguojama, ląstelės užšaldomos ir saugomos $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

- Po indukcijos kultūra auginama $+16\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ arba $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje atitinkamai 16 val, 6 val ir 16 val, 4 val arba 2 val. Po to paimami mėginiai bendram ekspresijos lygiui įvertinti. Baltymų tirpumui įvertinti imami 20 mL ląstelių suspensijos mėginiai po indukcijos IPTG.

2.2.15. Baltymų SDS-PAGE

Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis natrio dodecilsulfato poliakrilamidiniame gelyje atliekama keliais etapais.

➤ *Mėginių paruošimas*

Augimo metu paimti ląstelių suspensijos mėginiai (800 μL) nucentrifuguojami 1 min, 10 000 aps./min. Supernatantas pašalinamas, o nuosėdos tirpinamos 80 μL pavyzdžio buferinio tirpalo, mišinys virinamas 5 min $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Į elektroforezės gelio šulinėlį užnešama 12 μL mėginio prieš indukciją ir 6 μL mėginio po indukcijos.

➤ *Gelių paruošimas*

12 % skiriamojo (apatinio) gelio sudėtis:

30 % AA/BAA	2,00 mL;
1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8	1,25 mL;
10 % SDS	0,05 mL;
Dejonizuotas vanduo	1,585 mL;
10 % APS	0,025 mL;
TEMED	0,005 mL.

Gerai išmaišius, tirpalas pilamas į gelio formą iki pažymėtos vietos – 2 cm nuo formos viršaus. Ant viršaus atsargiai užsluoksniuojama distiliuoto vandens tam, kad tirpalas neturėtų kontakto su deguonimi. Polimerizacija kambario temperatūroje trunka apie 30 min, jos pabaigoje gerai matoma fazių riba tarp polimero ir vandens. Sustingusio gelio paviršius praplaunamas distiliuotu vandeniu ir nusausinamas filtriniu popieriumi. Ant viršaus pilamas koncentruojantis gelis.

4 % koncentruojančio (viršutinio) gelio sudėtis:

30 % AA/BAA	0,67 mL;
1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8	1,25 mL;
10 % SDS	0,05 mL;
Dejonizuotas vanduo	3,00 mL;
10 % APS	0,025 mL;

TEMED

0,005 mL.

Gerai išmaišius, tirpalas pilamas ant apatinio gelio iki formos viršaus ir šukomis suformuojami šulinėliai. Atsižvelgiama į tai, kad po šukučių neliktų oro burbulų. Sustingus geliui, ištraukiamos šukos, šulinėliai praplaunami poliakrilamidinio gelio elektroforezės elektrodiniu buferiniu tirpalu ir forma įstatoma į aparatą. Paruoštas gelis elektroforezei gali būti laikomas +4 °C temperatūroje iki 30 dienų.

➤ *Elektroforezės eiga*

Elektroforezė atliekama vertikaliame elektroforezės aparate, naudojant SDS-PAGE redukuojančiomis sąlygomis. Forma su geliu įstatoma į aparatą, šukos ištraukiamos, viršutinis ir apatinis aparato rezervuarai užpildomi elektroforezės elektrodiniu buferiniu tirpalu. Pavyzdžiai įnešami į šulinėlius po elektrodinio buferinio tirpalo sluoksniu. Elektroforezės metu palaikomas pastovus srovės dydis. Koncentruojančiame gelyje palaikoma 20 mA/geliui dydžio srovė, skiriamajame – 30 mA/geliui. Elektroforezė vykdoma, kol dažo frontas pasiekia skiriamojo gelio apačią. Po to srovės šaltinis išjungiamas, stiklai atskiriami vienas nuo kito ir nupjaunamas koncentruojantis gelis. Skiriamasis gelis dažomas Kumasi dažu.

➤ *Gelių dažymas*

Poliakrilamidinis gelis dažomas specialiai paruoštu Kumasi dažu. Iš karto po elektroforezės gelis kelis kartus praplaunamas distiliuotu vandeniu ir laikomas apie 15 min dažo tirpale. Dažą nupylus, gelis virinamas distiliuotame vandenyje, kol išblunka, nufotografuojamas ir analizuojamas UNSCAN-IT v 5.1 programa.

2.2.16. Tirpių ir netirpių baltymų nustatymas

Augimo metu paimti 20 mL ląstelių suspensijos mėginiai nucentrifuguojami 15 min, 6 000 aps./min, +4 °C temperatūroje ir nuosėdos laikomos –20 °C temperatūroje. 0,09–0,12 g biomasės suspenduojama 4 mL ardymo buferinio tirpalo. Mėginys ardomas ultragarsu 3,5 min kas 15 s darant 15 s pertraukas, esant 30 % amplitudei. Lizatas centrifuguojamas 20 min, 20 000 aps./min, +4 °C temperatūroje, atskiriamas supernatantas.

100 µL tirpios frakcijos sumaišoma su 25 µL šešis kartus koncentruoto pavyzdžio buferinio tirpalo, turinčio β-merkaptioetanolio, išvirinama 5 min ir saugoma –20 °C temperatūroje.

Netirpių baltymų frakcija suspenduojama 1 mL 8 M urėjos, paimama 100 µL ir sumaišoma su 25 µL šešis kartus koncentruoto pavyzdžio buferinio tirpalo, turinčio β-merkaptioetanolio, išvirinama 5 min ir saugoma –20 °C temperatūroje.

Mėginiai analizuojami SDS-PAGE metodu.

2.2.17. DNR nukleotidinės sekos nustatymas

Visų sukonstruotų plazmidžių DNR nukleotidų sekos nustatytos Biotechnologijos institute, Sekvenavimo centre automatinio sekvenatoriumi ABI PRISM 377 (Applied Biosystems), naudojant pGEX šeimos vektoriams tinkamus pradmenis:

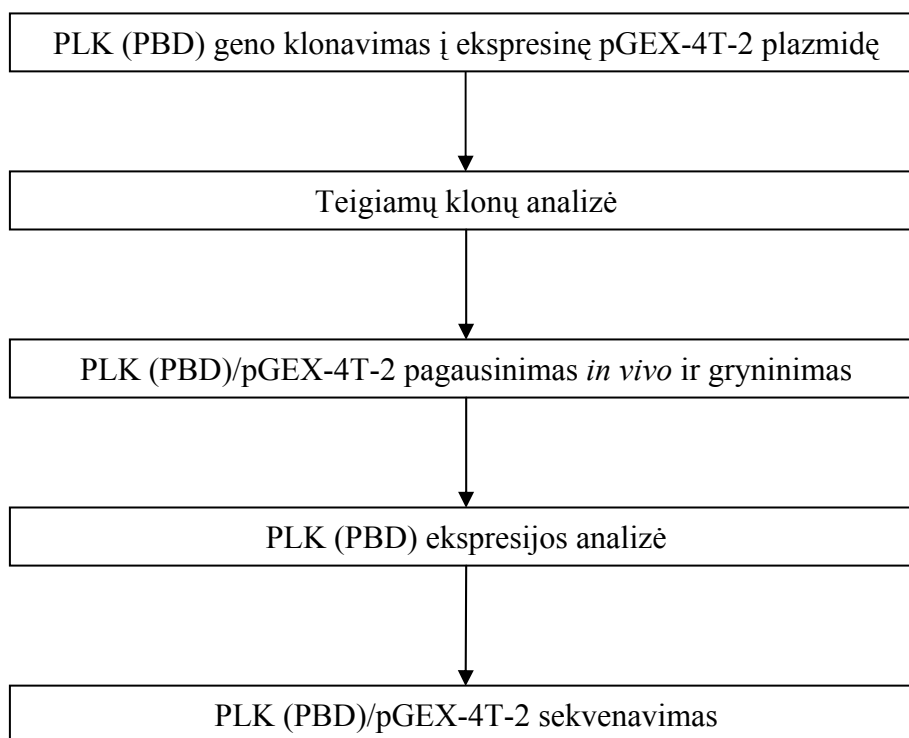
- pGEX 5' pradmuo: 5'-d[GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG]-3' (prisijungia prie vektoriaus 869–891 nukleotidų);
- pGEX 3' pradmuo: 5'-d[CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG]-3' (prisijungia prie vektoriaus 1042–1020 nukleotidų) [15].

2.3. Darbo eiga

Tikslinius baltymus koduojančių genų klonavimo į pasirinktą ekspresinį vektorių ir tirpių baltymų nustatymo schemoje buvo numatyti du pagrindiniai etapai:

1. PLK1 (PBD), PLK2 (PBD), PLK3 (PBD) ir PLK4 (PBD) genų klonavimas į ekspresijos vektorių pGEX-4T-2, gautų konstrukto genų raiškos tikrinimas.
2. Gautų su GST baltymo seka sulietų baltymų tirpumo nustatymas ir optimizavimas.

Pirmojo etapo tikslui pasiekti buvo numatyti šie darbai: PLK (PBD) geno klonavimas į pGEX-4T-2 vektorių, teigiamų klonų atranka, sukonstruoto rekombinantinio producento ekspresijos analizė ir geno sekos validavimas sekvenavimu. Bendra pirmojo darbo etapo eigos schema pateikiama 12 paveiksle.



12 pav. Bendra pirmojo darbo etapo schema

Antrajame darbo etape numatyti šie darbai: sukonstruotų PLK (PBD)/pGEX-4T-2 plazmidžių transformacija į *E. coli* BL21 (DE3) kamieną, pakartotinis ekspresijos patikrinimas, tirpių/netirpių baltymų nustatymas ir jų tirpumo optimizavimas.

3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Pirmojo darbo etapo rezultatai

Pirmajame darbo etape buvo pasiekti tokie genetinio klonavimo ir espresijos rezultatai:

3.1.1. Genetinio klonavimo rezultatai

Gautos genetinių vektorių konstrukcijos:

