



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Molekulinės biologijos IV kurso studentė

Aurelija MICKEVIČIŪTĖ

Bakalaurinis darbas

Žmogaus rekombinantinės karboanhidrazės IV gavimas

Darbo vadovė:

dr. V. Jogaitė

Vilnius, 2012

Žmogaus rekombinantinės karboanhidrazės IV gavimas

Darbas atliktas Vilniaus Universiteto Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje

Aurelija Mickevičiūtė

Darbo vadovė:

Dr. Vaida Jogaitė

Turinys

SUTRUMPINIMAI.....	4
ĮVADAS	5
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	6
I. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1. Karboanhidrazių apžvalga	7
1.1.1. Karboanhidrazių klasės, jų paplitimas gyvajame pasaulyje	7
1.1.2. Žmogaus karboanhidrazių paplitimas organizme ir ląstelėje	8
1.1.3. Karboanhidrazių aktyvaus centro struktūra ir jų veikimo principas.....	9
1.1.4. Karboanhidrazių raiškos sutrikimų sukeltos ligos ir jų gydymo galimybės.....	11
1.1.5. Žmogaus karboanhidrazė IV (CAIV)	12
1.2. Rekombinantinių baltymų kūrimo strategija	13
II. MEDŽIAGOS IR METODAI	18
2.1. Darbe naudoti prietaisai, medžiagos, tirpalai ir kitos priemonės	18
2.1.1. Naudoti prietaisai.....	18
2.1.2. Naudoti fermentai, rinkiniai ir cheminės medžiagos.....	18
2.1.3. Naudotos terpės ir tirpalai	19
2.1.4. Naudotos kitos priemonės	21
2.2. Metodai.....	25
2.2.1. Rekombinantinio žmogaus CAIV geno klonavimas	25
2.2.2. Rekombinantinio CAIV baltymo raiškos gavimas <i>E. coli</i> ląstelėse.....	30
III. REZULTATAI	32
3.1. Rekombinantinės CAIV (19–284 a. r.) klonavimas bei raiška.....	32
3.2. Rekombinantinės CAIV (19–312 a. r.) klonavimas bei raiška.....	37
IV. REZULTATŲ APTARIMAS	42
4.1. Rekombinantinių CAIV konstrukto kūrimas.....	42
4.2. Rekombinantinės CAIV raiška <i>E. coli</i> ląstelėse.....	43
IŠVADOS	47
SANTRAUKA	48
SUMMARY	49
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	50
PADĖKA.....	54

SUTRUMPINIMAI

AA – akrilamidas;

APS – amonio persulfatas;

aps. – apsisukimai;

a. r. – aminorūgštis;

BAA – bisakrilamidas;

bp – bazių pora;

CA – karboanhidrazė;

CNS – centrinė nervų sistema;

Cys – cisteinas;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

dNTP – deoksiribonukleotidas;

DTT – ditionitritolis;

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

EZA – etokszolamidas;

Glu – glutamo rūgštis;

His – histidinas;

IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas;

kb – kilobazė;

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

PGR – polimerazinė grandininė reakcija;

pur. – purtymai;

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;

TFMSA – trifluormentano sulfonamidas;

Thr – treoninas;

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

IVADAS

Karboanhidrazės (CA) – tai fiziologiškai svarbūs fermentai, kurie, katalizuodami grįžtamą CO₂ hidrolizę, palaiko pastovų terpės pH, dalyvauja jonų mainų reakcijose ir daugelyje kitų gyvybiškai svarbių procesų. CA skirstomos į 5 klases ir randamos visuose gyvuose organizmuose bei visuose daugialąsčių organizmų audiniuose, ląstelių dalyse. Žmogaus organizme randama 12 aktyvių CA, kurios priklauso α -CA šeimai.

Dėl didelio paplitimo ir svarbos CA veiklos sutrikimai tampa daugybės ligų priežastimi – nuo virškinimo sistemos sutrikimų iki onkologinių susirgimų. Pavyzdžiui, daugelyje navikų nustatyta padidėjusi CAIX ir CAXII raiška. CAIV, kuriai šiame darbe skiriamas didžiausias dėmesys, geno mutacijos lemia kol kas nepagydomą akių ligą *retinitis pigmentosa*, kurios vėlyvojoje stadijoje žmogus apanka.

Norint išgydyti CA veiklos sutrikimų sukeltas ligas, bandoma kurti vaistus, kurių aktyvioji medžiaga – CA slopiklis arba aktyviklis. Vaistų tyrimai prasideda nuo CA ir slopiklių ar aktyviklių sąveikos tyrimų, kuriems reikia didelių kiekių išgrynintų, su slopikliais ar aktyvikliais besijungiančių CA. Jų gavimas – nemenka problema. Anksčiau CA buvo išskiriamos iš įvairių natūralių šaltinių, tiriant α -CA buvo naudojami žinduolių audiniai. Dabar naudoti iš gamtinių šaltinių išskirtas CA būtų labai brangu. Be to, stengiamasi kiek įmanoma sumažinti gyvūnų naudojimą moksliniuose tyrimuose, todėl ieškoma alternatyvų. Viena iš jų – rekombinantinių baltymų kūrimas ir jų raiška prokariotuose. Toks sprendimas šiuo metu yra vienas geriausių, nes, parinkus tinkamus vektorius, raiškos šeimininkus ir jų auginimo sąlygas, galima greitai ir gana pigiai gauti didelius kiekius funkcionalių baltymų. Taigi labai svarbu kiek įmanoma labiau optimizuoti rekombinantinių CA gavimą.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas:

Gauti rekombinantinę žmogaus CAIV.

Darbo uždaviniai:

- Klonuoti rekombinantinę žmogaus CAIV.
- Surasti optimalias sąlygas rekombinantinės žmogaus CAIV raiškai *E. coli* ląstelėse.

I. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Karboanhidrazių apžvalga

1.1.1. Karboanhidrazių klasės, jų paplitimas gyvajame pasaulyje

Karboanhidrazės (CA) (EC 4.2.1.1) yra Zn^{2+} metalofermentai, kurie katalizuoja grįžtamą CO_2 hidrolizės reakciją: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ (Breton, 2001).

CA priklauso 5 šeimoms (α , β , γ , δ ir ζ). Žinduoliai turi 16 α -CA izoformų, 13 iš jų yra aktyvios (CA I–IV, VA, VB, VI, VII, IX, XII–XV). Žmoguje neaptinkama CAXV (Pastorekova ir kiti, 2006). α -CA taip pat randamos augalų citoplazmoje, bakterijose ir virusuose (Supuran ir kiti, 2004; Krishnamurthy ir kiti, 2008). Dažniausiai tai monomeriniai vienos grandinės baltymai, kurių molekulinė masė apie 30 kDa (Krishnamurthy ir kiti, 2008). Žinoma, yra ir išimčių: CAXII molekulinė masė apie 40 kDa, CAIX – apie 54 kDa, o CAVI – apie 42 kDa (Kivelä ir kiti, 1999; Purkerson ir Schwartz, 2007). CAIX ir CAXII yra dimerai (Manokaran ir kiti, 2008; Li ir kiti, 2010). α -CA aktyviajame centre Zn^{2+} visada susijungęs su vandens molekule ir trimis His šoninėmis grupėmis (Supuran ir kiti, 2004).

β -CA randamos žemesniuosiuose eukariotuose, prokariotuose, archėjose ir augaluose. Kitaip nei α -CA, β -CA yra oligomerai, sudaryti iš 2–6 monomerų, kurių kiekvieno molekulinė masė yra 25–30 kDa (Supuran ir kiti, 2004). Augaluose β -CA labai svarbios anglies fiksacijai ir metabolizmui (Huang ir kiti, 2011). Kaip ir α -CA, β -CA aktyvumui labai svarbus Zn^{2+} jono buvimas, bet aktyviojo centro struktūra nėra taip griežtai apibrėžta (Supuran ir kiti, 2004).

γ -CA randamos bakterijose. Iki šiol ištirti tik 2 *Archaea* domeno atstovai: *Methanosarcina thermophila* ir *Pyrococcus horikoshii*. Fiziologinė γ -CA funkcija kol kas neaiški (Ferry, 2010). γ -CA greičiausiai yra Fe^{2+} metalofermentai (Supuran, 2011). Kiekvienas aktyvus γ -CA vienetas yra sudarytas iš dviejų identiškų dalių. Kiekviena dalis yra homotrimeras, kurio molekulinė masė apie 70 kDa. Kiekvienas homotrimeras turi po vieną Fe^{2+} . Aktyviajame centre esantį metalą supa 3 His šoninės grupės. 2 iš jų priklauso 1 daliai, o trečioji – kitai. Taip susijungus dviem dalims gaunami trys aktyvieji centrai (Supuran ir kiti, 2004).

Apie δ ir ζ klasių CA šiuo metu nėra pakankamai duomenų. δ -CA buvo rastos *Thalassiosira weissflogii*, kuris yra jūrų planktono sudedamoji dalis. Manoma, kad δ -CA yra α -CA homologas – abi CA tikriausiai paveldėtos iš bendro protėvio. ζ -CA randamos

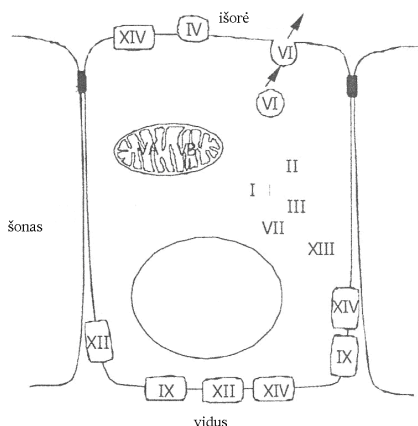
bakterijose. Manoma, kad tai – β -CA poklasis, atsiradęs skilus β -CA (Krishnamurthy ir kiti, 2008). δ -CA aktyviajame centre randamas Zn^{2+} , ζ -CA – Zn^{2+} arba Co^{2+} (Supuran, 2011).

Nėra tokios gyvybės formos, kurioje nebūtų CA. Augalų, gyvūnų, bakterijų ląstelėse CA atlieka gyvybiškai svarbias funkcijas (Kivelä ir kiti, 2005). Be to, kad palaiko pastovų pH, žinduoliuose CA dalyvauja kvėpavimo ir dujų mainų reguliacijoje, regėjimo funkcijos palaikyme, kaulų vystimesi ir jų funkcijos palaikyme, kalcifikacijoje, metabolizme, signalų perdavime, atminties, raumenų ir nervų sistemos funkcijų palaikyme, seilių susidaryme, skrandžio ir kasos sulčių susidaryme, žarnyne vykstančiame jonų transporte, prisitaikyme prie ląstelinio streso (Breton, 2001; Kivelä ir kiti, 2005; Krishnamurthy ir kiti, 2008).

1.1.2. Žmogaus karboanhidrazių paplitimas organizme ir ląstelėje

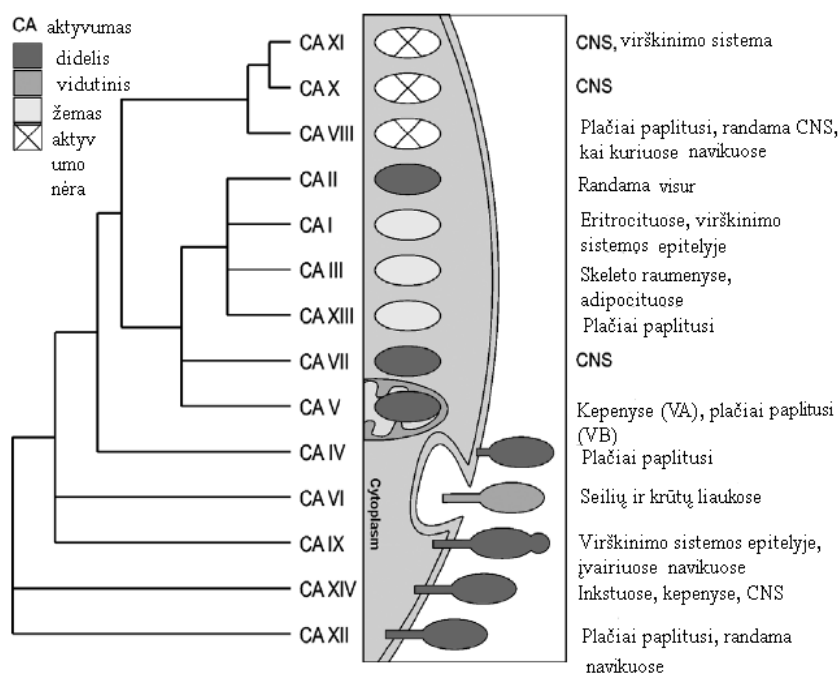
Žmogaus CA priklauso α -CA šeimai ir gali būti suskirstytos į 3 grupes. Seniausi žinomi fermentai turi užląstelinį CA domeną, kuris yra labai arba vidutiniškai katalitiškai aktyvus. Šie fermentai yra transmembraniniai (CAIX, XII, XIV), prikabinėti prie membranos per glikozilfosfatidilinozitolį (CAIV) arba sekretuojami (CAVI). Antrą grupę sudaro viduląsteliniai fermentai, turintys didelio (CAII, V, VII), vidutinio (CAXIII) arba mažo (CAI, III) fermentinio aktyvumo viduląstelinį CA domeną. Išskyrus CAVA ir CAVB, kurios randamos mitochondrijose, visi antros grupės fermentai yra citoplazmos baltymai. Trečia, evoliuciškai jauniausia, grupė jungia neaktyvius citoplazminius fermentus (CAVIII, X, XI) (Pastorekova ir kiti, 2006).

Skirtingos CA turi skirtingas kinetines savybes, yra aptinkamos skirtinguose audiniuose ir skirtingose ląstelės vietose (1 pav.). Tai, koks fermentas bus ekspresuojamas, labiau nusprendžia ląstelių vieta organizme, o ne ląstelių tipas (Christie ir kiti, 1997).



1 pav. CA pasiskirstymas ląstelėje (Kivelä ir kiti, 2005).

CA randamos visame žmogaus kūne (2 pav.). Daugiausia įvairių CA izoformų randama raudonosiose kraujo ląstelėse, smegenyse, plaučiuose, virškinimo trakte, inkstuose, kepenyse ir sėklidėse (Pastorekova ir kiti, 2006). Toks didelis CA paplitimas rodo neabejotiną jų svarbą organizmo išgyvenimui.

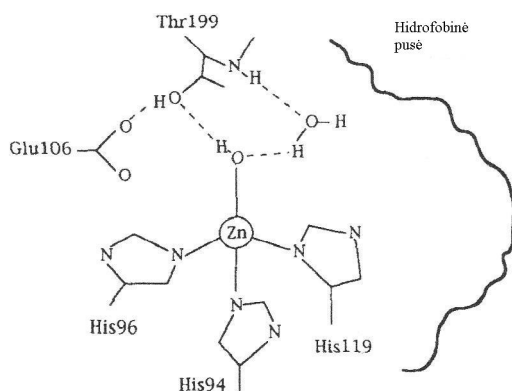


2 pav. CA paplitimas žmogaus organizme (Pastorekova ir kiti, 2006).

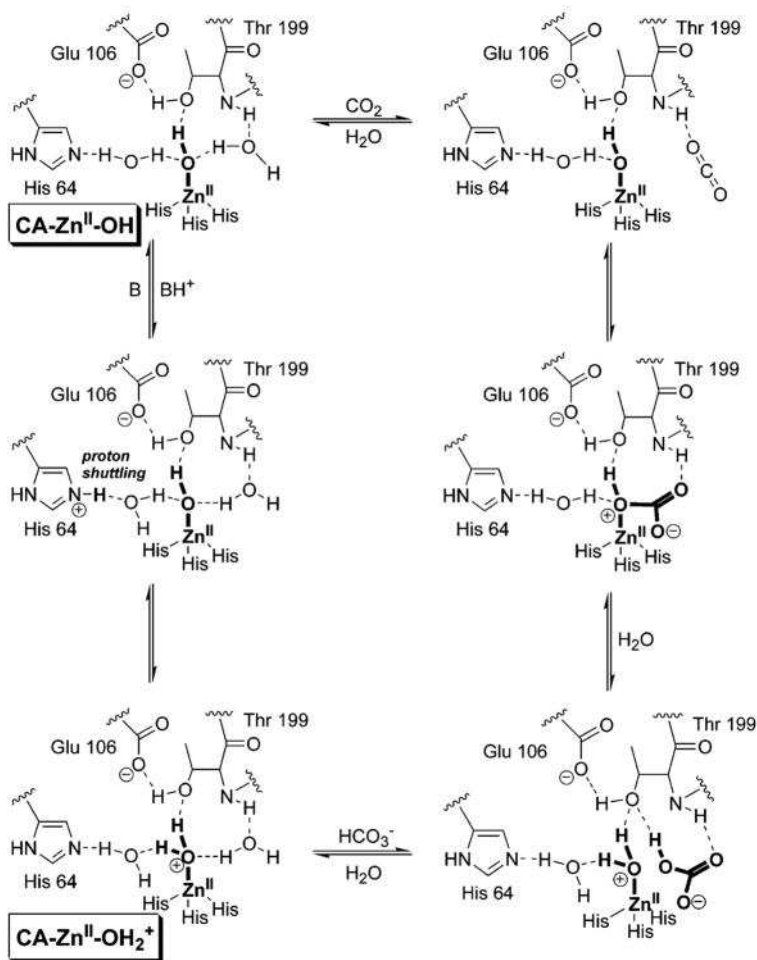
1.1.3. Karboanhidrazių aktyvaus centro struktūra ir jų veikimo principas

William Sly ir Peiyi Hu dar 1995 m. nustatė, kaip atrodo žmogaus CA aktyvusis centras. Iki šiol nepadaryta jokių žymių jų teorijos pataisymų. Anot W. Sly ir P. Hu, CA yra sferinė struktūra, o jos aktyvusis centras yra kūgio formos įdubime. Vienas įdubimo šonas sudarytas iš hidrofobinių aminorūgščių šoninių grupių, o kitame šone išsidėsčiusios hidrofilinių aminorūgščių liekanos. Svarbiausios iš jų – Thr199 ir Glu106. Zn^{2+} yra hidrofilinio šono apačioje, koordinaciniais ryšiais susijungęs su His šoninių grupių imidazolo grupėmis (3 pav.). Thr199–Glu109 svarbūs vandenilio jono prijungimui prie CO_2 hidrolizės metu (Sly ir Hu, 1995). Jie užtikrina, kad vyktų nukleofilinė ataka.

