



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra

Molekulinės biologijos studijų programos magistrantė

Aurelija MICKEVIČIŪTĖ

Magistro darbas

**Rekombinantinių baltymų, naudojamų kaip terapiniai
taikiniai, gavimas prokariotinėse ir eukariotinėse raiškos
sistemose**

Darbo vadovė

dr. Jurgita Matulienė

Vilnius, 2014

Rekombinantinių baltymų, naudojamų kaip terapiniai taikiniai, gavimas prokariotinėse ir eukariotinėse raiškos sistemose

Darbas atliktas Vilniaus Universiteto Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų
tyrimų skyriuje

Aurelija Mickevičiūtė

Darbo vadovė

Dr. Jurgita Matulienė

Turinys

SUTRUMPINIMAI.....	4
IVADAS	6
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	8
I. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1. Taikinių terapija medicinoje.....	9
1.2. Šiluminio šoko baltymų apžvalga.....	11
1.2.1. Šiluminio šoko baltymų klasifikacija ir veikimo mechanizmas.....	11
1.2.2. Šiluminio šoko baltymas 90 (Hsp90)	13
1.3. Karboanhidrazių apžvalga	17
1.3.1. Karboanhidrazių klasifikacija, veikimo mechanizmas ir paplitimas žmogaus organizme	17
1.3.2. Žmogaus karboanhidrazė IV (CAIV).....	19
1.4. Rekombinantinių baltymų kūrimo strategija	20
II. MEDŽIAGOS IR METODAI	28
2.1. Darbe naudoti prietaisai, medžiagos, tirpalai ir kitos priemonės	28
2.1.1. Naudoti prietaisai.....	28
2.1.2. Naudoti fermentai, rinkiniai ir cheminės medžiagos.....	28
2.1.3. Naudotos terpės ir tirpalai	29
2.1.4. Naudotos kitos priemonės	33
2.2. Metodai.....	36
2.2.1. Rekombinantinių genų klonavimas	36
2.2.2. Rekombinantinių baltymų raiška.....	45
III. REZULTATAI	50
3.1. Rekombinantinio PfHsp90N (1–215 ar.) klonavimas ir raiška	50
3.2. Rekombinantinio PfHsp90N (1–215 ar.) tirpumo tikrinimas ir gryninimas	53
3.3. Rekombinantinės CAIV(19–284 ar.) klonavimas ir raiška	55
3.4. Rekombinantinės CAIV (19–284 ar.) gryninimas.....	58
IV. REZULTATŲ APTARIMAS	59
4.1. PfHsp90 (1–215 ar.) raiška ir gryninimas	59
4.2. CAIV (19–284 ar.) raiška ir gryninimas.....	61
IŠVADOS.....	64
SUMMARY	65
PADĖKA.....	66
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	67

SUTRUMPINIMAI

AA – akrilamidas;

AKT – serino/treonino kinazė;

APS – amonio persulfatas;

aps. – apsisukimai;

ar. – aminorūgštis;

BAA – bisakrilamidas;

BHK – žiurkėno jauniklio inkstų ląstelės;

CA – karboanhidrazė;

CHO – kuniško žiurkėno kiaušidžių ląstelės;

CMV – citomegalo virusas;

CNS – centrinė nervų sistema;

COS-7 – į fibroblastus panašios beždžionės inkstų ląstelės;

Cys – cisteinas;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

dNTP – deoksiribonukleotidas;

DTT – ditioneitolis;

EBNA-1 – Epšteino-Baro viruso branduolio antigenas 1;

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

Fab – antigeną prisijungianti Ig dalis;

FAK – fokalinės adhezijos kinazė;

FDA – Amerikos maisto ir vaistų administracija;

HEK 293-F – žmogaus embriono inkstų ląstelės, pritaikytos augti suspensijoje terpėje be serumo;

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

Her2 – epidermio augimo veiksnio receptoriaus šeimos narys;

His – histidinas;

HsHsp90 – žmogaus šiluminio šoko baltymas 90;

HsHsp90N – žmogaus šiluminio šoko baltymo 90 N galas;

Hsp – šiluminio šoko baltymas;

IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas;

kb – kilobazė;

MES – 2-(N-morfolino)etansulfoninė rūgštis;

MET – tirozino kinazė;

PfHsp90 – *Plasmodium falciparum* šiluminio šoko baltymas 90;
PfHsp90N – *Plasmodium falciparum* šiluminio šoko baltymo 90 N galas;
PIPES – piperazino-N,N'-bis(2-etansulfoninė rūgštis);
PI3K – fosfotidilinozitolio 3 – kinazė;
PGR – polimerazinė grandininė reakcija;
PKR – baltymų kinazė R;
PLK – serino/treonino kinazė;
PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas;
purt. – purtymai;
p53 – navikų supresijos baltymas;
Ras – GTPazinį aktyvumą turintis baltymas;
Raf – serino/treonino kinazė;
RIP – su receptoriais sąveikaujančių baltymų kinazės;
SDS – natrio dodecilsulfatas (*angl. sodium dodecyl sulfate*);
S. O. C. – optimali mitybinė terpė (*angl. Super Optimal broth with Catabolite repression*);
SV40 – beždžionių virusas 40;
TAE – buferis (*angl. Tris–acetate–EDTA*);
TEMED – tetrametiletilendiaminas;
TK – timidino kinazė;
TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis.

IVADAS

Nors mokslas sparčiai vystosi, XXI amžiuje kai kurios ligos vis dar neišgydomos. Šiuo metu stengiamasi ne palengvinti ligos simptomus, o rasti ir pašalinti ligos priežastis, taip užkertant kelią ligos atsinaujinimui. Vieni iš ligos eigai įtakos turinčių veiksnių gali būti ir organizme svarbias funkcijas atliekantys baltymai, tokie kaip karboanhidrazės (CA) ar šiluminio šoko (Hsp) baltymai.

CA – tai fiziologiškai svarbūs fermentai, kurie, katalizuodami grįžtamą CO₂ hidrataciją, palaiko pastovų terpės pH, dalyvauja jonų mainų reakcijose ir daugelyje kitų gyvybiškai svarbių procesų. Jos randamos visuose gyvuose organizmuose bei visuose daugialąsčių organizmų audiniuose ir ląstelėse.

Hsp – tai visuose gyvuose organizmuose randami baltymai, kurie padeda kitiems baltymams įgauti tinkamą tretinę ir ketvirtinę struktūrą, reguliuoja genų raišką ir yra reikalingi baltymo–baltymo sąveikai, signaliniams keliams (Corbett ir Berger, 2010).

Dėl didelio paplitimo ir svarbos minėti baltymai dažnai turi įtakos daugybės ligų eigai – nuo virškinimo sistemos sutrikimų iki onkologinių susirgimų. Pavyzdžiui, daugelyje navikų nustatyta padidėjusi CAIX ir CAXII raiška. Šios CA padeda augliui kovoti su hipoksija. Dėl savo didelės svarbos ląstelių proliferacijoje ir signaliniuose keliuose Hsp90 plačiai tiriamas kaip taikinyς gydant onkologinius susirgimus. Žinoma, kad kai kurios natūralios medžiagos, pavyzdžiui, geldanamycinas ir radisikolis, slopina Hsp90 veiklą, o geldanamicino sintetinis analogas 17–(alilamino)–17–demetoksigeldanamycinas (17–AAG) šiuo metu yra klinikinių tyrimų stadijoje. Gauti daug žadantys rezultatai, todėl šią veikliąją medžiagą tikimasi panaudoti kuriant vaistus nuo įvairių onkologinių ligų (Corbett ir Berger, 2010).

Hsp baltymų slopiklius galima naudoti ir kovojant su parazitų sukeltomis infekcijomis. Vienas iš panaudojimo būdų – maliarijos gydymas slopinant *Plasmodium falciparum*, maliariją sukeliančio pirmuonio, Hsp90 aktyvumą ir taip neleidžiant jam vystytis.

Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje bandoma kurti Hsp90 ir CA aktyvumo slopiklius, kurie galėtų būti panaudoti kaip veiklioji medžiaga vaistų kūrime. Baltymų ir slopiklių sąveikos tyrimams reikia didelių kiekių išgrynintų baltymų. Jų gavimas – nemenka problema. Naudoti iš gamtinių šaltinių išskirtus baltymus būtų labai brangu, o kai kuriais atvejais – ir neetiška, ypač dirbant su žmogaus baltymais. Viena iš alternatyvų – rekombinantinių baltymų kūrimas. Toks sprendimas šiuo metu yra vienas geriausių, nes, parinkus tinkamus vektorius, raiškos šeimininkus ir jų auginimo sąlygas, galima greitai ir

gana nebrangiai gauti didelius kiekius funkciškai aktyvių baltymų. Taigi labai svarbu kiek įmanoma labiau optimizuoti rekombinantinių baltymų gavimą.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas:

Gauti rekombinantinius *Plasmodium falciparum* šaperono Hsp90 N galo domeną ir žmogaus CAIV katalitinį domeną.

Darbo uždaviniai:

- Klonuoti rekombinantinius *Plasmodium falciparum* šaperono Hsp90 N galo domeną ir žmogaus CAIV katalitinį domeną koduojančias genų dalis.
- Surasti optimalias sąlygas rekombinantinių *Plasmodium falciparum* šaperono Hsp90 N galo domeno raiškai *Escherichia coli* ir žmogaus CAIV katalitinio domeno raiškai žmogaus HEK 293–F ląstelių linijoje.
- Išgryninti baltymus.

I. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Taikinių terapija medicinoje

Paul Ehrlich – pirmasis žmogus, XIX a. aprašęs selektyvų molekulių patekimą į audinius. Jis aprašė šoninių grandinių teoriją, kuri davė pradžią antigeno – antikūno sąveikos supratimui. Šios žinios vėliau pasitarnavo monokloninių antikūnų atradimui ir taikinių terapijos, kuriai naudojami monokloniniai antikūnai ir mažos slopiklių molekulės, atsiradimui (Gerber, 2008; Dietrich ir Antoniades, 2012). Šiai terapijai naudojami vaistai, kurie atrankiai sąveikauja su konkrečiu taikiniu, dažniausiai baltymu, sukėlusiu ligą arba turinčiu įtakos ligos eigai. Šis baltymas dažniausiai yra augimo veiksnys ar jo receptorių, signalinio kelio arba ląstelės ciklo baltymas, apoptozės mediatorius. Vėžio atveju tai gali būti baltymai, svarbūs vėžinių ląstelių plitimui arba angiogenezei (Dietrich ir Antoniades, 2012).

Taikinių terapija ypač plačiai tiriama kaip onkologinių ligų gydymo būdas. Ši terapija ne tik prailgina sergančiųjų gyvenimą, bet ir suteikia viltį žmonėms, kuriems anksčiau nebūtų taikytas joks gydymas. Pavyzdžiui, vyresnio amžiaus onkologiniams ligoniams chemoterapija netaikoma dėl didžiulio šalutinio poveikio, tačiau juos galima gydyti geriau toleruojamais antikūnais ir slopikliais. Iš 20 naujų vaistų vėžio gydymui, kuriuos nuo 2000 m. patvirtino Amerikos maisto ir vaistų administracija (FDA), 15 yra skirti taikinių terapijai ir tik 5 – chemoterapijai. Šiuo metu taikinių terapija taikoma gydant krūties, žarnyno, plaučių, kasos vėžį, taip pat limfomą, leukemiją, daugybinę mielomą (Gerber, 2008).

Taikinių terapija atvėrė naują – pacientui individualiai pritaikytų vaistų – erą, nes vaistai skirti slopinti konkrečią ligą sukėlusio baltymo aktyvumą, o tą pačią ligą gali sukelti skirtingos priežastys. Pavyzdžiui, „Herceptin“ yra efektyvus vaistas 25% krūties vėžio atvejų. Kitais atvejais šis vaistas neskiriamas. Bene didžiausias tokio gydymo privalumas – mažesnis šalutinis poveikis ir geresni gydymo rezultatai. Tačiau šis gydymas brangesnis už chemoterapiją, todėl šiuo metu neskiriamas visiems pacientams. Be to, kai kurie vaistai slopiklių pagrindu dar nauji, nėra pakankamai žinių apie galimą ilgalaikį šalutinį poveikį (Gerber, 2008).

