



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Molekulinės biologijos studijų programos studentė

Eglė IVANAUSKAITĖ

Bakalaurinis darbas

**Žmogaus karboanhidrazės II aktyvaus centro mutantų
konstravimas ir rekombinantinio VA baltymo tirpumo
patikrinimas**

Darbo vadovas:

D. D. Timm

Konsultantas:

Dr. D. Matulis

Vilnius 2013

**Žmogaus karboanhidrazės II aktyvaus centro mutantų konstravimas ir
rekombinantinio VA baltymo tirpumo patikrinimas**

Bakalaurinis darbas rengtas VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje.

Eglė IVANAUSKAITĖ

Darbo vadovas:

David D. TIMM

Konsultantas:

Dr. Daumantas MATULIS

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	5
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	6
I. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1. Karboanhidrazių apžvalga.....	7
1.1.1. Karboanhidrazių šeimos	7
1.1.2. Žmogaus karboanhidrazės ir jų paplitimas oganizme	8
1.1.3. Karboanhidrazių aktyvusis centras ir katalizuojamos reakcijos	9
1.1.4. Karboanhidrazių slopikliai ir aktyvikliai	11
1.1.5. Žmogaus karboanhidrazė II	12
1.1.6. Žmogaus karboanhidrazė VA	13
1.1.7. Karboanhidrazių funkcijos ir raiškos sutrikimų sukeltos ligos	13
II. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	15
2.1. Naudoti prietaisai, medžiagos ir tirpalai	15
2.1.1. Naudoti prietaisai	15
2.1.2. Naudotos medžiagos ir rinkiniai	15
2.1.3. Naudotos terpės ir tirpalai.....	16
2.1.4. Naudoti kamieniai, vektoriai ir pradmenys	18
2.2. Metodai.....	21
2.2.1. CA II mutantų plazmidžių kūrimas.....	21
2.2.2. CA II mutantų raiškos gavimas E.coli ląstelėse.....	25
2.2.3. Rekombinantinės CA VA batymos tirpumo patikrinimas.....	26
III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	28
3.1. CA II mutanto 1 konstravimas ir geno raiška	28
3.2. CA II mutanto 2 konstravimas ir geno raiška	30
3.3. Rekombinantinio CA VA baltymo raiškos ir tirpumo patikrinimas	32
IŠVADOS.....	36
SUMMARY	37
PRIEDAS	38
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	39

SANTRUMPOS

APS – amonio persulfatas;

aps. – apsisukimai;

a. r. – amino rūgštis;

BHI – mitybinė terpė (angl. *Brain Heart Infusion*);

CA – karboanhidrazė (angl. *Carbonic Anhydrase*);

dNTP – deoksiribonukleotidas;

DTT – ditionitritolis;

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

Glu – glutamo rūgštis;

hCA – žmogaus karboanhidrazė (angl. *Human Carbonic Anhydrase*);

His – histidinas;

IPTG – izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas;

LB – mitybinė terpė (angl. *Lysogeny Broth*);

NDS – natrio dodecilsulfatas;

PGR – polimerazinė grandininė reakcija;

SDS – natrio dodecilsulfatas (angl. *sodium dodecyl sulfate*);

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

TAE – buferis (angl. *TRIS – acetate – EDTA*);

TEMED – tetrametiletildiaminas;

Thr – treoninas;

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

IVADAS

Karboanhidrazės (CA) – tai metalofermentai, kurių aktyviajame centre keturvalentiškai prisitvirtinęs Zn^{2+} jonas. Šie fermentai katalizuoja labai paprastą, bet itin svarbią fiziologinę reakciją – CO_2 hidrolizę. CA dalyvauja palaikant pastovų terpės pH, jonų mainų reakcijose ir kituose fiziologiniuose procesuose. CA yra aptinkami visuose gyvybės karalystėse, fiziologiškai labai skirtinguose organizmuose. Šie fermentai skirstomi į penkias šeimas, o žmoguje aptinkamos CA priskiriamos α -CA šeimai. Žmogaus organizme šie baltymai yra randami beveik kiekviename organe bei audinyje.

Dėl didelio paplitimo organizme, bei jų dalyvavimo svarbiuose fiziologiuose procesuose, CA raiškos sutrikimai tampa įvairių ligų priežastimi. Žinoma, kad padidėjusi jų raiška sukelia tokias ligas, kaip glaukoma, osteoporozė, nutukimas, inkstų bei virškinamojo trakto sutrikimai ir kt. Be to, dažnai padidėjusi CA raiška nustatoma vėžinėse ląstelėse. Pavyzdžiui, aplink auglį besiformuojančių, kraujagyslių ląstelėse aptinkamas CA II raiškos suaktyvėjimas.

Šiuo metu mokslinė bendruomenė aktyviai domisi ir tyrinėja CA. Tiriama jų struktūra, funkcijos, raiškos pokyčiai ir to poveikis ląstelei, slopinimas bei aktyvinimas. Pastarieji tyrimai labai naudingi bandant sukurti vaistus, kurių aktyvioji medžiaga turėtų būti CA aktyviklis ar slopiklis. Siekiant atrasti efektyvius ir specifiskus vaistus, būtini išsamūs fermento aktyvio centro ir sąveikos su substratu tyrimai.

Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje tiriamas CA ir ligando sąveikos, kuriami fermentų slopikliai. Šio darbo tikslas yra sukurti aktyviojo centro mutantus ir išskirti rekombinantinį baltymą, kurie vėliau būtų panaudoti tokiuose tyrimuose.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas:

Gauti CA II mutantą 1 ir CA II mutantą 2 su norimomis aktyviojo centro mutacijomis; patikrinti Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje sukonstruoto pET15b-6xHis-CAVA (40-305) geno raišką ir rekombinantinio CA VA baltymo tirpumą.

Darbo uždaviniai:

- Sukonstruoti CA II mutantą 1 su aktyviojo centro mutacijomis: V134A, I91R, N62S, T199V;
- Sukonstruoti CA II mutantą 2 su aktyviojo centro mutacijomis: N62T, H64Y, A65L, N67Q, F130Y, L203T, I91K;
- Patikrinti mutantinių baltymų (CA II mutanto 1 ir CA II mutanto 2) raišką *Escherichia coli* ląstelėse;
- Patikrinti pET15b-6xHis-CAVA (40-305) konstrukto geno raišką ir rekombinantinio CA VA baltymo tirpumą.

I. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Karbonhidrazių apžvalga

Karboanhidrazės – tai fermentai katalizuojantys grįžtamą anglies dioksido (CO₂) hidratacijos reakciją. Šie fermentai buvo atrasti 1932 m., o išskirti iš jaučio eritrocitų po metų (Meldrum ir Raughton, 1933). Meldrum ir Raughton su kolegomis ne tik pirmieji išskyrė CA baltymą, bet ir detalai aprašė jo ypatybes bei katalizuojamų reakcijų kinetines savybes. Šis jų darbas suteikė pagrindus tolesniems CA tyrimams ir net praėjus 80-imčiai metų šie fermentai yra toliau plačiai tyrinėjami ir kelia didelį mokslinės bendruomenės susidomėjimą.

CA yra aptinkamos ne tik eukariotuose, bet ir bakterijose, bei archėjose (Saczewski *et al.*, 2006). Visi šie fermentai skirstomi į penkias šeimas: α -, β -, γ -, δ - ir ϵ -CA (Akıncioğlu *et al.*, 2013). Žinduoliuose, tame tarpe ir žmoguje, yra aprašyta 16 skirtingų šio fermento izoformų, kurios skiriasi vieta ląstelėje ir pasiskirstymu audiniuose (Gilmour, 2010). Visi šie fermentai priskiriami α -CA šeimai. Skirtingos šeimos neturi reikšmingų amino rūgščių (a.r.) sekų panašumų, o skirstomos, pagal aktyviojo centro panašumus ar skirtumus (Akıncioğlu *et al.*, 2013). Bendras daugelio CA bruožas – Zn²⁺ jonas aktyviajame centre, kuris atlieka svarbiausią vaidmenį CO₂ hidratacijoje.

CA dalyvauja daugybėje skirtingų fiziologinių procesų, tokių kaip kaulų kalcifikacija, jonų transportas, fotosintezė ir kiti (Esbaugh *et al.*, 2006). Šie fermentai siejami su daug ligų ir fiziologinių sutrikimų. CA yra labai aktyviai tyrinėjami, yra ieškoma slopiklių ar aktyviklių, kurie keistų raiškos pokyčių sukeltų ligų vystymąsi ar jas stabdytų.

1.1.1. Karboanhidrazių šeimos

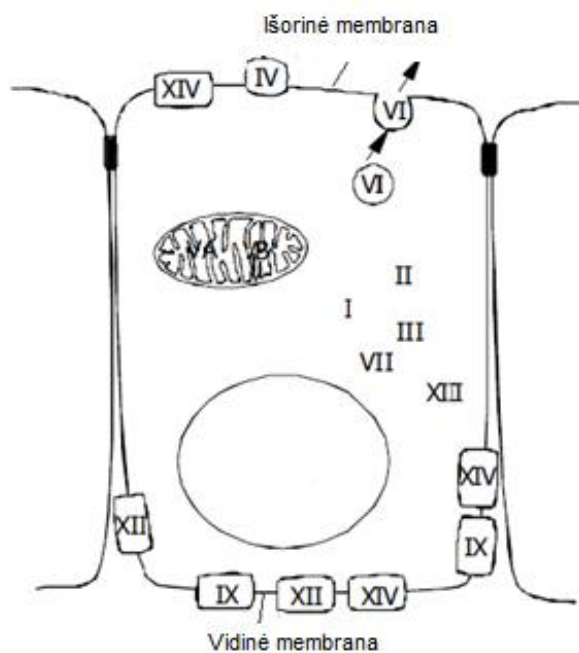
CA yra paplitę visuose gyvosios gamtos karalystėse, fiziologiškai labai skirtinguose organizmuose, turi skirtingas struktūras ir jas koduoja labai skirtingi genai (Hewett-Emmett, 2000). Visa tai, rodo ne tik tai, kad šie baltymai vystėsi atskirai vieni nuo kitų (konvergentinė evoliucija), bet ir kad jie biologiškai labai svarbūs (Ferry, 2010).

Kaip jau minėta anksčiau, gamtoje egzistuoja penkios CA šeimos: α -, β -, γ -, δ - ir ϵ -CA, kurios aptinkamos skirtingose organizmų grupėse. α -CA randami stuburiniuose gyvūnuose, taip pat augaluose, dumbliuose ir bakterijose. β -CA šeima dominuoja augaluose, dumbliuose ir bakterijose, be to, jų galima aptikti ir kai kuriose stuburiniuose. γ -CA yra randami archėjose ir bakterijose (Xu *et al.*, 2008; Supuran, 2008). Ši fermentų šeima aptinkama tik fotosintezę atliekančiuose eukariotiniuose organizmuose (Martin *et al.*, 2009). Jūriniuose titnagdumbliuose randami δ -CA ir ϵ -CA ir kol kas nėra žinoma daugiau juos sintetinančių organizmų (Supuran, 2008).

Nors α -CA šeimos fermentai yra monomeriniai, kitoms šio fermento šeimoms būdingas multimeriškumas: δ -CA ir ε -CA yra dimeriniai, γ -CA – trimeriniai, o β -CA šeimos baltymai turi daug oligomerinių formų (Gilmour, 2010). Kol kas daugiausia ištyrinėta yra α -CA šeima, nes jos fermentai yra sintetinami žmogaus organizme, tačiau pastarąjį dešimtmetį pradėta aktyviau domėtis ir kitomis šių fermentų šeimomis.

1.1.2. Žmogaus karboanhidrazės ir jų paplitimas organizme

Iki šiol žinduoliuose rasta 16 skirtingų CA arba su jomis susijusių baltymų, priskiriamų α -CA šeimai. Visi šie fermentai yra skirtingose ląstelės vietose ir nevienodai pasiskirstę audiniuose (Akincioğlu *et al.*, 2013). Žmogaus CA yra skirstomos į tris grupes. Pirmajai priklauso citoplazminiai CA: I, II, III, VA, VB, VII ir XIII. Antroji grupė – membraniniai fermentai: IV, IX, XII, XIV ir XV. Du iš jų (CA IV ir CA XV) prisitvirtinę prie ląstelių plazminės membranos, o likę trys yra transmembraniniai. Visi šie fermentai formavosi iš citoplazminių CA (Esbaugh ir Tufts, 2006). Trečiajai grupei priklauso fermentai, kurie nebeturi fermentinio aktyvumo, o yra tik su įprastais CA susiję baltymai (ang. *CA-related proteins - CA-RP*): CA VIII, X ir XI. Kadangi, visų trijų baltymų raiška vyksta smegenų ląstelėse, bei jų erdvinė struktūra yra labai konservatyvi, yra manoma, kad jie atlieka labai svarbią funkciją, kuri kol kas dar nenustatyta (Gilmour, 2010; Esbaugh ir Tufts, 2006). CA VI yra vienintelis sekretuojamas baltymas šioje šeimoje (1 pav.). Toks platus fermentų pasiskirstymas ląstelėje suteikia galimybę atlikti labai specifiskas funkcijas.