Pačią hidrolizės reakciją išsamiai ištyrė Vijay Krishnamurthy ir jo kolegės (Krishnamurthy ir kiti, 2008). Reakcija vyksta dviejų žingsnių „ping-pong“ mechanizmu (4 pav.).



3 pav. CA aktyvūs centras (Sly ir Hu, 1995).



4 pav. CA veikimo mechanizmas (Krishnamurthy ir kiti, 2008).

Minėti mokslininkai tyrė žmogaus CAII veikimo mechanizmą, tačiau manoma, kad ir kitos CA veikia tuo pačiu „ping–pong“ mechanizmu. Fermento aktyviajame centre yra Zn²⁺–OH, apsuptas trimis His šoninėmis grupėmis (His94, His96 ir His119) (Sly ir Hu, 1995; Krishnamurthy ir kiti, 2008). Tai sudaro tetraedrinę struktūrą. Trys neaktyvios CA izoformos (CA VIII, X, XI) neturi vieno His aktyviajame centre (Pastorekova ir kiti, 2006).

Pirmasis hidrolizės žingsnis – tai nukleofilinė ataka. Prie Zn^{2+} prisijungusi hidroksigrupė atakuoja CO_2 ir susiformuoja su metalu susijungęs bikarbonatas, kuris vėliau pakeičiamas vandens molekule (Krishnamurthy ir kiti, 2008).

Antrasis žingsnis vyksta, kai prie Zn^{2+} prisijungusi vandens molekulė perduoda protoną fermento aplinkoje esančių skysčių molekulėms ir regeneruoja $\text{Zn}^{2+}\text{-OH}$. Šis žingsnis apsprendžia reakcijos greitį. Protono perdavime dalyvauja His64, kuris atlieka protono perdavėjo funkciją (Krishnamurthy ir kiti, 2008).

CA yra vieni iš aktyviausių fermentų. Aktyviausios iš jų, CAII, katalitinis aktyvumas didesnis nei 10^6 s^{-1} , mažiausiai aktyvios CAIII – $2 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ (Paranawithana ir kiti, 1990; Krebs ir Fierke, 1993). CAIV CO_2 hidrolizės katalitinis aktyvumas yra $8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ (Sterling ir kiti, 2002). CA fermentinis aktyvumas neapsiriboja tik CO_2 hidrolizės reakcijomis. Šie fermentai taip pat gali katalizuoti arilo grupę turinčių bei alifatinių aldehydų ir esterių hidrolizę (Krishnamurthy ir kiti, 2008).

Bikarbonatas, gaunamas CO_2 hidrolizės metu, yra svarbus daugeliui biologinių procesų, pavyzdžiui Na^+ ir CO_2 pernešimui, biosintezės reakcijoms (gliukoneogenezei, amino rūgščių sintezei, lipogenezei, karbamido susidarymui, pirimidino sintezei) (Kivelä ir kiti, 2005; Krishnamurthy ir kiti, 2008).

1.1.4. Karboanhidrazių raiškos sutrikimų sukeltos ligos ir jų gydymo galimybės

Kaip minėta anksčiau, CA randamos visame žmogaus organizme ir yra svarbios daugelio gyvybinių funkcijų palaikymui, o jų veiklos sutrikimai lemia įvairias ligas. Pavyzdžiui, paveldimas CAII nepakankamumas sukelia osteoporozę, inkstų nepakankamumą ir protinį atsilikimą (Pastorekova ir kiti, 2006). Šiuo metu manoma, kad CA turi įtakos daugelio ligų, tokių kaip glaukoma, edema, dėl debeto atsiradęs regos nepakankamumas, epilepsija, neurologinės ligos, plaučių ligos, Alzheimerio liga, osteoporozė, nutukimas, atsiradimui ir eigai, todėl bandoma ieškoti cheminių medžiagų – CA slopiklių ar aktyvikių – kurie selektyviai darytų įtaką sutrikusiai CA raiškai ląstelėje ir taip stabdytų ligos vystymąsi ir plitimą (Pastorekova ir kiti, 2006; Krishnamurthy ir kiti, 2008; Supuran, 2008).

Pavyzdžiui, vieni iš dažniausiai naudojamų vaistų glaukoms gydyti yra sukurti CA slopiklio sulfonamido pagrindu. Jis labai stipriai sumažina intraokuliarinį spaudimą. Tie patys slopiklių poveikiu pagrįsti vaistai gali būti naudojami geltonosios dėmės degeneracijai ir geltonosios dėmės edemai gydyti (Krishnamurthy ir kiti, 2008).

Sergant nervų sistemos ligomis CA slopikliais galima slopinti konvulsijas ir epilepsijos priepuolius. Slopiklių naudojimas gali pakeisti smegenų šuntavimą žmonėms,

kurių smegenyse kaupiasi skystis. Be to, jie gali padėti išvengti hipokaleminio paralyžiaus (Krishnamurthy ir kiti, 2008).

CA slopikliai stabdo skrandžio sulčių sekreciją, todėl gali būti naudojami opaligei gydyti ir skrandžio rūgštingumui normalizuoti. Be to, dėl savo diuretinio poveikio CA slopiklius galima naudoti gydant hipertoniją ir stazinį širdies nepakankamumą (Krishnamurthy ir kiti, 2008).

Pernelyg didelė CAIX ir CAXII raiška aptinkama navikuose. Esant onkologiniams susirgimams, dėl aktyvios ląstelių proliferacijos pagreitėja ir pakinta ląstelių metabolizmas ir joms reikia daugiau bikarbonato. Be to, dėl pakitusio metabolizmo kinta pH ląstelių viduje. CAIX ir CAXII padeda užtikrinti pastovų pH ir sintetina bikarbonatą vėžinėse ląstelėse. Atrodo, kad citozolinės CA prisideda prie ląstelių diferenciacijos ir yra inaktyvuojamos menkai diferencijuotose vėžinėse ląstelėse. Mitochondrinė CAV taip pat gali dalyvauti vėžio susidaryme, nes mitochondrijos dalyvauja biosintezėje ir metabolitiniuose ląstelių keliuose (Pastorekova ir kiti, 2006). Visos minėtos CA gali būti naudojamos kaip taikiniai onkologinių ligų gydyme.

CA slopikliai taip pat gali būti naudojami vietoj antibiotikų gydant bakterijų sukeltas ligas. Daugybė patogeninių bakterijų turi β arba γ klasių CA. Užblokavus jų veiklą, būtų sustabdyti pagrindiniai bakterijų metaboliniai keliai ir jos žūtų (Merlin ir kiti, 2003; Supuran, 2011). Slopikliai galėtų išspręsti šiuo metu vis labiau aptarinėjamą problemą – gydymo neefektyvumą dėl vis didėjančio bakterijų atsparumo antibiotikams.

Šiuo metu žinomos šios pagrindinės CA slopiklių grupės: kompleksiniai metalo anijonai, sulfonamidai, fenoliai, kumarinai ir poliaminai (Durdagi ir kiti, 2011). Apie 25 skirtingi CA slopinimu paremti vaistai yra klinikinių tyrimų stadijoje (Supuran, 2008).

1.1.5. Žmogaus karboanhidrazė IV (CAIV)

CAIV – labiausiai organizme paplitusi CA iš visų membraninių CA. CAIV sintetinama endoplazminiame tinkle ir yra unikali tuo, kad turi glikozilfosfatidilinozitolio inkarą, kuris po kelių potransliacinių modifikacijų prijungiamas vietoj C galinio peptido (285–312 a. r.) (Purkerson ir Schwartz, 2007; Datta ir kiti, 2008; <http://www.uniprot.org/uniprot/P22748>). Tai – pirmoji atrasta membraninė CA (Datta ir kiti, 2010). Baltymas yra 312 aminorūgščių ilgio. Ją koduojantis genas yra 17 chromosomoje, CAIV molekulinė masė yra apie 35 kDa (Kivelä ir kiti, 2005). CAIV baltymą sudaro 2 maždaug 18 ir 15 kDa dydžio fragmentai, sujungti dviem disulfidiniais tilteliais tarp Cys24 ir Cys36 bei tarp Cys46 ir Cys229. Šie disulfidiniai tilteliai padidina baltymo stabilumą

(Waheed ir kiti, 1996; <http://www.uniprot.org/uniprot/P22748>). Manoma, kad dėl šios priežasties CAIV afiniškumas sulfonamido slopikliams 65 kartus mažesnis nei CAII (Sterling ir kiti, 2002). Baltymas randamas įvairių organų, pavyzdžiui, inkstų, širdies, plaučių, kasos, skeleto raumenų epitelinių ir endotelinių ląstelių plazminėje membranoje, akių kapiliaruose (Purkerson ir Schwartz, 2007; Datta ir kiti, 2008). CAIV atlieka pagrindinį vaidmenį reabsorbuojant HCO_3^- inkstuose ir turi įtakos pH palaikymui inkstų kanalėliuose (Waheed ir kiti, 1996; Sterling ir kiti, 2002). CAIV palaiko smegenų homeostazę, katalizuoja dujų mainus ir palaiko vietinį plaučių pH, katalizuoja CO_2 hidrolizę raumenyse fizinės veiklos metu (Waheed ir kiti, 1996). CAIV funkcija glaudžiai susijusi su kitų membraninių CA funkcijomis ir buvo manyta, kad CAIV funkcija nėra svarbi ir ją gali pakeisti kitos CA (Datta ir kiti, 2010). Todėl įrodymai, kad CAIV mutacijos sukelia sunkias ligas, buvo netikėti. Reikėjo daug laiko ir darbo siekiant paaiškinti ligų mechanizmus.

Šiuo metu išaiškintos kelios ligos, kurių atsiradimui turi įtakos CAIV veiklos sutrikimai. Viena iš ligų – *retinitis pigmentosa*. Tai grupė progresuojančių akių ligų, kurių pagrindinis požymis – apoptozės sukeltas fotoreceptorių nykimas (Ferrari ir kiti, 2011). Pacientai kenčia dėl nematymo tamsoje ankstyvoje vaikystėje ir laipsniško regėjimo lauko mažėjimo paauglystėje, kol visiškai apanka (Datta ir kiti, 2008; Köhn ir kiti, 2008). Šia liga serga 1 iš 3000–7000 žmonių nepriklausomai nuo lyties. Pirmieji požymiai pasireiškia paauglystėje, o visiškai apankama sulaukus 40–50 metų. Liga gali būti paveldima autosominiu dominantiniu, autosominiu recesyviniu, su X chromosoma susijusiu, sporadiniu paveldėjimo būdu arba kaip kito sindromo požymis. Nors paprastai ligos požymiai apsiriboja akimis, *retinitis pigmentosa* gali būti Ušerio (Usher) ir Bardeto–Bidlo (Bardet–Biedl) sindromo dalimi. Šiuo metu su liga siejama virš 40 genų, jie visi ekspresuojami fotoreceptoriuose arba akies tinklainės epitelyje (Ferrari ir kiti, 2011).

1.2. Rekombinantinių baltymų kūrimo strategija

Rekombinantiniai baltymai – tai baltymai, sukurti genų inžinerijos būdu. Šie baltymai dažniausiai turi prototipus gyvuose organizmuose, tačiau yra gaunami iš rekombinantinės DNR. Kuriant rekombinantinius baltymus stengiamasi gauti baltymą, kuris funkcionuotų taip pat gerai, kaip ir natyvus baltymas, ir tuo pat metu turėtų papildomų savybių, leidžiančių jį sintetinti kituose, efektyviau tikslinio baltymo sintezę vykdančiuose šeiminkuose, lengviau išgryninti, padidinti tirpumą, stabilumą. Šiuo metu rekombinantiniai baltymai plačiai naudojami daugelyje sričių tiek moksliniuose tyrimuose (fermentinio aktyvumo matavimai, kristalinių struktūrų nustatymas, antikūnų–antigenų sąveikų tyrimai),

tiesiogiai (kaip biologiniai tirpikliai, biokatalizatoriai), nes tai – pigesnis, greitesnis ir paprastesnis būdas gauti didelius kiekius norimo baltymo nei išskiriant iš gamtinio šeimnininko. Be to, medicinoje tokie baltymai jau dabar naudojami diagnostiniais tikslais. Ateityje planuojama pradėti naudoti rekombinantinius baltymus gydyme (Sevastyanovich ir kiti, 2010).

Atrodytų, kad rekombinantiniams baltymams nekeliami daug reikalavimų – gautas baltymas turi atlikti savo funkciją taip pat gerai, kaip ir baltymas, išskirtas iš natyvaus šeimnininko. Šiuo metu apie rekombinantinių baltymų kūrimą žinoma daug: yra daugybė modelinių organizmų, žinomas jų genomai, molekulinė biologija, fiziologija, biochemija, sukurta daugybė genų raiškos sistemų, tačiau rekombinantinių baltymų kūrimas vis dar kelia nemažai problemų (Sevastyanovich ir kiti, 2010). Pagrindinės problemos išlieka jau daugelį metų: rekombinantiniai baltymai yra linkę kauptis bakterijų citoplazmoje netirpių, intarpinių kūnelių pavidalu ir/arba yra neaktyvūs.

Rekombinantinio geno kūrimas. Pirmasis rekombinantinio baltymo kūrimo etapas – baltymą koduojančio geno identifikavimas ir jo sekos turėjimas. Šiuo metu sukurta daugybė bibliotekų, kuriose yra pilno ilgio baltymų genai. Jeigu norimo geno nėra bibliotekoje, galima iš baltymą sintetinančios ląstelės išskirti iRNR ir gauti cDNR. Taip pat galima susintetinti norimą geną. Rekombinantiniai baltymai dažniausiai kuriami siekiant patikrinti kokį nors biologinį ar biocheminį aktyvumą, pavyzdžiui, ar fermentas katalizuoja reakciją, ar baltymas jungiasi su ligandu. Tokiems tyrimams dažnai nereikia viso baltymo. Užtenka turėti už norimą baltymo funkciją atsakingą domeną. Deja, tik pasižiūrėjus į geną neįmanoma pasakyti, kokio ilgio baltymo fragmentą būtų geriausia sintetinti. Vienintelė išeitis – išbandyti įvairius to paties baltymo skirtingo ilgio rekombinantinių baltymų variantus. Susanne Gräslund iš Structural Genomics Consortium ir kiti straipsnio bendraautoriai, klonavę daugiau kaip 400 žmogaus baltymų, pateikia kelis pastebėjimus apie klonuojamos baltymo dalies pasirinkimą. Jie siūlo pašalinti membraną perveriančius domenus, stengtis neišardyti antrinės struktūros elementų arba elementų, reikalingų baltymui susisukti į globulę ir stengtis, kad galuose neatsidurtų hidrofobinės liekanos arba iš daugelio vienetų nukleotidų sudaryta seka (Structural Genomics Consortium ir kiti, 2008).

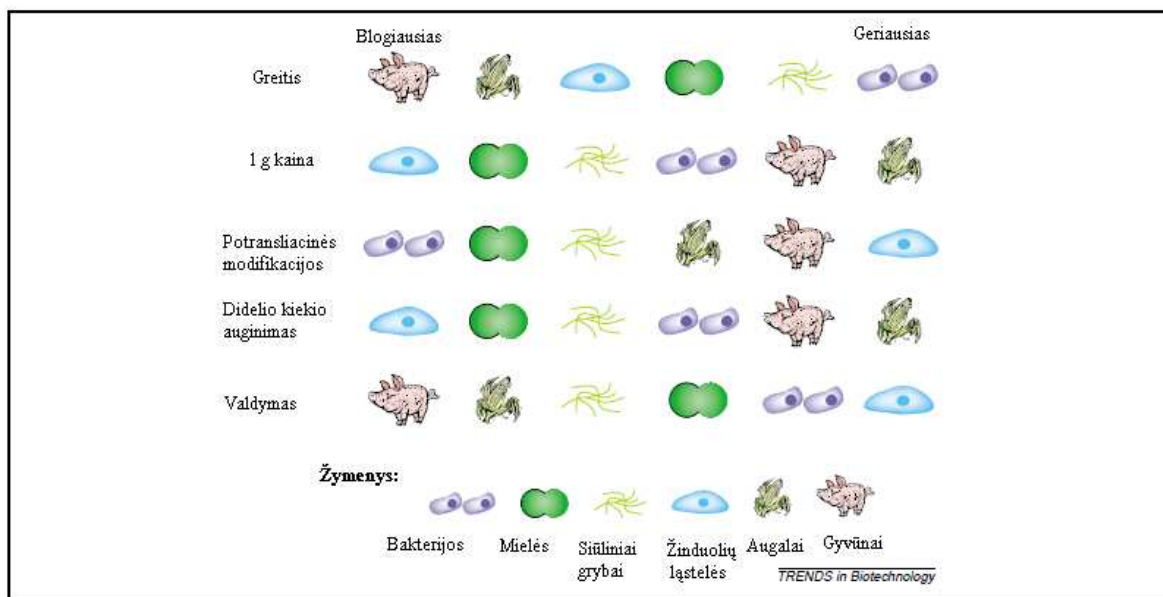
Raiškos vektoriai. Raiškos vektoriai perneša norimą DNR segmentą į šeimnininko ląsteles, kuriose sintetinamas pernešto geno koduojamas baltymas. Vektoriai dažniausiai turi papildomas reguliacines sekas, pavyzdžiui, slopiklius arba stipriklius. Be to, vektoriai turi turėti stiprius promotorius ir baltymo sintezės pabaigos kodonus. Vektorius turi būti toks, kad nuo jo būtų galima transkribuoti didelius kiekius iRNR, vadinasi, ir susintetinti didelį baltymo kiekį. Patekę į ląstelę vektoriai replikuojasi. Vienoje ląstelėje gali būti nuo

keliolikos iki kelių šimtų konstrukčių. Tai ženkliai padidina tikslinio baltymo sintezę. Kitą vertus, jeigu baltymas toksiškas ląstelėms, tai stabdo jų augimą (Baneyx, 1999). Paprastai pasirenkami vektoriai, turintys T7 bakteriofago promotorių, nes jie labai specifiški T7 RNR polimerazei ir šiuo metu yra sukurta daugybė kamienų, tinkamų naudoti su tokiais vektoriais (Dyson ir kiti, 2004). Dažnai naudojami pET (Novagen) vektoriai. Jie turi T7 RNR polimerazės promotorių ir lac operatorių. Šie du elementai užtikrina, kad rekombinantinio baltymo sintezė iki jo raiškos indukcijos naudojant IPTG būtų kiek įmanoma mažesnė. Kol terpėje nėra IPTG, lac operatorius neaktyvus, T7 RNR polimerazė nesintetinama arba sintetinama labai silpnai, baltymo genas netranskribuojamas (Structural Genomics Consortium ir kiti, 2008; Sevastyanovich ir kiti, 2010).