Slopikliai ir antikūnai skiriasi keliomis svarbiomis savybėmis. Slopikliai dažniausiai yra geriami, o ne leidžiami, todėl žmonėms nereikia vykti į gydymo įstaigą. Tačiau monokloninių antikūnų gyvavimo pusperiodis yra ilgesnis nei slopiklių ir antikūnus suleisti reikia kas vieną – keturias savaites, o slopiklius reikia gerti kasdien. Slopikliai gaminami chemijos pramonėje, o tai yra žymiai pigiau nei gaminti monokloninius antikūnus bioinžinerijos būdu. Tačiau jų specifiskumas mažesnis nei monokloninių antikūnų. Be to,

daugelis slopiklių yra metabolizuojami citochromo P450 fermentų, todėl, priešingai nei monokloniniai antikūnai gali sukelti nepageidaujamas reakcijas, jeigu vartojami kartu su kitais vaistais (Gerber, 2008).

Vieni pirmųjų vaistų, sukurtų taikinių terapijai, buvo antikūnai prieš ląstelių paviršiaus žymenis CD20, CD33, CD52, skirti gydyti limfomą ir leukemiją. Kadangi CD20 randamas ir normaliose limfoidinėse ląstelėse, prieš jį nukreiptas antikūnas veikia visą imuninę sistemą. Šiuo metu vaistas „Rituxan“, kurio veiklioji medžiaga yra antikūnas prieš CD20, naudojamas gydyti autoimunines ligas, pavyzdžiui, reumatoidinį artritą, taip pat ne Hodžkino limfomą (Gerber, 2008).

1986 m. FDA patvirtino pirmąjį monokloninį antikūną muromonabą–CD3, kuris blokuoja T ląstelių funkciją ir apsaugo nuo organų atmetimo po transplantacijos. Nuo tada buvo patvirtinta apie 20 monokloninių antikūnų, pusė iš jų skirti vėžio gydymui. Monokloninių antikūnų Fab fragmentai, kurie atpažįsta antigeną ir prisijungia prie jo, yra atsakingi už šioms terapijoms būdingą itin didelį specifiškumą. Monokloninių antikūnų gebėjimas kovoti su liga pasireiškia keliais mechanizmais. Jie aktyvina šeimininko imunines funkcijas prieš taikinio ląstelę, prisijungia prie receptoriaus arba ligando ir taip blokuoja ląstelių išgyvenimui būtinas signalines kaskadas arba yra nešikliai medžiagoms, kurios nužudo antikūno atpažintą ląstelę. Monokloninių antikūnų minusas yra tai, kad juos tenka leisti intraveniniu būdu, nes šie baltymai būtų denatūruoti skrandyje. Kadangi antikūnai nemetabolizuojami kepenyse, beveik nepastebima sąveikų su kitais pacientų vartojamais vaistais (Gerber, 2008). Tačiau dėl savo dydžio antikūnai negali patekti į tam tikras organizmo vietas, pavyzdžiui, CNS (Dietrich ir Antoniadēs, 2012). Tokiais atvejais geriau naudoti slopiklius.

Maži slopikliai dažniausiai sąveikauja su signaliniuose keliuose dalyvaujančiais baltymais ir blokuoja jų reguliuojamus signalinius kelius. Vienas pirmųjų ir efektyviausių slopiklių – 2002 m. lėtinės mieloidinės leukemijos gydymui patvirtintas imatinibas. Šis vaistas slopina Filadelfijos chromosomos tirozino kinazę ir tinka 98% pacientų (Gerber, 2008). Imatinibas sukėlė tikrą leukemijos gydymo revoliuciją, paversdamas mirtiną susirgimą lėtine liga (Danisz ir Blasiak, 2013). Ypač aktyviai kuriami slopikliai prieš PI3K, nes šio baltymo signalinių kelių reguliavimo sutrikimų aptinkama trečdalyje žmogaus navikų (Akinleye ir kiti, 2013). Be šio baltymo, ieškoma slopiklių, galinčių slopinti Ras ir B–Raf baltymų aktyvumą. Šie baltymai dalyvauja daugelyje vėžinėse ląstelėse veikiančių signalinių kelių. Ras slopikliai šiuo metu tiriami su pelėmis, tuo tarpu B–Raf slopikliai jau taikomi gydant melanomą ir kepenų ląstelių karcinomą. Gydant pastarąją ligą šis slopiklis – vienas iš nedaugelio efektyvių vaistų (McCubrey ir kiti, 2012). Slopikliai gali padėti kovoti su vėžio

gydymo eigoje atsirandančiu atsparumu chemoterapijai. Šį atsparumą dažniausiai sukelia epigenetiniai pokyčiai, todėl šiuo metu kuriami slopikliai, kurių taikyns – už epigenetinius pokyčius atsakingi baltymai, pavyzdžiui, histonų deacetilazės. Šių baltymų raiška padidėja daugelyje navikų ir yra siejama su prastomis gydymo prognozėmis. Histonų deacetilazių slopiklius planuojama naudoti kartu su kitais gydymo būdais, pavyzdžiui, radioterapija arba chemoterapija. Kai kurie histonų deacetilazių slopikliai tiriami kaip galimi vaistai nuo astmos ir maliarijos (Hrabeta ir kiti, 2013).

Nors absoliuti dauguma tyrimų atliekami siekiant pažaboti vėžį, slopikliai naudojami ir gydant kitas ligas. Pavyzdžiui, lėtinė obstrukcinė plaučių liga gydoma naudojant fosfodiesterazių slopiklius. Tiesa, šie vaistai turi nemažai šalutinių poveikių (Lee ir kiti, 2013). Taip pat tikimasi, kad slopikliai gali padėti išgydyti diabetinę retinopatiją, vieną dažniausių diabeto komplikacijų. Šiuo metu slopikliai tiriami su žiurkėmis. Nors kelias iki vaisto dar ilgas, turimi rezultatai teikia vilties (Liu ir kiti, 2013). Slopikliai naudojami ir policistinės inkstų ligos gydymui. Šia liga pasaulyje serga apie 12 milijonų žmonių. Nors ligos vien slopikliais išgydyti neįmanoma, jie padeda sustabdyti ligos progresavimą (Helal, 2013). Taip pat kuriami slopikliai Hsp70 baltymui, kuris siejamas su Alzheimerio ir Huntingtono ligomis bei daugeliu vėžio rūšių (Schlecht ir kiti, 2013).

Taigi taikinių terapija – gana nauja, bet sparčiai besivystanti biomedicinos mokslo sritis, galinti pasiūlyti labai specializuotą gydymą su mažesniais šalutiniais poveikiais. Žinoma, tai nėra universalus gydymo būdas nuo visų ligų (kaip nėra ir bet koks kitas gydymo būdas) ir ilgainiui gali išryškėti neigiamų tokio gydymo pasekmių, tačiau, kaip parodė leukemijos gydymo pavyzdys, šiuo metu kai kuriems žmoniams taikinių terapija – skirtumas tarp gyvybės ir mirties. Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje kuriami slopikliai, specifiskai besijungiantys prie žmogaus CA ir Hsp baltymų. Šie baltymai turi įtakos rimtų ir sunkiai pagydomų ligų, tokių kaip vėžys, epilepsija, maliarija, eigai. Tikimasi, kad vieną dieną mūsų slopikliai taps pagrindu vaistams prieš šiuo metu sunkiai įveikiamas ligas.

1.2. Šiluminio šoko baltymų apžvalga

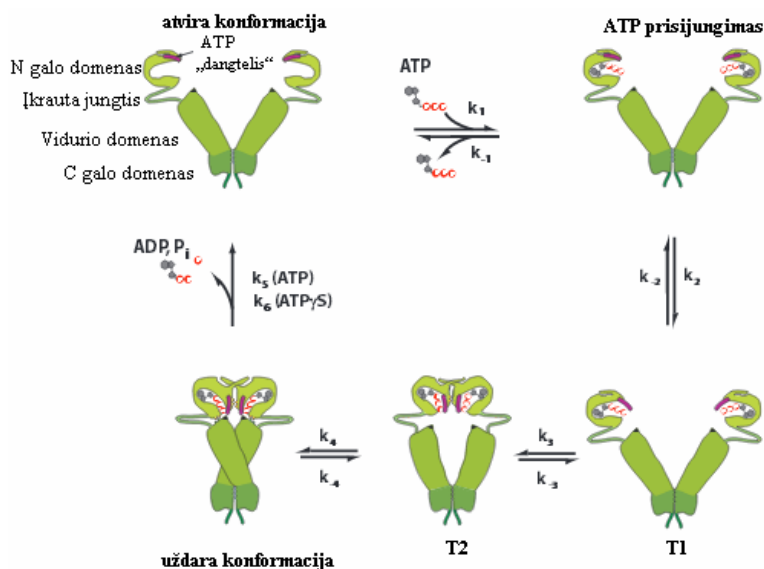
1.2.1. Šiluminio šoko baltymų klasifikacija ir veikimo mechanizmas

Naujai susintetinti baltymai ląstelėje susiduria su sunkia užduotimi – paversti linijinę aminorūgščių seką trijų dimensijų baltymo struktūra. Transliacijos metu molekuliniai šaperonai (Hsp), naudodami ATP hidrolizės energiją, neleidžia agreguoti naujai sintetinamam baltymui ir padeda jam įgauti tinkamą tretinę ir ketvirtinę struktūrą (Yam ir kiti, 2005). Tai

labai konservatyvūs baltymai, randami visuose gyvuose organizmuose. Iš pradžių buvo manoma, kad Hsp sintetinami kaip atsakas į šiluminį arba oksidacinį stresą (Kampinga ir kiti, 2009). Dabar žinoma, kad šie baltymai ne tik padeda baltymams įgauti tinkamą tretinę ir ketvirtinę struktūrą, bet ir reguliuoja genų raišką ir yra reikalingi baltymo–baltymo sąveikai, signaliniams keliams (Corbett ir Berger, 2010; Pallavi ir kiti, 2010).

Hsp skirstomi į 6 šeimas pagal molekulinę masę: didelės (daugiau nei 90 kDa) molekulinės masės Hsp, Hsp90, Hsp70, Hsp60, mažos (mažiau nei 60 kDa) molekulinės masės Hsp ir ubikvitinas. Gausiausios ir konservatyviausios yra Hsp70 ir Hsp60 šeimos. Hsp70 – tai molekulinis šaperonas, antiapoptotinis agentas bei antioksidantas. Jis padeda ląstelėms toleruoti stresą, skatina ląstelių dalinimąsi, ląstelės griaučių formavimąsi, pažaidų taisymą (Li ir kiti, 2011). Skeleto raumenyse Hsp70 reaguoja į streso stimulą, nesvarbu, sukelia jis pažeidimą ar ne. Tai gali būti tiek fizinis krūvis, tiek rimti raumenų sužalojimai. Hsp70 atsakingas už raumenų fibrinių integralumo palaikymą ir skatina raumenų regeneraciją ir atsigavimą. Hsp70 raiška mažėja su amžiumi ir tai gali būti pagrindinė raumenų atrofijos priežastis (Senf, 2013). Hsp60 ir Hsp70 šeimų baltymai aktyvina imuninį atsaką prieš bakterijas ir mikoplazmas (Li ir kiti, 2011). Daugelyje organizmų aptinkami visų Hsp šeimų baltymai, tačiau gali smarkiai skirtis jų skaičius. Pavyzdžiui, žmogus turi 13 Hsp70 šeimos baltymų, o *E. coli* – tik 3. Manoma, kad sudėtingėjant organizmui baltymų daugėja dėl evoliucijos eigoje įvykusių genų duplikacijų (Kampinga ir kiti, 2009).