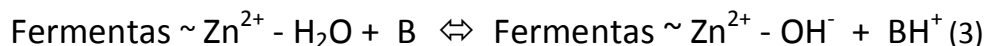
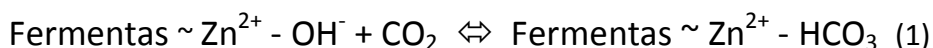
1 pav. CA pasiskirstymas ląstelėje (pagal Kivelä *et al.*, 2005)

CA raiška apsprendžiama audinio, kuriame yra ląstelė, bet ne ląstelės, kurioje sintetinamas baltymas (Christie *et al.*, 1997). CA II yra viena kataliziškai aktyviausių ir daugiausiai žmogaus organizme paplitusių CA – jis randamas beveik visuose audiniuose ir organuose (Nardfors *et al.*, 2010). CA I aptinkama žarnyno epitelio sekretuojančiose (angl. *mucosal*) ląstelėse ir kasos Langerhanso salelėse (angl. *Langerhans islets*) (Parkkila *et al.*, 1994). Be to, CA I ir CA II yra sintetintos raudonosiose kraujo ląstelėse (Väänänen *et al.*, 1985). Transmembraninis CA XII baltymas randamas inkstų, žarnyno ir šlapimo pūslės audinių ląstelėse. Kitas transmembraninis baltymas - CA IX yra aptinkamas skrandžio ir žarnyno audiniuose. Kaip jau minėta anksčiau, CAVI yra sekretuojamas fermentas, jis įeina į seilių sudėtį, o sintetinamas paausio ir submandibuliarinės limfinės liaukų ląstelių (Kivelä *et al.*, 1999). CAIV yra plaučių ir inkstų ląstelių membranų baltymas (Waheed *et al.*, 1992). CA VII raiška vyksta seilių liaukų ląstelėse (Tashian, 1989). CA VA baltymas aptinkamas tik kepenų, tuo tarpu CA VB – beveik kiekvieno audinio ląstelių mitochondrijose (Shah, 2000). Dideli kiekiai CA III sintetinami skeleto raumenų ląstelėse (Carter *et al.*, 1979). Toks platus šių baltymų paplitimas organizme rodo jų svarbą fiziologiniuose procesuose.

1.1.3. Karbonhidrazių aktyvusis centras ir katalizuojamos reakcijos

CA katalizuoja labai paprastą grįžtamą fiziologinę reakciją – anglies dioksido hidrataciją iki bikarbonato. Kadangi šie fermentai yra vieni greičiausių šiuo metu žinomų fermentų, ši reakcija vykdoma ypatingai greitai (Krishnamurthy *et al.*, 2008). Tai naudinga dėl svarbių fiziologinių funkcijų organizme, kurios reguliuojamos CO₂ hidratacijos. Išsamiausiai šios reakcijos mechanizmas ištirtas žmogaus CA II ir dėl CA izoformų homologiškumo, daroma prielaida, kad jis toks pat visuose α-CA šeimos atstovuose.

CA katalizuojama reakcija:

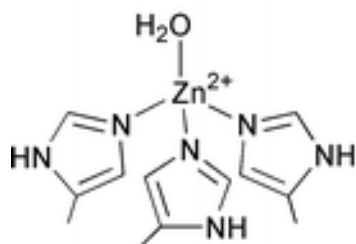


Hidratacijos pirmojoje stadijoje (1), CO₂ prisijungia prie CA aktyviojo centro. Hidroksi grupė, kuri prisijungusi prie Zn²⁺ jono nukleofiliškai atakuoja CO₂ ir susiformuoja HCO₃⁻. Tada vandens molekulė išstumia HCO₃⁻ iš aktyviojo centro (2). Trečiojoje stadijoje (3) atstatoma pirminė fermento būseną, atiduodant protoną nuo vandens molekulės aplinkoje esančioms skysčių molekulėms (Akincioğlu *et al.*, 2013).

Be CO₂ hidratacijos α -CA šeimos fermentai katalizuoja cianato hidratacija iki karbamido rūgšties, cianamido iki karbamido, karboksilinių esterų hidratacija ir kt. (Supuran ir Scozzafava, 2007).

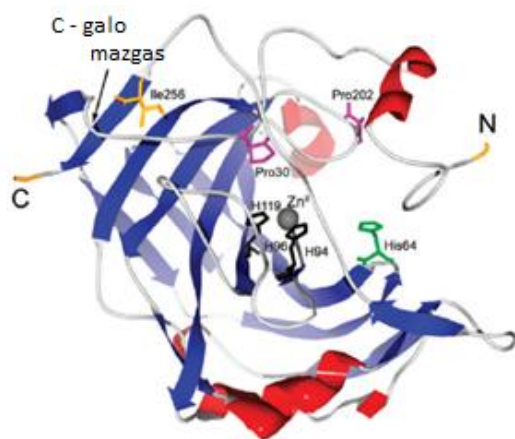
Detali CA aktyviojo centro struktūra yra žinoma, dėl daug mokslininkų grupių atliktų kristalografinių, kryptingos mutagenezės (angl. *site – specific mutagenesis*) ir kitų baltymo struktūros tyrimų. Kaip ir katalizuojamos reakcijos tyrimuose, taip ir baltymo struktūroje, daugiausia ištyrinėtas CA II, dėl to, kad šis izomeras tirpus, monomerinis, mažas, lengvai išskiriamas - tai palengvina darbą su juo. Tačiau atlikus daugiau tyrimų paaiškėjo, kad visi α -CA yra struktūriškai panašūs – aptinkama daug antrinės ir tretinės struktūros homologijų tarp izomerų, todėl daroma prielaida, kad visi fermentai turi panašius aktyviuosius centrus (Krishnamurthy *et al.*, 2008).

CA aktyviojo centro plotis ir gylis yra apie 15Å. Cinko jonas yra aktyviojo centro dugne, jis keturvalentiškai sąveikauja su trimis histidino liekanomis (His94, His96 ir His119) ir vandens molekulės hidroksido jonu (Ghiasi *et al.*, 2012). Tokia Zn²⁺ jono sąveika su fermento aktyviuoju centru yra konservatyvus bruožas visiems CA (Sly ir Hu, 1995) (2 pav.).



2 pav. CA aktyvusis centras (pagal Springings ir Hall, 2001)

Aktyvusis centras turi hidrofobinę ir hidrofilinę puses. Svarbią funkciją atlieka Glu106 ir Thr199 liekanos, baltymo hidrofilinėje dalyje – prie jų jungiasi vandenilis, CO₂ hidratacijos metu (Sly ir Hu, 1995). Pagal fermento struktūrą aišku, kad CO₂ jungiasi prie hidrofobinės dalies (McCall *et al.*, 2000). Pats baltymas sudarytas iš β plokštės ir kelių α grandinių aplink ją (3 pav.). Baltymo grandinės C-gale formuojasi labai reta ir neįprasta struktūra, vadinama C-galo mazgu (angl. *C - terminal knot*) (3 pav.).



3 pav. CA II struktūra (pagal Krishnamurthy *et al.*, 2008)

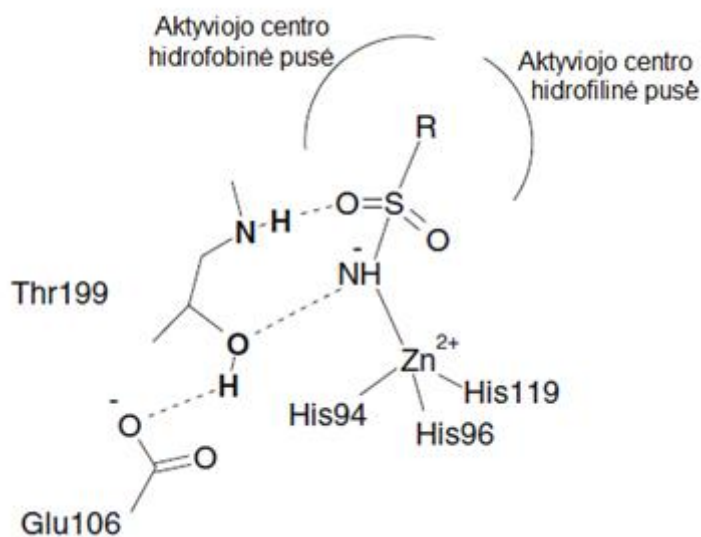
1.1.4. Karboanhidrazių slopikliai ir aktyvikliai

Dėl daugybės ligų ir sutrikimų, kuriuos sukelia CA fermentų padidėjusi/sumažėjusi raiška, yra aktyviai ieškoma efektyvių šio baltymo slopiklių ar aktyviklių. Jau daugiau nei 50 metų medicinoje naudojami pirminiai sulfonamidai - RSO_2NH_2 . Jų pagalba gydoma glaukoma, be to, yra naudojami kaip diuretikai. Šiuo metu slopiklių tyrimai labai suaktyvėjo, dėl galimybės jų pagalba gydyti nutukimą, vėžį, naudoti, kaip nuskausminamuosius ar diagnozuojant ligą (Supuran, 2010).

CA slopinimas ir aktyvinimas yra gerai ištirtas ir sąlyginai aiškus mechanizmas. Aktyvikliai jungiasi prie aktyviojo centro įėjimo (angl. *entrance of the active site*) ir dalyvauja jonų pernašoje tarp vandens molekulės ir reakcijos terpės, taip skatindamas metalo hidroksido susidarymą ir aktyvuodamas fermentą (Clare ir Supuran, 1994). Kadangi dažniau sveikatos sutrikimus sukelia per didelė CA raiška, daugiau yra tyrinėjami slopikliai. CA slopinimas vyksta pagal tris pagrindinius mechanizmus:

1. Slopiklis tiesiogiai jungiasi prie Zn^{2+} jono ir išstumia vandens molekulę iš fermento aktyviojo centro;
2. Slopiklio molekulė tvirtinasi prie vandens molekulės arba hidroksido jono;
3. Slopiklis jungiasi prie aktyviklio jungimosi vietos ir taip užblokuoja įėjimą į aktyvų centrą.

Kaip jau minėta, sulfonamidai yra seniausiai naudojami CA slopikliai. Šiuo metu yra apie trisdešimt jau naudojamų vaistų, kurių veiklioji medžiaga yra būtent sulfonamidai (Supuran, 2010). Jie prie fermento jungiasi per Zn^{2+} joną – sulfonamido molekulės azoto jonas sudaro su juo koordinacinę jungtį, taip išstumdamas hidroksi grupę iš aktyviojo centro. Be to, susiformuoja vandenilinių ryšių tinklas su Thr199 ir Glu106 (4 pav.) (Supuran ir Scozzafava, 2007).



4 pav. CA slopinimo sulfonamidais schema (pagal Supuran ir Scozzafava, 2007).

Didžiausios problemos, kuriant CA slopiklius bei aktyviklius, yra didelis šio fermento izoformų kiekis ir jų platus pasiskirstymas po organus ir audinius. Be to, labai sunku sukurti slopiklius ar aktyviklius, kurie būtų specifiški tam tikrai CA formai (Supuran, 2010). Šiuo metu labai aktyviai tyrinėjami fenoliai, kumarinai ir kitos prie Zn^{2+} jono nesijungiančios medžiagos, dėl savo gebėjimo jungtis prie konkrečios CA izoformos. Fenoliai jungiasi prie aktyviajame centre esančios hidroksi grupės arba vandens molekulės ir taip stabdo fermentą. Kadangi šie slopikliai sąveikauja su skirtingomis amino rūgštimis baltymo struktūroje, juos galima sukurti specifiskus tam tikrai CA (Innocenti *et al.*, 2009).

1.1.5. Žmogaus karboanhidrazė II

CA II – tai citozolinis, katalitiškai vienas aktyviausių fermentų, kurio greitis apie $10^6 s^{-1}$. Šis fermentas yra 29kDa dydžio monomeras. Pirmą kartą CA II baltymo, išskirto iš žmogaus eritrocito, kristalinė struktūra išsiaiškinta 1972 metais. Baltymas turi sferinę struktūrą ir jo pilnas aprašymas pateiktas skyrelyje „Karbonhidrazių aktyvusis centras ir katalizuojamos reakcijos“ (1.1.3.).

CA II raiška vyksta beveik visų audinių ir organų ląstelėse: eritrocituose ir trombocituose, akies lęšiuko ir Miulerio ląstelėse, virškinamojo trakto ląstelėse, kaulų osteoklastuose, inkstuose, plaučiuose, smegenų oligodendrocituose ir choroidinio rezginio epitelio ląstelėse, kepenų hepatocituose, seilių liaukų ir plaučių epitelio ląstelėse (Supuran *et al.*, 2007; Sly ir Hu, 1995). Šio fermento atliekama funkcija priklauso nuo audinio, kuriame vyksta jo raiška. Kai kuriose ląstelėse, CA II yra vienas svarbiausių rūgštinių bazių (angl. *acid base*) homeostazės veiksnių. Šie baltymai prisideda prie skrandžio ląstelių H^+ jonų sekrecijos, šlapimo rūgšties gamybos inkstuose. Be to,

skatina HCO_3^- sekreciją ląstelėse, kurios atsakingos už kasos sulčių, audinių skysčio, cerebrospinalinio skysčio, seilių gamybą. Labai svarbu nepamiršti, kad CA II skatina CO_2 apykaitą inkstuose, plaučiuose ir eritrocituose (Sly ir Hu, 1995).