Tam, kad būtų užtikrintas ląstelių, turinčių reikiamą konstrukta, selektyvus augimas, į raiškos vektorius įterpiami atsparumą antibiotikams (ampicilinui, chloramfenikoliui, kanamicinui) užtikrinantys genai. Kita, mažiau populiari atrankos sistema – vektorius, turintis geną, kurio produkto raiška lemia ląstelės žūtį. Konstruojant rekombinantinį baltymą, baltymo genas įterpiamas į ląstelių žūtį sąlygojantį geną ir pastarasis suardomas (Baneyx, 1999).

Viena iš didžiausių rekombinantinių baltymų kūrimo problemų – gauti tirpų baltymą, todėl į vektorių dažnai įterpiamos sekos, koduojančios papildomas baltymo tirpumą didinančias aminorūgščių sekas ar baltymus. Eksperimentiškai nustatyta, kad esant baltymo molekulinei masei apie 22,8 kDa dažniausiai *E. coli* sintetina pakankamą kiekį tirpaus tikslinio baltymo be jokių papildomų sekų, tačiau norint pagaminti didesnius rekombinantinius baltymus, gali prireikti jų tirpumą pagerinti baltymus suliejus su papildomomis baltymais: gliutatio S-transferaze (GST), maltozę surišančiu baltymu (MBP), tioredoksinu (Trx), žaliai fluorescuojančiu baltymu (GFP) ir kitais (Hammarström ir kiti, 2001; Dyson ir kiti, 2004; Prasad ir kiti, 2011). Kai kuriais atvejais truputį pagerinti rekombinantinių baltymų tirpumą padeda 6–10 His ilgio uodegėlė, prijungta tikslinio baltymo N arba C gale. Būdama maža, ji papildomai neapsunkina šeimininko metabolizmo. Be to, ji labai palengvina baltymų gryninimą ir leidžia gryninti švelniomis sąlygomis, nepažeidžiant baltymo. Dėl savo mažo dydžio ir antigeniškumo, His uodegėlė dažniausiai neturi jokios įtakos baltymo struktūrai ir funkcijai, todėl ją nebūtina pašalinti išgryninus baltymą (Dan ir kiti, 2009). Kai baltymo masė perkopia 51,4 kDa, sulietiniai baltymai tampa neefektyvūs, nes kartu su mase dažniausiai didėja baltymų struktūros sudėtingumas. Gali būti, kad jiems reikia eukariotų šaperonų, kurie padėtų įgauti tinkamą struktūrą (Dyson ir kiti, 2004).

Rekombinantinio baltymo raiškos įvairovė. Baltymą ekspresuojantys organizmai gali būti labai įvairūs – nuo bakterijų iki žinduolų. Kiekvienas organizmas turi privalumų ir trūkumų (5 pav.).



5 pav. Įvairių modelinių organizmų palyginimas (Dyck ir kiti, 2003).

Bakterijos, ypač *E. coli*, yra vieni dažniausiai naudojamų šeimininkų. Tačiau jos nelabai tinka eukariotinių baltymų raiškai, nes šie bręsdami patiria įvairias modifikacijas, kurios bakterijose nevyksta (Dyck ir kiti, 2003). Be to, eukariotų ir prokariotų genomuose sutinkamų kodonų dažnis nesutampa. Yra kodonų, pavyzdžiui, AGA, AGG, AUA, kurie dažni eukariotų genome, bet beveik nesutinkami prokariotuose. Kai prokariotų ribosoma prieina tokį kodoną, baltymo sintezė lėtėja. Siekiant išspręsti šią problemą kuriami *E. coli* kamieniai, pavyzdžiui, darbe naudoti *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus–RIL ir *E. coli* Rosetta2(DE3), kurių genomai turėtų papildomas tRNR koduojančių genų kopijas. Šios tRNR atneša retų kodonų koduojamas aminorūgštis (Rosano ir Ceccarelli, 2009). *E. coli* yra vienas iš dažniausiai naudojamų šeimininkų, nes joje gerai ištirtinėti baltymų raiškos, tretinės struktūros formavimosi mechanizmai, pilnai nuskaitytas jos genomas. Šios bakterijos auga greitai, augimui nereikia brangių terpių, todėl toks baltymų gavimas palyginti pigus (Baneyx, 1999).

Kai kurių eukariotinių rekombinantinių baltymų raiškai naudojami vienaląsčiai eukariotai (mielės, siūliniai grybai, dumbliai). Jų, panašiai kaip prokariotų, galima užauginti didelį kiekį ir gauti nemažą tikslinio baltymo kiekį. Šiuose organizmuose vyksta tam tikros eukariotams būdingos DNR ir baltymų modifikacijos, tačiau nėra visiškai atkartojama žmogaus baltymo transliacija, todėl gauti baltymai gali būti imunogeniški arba prarasti tam tikras savybes ar aktyvumą. Minėtą problemą galima išspręsti naudojant vabzdžių ląsteles ir

bakulovirusus, tačiau ši sistema turi unikalų glikozilinimo kelią. Be to, naudojant bakulovirusus gaunami nelabai dideli baltymo kiekiai. Šis būdas netinka pramoniniam naudojimui skirtiems baltymams gaminti. Žinduolių ląstelių kultūrose galima atlikti visas potransliacines modifikacijas, bet jas auginti brangu ir sudėtinga užauginti didesnę kiekį. Transgeninių augalų, gyvūnų ir vabzdžių auginimas yra pigesnis, tačiau ilgai užtrunka juos sukurti. Be to, sunku valdyti augimo greitį ir susintetinto baltymo kiekį. Transgeniniai gyvūnai ar paukščiai ypač tinkami gydymui naudojamų rekombinantinių baltymų gamybai, nes gali juos sekretuoti į pieną, kiaušinius. Šiuos produktus lengva surinkti, laikyti, transportuoti, jų pagaminami dideli tūriai. Pagrindinė problema – tinkami gyvūnai, ypač karvės, ožkos labai lėtai auga (Dyck ir kiti, 2003).

II. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Darbe naudoti prietaisai, medžiagos, tirpalai ir kitos priemonės

2.1.1. Naudoti prietaisai

Darbe naudoti prietaisai:

- centrifuga „Beckmann“;
- DNR elektroforezės aparatas „SIGMA–ALDRICH“;
- kaitinimo plytelė „ИСКОПКА“;
- laminarinė spinta;
- magnetinė maišyklė „BIOSAN“;
- mikrobangų krosnelė „Gamma“;
- mikrocentrifuga „Eppendorf Centrifuge 5415R“;
- PGR aparatas „Eppendorf Mastercycler personal“;
- poliakrilamido gelio elektroforezės aparatas „BIO–RAD“;
- purtyklė „BIOSAN Multi–vortex V–32“;
- purtyklė „Excella E24“;
- purtyklė–termostatas „BIOSAN ES–20“;
- spektrofotometras „NanoDrop“;
- svarstyklės „KERN 572“;
- termostatas „Eppendorf ThermoStat plus“;
- termostatas „TC – 80Y42“;
- UV/WL šaltinis su gelių dokumentavimo sistema „MiniBis Pro“.

2.1.2. Naudoti fermentai, rinkiniai ir cheminės medžiagos

- BioRad: TEMED, glicinas.
- Fluka: Coomassie Brilliant Blue R-250, etidžio bromidas, HCl, bisakrilamidas, NaOH, PIPES.
- Matheson Coleman & Bell: bromfenolio mėlis.
- Roth: agar–agaras, LB terpė, ampicilinas, APS, akrilamidas, triptonas, mielių ekstraktas, NaCl, CaCl₂, chloramfenikolis, glicerolis.
- Sigma: TRIS bazė, SDS, KCl, acto rūgštis, EDTA, DTT.

- ThermoFisher (Fermentas): agarozė, IPTG, DNR ilgio žymuo ir DNR 6x mėginių dažas, baltymų dydžio žymuo, restrikcijos endonukleazės NdeI ir XhoI, *Pfu* DNR polimerazė ir jos buferinis tirpalas, T4 DNR ligazė ir jos buferinis tirpalas, SAP šarminė fosfatazė ir jos buferinis tirpalas, dNTP mišinys, rinkiniai: „GeneJET™ Gel Extraction Kit“, „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“, „GeneJET™ PCR Purification Kit“.
- Реахим: ZnSO₄, MnCl₂.

2.1.3. Naudotos terpės ir tirpalai

Skysta LB (Luria/Miller) terpė (1 l): 25 g terpės ištirpinami 1 l dejonizuoto vandens. Terpė autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje.

Agarizuota LB (Luria/Miller) terpė (1 l): 25 g LB terpės ištirpinami 1 l dejonizuoto vandens. Pridedami 15 g agar–agaro. Terpė autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje.

S. O. C. terpė (1 l):

20 g triptono;
5 g mielių ekstrakto;
10 mM NaCl;
3,5 mM KCl;
1 l dejonizuoto vandens.

Paruošta terpė autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje. Atšaldžius pridedama 10 mM MgCl₂ ir 20 mM gliukozės. Terpė filtruojama per 0,2 μm polivinilidino difluorido filtrą, išpilstoma nedideliu tūriu ir laikoma -20 °C temperatūroje.

30% akrilamido/bisakrilamido tirpalas (70 ml):

29,2 g akrilamido;
0,8 g bisakrilamido;
70 ml dejonizuoto vandens.

Tirpalas nufiltruojamas per stiklinį filtrą ir laikoma +4 °C temperatūroje.

10x TRIS–glicino–SDS elektroforezės buferis (1 l):

10 g SDS;
30 g TRIS bazės;

144 g glicino;

1 l dejonizuoto vandens.

 Buferis laikomas +4 °C temperatūroje.

50x TAE elektroforezės buferis (1 l):

242 g TRIS bazės;

57,1 ml ledinės acto rūgšties;

100 ml 0,5 M EDTA;

dejonizuoto vandens iki 1 l.

 Buferis laikomas kambario temperatūroje.

Akrilamidinių gelių dažas (250 ml):

113 ml etanolio;

23 ml acto rūgšties;

0,6 g Coomassie Brilliant Blue R-250;

dejonizuoto vandens iki 250 ml.

 Ruošiant tirpalą etanolis ir acto rūgštis pilama į nedidelį kiekį dejonizuoto vandens. Tada pilamas likęs vanduo iki 250 ml. Tirpalas laikomas kambario temperatūroje.

1,5 M TRIS–HCl (100 ml): 18,15 g TRIS ištirpinama 70 ml dejonizuoto vandens. Į tirpalą lašinama HCl, kol pH pasiekia 8,8. Tada pripilama dejonizuoto vandens iki 100 ml. Tirpalas filtruojamas per stiklo filtrą ir laikomas +4 °C temperatūroje.

1 M TRIS–HCl (100 ml): 12,1 g TRIS ištirpinama 50 ml dejonizuoto vandens. Į tirpalą lašinama HCl, kol pH pasiekia 6,8. Tada pripilama dejonizuoto vandens iki 100 ml. Tirpalas filtruojamas per stiklo filtrą ir laikomas +4 °C temperatūroje.

6x mėginių dažas (10 ml):

300 µl 1 M TRIS;

1,2 g SDS;

92,5 mg DTT;

6 ml glicerolio;

60 mg bromfenolio mėlio;

dejonizuoto vandens iki 10 ml.

 Dažas išpilstomas nedideliu tūriu ir laikomas -20 °C temperatūroje.

0,5 M PIPES (100 ml): 15,1 g PIPES ištirpinama 80 ml dejonizuoto vandens. Į tirpalą lašinama 5 M KOH, kol pH pasiekia 6,7. Tada pripilama dejonizuoto vandens iki 100 ml. Tirpalas filtruojamas, išpilstomas nedideliu tūriu ir laikomas -20 °C temperatūroje.

Bendras transformacijos buferis (1 l):

	Kiekis	Galutinė koncentracija
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10,88 g	55 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,20 g	15 mM
KCl	18,65 g	250 mM
0,5 M PIPES	20 ml	10 mM
dejonizuotas vanduo		iki 1 l

Tirpalas be PIPES filtruojamas per 0,2 µm polivinilidino difluorido filtrą, išpilstomas nedideliu tūriu ir laikomas -20 °C temperatūroje. PIPES pridedama prieš pat naudojimą.

Poliakrilamido gelis:

Apatinis frakcionuojantis 12% gelis (4,9ml):	Viršutinis koncentruojantis 4% gelis (2,5ml):
2 mL 30% AA/BAA;	335 µL 30% AA/BAA;
1,25 mL 1,5 M TRIS–HCl, pH 8,8;	625 µL 1 M TRIS–HCl, pH 6,8;
50 µL 10% SDS;	25 µL 10% SDS;
1,58 mL H ₂ O;	1,5 mL H ₂ O;
25 µL 10% APS;	12,5 µL 10% APS;
5 µL TEMED.	5 µL TEMED.

2.1.4. Naudotos kitos priemonės

Naudoti *E. coli* kamieniai

Tyrimo metu naudoti *Escherichia coli* kamieniai XLI–blue, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)CodonPlus–RIL ir Rosetta2(DE3). Jie visi įsigyti iš Novagen kompanijos.

E. coli XLI–blue – tai atsparumo antibiotikams neturintis kamienas, skirtas DNR pagausinimui. Kamienas neturi endonukleazės. Jame nevyksta rekombinacija (Stratagene).

Kiti minėti *E. coli* kamienai skirti rekombinantiniams baltymams gauti. *E. coli* BL21(DE3) kamienas neturi atsparumo antibiotikams. Kamienas turi lizogeninį λ profagą DE3 ir T7 RNR polimerazės geną. Be to, šis kamienas neturi Lon ir OmpT proteazių, kurios galėtų suskaidyti sintetinamą baltymą į smulkesnius peptidus (Delphi Genetics).

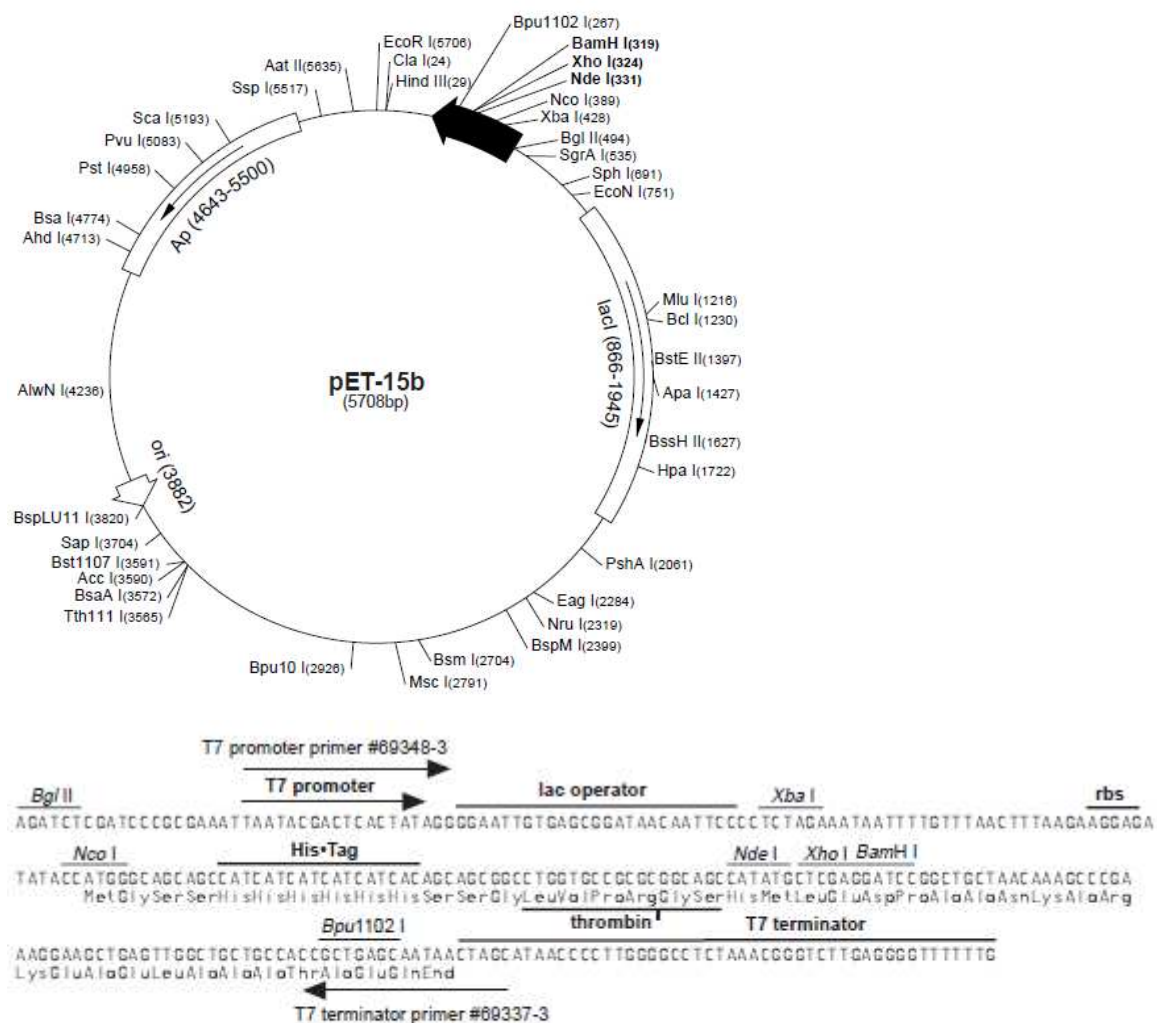
BL21(DE3)pLysS kamienas skiriasi nuo BL21(DE3) kamieno savo atsparumu chloramfenikoliui. Kamienas pasižymi griežtesne tikslinio baltymo geno raiškos kontrole ir yra tinkamas šeimininko ląstelei nuodingų rekombinantinių baltymų genų raiškai (Stratagene).