Visi Hsp baltymai turi N galo ATP prijungiantį ir hidrolizuojantį domeną, vidurio baltymą–substratą prijungiantį domeną ir C galo dimerizacijos domeną. Išskyrus įkrautą jungtį tarp N galo ir vidurinio domenų, Hsp90 struktūra konservatyvi nuo bakterijų iki žmogaus. Be to, ATP prisijungiančiame N galo domene yra iš konservatyvių aminorūgščių sudarytas „dangtelis“, kuris užsidaro, kai prijungiamas ATP. Vidurio domeną prijungia ne tik baltymą–substratą, bet ir košaperonus (Li ir Buchner, 2013). Plačiausiai ištirtas Hsp90 veikimo mechanizmas, tačiau manoma, kad visi Hsp veikia pagal tą patį ar panašų mechanizmą (1 pav.).



1 pav. Hsp90 veikimo mechanizmas (Li ir Buchner, 2013).

Hsp90 funkcionuoja kaip dimeras, susijungęs per C galo domenų. Dimeras gali būti uždaro arba atviros konformacijos, o konformacinius pokyčius sukelia ATP prisijungimas. Kai ATP neprisijungęs, N galo ir vidurio domenai yra nutolę vieni nuo kitų (atvira konformacija). Tokioje padėtyje hidrofobinės sritys atsiduria Hsp90 paviršiuje ir pritraukia kitus baltymus (Corbett ir Berger, 2010). ATP prisijungimas įvyksta staiga, po to Hsp90 iš lėto pasiekia pirmą tarpinę būseną (T1), kai ATP „dangtelis“ jau uždarytas, bet N galo domenai dar atviri. N galo domenų dimerizacija veda į antrą tarpinę būseną (T2), kurioje vidurio domenai keičia savo konformaciją ir sąveikauja N galo domenai (Li ir Buchner, 2013). Susiformuoja uždara konformacija. Vykstant ATP hidrolizei, įvyksta Hsp90 konformaciniai pokyčiai, kurių pasekoje atpalaiduojamas sulankstytas baltymas–substratas, o Hsp, atsikabinus ADP, vėl grįžta į atvirą konformaciją (Corbett ir Berger, 2010). Nukleotidų prisijungimas – ne vienintelis dalykas, lemiantis Hsp90 konformacijos pokyčius. Juos taip pat lemia sąveika su košaperonais ir baltymais–substratais. Manoma, kad tarp skirtingų Hsp90 konformacijų yra dinaminė pusiausvyra ir tai padeda baltymui prisitaikyti prie skirtingų baltymų–substratų (Li ir Buchner, 2013).

1.2.2. Šiluminio šoko baltymas 90 (Hsp90)

Hsp90 – tai labai konservatyvus baltymas, svarbus tinkamos baltymo tretinės ir ketvirtinės struktūros įgavimui ir baltymo–baltymo sąveikai. Jis reguliuoja genų raišką ir turi įtakos daugelio transkripcijos veiksnių, tokių kaip AKT, p53, šiluminio šoko veiksnio aktyvumui. Visi šie veiksniai susiję su signaliniais keliais, todėl Hsp90 yra svarbus signalinis baltymas, turintis įtakos ląstelių augimui ir dalinimuisi (Corbett ir Berger, 2010; Pallavi ir kiti,

2010). Daugybė onkogeninių baltymų, tokių kaip Her2, Raf, PLK, RIP, FAK ir MET, telomerazės, yra Hsp90 baltymai–substratai (Hadden ir Blagg, 2009). Hsp90 nedalyvauja naujai susintetintų baltymų sulankstyme, bet yra labai svarbus baltymo galutinės struktūros įgavimui (Li ir Buchner, 2013). Tai homodimeras, kurio kiekvienas monomeras sudarytas iš N galo ATP prijungiančio ir hidrolizuojančio domeno, vidurio baltymą–substratą prijungiančio domeno ir C galo dimerizacijos domeno (Corbett ir Berger, 2010; Pallavi ir kiti, 2010). Šiuo metu žinoma apie 200 baltymų, kuriems Hsp90 padeda įgauti tinkamą tretinę struktūrą. Manoma, kad Hsp90 savo baltymus–substratus atpažįsta pagal tam tikras struktūras, o ne pagal pirminę seką (Li ir Buchner, 2013).

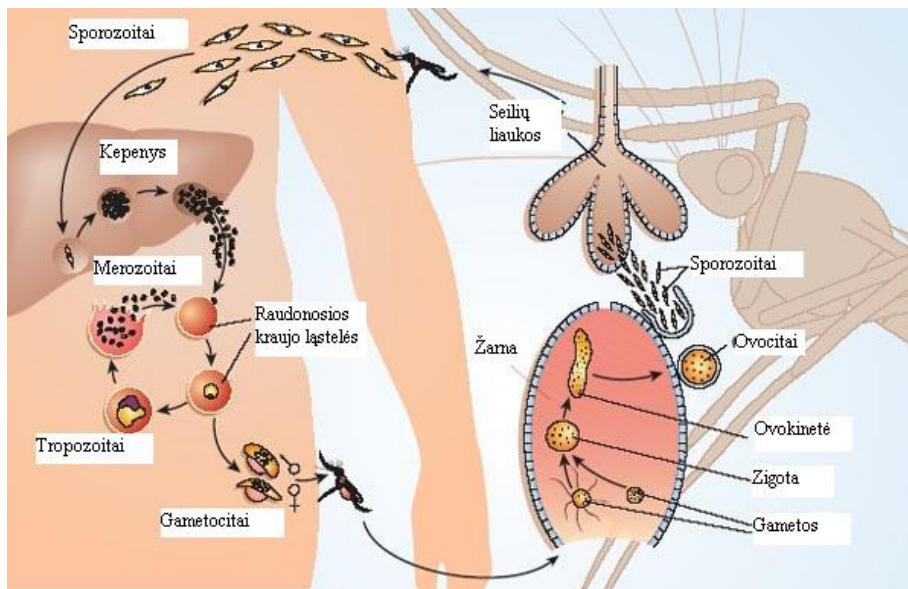
Hsp90 atlieka savo funkciją ne vienas, bet kompleksuose su įvairiais košaperonais, šiuo metu jų žinoma apie 20. Košaperonai lemia Hsp90 specifiškumą tam tikriems baltymams–substratams. Be to, Hsp90 būdingos tam tikros potransliacinės modifikacijos, tokios kaip fosforilinimas, acetilinimas, nitosilinimas ir metilinimas, kurios irgi reguliuoja baltymo aktyvumą keisdamos tarpdomeninę sąveiką ir šaperonų sąveikavimą su Hsp90 (Li ir Buchner, 2013).

Pagrindinė Hsp90 funkcija – baltymų tinkamos tretinės struktūros įgavimas, taigi ir baltymų stabilumo palaikymas, tačiau šis šaperonas taip pat susijęs ir su baltymų degradacija. Jis padeda degraduoti tirpius citozolio baltymus bei kai kuriuos endoplazminio tinklo baltymus (Li ir Buchner, 2013).

Kaip ir dauguma baltymų, svarbių ląstelių išgyvenimui, dauginimuisi ir apoptozei, Hsp90 yra glaudžiai susijęs su žmogaus sveikata ir labai svarbus kai kurių ligų vystymuisi. Hsp90 raiška navikuose padidėja 2–10 kartų ir tai susiję su prastomis gydymo prognozėmis (Wu ir kiti, 2013). Todėl Hsp90 plačiai tiriamas kaip vaistų taikiny. Geldanamycinas – pirmasis atrastas Hsp90 slopiklis. Tai natūralus antibiotikas. Jis konkuruoja su ATP dėl jungimosi N galo domene, o prisijungęs stabdo Hsp90 konformacinius pokyčius (Pallavi ir kiti, 2010; Li ir Buchner, 2013). Geldanamycinas pasižymi priešvėžinėmis savybėmis, tačiau dėl mažo tirpumo ir didelio toksiškumo šis junginys nepateko į klinikinius tyrimus (Li ir Buchner, 2013). Nors ir netinkamas kaip galimas vaistas, geldanamycinas davė pradžią slopiklių kūrimui. Naudojant jį buvo išsiaiškintas slopiklių veikimo mechanizmas (Pallavi ir kiti). Pastebėjus priešvėžines geldanamicino savybes buvo susintetinti pakaitalai, pavyzdžiui, 17–(alilamino)–17–demetoksigeldanamycinas (17–AAG), kuris šiuo metu yra vaistų nuo vėžio III klinikinių tyrimų stadijoje (Pallavi ir kiti, 2010). Tyrimai su pelėmis rodo, kad 17–AAG galima naudoti ir gydant enteroviruso 71 sukeltas infekcijas. Šiuo metu tokios infekcijos dažnai baigiasi mirti, ypač vaikų iki 5 metų tarpe (Tsou ir kiti, 2013). Šiuo metu iškelta hipotezė, kad 17–AAG gali būti naudojamas ir gydant Alzheimerio ligą, nes

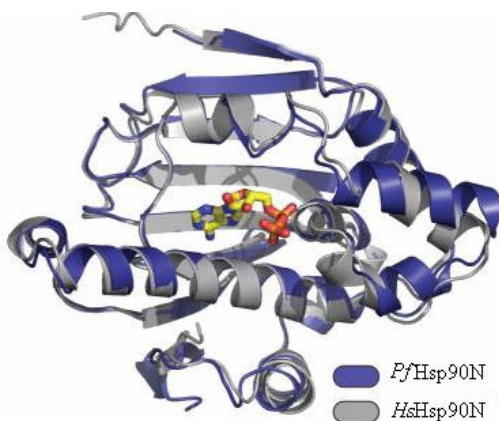
netinkamas Hsp90 aktyvavimas gali skatinti Alzheimerio ligą sukeliančių agregatų susidarymą (Ho ir kiti, 2013). Radisikolis – dar vienas natūralus Hsp90 slopiklis, *in vitro* tyrimuose puikiai stabdęs ląstelių dalinimąsi. Deja, *in vivo* tyrimuose jokių priešvėžinių savybių nepastebėta, greičiausiai dėl mažo junginio stabilumo (Li ir Buchner, 2013). Šiuo metu radisikolis vėl naudojamas tyrimuose *in vitro*. Manoma, kad jį galima naudoti kartu su fisetinu, vaisiuose ir daržovėse randamu flavanoidu, žarnyno vėžio gydymui (Wu ir kiti, 2013). Taip pat sukurtas chimerinis slopiklis iš geldanamicino ir radisikolio funkcinių grupių. Šis slopiklis tiriamas naudojant krūties vėžio ląsteles, kuriose jis slopika Hsp90 aktyvumą esant labai mažoms mikromoliarinėms koncentracijoms. Novobiocinas – tai antibiotikas, kuris taip pat tiriamas kaip Hsp90 slopiklis. Įdomu tai, kad jis jungiasi prie C galo domeno (Li ir Buchner, 2013).

Archėjų genome nerandamas nė vienas Hsp90 koduojantis genas. Bakterijose randamas vienas Hsp90 baltymas, tačiau jis nėra gyvybiškai svarbus ir jo tiksli funkcija dar nežinoma (Li ir Buchner, 2013). Hsp90 labai svarbus visuose eukariotuose. Jis taip pat reikalingas infekcijas sukeliančių mikroorganizmų augimui. Vienas iš tokių mikroorganizmų – pirmuonis *P. falciparum*, vienas pagrindinių maliarijos sukėlėjų. *P. falciparum* vystosi dviejuose šeimininkuose: *Anopheles sp.* uode ir žmoguje, todėl turi jautriai reaguoti į skirtingus signalus vystymosi metu ir į staigiai besikeičiančias aplinkos sąlygas (2 pav.) (Pallavi ir kiti, 2010). *P. falciparum* sukelia pačią sunkiausią maliarijos formą, kasmet nusinešančią mažiausiai milijoną gyvybių, ypač besivystančiose šalyse, kur kyla maliarijos epidemijos. Pasaulyje per metus maliarija užsikrečia apie 250 milijonų žmonių, dažniausiai nėščios moterys ir vaikai. Net ir gydant dabar turimais vaistais, nuo šios ligos miršta daugiau nei 20% suaugusiųjų, 15% vaikų ir 50% nėščiųjų. Be to, kai kuriuose regionuose, pavyzdžiui, pietų Azijoje, randama *P. falciparum*, atsparių visiems dabar naudojamiems vaistams (Shahinas ir kiti, 2013). Todėl ieškoma naujų vaistų, jų taikiniu dažnai tampa PfHsp90. Tyrimai su *P. falciparum* kultūromis parodė, kad geldanamicinas stabdo plazmodijaus augimą blokuodamas PfHsp90 ir taip sustabdydamas *P. falciparum* vystymąsi tropozoito stadijoje (Corbett ir Berger, 2010; Pallavi ir kiti, 2010).