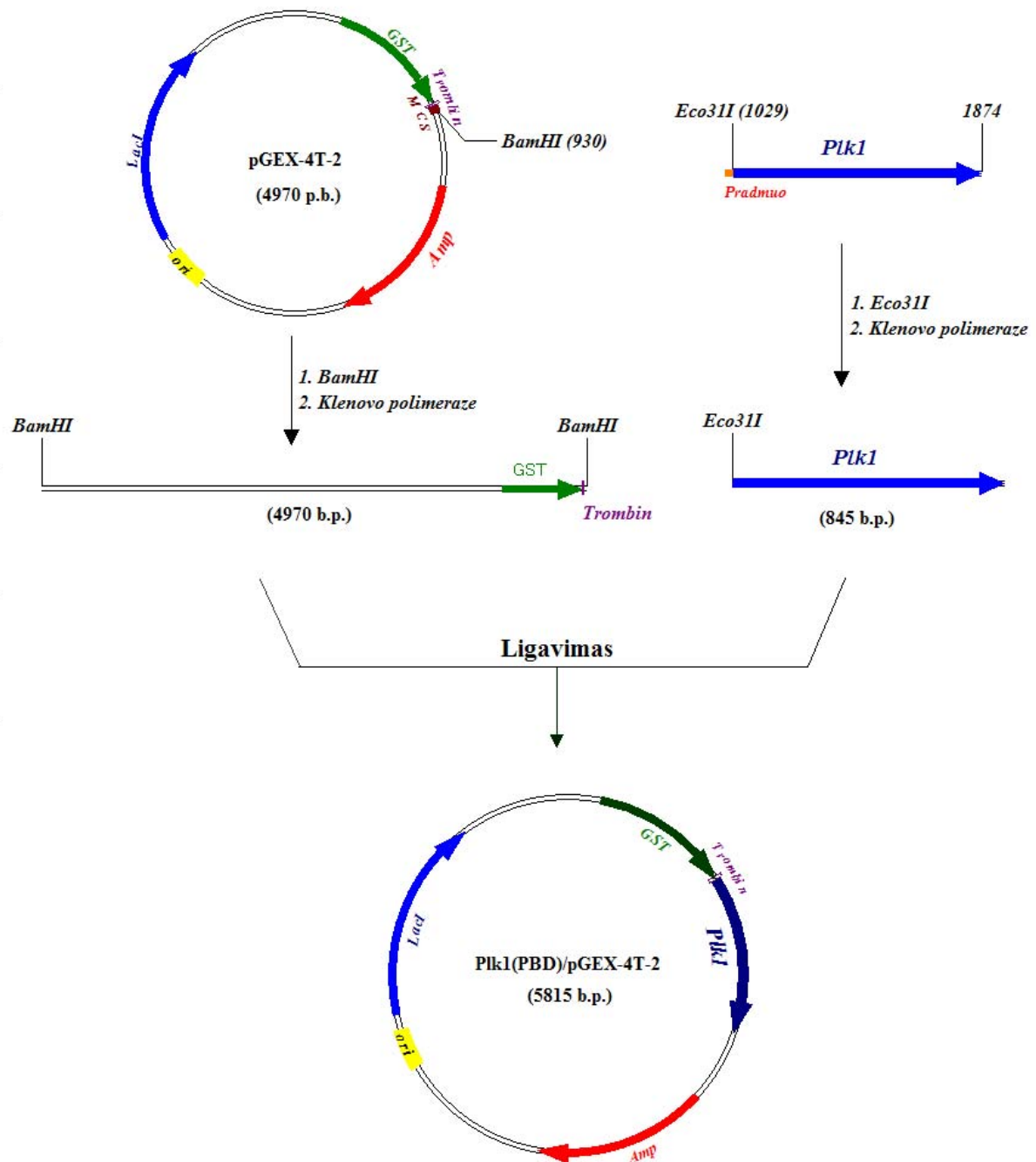
- PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2 (PLK1 326–603 a. r.);
- PLK2 (PBD)/pGEX-4T-2 (PLK2 340–685 a. r.);
- PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2 (PLK3 325–646 a. r.);
- PLK4 (PBD)/pGEX-4T-2 (PLK4 875–970 a. r.).

Iš atrinktų teigiamų PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2, PLK2 (PBD)/pGEX-4T-2, PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2 ir PLK4 (PBD)/pGEX-4T-2 plazmidžių papildytas BTI Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijos genų bankas, išskiriant DNR šarminės lizės metodu ir saugant „Eppendorf“ tipo megintuvėliuose TE buferiniame tirpale –20 °C temperatūroje.

3.1.1.1. PLK1 (PBD) geno klonavimo rezultatai

Principinė PLK1 (PBD) geno klonavimo schema ir gautos plazmidės konstrukcija pateikta 13 paveiksle.

1. PLK1 (PBD) genas buvo nuskaitytas nuo pirktinės PLK1/pOTB7 plazmidės ir padaugintas PGR būdu, panaudojus PLK1_FI (yra *Eco31I* kirpimo vieta) (5'-AATGGTCTCTAGGTTTCGATTGCTCCCAGCAGCC-3') ir PLK1_R (yra terminalinis TAA stop kodonas) (5'-GGGAAGCTTTTAGGAGGCCTTGAGACGGTTG-3') pradmenis. Toliau PLK1 PGR produktas buvo naudotas klonavimams.
2. PLK1 (PBD) PGR produktas kirptas su *Eco31I* restrikcijos endonukleaze ir atlikta reakcija su Klenovo polimeraze. Iš agarozinio gelio išskirtas apie 850 b.p. tikslinio geno fragmentas (pateikiami apytikriai dydžiai, nes restrikcijos rezultatai patvirtinti vizualiai, atlikus restrikcijos mišinio elektroforezę agaroziniame gelyje).
3. Plazmidė pGEX-4T-2 perkirpta per MCS regiono *BamHI* restrikcijos endonukleazės taikinį 930 pozicijoje ir atlikta reakcija su Klenovo polimeraze. Iš agarozinio gelio išskirta 4970 p. b. perkirpta linearizuota plazmidė ir panaudota ligavimui su tiksliniu genu.



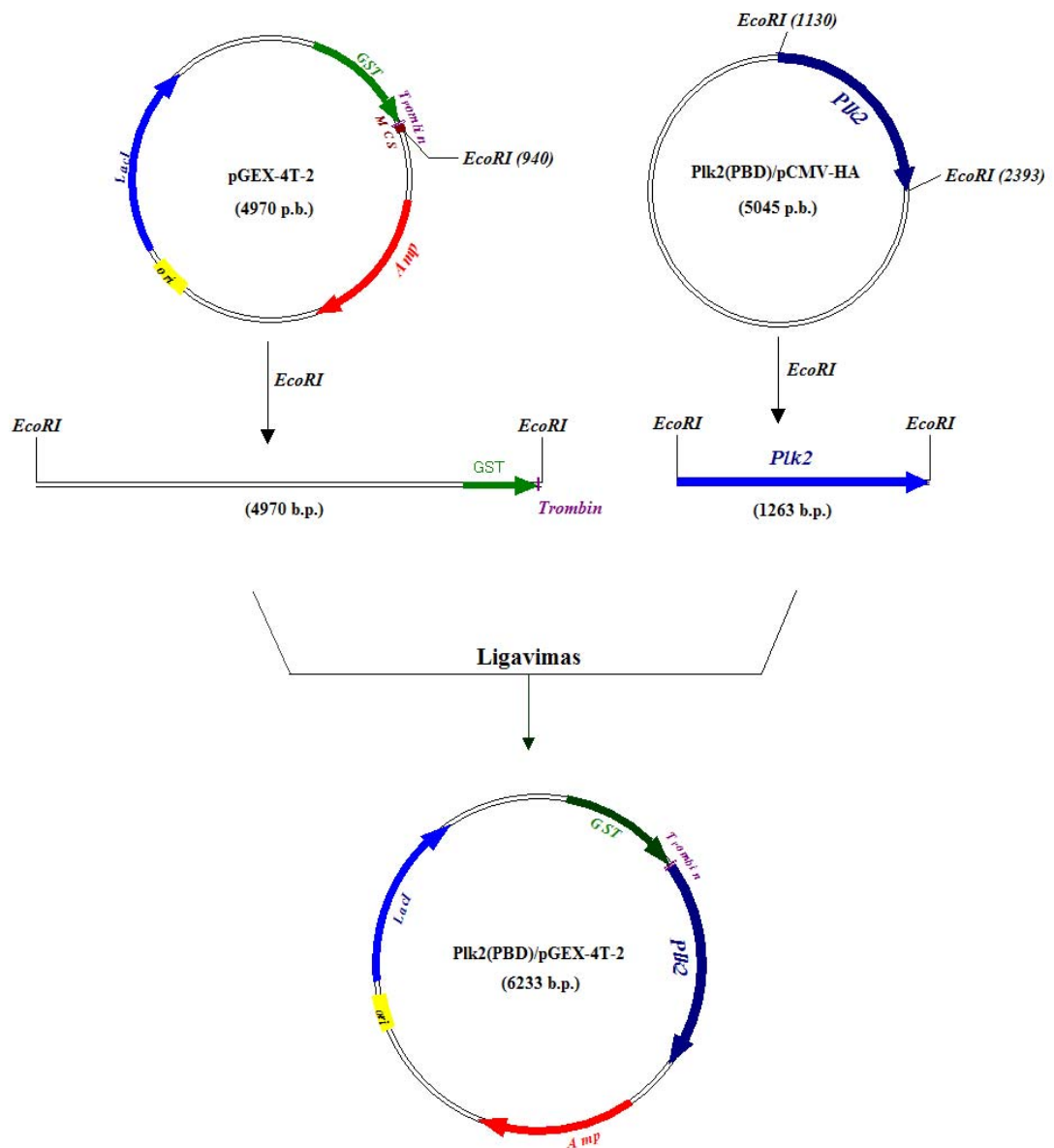
13 pav. Principinė PLK1 (PBD) geno klonavimo schema

4. PLK1 (PBD) genas į ekspresinę pGEX-4T-2 plazmidę įklonuotas per bukų galus. Ligavimo reakcija vykdyta 4 val 22 °C temperatūroje, fermentas inaktyvuotas 10 min +65 °C temperatūroje. Ligatas iš karto transformuotas į kompetentinę *E. coli* XLI blue kultūrą. Transformuota kompetentinė kultūra išsėta ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu (100 µg/mL), auginta +37 °C temperatūroje per naktį.
5. Gautos ampicilinui atsparių transformantų kolonijos analizuotos atliekant transformantų restrikcinę analizę, panaudojant *PvuII*, *ScaI* ir *BamHI* restrikcijos endonukleazes.

6. Atlikta iš teisingo klon išskirtos tikslinės plazmidės transformacija į kompetentinę *E. coli* BL21 (DE3) kultūrą, patikrinta baltymo ekspresija SDS-PAGE. Plačiau žiūrėti 3.1.2. skyrelį.
7. PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2 plazmidė iš *E. coli* XLI blue/pGEX4T-2/PLK1 (PBD) kamieno išskirta, panaudojus „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ („Fermentas“) rinkinį. PLK1 (PBD) geno seka nustatyta „BTI DNR Sekvenavimo Centre“ naudojant pGEX5' ir pGEX3' pradmenis. Plačiau žiūrėti 2.2.17. skyrelį.

3.1.1.2. PLK2 (PBD) geno klonavimo rezultatai

Principinė PLK2 (PBD) geno klonavimo schema ir gautos plazmidės konstrukcija pateikta 14 paveiksle.



14 pav. Principinė PLK2 (PBD) geno klonavimo schema

1. PLK2 (PBD) genas iškirptas iš BTI Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje sukonstruotos PLK2 (PBD)/pCMV-HA genetinės plazmidės per *EcoRI* restrikcijos endonukleazių taikinius. Iš agarozinio gelio išskirtas apie 1 250 b. p. tikslinio geno fragmentas.
2. Plazmidė pGEX-4T-2 perkirpta per MCS regiono *EcoRI* restrikcijos endonukleazės taikinį 941 pozicijoje. Iš agarozinio gelio išskirta 4970 p. b. perkirpta linearizuota plazmidė ir panaudota ligavimui su tiksliniu genu.
3. PLK2 (PBD) genas į ekspresinę pGEX-4T-2 plazmidę įklonuotas per lipnius *EcoRI* galus. Ligavimo reakcija vykdyta 4 val. 22 °C temperatūroje, fermentas inaktyvuotas 10 min. +65 °C temperatūroje. Ligatas iš karto transformuotas į kompetentinę *E. coli* DH5α kultūrą. Transformuota kompetentinė kultūra išsėta ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu (100 µg/mL), auginta +37 °C temperatūroje per naktį.
4. Gautos ampicilinui atsparių transformantų kolonijos analizuotos atliekant transformantų restrikcinę analizę, panaudojant *PdmI* ir *EcoRI* restrikcijos endonukleazes.
5. Atlikta iš teisingo klonu išskirtos tikslinės plazmidės transformacija į kompetentinę *E. coli* BL21 (DE3) kultūrą, patikrinta baltymo ekspresija SDS-PAGE. Plačiau žiūrėti 3.1.2. skyrelį.
6. PLK2 (PBD)/pGEX-4T-2 plazmidė iš *E. coli* DH5α/pGEX4T-2/PLK1 (PBD) kamieno išskirta, panaudojus „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ („Fermentas“) rinkinį. PLK2 (PBD) geno seka nustatyta „BTI DNR Sekvenavimo Centre“ naudojant pGEX5' ir pGEX3' pradmenis. Plačiau žiūrėti 2.2.17. skyrelį.