BL21(DE3)CodonPlus–RIL – tai chloramfenikoliui atsparus *E. coli* kamienas. Jis koduoja papildomas tRNR, atpažįstančias retai prokariotų genome sutinkamus arginio kodonus AGA ir AGG, izoleucino kodoną AUA ir leucino kodoną CUA, kurie yra dažni eukariotų genome. Šių kodonų nebuvimas dažniausiai stabdo eukariotinių baltymų transliaciją, ypač jeigu rekombinantinių baltymų natyvūs analogai randami organizmuose, kurių genomas turi daug AT sekų. Kamienas neturi Lon ir OmpT proteazių (Stratagene).

Rosetta2(DE3) – chloramfenikoliui atsparus kamienas, turintis papildomų kodonų AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA ir CGG, kurių beveik nebūna *E. coli* bakterijų genome, tačiau jie dažnai sutinkami eukariotuose. Kamienas pritaikytas būtent eukariotinių baltymų genų raiškai (Novagen).

Naudoti klonavimo vektoriai

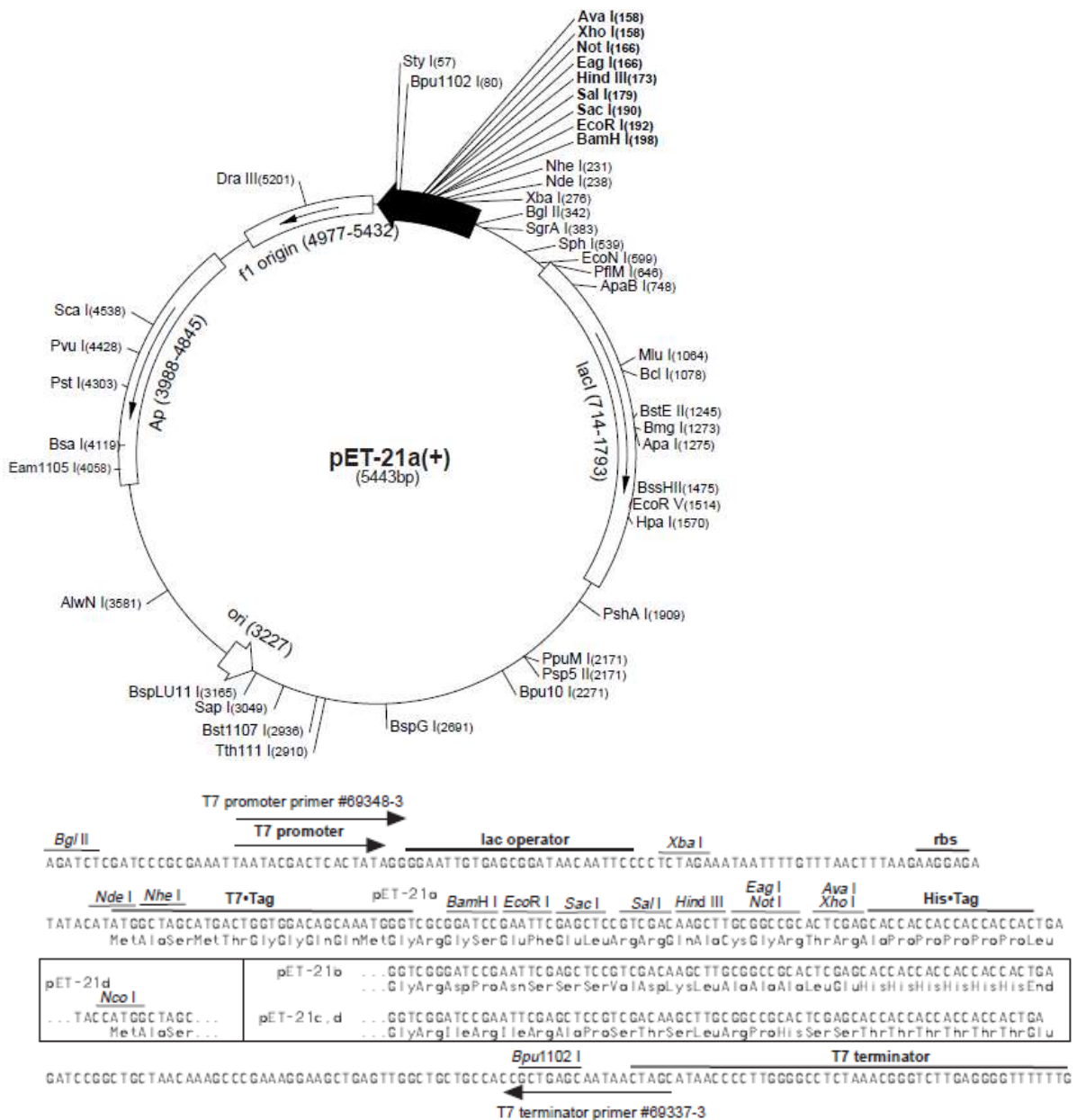
pET15b (Novagen) – vektorius, turintis T7 promotorių, šešis histidinus koduojančią nukleotidų seką multikloninės sekos N gale (6 pav). Vektorius turi atsparumo ampicilinui geną (Novagen).



pET-15b cloning/expression region

6 pav. Vektoriaus pET15b struktūra (Novagen).

pET21a (Novagen) – vektorius, turintis T7 promotorių, šešis histidinus koduojančią nukleotidų seką multikloninės sekos C gale ir 11 aminorūgščių T7 seką koduojančius nukleotidus N gale, kuri padidina genų raišką (7 pav.). Vektorius turi atsparumo ampicilinui geną (Novagen).



pET-21a-d(+) cloning/expression region

7 pav. Vektoriaus pET21a struktūra (Novagen).

Naudoti pradmenys

T7Prom – pradmuo 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3', skirtas plazmidžių sekvenavimui.

T7Term – pradmuo 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' skirtas plazmidžių sekvenavimui.

JS9 – 5'-CATCGCATATGGCAGAGTCACACTGG-3' tiesioginis pradmuo, skirtas CAIV geno fragmento pagausinimui, turintis NdeI kirpimo vietą (pabraukta mėlynai) ir ATG geno transkripcijos pradžios kodoną (parašyta žaliai). Jungiasi už CAIV signalinę seką koduojančios DNR.

JS10 – 5'-GAAGTCTCGAGTCATCGCAGGAAGCC-3' atvirkštinis pradmuo, skirtas CAIV geno fragmento pagausinimui, turintis XhoI kirpimo vietą (pabraukta mėlynai) ir TGA geno transkripcijos pabaigos kodoną (žaliai parašytas atvirkštinis komplementarus kodonas). Jungiasi už CAIV C galinį peptidą koduojančios DNR.

JS11 – 5'-GACCCTCGAGTTAGGACTTTATCACCGTTGC-3' atvirkštinis pradmuo, skirtas CAIV geno fragmento pagausinimui, turintis XhoI kirpimo vietą (pažymėta mėlynai) ir TAA geno transkripcijos pabaigos kodoną (žaliai parašytas atvirkštinis komplementarus kodonas). Jungiasi prieš CAIV C galinį peptidą koduojančią DNR.

Rekombinantinio CAIV geno kūrimui naudotas žmogaus CAIV genas, kurio pilna seka įklonuota į pBluescriptR plazmidę. Konstruktas įsigytas iš RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung – Vokietijos išteklių genomų tyrimams centras).

Rekombinantinės CAIV sukūrimui naudotos kompiuterinės programos

- ApE – A plasmid Editor v1.17 – programa, naudota teoriniam konstrukto sukūrimui;
- MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) – programa, skirta kelių nukleorūgščių ar aminorūgščių sekų palyginimui;
- pDRAW32 – programa, naudota nustatyti atviro skaitymo rėmeliams konstrukte;
- ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) – programa, skirta baltymo parametrų sužinoti.

2.2. Metodai

2.2.1. Rekombinantinio žmogaus CAIV geno klonavimas

Polimerazinė grandininė reakcija

Reikiamą baltymą koduojanti DNR padauginama PGR metodu. PGR mišinį sudaro:

- 1,25 fermento aktyvumo vienetų *Pfu* rekombinantinės DNR polimerazės;
- 1 ng matricinės DNR;
- 0,5 μM tiesioginio pradmens;
- 0,5 μM atvirkštinio pradmens;
- 0,2 mM dNTP mišinio;
- 1x *Pfu* DNR polimerazės buferio su MgSO₄;

34 µl dejonizuoto vandens.

Norint gauti rekombinantinį baltymą be signalinės sekos ir C galinio peptido (nuo 19 iki 284 a. r.), PGR reakcijai buvo naudojami JS9 ir JS11 pradmenys, o norint gauti baltymą tik be signalinės sekos (nuo 19 iki 312 a. r.) – JS9 ir JS10 pradmenys.

Reakcijos tūris 50 µl. Reakcija vykdoma PGR aparate pagal šią programą: I žingsnis: kaitinimas +95 °C temperatūroje 5 min, II žingsnis: DNR grandinių atskyrimas +95°C temperatūroje 30 s, III žingsnis: pradmens prilydymas +64 °C temperatūroje 30 s naudojant JS9 ir JS11 pradmenis arba +62 °C temperatūroje 30 s naudojant JS9 ir JS10 pradmenis, IV žingsnis: DNR sintezė +72 °C temperatūroje 1 min. Programa kartojama nuo II iki IV žingsnio 25 kartus. Jai pasibaigus, vykdomas DNR grandinės galų prisintetinimas +72°C temperatūroje 10 min.

Elektroforezė 1,5% agarozės gelyje

Gauti PGR produktai analizuojami 1,5 % agarozės gelyje. Agarozė ištirpinama 1xTAE buferyje. Jam atvėsus pridedama etidžio bromido. Galutinė etidžio bromido koncentracija – 0,5 µg/ml. Elektroforezei naudojamas 1xTAE buferis, kuriame etidžio bromido galutinė koncentracija yra 0,25 µg/ml. Gelyje analizuojamas mėginys 6 kartus praskiedžiamas DNR 6x mėginių dažu. Horizontali elektroforezė vykdoma esant 6 V/cm² įtampai. Gelis analizuojamas UV šviesoje.

DNR išskyrimas iš PGR mišinio

Padauginta DNR, reikalinga tolesniems klonavimo etapams, iš PGR mišinio išskiriama naudojant „GeneJET™ PCR Purification Kit“ rinkinį, laikantis gamintojo pateiktų nurodymų. Išskirtos DNR koncentracija matuojama „NanoDrop“ spektrofotometru (λ=260 nm). DNR laikoma -20 °C temperatūroje.

Vektoriaus ir PGR produkto restrikcija

Klonavimui naudojamas PGR produktas ir vektoriai kerpami NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis. Šių restrikcijos endonukleazių atpažįstamos nukleotidų sekos yra įterptos į PGR produkto galus. Jos taip pat yra ir ekspresijos vektoriuose. Restrikcijos mišinį sudaro:

500 ng DNR;

10 fermento aktyvumo vienetų NdeI restrikcijos endonukleazės;
10 fermento aktyvumo vienetų XhoI restrikcijos endonukleazės;
2x Tango buferio;
9 µl dejonizuoto vandens.

Reakcijos tūris 20 µl. Reakcija vyksta 2 val +37 °C temperatūroje. Po reakcijos restrikcijos endonukleazės inaktyvuojamos palaikius mišinį 20 min +80 °C temperatūroje.

Vektoriaus defosforilinimas

Vektoriaus defosforilinimo metu šarminė fosfatazė pašalina fosfato grupę nuo vektoriaus 5' galo. To reikia, kad restrikcijos metu perkirptas vektorius savaime nesusijungtų atgal į žiedinę struktūrą. Vektoriaus defosforilinimas vykdomas į vektoriaus restrikcijos mišinį po restrikcijos pridėjus 1 fermento aktyvumo vienetą krevečių šarminės fosfatazės ir 1x krevečių šarminės fosfatazės buferio. Reakcija vyksta 30 min +37 °C temperatūroje. Reakcijai pasibaigus fermentas inaktyvuojamas palaikius mišinį 20 min +80°C temperatūroje.

Pasibaigus fermento inaktyvacijos laikui atliekama vektoriaus ir PGR produkto elektroforezė 1,5% agarozės gelyje. Mėginiai paruošiami kaip aprašyta anksčiau.

DNR išskyrimas iš agarozės gelio

Sukarpyti PGR produktas ir vektorius išskiriami iš agarozės gelio naudojant „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ rinkinį pagal gamintojų pateiktus nurodymus. Išskirtos DNR koncentracija matuojama „NanoDrop“ spektrofotometru ($\lambda=260$ nm). DNR laikoma -20 °C temperatūroje.

DNR ligavimas

Kitas klonavimo etapas – CAIV koduojančios DNR ir raiškos vektoriaus ligavimas siekiant gauti konstrukta, kuriuo bus transformuoti *E. coli* kamienus. Ligavimui reikiamas DNR kiekis apskaičiuotas pagal formulę: $S \times (\text{įterpiamos DNR ilgis (kb)/linearizuoto vektoriaus ilgis (kb)}) \times \text{vektoriaus kiekis (ng)} = \text{DNR kiekis (ng)}$, kur S yra įterpiamos DNR santykis vektoriaus atžvilgiu. Mano darbe naudotas įterptos DNR ir vektoriaus santykis – 3:1. Ligavimo mišinį sudaro:

25 ng vektoriaus;

11,6 ng PGR produkto;
5x T4 DNR ligazės buferio;
5 fermento aktyvumo vienetai T4 DNR ligazės;
5,8 µl dejonizuoto vandens.

Reakcijos tūris 20 µl. Kontrolinei reakcijai paruošiamas mišinys be DNR. Reakcija vyksta 5 min +22 °C temperatūroje.

Transformacija

Kompetentinių ląstelių paruošimas

1. *E. coli* ląstelės užsėjamos ant Petri lėkštelės su kieta agarizuota LB terpe ir auginamos per nakt +37 °C temperatūros termostate, kol susiformuoja pavienės kolonijos.
2. Kitą dieną viena ląstelių kolonija perkeliama į 10 ml LB tepės 50 ml talpos kolboje. Ląstelės per naktį auginamos +37 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu.
3. Ryte 2,5 ml ląstelių kultūros perkeliama į 250 ml LB terpės 1 l talpos kolboje. Ląstelės auginamos +37 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu, kol optinis tankis ($\lambda=600$ nm) pasiekia 0,55.
4. Kolba 10 min inkubuojama ant ledo.
5. Užaugusi ląstelių kultūra centrifuguojama 10 min 2500×g greičiu +4 °C temperatūroje. Terpė nupilama.
6. Ląstelės resuspenduojamos 80 ml šalto bendro transformacijos buferio.
7. Suspensija centrifuguojama 10 min 2500×g greičiu +4 °C temperatūroje. Buferis nupilamas.
8. Ląstelės resuspenduojamos 20 ml šalto bendro transformacijos buferio.
9. Pridedama 1,5 ml DMSO. Bakterijų suspensija pamaišoma ir inkubuojama ant ledo 10 min.
10. Ląstelės išpilstomos į 1,5 ml talpos mėgintuvėlius, užšaldomos skystame azote ir laikomos -70 °C temperatūroje. Jei reikalinga iškart atlikti transformaciją, į 50 µl kompetentinių ląstelių dedama 5 µl ligavimo mišinio po DNR ligavimo. Jei reikalinga padauginti plazmidę, į 50 µl kompetentinių ląstelių dedama 1 µl iš bakterijų išskirtos plazmidės.