CA II geno raiškos sutrikimai sukelia kai kurias ligas ir onkologinius susirgimus. Manoma, kas šis fermentas svarbus auglių vystymėsi, nes jo raiška būna padidėjusi neo-kraujagyslių (angl. *neovessels*) endotelio ląstelėse. CA II raiška būna padidėjusi glaukomos pacientų akies audiniuose, dėl to sutrinka akies skysčių apykaita ir padidėja jų spaudimas į akies nervą (Vierner *et al.*, 2009). Vienintelė iki šiol žinoma paveldima CA liga yra CA II nepakankamumo sindromas (angl. *CA II deficiency syndrome*). Šis sindromas paveldimas kaip autosominis recesyvinis požymis (Sly *et al.*, 1985). CA II nepakankamumo sindromo pasekmės yra osteoporozė, inkstų acidozė ir cerebralinė kalcifikacija. Be to, ligoniui būdingas sulėtėjęs vystymasis, žemas ūgis, dažni kaulų lūžiai bei smegenų kognityviniai sutrikimai, kurių pasekmės varijuoja nuo lengvų mokymosi sunkumų iki silpnaprotystės (Shah *et al.*, 2004).

1.1.6. Žmogaus karboanhidrazė VA

CA VA – tai citoplazminis, žemo aktyvumo 30kDa dydžio fermentas, aptinkamas kepenų ląstelių mitochondrijose. Mitochondrijų CA pirmą kartą išskirta iš jūros kiaulytės kepenų ląstelių (Dodgson, 1987). Išsamesni tyrimai parodė, kad egzistuoja dvi šio baltymo formos: CA VA aptinkama tik kepenų ląstelių, ir CA VB, kuri randama visų kitų ląstelių mitochondrijose. Dėl tokių fermento raiškos skirtumų, daroma prielaida, kad šie du baltymai turi skirtingas fiziologines funkcijas (Fujikawa-Adachi *et al.*, 1999).

Kadangi VB yra labiau paplitę po organizmą, manoma, kad VA kilo iš VB ir yra skirtas atlikti specifinę funkciją kepenyse. Iki šiol yra žinoma tik tiek, kad šis fermentas atsakingas už HCO_3^- pateikimą į mitochondrijas, kurių membrana yra nepralaidi šiam jonui. HCO_3^- jonas reikalingas piruvato karboksilazei ir karbamilfosfato sintetazei I (Shah *et al.*, 1999). Pirmasis fermentas vykdo gliukogenezę ir pateikiamą joną panaudoja pirmajai jos fazei. Antrasis fermentas vykdo ureagenezę ir, taip pat, joną naudoja pirmajai reakcijos fazei.

1.1.7. Žmogaus karboanhidrazių funkcijos ir raiškos sutrikimų sukeltos ligos

Kadangi fermentas naudoja ir suformuoja laisvus protonus, bei bikarbonato jonus, jis aktyviai dalyvauja pH reguliacijoje, jonų mainų reakcijose ir įtakoja skysčių pernašą. Reguluojant skysčių pernašą šie baltymai netiesiogiai dalyvauja vandeninio tirpalo, cerebrospinalinio skysčio, skrandžio rūgšties ir kasos sulčių gamyboje (Sly ir Hu, 1995). Be to, CA dalyvauja daugelio organų, bei audinių elektrolitų sekrecijoje, kaulų kalcifikacijoje, biosintetinio reakcijose – gliukoneogenezėje,

lipogenezėje, ureagenezėje (Supuran, 2010). Žinoma, svarbiausia ir pagrindinė šio baltymo funkcija CO₂ homeostazė, jo pernaša tarp plaučių audinio ir metabolizuojančių audinių. Skirtingų CA formų funkcija priklauso nuo jų vietos organizme – audinio ar vietos ląstelėje. Skeleto raumenų fermentai – CA III yra labai svarbūs CO₂ išnešimui iš audinio, be to dalyvauja rūgščių judėjime per raumenų ląstelių membranas (Wang *et al.*, 1998). CO₂ pernašą kraujo ląstelėse atlieka, ten aptinkami CA I ir CA II, tokiu būtu palaikydami CO₂ metabolizmą visame organizme. Inkstuose ekspresuojami CA dalyvauja rūgštinių grupių pernašoje, taip reguliuodami terpės pH (Gilmour, 2010). CA VA pateikia HCO₃⁻ joną piruvato karboksilazei ir taip dalyvauja pirmajame gliukoneogenezės etape, bei karbamilfosfato sintetazei I ir dalyvauja ureagenezės pirmajame etape (Shah *et al.*, 2000). Kaip jau minėta anksčiau, CA VIII, X ir XI raiška vyksta smegenų glijos ląstelėse ir, nors jų funkcija nėra iki galo nustatyta, manoma, kad jos dalyvauja smegenų vystymėsi (Sapirstein *et al.*, 2006).

Dėl dalyvavimo daugybėje svarbių fiziologinių reakcijų ir pasiskirstymo skirtinguose audiniuose bei ląstelėse, šių fermentų raiškos pokyčiai gali sukelti įvairias ligas, pradedant inkstų veiklos sutrikimais, virškinamojo trakto ligomis, baigiant onkologinėmis ligomis. Seniausiai žinoma CA sukeliama liga yra glaukoma. Glaukomą sukelia padidėjusi CA II ir CA XII raiška (Puccetti *et al.*, 2005). Taip pat, CA siejami su tokiomis ligomis, kaip nutukimas (pakitusi CA II, CA VA ir CA VB raiška) ir epilepsija (CA VII ir CA II raiškos padidėjimas) (Puccetti *et al.*, 2005). Osteoporozė siejama su CA II raiškos sumažėjimu eritrocituose (Sly *et al.*, 1985). Yra CA formų, kurių raiškos padidėjimas ar sumažėjimas visada aptinkamas vėžinėse ląstelėse ir todėl jos tapo vienos iš vėžio žymenų. Vienas iš jų yra CA IX, kurio padidėjusi raiška dažnai aptinkama gaubtinės žarnos, gimdos kaklelio, krūties ir inkstų augliuose. To paties fermento padidėjusi raiška aptinkama šlapimo pūslės ir skrandžio vėžio atvejais. Paprastai CA XII raiška padidėja inkstų, gaubtinės žarnos, prostatos, kasos, kiaušidžių, sėklidžių, plaučių ir smegenų vėžinių susirgimų atvejais.

Taigi, dėl CA atliekamų funkcijų ir didelio paplitimo, ji tampa svarbiu veiksnio daugelio ligų vystymėsi.

II.MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Naudoti prietaisai, medžiagos ir tirpalai

2.1.1. Naudoti prietaisai:

- autoklavas;
- centrifūga „Beckmann“
- centrifūga „Eppendorf Centrifuge 5415 R“
- DNR elektroforezės aparatas „Sigma-Aldrich“;
- elektroforezės aparatas „Bio-Rad“
- kaitinimo plytelė „ИСКОПКА“
- laminarinis boksas;
- magnetinė maišyklė „Biosan“;
- mikrobangų krosnelė „Gamma“;
- pH-metras „LaboChema“;
- PGR termocikleris „Eppendorf Mastercycler personal“;
- purtyklė „BIOSAN Multi-vortex V-32“
- spektrofotometras „NanoDrop“;
- spektrofotometras „Jenway 6305“;
- svarstyklės „Kern 572“;
- termostatas „Eppendorf ThermoStat plus“;
- ultragarso šaltinis „Bandolin Sonopuls“;
- UV/WL šaltinis su gelio dokumentavimo sistema „MiniBis Pro“.

2.1.2. Naudotos medžiagos ir rinkiniai:

- *Alfa Aesar*: gliukozė;
- *BioRad*: TEMED, glicinas;
- *Fluka*: bisakrilamidas, Coomassie Brilliant Blue R – 250, etidžio bromidas, HCl, NaOH, mielių ekstraktas, LB mitybinė terpė, BHI mitybinė terpė;
- *Labochema*: karbamidas;
- *Matheson Coleman & Bell*: bromfenikolio mëlis;
- *Peaxum*: ZnSO₄;

- *Roche*: chloramfenikolis, glicerolis;
- *Roth*: agar – agaras, ampicilinas, APS, NaCl, MgCl₂, tetraciklinas, triptonas;
- *Sigma*: acto rūgštis, akrilamidas, DTT, EDTA, etanolis, KCl, NDS, TRIS, SDS;
- *Thermo Fisher Scientific*: agarozė, IPTG, baltymų dydžio žymuo (Protein Molecular Weight Marker), DNR dydžių žymuo (Gene Ruler™ DNA Ladder Mix), DNR mėginių dažas (6X orange Loading Dye), dNTP mišinys, NdeI, *pfu* DNR polimerazė ir jos buferinis tirpalas, MgSO₄, rinkiniai: „GeneJET™ Gel Extraction Kit“, „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“, „GeneJET™ PCR Purification Kit“.

2.1.3. Naudotos terpės ir tirpalai:

Skysta LB (Luria/Miller) mitybinė terpė:

25 g terpės ištirpinama 1 L distiliuoto vandens. Tirpalas supilamas į karščiui atsparią kolbą ir autoklavuojama 20 min. 1 atm. slėgyje.

Agarizuota LB (Luria/Miller) mitybinė terpė:

Į 1 L skystos LB mitybinės terpės dedama 15 g agar-agaro. Tirpalas supilamas į karščiui atsparų indą ir autoklavuojama 20 min. 1 atm. slėgyje.

BHI (Brain Heart Infusion) terpė:

17.5 g terpės ištirpinama 1 L distiliuoto vandens. Tirpalas supilamas į karščiui atsparią kolbą ir autoklavuojamas 20 min. 1 atm. slėgyje.

S.O.C. terpė:

20 g triptono ir 5 g mielių ekstrakto ištirpinama 1 L distiliuoto vandens, pridedama 10 mM NaCl ir 3,5 mM KCl. Tirpalas supilamas į karščiui atsparų indą ir autoklavuojamas 20 min. 1 atm. slėgyje. Tirpalui atvėsus pridedama 10 mM MgCl₂ ir 20 mM gliukozės. Terpė filtruojama per 0,2 μm polivinilidino difluorido filtrą, išpilstoma po 900 μL ir laikoma -20°C temperatūroje.

Akrilamido/bisakrilamido tirpalas (30%):

29,2 g akrilamido ir 0,8 g bisakrilamido ištirpinama 70 mL distiliuoto vandens. Tirpalas filtruojamas per stiklinį filtrą ir supilamas į tamsų, stiklinį indą. Laikoma +4°C temperatūroje.

Akrilamidinių gelių dažas:

113 mL etanolio, 23 mL acto rūgšties ir 0,6 g Coomassie Brilliant Blue R-250 ištirpinama nedideliame kiekyje distiliuoto vandens. Gerai išmaišius, tirpalas skiedžiamas iki 250 mL. Tirpalas laikomas kambario temperatūroje.

Biomasės ardymo buferinis tirpalas:

25 mM TRIS/HCl, 0.1 M NaCl ir TRITON tirpinamas apie 40 mL distiliuoto vandens. Tirpalo pH koreguojamas iki 7,2. Po to, atskiedžiama distiliuotu vandeniu iki 50 mL. Tirpalas laikomas +4°C temperatūroje.

Poliakrilamido gelis:

1) Apatinis frakcionuojantis gelis (12%):

30% akrilamido/bisakrilamido tirpalas	2 mL
1,5 M TRIS pH 8,8	1,25 mL
10% NDS	50 µL
H ₂ O	1,585 mL
10% APS	25 µL
TEMED	2,5 µL
<u>Bendras tūris:</u>	5 mL

2) Viršutinis koncentruojantis gelis (4%):

30% akrilamido/bisakrilamido tirpalas	0,335 mL
1,5 M TRIS pH 8,8	0,625 mL
10% NDS	25 µL
H ₂ O	1,5 mL
10% APS	12,5 µL
TEMED	2,5 µL
<u>Bendras tūris:</u>	2,5 mL

6x baltymų mėginių dažas:

300 µL 1 M TRIS, 1,2 g SDS, 92.5 mg DTT, 6mL glicerolio, 60 mg bromfenikolio mėlio ištirpinama nedideliame kiekyje distiliuoto vandens. Po to, tirpalas atskiedžiamas vandeniu iki 10 mL. Dažas laikomas -20°C temperatūroje.

10x TRIS-glicino-SDS elektroforezės buferis:

10 g SDS, 30 g TRIS bazės ir 144 g glicino ištirpinama 1 L distiliuoto vandens ir laikoma +4°C temperatūroje.

50x TAE elektroforezės buferis:

242 g TRIS bazės, 57,1 mL ledinės acto rūgšties ir 100 mL 0,5 M EDTA ištirpinama 1 L distiliuoto vandens. Buferis laikomas kambario temperatūroje.