2 pav. *Plasmodium falciparum* vystymosi ciklas (Ménard, 2005).

Šiuo metu nėra žinomų slopiklių, kurie selektyviai jungtųsi tik su *PfHsp90*. Žinoma, kad *PfHsp90* turi didžiausią ATPazinį aktyvumą iš visų žinomų Hsp90. Šis aktyvumas 6 kartus didesnis už žmogaus Hsp90 (*HsHsp90*) aktyvumą. Dėl šios priežasties geldanamycinas *PfHsp90* slopina stipriau nei *HsHsp90*. *PfHsp90* ir *HsHsp90* skiriasi maždaug 40% baltymo aminorūgščių sekos. Didžiausias skirtumas – *PfHsp90* turi unikalią jungties domeną tarp N galo ir vidurio domenų. Domeną sudaro 30 aminorūgščių ir jis reguliuoja ATPazinį aktyvumą (Pallavi ir kiti, 2010). Tuo tarpu *PfHsp90* ir *HsHsp90* aktyvieji centrai beveik identiški (3 pav.).



3 pav. *PfHsp90* ir žmogaus Hsp90 N galo domenų (*PfHsp90N* ir *HsHsp90N*) palyginimas. Geltona spalva pažymėtas prie *PfHsp90N* prisijungęs ADP (Corbett ir Berger, 2010).

Vis dėlto ir tarp jų yra keletas skirtumų. Tretinėje struktūroje *PfHsp90* 173 padėtyje turi izoleuciną vietoj *HsHsp90* 186 padėties valino. *HsHsp90* 52 padėties serinas pakeistas *PfHsp90* 38 padėties alaninu, o 98 padėties argininas – 112 padėties lizinu. Šie pokyčiai padaro *PfHsp90* aktyvųjį centrą labiau hidrofobinį (Shahinas ir kiti, 2013). Deja, serino pakeitimą alaninu ne visada galima panaudoti kuriant specifinius slopiklius. Iš sekų

palyginimo negalima patvirtinti, kad aukštesnieji eukariotai visada šioje padėtyje turi ne alaniną, o seriną. Netgi *HsHsp90* β -izoforma turi alaniną (Corbett ir Berger, 2010). Tuo tarpu kiti du skirtumai bent jau teoriškai leidžia sukurti medžiagas, atrankiai sąveikaujančias su *PfHsp90*, tačiau tokie duomenys dar nepublikuojami. Manoma, kad kovai prieš maliariją ir kitas pirmuonių sukeltas infekcijas būtų galima naudoti sintetinį geldanamicino analogą 17-AAG (Pallavi ir kiti, 2010). Šiuo metu daugiau kaip 10 Hsp90 slopiklių yra įvairiose klinikinių tyrimų stadijose. Dauguma jų nukreipti prieš vėžį (Li ir Buchner, 2013).

1.3. Karboanhidrazių apžvalga

1.3.1. Karboanhidrazių klasifikacija, veikimo mechanizmas ir paplitimas žmogaus organizme

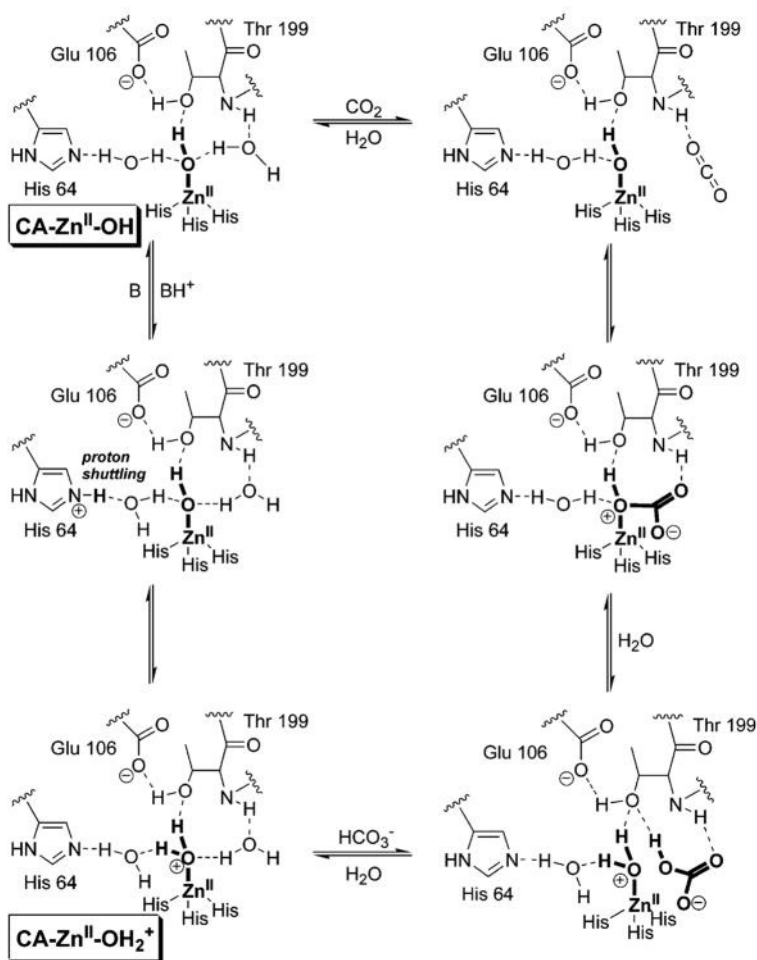
Karboanhidrazės (CA) (EC 4.2.1.1) yra Zn^{2+} metalofermentai, kurie katalizuoja grįžtamą CO_2 hidratacijos reakciją: $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$ (Breton, 2001).

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 aptinkamos visos išskyrus 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). α -CA aktyviajame centre Zn^{2+} visada susijungęs su vandens molekule ir trimis histidino (His) šoninėmis grupėmis (Supuran ir kiti, 2004).

Hidratacijos reakcija vyksta dviejų žingsnių „ping-pong“ mechanizmu (4 pav.). Reakcija išaiškinta tiriant žmogaus CAII veikimo mechanizmą, tačiau manoma, kad ir kitos CA veikia tuo pačiu „ping-pong“ mechanizmu (Krishnamurthy ir kiti, 2008).

Fermento aktyviajame centre yra Zn^{2+} -OH, apsuptas trimis His šoninėmis grupėmis (His94, His96 ir His119) (Sly ir Hu, 1995; Krishnamurthy ir kiti, 2008). Tai sudaro tetraedrinę struktūrą. Pirmasis hidratacijos 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).

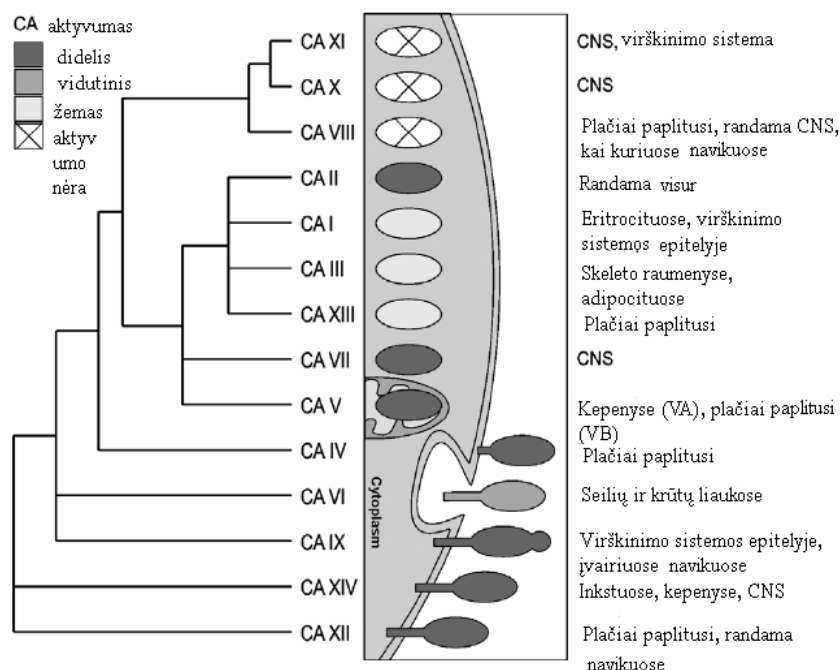
Antrasis žingsnis vyksta, kai prie Zn^{2+} prisijungusi vandens molekulė perduoda protoną fermento aplinkoje esančių skysčių molekulėms ir regeneruoja Zn^{2+} -OH. Šis žingsnis apsprendžia reakcijos greitį. Protono perdavime dalyvauja His64, kuris atlieka protono perdavėjo funkciją (Krishnamurthy ir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



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

Nėra tokios gyvybės formos, kurioje nebūtų CA. Augalų, gyvūnų, bakterijų ląstelėse CA atlieka gyvybiškai svarbias funkcijas (Kivelä ir kiti, 2005). Jos ne tik palaiko pastovų pH, bet taip pat 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 sekrecijoje, skrandžio ir kasos sulčių susidaryme, žarnyne vykstančiame jonų transporte, prisitaikyme prie ląstelinio streso (Breton, 2001; Kivelä ir kiti, 2005; Krishnamurthy ir kiti, 2008).

CA randamos visame žmogaus kūne (5 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.



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

Žmogaus aktyvios CA yra transmembraninės (CAIX, XII, XIV), prikabintos prie membranos per glikozilfosfatidilinozitolį (CAIV), sekretuojamos (CAVI), citoplazminės (CAI, II, III, VII, XIII) arba mitochondrinės (CAVA, VB) (Pastorekova ir kiti, 2006).

1.3.2. 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 galo peptido (285–312 ar.) (Purkerson ir Schwartz, 2007; Datta ir kiti, 2008; UniProt duomenų bazė). 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; UniProt duomenų bazė). 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 katalizuoja dujų mainus ir palaiko vietinį plaučių pH, katalizuoja CO_2

hidrataciją raumenyse fizinės veiklos metu (Waheed ir kiti, 1996). CAIV ir CAXIV – pagrindinės smegenų ekstraląstelinės CA, kurios palaiko smegenų pH homeostazę (Svichar ir kiti, 2009). 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, vienas iš jų koduoja CAIV. Visi genai ekspresuojami fotoreceptoriuose arba akies tinklainės epitelio ląstelėse (Ferrari ir kiti, 2011).

Mūsų skyriuje CAIV siekiama gauti 2 tikslais. Tikimasi rasti slopiklį, atrankiai sąveikaujantį su šiuo baltymu ir galintį tapti vaisto veikliąja medžiaga. Be to, mums labai svarbu turėti visas CA, nes tik patikrinus slopiklį su visomis žmogaus organizme randamomis CA galima įsitikinti jo atrankumu konkrečiai CA. Todėl net ir neradus CAIV slopiklio, ši CA pasitarnautų su kitomis CA sąveikaujančių slopiklių tyrimuose.

1.4. 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. Šis baltymas gali turėti papildomų sekų, leidžiančių jį sintetinti kituose, efektyviau tikslinio baltymo sintezę vykdančiuose šeimininkuose, 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), tiek ir pramonėje (kaip biologiniai tirpikliai, biokatalizatoriai), nes tai – pigesnis, greitesnis ir

paprastesnis būdas gauti didelius kiekius norimo baltymo nei išskiriant iš gamtinio šaltinio (Sevast'syanovich 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 šeimininko. 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 (Sevast'syanovich 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, pagal pirminę baltymo struktūrą 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 šeimininko ląsteles, kuriose sintetinamas pernešto geno koduojamas baltymas. Vektoriai dažniausiai turi papildomas reguliacines sekas, pavyzdžiui, slopiklius arba stipriklis. 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 konstrukto. Tai ženkliai padidina tikslinio baltymo sintezę. Kitą vertus, jeigu baltymas toksiškas ląstelėms, tai stabdo jų augimą (Baneyx, 1999). Naudojant bakterijų raiškos sistemą, 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). Dažniausiai tai lizogeninį λ DE3 profagą turintys *E. coli* kamieniai, turintys T7 RNR polimerazės geno kopiją ir šio geno raišką reguliuojantį lac represorių (Structural Genomics Consortium ir kiti, 2008). 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; Sevast'syanovich ir kiti, 2010).