Transformacijos eiga

1. Kompetentinių ląstelių ir plazmidės mišinys inkubuojami lede 30 min.
2. Mėgintuvėlis 90 s laikomas +42 °C temperatūroje.
3. Po to 2 min inkubuojama ant ledo.
4. Ląstelių gaivinimui pridedama 400 µl S. O. C. terpės.
5. Ląstelės gaivinamos +37 °C temperatūroje 45 min jas purtant 220 aps./min greičiu.
6. Ląstelės centrifuguojamos 2 min 3300×g greičiu. Dalis terpės nupilama. Jos likutyje (maždaug 50 µl) ląstelės suspenduojamos ir užsėjamos ant prieš tai +37 °C temperatūroje pašildytų Petri lėkštelių su agarizuota terpe bei 100 µg/ml ampicilino ir per naktį auginamos +37 °C temperatūros termostate.

DNR išskyrimas iš bakterijų

Norint išskirti gryną konstruklą ar/ir gauti jo didesnę kiekį, reikalingą atlikti tolimesnes procedūras (pavyzdžiui, DNR sekvenavimą), konstruktu transformuojamos XLI–blue *E. coli* ląstelės.

Po transformacijos per naktį užaugusios pavienės transformantų kolonijos perkeliamos į mėgintuvėlius su 5 ml LB terpės ir 100 µg/ml ampicilino. Ląstelės auginamos per naktį +37 °C jas purtant 220 aps./min greičiu. Pasibaigus auginimo laikui terpė su ląstelėmis perpilama į 1,5 ml talpos mėgintuvėlius ir centrifuguojama 6000×g greičiu 2 min kambario temperatūroje. Terpė nusiurbiamo. Į mėgintuvėlį vėl įpilama apie 1 ml kultūros ir procedūra kartojama, kol nucentrifuguojama visa užauginta biomasė. DNR išskiriama naudojant „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį, pagal gamintojų pateiktas rekomendacijas. DNR koncentracija matuojama spektrofotometru „NanoDrop“ (λ=260 nm). DNR laikoma -20°C temperatūroje.

Klonų atranka

DNR, turinčios įstatytą fragmentą, atrankai iš pavienių *E. coli* kolonijų išskirtos plazmidės karpomos klonavimo metu naudotomis NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis. Restrikcijos produktai analizuojami 1,5% agarozės gelyje.

2.2.2. Rekombinantinio CAIV baltymo raiškos gavimas *E. coli* ląstelėse

Transformantų biomasės auginimas

1. Rekombinantinės CAIV raiškai gauti *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)CodonPlus–RIL, BL21(DE3)pLysS, Rosetta2(DE3) kamienai transformuojami pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.), pET15b–6xHis–CAIV(19–312 a. r.) arba pET21a–CAIV(19–312 a. r.) konstruktu ir užsėjami ant Petri lėkštelės su selektyvia, antibiotikų turinčia agarizuota terpe. Auginant transformuotas BL21(DE3) kamieno ląsteles į LB terpę dedama 100 µg/ml ampicilino. Auginant kitų kamienų transformuotas ląsteles dedama 100 µg/ml ampicilino ir 34 µg/ml chloramfenikolio.
2. Iš užaugusių pavienių transformantų kolonijų atrenkama viena kolonija ir perkeliama į kolbą su 100 ml LB terpės ir atitinkamu antibiotiku. Ląstelės auginamos per naktį +37°C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu. Ryte į kolbas su 400 ml LB terpės pridedama antibiotikų: 100 µg/ml ampicilino BL21(DE3) kamienui, 100 µg/ml ampicilino ir 34 µg/mL chloramfenikolio BL21(DE3)CodonPlus–RIL, BL21(DE3)pLysS ir Rosetta2(DE3) kamienams bei įpilama po 8 ml per naktį augintos bakterijų kultūros. Priklausomai nuo eksperimento, į terpę dedamas skirtingas ZnSO₄ kiekis. Auginant **įprastu būdu** – 0,05 mM, **W. Vernier metodu** – 0,8 mM, **pakeistu W. Vernier metodu** – 0,04 mM ZnSO₄. Bakterijos auginamos +37 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu, kol jų optinis tankis ($\lambda=600$ nm) pasiekia 0,6–0,8. Auginant **įprastu būdu**, rekombinantinės CAIV geno raiška indukuojama pridedant 1 mM IPTG, taikant **W. Vernier metodą** – 0,1 mM IPTG, o taikant **pakeistą W. Vernier metodą** – 1 mM IPTG. Auginant ląsteles kai kuriais metodais, indukcijos metu į terpę papildomai įdedama ZnSO₄ – Zn²⁺ šatinio, kuris reikalingas CAIV aktyviojo centro susidarymui. Auginant **įprastu būdu**, dedama 0,5 mM ZnSO₄, **pakeistu W. Vernier metodu** – 0,4 mM. Auginant ląsteles **W. Vernier būdu** indukcijos metu ZnSO₄ į terpę nededamas. Bakterijos auginamos +30 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu 4 val (**įprastas būdas**) arba +20 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu 20 val (**W. Vernier ir pakeistas W. Vernier metodas**).
3. Rekombinantinio baltymo raiškai patikrinti ruošiami ląstelių lizatų mėginiai, kurie analizuojami atliekant elektroforezę poliakrilamido gelyje. Ląstelių auginimo metu joms pasiekus optinį tankį ($\lambda=600$ nm) 0,6–0,8 paimamas 300 µl ląstelių mėginys prieš tikslinio baltymo indukciją. Norint įsitikinti, kad į terpę pridėjus tikslinio

baltymo raiškos induktoriaus IPTG vyko rekombinantinės CAIV raiška ląstelėse, pasibaigus ląstelių auginimo laikui vėl imama ląstelių suspensija (apie 1 ml) ir matuojamas jos optinis tankis ($\lambda=600$ nm). Mėginyje prieš tikslinio baltymo raiškos indukciją paimtų ląstelių kiekis turi būti toks pats, kaip ir po jos. Apskaičiuotas ląstelių optinių tankių po ir prieš tikslinio baltymo indukciją santykis parodo, kiek kartų daugiau ląstelių yra suspensijoje, pasibaigus jų auginimo laikui po indukcijos, lyginant su ląstelių kiekiu prieš indukciją. Kitaip tariant, kiek kartų mažiau reikia paimti mėginio pasibaigus ląstelių auginimo laikui lyginant su mėginiu prieš indukciją, kad būtų paimtas vienodas ląstelių kiekis abejuose mėginiuose. Mėginiai centrifuguojami 2 min $3300\times g$ greičiu. Skystis nusiurbiamas. Mėginiai suspenduojami 30 μ l 1x mėginių dažo ir 5 min palaikomi $+95^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

4. Ląstelių biomasė 20 min centrifuguojama $4000\times g$ greičiu $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Skystis nupilamas. Biomasė laikoma -20°C temperatūroje iki CAIV gryninimo.

Baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje

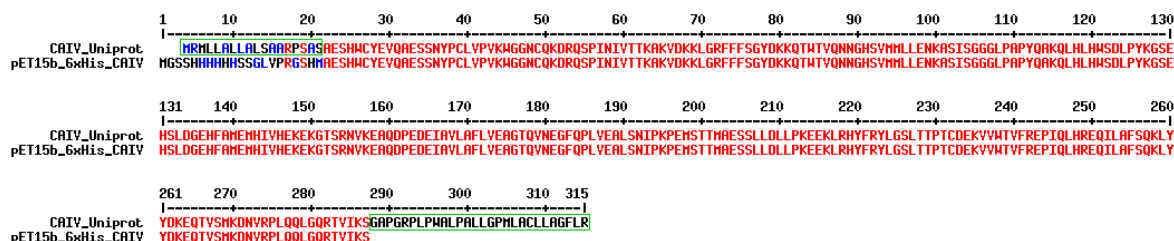
Baltymų elektroforezė vykdoma siekiant pamatyti tikslinio baltymo geno raišką. Tarp švarių, 70% etanolio tirpalu nuvalytų gelio užpylimo stiklų pilamas apatinis frakcionuojantis 12% poliakrilamido gelis, kurio paviršius padengiamas keliais mililitrais dejonizuoto vandens. Gelis stingsta apie 40 min kambario temperatūroje. Geliui sustingus vanduo nupilamas. Vietoj jo pilamas gerai išmaišytas viršutinis koncentruojantis 4% poliakrilamido gelis. Į užpiltą gelį įstatomos „šukutės“ ir paliekama stingti 40 min kambario temperatūroje.

Geliui sustingus surenkamas elektroforezės aparatas, pripilama 1x Tris–glicino–SDS elektroforezės buferio ir iš gelio išimamos šukutės. Į šulinėlius įnešami 5 min $+95^{\circ}\text{C}$ temperatūroje pakaitintas baltymų dydžio žymuo ir anksčiau aprašytu būdu paruošti mėginiai – ląstelių lizatai. Elektroforezė vykdoma esant 50 mA stiprumo ir 200 V įtampos srovei. Srovė išjungžiama, kai dažas iš gelio išeina į buferį. Po elektroforezės gelis 20 min dažomas paruoštais akrilamidinių gelių dažais $+25^{\circ}\text{C}$ temperatūroje jį purtant 70 purt./min greičiu. Tada 10 min blukinamas verdančiame distiliuotame vandenyje.

III. REZULTATAI

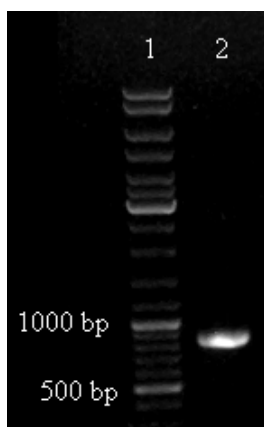
3.1. Rekombinantinės CAIV (19–284 a. r.) klonavimas bei raiška

Remiantis turimais duomenimis apie vektoriaus pET15b (Novagen) bei žmogaus CAIV geno (UniProt duomenų bazė) sekas bei naudojantis programomis „ApE“ (A plasmid Editor v1.17) bei pDRAW32 buvo teoriškai sukonstruotas pET15b–6xHis–CAIV (19–284 a. r.) konstruktas, koduojantis CAIV nuo 19 iki 284 aminorūgšties (8 pav.).



8 pav. Rekombinantinės žmogaus CAIV(19–284 a. r.) (konstruktas – pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.)) ir žmogaus laukinio tipo CAIV aminorūgščių sekų palyginimas. Paveiksle apibrėžta N galinė signalinė seka (1–18 a. r.) ir C galinis peptidas (285–312 a.r.), kurių rekombinantiniame baltyme nėra.

PGR. Žmogaus CAIV geno dalis, koduojanti 19–284 a. r., buvo padauginta PGR metodu, PGR produkto 3' ir 5' galuose įvedant restrikcijos endonukleazių NdeI ir XhoI kirpimo vietas. Po PGR buvo atliekama elektroforezė 1,5% agaroziniame gelyje (9 pav.). Mėginys paruošiamas pagal aprašymą metodinėje dalyje.



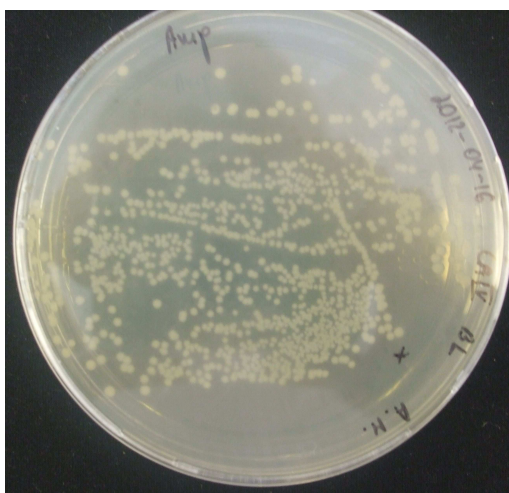
9 pav. PGR produkto elektroforezė. **1 takelis** – DNR ilgio žymuo; **2 takelis** – PGR produktas (804 bp).

Gautas, kaip ir teoriškai tikėtasi, apie 804 bp dydžio PGR produktas.

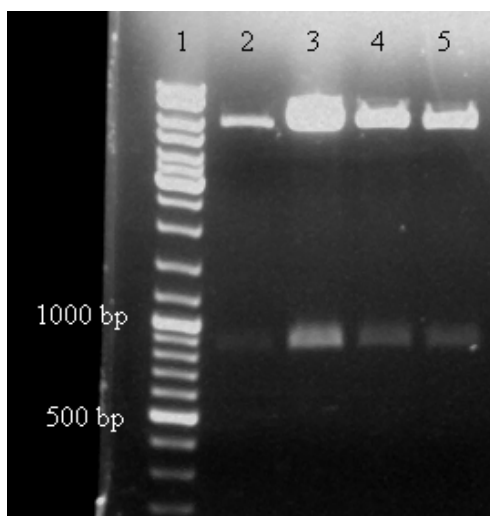
Tolesni darbo etapai – **restrikcija**, **ligacija** ir **transformacija** – atlikti pagal aprašymą metodinėje dalyje. Restrikcijos metu NdeI ir XhoI restrikcijos fermentais kerpama PGR metodu padauginta CAIV(19–284 a. r.) geno dalis ir pET15b vektorius. Po ligacijos,

kurios metu turėtų būti gautas pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.) konstruktas, ir transformacijos į *E. coli* XLI–blue kamieną ant Petri lėkštelių užaugo keliolika kolonijų. Ant kontrolinės lėkštelės (užsėtas sukarpytas vektorius be intarpo) kolonijų nebuvo visai. Vadinas, linearizuotas vektorius greičiausiai nesusijungė į žiedinę struktūrą be intarpo.

Klonų, turinčių reikiamą CAIV intarpą, atranka. Konstruktą ar „tuščiu“ (be intarpo) vektoriumi transformuotos *E. coli* XLI–blue ląstelės įgyja atspatumą ampicilinui ir gali augti ant agarizuotos terpės su juo (10 pav.). Norint patikrinti, ar konstruktas, kuriuo transformuotos ląstelės, turi CAIV(19–284 a. r.) intarpą, atliekama rekombinantinio žmogaus CAIV geno restrikcija naudojant NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazes ir DNR elektroforezė 1,5% agaroziniame gelyje (11 pav.). Gelis ir mėginiai paruošiami kaip aprašyta metodinėje dalyje. Buvo tikimasi takeliuose pamatyti po 2 DNR fragmentus: 5704 bp ilgio linearizuotą vektorių ir 804 bp restrikcijos endonukleazių iškirptą įklonuotą CAIV(19–284 a. r.) geno dalį.



10 pav. *E. coli* bakterijų kolonijos ant Petri lėkštelės.



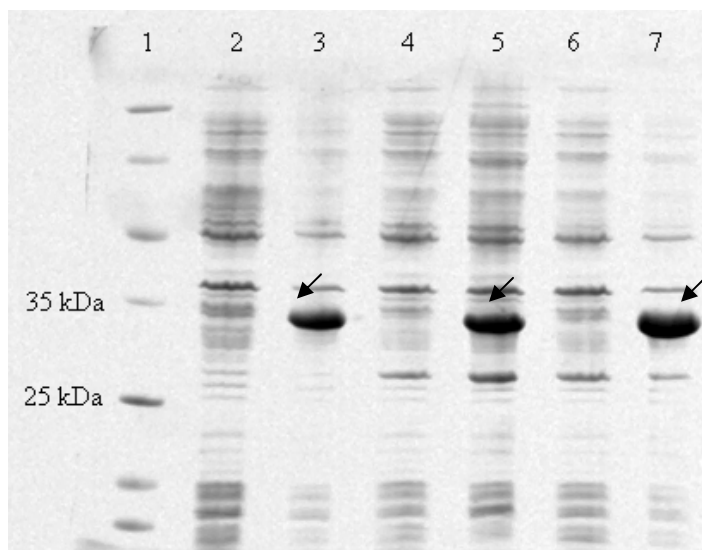
11 pav. *E. coli* pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.) klonų DNR elektroforezė po DNR sukarpymo NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis. **1 takelis** – DNR ilgio žymuo; **2–5 takeliai** – plazmidinė DNR po restrikcijos endonukleazėmis.

Restrikcinė analizė parodė, kad visi 4 tirti klonai turėjo pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.) konstrukta. Norint įsitikinti, kad konstruktas neturi mutacijų, didžiausios koncentracijos DNR mėginys (134 ng/μL) buvo nusekvenuotas.

Konstruktas nusekvenuotas iš abiejų įklonuoto intarpo galų: nuo intarpo priekyje esančios vektoriaus T7 promotorinės sekos bei nuo intarpo pabaigoje esančios T7 terminatoriaus sekos. Gauti duomenys buvo apibendrinti ir gauta seka palyginta su žmogaus laukinio tipo CAIV seka iš UniProt duomenų bazės. Sekos sutapo, mutacijų aptikta nebuvo.

Rekombinantinės CAIV(19–284 a. r.) raiška *E. coli* kamienuose auginant laboratorijoje įprastai taikomu metodu. Tikslinio baltymo raiška buvo indukuota su 1 mM IPTG. Taip pat į auginimo terpę pridėta 0,5 mM ZnSO₄. Tokios šių reagentų koncentracijos buvo dažniausiai tinkamos indukuojant kitų mūsų laboratorijoje gautų CA raišką. Po indukcijos ląstelės buvo auginamos 4 val +30 °C purtant 220 aps./min greičiu.

E. coli baltymų elektroforezės vaizdas pateiktas 12 paveiksle. Didžiausia CAIV geno raiška gauta *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus–RIL kamiene. Rosetta2(DE3) ląstelės augo lėtai, per 10 valandų taip ir nepasiekė reikiamo indukcijai optinio tankio lygio.