2.1.4. Naudoti kamieniai, vektoriai ir pradmenys

Pradmenys:

CA II mutanto 1 pradmenys:

Pavadinimas:	Seka:
V134A	5'-TTGGGAAAGCTGCGCAGCAACCTGATG-3'
V134A atvirkštinis (atv.)	5'-CATCAGGTTGCTGCCAGCTTTCCCAA-3'
I91R	5'-CTTACAGATTGAGGCAGTTTCACTTTTTCAC-3'
I91R atv.	5'-GTGAAAGTGAAACTGCCTCAATCTGTAAG-3'
N62S	5'-GAGGATCCTCAACA GTGGTCATGCTTTC-3'
N62S atv.	5'-GAAAGCATGACCACTGTTGAGGATCCTC-3'
T199V	5'-GGCTCACTGACCGTCCCTCCTCTTCTG-3'
T199V atv.	5'-CAGAAGAGGAGGGACGGTCAGTGAGCC-3'

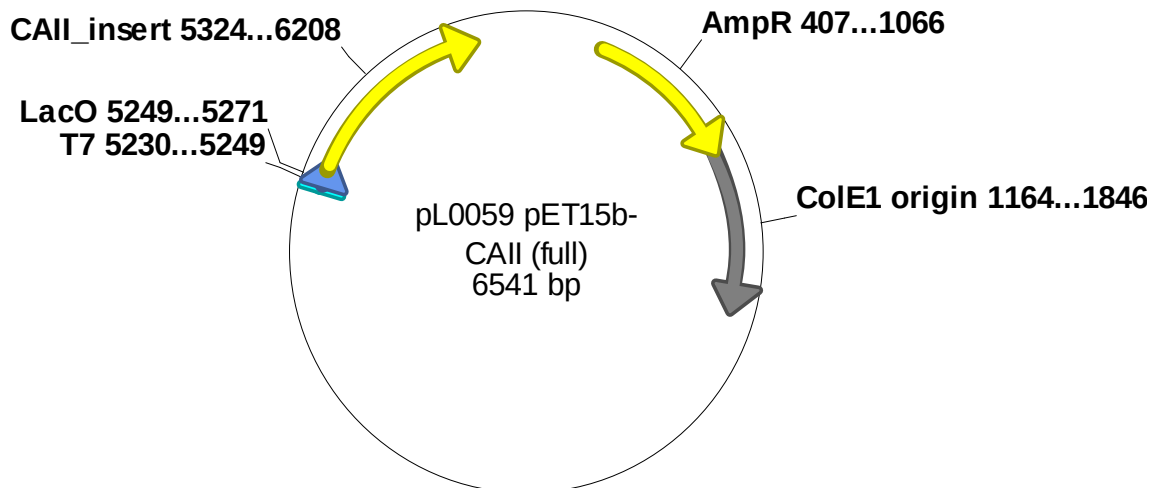
CA II mutanto 2 pradmenys:

Pavadinimas:	Seka:
N62T_H64Y	5'-CCTGAGGATCCTCAACA CTGGTATGCTTTCAACGTGGAG-3'
N62T_H64Y atv.	5'-CTCCACGTTGAAAGCAT AACCAGTGTTGAGGATCCTCAGG-3'
A65L_N67Q	5'-CCTCAACACTGGTTATCTATTCCAGGTGGAGTTTGATGAC-3'
A65L_N67Q atv.	5'-GTCATCAAACCTCCACCTGGAATAGATAACCAGTGTTGAGG-3'
F130Y	5'-GAACACCAAATATGGGGATTATGGGAAAGCTGT-3'
F130Y atv.	5'-ACAGCTTTCCCATTAATCCCATATTTGGTGTTTC-3'
L203T	5'-GACCACCCCTCCTCTTACGGAATGTGTGACCTG-3'
L203T atv.	5'-CAGGTCACACATTCCGTAAGAGGAGGGGTGGTC-3'
I91K	5'-GGCACTTACAGATTGAAGCAGTTTCACTTTTCAC-3'
I91K atv.	5'-GTGAAAGTGAAACTGCTTCAATCTGTAAGTGCC-3'

*raudona spalva pažymėtos mutacijos

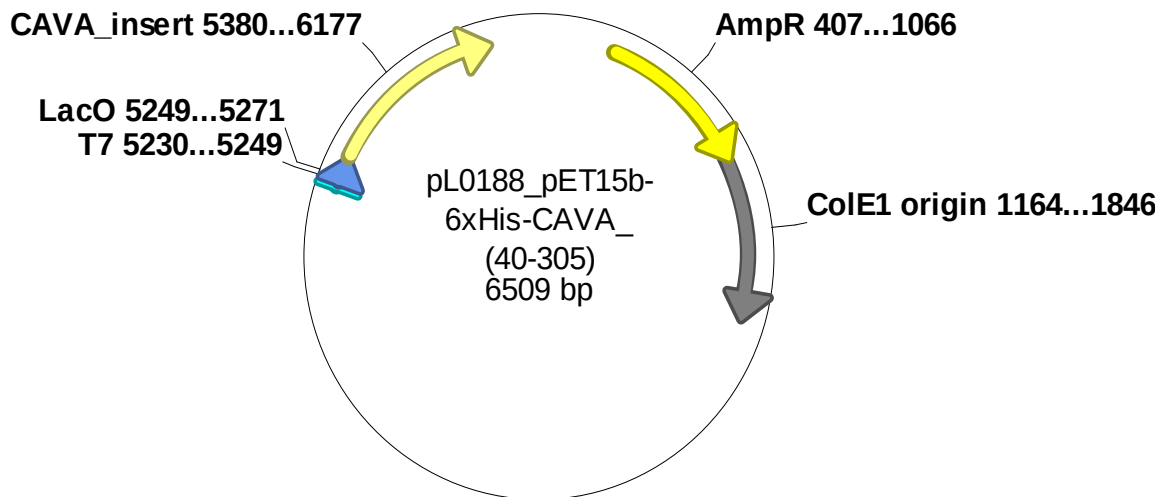
Vektoriai:

pET15b – CA II vektorius turi T7 promotorių ir atsparumo ampicilinui geną.



5 pav. pET15b vektoriaus, su pilnu CA II genu, struktūra.

pET15b – 6xHis - CAVA vektorius turi T7 promotorių, šešis histidinus koduojančią nukleotidų seką baltymo geno N'-gale, bei atsparumo ampicilinui geną.



6 pav. pET15b vektoriaus, su rekombinantiniu CA VA genu, struktūra.

Kamienai:

Escherichia coli XLI-Blue ląstelės: endA1, HSDR17 (rk-, mk+), supE44, thi-1, lambda-, recA1, gyrA96, reMA1, lac-, [F, ProAB, lacIqZAM15, TnlO (tetR)].

Ląstelės naudotos CA II mutantų konstrukto pET15b - CA II padauginimui. Kamienas neturi atsparumo antibiotikams. Šios ląstelės labai tinkamos plazmidės klonavimui, nes neturi endonukleazės, tai padidina išskiriamos DNR kokybę, ir neatlieka rekombinacijos, tai padidina įkeliamo geno stabilumą.

Escherichia coli BL21 (DE3): F- *ompT gal dcmlonhsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)* λ (DE3 [*lac I lacUV5-T7 gene1 and 1 sam7nin5*]).

Ląstelės naudotos CA II mutantų baltymams sintetinti. Kamienas neturi atsparumo antibiotikams. Šios ląstelės tinkamos baltymo skyrimui, nes neturi *OmpT* ir *Lon* proteazių, kurios gali apsunkinti baltymo skyrimą. Kadangi į konstrukto yra įjungtas T7 RNR polimerazės genas, lengviau sintetinami eukariotiniai baltymai.

Escherichia coli OrigamiTM: Δ (*ara-leu*)7697 Δ *lacX74* Δ *phoA* *PvuII* *phoR* *araD139* *ahpC* *galE* *galK* *rpsL* F' [*lac+ lacI*]*pro*] *gor522::Tn10* *trxB* (KanR, StrR, TetR)4.

Ląstelės naudotos rekombinantiniam CA VA baltymui sintetinti. Kamienas turi atsparumą kanamicinui, streptamicinui ir tetraciklinui.

Escherichia coli Rosetta gamiTM (DE3): Δ (*ara-leu*)7697 Δ *lacX74* Δ *phoA* *PvuII* *phoR* *araD139* *ahpC* *galE* *galK* *rpsL* (DE3) F' [*lac+ lacI q pro*] *gor522::Tn10* *trxB* pRARE2 (CamR, KanR, StrR, TetR)4.

Šios ląstelės naudotos rekombinantiniam CA VA baltymui sintetinti. Kamienas turi atsparumą tetraciklinui, kanamicinui, streptamicinui ir chloramfenikoliui. Šios ląstelės tinkamos baltymų, su retai *E. coli* naudojamais kodonais, raiškai. Be to, juose yra *trxB* ir *gor* mutacijos, kurios įgalina ląstelę citoplazmoje formuoti disulfidinius ryšius.

Escherichia coli BL21(DE3) pGKJE8: genai tokie pat kaip *E. coli* BL21 (DE3), tik su turi *dnaK-dnaJ-grpE* už *araB* ir *agoEgroET* už *Pzt1*.

Ląstelės naudotos rekombinantiniam CA VA baltymui sintetinti. Kamienas turi atsparumą chloramfenikoliui. Šios ląstelės turi indukuojamą šaperono plazmidę pG-KJE8.

Escherichia coli BL21(DE3) pLysS: F- *ompT hsdSB(rB- mB-)* *gal dcm* (DE3) pLysS (CamR)

Ląstelės naudotos rekombinantiniam CA VA baltymui sintetinti. Kamienas turi atsparumą chloramfenikoliui. Neturi neturi *OmpT* ir *Lon* proteazių.

Escherichia coli BL21(DE3) Codon Plus – RIL:*E. coli* B F⁻ *ompThsdS*(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁻ Tet^r gal λ (DE3) endA The [argUileYleuW CAM^r].

Ląstelės naudotos mutantiniam CA VA baltymui gauti. Kamienas turi atsparumą chloramfenikoliui.

2.2. Metodai

2.2.1. CA II mutantų plazmidžių kūrimas

Mutacijų į plazmidę įkėlimas

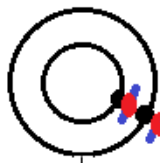
Mutacijos į plazmidę įkeliamos pagal 8 pav. paveizduotą schemą. Visų pirma nusprendžiama, kurią a.r. sekoje norima pakeisti. Tada konstruojamas pradmuo, kuris turi atitikti kryptingos mutagenezės protokole (PGR aprašymas) pateiktus reikalavimus. Atliekamos PGR reakcijos ir susintetinama nauja dukterinė grandinė su norima mutacija. Pagal anksčiau aprašytą DNR restrikcijos protokolą, sukarpoma matricinė plazmidė ir atliekama transformacija.

1. Plazmidės paruošimas

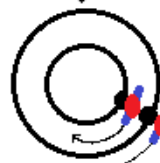


● amino rūgštis, kurią norima pakeisti.
/ Matricinė (metilinta) DNR

2. PGR

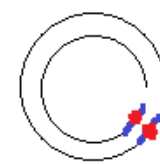


Denatūruojama plazmidė ir prilydomi pradmenys / su norima mutacija ●.



Susintetinama nauja DNR.
/ Dukterinė DNR

3. Restrikcija



Metilinta (motininė) grandinė sukarpoma DpnI fermento pagalba.

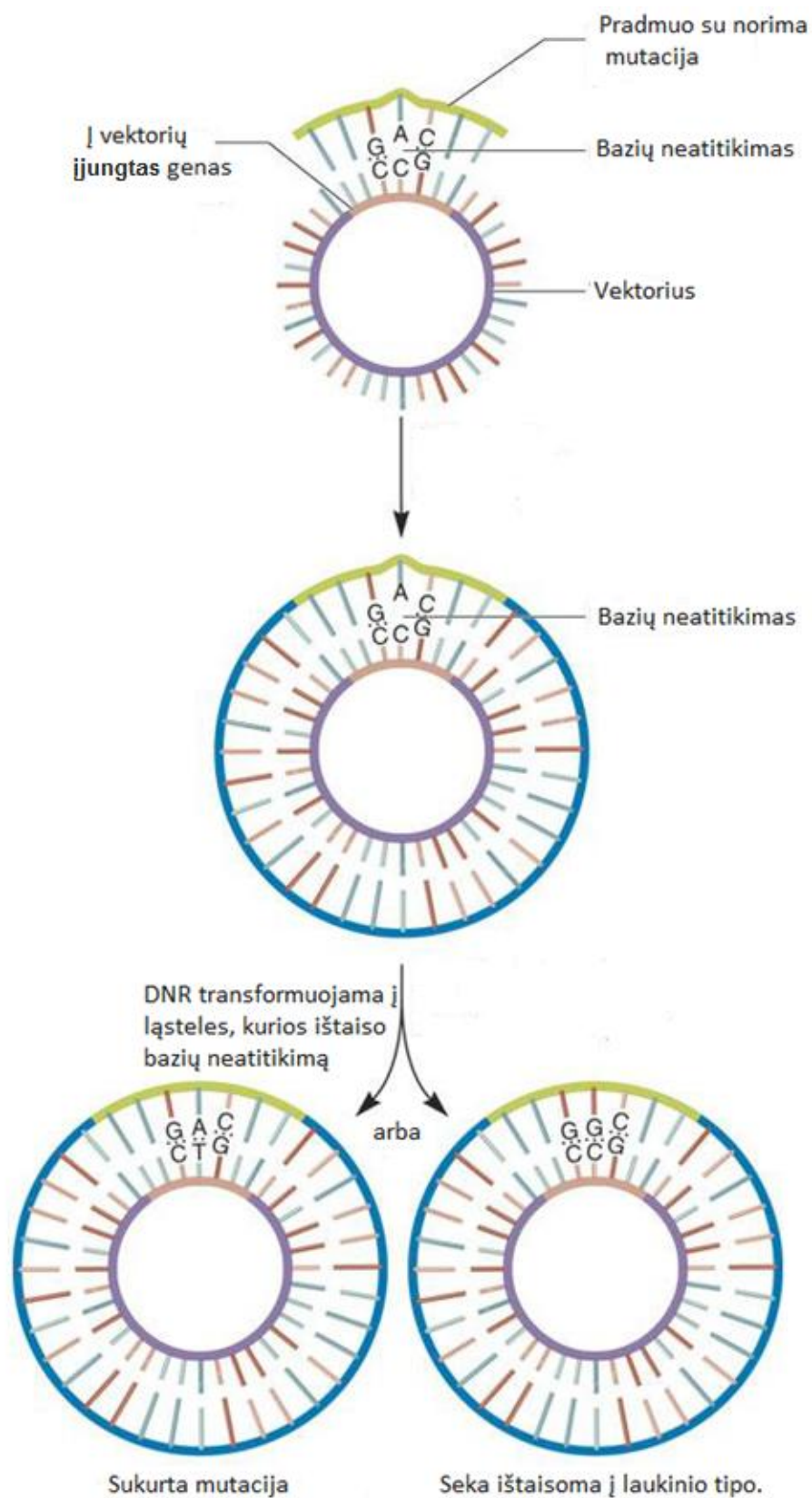
4. Transformacija

8 pav. Mutacijos įkėlimo į plazmidę schema.