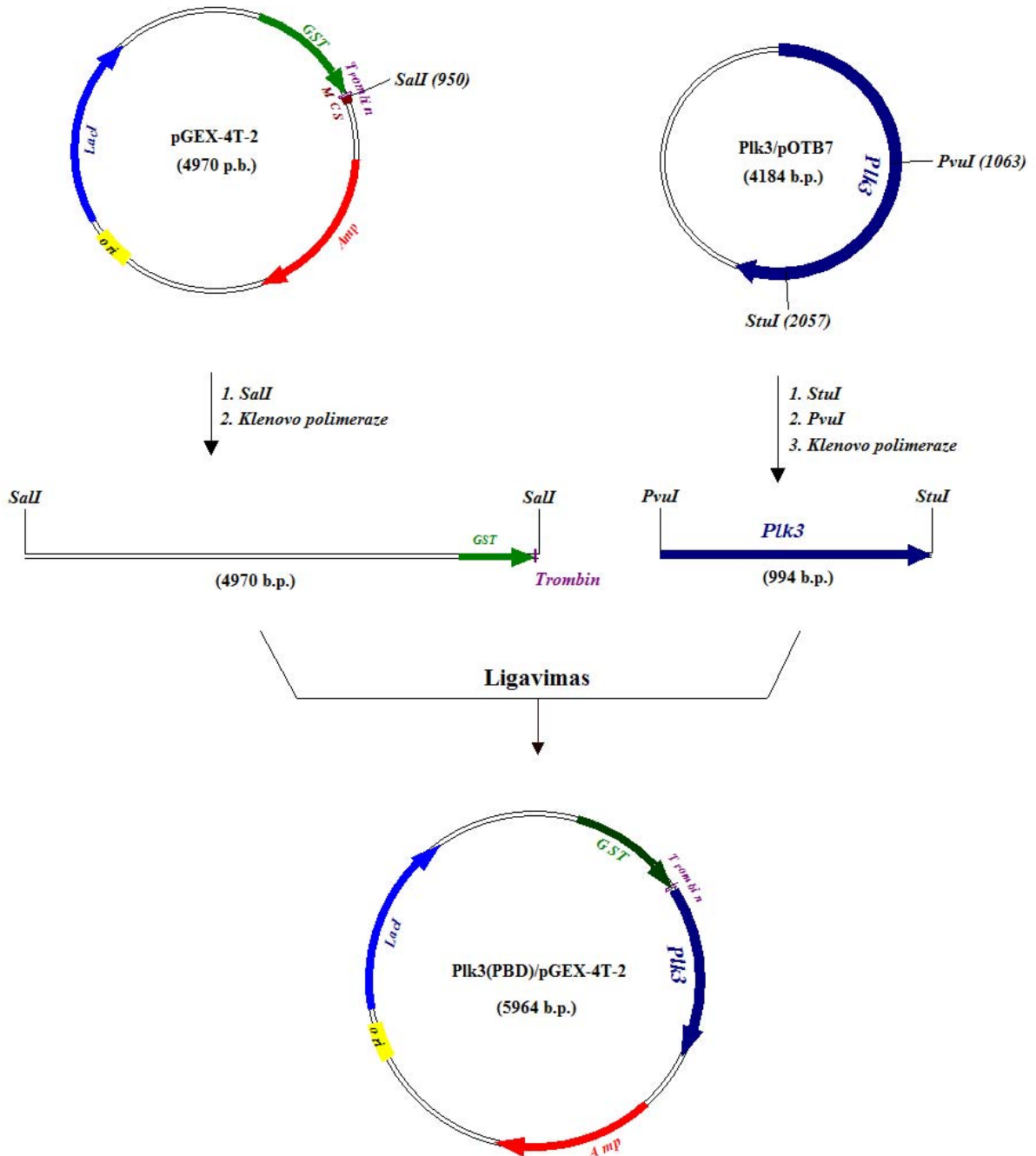
3.1.1.3. PLK3 (PBD) geno klonavimo rezultatai

Principinė PLK3 (PBD) geno klonavimo schema ir gautos plazmidės konstrukcija pateikta 15 paveiksle.

1. PLK3 (PBD) genas iškirptas iš pirktinio PLK1/pOTB7 konstrukto per *PvuI* ir *StuI* restrikcijos endonukleazių taikinius ir atlikta reakcija su Klenovo polimeraze. Iš agarozinio gelio išskirtas apie 1000 b.p. tikslinio geno fragmentas.
2. Plazmidė pGEX-4T-2 perkirpta per MCS regiono *Sall* restrikcijos endonukleazės taikinį 950 pozicijoje ir atlikta reakcija su Klenovo polimeraze. Iš agarozinio gelio išskirta 4970 p.b. perkirpta linearizuota plazmidė ir panaudota ligavimui su tiksliniu genu.
3. PLK3 (PBD) genas į ekspresinę pGEX-4T-2 plazmidę įklonuotas per bukus galus. Ligavimo reakcija vykdyta 4 val 22 °C temperatūroje, fermentas inaktyvuotas 10 min. +65 °C temperatūroje. Ligatas iš karto transformuotas į kompetentinę *E. coli* DH5α

kultūra. Transformuota kompetentinė kultūra išsėta ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu (100 µg/mL), auginta +37 °C temperatūroje per naktį.

- Gautos ampicilinui atsparių transformantų kolonijos analizuotos atliekant transformantų restrikcinę analizę, panaudojant *BsaI* ir *HincII* restrikcijos endonukleazes.



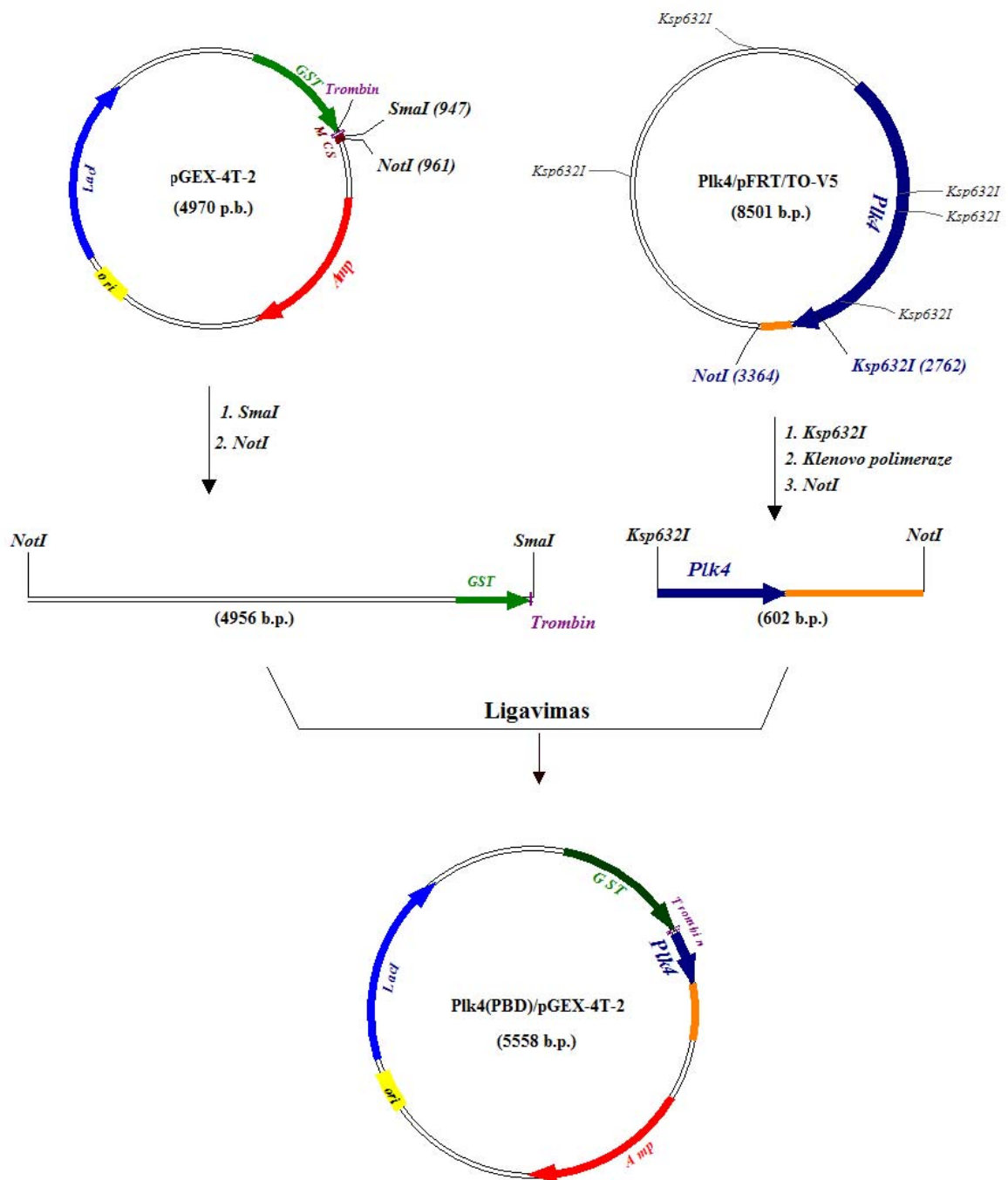
15 pav. Principinė PLK3 (PBD) geno klonavimo schema

- Atlikta iš teisingo klonu išskirtos tikslinės plazmidės transformacija į kompetentinę *E. coli* BL21 (DE3) kultūrą, patikrinta baltymo ekspresija SDS-PAGE. Plačiau žiūrėti 3.1.2. skyrelį.

6. PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2 plazmidė iš *E. coli* DH5 α /pGEX4T-2/PLK1 (PBD) kamieno išskirta, panaudojus „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ („Fermentas“) rinkinį. PLK3 (PBD) geno seka nustatyta „BTI DNR Sekvenavimo Centre“ naudojant pGEX5' ir pGEX3' pradmenis. Plačiau žiūrėti 2.2.17. skyrelį.

3.1.1.4. PLK4 (PBD) geno klonavimo rezultatai

Principinė PLK3 (PBD) geno klonavimo schema ir gautos plazmidės konstrukcija pateikta 16 paveiksle.



16 pav. Principinė PLK4 (PBD) geno klonavimo schema

1. PLK4 (PBD) genas iškirptas iš PLK4/pFRT/TO-V5 konstrukto pirmiausia per *Ksp632I* restrikcijos endonukleazės taikinį, atlikta reakcija su Klenovo polimeraze, o paskui per *NotI* restriktažės taikinį. Iš agarozinio gelio išskirtas apie 600 b. p. tikslinio geno fragmentas.
2. Plazmidė pGEX-4T-2 perkirpta per MCS regiono *SmaI* ir *NotI* restrikcijos endonukleazių taikinius atitinkamai 947 ir 961 pozicijose. Iš agarozinio gelio išskirta apie 4950 b. p. pGEX-4T-2 plazmidės dalis ir panaudota ligavimui su tiksliu genu.
3. PLK4 (PBD) genas į ekspresinę pGEX-4T-2 plazmidę įklonuotas per vieną buką ir vieną lipnų (restrikcijos endonukleazės *NotI* taikinys) galus. Ligavimo reakcija vykdyta 4 val 22 °C temperatūroje, fermentas inaktyvuotas 10 min +65 °C temperatūroje. Ligatas iš karto transformuotas į kompetentinę *E. coli* XLI blue kultūrą. Transformuota kompetentinė kultūra išsėta ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu (50 µg/mL), auginta +37 °C temperatūroje per naktį.
4. Gautos ampicilinui atsparių transformantų kolonijos analizuotos atliekant transformantų restrikcinę analizę, panaudojant *HincII* ir *AlwNI* restrikcijos endonukleazes.
5. Atlikta teisingo klono išskirtos tikslinės plazmidės transformacija į kompetentinę *E. coli* BL21 (DE3) kultūrą, patikrinta baltymo ekspresija SDS-PAGE. Plačiau žiūrėti 3.1.2. skyrelį.
6. PLK4 (PBD)/pGEX-4T-2 plazmidė iš *E. coli* XLI blue/pGEX4T-2/PLK1 (PBD) kamieno išskirta, panaudojus „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ („Fermentas“) rinkinį. PLK4 (PBD) geno seka nustatyta „BTI DNR Sekvenavimo Centre“ naudojant pGEX5' ir pGEX3' pradmenis. Plačiau žiūrėti 2.2.17. skyrelį.