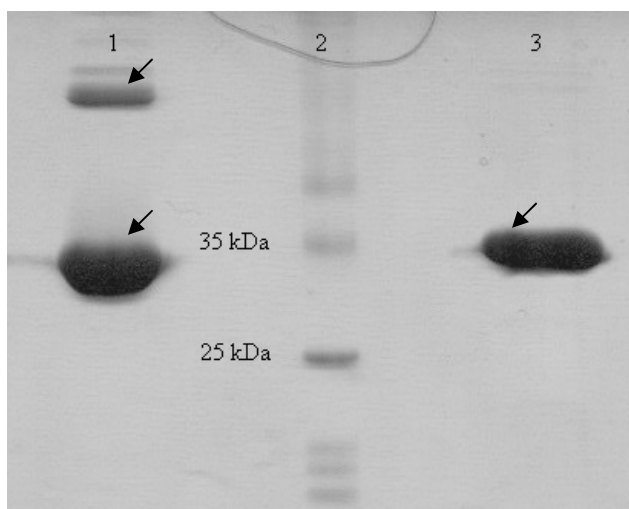


12 pav. *E. coli* baltymų elektroforezės vaizdas poliakrilamido gelyje (rodyklės rodo apie 33 kDa dydžio rekombinantinę CAIV(19–284 a. r.)). **1 takelis** – baltymų dydžio žymuo; **2 takelis** – BL21(DE3) ląstelių lizatas prieš CAIV geno raiškos indukciją; **3 takelis** – BL21(DE3) ląstelių lizatas po CAIV geno raiškos indukcijos; **4 takelis** – BL21(DE3)pLysS ląstelių lizatas prieš CAIV geno raiškos indukciją; **5 takelis** – BL21(DE3)pLysS ląstelių lizatas po CAIV geno raiškos indukcijos; **6 takelis** – BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląstelių lizatas prieš CAIV geno raiškos indukciją; **7 takelis** – BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląstelių lizatas po CAIV geno raiškos indukcijos.

Iš gautos *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląstelių biomasės buvo išgrynintas rekombinantinis CAIV baltymas metalochelatinės chromatografijos būdu naudojant Ni²⁺ kolonėlę. Masių spektrometrijos metodu buvo nustatyta gauto baltymo masė, kuri pasirodė esanti reikiamo rekombinantinei CAIV dydžio. Šį darbą atliko dr. Vytautas Smirnovas. Buvo

pamatuotas baltymo jungimasis su sulfonamidiniais slopikliais TFMSA ir EZA terminio poslinkio metodu. Metodas pagrįstas baltymo denatūravimu keliant temperatūrą. Slopiklį prisijungęs baltymas yra stabilesnis už neprisijungusį, jo denatūravimo temperatūra aukštesnė. Gautas baltymas jungėsi su slopikliais. Baltymą išgrynino j. m. d. Vilma Michailovienė, jungimasi pamatavo dr. Asta Zubrienė.

Atlikus elektroforezę poliakrilamidiniame gelyje redukuojančiomis (įprastas 6x mėginio dažas su DTT) ir neredukuojančiomis (6x mėginio dažas be DTT) sąlygomis paaiškėjo, kad neredukuojančiomis sąlygomis baltymas sudaro dimerą (13 pav.), nors natyvi CAIV būna monomeras. Viena iš galimų dimerinio baltymo susidarymo priežasčių – rekombinantiniame CAIV (19-284 a.r.) baltyme nesusidaro vienas disulfidinis baltymą stabilizuojantis tiltelis, todėl likęs laisvas Cys jungiasi su su kitos CAIV(19–284 a. r.) laisvu Cys. Ši hipotezė buvo patvirtinta atlikus masių spektrometriją (atliko dr. Vytautas Smirnovas). Tiltelio nesusidarymo priežastis iki galo neaiški, nes, remiantis UniProt duomenų bazės duomenimis, pET15b–6xHis–CAIV(19–248 a. r.) konstruktas turi visus 4 Cys, reikalingus dviems tilteliams susidaryti. Buvo nuspręsta sukurti CAIV konstruktą su C galiniu peptidu, kuris nukerpamas bręstant baltymui, tikintis, kad jo buvimas padės baltymui įgauti tinkamą tretinę struktūrą ir susidaryti disulfidiniams tilteliams. Buvo sukurti nauji 2 konstruktai pET15b–6xHis–CAIV(19–312 a. r.) ir pET21a–CAIV(19–312 a. r.). Jie turėjo C galinį peptidą, o vienas – dar ir 6 histidinių uodegėlę, padidinančią rekombinantinio baltymo tirpumą ir padedančią jį išgryninti. Konstruktų kūrimas ir raiškos tyrimai aprašyti 3.2 poskyryje.



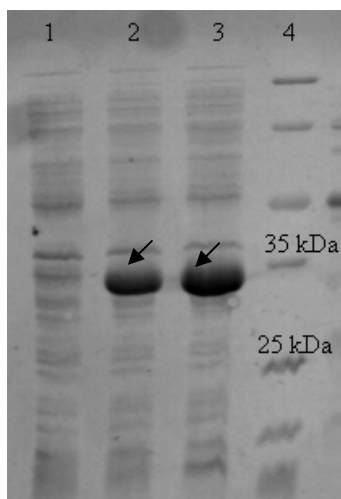
13 pav. CAIV(19–284 a. r.) elektroforezės vaizdas neredukuojančiomis (**1 takelis**) ir redukuojančiomis (**3 takelis**) sąlygomis. **2 takelis** – baltymo dydžio žymuo. (Rodyklės rodo baltymo dimero ir monomero vaizdą gelyje. Elektroforezę atliko j. m. d. V. Michailovienė).

CAIV geno raiška panaudojus naujai sukurtus pET15b–6xHis–CAIV(19–312 a. r.) ir pET21a–CAIV(19–312 a. r.) konstruktus buvo labai prasta, pET15b–6xHis–CAIV(19–

312 a. r.) gryninosi sunkiai ir nesijungė su slopikliais, todėl netiko tolesniems tyrimams. Buvo nuspręsta grįžti prie pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.) konstrukto, kuris, nors ir sudarantis dimerą, jungėsi su EZA ir TFMSA slopikliais. Biomasė, užauginta anksčiau aprašytomis, laboratorijoje įprastomis sąlygomis naudojant pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.) konstrukta (0,5 mM ZnSO₄, 1 mM IPTG, po indukcijos 4 val auginta +30 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu), buvo išgryninta naudojant jonų mainų ir afininę chromatografiją pagal laboratorijoje anksčiau nenaudotą, W. Vernier ir kolegų straipsnyje aprašytą gryninimo metodą. Buvo gautas mažos 0,2 mg/ml koncentracijos baltymas, kuris jungėsi su sulfonamidiniais slopikliais TFMSA ir EZA geriau, nei išgryninus to paties konstrukto koduojamą baltymą metalochelatinės chromatografijos būdu. Jungimasis matuotas terminio poslinkio metodu dr. Astos Zubrienės.

Rekombinantinės CAIV(19–284 a. r.) raiška *E. coli* kamienuose auginant W. Vernier pasiūlytu metodu. Vienintelė naujosios metodikos problema buvo labai maža gryninimo išeiga. Laboratorijoje sukurtas konstruktas buvo palygintas su W. Vernier naudotu konstruktu. Paaiškėjo, kad jie sutampa. Tada buvo bandoma užauginti biomasę W. Vernier ir kolegų straipsnyje aprašytu būdu tikintis, kad iš ląstelių biomasės bus galima išgryninti didesnę kiekį baltymo, nes tai pavyko straipsnio autoriams. Tikslinio baltymo raiškai buvo naudojamas *E. coli* BL21(DE3) kamienas. Ląstelės auginamos LB terpėje. Inokuliacijos metu į terpę įdėta neįprastai didelė 0,8 mM ZnSO₄ koncentracija, o, skirtingai nei anksčiau, rekombinantinio baltymo raiškos indukcijos metu ZnSO₄ į terpę nebuvo dedamas. Tikslinio baltymo indukcijai naudotas neįprastai mažas 0,1 mM IPTG kiekis. Ląstelės iki indukcijos buvo auginamos +37 °C temperatūroje, po indukcijos 20 val +20 °C. Buvo baiminamasi, kad tokia didelė ląstelėms toksiško ZnSO₄ koncentracija stabdys jų augimą, tačiau ryškaus ląstelių augimo sulėtėjimo nebuvo, nepaisant to, tikslinio geno raiškos negauta.

Rekombinantinės CAIV(19–284 a. r.) raiška *E. coli* kamienuose auginant modifikuotu W. Vernier metodu. Nepavykus gauti rekombinantinio CAIV baltymo, W. Vernier pasiūlytas bakterijų auginimo metodas buvo modifikuotas: ląstelių adaptacijai prie joms toksiško ZnSO₄, inokuliacijos metu jo buvo dedama tik 0,04 mM, o baltymo raiškos indukcijos metu – 0,4 mM. IPTG koncentracija padidinta iki 1 mM. Ląstelės auginamos 20 val +20 °C. *E. coli* baltymų elektroforezės vaizdas pateiktas 14 paveiksle. Šiuo metodu užauginti didesnio biomasės kiekio, reikalingo baltymui išgryninti, nepavyko.

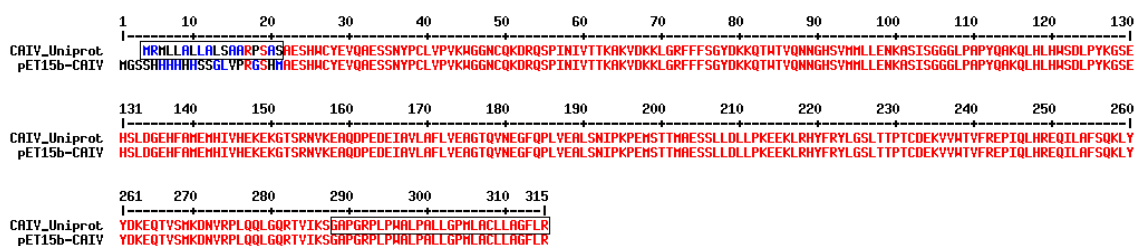


14 pav. *E. coli* BL21(DE3) baltymų elektroforezės vaizdas poliakrilamido gelyje (rodyklės rodo apie 33 kDa dydžio rekombinantinę CAIV(19–284 a. r.)). **1 takelis** – BL21(DE3) ląstelių lizatas prieš CAIV geno raiškos indukciją; **2 takelis** – BL21(DE3) ląstelių lizatas po CAIV geno raiškos indukcijos, kai ląstelės augintos 4 val +30 °C temperatūroje (įprastas metodas); **3 takelis** – BL21(DE3) ląstelių lizatas po CAIV geno raiškos indukcijos, kai ląstelės augintos 20 val +20 °C temperatūroje (modifikuotas W. Vernier metodas); **4 takelis** – baltymų dydžio žymuo.

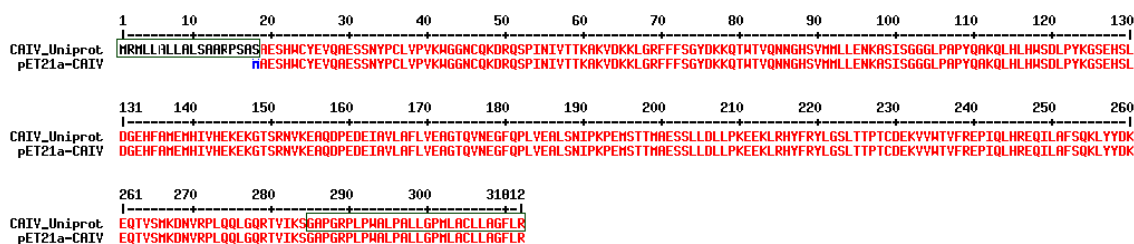
3.2. Rekombinantinės CAIV (19–312 a. r.) klonavimas bei raiška

Kurti naujus CAIV konstruktus buvo nuspręsta, kai po baltymo elektroforezės poliakrilamido gelyje redukuojančiomis (įprastas 6x mėginių dažas) ir neredukuojančiomis (6x mėginių dažas be DTT) sąlygomis gautas rekombinantinis baltymas CAIV (19–284 a.r.) sudarė dimerą. Buvo tikėtasi, jog sukūrus naujus, didesnę baltymą koduojančius konstruktus pavyks gauti stabilesnį tokio paties ar didesnio aktyvumo baltymą.

Remiantis turimais duomenimis apie vektorius pET15b ir pET21a (Novagen) bei žmogaus CAIV geno (UniProt duomenų bazė) sekas bei naudojantis programomis „ApE“ (A plasmid Editor v1.17) bei pDRAW32 buvo teoriškai sukonstruoti pET15b–6xHis–CAIV (19–312 a. r.) ir pET21a–CAIV(19–312 a. r.) konstruktai, koduojantys CAIV nuo 19 iki 312 aminorūgšties (15 ir 16 pav.).

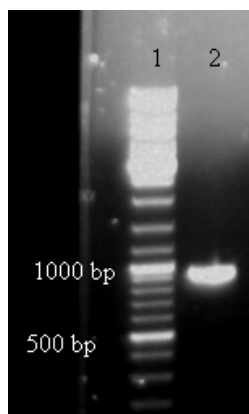


15 pav. Rekombinantinės žmogaus CAIV(19–312 a. r.) (konstruktas – pET15b–6xHis–CAIV(19–312 a. r.)) ir žmogaus laukinio tipo CAIV aminorūgščių sekų palyginimas. Paveiksle apibrėžta N galinė signalinė seka (1–18 a. r.), kurios nėra rekombinantiniame baltyme, ir C galinis peptidas (285–312 a. r.), kurio buvimas skiria šį konstruktą nuo pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.).



16 pav. Rekombinantinės žmogaus CAIV(19–312 a. r.) (konstruktas – pET21a–CAIV(19–312 a. r.)) ir žmogaus laukinio tipo CAIV aminorūgščių sekų palyginimas. Paveiksle apibrėžta N galinė signalinė seka (1–18 a. r.), kurio rekombinantiniame baltyme nėra ir C galinis peptidas (285–312 a. r.), kurio buvimas skiria šį konstruktą nuo pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.).

PGR. Žmogaus CAIV geno dalis, koduojanti 19–312 a. r., buvo padauginta PGR metodu, PGR produkto 3' ir 5' galuose įvedant restrikcijos endonukleazių NdeI ir XhoI kirpimo vietas. Po PGR buvo atliekama elektroforezė 1,5% agaroziniame gelyje (17 pav.). Mėginys paruošiamas pagal aprašymą metodinėje dalyje.



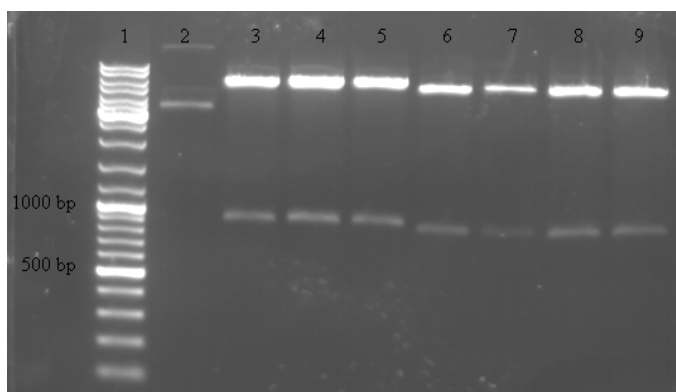
17 pav. PGR produkto elektroforezė. **1 takelis** – DNR ilgio žymuo; **2 takelis** – PGR produktas (881 bp).

Kaip ir tikėtasi, gautas 881 bp PGR produktas.

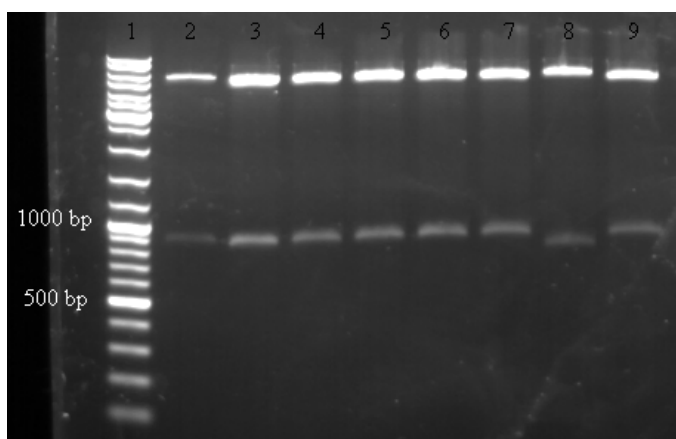
Tolesni klonavimo etapai – **restrikcija**, **ligacija** ir **transformacija** – atliekami kaip aprašyta metodinėje dalyje. Restrikcijos metu NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis kerpami pET15b ir pET21a vektoriai bei CAIV(19–312 a. r.) geno fragmentas, padaugintas PGR būdu. Po ligacijos ir transformacijos naudojant *E. coli* XLI–blue kamieną ant Petri lėkštelių užaugo po keliolika kolonijų. Ant kontrolinės lėkštelės neužaugo nė viena kolonija.

Klonų, turinčių reikiamą CAIV intarpą, atranka. Klonų atranka buvo atliekama taip pat, kaip buvo atrinkti pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.) klonai (33 psl.). Atrankos metu atlikta rekombinantinio CAIV(19–312 a. r.) konstrukto restrikcija naudojant NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazes ir DNR elektroforezė 1,5% agaroziniame gelyje (18 ir 19 pav.). Gelis ir mėginiai paruošiami kaip aprašyta metodinėje dalyje. Buvo tikimasi tinkamų klonų takeliuose pamatyti po 2 DNR fragmentus: 5704 bp (pET15b) arba 5365 bp

(pET21a) ilgio perkirtus vektorius ir 881 bp restrikcijos endonukleazių iš konstrukto iškirptą CAIV(19–312 a. r.) geną.