Polimerazinė grandininė reakcija

Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) naudota mutacijų į plazmidę įvedimui ir reikiamą baltymą koduojančios DNR padauginimui.

Buvo naudotas M. Zoller ir M. Smith sukurtas kryptingos mutagenezės metodas. Norint sukurti mutacija geno sekoje, sukonstruojamas oligonukleotidinis pradmuo, kuris būtų komplementarus sekai aplink tą vietą, kur yra norima pakeisti bazę. Be to, savo sekoje turėtų bazę, kurią norima įterpti į geno seką (Zoller ir Smith, 1983). Pradmuo paprastai būna apie 20 nukleotidų ilgio. Vykstant PGR, toks pradmuo prisikabina prie matricinės DNR ir DNR polimerazė susintetina likusią dukterinės DNR dalį. Tokiu būdu sukuriamas plazmidė su bazių neatitikimu, toje sekos vietoje, kur turėtų būti norima mutacija. Tokia plazmidė transformuojama į ląstelę. Į sekų neatitikimą ląstelė reaguos, kaip į mutaciją, todėl plazmidė bus reparuojama. Reparacijos baltymai gali ištaisyti mutaciją ir padaryti geną laukinio tipo, arba ištaisyti laukinio tipo geną ir paversti jį mutuotu. DNR sekvenavimo pagalba galima išsiaiškinti, ar reparacija įvyko taip, kaip tikėtasi. Procesą pavaizduojanti schema pateikta 7 pav.



7 pav. Kryptingos mutagenezės schema (pagal Brooker, 2009)

Reakcijos mišinį sudaro (50µL):

- 1x *Pfu* DNR polimerazės buferinio tirpalo su MgSO₄ (2%);
- 0,2 mM dNTP mišinio;
- 25 ng matricinės DNR;
- 0,5 mM tiesioginio pradmens;
- 0,5 mM atvirkštinio pradmens;
- 1,25 fermentų aktyvumo vienetų *Pfu* DNR polimerazės;
- 34 µL distiliuoto vandens.

Naudota amplifikacijos programa:

1. Kaitinimas: 5 min. 95°C temperatūroje;
2. Denatūracija: 30 s. 95°C temperatūroje;
3. Pradmenų prisikabinimas: 2min. Temperatūra parenkama pagal pradmenį*;
4. Sintezė: 1min. 72°C temperatūroje;
2-4 kartojami 18 kartų.
5. Galutinis galų sintetinimas: 10 min. 72°C temperatūroje.

*Pradmenų prilydimo temperatūrą parenkama pagal pradmens ilgį. Prilydymo temperatūra turi būti 3 - 5°C mažesnė už lydymosi temperatūrą. Pradmens lydymosi temperatūrą (T_m) apskaičiuojama pagal formulę: $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 (A+T) + 4 (G + C)$.

Elektroforezė

PGR reakcijos produktai analizuojami 1,5% agarozės gelyje. Gelis ruoštas ištirpinant agarozę 1x TAE buferiniame tirpale ir įdedant etidžio bromido, kurio koncentracija galutiniam tirpale turi būti 0,5 µL/mL.

DNR mėginiai maišomi su 6x Orange Loading Dye dažų ir užnešami ant gelio. Atliekant analizę naudotas GeneRuler™ DNA Ladder Mix žymuo. Elektroforezė vykdoma naudojant 1x TAE buferinį tirpalą su 0,25 µL/mL etidžio bromido.

Elektroforezė vykdoma esant 8 V/cm³ įtampai. Gelis analizuojamas UV šviesoje.

PGR produkto restrikcija su *NdeI* endonukleaze

Į visą PGR reakcijos produktą (50 µL) dedamas 1µL *NdeI* fermento. Šis fermentas atpažįsta ir kerpa metilintą DNR grandinę. Reakcija vykdoma laikant mišinį 37°C temperatūroje 1 val.

Transformacija

Transformacijai naudojamos Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų laboratorijoje paruoštos kompetentinės ląstelės (laikomos po 100 μ L, -80°C temperatūroje).

Eiga:

1. Į 50 μ L kompetentinių ląstelių mišinio pilama 5 μ L PGR produkto arba 1 μ L plazmidės. Inkubuojama ant ledo 30 min.
2. Keliama į 42°C termostatą ir laikoma 90s.
3. Vėl inkubuojama ant ledo 2min.
4. Į mėgintuvėlį pilama 400 μ L S.O.C. tirpalo ląstelių gaivinimui ir jos purtomos 220 aps./min. greičiu 37°C temperatūroje 1 val.
5. Po to, ląstelės nucentrifuguojamos 2 min. 6000 aps./min. greičiu. Terpė nupilama. Terpės likutyje ląstelės suspenduojamos ir užsėjamos ant Perti lėkštelių su agarizuota terpe bei reikalingais antibiotikais ir auginama 12 val. 37°C temperatūroje.

DNR gryninimas

Norint padauginti plazmidę, transformacija atliekama į XLI-Blue *E. coli* ląsteles. Iš Perti lėkštelės viena kolonija keliama į mėgintuvėlius su 5 mL LB terpės ir 100 μ L/mL ampicilino. Ląstelės auginamos per naktį 37°C temperatūroje purtant 220 aps./min. Užauginta kolonija centrifuguojama 2 min. 6000 aps./min. greičiu. DNR išskiriama naudojant „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį, pagal gamintojų pateiktą protokolą.

2.2.2. CA II mutantų raiškos gavimas *E.coli* ląstelėse

Baltymo raiškos tyrimas *Escherichia coli* BL21 (DE3) ląstelėse:

Tikslinio baltymo raiškos tyrimui BL21 (DE3) ląstelėse, atliekama transformaciją ir iš Petri lėkštelių viena kolonija keliama į kolbą su 50 mL LB mitybinės terpės, sumaišytos su antibiotikais (parenkami pagal vektorių ir ląstelių kamienų atsparumą). Kultūra auginama per naktį (apie 16h) termostatinėje purtyklėje $+37^{\circ}\text{C}$ temperatūroje purtant 220 aps./min.

Ryte kolonijos keliamos į paruoštas kolbas su 400 mL LB mitybinės terpės, sumaišytos su antibiotikais ir 0,05 mM ZnSO_4 , kuris reikalingas baltymo aktyviajam centrui susiformuoti. Naktinės kultūros keliama tūrių santykiu 1:50. Kolonija auginama tokiomis pat sąlygomis, kaip per naktį iki tol, kol tirpalo optinis tankis pasiekia 0,7 ($\lambda=600\text{nm}$).

Pasiekus norimą ląstelių kiekį, indukuojama baltymo raiška – į terpę pridedama 1 mM IPTG ir 0,5 mM ZnSO_4 . Po tikslnio baltymo indukcijos, ląstelės vėl auginamos per naktį, tik temperatūra

sumažinama iki 20°C.

Ryte ląstelės centrifuguojamos +4°C temperatūroje 6000 aps./min. greičiu, 20 min. Terpė išpilama, o biomasė laikoma -20°C temperatūroje.

Analizei paruošiami du ląstelių lizatų mėginiai. Vienas mėginys paimamas prieš baltymo raiškos indukciją, antrasis prieš centrifuguojant ląsteles. Ruošiant pirmąjį mėginį paimama 300 µL ląstelių tirpalo, centrifuguojama (2 min. 6000 aps./min greičiu), terpė nupilama, o nuosiedos suspensuojamos 30 µL 1x baltymų elektroforezės dažo ir verdamos 5 min. +95°C temperatūroje. Antrasis mėginys ruošiamas analogiškai, tačiau imamas atitinakamai mažesnis kiekis ląstelių tirpalo, kad abiejuose mėginiuose būtų maždaug vienodas kiekis ląstelių.

Baltymų elektroforezė denaturuojančiomis sąlygomis natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelyje:

Analizė poliakrilamido gelyje atliekama siekiant nustatyti tikslinio baltymo raišką – leidžiamas mėginys prieš indukciją, bei po jos, arba tiriant baltymo tirpumą – leidžiami tirpios ir netirpios frakcijos mėginiai.

Poliakrilamido gelis ruošiamas tarp dviejų švariai nuvalytų ir 70% spiritu nudezinfekuotų elektroforezės stiklų. Apatinis frakcionuojantis gelis pilamas paliekant maždaug 1,5 cm tarpą iki viršaus ir paliekamas stingti 30 min. Iki stikliukų viršaus pripilama distiliuoto vandens, kad gelio viršus būtų lygus. Apatiniam geliui sustingus vanduo nupilamas, nusausinama ir užpilamas viršutinis koncentruojantis gelis, įdedamos „šukutės“, su norimu šulinėlių kiekiu, ir paliekama stingti dar 30 min.

Geliui sutingus surenkamas elektroforezės aparatas, blokas užpilamas 1x TRIS–glicino–SDS elektroforezės buferio ir iš gelio išimamos „šukutės“. Elektroforezė vykdoma esant 50 mA stiprio srovei.

Gelio dažymas: pasibaigus elektroforezei aparatas išardomas, stikliukai atskiriami ir gelis keliamas į poliakrilamido gelio dažą (dažoma 20 min. esant 70 aps./min.) Po to, gelis blukinamas verdant distiliuotame vandenyje 10 min.

2.2.3. Rekombinantinio CA VA baltymo tirpumo patikrinimas

Baltymo tirpumo tyrimas:

1 g bakterijų biomasės tirpinama 6 mL biomasės ardymo buferinio tirpalo maišant 1 val. +4°C temperatūroje. Po to, ląstelės ardomos ultragarsu 10 min. (60 s ardoma, 60 s – ne), vibracijos amplitudė 50%. Ardymo metu ląstelės laikomos šaltai, kad nedenatūruotų baltymas.

Po ardymo ultragarsu, ląstelių lizatas centrifuguojamas 18 000 aps./min. greičiu, +4°C temperatūroje. Tirpalas nupilamas, o nuosėdos tirpinamos 2 mL 8M karbamido tirpale.

Paruošiami tirposios ir netirpiosios frakcijų mėginiai:

30 µL baltymo tirpalo sumaišoma su 6 µL 6x baltymų elektroforezės dažo ir kaitinama +95°C temperatūroje 5 min. Norint sužinoti kokį baltymo kiekį nešti ant gelio, tirpalų koncentracijos nustatomos Bredfordo metodu (Bradford, 1976).

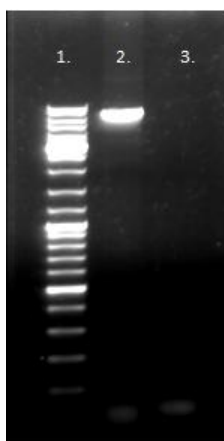
III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje yra atliekami išsamūs CA aktyvumo, jungimosi su slopikliais tyrimai. Tam tikslui sintetinami rekombinantiniai CA fermentai ir konstruojami jų mutantai su norimomis aktyviojo centro mutacijomis.

3.1. CA II mutanto 1 konstravimas ir geno raiška

Remiantis turimomis žiniomis apie žmogaus CA II baltymą ir jo aktyvųjį centrą, Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje buvo sukonstruotas teorinis CA II mutanto 1 konstruktas su norimomis mutacijomis. Buvo panaudota kompiuterinė programa: Accelrys Discovery Studio.

CA II mutantui 1 sukurti buvo panaudotas pET15b vektorius su į jį įjungta pilna CA II baltymo seka. Pagal bioinformatiniais metodais sukonstruotą, teorinį CA II mutanto 1 modelį, buvo norima padaryti keturias taškines mutacijas jo aktyviajame centre: V134A, I91R, N62S, T199V. Tam buvo atliekami PGR, šios reakcijos mišiniai buvo rengiami, pagal metoduose pateiktą reakcijos mišinį. Rezultatai analizuoti 1,5% agarozės gelyje. 9 pav. parodyti pirmosios reakcijos rezultatai su N62S pradmenimis.



9 pav. PGR produkto elektroforezė su N62S pradmenimi. 1 takelis – DNR ilgio žymuo, 2 tak. - PGR produktas, 3 tak. - PGR produktas (su papildomais 2% $MgSO_4$).