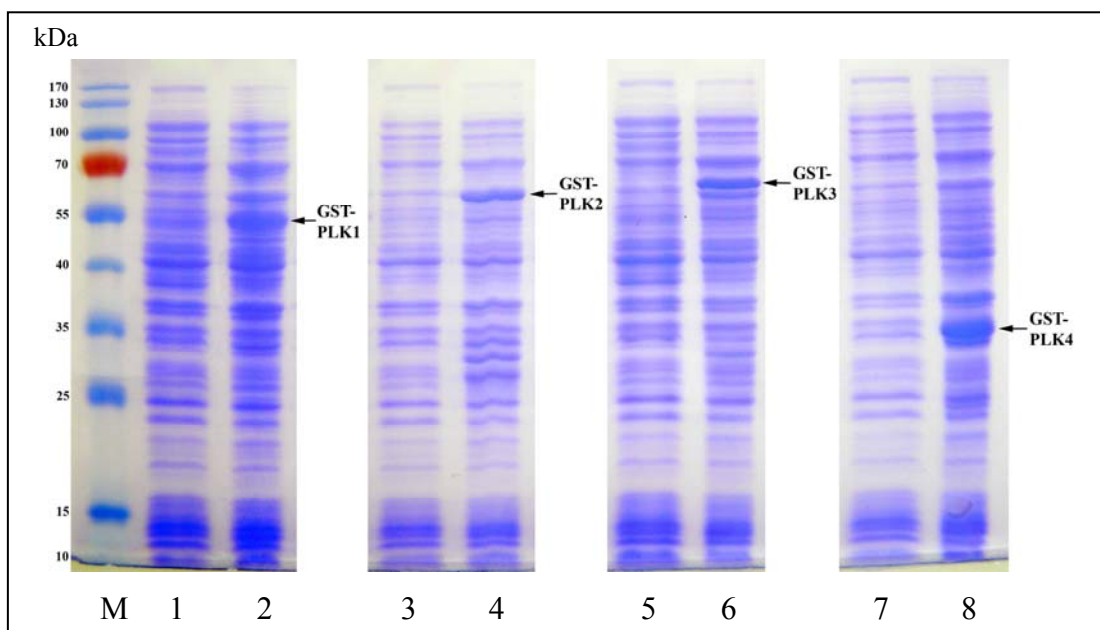
3.1.2. PLK/pGEX-4T-2 ekspresijos patikrinimas

Apskaičiuotos gautų sulietų su GST baltymo seka PLK baltymų molekulinės masės [32]. Skaičiavimo rezultatai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Apskaičiuotos GST-PLK baltymų molekulinės masės

Baltymas	Molekulinė masė, kDa
GST-PLK1 (PBD)	58,19
GST-PLK2 (PBD)	65,95
GST-PLK3 (PBD)	62,83
GST-PLK4 (PBD)	37,34

Patikrintas bendras tikslių baltymų ekspresijos lygis, esant +37 °C temperatūrai, indukuojant 0,1 mM IPTG, imant mėginius po 2 val po indukcijos. Mėginiai analizuoti SDS-PAGE metodu (žr. 17 paveikslą).



17 pav. *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-4T-2/PLK kamienų auginimų +37 °C temperatūroje SDS-PAGE rezultatai. M – molekulinė masių standartai; 1, 2 – PLK1 mėginiai prieš ir po indukcijos IPTG, 3, 4 – PLK2 mėginiai prieš ir po indukcijos IPTG, 5, 6 – PLK3 mėginiai prieš ir po indukcijos IPTG, 7, 8 – PLK4 mėginiai prieš ir po indukcijos IPTG.

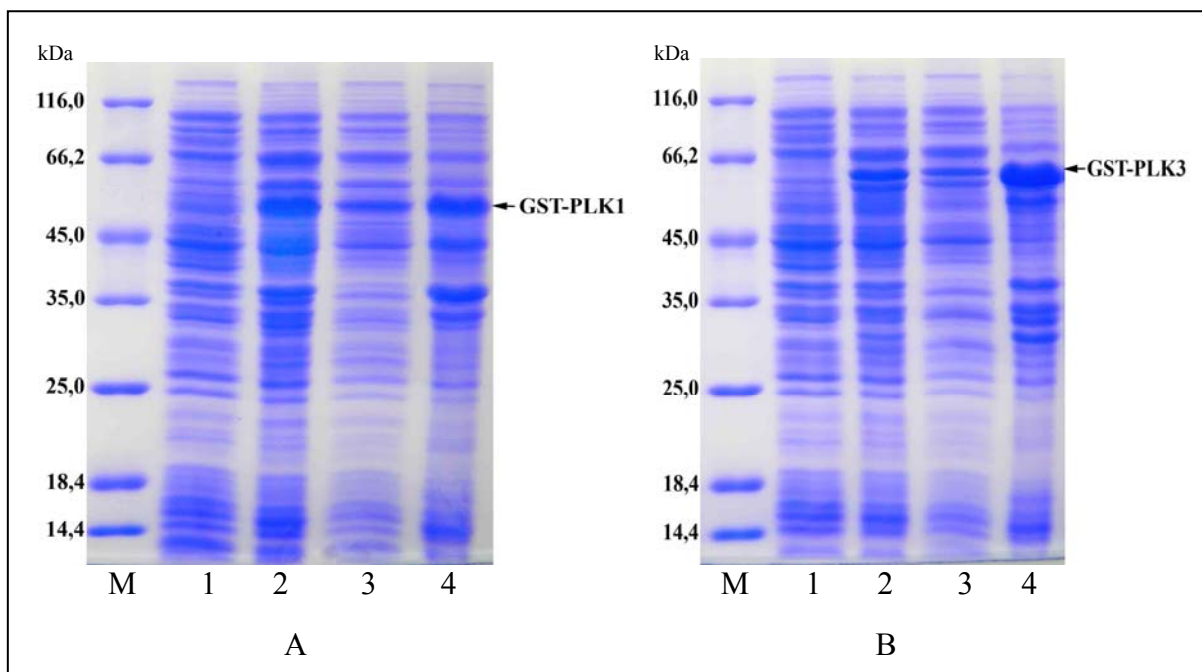
Iš baltymų SDS-PAGE rezultatų (žr. 18 pav.) matyti, jog darbo metu visos sukonstruotos PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2, PLK2 (PBD)/pGEX-4T-2, PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2, ir PLK4 (PBD)/pGEX-4T-2 plazmidės ekspresuoja tikslius su GST baltymo seka sulietus baltymus, kurių ekspresijos lygis yra pakankamas, norint atlikti tolimesnius tyrimus.

3.2. Antrojo darbo etapo rezultatai

Antrajame darbo etape nustatytas ir optimizuotas GST-PLK baltymų tirpumas.

3.2.1. PLK1 ir PLK3 baltymų tirpumo nustatymo rezultatai

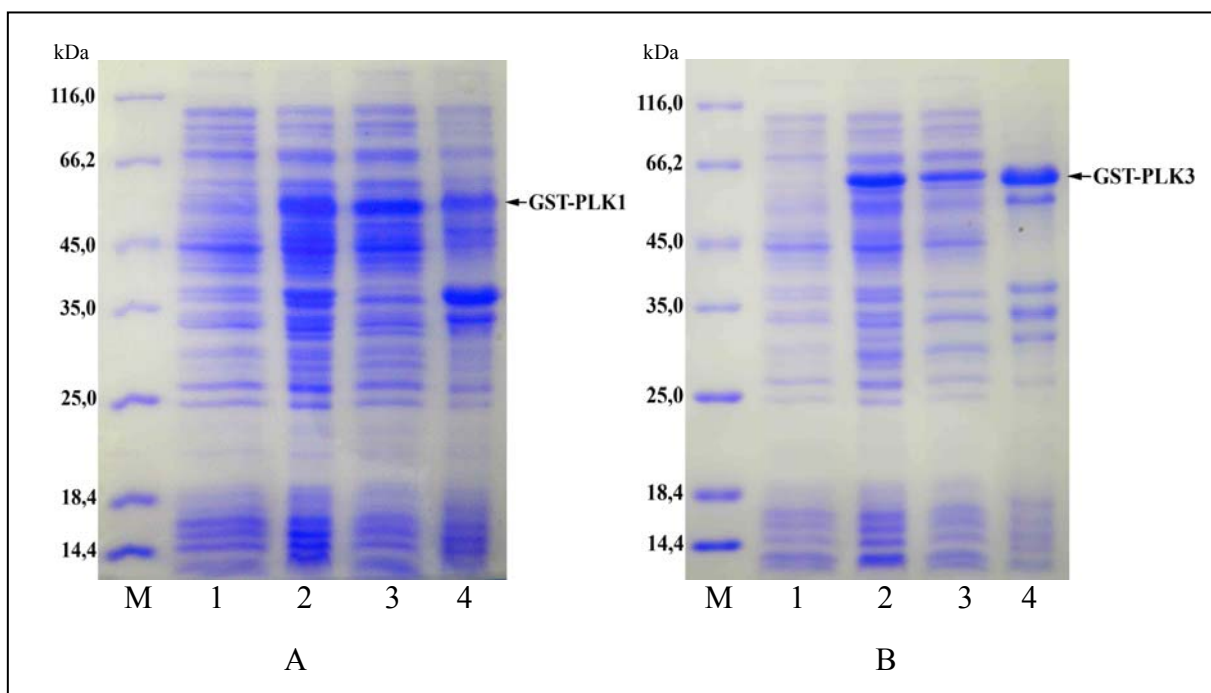
PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2 ir PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2 plazmidės transformuotos į *E. coli* BL21 (DE3) kamieną. Pirmiausia baltymų ekspresija ir tirpumas patikrinti, indukuojant 0,1 mM IPTG ir kultivuojant 2 valandas +37 °C temperatūroje. SDS-PAGE rezultatai pateikti 18 paveiksle.



18 pav. PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2 ir PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2 ekspresijos ir tirpumo rezultatai, auginant 2 val +37 °C temperatūroje. A – GST-PLK1 (PBD) ekspresija ir tirpumas, 1-4 – mėginiai, atitinkamai prieš ir po indukcijos, tirpios ir netirpios baltymų frakcijų; B – GST-PLK1 (PBD) ekspresija ir tirpumas, 1-4 – mėginiai, atitinkamai prieš ir po indukcijos, tirpios ir netirpios baltymų frakcijų; M – molekulinė masių standartai. Tirpių ir netirpių fazių baltymų santykis yra apie 1:5.

Iš elektroferogramų, pateiktų 18 paveiksle, suskaičiuota, kad kultivuojant *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-4T-2/PLK1 (PBD) ir *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-4T-2/PLK3 (PBD) kamienus +37 °C temperatūroje tikslinių baltymų ekspresija sudaro apie 15 %, tačiau jų tirpumas nėra geras. GST-PLK1 (PBD) ir GST-PLK3 (PBD) baltymų didžioji dalis kaupiasi intarpiniuose kūneliuose. Tokiu būdu kultivuojant *E. coli* kamienus su tiksliniais baltymais tolimesnis jų gryninimas iš tirpios fazės nebūtų efektyvus.