Tam, kad būtų užtikrintas ląstelių, turinčių reikiamą konstruktą, atrankus augimas, į raiškos vektorius įterpiami atsparumą antibiotikams (ampicilinui, choramfenikoliui, 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 papildomomais 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).

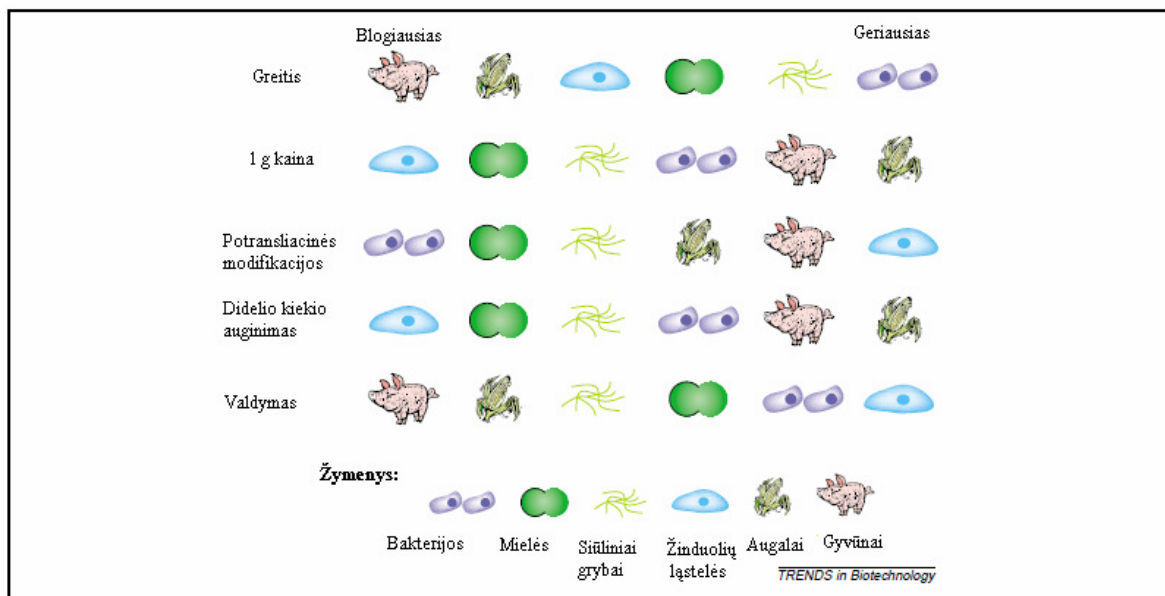
Žinduolių ląstelių raiškos sistemoms pritaikyta daugybė vektorių, turinčių replikacijos pradžios sritį, skirtą padauginti plazmidę žinduolių ląstelėse, iRNR brendimo

signalus, multikloninę seką ir atrankos žymenis. Baltymo raiška priklauso nuo intarpo savybių, todėl neįmanoma rasti vektoriaus, tinkančio visų baltymų raiškai (Kaufman, 2000). Magistro darbo metu klonavimo darbams buvo pasirinktas pCEP4 vektorius. Tai episominis žinduolių raiškos sistemoms pritaikytas vektorius, turintis žmogaus citomegalo viruso ankstyvąjį stipriklį/promotorių (CMV), kuris užtikrina aukšto lygio rekombinantinio geno transkripciją. Šiame vektoriuje taip pat yra Epšteino–Baro viruso replikacijos pradžios sritis OriP ir branduolio antigenas, koduojamas EBNA–1 geno, kurie užtikrina, kad į chromosomą neintegruotas vektorius efektyviai replikuotų žmogaus, primatų ir šuninių ląstelėse. Vektorius turi SV40 poliadenilinimo signalą, užtikrinantį iNRN poliadenilinimą. Vektorius turi atsparumo ampicilinui geną bei pUC replikacijos pradžios sritį. Tai leidžia šiam vektoriumi taikyti ampicilinu pagrįstą atrankos sistemą *E. coli* ląstelėse. pCEP4 taip pat turi higromicino B atsparumo geną, TK promotorių ir TK poliadenilinimo signalą stabiliai transfekuotų ląstelių atrankai (Invitrogen). Daugelis vektorių turi SV40, Rous sarkomos viruso, adenoviruso arba citomegalo viruso promotorius, kurie yra labai aktyvūs daugelyje iš įvairių rūšių paimtų ląstelių linijų. Kai kurie vektoriai turi atrankos sistemas, pavyzdžiui, fluorescuojančius baltymus, kurie leidžia nustatyti, kokia dalis populiacijos ląstelių buvo transfekuotos (Kaufman, 2000). Be to, vektoriai gali turėti papildomų reguliacinių elementų, tokių kaip transkripcijos ar translacijos stiprikliai, intronai, kurie padidina kai kurių genų raišką. Magistro darbo metu taip pat buvo sukurti konstruktai, turintys SV40 mažąjį T introną, translacijos stipriklį arba abu šiuos elementus. Patartina naudoti kiek įmanoma mažesnį vektorių, nes dydis neigiamai veikia stabilumą, sunkiau gauti didelius plazmidės kiekius (Geisse ir Fux, 2009). Žinduolių raiškos sistemose naudojami vektoriai gali būti paprasti arba indukuojami. Pastarieji geri tuo, kas transfekuotose ląstelėse geno raišką galima indukuoti, kai ląstelės pasiekia norimą tankį. Taip augančios ląstelės apsaugomos nuo galimo toksiško gaminamų tikslinių baltymų poveikio (Chaudhary ir kiti, 2011).

Kuo griežčiau reguliuojama geno raiška, tuo įvairesnius tyrimus galima atlikti. Taip pat galima gauti toksiškus baltymus. Norimo geno raišką galima indukuoti įvairiais būdais: šiluminiu šoku, steroidiniais hormonais, sunkiųjų metalų jonais, interferonais, geležimi ir kitais būdais. Pasirenkant vektorių konkreitiems tyrimams svarbu įsitikinti, kad induktorius neturės įtakos tyrimų rezultatams (Kaufman, 2000).

Rekombinantinio baltymo raiškos įvairovė. Baltymą ekspresuojantys organizmai gali būti labai įvairūs – nuo bakterijų iki žinduolių. Kiekvienas organizmas turi privalumų ir trūkumų (6 pav.) (Dyck ir kiti, 2003). Raiškos sistema dažnai pasirenkama atsižvelgiant į tai, kokio kiekio baltymo reikia, koku metodu į šeimininką norima įterpti DNR. Jeigu dirbama su toksiškais baltymais, lemiamu veiksniu gali būti ir tai, ar norimai

sistamai yra sukurtas vektoriaus, pritaikyto toksiškų baltymų raiškai (Kaufman, 2000). Kai kuriems tyrimams reikia mažų kiekių įvairių baltymų, kitiems reikia didžiulių kiekių vieno baltymo. Ypač didelis terapinių baltymų poreikis. Dauguma jų gaminami *E. coli* arba žinduolių ląstelių kultūrose (Andersen ir Krummen, 2002). Būtent šios raiškos sistemos buvo pasirinktos baltymų gavimui magistro darbe. Paprastesnis *PfHsp90N* (1–215 ar.) baltymas buvo gautas *E. coli* raiškos sistemoje, o sudėtingesnė CAIV (19–284 ar.) – žmogaus HEK 293–F ląstelėse. Bakalauro darbo metu buvo bandoma gauti CAIV (19–284 ar.) *E. coli* ląstelėse, bet gautas baltymas nebuvo aktyvus.



6 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* kamienai, 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). Nors ir labai patogi, raiška bakterijose netinkama, jeigu norima gauti žinduolių baltymus, kurie tam tikrą brandos etapą pereina endoplazminiame tinkle. Tokie baltymai,

dažnai fermentai, bakterijose netinkamai sulankstomi. Be to, bakterijose baltymai neglikozilinami (Morton ir Potter, 2000).

Kai kurių eukariotinių rekombinantinių baltymų raiškai naudojami vienaląsčiai eukariotai (mielės, siūliniai grybai, dumbliai). Jų, panašiai kaip prokariotų, galima užauginti didelį kiekį ir gauti nemažai tikslinio baltymo (Dyck ir kiti, 2003). Mielės *Saccharomyces sp.* ir *Pichia sp.* bręstantiems baltymams gali sukurti tokią aplinką, kaip ir žinduolių ląstelės, tačiau nėra visiškai atkartojama žmogaus baltymo transliacija, todėl gauti baltymai gali būti imunogeniški arba prarasti tam tikras savybes ar aktyvumą (Morton ir Potter, 2000; Dyck ir kiti, 2003). Kai kurios vabzdžių ląstelės, pavyzdžiui, *Spodoptera sp.* arba *Trichoplusia sp.* gali glikozilinti baltymus. Be to, jeigu baltymas turi signalinę seką, ji atpažįstama taip pat, kaip ir žinduolių ląstelėse. Tačiau šioje sistemoje gaunami baltymai dažnai yra pernelyg glikozilinami. Sprendžiant šią problemą sukurta nauja vabzdžių ląstelių linija iš *Estigmene acrea*, skirta naudoti kartu su bakulovirusais. Tikimasi, kad ši linija padės išs্পesti glikozilinimo problemą (Morton ir Potter, 2000). Tačiau naudojant bakulovirusus gaunami nelabai dideli baltymo kiekiai. Šis būdas netinka pramoniniam naudojimui skirtiems baltymams gaminti.

Baltymai, gauti žinduolių ląstelėse, naudojami tiriant genų raišką, baltymų struktūrą ir funkcijas, reguliacinius mechanizmus (Kaufman, 2000). Ypač didelių baltymų kiekių reikia gaminant antikūnus, atrenkant medžiagas su tam tikromis savybėmis (Parham ir kiti, 1998). Baltymo kiekis, gaunamas iš žinduolių ląstelių, priklauso nuo daugybės veiksnių, tokių kaip DNR patekimo į ląsteles būdas, DNR kopijų skaičius, transportavimo efektyvumas, iRNR brendimas, transportavimas ir stabilumas, transliacijos efektyvumas, baltymų brendimas, transportavimas ir stabilumas. Skirtingų genų raiškai svarbūs skirtingi veiksniai (Parham ir kiti, 1998; Kaufman, 2000). Nors žinduolių ląsteles auginti brangu ir sudėtinga užauginti didesnę kiekį, jos vis dažniau naudojamos baltymų gamybai (Dyck ir kiti, 2003). Skirtingos ląstelių linijos skiriasi savo gebėjimu priimti svetimą DNR. Kai kurias linijas, pavyzdžiui, fibroblastus ir mieloidines ląsteles, transfekuoti sunku, tuo tarpu epitelinių ląstelių linijas, pavyzdžiui, CHO, COS-7, HEK-293, BHK, lengva (Parham ir kiti, 1998). Žinduolių ląstelės HEK-293 plačiai naudojamos rekombinantinių baltymų raiškai, nes jose galima sukurti fiziologinę aplinką, kuri labai panaši į žinduolių baltymų natyvią aplinką. Šios ląstelės naudojamos ir labai dideliems baltymų kiekiams gaminti, pavyzdžiui, terapiniams baltymams. Transfekavus HEK-293 ląsteles svetima DNR, jose aktyvinamas viduląstelinis antivirusinis PKR signalinis kelias. Tai slopina transliaciją ir gali būti viena iš mažo baltymo kiekio gavimo priežasčių. Kai kurie virusai, pavyzdžiui, Ebola virusas, turi mechanizmus, kurie neleidžia aktyvuoti PKR signalinio kelio. Todėl virusus galima panaudoti siekiant padidinti

transfekcijos efektyvumą (Gantke ir kiti, 2013). Geno raiškai įtakos turi ir kiti veiksniai, tokie kaip manipuliavimas ląstelės ciklu. Norint gauti daugiau tikslinio baltymo, galima slopinti kai kurias histonų deacetilazes. Tuomet DNR taip glaudžiai neapsivynioja aplink histonus ir nuo jos ilgiau transkribuojami genai (Parham ir kiti, 1998). Baltymų gryninimas iš žinduolių ląstelių kultūrų ekstraktų yra ilgas ir brangus (reikia specifinio sorbento arba monokloninių antikūnų), gaunami maži baltymo kiekiai (Morton ir Potter, 2000). Dalinai šią problemą galima išspręsti į baltymą koduojantį konstruklą įterpian sekretijos signalą. Jeigu norimas gauti baltymas kilęs iš aukštesniųjų eukariotų, jo brendimui dažnai reikia įvairių potransliacinių modifikacijų. Jas visas galima gauti žinduolių ląstelėse. Be to, žinduolių ląstelėse baltymai įgauna tinkamą tretinę ir ketvirtinę struktūrą, todėl yra stabilūs. Žinduolių ląstelės naudojamos norint patikrinti, ar konkretus genas tiesiogiai atsakingas už tam tikro baltymo sintezę, ištirti baltymo struktūros ir jo funkcijos sąsajas, nustatyti baltymo raiškos pasekmes ląstelėms arba gaminti baltymus (Kaufman, 2000).