18 pav. *E. coli* pET15b–6xHis–CAIV(19–312 a. r.) klonų DNR elektroforezė po DNR sukarpymo Nde I ir Xho I restrikcijos endonukleazėmis. **1 takelis** – DNR ilgio žymuo; **2–9 takeliai** – restrikcijos produktai.



19 pav. *E. coli* pET21a–CAIV(19–312 a. r.) klonų DNR elektroforezė po DNR sukarpymo Nde I ir Xho I restrikcijos endonukleazėmis. **1 takelis** – DNR ilgio žymuo; **2–9 takeliai** – restrikcijos produktai.

Iš 8 patikrintų pET15b–6xHis–CAIV(19–312 a. r.) konstruktu transformuotų klonų CAIV(19–312 a. r.) geno dalį turėjo 7. Norint įsitikinti, kad konstruktas neturi mutacijų, didžiausios koncentracijos DNR mėginys (84 ng/μL) buvo nusekvenuotas.

Visi tirti pET21a–CAIV(19–312 a. r.) konstruktu transformuoti klonai turėjo CAIV(19–312 a. r.) geno dalį. Sekvenavimui atiduotas didžiausios – 75,5 ng/μL – koncentracijos DNR mėginys.

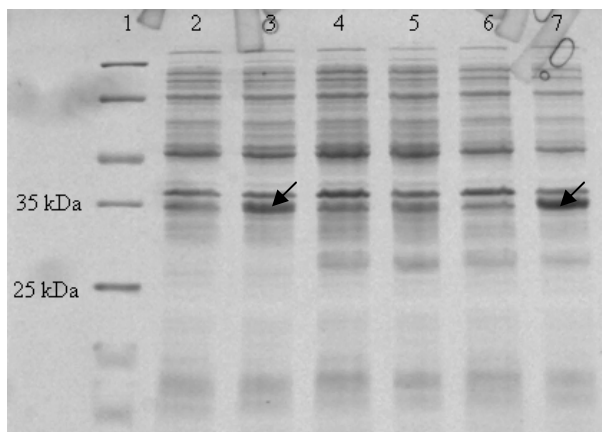
Konstruktai nusekvenuoti iš abiejų įklonuoto intarpo galų: nuo intarpo priekyje esančios vektoriaus T7 promotorinės sekos bei nuo intarpo pabaigoje esančios T7 terminatoriaus sekos. Gauti duomenys buvo apibendrinti ir gautos sekos palygintos su žmogaus laukinio tipo CAIV seka iš UniProt duomenų bazės. Sekos sutapo, mutacijų nebuvo.

Rekombinantinės CAIV(19–312 a. r.) raiška *E. coli* kamienuose. Siekiant surasti optimalias rekombinantinio pET15–6xHis–CAIV(19–312 a. r.) ir pET21a–CAIV(19–

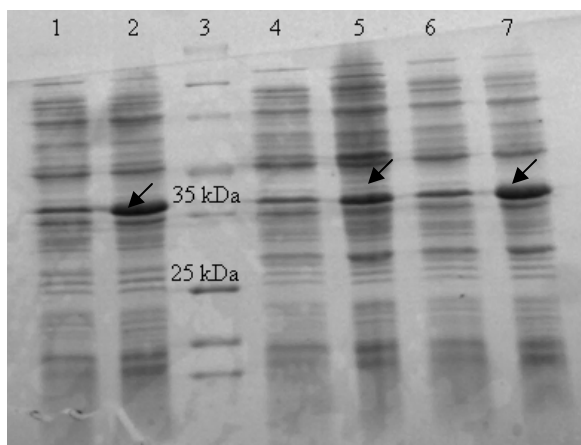
312 a. r.) konstruktų koduojamo baltymo raiškos sąlygas, išbandyti 4 *E. coli* raiškos kamienai: BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)CodonPlus–RIL ir Rosetta2(DE3). Visi kamienai auginti LB terpėje. Tikslinio baltymo indukcijos metu į terpę pridėta 0,5 mM ZnSO₄ ir 1 mM IPTG. Po indukcijos ląstelės 4 val. auginamos +30 °C temperatūroje. Geno raiška gauta auginant pET15–6xHis–CAIV(19–312 a. r.) konstruktą transformuotas *E. coli* BL21(DE3) ir BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląsteles. Didžiausia CAIV(19–312 a. r.) raiška užfiksuota *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus–RIL kamienne. 20 paveiksle pateiktas tikslinio pET15b–6xHis–CAIV(19–312 a. r.) konstrukto koduojamo baltymo elektroforezės poliakrilamido gelyje vaizdas.

21 paveiksle matomas pET21a–CAIV(19–312 a. r.) koduojamo baltymo elektroforezės vaizdas. Geno raiška matoma auginant pET21a–CAIV(19–312 a. r.) konstruktą transformuotas trijų kamienų ląsteles: BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)CodonPlus–RIL. Didžiausia pET21a–CAIV(19–312 a. r.) koduojamo baltymo geno raiška užfiksuota *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus–RIL kamienne.

Nepriklausomai nuo to, kokių konstrukto buvo transformuotos, Rosetta2(DE3) ląstelės nepasiekė indukcijai reikalingo optinio tankio.



20 pav. *E. coli* baltymų elektroforezės vaizdas poliakrilamido gelyje (rodyklės rodo apie 33 kDa dydžio rekombinantinę CAIV(19–312 a. r.)). **1 takelis** – baltymų dydžio žymuo; **2 takelis** – BL21(DE3) ląstelių lizatas prieš CAIV geno raiškos indukciją; **3 takelis** – BL21(DE3) ląstelių lizatas po CAIV geno raiškos indukcijos; **4 takelis** – BL21(DE3)pLysS ląstelių lizatas prieš CAIV geno raiškos indukciją; **5 takelis** – BL21(DE3)pLysS ląstelių lizatas po CAIV geno raiškos indukcijos; **6 takelis** – BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląstelių lizatas prieš CAIV geno raiškos indukciją; **7 takelis** – BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląstelių lizatas po CAIV geno raiškos indukcijos.



21 pav. *E. coli* baltymų elektroforezės vaizdas poliakrilamido gelyje (rodyklės rodo apie 33 kDa rekombinantinę CAIV(19–312 a. r.)). **1 takelis** – BL21(DE3) ląstelių lizatas prieš CAIV geno raiškos indukciją; **2 takelis** – BL21(DE3) ląstelių lizatas po CAIV geno raiškos indukcijos; **3 takelis** – baltymų dydžio žymuo; **4 takelis** – BL21pLysS ląstelių lizatas prieš CAIV geno raiškos indukciją; **5 takelis** – BL21(DE3)pLysS ląstelių lizatas po CAIV geno raiškos indukcijos; **6 takelis** – BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląstelių lizatas prieš CAIV geno raiškos indukciją; **7 takelis** – BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląstelių lizatas po CAIV geno raiškos indukcijos.

pET15b–6xHis–CAIV(19–312 a. r.) koduojamas baltymas buvo išgrynintas j. m. d. Vilmos Michailovienės. Deja, atlikus matavimus terminio poslinkio būdu su sulfonamidiniais slopikliais TFMSA ir EZA paaiškėjo, kad baltymas su jais nesijungia. Matavimus atliko dr. Asta Zubrienė.

Kitas CAIV(19–312 a. r.) baltymas, gautas transformavus pET21a–CAIV(19–312 a. r.) konstruktu *E. coli* ląsteles, nebuvo grynintas. Buvo nuspręsta verčiau grįžti prie konstrukto be signalinės sekos ir C galinio peptido ir pabandyti jį auginti ir gryninti kitomis, W. Vernier pasiūlytomis ir mūsų modifikuotomis, sąlygomis. Auginimo sąlygos aprašytos 3.1 poskyryje.

IV. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. Rekombinantinių CAIV konstrukto kūrimas

Pagal UniProt duomenų bazėje pateiktus žmogaus CAIV laukinio tipo baltymo (P22748) duomenis, CAIV propeptidą sudaro 312 aminorūgštys. CAIV tretinės struktūros formavimui svarbūs Cys24 ir Cys36 bei Cys46 ir Cys229. Per juos baltymo viduje susiformuoja du disulfidiniai tiltai. Propeptidui bręstant pašalinama N galo signalinė seka (1–18 a. r.) ir C galinis peptidas (285–312 a. r.). Tai padeda baltymui įgauti teisingą konformaciją, turi įtakos jo aktyvumui. Kadangi tokios potransliacinės modifikacijos prokariotų ląstelėse nevyksta, buvo nuspręsta sukurti rekombinantinį baltymą be signalinės sekos ir be C galinio peptido, t. y. nuo 19 iki 284 aminorūgšties, o gautą rekombinantinį baltymą gaminti *E. coli* ląstelėse. Panašiai aktyvų rekombinantinį baltymą gavo W. Vernier su kolegomis (Vernier ir kiti, 2010). Mokslininkai matavo baltymo jungimąsi su slopikliais. Tarp jų nebuvo EZA ir TFMSA, naudojamų mūsų tyrimuose, todėl matavimų rezultatų palyginti negalima. Paaiškėjus, kad baltymas be C galinio peptido sudaro dimerą, buvo nuspręsta sukurti rekombinantinį baltymą be signalinės sekos, bet su C galiniu peptidu.

Norint palengvinti gauto rekombinantinio CAIV baltymo gryninimą bei šiek tiek padidinti jo tirpumą, sutrumpintas CAIV genas buvo sulietas su pET15b vektoriuje 6 His koduojančia DNR seka. Dėl šios priežasties rekombinantinė CAIV (19–284 a. r.) ir vienas iš CAIV(19–312 a. r.) baltymų N gale turi 6 His bei 13 vektoriaus koduojamų aminorūgščių.

Viena iš pET vektoriaus pasirinkimo priežasčių – šie vektoriai pritaikyti kamienų, turinčių lizogeninį λ profagą (DE3) transformavimui. Be to, naudojant pET vektorius lengva indukuoti baltymo sintezę ir prikabinti prie baltymo papildomas žymes, pavyzdžiui, minėtą His uodegėlę.

pET15b vektoriaus kirpimui buvo pasirinktos NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazės, nes įstačius CAIV geno fragmentą į šių restrikcijos endonukleazių perkirptą vektorių, po transliacijos gaunamas rekombinantinis baltymas su N gale prijungta 6 His uodegėle. Yra žinoma, kad baltymo savybės gali skirtis priklausomai nuo to, N ar C gale yra His uodegėlė. Iš vienos pusės, būdama balastine aminorūgščių seka baltymo N gale, 6 His uodegėlė gali trukdyti natūraliai vykstančiam baltymo susisukimui šiam slenkant nuo ribosomos, tad atrodytų, kad išmintingiau būtų ją kabinti C gale, kuris susintetinamas tikslinio baltymo sintezės pabaigoje ir nebeturėtų trukdyti jam susivynioti. Kita vertus, gali būti, kad kaip tik tai, kad baltymo transliacijos pradžioje pirmiausia sintetinama 6 His uodegėlė, padidina baltymo tirpumą, stabilumą, neleidžia jam negrįžtamai agreguotis. Kai uodegėlė

sintetinama baltymo transliacijos pabaigoje, prieš ją susintetintas baltymas gali iš karto susilankstyti į netinkamą tretinę struktūrą. Tada bet kokių tirpumą didinančių peptidų naudojimas praranda prasmę (Dyson ir kiti, 2004). Kiekvienas rekombinantinis baltymas yra labai individualus, todėl pradedant klonavimą neįmanoma teoriškai pasakyti, N ar C gale geriau His uodegėlę kabinti konkrečiam baltymui (Dan ir kiti, 2009). Kuriant pET5b–6xHis–CAIV(19–384 a. r.) ir pET15b–6xHis–CAIV(19–312 a. r.) konstruktus His uodegėlės vieta buvo pasirinkta remiantis laboratorijoje anksčiau sukurtais CA konstruktais – dauguma jų turi His uodegėlę N gale. Kadangi atliekant eksperimentus bakalauro darbui pET21a–CAIV(19–312 a. r.) konstruktas be His sekos nebuvo išgrynintas dėl afininės chromatografijos brangumo ir ypatingo gryninimo poreikio nebuvimo, negalima pasakyti, ar šiuo atveju 6 His seka turi įtakos baltymo funkcijai, tačiau gryninant tą patį baltymą metalochelatinės ir afininės bei jonų mainų chromatografijos būdais atsirado didelis koncentracijų skirtumas. Metalochelatinės chromatografijos, kurią atlikti galima dėl esančios His sekos, būdu išgryninto baltymo koncentracija buvo beveik 5 kartus didesnė nei tą patį baltymą išgryninus afininės ir jonų mainų chromatografijos būdais (atitinkamai 0,92 mg/ml ir 0,2 mg/ml).

pET21a vektoriaus konstravimui buvo pasirinktos tos pačios restrikcijos endonukleazės. Kadangi visi trys sukurti konstruktai (pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.), pET15b–6xHis–CAIV(19–312 a. r.) ir pET21a–CAIV(19–312 a. r.)) neturi signalinės sekos ir CAIV rekombinantiniai baltymai prasideda nuo toje pačioje padėtyje esančios aminorūgšties, jų padauginimui PGR metu buvo naudojamas tas pats tiesioginis pradmuo, turintis NdeI kirpimo vietą. XhoI fermentas buvo pasirinktas todėl, kad šios dvi restrikcijos endonukleazės tinkamos naudoti kartu: jos abi aktyvios 1x Tango buferyje, sutampa jų inkubavimo temperatūra ir laikas. pET21a–CAIV(19–312 a. r.) koduojamas baltymas neturi jokių papildomų aminorūgščių. Jį sunkiau gryninti, tačiau jis panašesnis į natyvų baltymą.

4.2. Rekombinantinės CAIV raiška *E. coli* ląstelėse

Biomasės auginimas W. Vernier pasiūlytu būdu. Kadangi gryninimas W. Vernier ir jo kolegų pasiūlytu metodu buvo sėkmingas, buvo nuspręsta pabandyti užauginti biomasę jų pasiūlytu metodu. Tačiau visiškai nebuvo pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.) geno raiškos. Manau, kad pagrindinė raiškos nebuvimo priežastis – inokuliacijos metu dedamas didelis ląstelėms toksiško ZnSO₄ kiekis (0,8 mM). Kadangi iki tikslinio baltymo indukcijos IPTG bakterijos CAIV(19–284 a. r.) nesintetina, Zn²⁺ terpėje nereikalingas. Šio metalo jonai toksiškai veikia *E. coli* ląsteles, sekina jas ir stabdo augimą. Po indukcijos IPTG

ląstelės tikriausiai nebeturi vidinių resursų baltymo sintezei, nes visa energija skiriama ląstelių gyvybinei veiklai palaikyti.

Atliekant tikslinio baltymo raiškos indukciją pagal W. Vernier ir jo kolegų šios procedūros aprašymą, į terpę buvo pridėta neįprastai mažai IPTG, 10 kartų mažiau nei paprastai dedama auginant ląsteles mūsų laboratorijoje. Galbūt IPTG neužteko, kad baltymas būtų sintetinamas pilnu pajėgumu.

W. Vernier metodo modifikavimas. Negavus tikslinio baltymo raiškos, W. Vernier ir kolegų pasiūlytas ląstelių auginimo ir tikslinio baltymo raiškos būdas buvo pakeistas mūsų laboratorijoje dažniausiai naudojamomis sąlygomis, sumažinant ZnSO_4 kiekį bei padidinant IPTG koncentraciją. Auginimas $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 20 val (W. Vernier metodas) padidino geno raišką lyginant su auginimu 4 val $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje (įprastas, mūsų laboratorijoje taikomas auginimo būdas). Viena iš auginimo problemų yra tai, jog nėra duomenų, kiek laiko užtrunka baltymo susivyniojimas į natyvią struktūrą žmogaus organizme ir kiek laiko tai vyksta *E. coli* ląstelėse. Gali būti, kad, kai ląstelėse, auginamose 4 val $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje su dideliu kiekiu IPTG, baltymas sintetinamas labai greitai, jis nespėja įgauti tinkamos tretinės struktūros.

Geno raiškos priklausomybė nuo IPTG koncentracijos. Yanina Sevast'syanovich su kolegomis atliko nemažą tyrimą bandydami išsiaiškinti, kokią įtaką baltymo geno raiškai turi IPTG kiekis, nes įvairių genų raiškos indukcijai naudojamas skirtingos IPTG koncentracijos, dažniausiai 0,1–1 mM. Savo tyrime jie indukavo baltymą koduojančio geno raišką su 0,5 mM IPTG. Baltymas buvo auginamas *E. coli* BL(21)DE3 kamienne iš pradžių $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$, o po indukcijos $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 30 val. Buvo pastebėta, kad staigi baltymo sintezė vyksta 2–4 val po indukcijos, o po to sustoja, nes staiga prasidėjusi intensyvi T7 polimerazės veikla, kuri yra indukcijos rezultatas, sukelia ląstelėms šiluminį šoką. Kai augimas sustojęs, susidaręs baltymas sudaro netirpius kūnelius. Galiausiai augimas atsistato, tačiau daugelis užaugusių bakterijų nebeturi plazmidės. Dar prieš indukciją dalis bakterijų atsitiktinai „pameta“ plazmidę, tačiau tokių bakterijų būna nedaug. Po indukcijos jos nesusiduria su šiluminiu šoku, su kuriuo susiduria plazmidę turinčios bakterijos, todėl auga greičiau ir pradeda dominuoti. Autoriai nusprendė, kad jų naudota 0,5 mM IPTG koncentracija yra per didelė. Mes naudojome 1 mM IPTG CAIV sintezės indukcijai auginant 20 val. Tai 2 kartus daugiau už Y. Sevast'syanovich ir kolegų naudotą kiekį, kuris buvo per didelis, ir 10 kartų daugiau už W. Verner ir kolegų pasiūlytą IPTG koncentraciją. Galbūt reikėtų išbandyti tarpines IPTG koncentracijas, pavyzdžiui, pabandyti indukuoti pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.) geno raišką pridėjus į terpę 0,5 mM IPTG.