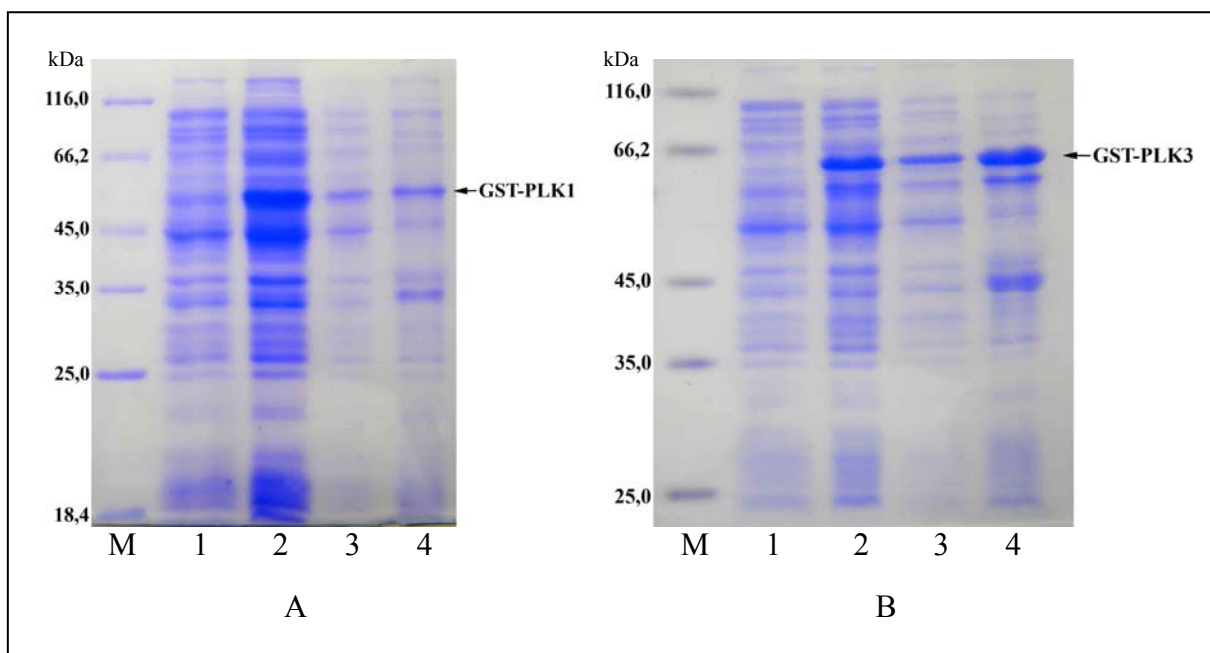
Atsižvelgus į tokius rezultatus, buvo indukuota 0,1 mM ITPG, esant žemesnei temperatūrai – +30 °C, ir ilgesniam laikui – 4 valandas. SDS-PAGE rezultatai pateikti 19 paveiksle. Tikslinių baltymų ekspresijos ir tirpumo rezultatai parodė, kad, esant tokioms sąlygoms, GST-PLK1 (PBD) baltymo ekspresija padidėjo 3 %, GST-PLK3 (PBD) – 15 %, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų. Tikslinių baltymų tirpumas taip pat padidėjo. Šiuo atveju GST-PLK1 (PBD) sudaro 22 % visų tirpios frakcijos baltymų kiekio, GST-PLK3 (PBD) – 28 %. Taip pat pastebėta, kad, padidėjus GST-PLK3 (PBD) baltymo ekspresijai, padidėjo ir šio baltymo kiekis intarpiniuose kūneliuose – sudaro 55 %, skaičiuojant nuo visų netirpios frakcijos ląstelės baltymų.



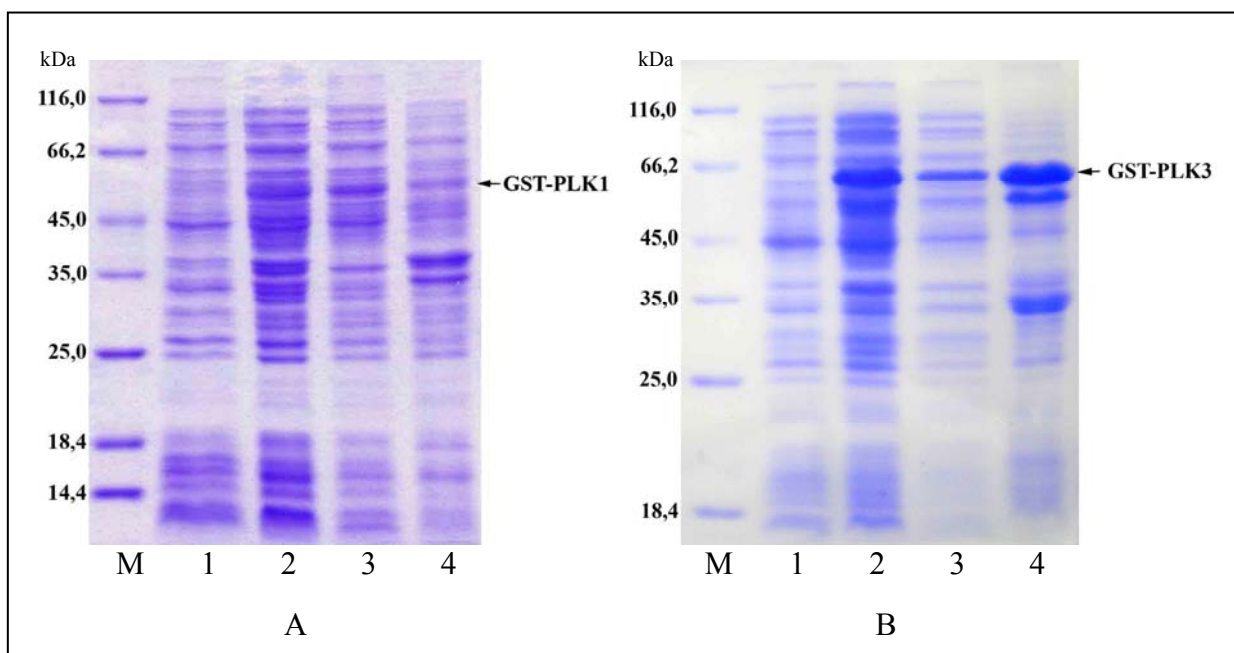
19 pav. PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2 ir PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2 ekspresijos ir tirpumo rezultatai, auginant 4 val +30 °C temperatūroje. A – GST-PLK1 (PBD) ekspresija ir tirpumas, 1-4 – mėginiai, atitinkamai prieš ir po indukcijos, tirpios ir netirpios baltymų frakcijų; B – GST-PLK1 (PBD) ekspresija ir tirpumas, 1-4 – mėginiai, atitinkamai prieš ir po indukcijos, tirpios ir netirpios baltymų frakcijų; M – molekuliųjų masių standartai. Tirpių ir netirpių fazių baltymų santykis yra apie 1:5.

Sumažinus indukcijos temperatūrą iki 20 °C ir padidinus laiką iki 6 valandų, rezultatai nepatenkino užbręžto tikslo (20 pav.). Šiuo atveju GST-PLK1 (PBD) baltymo ekspresija sumažėjo iki 16 %, o GST-PLK3 (PBD) truputį padidėjo ir sudaro 31 %, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų. Šiuo atveju GST-PLK1 (PBD), palyginus su kultivavimu 4 val +30 °C temperatūroje, baltymo kiekis tirpioje frakcijoje yra 2 % mažesnis. GST-PLK3 (PBD) tirpumas yra neblogas – 35 %, skaičiuojant nuo visų tirpios frakcijos ląstelės baltymų, tačiau netirpioje frakcijoje tikslinio baltymo yra daugiau, nei pusė visų ląstelės baltymų. Todėl tikėtina, kad gana didelė GST-PLK3 (PBD) ekspresuojama dalis yra susikaupta intarpiniuose kūneliuose

Praailginus indukcijos laiką iki 16 valandų, esant +20 °C temperatūrai, GST-PLK1 (PBD) baltymo tirpioje ir netirpioje baltymų frakcijose santykis yra didesnis, nei indukuojant 6 valandas, tačiau ekspresijos lygis nėra aukštas – vos 9 % visų ląstelės baltymų. GST-PLK3 (PBD) tirpumui 10 val skirtumas neturi įtakos, gana didelė šio baltymo dalis vis dar susikaupta intarpiniuose kūneliuose. SDS-PAGE rezultatai pateikti 21 paveiksle.

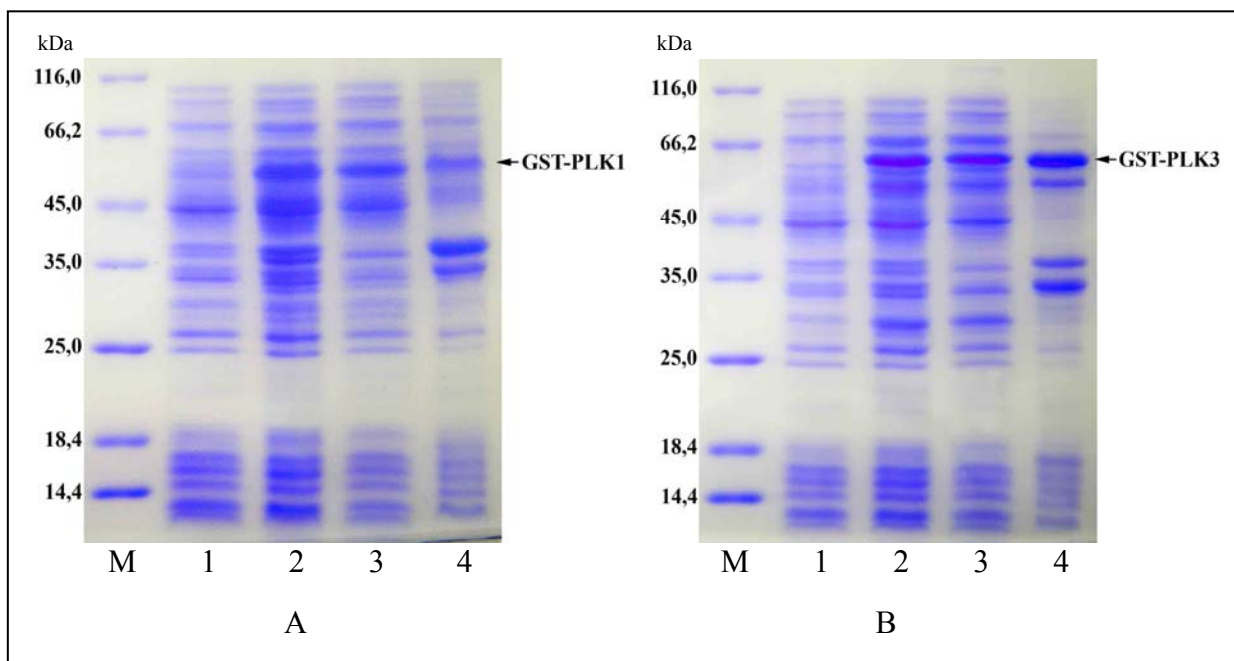


20 pav. PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2 ir PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2 ekspresijos ir tirpumo rezultatai, auginant 6 val +20 °C temperatūroje. A – GST-PLK1 (PBD) ekspresija ir tirpumas, 1-4 – mėginiai, atitinkamai prieš ir po indukcijos, tirpios ir netirpios baltymų frakcijų; B – GST-PLK1 (PBD) ekspresija ir tirpumas, 1-4 – mėginiai, atitinkamai prieš ir po indukcijos, tirpios ir netirpios baltymų frakcijų; M – molekulių masių standartai. Tirpių ir netirpių fazių baltymų santykis yra apie 1:5.