Dirbant su ląstelių linijomis galima naudoti laikiną arba stabilią transfekciją. Stablios transfekcijos metu transfekuojama DNR integruojasi į šeimininko genomą. Integruojama DNR dažnai turi selektyvius markerius, pagal kuriuos atrenkamos sėkmingai transfektuotos ląstelės ir sukuriamas stabiliai transfektuotų ląstelių linija, kuri nuolatos ekspresuoja turimą geną (Kim ir Eberwine, 2010). Tačiau gauti tokias ląstelių linijas brangu ir užima daug laiko. Be to, naudojant stabiliai transfektuotas ląstelių linijas sunku gauti didelius kiekius tikslių baltymų. Pigesnė, greitesnė ir dideliems baltymų kiekiams gauti pritaikyta alternatyva – laikina transfekcija, naudojant suspensijoje augti pritaikytas ląsteles, dažnai HEK arba CHO ląstelių linijas (Meissner ir kiti, 2001). Suspensines HEK galima auginti bioreaktoriuose, tai svarbu terapinių baltymų gamybai (Tsao ir kiti, 2001). Suspensinės HEK ląstelės buvo gautos iš adhezinių ląstelių, kiekvieno persėjimo metu naudojant vis didesnę beseruminės terpės kiekį, kol terpėje visai neliko serumo. Tokias ląsteles pradėta auginti kolbose purtant nedideliu greičiu (Meissner ir kiti, 2001). Iš pradžių suspensinės HEK ląstelės sudarydavo nemažus agregatus, kurie keisdavo ląstelių metabolizmą ir mažindavo transfekcijos efektyvumą. Ši problema buvo išspręsta tobulinant mitybines terpes (Tsao ir kiti, 2001). Šiuo metu galima įsigyti komercinių sistemų, pritaikytų suspensinių HEK arba CHO ląstelių auginimui. Suspensines ląsteles nesudėtinga auginti, prireikus galima greitai gauti didelius jų kiekius. Naudojamos beseruminės tikslios cheminės sudėties terpės, kas užtikrina rezultatų atsikartojamumą bei tinkamumą terapinių baltymų gamybai.

Transgeniniai augalai, gyvūnai ir vabzdžiai taip pat gali būti naudojami kaip raiškos sistemos, 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 „Herolab HiCen SR Superspeed“;
- CO₂ inkubatorius–purtyklė „Eppendorf New Brunswick S41i“;
- DNR elektroforezės aparatas „SIGMA–ALDRICH“;
- gryninimo sistema „ÄKTA purifier“;
- gryninimo sistema „LKB BROMMA“;
- kaitinimo plytelė „ИСКОПКА“;
- laminarinė spinta „NUAIRE Biological Safety Cabinets“;
- 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 „Agilent 8453“;
- spektrofotometras „NanoDrop“;
- svarstyklės „KERN 572“;
- šviesinių fazių kontrasto mikroskopas „Olympus“;
- 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

- Acrōs organics: NiCl₂.
- BioRad: TEMED, glicinas, 2–merkaptioetanolis.

- Fisher Scientific UK: imidazolas.
- Fluka: Coomassie Brilliant Blue R-250, etidžio bromidas, HCl, bisakrilamidas, NaOH, PIPES, C₂H₃NaO₂, NaClO₄, NaCl, KH₂PO₄, K₂HPO₄.
- GE Healthcare: „Ni SepharoseTM 6 Fast Flow“.
- Invitrogen: FreeStyleTM MAX transfekcijos reagentas, FreeStyleTM 293 ir OptiPROTM SFM terpės, tripano mėlis.
- Matheson Coleman & Bell: bromfenolio mėlis.
- Roth: agar–agaras, LB terpė, ampicilinas, APS, akrilamidas, triptonas, mielių ekstraktas, NaCl, CaCl₂, chloramfenikolis, glicerolis, HEPES.
- Sigma: TRIS bazė, SDS, KCl, acto rūgštis, EDTA, DTT, MES, *p*–aminometilbenzensulfonamido agarozė.
- ThermoFisher (Fermentas): agarozė, IPTG, DNR ilgio žymuo ir DNR 6x mėginių dažas, baltymų dydžio žymuo, restrikcijos endonukleazės NdeI, HindIII, BglII, NcoI, PflMI, DraIII, BamHI, VspI, NheI, DraI, EcoRI, KpnI, 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: „GeneJETTM Gel Extraction Kit“, „GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit“, „GeneJETTM PCR Purification Kit“, „GeneJETTM Plasmid Maxiprep Kit“.
- Реахим: ZnSO₄, MnCl₂.

2.1.3. Naudotos terpės ir tirpalai

Skysta LB (Luria/Miller) terpė (1 l): 25 g sausos terpės ištirpinami 1 l dejonizuoto vandens. Terpė autoklavuojama 20 min +120 °C 1 papildomos atm slėgyje.

Agarizuota LB (Luria/Miller) terpė (1 l): 25 g sausos LB terpės ištirpinami 1 l dejonizuoto vandens. Pridedami 15 g agar–agaro. Terpė autoklavuojama 20 min +120 °C 1 papildomos atm slėgyje.

S. O. C. terpė (1 l):

20 g triptono;

5 g mielių ekstrakto;

10 mM NaCl;

3,5 mM KCl.

Terpė ruošama dejonizuotame vandenyje. Paruošta terpė autoklavuojama 20 min +120 °C 1 papildomos atm slėgyje. Atšaldžius pridedama MgCl₂ iki 10 mM ir gliukozės iki 20 mM. Terpė filtruojama per 0,2 μm polivinilidino difluorido filtrą, išpilstoma nedideliu tūriu ir laikoma -20 °C temperatūroje.

FreeStyle™ 293 terpė: parduodama jau paruošta. Terpės sudėtis – komercinė paslaptis. Terpė sintetinė, tikslios cheminės sudėties, be fetalinio serumo. Terpė laikoma +4 °C tamsoje.

OptiPRO™ SFM transfekcijos terpė: parduodama jau paruošta. Sudėtis – komercinė paslaptis. Terpė sintetinė, tikslios cheminės sudėties, be fetalinio serumo. Terpė laikoma +4°C tamsoje.

30% akrilamido/bisakrilamido tirpalas (70 ml):

29,2 g akrilamido;

0,8 g bisakrilamido.

Tirpalas ruošiamas dejonizuotame vandenyje, nufiltruojamas per stiklo filtrą ir laikoma +4 °C temperatūroje.

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

10 g SDS;

30 g TRIS bazės;

144 g glicino.

Buferis ruošiamas dejonizuotame vandenyje ir 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.

Buferis ruošiamas dejonizuotame vandenyje ir laikomas kambario temperatūroje.

Akrilamidinių gelių dažas (250 ml):

113 ml etanolio;

23 ml acto rūgšties;

0,6 g Coomassie Brilliant Blue R-250.

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 baltymų elektroforezei (10 ml):

300 µl 1 M TRIS;

1,2 g SDS;

92,5 mg DTT;

6 ml glicerolio;

60 mg bromfenolio mėlio.

Dažas ruošiamas dejonizuotame vandenyje, 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 per 0,2 µm polivinilidino difluorido filtrą, 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 (4,9 ml):	Viršutinis koncentruojantis 4% gelis (2,5 ml):
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.

***Pf*Hsp90N (1–215 ar.) gryninimui naudoti buferiai:**

Pavadinimas	Sudėtis	pH
I buferis	50 mM HEPES 0,5 M NaCl 10% glicerolio	8
II buferis	50 mM HEPES 0,5 M NaCl 10% glicerolio 0,6 M imidazolo	8
Dializės buferis	50 mM MES 10% glicerolio 0,5mM EDTA 1 mM DTT	6,5

CAIV (19–284 ar.) gryninimui naudoti buferiai:

Pavadinimas	Sudėtis	pH
III buferis	20 mM HEPES 0,15 M NaCl	7,5
IV buferis	0,1 M C ₂ H ₃ NaO ₂ 0,5 M NaClO ₄	6,5
Dializės buferis II	10 mM HEPES 50 mM NaCl	7,5

Kadangi baltymai gryninami iš skirtingų biomasės arba terpės kiekių, kiekvienu atveju gaminami skirtingi buferių tūriai, todėl į buferius įeinančių medžiagų kiekiai gramais nepateikiami. Atsverta medžiaga ištirpinama nedideliame tūryje šalto vandens. Į tirpalą lašinamas NaOH arba CH₃COOH, kol pasiekiamas norimas pH. Tada pripilama šalto dejonizuoto vandens iki reikiamo tūrio. Visi gryninimo buferiai laikomi +4 °C.

Fosfatinis buferis (250 ml):

2 g NaCl;
0,05 g KCl;

0,05 g KH_2PO_4 ;

0,2475 g K_2HPO_4 .

Buferis ruošiamas dejonizuotame vandenyje. Paruoštas buferis autoklavuojamas 20 min +120 °C 1 papildomos atm slėgyje. Buferis laikomas kambario temperatūroje.

2.1.4. Naudotos kitos priemonės

Naudoti *E. coli* kamienai ir žmogaus ląstelių linija

Tyrimo metu naudoti *E. coli* kamienai XLI-blue, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)CodonPlus-RIL, BL21 Star (DE3) One Shot ir Rosetta2(DE3). Visi kamienai, išskyrus BL21 Star (DE3) One Shot, įsigyti iš „Novagen“ kompanijos. Pastarasis įsigytas iš „Invitrogen“.

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

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 (Novagen).

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 (Novagen).

BL21(DE3)CodonPlus-RIL – tai chloramfenikoliui atsparus *E. coli* kamienas. Jis koduoja papildomas tRNR, atpažįstančias retai prokariotų genome sutinkamus arginino 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 (Novagen).

BL21 Star (DE3) One Shot – tai atsparumo antibiotikams neturintis *E. coli* kamienas, skirtas heterologinių genų raiškai. Šiame kamiene sintetinama neaktyvi ribonukleazė E, kurios funkcija – iRNR skaidymas. Kadangi fermentas neaktyvus, iRNR ilgiau išlieka nesuardyta. Tai sąlygoja didesnę genų raišką (Invitrogen).