Ruošiant PGR reakcijos mišinius kartais pridedami papildomi 2% $MgSO_4$. Taip siekiama sumažinti pradmenų prisijungimo prie DNR temperatūra, kadangi ji labai artima elongacijos temperatūrai - tokiu atveju gaunamas labai mažas PGR produkto kiekis. Visoms PGR reakcijoms naudota vienoda amplifikacijos programa, tik keičiama temperatūra pradmenų prilydimui.

Buvo atliekama PGR produkto restrikcija su NdeI fermentu, kaip aprašyta metodinėje dalyje. Su likusiu produktu atlikta transformacija į *E. coli* XLI – Blue ląstelės, kaip aprašyta metodinėje dalyje.

E. coli XLI – Blue kamienas labai tinkamas plazmidės klonavimui, nes neturi endonukleazės, tai padidina išskiriamos DNR kokybę, ir neatlieka rekombinacijos, tai padidina įkeliamo geno stabilumą. Naudotas vektorius pET15b suteikia atsparumą ampicilinui, todėl į LB mitybinę terpę pridedama 100 µg/mL šio antibiotiko. Taip atliekama atranka ir išgyvena tik tos ląstelės, kurios turi konstruklą. *E. coli* XLI – Blue ląstelės, po transformacijos, atlieka DNR reparaciją, kadangi PGR reakcijos metu plazmidė lieka nesujungta į žiedą. Užauginus ląsteles, iš jų išgryninama plazmidė (paprastai išgryninama iš dviejų skirtingų kultūrų), kuri turi norimą mutaciją ir yra be trūkių. Su išskirta plazmide kartotas PGR ir įvesta kita mutacija. Kadangi norėta sukurti keturias mutacijas, visas procesas buvo kartojamas tol, kol gautos visos norimos mutacijos (PGR produktų elektroforezės nuotraukos priede).

Atlikus paskutinę PGR reakciją ir patikrinus rezultatus elektroforezės gelyje (10 pav.), atliktas DNR gryninimas, DNR koncentracija pamatuota „NanoDrop“ spektrofotometru ($\lambda=260$ nm). Tada konstruktas siųstas sekvenavimui. Gauti duomenys parodė, kad konstruktas turi visas norimas mutacijas: N62S, I91R, V134A ir T199V (10 pav.)

1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
1.													ATGTCCCATCACTGGGGGTACGGCAACACACACGGACCTGAGCACTGGCATAGGACTTCCCATTGC
2.	GGTAGACGGGATACATTCCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAGGAGATATACCATATGTCCCATCACTGGGGGTACGGCAACACACACGGACCTGAGCACTGGCATAGGACTTCCCATTGC												
131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
1.	CAGGGGAGAGCGCCAGTCCCTGTTGACATCGACACTCATACAGCCAGATATGACCTTCCCTGAGGCCCTGTCTGTTTCTATGATCAGCAACTTCCCTGAGGATCCTCAACATTTGGTCATGCTTTC												
2.	CAGGGGAGAGCGCCAGTCCCTGTTGACATCGACACTCATACAGCCAGATATGACCTTCCCTGAGGCCCTGTCTGTTTCTATGATCAGCAACTTCCCTGAGGATCCTCAACATTTGGTCATGCTTTC												
261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
1.	AACGTGGAGTTTGTGACTCTCAGGACAAAGCAGTGCTCAGGGGAGGACCCCTGGATGGCACTTACAGATTGAGGAGTTTCACTTTCACCTGGGGTTCACCTGATGGACAGGTTCAAGGCATACCTGTGG												
2.	AACGTGGAGTTTGTGACTCTCAGGACAAAGCAGTGCTCAGGGGAGGACCCCTGGATGGCACTTACAGATTGAGGAGTTTCACTTTCACCTGGGGTTCACCTGATGGACAGGTTCAAGGCATACCTGTGG												
391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
1.	ATAAAAGAAATATGCTGCAGAACTTCACTTGGTTCACTGGAAACCAATATGGGGATTCTGGGAAGCTGCAGCAACCTGATGACTGGCCGTCTAGGTATTTTGTGAAGGTTGGCAGCGCTAA												
2.	ATAAAAGAAATATGCTGCAGAACTTCACTTGGTTCACTGGAAACCAATATGGGGATTCTGGGAAGCTGCAGCAACCTGATGACTGGCCGTCTAGGTATTTTGTGAAGGTTGGCAGCGCTAA												
521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
1.	ACCGGCCCTCAGAAAGTTGTTGATGTCTGGATTCCATTAAACCAAGGGCAGAGTGCTGACTTCACTAACTTCGATCCCTGGGCCCTCTCTGATCCCTGGATTACTGGACCTACCCAGGCTCA												
2.	ACCGGCCCTCAGAAAGTTGTTGATGTCTGGATTCCATTAAACCAAGGGCAGAGTGCTGACTTCACTAACTTCGATCCCTGGGCCCTCTCTGATCCCTGGATTACTGGACCTACCCAGGCTCA												
651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
1.	CTGACGCTCCCTCTCTCTCTGATGTGTGACCTGGATTGTGCTCAGGAAACCATCAGCGTCAGCAGCGAGGAGGTTGAATTCCTGTAACCTTAACCTCAATGGGGAGGGTGAACCCGAGAACTGA												
2.	CTGACGCTCCCTCTCTCTCTGATGTGTGACCTGGATTGTGCTCAGGAAACCATCAGCGTCAGCAGCGAGGAGGTTGAATTCCTGTAACCTTAACCTCAATGGGGAGGGTGAACCCGAGAACTGA												
781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
1.	TGGTGGACAACTGGCGCCAGCTCAGCCACTGAGAACAGGCAATCAAGCTTCCCTCAATAAATGATGGTCCCATAGTCTGTATCAATAATGAATCTTTCGGGTGTTTCCCTTTAGCTAAGCACAGA												
2.	TGGTGGACAACTGGCGCCAGCTCAGCCACTGAGAACAGGCAATCAAGCTTCCCTCAATAAATGATGGTCCCATAGTCTGTATCAATAATGAATCTTTCGGGTGTTTCCCTTTAGCTAAGCACAGA												

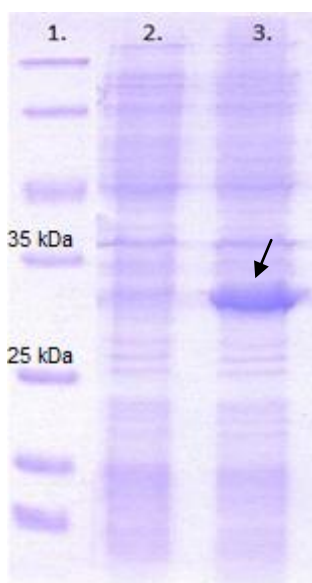
10 pav. pET15b – CA II mutanto 1 ir laukinio tipo CA II sekų palyginimas. 1 eilutė – CA II mutanto 1 seka su norimomis mutacijomis, 2 eilutė – sekvenavimo rezultatai (Žalia spalva pažymėtas pradmuo, juoda spalva – mutacija).

Tada buvo atliekamas konstrukto tikslinio baltymo raiškos patikrinimas. Biomasės auginimui naudotos *E. coli* BL21(DE3) ląstelės, nes jos neturi *OmpT* ir *Lon* proteazių, kurios gali apsunkinti baltymo skyrimą ir į plazmidę yra įjungtas T7 RNR polimerazės genas, dėl kurio lengviau sintetinami eukariotiniai baltymai. Šis kamienas, taip pat neturi atsparumo antibiotikams, todėl į auginimo terpę buvo dedama tik 100 µg/mL ampicilino. Naktinė kultūra persėjama į kolbą su 400 mL LB mitybinės

terpės, sumaišytos su 100 µg/mL ampicilino ir 0,05 mM ZnSO₄. Ląstelės augintos, kol terpės tankis pasiekė 0,7 (λ=600 nm).

Prieš geno raiškos indukciją biomasė augo pakankamai greitai ir jau po 4 val. buvo atlikta indukcija su 1 mM IPTG. Auginant biomasę, baltymo skyrimui būtina į mitybinę terpę įdėti ZnSO₄, kad tinkamai susiformuotų CA aktyvusis centras. Ląstelės buvo augintos per naktį +20°C temperatūroje, purtant 220 aps./min. greičiu.

Pagal metodinėje dalyje pateiktą aprašą, buvo paruošti mėginiai baltymų elektroforezei ir patikrinta tikslinio baltymo raiška.

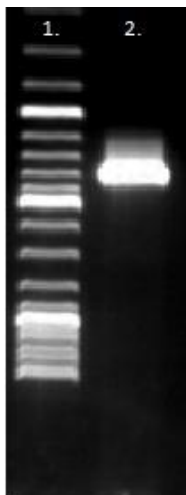


11 pav. Baltymų raiškos patikrinimas poliakrilamido gelyje (rodyklė rodo baltymą) 1 takelis – baltymų dydžio žymuo (kDa), 2 tak. – ląstelių lizatas prieš CA II geno raiškos indukciją, 3 tak. – ląstelių lizatas po CA II geno raiškos indukcijos.

Po CA II mutanto 1 geno raiškos indukcijos matomas stiprus baltymo sintezės suaktyvėjimas (11 pav.). Padaryta išvada, kad pET15b – CA II mutanto 1 konstruktas tinkamas baltymo gryninimui.

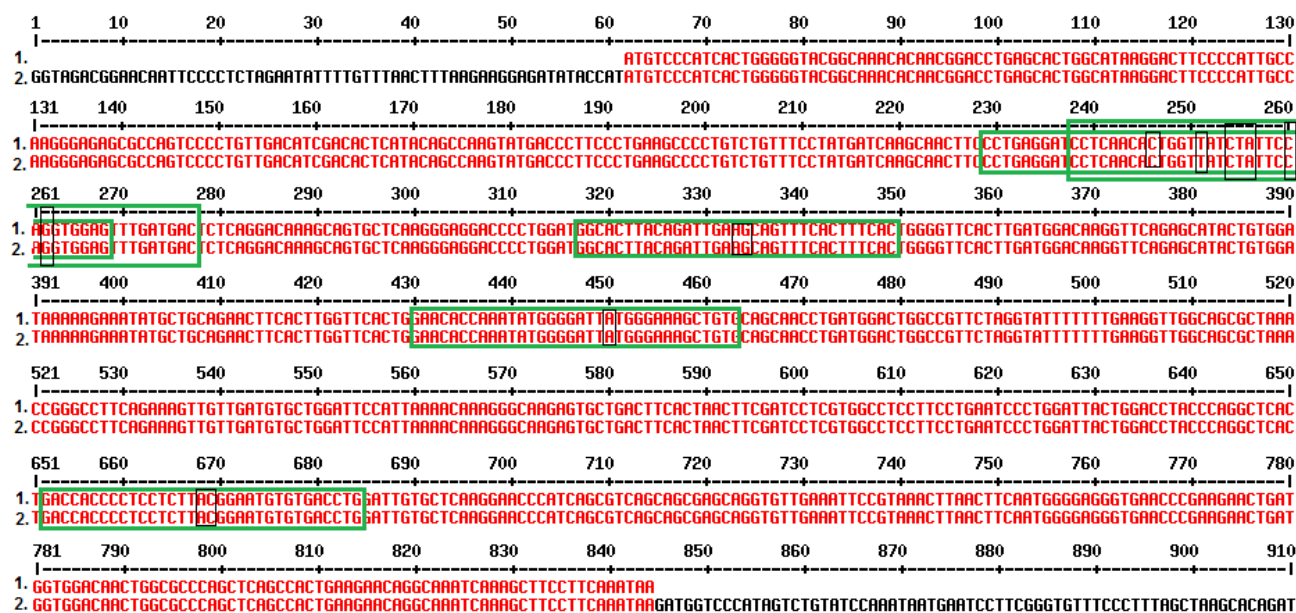
3.2. CA II mutanto 2 konstravimas ir geno raiška

Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų laboratorijoje buvo padarytas pET15B – CAII konstruktas: į pET15b vektorių buvo įjungta CA II baltymo seka. Į tokią plazmidę įjungtos keturios kutacijos: N62T, H6Y, A65L ir N67Q naudojant atitinkamus pradmenis. Aš atlikau tris PGR reakcijas ir baigiau mutantinės plazmidės pET15b – CA II mutantas 2 konstravimą. Kaip ir su CA II mutantu 1, atliktos PGR ir į plazmidę įjungiami pradmenys su norimomis mutacijomis: F130Y, L203T ir I91K (12 pav. – PGR, su I91K pradmenimi, produkto elektroforezė).



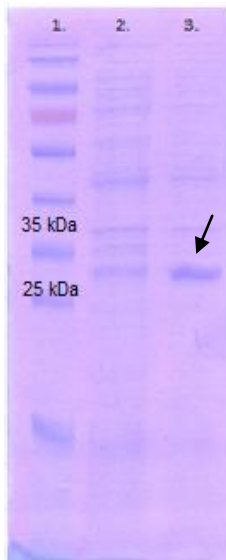
12 pav. . PGR produkto elektroforezė. 1 takelis – DNR ilgio žymuo, 2 tak. - PGR produktas.

Vėliau atliktas sekos sekvenavimas. Rezultatai parodė, kad plazmidė pET15b – CAII mutantas 2 turi visas norimas mutacijas: N62T, H64Y, A65L, N67Q, I91K, F130Y ir L203T (13 pav.).