21 pav. PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2 ir PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2 ekspresijos ir tirpumo rezultatai, auginant 16 val +20 °C temperatūroje. A – GST-PLK1 (PBD) ekspresija ir tirpumas, 1-4 – mėginiai, atitinkamai prieš ir po indukcijos, tirpios ir netirpios baltymų frakcijų (tirpių ir netirpių fazių baltymų santykis yra apie 1:1); B – GST-PLK1 (PBD) ekspresija ir tirpumas, 1-4 – mėginiai, atitinkamai prieš ir po indukcijos, tirpios ir netirpios baltymų frakcijų (tirpių ir netirpių fazių baltymų santykis yra apie 1:5); M – molekulių masių standartai.

Užauginus *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-4T-2/PLK1 (PBD) ir *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-4T-2/PLK3 (PBD) kamienus iki 0,6–0,8 O.V. +37 °C temperatūroje ir indukavus 0,1 mM IPTG 16 valandų +16 °C temperatūroje, visų tiriamų GST-PLK1 (PBD) ir GST-PLK3 (PBD) baltymų tirpumas padidėjo, o svarbiausia, kad sumažėjo jų kiekis netirpioje baltymų fazėje (22 pav.).



22 pav. PLK1 (PBD)/pGEX-4T-2 ir PLK3 (PBD)/pGEX-4T-2 ekspresijos ir tirpumo rezultatai, auginant 16 val +16 °C temperatūroje. A – GST-PLK1 (PBD) ekspresija ir tirpumas, 1-4 – mėginiai, atitinkamai prieš ir po indukcijos, tirpios ir netirpios baltymų frakcijų; B – GST-PLK1 (PBD) ekspresija ir tirpumas, 1-4 – mėginiai, atitinkamai prieš ir po indukcijos, tirpios ir netirpios baltymų frakcijų; M – molekulių masių standartai. Tirpių ir netirpių fazių baltymų santykis yra apie 1:5.

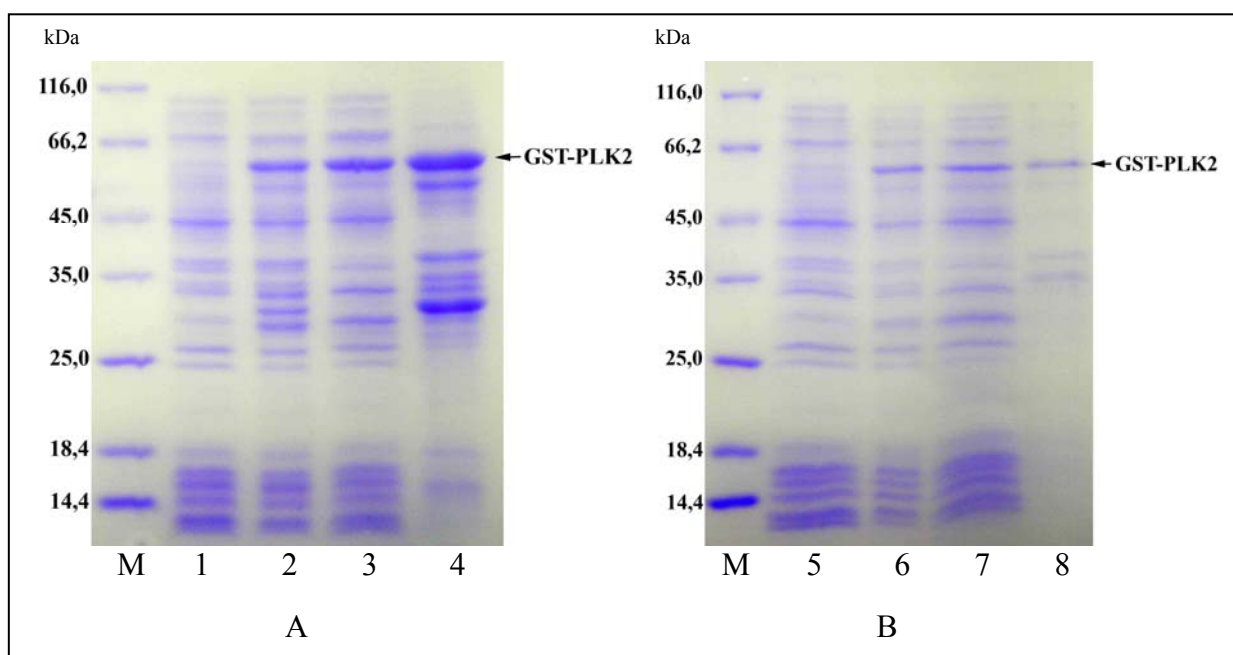
Gautus SDS-PAGE rezultatus (22 pav.) įvertinus UNSCAN-IT v 5.1 programa, nustatyta, kad praėjus 16 valandų po 0,1 mM IPTG įvedimo, GST-PLK1 (PBD) ekspresijos rezultatas – 15 %, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų, GST-PLK3 (PBD) – 15 %, kultivuojant producentą +16 °C temperatūroje. Didžioji visų šių baltymų dalis yra tirpioje baltymų fazėje, kurioje išlaiko savo natyvią formą ir aktyvumą. Tirpioje frakcijoje tikslinių baltymų kiekis nuo visų ląstelėje esančių baltymų rodo patenkinamus rezultatus: GST-PLK1 (PBD) – 25 %, GST-PLK3 (PBD) – 25 %. Šiuo atveju ryškiai sumažėjo GST-PLK3 (PBD) baltymo kaupimasis tarpiniuose kūneliuose – sudaro vos 25 % visų netirpios frakcijos ląstelės baltymų.

3.2.2. PLK2 ir PLK4 baltymų tirpumo nustatymo rezultatai

PLK2 (PBD)/pGEX-4T-2 ir PLK4 (PBD)/pGEX-4T-2 plazmidės transformuotos į *E. coli* BL21 (DE3) kamieną.

Atlikus 3.2.1. skyrelyje aprašytą GST-PLK1 (PBD) ir GST-PLK3 (PBD) baltymų tirpumo analizę ir nustatčius, kad geriausios šių baltymų didesniai tirpumui gauti sąlygos yra genetinių kamienų kultivavimas žemesnėje temperatūroje ilgesnį laiką, GST-PLK2 (PBD) ir GST-PLK4 (PBD) baltymai buvo kultivuojami 2 valandas, esant +37 °C temperatūrai, ir 16 valandų, esant +16 °C temperatūrai.

Pirmiausia patikrinta PLK2 (PBD)/pGEX-4T-2 raiška ir ekspresuoto GST-PLK2 (PBD) baltymo tirpumas, indukuojant 0,1 mM IPTG ir kultivuojant 2 val +37 °C temperatūroje. Iš elektroferogramos A, pateiktos 23 paveiksle, matyti, kad, esant tokioms sąlygoms, baltymų ekspresija nėra labai gera, tačiau įvertinus UNSCAN-IT v 5.1 programa, nustatyta, kad tikslinio baltymo kiekis yra 24 %, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų. GST-PLK2 (PBD) baltymo yra ir tirpioje, ir netirpioje fazėje.

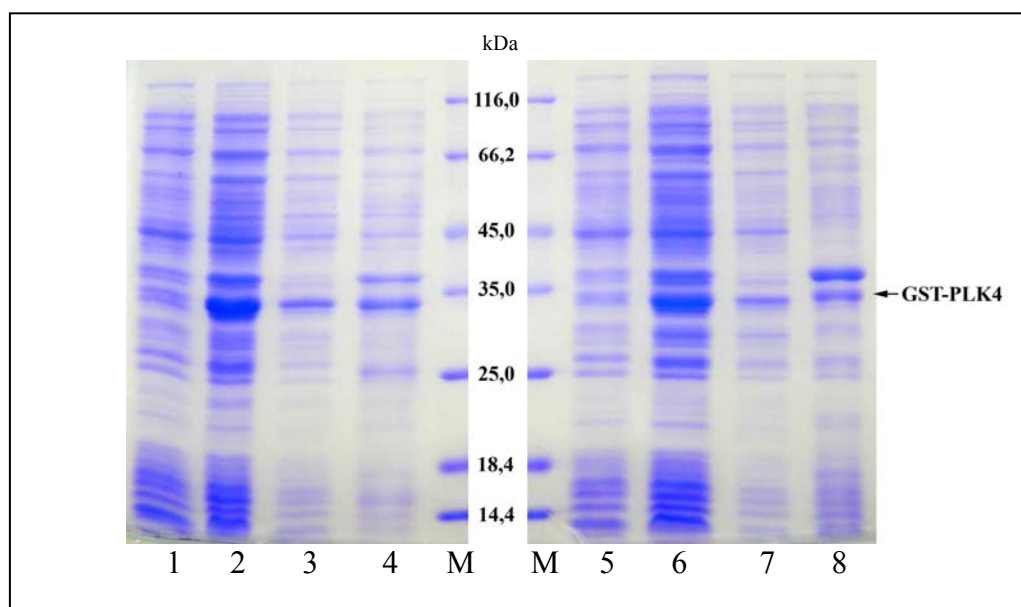


23 pav. PLK2 (PBD)/pGEX-4T-2 ekspresijos ir tirpumo rezultatai, auginant 2 val +37 °C temperatūroje (A) ir 16 val +16 °C temperatūroje (B). 1-4 – GST-PLK2 (PBD) mėginiai, atitinkamai prieš ir po indukcijos, tirpios ir netirpios baltymų fazių; 5-8 – GST-PLK2 (PBD) mėginiai, atitinkamai prieš ir po indukcijos, tirpios ir netirpios baltymų fazių; M – molekulinį masių standartai. Tirpių ir netirpių fazių baltymų santykis yra apie 1:1.

Sumažinus temperatūrą nuo +37 °C iki +16 °C ir padidinus kultivavimo laiką iki 16 valandų, skaičiavimo rezultatai parodė, kad didesnė GST-PLK2 (PBD) dalis yra tirpioje fazėje ir

sudaro 32 %, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų (23 pav. (B)). Intarpiniuose kūneliuose šiuo atveju yra sukonzentruota dvigubai mažiau tikslinio baltymo.

Patikrinta PLK4 (PBD)/pGEX-4T-2 raiška ir ekspresuoto GST-PLK4 (PBD) baltymo tirpumas. SDS-PAGE rezultatai pateikti 24 paveiksle.



24 pav. PLK4 (PBD)/pGEX-4T-2 ekspresijos ir tirpumo rezultatai, auginant 2 val +37 °C temperatūroje ir 16 val +16 °C temperatūroje. 1-4 – GST-PLK4 (PBD) mėginiai, atitinkamai prieš ir po indukcijos, tirpios ir netirpios baltymų fazių, auginant 2 val +37 °C temperatūroje; 5-8 – GST-PLK4 (PBD) mėginiai, atitinkamai prieš ir po indukcijos, tirpios ir netirpios baltymų fazių, auginant 16 val +16 °C temperatūroje; M – molekulių masių standartai. Tirpių ir netirpių fazių baltymų santykis yra apie 1:1.