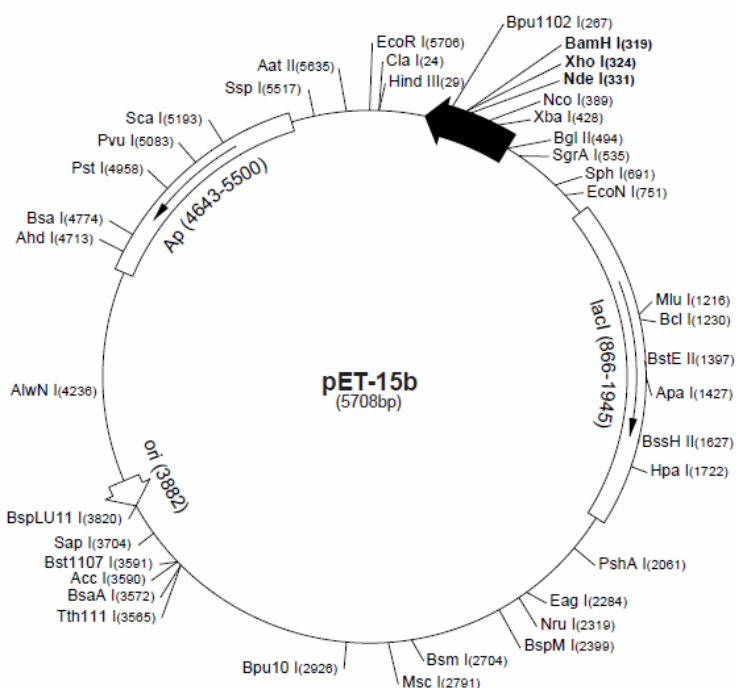
Rosetta2(DE3) – chloramfenikoliui atsparus kamienas, turintis papildomų kodonų AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA ir CGG, kurių beveik nebūna *E. coli* bakterijų

genome, tačiau jie dažnai sutinkami eukariotuose. Kamienas pritaikytas būtent eukariotinių baltymų genų raiškai (Novagen).

Tyrime naudota HEK 293–F žmogaus ląstelių linija. HEK 293-oji imortalizuota ląstelių linija gauta pirminę žmogaus embriono inkstų ląstelių liniją transformavus žmogaus 5-ojo tipo adenoviruso DNR. Ląstelėse esančio adenoviruso E1A geno produktas aktyvina kai kuriuos virusinius promotorius. Tai leidžia ląstelėms sintetinti didelius baltymų kiekius. Ląstelės pritaikytos augti suspensijoje (Invitrogen). HEK 293–F ląstelės, pritaikytos augti FreeStyle™ 293 terpėje, įsigytos iš „Invitrogen“.

Naudoti klonavimo vektoriai

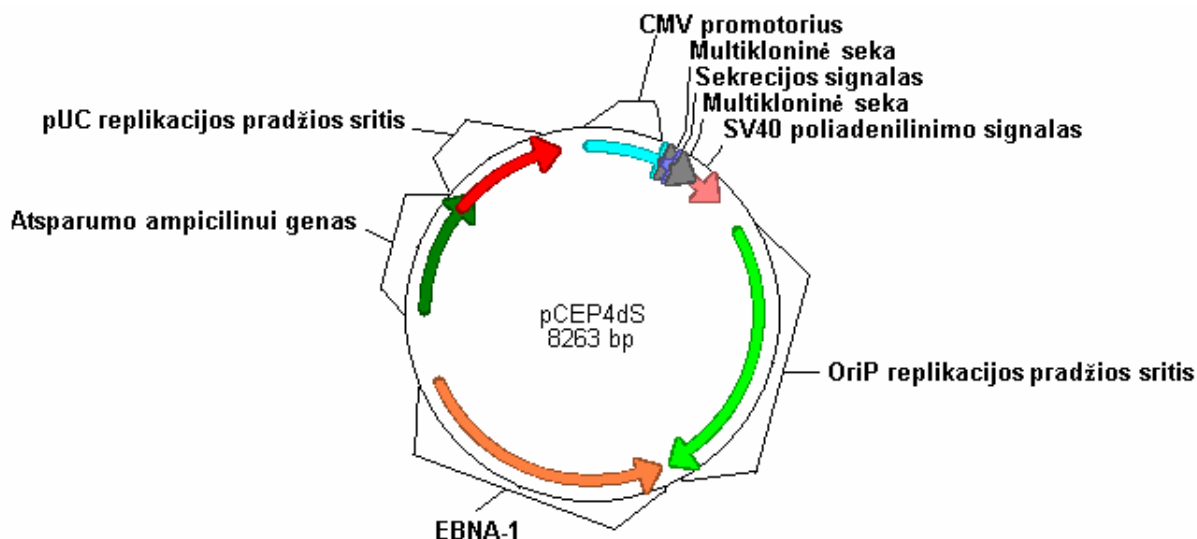
pET15b (Novagen) – vektorius, turintis T7 promotorių ir šešis histidinus koduojančią nukleotidų seką multikloninės sekos N gale (7 pav). Vektorius turi atsparumo ampicilinui geną. Jis skirtas baltymų raiškai *E. coli* ląstelėse (Novagen).



7 pav. Vektoriaus pET15b struktūra (Novagen).

pCEP4dS – vektorius, skirtas baltymų raiškai žinduolių ląstelėse. Vektorius padarytas iš pCEP4 vektoriaus mūsų laboratorijoje (Invitrogen). Jis turi CMV promotorių ir atsparumo ampicilinui geną. Siekiant sumažinti pCEP4 vektoriaus dydį NruI ir SalI restriktazėmis iškirpta vektoriaus dalis nuo 7960 iki 9947 nukleotido. Šioje dalyje yra TK promotorius, higromicino atsparumo genas ir TK poliadenilinimo signalas. Ši vektoriaus dalis mums nereikalinga, nes higromicino atrankos sistema taikoma kuriant stabiliai transfekuotų

ląstelių linijas, o mes naudojame laikiną transfekciją. Siekiant palengvinti baltymo gryninimą, už CMV promotoriaus buvo įterpta pelių Ig κ grandinės V–J2–C regiono sekrecijos signalo seka (8 pav.). Ši modifikacija leido susintetintą baltymą gryninti iš terpės praleidžiant ląstelių ardymo etapą. pCEP4dS vektoriaus gamyba plačiau aprašyta Dovilės Dekaminavičiūtės straipsnyje (priimtas spaudai 2013 m.).



8 pav. Vektoriaus pCEP4dS struktūra.

Naudoti pradmenys

T7Prom – tiesioginis pradmuo 5′-TAATACGACTCACTATAGG-3′, skirtas plazmidžių, sukonstruotų naudojant pET15b vektorių, sekvenavimui.

T7Term – atvirkštinis pradmuo 5′-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3′, skirtas plazmidžių, sukonstruotų naudojant pET15b vektorių, sekvenavimui.

pCEP4i_Fwd – tiesioginis pradmuo 5′-GGATCGATCCAGACATGATAAG-3′, skirtas plazmidžių, sukonstruotų naudojant pCEP4 vektorių ir turinčių introną, sekvenavimui.

pCEP4i_Rev – atvirkštinis pradmuo 5′-CTTCTGTGGTGTGACATAATTG-3′, skirtas plazmidžių, sukonstruotų naudojant pCEP4 vektorių ir turinčių introną, sekvenavimui.

pCEP_Fwd – tiesioginis pradmuo 5′-GGCACCAAATCAACGGGAC-3′, skirtas plazmidžių, sukonstruotų naudojant pCEP4 vektorių, sekvenavimui.

pCEP_Rev – atvirkštinis pradmuo 5′-CTGCATTCTAGTTGTGGTTTG-3′, skirtas plazmidžių, sukonstruotų naudojant pCEP4 vektorių, sekvenavimui.

pET15b_PfHsp90N_F – tiesioginis pradmuo 5′-TCCAACATATGTCAACGGA AACATTC-3′, skirtas pET15b–6xHis–PfHsp90N (1–215 ar.) konstrukto gavimui. Pradmuo turi ATG geno translacijos pradžios kodoną (mėlynas) ir NdeI kirpimo vietą (pabraukta žaliai).

pET15b_*Pf*Hsp90N_R – atvirkštinis pradmuo 5'-CAGATGCCTCGAGTTATT TTTTCATTTTGCC-3', skirtas pET15b-6xHis-*Pf*Hsp90N (1–215 ar.) konstrukto gavimui. Pradmuo turi TAA geno translacijos pabaigos kodoną (atvirkštinis komplementarus kodonas mėlynas) ir XhoI kirpimo vietą (pabraukta žaliai).

Rekombinantinių baltymų 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. Rekombinantinių genų klonavimas

*Pf*Hsp90N (1–215 ar.) koduojančios geno dalies klonavimas

1. *Pf*Hsp90N (1–215 ar.) 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 pET15b_*Pf*Hsp90N_F;
 - 0,5 μM atvirkštinio pradmens pET15b_*Pf*Hsp90N_R;
 - 0,2 mM dNTP mišinio;
 - 1x *Pfu* DNR polimerazės buferio su MgSO₄;
 - 34 μl dejonizuoto vandens.

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: pradmenų prilydymas +57 °C temperatūroje 1 min, IV žingsnis: DNR sintezė +72 °C temperatūroje 2 min. Programa kartojama nuo II iki IV žingsnio 30 kartų. Jai pasibaigus, vykdomas DNR grandinės galų prisintetinimas +72 °C temperatūroje 10 min.

2. 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.
3. 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.
4. *PfHsp90N* (1–215 ar.) koduojančio konstrukto klonavimui naudojamas **PGR produktas ir vektorius kerpami** NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis. Šių restrikcijos endonukleazių atpažįstamos nukleotidų sekos yra įterptos į PGR produkto galus. Jos taip pat yra ir ekspresijos vektoriuje. Restrikcijai naudojama 500 ng DNR ir po 10 fermento aktyvumo vienetų NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazių. Reakcijos tūris 20 µl. Reakcija vykdoma 2 val +37 °C temperatūroje. Po reakcijos restrikcijos endonukleazės inaktyvuojamos palaikius mišinį 15 min +80 °C temperatūroje.
5. **Vektoriaus defosforilinimo** metu šarminė fosfatazė pašalina fosfato grupę nuo perkirpto 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 šarminės fosfatazės ir reikiamą kiekį 10x šarminės fosfatazės buferio. Reakcija vykdoma 15 min +37 °C temperatūroje. Reakcijai pasibaigus fermentas inaktyvuojamas palaikius mišinį 15 min +80°C temperatūroje.
6. Pasibaigus fermento inaktyvacijos laikui atliekama vektoriaus ir PGR produkto **elektroforezė 1,5% agarozės gelyje**. Mėginiai paruošiami kaip aprašyta anksčiau.
7. 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 (λ=260 nm). DNR laikoma -20 °C temperatūroje.
8. Kitas klonavimo etapas – baltymą koduojančios DNR ir raiškos vektoriaus **ligavimas** siekiant gauti konstruklą, kuriuo bus transformuoti *E. coli* kamienus. Ligavimui reikiamas DNR kiekis apskaičiuotas pagal formulę: $S \times (\text{įterpiamos DNR ilgis (kb)} / \text{linearizuoto vektoriaus ilgis (kb)}) \times \text{vektoriaus kiekis (ng)} = \text{DNR kiekis (ng)}$, kur

S yra įterpiamos DNR moliarinis santykis vektoriaus atžvilgiu. Mano darbe naudotas įterptos DNR ir vektoriaus moliarinis santykis – 3:1. Ligavimo mišinį sudaro:

25 ng vektoriaus;

11,6 ng PGR produkto;

1x 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 įterpiamos DNR. Reakcija vykdoma 5 min +22 °C temperatūroje.

9. Gautu konstruktu **transformuojamos** *E. coli* XLI–blue ląstelės (aprašyta toliau).

10. Iš bakterijų **išskiriama DNR** (aprašyta toliau).

11. Plazmidžių, turinčių 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. Gautas **pET15b–6xHis–P/Hsp90N(1–215 ar.)** konstruktas sekvenuojamas.

CAIV klonavimas į pCEP4dS vektorių

Bakalauro darbo metu buvo sukurtas pET15b–6xHis–CAIV(19–284 ar.) konstruktas, skirtas CAIV (19–284 ar.) raiškai *E. coli* ląstelėse. CAIV (19–284 ar.) koduojanti geno dalis į pET15b vektorių buvo įterpta naudojant NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazes. Norint perklonuoti CAIV (19–284 ar.) į pCEP4dS vektorių paaiškėjo, kad NdeI restrikcijos endonukleazė šį vektorių kerpa 19 kartų. Todėl vieną vektoriaus ir CAIV (19–284 ar.) galą teko „bukinti“. Klonavimo darbams naudoti greito karpymo fermentai.