13 pav. pET15b – CA II mutanto 1 ir laukinio tipo CA II sekų palyginimas. 1 eilutė – CA II mutanto 2 seka su norimomis mutacijomis, 2 eilutė – sekvenavimo rezultatai (Žalia spalva pažymėtas pradmuo, juoda spalva – mutacija).

Atlikta transformacija į *E. coli* BL21(DE3) ląsteles ir užauginta biomasė. Visos sąlygos buvo tokios pat kaip ir CA II mutanto 1. Baltymų elektroforezės poliakrilamido gelyje rezultatai parodė, kad baltymo sintezė po geno indukcijos vyksta (14 pav).



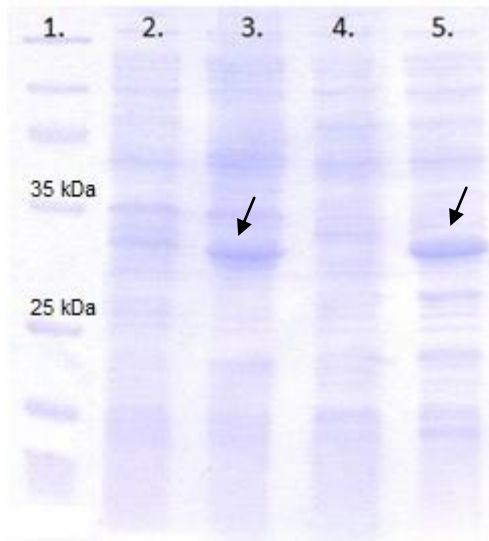
14 pav. Baltymų raiškos patikrinimas poliakrilamido gelyje (rodyklė rodo baltymą). 1 takelis – baltymų dydžio žymuo (kDa); 2 tak. – ląstelių lizatas prieš CA II geno raiškos indukciją; 3 tak. – ląstelių lizatas po CA II geno raiškos indukcijos.

Biomasė atiduota baltymo gryninimui.

3.3. Rekombinantinio CA VA baltymo raiškos ir tirpumo patikrinimas.

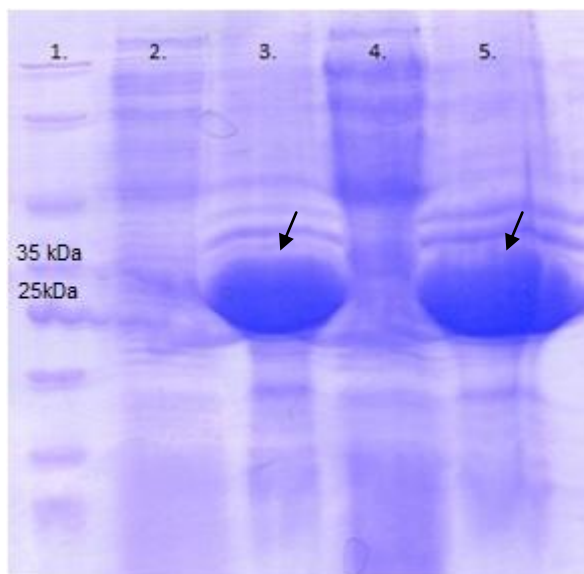
Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje buvo sukurti du rekombinantinės CA VA konstruktai: pET21a-CAVA-6xHis (34-305) ir pET15b-6xHis-CAVA (40-305). pET21a-CAVA-6xHis (34-305) konstrukte buvo pašalintos šešios a.r. CA VA baltymo geno sekos N^c- gale ir prijungta šešių His uodega sekos C^c- gale. Atliktas šio konstrukto baltymo raiškos ir tirpumo patikrinimas. Gauti rezultatai parodė, kad sintetinamas tirpus baltymas. Pabandžius išgryninti baltymą, gautas labai mažas jo kiekis, todėl toliau atlikti bandymai su pET15b-6xHis-CAVA (40-305) konstruktu, tikintis, kad bus gauta daugiau baltymo. Šis konstruktas turi pilną CA VA baltymo geno seką, o jo N^c- gale prijungta šešių His uodega.

Visų pirma, nuspręsta patikrinti, kaip terpė keičia baltymo raišką ir tirpumą. Konstruktas transformuotas į *E. coli* BL21(DE3) ląsteles ir biomasė auginta dviejose skirtingose terpėse: LB mitybinėje terpėje ir BHI mitybinėje terpėje. Po baltymo geno raiškos indukcijos su 1 mM IPTG, ląstelės augintos per naktį 20°C temperatūroje, purtant 220 aps./min. greičiu. Ryte ląstelės centrifuguotos ir pagal metodinėje dalyje aprašytą protokolą, paruošti mėginiai baltymo geno raiškai patikrinti (15 pav.). Nuotraukoje matoma, kad abiejų baltymų raiška vyksta, nepriklausomai nuo mitybinės terpės, kurioje auga biomasė.



15 pav. Baltymų raiškos patikrinimas poliakrilamido gelyje (rodyklė rodo baltymą). 1 takelis – baltymų dydžio žymuo (kDa), 2 tak. – ląstelių, augintų LB mitybinėje terpėje, lizatas prieš rekombinantinės CA VA geno raiškos indukciją, 3 tak. – ląstelių, augintų LB mitybinėje terpėje, lizatas po rekombinantinės CA VA geno raiškos indukcijos; 4 tak. – ląstelių, augintų BHI mitybinėje terpėje, lizatas prieš rekombinantinės CA VA geno raiškos indukciją; 5 tak. – ląstelių, augintų BHI mitybinėje terpėje, lizatas po rekombinantinės CA VA geno raiškos indukcijos.

Po to, atliktas ląstelių biomasės ardymas pagal metodinėje dalyje pateiktą aprašymą. Paruošti mėginiai ir paleista baltymų elektroforezė (16 pav.)



16 pav. Baltymų tirpumo patikrinimas poliakrilamido gelyje (rodyklės rodo baltymą). 1 takelis – baltymų dydžio žymuo (kDa), 2 tak. – tirpi frakcija, kai auginta LB mitybinėje terpėje, 3 tak. – netirpi frakcija, kai auginta LB mitybinėje terpėje, 4 tak. – tirpi frakcija, kai auginta BHI mitybinėje terpėje, 5 tak. – netirpi frakcija, kai auginta BHI mitybinėje terpėje.

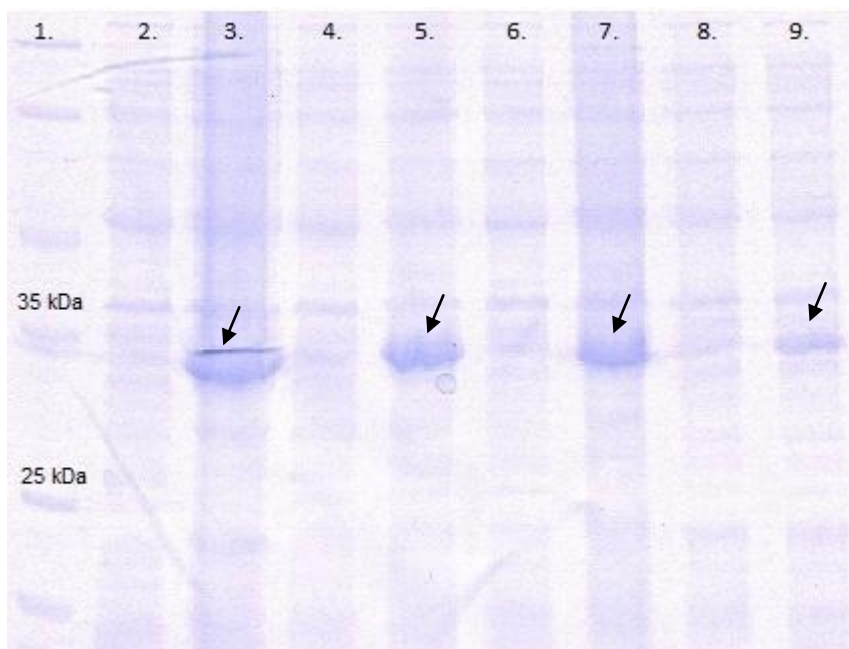
Tirpumo testas parodė, kad abiejose terpėse sintetinamas netirpus baltymas.

Tada nuspręsta atlikti transformacijas į skirtingus *E. coli* kamienus. Pasirinkti penki skirtingi

Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje naudojami kamieniai. Buvo naudota LB mitybinė terpė, į ją pridedama 100µg/mL ampicilino ir kitų antibiotikų priklausomai nuo auginamo kamieno:

- *E. coli* OrigamiTM: 12,5 µg/mL kanamicino, 12,5 µg/mL tetraciklino ;
- *E. coli* Roseta gamiTM: 12,5 µg/mL kanamicino, 12,5 µg/mL tetraciklino, 50 µg/mL streptociklino;
- *E. coli* BL21(DE3) pGKJE8: 34 µg/mL chloramfenikolio;
- *E. coli* BL21(DE3) pLysS: 34 µg/mL chloramfenikolio;
- *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus – RIL: 34 µg/mL chloramfenikolio.

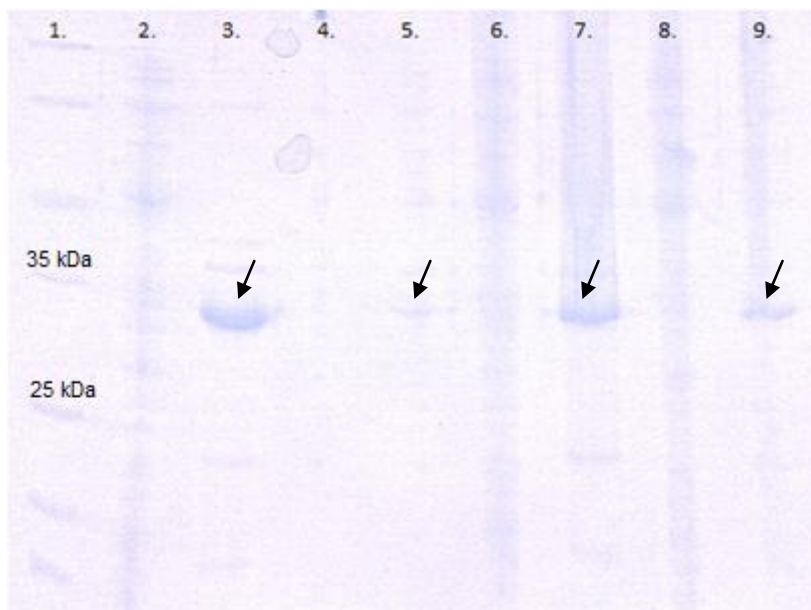
E. coli Roseta gamiTM kamieno naktinė kultūra neužaugo, todėl toliau auginti likę keturi kamieniai. Perkėlus kultūras į 400 mL kolbas su reikiamais antibiotikais ir 0,05 mM ZnSO₄, ląstelės buvo auginamos, kol optinis tankis pasiekė 0,7 ($\lambda=600\text{nm}$). Kultūrų augimo laikas labai skyrėsi: *E. coli* BL21(DE3) pLysS ląstelės reikiamą optinį tankį pasiekė už 2 val., tuo tarpu *E. coli* OrigamiTM tik po 6 val. Taigi, pastarąsias ląsteles po indukcijos auginta per naktį, 18°C temperatūroje, likusias – 4 val. 30°C temperatūroje. Paruošus ląstelių lizato mėginius, buvo paleista baltymų elektroforezė baltymo raiškai patikrinti (17 pav.).



17 pav. Baltymo raiškos patikrinimas poliakrilamido gelyje (rodyklės rodo batymą). 1 takelis – baltymų dydžio žymuo (kDa); 2 tak. – *E. coli* BL21(DE3) pLysS ląstelių lizatas prieš rekombinantinės CA VA geno raiškos indukciją; 3 tak. – *E. coli* BL21(DE3) pLysS ląstelių lizatas po rekombinantinės CA VA geno raiškos indukcijos; 4 tak. – *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus – RIL ląstelių lizatas prieš rekombinantinės CA VA geno raiškos indukciją; 5 tak. – *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus – RIL ląstelių lizatas po rekombinantinės CA VA geno raiškos indukcijos; 6 tak. – *E. coli* BL21(DE3) pGKJE8 ląstelių lizatas prieš rekombinantinės CA VA geno raiškos indukciją; 7 tak. – *E. coli* BL21(DE3) pGKJE8 ląstelių lizatas

po rekombinantinės CA VA geno raiškos indukcijos; 8 tak. - *E. coli* Origami™ ląstelių lizatas prieš rekombinantinės CA VA geno raiškos indukciją; 9 tak. - *E. coli* Origami™ ląstelių lizatas po rekombinantinės CA VA geno raiškos indukcijos.

Kadangi, baltymo raiška vyko visuose *E. coli* kamienuose, atliktas biomasių ardymas ultragarsu ir paruošti tirpios ir netirpios frakcijų mėginiai. Paleista baltymų elektroforezė (18 pav.).



18 pav. Baltymo tirpumo patikrinimas poliakrilamido gelyje (rodyklės rodo baltymą). 1 takelis – baltymų dydžio žymuo (kDa); 2 tak. – *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus – RIL ląstelių tirpi frakcija; 3 tak. – *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus – RIL ląstelių netirpi frakcija; 4 tak. – *E. coli* Origami™ ląstelių tirpi frakcija; 5 tak. - *E. coli* Origami™ ląstelių netirpi frakcija; 6 tak. - *E. coli* BL21(DE3) pLysS ląstelių tirpi frakcija; 7 tak. - *E. coli* BL21(DE3) pLysS ląstelių netirpi frakcija; 8 tak. - *E. coli* BL21(DE3) pGKJE8 ląstelių tirpi frakcija; 9 tak. - *E. coli* BL21(DE3) pGKJE8 ląstelių netirpi frakcija.