Kultivuojant *E. coli* BL21 (DE3)/pGEX-4T-2/PLK4 (PBD) kamieną 2 valandas +37 °C temperatūroje po 0,1 mM IPTG įvedimo, GST-PLK4 (PBD) baltymo ekspresija yra 32 %, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų. Tikslinio baltymo tirpumas šiuo atveju nėra labai geras – beveik toks pat baltymo kiekis yra sukauptas intarpiniuose kūneliuose. Tirpioje baltymų frakcijoje GST-PLK4 (PBD) yra 47 %, skaičiuojant nuo visų tirpių ląstelės baltymų.

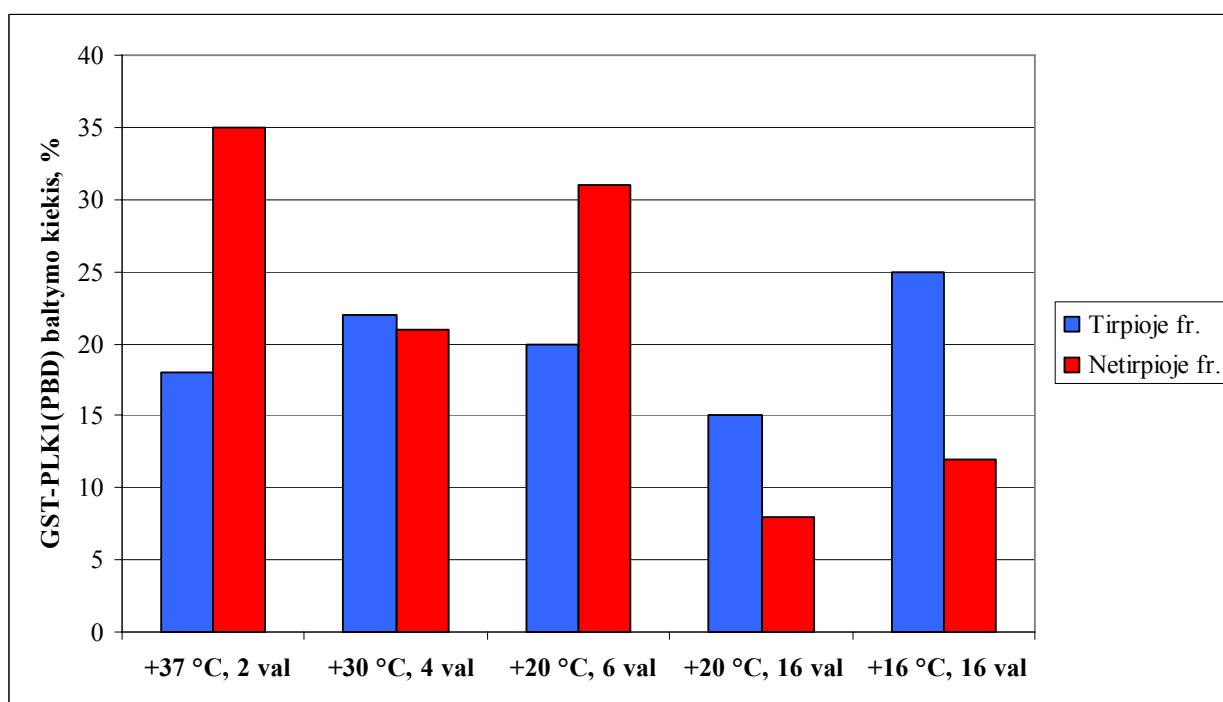
Sumažinus temperatūrą iki +16 °C ir padidinus kultivavimo trukmę po IPTG įvedimo iki 16 valandų, tikslinio baltymo ekspresija ir tirpumas sumažėjo, didesnę GST-PLK4 (PBD) dalis yra sukaupta intarpiniuose kūneliuose. Tikslinio baltymo kiekis tirpioje frakcijoje sudaro 37 %, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų.

3.2.3. GST-PLK baltymų tirpumo optimizavimo rezultatai

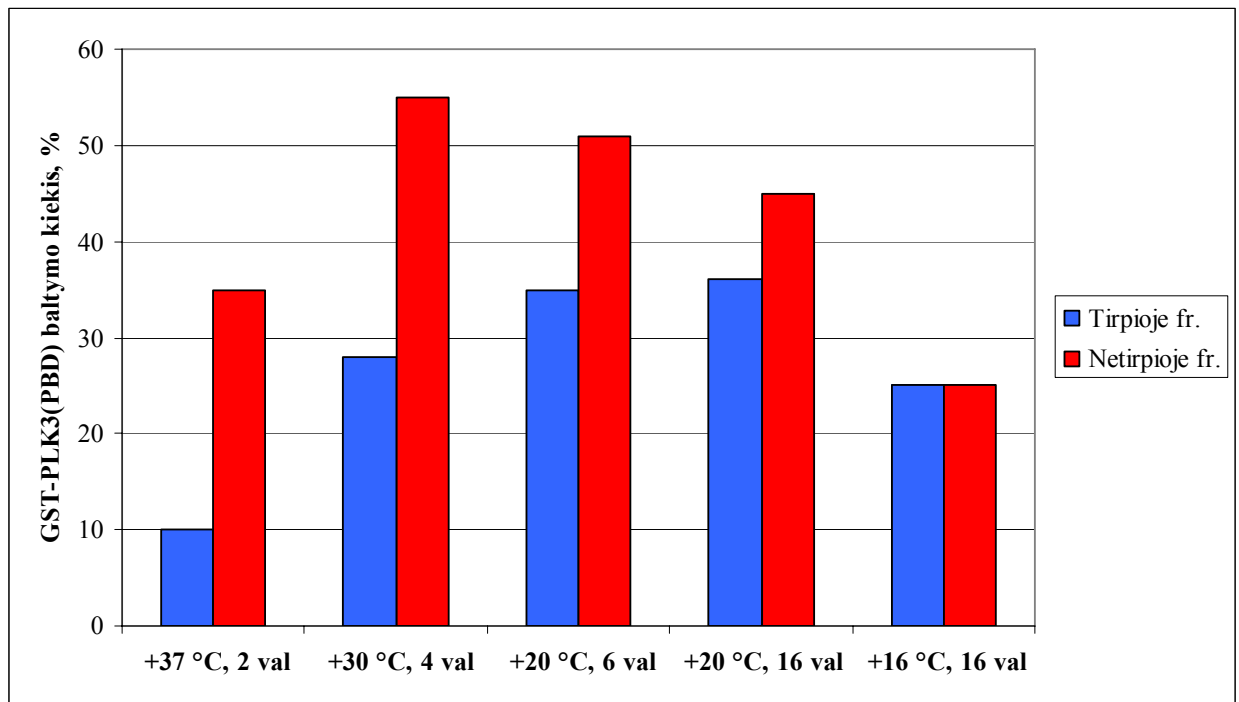
UNSCAN-IT v 5.1 programa įvertinti visų ekspresuotų tikslių baltymų lygis procentais nuo visų tirpioje ir netirpioje frakcijose esančių baltymų. Rezultatai pateikti 25, 26 ir 27 paveiksluose.

25 paveiksle pateiktoje diagramoje aiškiai matyti, kad didžiausias tirpaus GST-PLK1 (PBD) baltymo kiekis gaunamas kultivuojant rekombinantinį producentą 16 valandų +16 °C temperatūroje po IPTG įvedimo. Tikslių baltymo raiška šiuo atveju sudaro 15 % visų ląstelės baltymų, o intarpiniuose kūneliuose sukaupta tikrai apie 12 %, skaičiuojant nuo visų netirpios frakcijos baltymų.

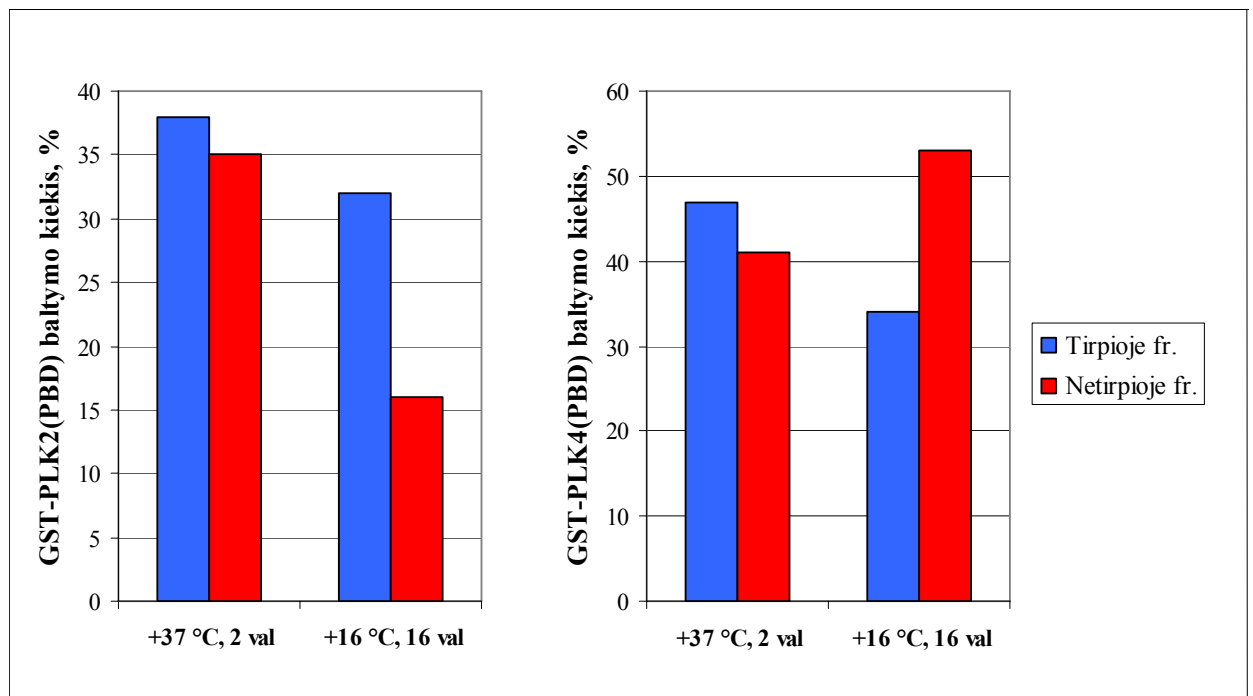
GST-PLK2 (PBD) baltymas labiau linkęs išsaugoti savo teisingą struktūrą, kai ekspresuojamas 2 valandas +37 °C temperatūroje po IPTG įvedimo (27 pav.). Tikslių baltymo ekspresija sudaro 24 %, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų, o netirpioje fazėje GST-PLK2 (PBD) sudaro 35 %, skaičiuojant nuo visų intarpinių kūnelių masės.



25 pav. GST-PLK1 (PBD) baltymo lygis procentais, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų. Diagramoje mėlyna spalva pažymėtas tikslių baltymo lygis tirpioje baltymų frakcijoje, raudona spalva – tikslių baltymo lygis netirpioje baltymų frakcijoje



26 pav. GST-PLK3 (PBD) baltymo lygis procentais, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų. Diagramoje mėlyna spalva pažymėtas tikslinio baltymo lygis tirpioje baltymų frakcijoje, raudona spalva – tikslinio baltymo lygis netirpioje baltymų frakcijoje



27 pav. GST-PLK2 (PBD) ir GST-PLK4 (PBD) baltymų lygis procentais, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų. Diagramoje mėlyna spalva pažymėtas tikslinio baltymo lygis tirpioje baltymų frakcijoje, raudona spalva – tikslinio baltymo lygis netirpioje baltymų frakcijoje

GST-PLK3 (PBD) geriausias kultivavimo sąlygos po IPTG indukcijos yra 6–16 valandų +20 °C temperatūroje, nes tokiomis sąlygomis ekspresuojama daugiausia tirpaus tikslinio baltymo – apie 35 %, skaičiuojant nuo visų tirpių ląstelės baltymų. Tikslinio baltymo raiška šiuo atveju yra 32 % nuo visų ląstelės baltymų ir 45 % sudaro intarpinių kūnelių kiekio (26 pav.).