Studijuojant Y. Sevastsyanovich darbą kyla vienas klausimas – kaip plazmidę praradusios *E. coli* ląstelės auga selektyvioje terpėje su antibiotikais? BL21(DE3) transformantų selektyviam augimui mes naudojame ampiciliną, kurio koncentracija terpėje yra 100 µg/ml. *E. coli* BL21(DE3) kamienas neturi atsparumo šiam antibiotikui, jį turi vektorius. Todėl plazmidės „pametusios“ ląstelės turėtų neaugti, bakterijų optinis tankis turėtų mažėti, o to nebuvo pastebėta.

Galbūt bakterijų augimo priežastis yra ta, kad augdamos jos skaido ampiciliną. Mes žinome, kad pradinė ampicilino koncentracija yra 100 µg/ml, tačiau nežinome, kokia jo koncentracija ląstelių augimo pabaigoje. Jeigu ampicilinas suskaidomas gana greitai, terpėje gali pradėti augti ir atsparumo antibiotikams neturinčios ląstelės. Tuomet pamatavus optinį tankį atrodo, kad biomasės labai daug, o baltymą koduojančio geno raiškos nematyti, kaip kad teigiama Y. Sevastsyanovich ir kolegų straipsnyje.

Geno raiškos priklausomybė nuo ZnSO₄ koncentracijos. Cinko kiekis rekombinantinėje CAIV(19–284 a. r.), gautoje auginant ląsteles terpėje su 0,5 mM ZnSO₄ buvo patikrintas prof. habil. dr. Stasio Tautkaus iš VU Chemijos fakulteto Analizinės ir aplinkos chemijos katedros. Baltymo koncentracija buvo lygi Zn²⁺ koncentracijai, vadinasi, kiekviena CAIV(19–284 a. r.) molekulė savo aktyviajame centre turi Zn²⁺, todėl reikia manyti, kad į terpę dėti 0,8 mM ZnSO₄, kaip siūlo W. Vernier, netikslinga.

Geno raiškos priklausomybė nuo temperatūros. Germán Rosano ir Eduardo Ceccarelli atkreipė dėmesį, kad baltymų sintezė aukštoje temperatūroje vyksta pernelyg greitai ir už tinkamą baltymo susilankstymą atsakingi transliacijos veiksniai nespėja padėti baltymui įgauti tinkamos tretinės struktūros. Nick Berrow su kolegomis taip pat siūlo auginti *E. coli* ląsteles +20 °C ar net +17 °C. Šiame darbe ląstelės po indukcijos buvo auginamos tik dvejose temperatūrose: +30 °C ir +20 °C, nors bakterijos gana dažnai auginamos ir +25°C bei +16°C temperatūrose (Berrow ir kiti, 2006; Sevastsyanovich ir kiti, 2010).

Geno raiškos priklausomybė nuo kamieno. BL21(DE3) ląstelių biomasė augo greičiausiai nepriklausomai nuo to, koku konstruktu šis kamienas buvo transformuotas, tačiau greitas augimas ne visada lėmė didžiausią CAIV geno raišką. Auginant transformuotas BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS ir BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląsteles 4 val +30 °C temperatūroje, geno raiška buvo didžiausia transformavus CAIV BL21(DE3)CodonPlus–RIL kamieną, todėl jis buvo pasirinktas auginti biomasę baltymo gryninimui. Galbūt taip yra todėl, kad CAIV geno sekoje yra AGA, AGG, ATA kodonų, todėl šiuos kodonus atpažįstančių papildomų tRNR kodavimas BL21(DE3)CodonPlus kamienne pagerina tikslinio baltymo sintezę.

Auginant CAIV W. Vernier pasiūlytu būdu pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.) buvo transformuotas tik BL21(DE3) kamienas, nes šį kamieną naudojo W. Vernier, o mes stengiamės gauti baltymą kiek įmanoma panašesnėmis sąlygomis. Geno raiška naudojant BL21(DE3)CodonPlus–RIL kamieną nebuvo tikrinama, tačiau patirtis rodo, kad ji tikriausiai būtų didesnė.

N. Berrow ir jo kolegos pažymi labai svarbų dalyką: kiekvienas *E. coli* kamienas turi optimalią augimo temperatūrą ir ieškant geriausių sąlygų baltymą koduojančio geno raiškai reikėtų išbandyti kiek įmanoma daugiau kamienų ir temperatūrų variantų, kas nebuvo padaryta šiame darbe. Be to, jie atkreipia dėmesį, kad auginimo terpė neturi didelės įtakos baltymo geno raiškai ar jo tirpumui (Berrow ir kiti, 2006).

Išvados. Palyginus visų trijų: pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.), pET15b–6xHis–CAIV(19–312 a. r.) ir pET21a–CAIV(19–312 a. r.) konstruktų genų raišką tiek mano darbe, tiek W. Vernier ir kolegų naudotomis ląstelių auginimo bei tikslinio geno raiškos sąlygomis, matyti, jog pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.) raiška buvo didžiausia. Tam galėtų būti kelios priežastys. Galbūt nenukirptas C galinis peptidas, esantis pET15b–6xHis–CAIV(13–312 a. r.) ir pET21a–CAIV(19–312 a. r.) konstruktuose, trukdo baltymui įgauti tinkamą tretinę struktūrą. Galbūt darbo metu nepavyko rasti tinkamų sąlygų minėtų konstruktų geno raiškai, nes darbe buvo išbandyta mažai sąlygų palyginus su tuo, kokią įvairovę siūlo straipsnių autoriai.

Apžvelgus kelių autorių darbus galima padaryti išvadą, kad didelę įtaką baltymo geno raiškai ir tirpumui daro temperatūra, kurioje ląstelės auginamos po indukcijos, ir laikas, skirtas baltymo tretinės struktūros įgijimui po indukcijos. Kuo žemesnė temperatūra ir kuo ilgesnis laikas, tuo didesnė tikimybė, kad bus gautas tirpus tinkamos tretinės struktūros baltymas. Be to, funkcionalaus baltymo gavimui svarbi geno kirpimo vieta. pET15b–6xHis–CAIV(19–312 a. r.) konstruktas nuo pET15b–6xHis–CAIV(19–284 a. r.) konstrukto skiriasi tik tuo, jog pirmasis turi 28 C galines aminorūgštis koduojančią seką. To pakanka, kad šis baltymas nesijungtų su slopikliais.

IŠVADOS

- Nustatyta, jog tirpi ir su slopikliais besijungianti CAIV gaunama sukonstravus rekombinantinį CAIV baltymą nuo 19 iki 284 aminorūgšties, turintį 266 a. r. ilgio katalitinį domeną, neturintį N gale signalinės sekos ir C galinio propeptido. Rekombinantinio baltymo gryninimui N gale prikabinta 6 histidinių seka.
- Nustatyta, jog tirpi ir su slopikliais besijungianti CAIV gaunama *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus–RIL kamieno ląstelėse, jas auginant LB terpėje su 0,5 mM ZnSO₄, 4 val +30 °C temperatūroje po tikslinio baltymo raiškos indukcijos 1 mM IPTG.

ŽMOGAUS REKOMBINANTINĖS KARBOANHIDRAZĖS IV GAVIMAS

Bakalauro darbas

Aurelija Mickevičiūtė

Vilniaus Universitetas

Gamtos mokslų fakultetas

SANTRAUKA

Bakalaurinio darbo metu buvo siekiama sukurti ir išgryninti žmogaus rekombinantinę karboanhidrazę IV (CAIV), kuri būtų tinkama tolesniems laboratorijoje vykdomiems biofizikiniams baltymo – ligando sąveikos tyrimams. Darbo metu buvo eksperimentiškai nustatyta CAIV dalis nuo 19 iki 284 aminorūgšties, reikalinga rekombinantinės CAIV raiškai bei stabilaus baltymo gavimui. Panaudojus rekombinantinės CAIV raiškai įvairius *E. coli* kamienus ir auginimo sąlygas, didžiausia raiška nustatyta BL21(DE3) kamieno, tikslinio baltymo raiškai indukuotas ląsteles auginant 20 val +20 °C temperatūroje LB terpėje su 0,4 mM ZnSO₄ ir 1 mM izopropil-β-D-tiogalaktopiranozido (IPTG). Savo funkcijos nepraradęs baltymas buvo išgrynintas iš *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląstelių, po indukcijos augintų LB terpėje 4 val +30 °C temperatūroje į terpę pridėjus 1 mM IPTG ir 0,5 mM ZnSO₄.

PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN CARBONIC ANHYDRASE IV

Bachelor's Thesis

Aurelija Mickevičiūtė

Vilnius University

Faculty of Nature Science

SUMMARY

The aim of this research project was to clone, express and purify human carbonic anhydrase IV (CAIV), which would be suitable for further biophysical investigation in the Department of Biothermodynamics and Drug Design focusing on protein – ligand interactions. During the experimental phase of this research, it was found out that a portion of CAIV, including amino acids from 19 to 284, is essential for recombinant CAIV expression and protein stability. After using different *E. coli* strains and growing conditions, it was noticed, that the best expression is in BL21(DE3) strain while growing induced cells for 20 hours at +20 °C temperature in LB medium with 0,4 mM ZnSO₄ and 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). An active protein was produced when growing transformed *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus-RIL cells in LB medium for 4 hours at +30 °C after induction with 1 mM IPTG and in the presence of 0,5 mM ZnSO₄.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Baneyx F. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol. 1999; 10: 411–21.
2. Berrow NS, Büssow K, Coutard B, Diprose J, Ekberg M, Folkers GE, Levy N, Lieu V, Owens RJ, Peleg Y, Pinaglia C, Quevillon–Cheruel S, Salim L, Scheich C, Vincentelli R, Busso D. Recombinant Protein Expression and Solubility Screening in *Escherichia coli*: a Comparative Study. Acta Cryst. 2006; 62: 1218–26.
3. Breton S. The Cellular Physiology of Carbonic Anhydrases. JOP. 2001; 2(4): 159–64.
4. 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.
5. Dan H, Balachandran A, Lin M. A Pair of Ligation–Independent *Escherichia coli* Expression Vectors for Rapid Addition of a Polyhistidine Affinity Tag to the N– or C–Termini of Recombinant Proteins. J Biomol Tech. 2009; 20: 241–8.
6. Datta R, Shah GN, Rubbelke TS, Waheed A, Rauchman M, Goodman AG, Katze MG, Sly WS. Progressive Renal Injury from Transgenic Expression of Human Carbonic Anhydrase IV Folding Mutants is Enhanced by Deficiency of p58^{IPK}. PNAS. 2010; 107(14): 6448–52.
7. Datta R, Waheed A, Bonapace G, Shah GN, Sly WS. Pathogenesis of retinitis pigmentosa associated with apoptosis–inducing mutations in carbonic anhydrase IV. PNAS. 2008; 106(9): 3437–42.
8. Dyck MK, Lacroix D, Pothier F, Sirard MA. Making recombinant proteins in animals – different systems, different applications. Trends Biotechnol. 2003; 21(9): 394–99.
9. Dyson MR, Shadbolt SP, Vincent KJ, Parera RL, McCafferty J. Production of Soluble Mammalian Proteins in *Escherichia coli*: Identification of Protein Features that Correlate with Successful Expression. BMC Biotechnol. 2004; 4: 32–49.
10. Durdagi S, Şentürk M, Ekinici D, Balaydın HT, Göksu S, Küfrevioğlu Öİ, Innocenti A, Scozzafava A, Supuran CT. Kinetic and Docking Studies of Phenol–based Inhibitors of Carbonic Anhydrase Isoforms I, II, IX and XII Evidence a New Binding Mode within the Enzyme Active Site. Bioorg Med Chem. 2011; 19: 1381–9.
11. Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, Ponzin D, Sorrentino FS, Parmeggiani F. Retinitis Pigmentosa: Genes and Disease Mechanisms. Curr Genomics. 2011; 12(4): 238–49.
12. Ferry JG. The γ Class of Carbonic Anhydrases. Biochim Biophys Acta. 2010; 1804(2): 1–19.

13. Hammarström M, Hellgren N, Van den Berg S. Rapid Screening for Improved Solubility of Small Human Proteins Produced as Fusion Proteins in *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 2002; 11: 313–21.
14. Huang S, Hainzl T, Grundström C, Forsman C, Samuelsson G, Sauer – Eriksson AE. Structural Studies of α -Carbonic Anhydrase from the Green Alga *Coccomyxa*: Inhibitor Complexes with Anions and Acetazolamide. *PLoS ONE*. 2011; 6(12): 1–13.
15. Kivelä AJ, Kivelä J, Saarnio J, Parkkila S. Carbonic Anhydrases in Normal Gastrointestinal Tract and Gastrointestinal Tumours. *World J Gastroentero.* 2005; 11(2): 155–63.
16. Kivelä J, Parkkila S, Parkkila AK, Leinonen J, Rajaniemi H. Salivary Carbonic Anhydrase isoenzyme VI. *J Physiol.* 1999; 520(2): 315–20.
17. Köhn L, Burstedt MSI, Jonsson F, Kadzhaev K, Haamer E, Sandgren O, Golovleva I. Carrier of R14W in Carbonic Anhydrase IV Presents Bothnia Dystrophy Phenotype Caused by Two Allelic Mutations in RLBP1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(7): 3172–7.
18. Krebs JF, Fierke CA. Determinants of Catalytic Activity and Stability of Carbonic Anhydrase II as Revealed by Random Mutagenesis. *J Biol Chem.* 1993; 268(2): 948–54.
19. 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(3): 946–1051.
20. Li Y, Wang H, Tu C, Shiverick KT, Silverman DN, Frost SC. Role of Hypoxia and EGF on Expression, Activity, Localization and Phosphorylation of Carbonic Anhydrase IX in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813(1): 159–67.
21. Manokaran S, Berg A, Zhang X, Chen W, Srivastava DK. Modulation of Ligand Binding Affinity of Tumorigenic Carbonic Anhydrase XII upon Interaction with Cationic CdTe Quantum Dots. *J Biomed Nanotechnol.* 2008; 4(4): 491–8.
22. Merlin C, Masters M, McAteer S, Coulson A. Why is Carbonic Anhydrase Essential to *Escherichia coli*?. *J Bacteriol.* 2003; 185(21): 6415–24.
23. Paranawithana SR, Tu C, Laipis PJ, Silverman DN. Enhancement of the Catalytic Activity of Carbonic Anhydrase III by Phosphates. *J Biol Chem.* 1990; 265(36): 22270–74.

24. Pastorekova S, Parkkila S, Zavada J. Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance. *Adv Clin Chem.* 2006; 42: 167–216.
25. Prasad S, Khadatare PB, Roy I. Effect of Chemical Chaperones in Improving the Solubility of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(13): 4603–9.
26. Purkerson JM, Schwartz GJ. The Role of Carbonic Anhydrases in Renal Physiology. *Kidney Int.* 2007; 71: 103–15.
27. Rosano GL, Ceccarelli EA. Rare Codon Content Affects the Solubility of Recombinant proteins in a Codon Bias-adjusted *Escherichia coli* Strain. *Microb Cell Fact.* 2009; 8: 41–9.
28. Sevastsyanovich YR, Alfasi SN, Cole JA. Sense and Nonsense from a Systems Biology Approach to Microbial Recombinant protein Production. *Biotechnol Appl Biochem.* 2010; 55: 9–28.
29. Sly WS, Hu PY. Human Carbonic Anhydrases and Carbonic Anhydrase Deficiencies. *Annu Rev Biochem.* 1995; 64: 375–401.
30. Sterling D, Alvarez BV, Casey JR. The Extracellular Component of a Transport Metabolon. *J Biol Chem.* 2002; 277(28): 25239–46.
31. Structural Genomics Consortium, Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, Berkeley Structural Genomics Center, China Structural Genomics Consortium, Integrated Center for Structure and Function Innovation, Israel Structural Proteomics Center, Joint Center for Structural Genomics, Midwest Center for Structural Genomics, Northeast Structural Genomics Consortium, Oxford protein Production Facility, Protein Sample Production Facility, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative, SPINE2–Complexes. Protein production and purification. *Nat Methods.* 2008; 5(2): 135–46.
32. Supuran CT. Bacterial Carbonic Anhydrases as Drug Targets: Toward Novel Antibiotics? *Front Pharmacol.* 2011; 2: 1–6.
33. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7: 168–81.
34. Supuran CT, Scazzafava A, Conway J, editors. Carbonic Anhydrase. 1st ed. Its Inhibitors and Activators. USA: CRC Press LLC; 2004.
35. 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: 3307–19.

36. Waheed A, Okuyama T, Heyduk T, Sly WS. Carbonic Anhydrase IV: Purification of a Secretory Form of the Recombinant Human Enzyme and Identification of the Positions and Importance of Its Disulfide Bonds. *Arch Biochem Biophys*. 1996; 333(2): 432–8.

PADĖKA

Dėkoju dr. Daumantui Matuliui už suteiktą galimybę atlikti bakalauro darbą Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje.

Savo vadovei dr. Vaidai Jogaitei dėkoju už pagalbą, naudingus patarimus ir neišsenkančią kantrybę.

Taip pat dėkoju j. m. d. Jolantai Torresan, j. m. d. Vilmai Michailovienei, dr. Astai Zubienei ir magistrantei Jurgitai Revuckienei už pagalbą eksperimentinio darbo metu bei visam kolektyvui už draugišką ir skatinančią tobulėti aplinką.