Tirpumo testo rezultatai parodė, kad visuose keturiuose kamienuose sintetinas netirpus rekombinantinis CA VA baltymas.

IŠVADOS

- Sukonstruotas CA II mutantas 1 su aktyviojo centro mutacijomis: V134A, I91R, N62S ir T199V;
- Sukonstruotas CA II mutantas 2 su aktyviojo centro mutacijomis: N62T, H64Y, A65L, N67Q, F130Y, L203T ir I91K;
- Rezultatai parodė, kad pET15b - CA II mutanto 1 ir pET 15b - CA II mutanto 2 konstrukto tikslinio baltymo raiška vyksta;
- Patikrinus pET15b-6xHis-CAVA (40-305) konstrukto baltymo raišką, rezultatai parodė, kad ji vyksta, tačiau sintetinamas netirpus baltymas. Pamėginus gauti tirpų baltymą kituose Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje naudojamuose *Escherichia coli* kamienuose išsiaiškinta, kad visuose sintetinamas netirpus rekombinantinis CA VA baltymas.

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF NATURAL SCIENCES

Eglė Ivanauskaitė

Construction of human carbonic anhydrase II active site mutants and solubility test for recombinant VA protein

Bachelor's thesis

SUMMARY

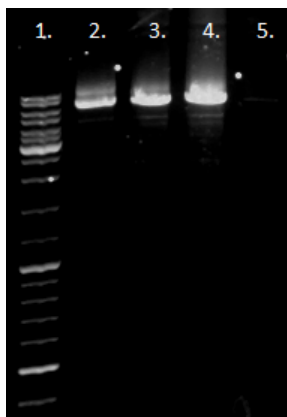
The carbonic anhydrases (CA) are a superfamily of metalloenzymes, which efficiently catalyzes carbon dioxide (CO_2) hydration to bicarbonate (HCO_3^-) and protons (H^+). These proteins are widespread and present in all life kingdoms. Currently, there are described five types of CAs (α , β , γ , δ , ζ), all human CAs belongs to α -CA family. These enzymes implicate in a wide array of physiological processes and their inhibitors are used to treat many diseases, such as glaucoma, obesity and even cancer. The development of new therapeutic agents requires explicit understanding of catalytic mechanism and structure of active site.

The aim of this research project was to construct two carbonic anhydrase II (CA II) active site mutants, check if it is expressed and to do protein solubility test for recombinant VA protein. These proteins later would be used for biophysical investigation. There were constructed two CA II mutants with chosen active site mutations. Sequencing results showed that all mutations were inserted so constructs were transformed into cells. Protein expression test revealed that both mutants are expressed and protein can be purified. Solubility tests for recombinant VA protein showed that culture medium and strains it is expressed in do not influence the solubility of protein and it was insoluble.

PRIEDAS

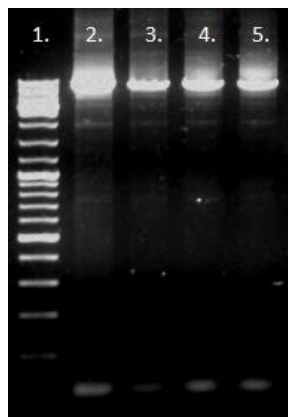
CA II mutanto 1 PGR produktų elektroforezės nuotraukos:

V134A mutacija.



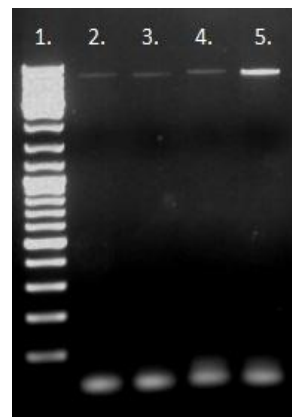
19 pav. PGR produkto elektroforezė.
elektroforezė

T199V mutacija.



20 pav. PGR produkto elektroforezė.

I91R mutacija.

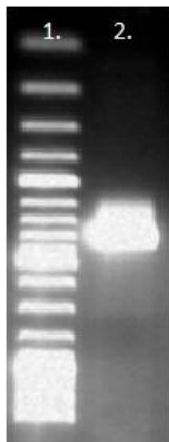


21 pav. PGR produkto

1tak. – DNR ilgio žymuo;
2tak. – PGR produktas (1mėg.);
3 tak. – PGR produktas (1 mėg. +2% MgSO₄);
4 tak. – PGR produktas (2 mėg.);
5 tak. – PGR produktas (2 mėg. +2% MgSO₄).

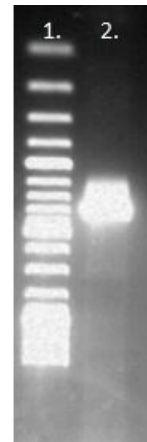
CA II mutanto 2 PGR produktų elektroforezės nuotraukos:

F130Y mutacija.



22 pav. PGR produkto elektroforezė.

L203T mutacija.



23 pav. PGR produkto elektroforezė.

1 tak. – DNR ilgio žymuo;
2 tak. – PGR produktas.

LITERATŪROS SĄRAŠAS:

1. Akıncioğlu A, Akbaba Y, Göçer H, Göksu S, Gülçin İ, Supuran CT. Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2013;21(6):1379-85.
2. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities for Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
3. Brooker RJ. *Genetics analysis & principles.* 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 2009.
4. Carter N, Jeffery S, Shiels A, Edwards Y, Tipler T, Hopkinson DA. Characterization of human carbonic anhydrase III from skeletal muscle. *Biochem Genet.* 1979;17:837–854.
5. Clare BW, Supuran CT. Carbonic anhydrase activators. 3: structure-activity correlations for a series of isozyme II activators. *J Pharm Sci.* 1994;83(6):768-73.
6. Christie KN, Thomson C, Xue L, Lucocq JM., Hopwood D. Carbonic Anhydrase Isoenzymes I, II, III and IV Are Present in Human Esophageal Epithelium. *J Histochem Cytochem.* 1997; 45(1): 35–40.
7. Dodgson SJ. Inhibition of mitochondrial carbonic anhydrase: a discrepancy examined. *J Appl Physiol.* 1987;63,2134-2141.
8. Esbaugh AJ, Tufts BL. The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. *Resp Physiol Neurobiol.* 2006;154:185–198.
9. Ferry JF. The gamma class of carbonic anhydrases. *BBA-Proteins Proteom.* 2010;1804:374–381.
10. Fujikawa-Adachi K, Nishimori I, Taguchi T, Onishi S. Human mitochondrial carbonic anhydrase VB. cDNA cloning, mRNA expression, subcellular localization, and mapping to chromosome x. *J Biol Chem.* 1999;274:21228–33.
11. Ghiasi M, Kamalinahad S, Arabieh M, Zahedi M. Carbonic anhydrase inhibitors: A quantum mechanical study of interaction between some antiepileptic drugs with active center of carbonic anhydrase enzyme. *T Comp Chem.* 2012;922:59-69.
12. Gilmour KM. Perspectives on carbonic anhydrase. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol Integr Physiol.* 2010;157, 193–197.
13. Hewett-Emmett D. Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families. *EXS.* 2000;(90):29–76.
14. Innocenti A, Beyza Oztürk Sarikaya S, Gülçin I, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of mammalian isoforms I-XIV with a series of natural product polyphenols and phenolic acids. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(6):2159-64.
15. Kivelä J, Parkkila S, Parkkila A-K, Leinonen J, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. *J Physiol.* 1999;520:315–320.
16. Krishnamurthy VM, Kaufman GK, Urbach AR, Gitlin I, Gudiksen KL, Weibel DB, Whitesides GM. Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein–ligand binding. *Chem Rev.* 2008; 108: 946–1051.
17. Martin V, Villarreal F, Miras I, Navaza A, Haouz A, Gonzalez-Lebrero RM, Kaufman SB, Zabaleta E. Recombinant plant gamma carbonic anhydrase homotrimers bind inorganic carbon. *FEBS Lett.* 2009;583:3425–3430.
18. McCall K, Huang C, Fierke C. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr.* 2000;130:1437S–1446S.
19. Meldrum NU, Roughton FJW. Carbonic anhydrase: Its preparation and properties. *J Physiol.* 1933;80:113–42.

20. Nordfors K, Haapasalo J, Korja M, Niemelä A, Laine J, Parkkila A-K, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Parkkila S, Haapasalo H. The tumour-associated carbonic anhydrases CA II, CA IX and CA XII in a group of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumours: an association of CA IX with poor prognosis. *BMC Cancer*. 2010;10:148.
21. Parkkila S, Parkkila AK, Juvonen T, Rajaniemi H. Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and VI in the human alimentary tract. *Gut*. 1994;35:646–650.
22. Pastorekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran CT. Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2004;19(3):199-229.
23. Pastorekova S, Parkkila S, Zavada J. Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance. *Adv Clin Chem*. 2006;42:167-216.
24. Puccetti L, Fasolis G, Vullo D, Chohan ZH, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, IX, and XII with Schiff's bases incorporating chromone and aromatic sulfonamide moieties, and their zinc complexes. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005;15(12):3096-101.
25. Saczewski F, Sławiński J, Korniska A, Brozowski Z, Pomarnacka E, Innocenti A, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the cytosolic human isozymes I and II, and the transmembrane, tumor-associated isozymes IX and XII with substituted aromatic sulfonamides activatable in hypoxic tumors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16(18):4846-51.
26. Sapirstein VS, Strocchi P, Gilbert JM. Properties and function of brain carbonic anhydrase. *Ann N Y Acad Sci*. 1984;429:481–93.
27. Shah GN, Bonapace G, Hu PY, Strisciuglio P, Sly WS. Carbonic anhydrase II deficiency syndrome (osteopetrosis with renal tubular acidosis and brain calcification): novel mutations in CA2 identified by direct sequencing expand the opportunity for genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat*. 2004;24(3):272.
28. Shah GN, Hewett-Emmett D, Grubb JH, Migas MC, Flemig RE, Waheed A, Sly WS. Mitochondrial carbonic anhydrase CA VB: Differences in tissue distribution and pattern of evolution from those of CA VA suggest distinct physiological roles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(4):1677–1682.
29. Sly WS, Hewett-Emmett D, Whyte MP, Yu YS, Tashian RE. Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:2752–2756.
30. Sly WS, Hu PY. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:375–401.
31. Sly WS, Whyte MP, Sundaram V, Tashian RE, Hewett-Emmett D, Guibaud P, Vainsel M, Baluarte J, Gruskin A, Al-Mosawi M, Sakati N, Ohlsson A. Carbonic Anhydrase II Deficiency in 12 Families with the Autosomal Recessive Syndrome of Osteopetrosis with Renal Tubular Acidosis and Cerebral Calcification. *N Engl J Med*. 1985;313:139-145.
32. Sprigings TG, Hall CD. A simple carbonic anhydrase model which achieves catalytic hydrolysis by the formation of an 'enzyme–substrate'-like complex. *J Chem Soc*. 2001;2063-2067.
33. Supuran CT, Scozzafava A. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorg Med Chem*. 2007;15:4336–4350.
34. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(2):168-81.

35. Tashian RE. The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function. *Bioessays*. 1989;10(6):186-92.
36. Väänänen HK, Paloniemi M, Vouri J. Purification and localization of human carbonic anhydrase. III. Typing of skeletal muscle fibers in paraffin embedded sections. *Histochem*. 1985;83(3):231-5.
37. Vernier W, Chong W, Rewolinski D, Greasley S, Pauly T, Shaw M, Dinh D, Ferre RA, Nukui S, Ornelas M, Reyner E. Thioether benzenesulfonamide inhibitors of carbonic anhydrases II and IV: structure-based drug design, synthesis, and biological evaluation. *Bioorg Med Chem*. 2010;18(9):3307–3319.
38. Waheed A, Zhu XL, Sly WS. Membrane-associated carbonic anhydrase from rat lung. Purification, characterization, tissue distribution, and comparison with carbonic anhydrase IVs of other mammals. *J Biol Chem*. 1992;267, 3308–3311.
39. Wang Y, Henry RP, Wright PM, Heigenhauser GJ, Wood CM. Respiratory and metabolic functions of carbonic anhydrase in exercised white muscle of trout. *Am J Physiol*. 1998;275(6 Pt2):R1766-79.
40. Xu Y, Feng L, Jeffrey PD, Shi Y, Morel FMM. Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature*. 2008;452:56–61.
41. Zoller MJ, Smith M. Oligonucleotide – directed mutagenesis of DNA fragments clones into M13 vectors. *Methods Enzymol*. 1983;100:468-500.

PADĖKA

Esu be galo dėkinga dr. Daumantui Matuliui už suteiktą galimybę atlikti bakalauro darbą VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje. Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovui David D. Timm už suteiktas žinias, pagalbą ir neišsenkančią kantrybę. Be to, dėkoju dr. Vaidai Jogaitei už naudingus patarimus ir pagalbą. Ir žinoma, noriu padėkoti visam kolektyvui už draugiškumą bei šiltą atmosferą.