Daugiausia tirpaus GST-PLK4 (PBD) baltymo susidaro, kultivuojant rekombinantinį producentą 2 valandas po IPTG įvedimo +37 °C temperatūroje (47 %, skaičiuojant nuo visų tirpių ląstelės baltymų). Šiuo atveju tikslinio baltymo ekspresija yra 32 %, skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų, o mažesnė dalis, nei kultivuojant 16 valandų +16 °C temperatūroje, yra sukaupta intarpiniuose kūneliuose (41 % visų netirpios fazės baltymų (27 pav.)).

4. IŠVADOS

1. Sukonstruotos keturios ekspresinės plazmidės, nešančios rekombinantinius žmogaus PLK1, PLK2, PLK3 ir PLK4 genus. Klonuotų genų sekos patvirtintos sekvenuojant. Genų transliacijos produktai sutampa su NCBI duomų bazėje pateikiamomis baltymo sekomis.
2. Patikrinus tikslinių baltymų ekspresijos lygį nustatyta, kad rekombinantinio baltymo sintezė priklauso nuo kultivavimo laiko ir temperatūros, kuriai esant auginami rekombinantiniai *E. coli* producentai.
3. Atlikus su GST baltymo seka sulietų rekombinantinių žmogaus PLK baltymų tirpumo analizę nustatyta, kad GST-PLK1 (PBD) ir GST-PLK3 (PBD) tirpiems baltymams gauti geriausia tinka žemesnių (16–20 °C) temperatūrų intervalas, o kultivavimo laikas – apie 16 valandų. Tuo tarpu, GST-PLK2 (PBD) ir GST-PLK4 (PBD) temperatūros mažinimas neturi prasmės, nemažai tirpių baltymų gaunama kultivuojant 2 valandas +37 °C temperatūroje po IPTG indukcijos.
4. Visos sukonstruotos genetinės plazmidės pasižymėjo tikslinių baltymų, sulietų su GST seka, ekspresija tirpioje frakcijoje, todėl tikėtina, kad visi rekombinantiniai baltymai yra natyvioje formoje. Išgrynintus rekombinantinius baltymus afinine chromatografija bus galima panaudoti PB domeno funkcijai tirti, kurti junginius, galinčius slopinti kinazių PB domeną, ir tirti jų poveikį vėžinių ląstelių dauginimuisi.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. BL21(DE3) Competent Cells, BL21(DE3)pLysS Competent Cells, and BL21 Competent Cells. Instruction Manual, Stratagene, 2003.
2. BLAGOSKLONNY, M.V. *Cell Cycle Checkpoints and Cancer*. USA: Eureka.com, 2001. ISBN 1-58706-067-1.
3. BRENNAN, I.M. et al. Polo-like Kinase Controls Vertebrate Spindle Elongation and Cytokinesis. *PLoS ONE*. 2007, nr.5, p.1-8.
4. CAMMACK, R. et al. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford: University Press, 2006. ISBN 0-19-852917-1.
5. CARCER, G. et al. Targeting Cell Cycle Kinases for Cancer Therapy. *Current Medicinal Chemistry*. 2007, nr.14, p.969-985. ISSN 0929-8673.
6. *Certificate of analysis. Klenow Fragment, exo-* [Interaktyvus] [Žiūrėta 2008 m. gegužės 23 d.]. Prieiga per internetą:
http://www.fermentas.com/profiles/modifyingenzymes/pdf/coa_ep0421.pdf.
7. *Certificate of analysis. Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)* [Interaktyvus] [Žiūrėta 2008 m. gegužės 23 d.]. Prieiga per internetą:
http://www.fermentas.com/profiles/modifyingenzymes/pdf/coa_ef0511.pdf.
8. DAI, W. et al. Polo-like kinases and centrosome regulation. *Oncogene*. 2002, nr.21, p.6195-6200. ISSN 0950-9232.
9. DONALDSON, M.M. et al. The mitotic roles of Polo-like kinase. *Journal of Cell Science*. 2001, nr.114, p.2357-2358.
10. ECKERDT, F. et al. Polo-like kinases and oncogenesis. *Oncogene*. 2005, nr.24, p.267-276. ISSN 0950-9232.
11. EYTAN, E. et al. Roles of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome and of its Activator Cdc20 in Functional Substrate binding. *PNAS*. 2006, nr.103, p.2081-2086.
12. ELIA, A.E.H. et al. The Molecular Basis for Phosphodependent Substrate Targeting and Regulation of Plks by the Polo-Box Domain. *Cell*. 2003, nr.115, p.83-95.
13. GLOVER, D.M. et al. Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes & Development*. 1998, nr.12, p.3777-3787. ISSN 0890-9369.
14. *Glutathione S-transferytase* [Interaktyvus] [Žiūrėta 2008 m. gegužės 1 d.]. Prieiga per internetą:
<http://www.drugmetabolism.co.uk/gst.aspx>.
15. *GST Gene Fusion System Handbook*. Amersham Biosciences. 2002. [Interaktyvus] [Žiūrėta 2008 m. gegužės 31 d.]. Prieiga per internetą:

- [http://www1.gelifesciences.com/APTRIX/upp00919.nsf/Content/87478CFA7E09E0C7C1256EB400417E59/\\$file/18115758.pdf](http://www1.gelifesciences.com/APTRIX/upp00919.nsf/Content/87478CFA7E09E0C7C1256EB400417E59/$file/18115758.pdf).
16. GUMIREDDY, K. et al. ON01910, a non-ATP-competitive small molecule inhibitor of Plk1, is a potent anticancer agent. *Cancer Cell*. 2005, nr.7, p.275-286.
 17. HABEDANCK, R. The Human Polo-like Kinase 4 is a Regulator of Centrosome Duplication. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Munchen, 2006, p.124
 18. HIGGINS, S.J.; HAMES, B.D. *Protein Expression: A Practical Approach*. Oxford: University Press, 1999. ISBN 0-19-963623-0.
 19. HOFFMANN, I. Regulation of Centriole Duplication in Mammalian Cells [Interaktyvus] [Žiūrėta 2008 m. gegužės 31 d.]. Prieiga per internetą: http://www.eie.gr/nhrf/institutes/ibrb/EMBO_Workshop-2007/invited_speakers_abstracts.pdf.
 20. JIANG, N. et al. Polo Box Domain of Plk3 Functions as a Centrosome Localization Signal, Overexpression of Which Causes Mitotic Arrest, Cytokinesis Defects, and Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006, nr.281, p.10577-10582.
 21. JONASSON, P. et al. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2002, nr.35, p.91-105. ISSN 1470-8744.
 22. KING, R.C. et al. *A Dictionary of Genetics*. 7th ed., Oxford: University Press, 2006. ISBN 0-19-530762-3.
 23. KOTHE, M. et al. Structure of the Catalytic Domain of Human Polo-like Kinase 1. *Biochemistry*. 2007, nr.46, p.5960-5971.
 24. LEUNG, G.C. et al. The SAK polo-box comprises a structural domain sufficient for mitotic subcellular localization. *Nature Structural Biology*. 2002, nr.9, p.719-724.
 25. LEWIN, B. *Genes VIII*. Oxford: University Press, 2004. ISBN 0-13-123826-4.
 26. LLAMAZARES, S. et al. Polo Encodes a Protein Kinase Homolog Required for Mitosis in *Drosophila*. *Genes & Development*. 1991, nr.5, p.2153-2165. ISSN 0890-9369.
 27. LOWERY, D.M. et al. Structure and function of Polo-like kinases. *Oncogene*. 2005, nr.24, p.248-259. ISSN 0950-9232.
 28. LOWERY, D.M. et al. The Polo-Box Domain: A Molecular Integrator of Mitotic Kinase Cascades and Polo-like Kinase Function. *Cell Cycle*. 2004, nr.3, p.128-131. ISSN 1538-4101.
 29. MCINNES, C. et al. Progress in the Discovery of Polo-like Kinase Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2005, nr.5, p.181-197. ISSN 1568-0266.
 30. MORGAN, D.O. *The Cell Cycle: Principles of Control*. Oxford: University Press, 2007.
 31. NOVAGEN 2004-2005 Catalog.

32. *Protein Molecular Weight calculator* [Interaktyvus] [Žiūrėta 2008 m. gegužės 23 d.]. Prieiga per internetą: http://www.bioinformatics.org/SMS/prot_mw.html.
33. *Protocol for PCR with Pfu DNA Polymerase* [Interaktyvus] [Žiūrėta 2008 m. gegužės 23 d.]. Prieiga per internetą: <http://www.fermentas.com/techinfo/pcr/pcrprotocolpfu.htm>.
34. SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 0-87969-577-3.
35. SASNAUSKAS, K. *Genų inžinerijos pagringai*. Biotechnologijos institutas, Vilnius. 2006. ISBN 9986-19-812-7 [Interaktyvus] [Žiūrėta 2008 m. gegužės 31 d.]. Prieiga per internetą: <http://www.ibt.lt/uploads/files/mokomoji/paskaitos/genuinzpagr.pdf>.
36. SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J.; JENKINS, J.B. *Principles of Genetic*. New York: John Wiley & Sons, 1997. ISBN 0-471-31196-0.
37. STAIN, G.S.; PARDEE, A.B. *Cell Cycle and Growth Control*. Canada: John Wiley & Sons, 2004. ISBN 0-471-25071-6.
38. STASIONYTĖ, R. *Žmogaus Granulocitų-Makrofagų Kolonijas Stimuliuojančio Faktoriaus Geno Klonavimas su T7 ir pS0-7 Promotoriais bei Ekspresija*. Baigiamasis bakalauro darbas. VGTU, 2007. p.66.
39. SUMARA, I. et al. Roles of Polo-like Kinase 1 in the Assembly of Functional Mitotic Spindles. *Current Biology*. 2004, nr.14, p.1712-1722.
40. SWARTZ, J.R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001, nr.12, p.195-201.
41. TAKAI, N. et al. Polo-like kinases (Plks) and cancer. *Oncogene*. 2005, nr.24, p.287-291. ISSN 0950-9232.
42. *The Operon Model of Gene Regulation* [Interaktyvus] [Žiūrėta 2008 m. gegužės 23 d.]. Prieiga per internetą: <http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/Topics/Operon.html>.
43. TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. The Role of Glutathione-S-Transferase in Anti-cancer Drug Resistance. *Oncogene*. 2003, nr.22, p.7369-7375. ISSN 0950-9232.
44. TU, Z. et al. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2005, nr.8, p.114-120. ISSN 0717-3458.
45. UWE, H. et al. Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Biochemistry*. 1994, nr.91, p.1736-1740.
46. WEERDT, B.C.M.; MEDEMA, R.H. Polo-like Kinases: A Team in Control of the Division. *Cell Cycle*. 2006, nr.5, p.853-864. ISSN 1538-4101.
47. ZIMMERMAN, W.C.; ERIKSON, R.L. Polo-like kinase 3 is required for entry into S phase. *Cell Biology*. 2007, nr.104, p.1847-1852.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju dr. Daumantui Matuliui už galimybę atlikti bakalaurinį darbą BTI Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje; bakalaurinio darbo vadovei dr. Jurgitai Matulienei už suteiktas žinias, naudingus patarimus ir pastabas; Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijos darbuotojoms – Jelenai Jachno ir Jolantai Torresan už pagalbą ir patarimus darbo metu. Taip pat dėkoju visiems Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijos darbuotojams už naudingus patarimus, draugišką atmosferą ir palaikymą.