1. Atliekama pET15b–6xHis–CAIV(19–284 ar.) **restrikcija** naudojant 10 µg DNR ir 25 fermento aktyvumo vienetus NdeI restrikcijos endonukleazės. Reakcija vykdoma 15 min +37 °C temperatūroje. Po reakcijos restrikcijos endonukleazė inaktyvuojama palaikius mišinį 15 min +80 °C temperatūroje.
2. Atliekama pCEP4dS **restrikcija** naudojant 10 µg DNR ir 25 fermento aktyvumo vienetus HindIII restrikcijos endonukleazės. Reakcija vykdoma 15 min +37 °C temperatūroje. Po reakcijos restrikcijos endonukleazė inaktyvuojama palaikius mišinį 15 min +80 °C temperatūroje.
3. „**Bukinant**“ perkirptus pCEP4dS vektoriaus ir pET15b–6xHis–CAIV(19–284 ar.) konstrukto galus į restrikcijos mišinius pridedama po 25 fermento aktyvumo vienetus Klenovo fragmento ir po 0,05 mM dNTP mišinio. Reakcija vykdoma 15 min +37 °C

- temperatūroje. Po reakcijos Klenovo reagentas inaktyvuojamas palaikius mišinį 15 min +80 °C temperatūroje.
4. CAIV (19–284 ar.) koduojanti geno dalis **iškerpama** iš pET15b vektoriaus naudojant XhoI restrikcijos endonukleazę. Šia endonukleaze kerpamas ir pCEP4dS vektorius. Tam tikslui į reakcijos mišinį pridedama po 25 fermento aktyvumo vienetų XhoI ir inkubuojama 15 min +37 °C temperatūroje. Po reakcijos fermentas inaktyvuojamas palaikius mišinį 15 min +80 °C.
 5. pCEP4dS vektorius **defosforilinamas**, kaip aprašyta anksčiau, tik į mišinį pridedama 2,5 fermento aktyvumo vienetų šarminės fosfatazės.
 6. Pasibaigus fermento inaktyvacijos laikui atliekama pCEP4dS vektoriaus ir pET15b–6xHis–CAIV(19–284 ar.) konstrukto **elektroforezė 1,5% agarozės gelyje**. Mėginiai paruošiami kaip aprašyta anksčiau.
 7. CAIV (19–284 ar.) geno dalis ir pCEP4dS 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.
 8. CAIV (19–284 ar.) geno dalis ir pCEP4dS vektorius **liguojami**. Ligavimo mišinį sudaro:
 - 100 ng pCEP4dS vektoriaus;
 - 30 ng CAIV (19–284 ar.);
 - 1x T4 DNR ligazės buferis;
 - 7,5 fermento aktyvumo vienetai T4 DNR ligazės;
 - 0,9 μ l dejonizuoto vandens.Reakcijos tūris 30 μ l. Kontrolinei reakcijai paruošiamas mišinys be CAIV (19–284 ar.). Reakcija vykdoma 30 min +22 °C temperatūroje.
 9. Gautu konstruktu **transformuojamos** *E. coli* XLI–blue ląstelės (aprašyta toliau).
 10. Iš bakterijų **išskiriama DNR** (aprašyta toliau).
 11. DNR, turinčios įstatytą fragmentą, **atrunkai** iš pavienių *E. coli* kolonijų išskirtos plazmidės karpomos HindIII ir XhoI, NcoI, PflMI restrikcijos endonukleazėmis. Restrikcijos produktai analizuojami 1,5% agarozės gelyje. Gautas **pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.)** konstruktas sekvenuojamas.

Introno klonavimas į pCEP4dS vektorių

SV40 mažasis T intronas ir polyA signalinė seka buvo iškirpti iš pCMV SPORT-βgal vektoriaus naudojant VspI ir NheI restrikcijos endonukleazes. pCEP4dS vektorius buvo kerpamas DraIII ir BamHI restrikcijos endonukleazes. Tiek vektoriaus, tiek introno po karpymo atsiradę galai „bukinami“. DraIII restrikcijos endonukleazė kerpa CAIV (19–284 ar.) klonuojančią geno dalį, todėl į vektorių iš pradžių buvo įterptas intronas, po to įklonuota CAIV (19–284 ar.) geno dalis, kaip aprašyta prieš tai. Klonavimui naudojami greito karpymo fermentai.

1. Atliekama pCMV SPORT-βgal vektoriaus **restrikcija** naudojant 10 μg DNR, 25 fermento aktyvumo vienetus VspI ir 25 fermento aktyvumo vienetus NheI restrikcijos endonukleazių. Reakcija vykdoma 15 min +37 °C temperatūroje. Po reakcijos restrikcijos endonukleazės inaktyvuojamos palaikius mišinį 15 min +80 °C temperatūroje.
2. Atliekama pCEP4dS vektoriaus **restrikcija** naudojant 10 μg DNR, 25 fermento aktyvumo vienetus DraIII ir 25 fermento aktyvumo vienetus BamHI restrikcijos endonukleazių. Reakcija vykdoma 15 min +37 °C temperatūroje. Po reakcijos restrikcijos endonukleazės inaktyvuojamos palaikius mišinį 15 min +80 °C temperatūroje.
3. „**Bukinant**“ lipnius pCEP4dS vektoriaus ir introno galus į restrikcijos mišinius pridedama po 25 fermento aktyvumo vienetus Klenovo fragmento ir po 0,05 mM dNTP mišinio. Reakcija vykdoma 15 min +37 °C temperatūroje. Po reakcijos Klenovo reagentas inaktyvuojamas palaikius mišinį 15 min +80 °C temperatūroje.
4. pCEP4dS vektorius **defosforilinamas**, kaip darant pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.) konstruklą.
5. Pasibaigus fermento inaktyvacijos laikui atliekama pCEP4dS vektoriaus ir introno **elektroforezė 1,5% agarozės gelyje**. Mėginiai paruošiami kaip aprašyta anksčiau.
6. Sukarpyti intronas ir pCEP4dS 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.
7. Intronas ir pCEP4dS vektorius **liguojami**. Ligavimo mišinį sudaro:
 - 100 ng pCEP4dS vektoriaus;
 - 21 ng introno;
 - 10% PEG₄₀₀₀;

1x T4 DNR ligazės buferio;

5 fermento aktyvumo vienetai T4 DNR ligazės;

1 µl dejonizuoto vandens.

Reakcijos tūris 10 µl. Kontrolinei reakcijai paruošiamas mišinys be DNR.

Reakcija vykdoma 1 val +22 °C temperatūroje.

8. Gautu konstruktą **transformuojamos** *E. coli* XLI–blue ląstelės (aprašyta toliau).
9. Iš bakterijų **išskiriama DNR** (aprašyta toliau).
10. DNR, turinčios įstatytą fragmentą, **atranksiai** iš pavienių *E. coli* kolonijų išskirtos plazmidės karpomos DraI, EcoRI ir BamHI restrikcijos endonukleazėmis. Restrikcijos produktai analizuojami 1,5% agarozės gelyje. Gautas pCEP4dSi konstruktas.
11. Į pCEP4dSi konstruktą įterpiama CAIV (19–284 ar.) geno dalis taip pat, kaip ir į pCEP4dS vektorių. Gautas **pCEP4dS–i–CAIV(19–284 ar.)** konstruktas sekvenuojamas.

Transliacijos stipriklio klonavimas į pCEP4dS vektorių

Transliacijos stipriklis buvo užsakytas iš „Linea libera“ ir turėjo BglII bei KpnI restrikcijos endonukleazių kirpimo vietas. Šiais fermentais buvo kerpamas ir pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.) konstruktas. BglII restrikcijos endonukleazė kerpa pCEP4dS dvejose vietose, todėl buvo atliekama dalinė restrikcija. Klonavimui naudojami greito karpymo fermentai.

1. Atliekama transliacijos stipriklio **restrikcija** naudojant 10 µg DNR, 25 fermento aktyvumo vienetus BglII ir 25 fermento aktyvumo vienetus KpnI restrikcijos endonukleazių. Reakcija vykdoma 15 min +37 °C temperatūroje. Po reakcijos restrikcijos endonukleazės inaktyvuojamos palaikius mišinį 15 min +80 °C temperatūroje.
2. Atliekama pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.) konstrukto **restrikcija** naudojant 10 µg DNR, 25 fermento aktyvumo vienetus BglII ir 25 fermento aktyvumo vienetus KpnI restrikcijos endonukleazių. Reakcija vykdoma 2, 3, 4 arba 5 min +37 °C temperatūroje. Po reakcijos restrikcijos endonukleazės inaktyvuojamos palaikius mišinį 15 min +80 °C temperatūroje.
3. pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.) konstruktas **defosforilinamas**.
4. Pasibaigus fermento inaktyvacijos laikui atliekama pCEP4–CAIV(19–284 ar.) konstrukto ir transliacijos stipriklio **elektroforezė 1,5% agarozės gelyje**. Mėginiai paruošiami kaip aprašyta anksčiau.

5. Sukarpyti transliacijos stipriklis ir pCEP4–CAIV(19–284 ar.) konstruktas **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.
6. Transliacijos stipriklis ir pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.) konstruktas **liguojami**. Ligavimo mišinį sudaro:
 - 100 ng pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.) konstrukto;
 - 1,6 ng transliacijos stipriklio;
 - 1x T4 DNR ligazės buferio;
 - 5 fermento aktyvumo vienetai T4 DNR ligazės;
 - 3,6 μ l dejonizuoto vandens.

Reakcijos tūris 10 μ l. Kontrolinei reakcijai paruošiamas mišinys be įterpiamos DNR. Reakcija vykdoma 15 min +22 °C temperatūroje.
7. Gautu konstruktu **transformuojamos** *E. coli* XLI–blue ląstelės (aprašyta toliau).
8. Iš bakterijų **išskiriama DNR** (aprašyta toliau).
9. DNR, turinčios įstatytą fragmentą, **atrankai** iš pavienių *E. coli* kolonijų išskirtos plazmidės karpomos BglII ir KpnI restrikcijos endonukleazėmis. Restrikcijos produktai analizuojami 1,5% agarozės gelyje. Gautas **pCEP4dS–e–CAIV(19–284 ar.)** konstruktas sekvenuojamas.

Konstrukto, turinčio introną ir transliacijos stipriklių, kūrimas

Konstruktas, turintis CAIV (19–284 ar.) koduojančią geno dalį bei transliacijos stipriklių ir introną, buvo sukurtas iš pCEP4dS–i–CAIV(19–284 ar.) ir pCEP4dS–e–CAIV(19–284 ar.) konstrukto sukarpius juos EcoRI ir HindIII restrikcijos endonukleazėmis.

1. Atliekama pCEP4dS–i–CAIV(19–284 ar.) ir pCEP4dS–e–CAIV(19–284 ar.) konstrukto **restrikcija** naudojant 10 μ g DNR, 25 fermento aktyvumo vienetus EcoRI ir 25 fermento aktyvumo vienetus HindIII restrikcijos endonukleazių. Reakcija vyksta 15 min +37 °C temperatūroje. Po reakcijos restrikcijos endonukleazės inaktyvuojamos palaikius mišinį 15 min +80 °C temperatūroje.
2. pCEP4dS–i–CAIV(19–284 ar.) konstruktas **defosforilinamas**.
3. Pasibaigus fermento inaktyvacijos laikui atliekama pCEP4dS–i–CAIV(19–284 ar.) ir pCEP4dS–e–CAIV(19–284 ar.) konstrukto **elektroforezė 1,5% agarozės gelyje**. Mėginiai paruošiami kaip aprašyta anksčiau.

4. Norimos sukarpytų konstrukčių dalys **išskiriamos 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.
5. Konstrukčių dalys **liguojamos**. Ligavimo mišinį sudaro:
 - 100 ng pCEP4dS–i–CAIV(19–284 ar.) konstrukto dalies su CAIV (19–284 ar.) ir introną koduojančia DNR;
 - 103 ng iš pCEP4dS–e–CAIV(19–284 ar.) iškirptos transliacijos stipriklį koduojančios DNR;
 - 1x T4 DNR ligazės buferio;
 - 5 fermento aktyvumo vienetai T4 DNR ligazės;
 - 2,8 µl dejonizuoto vandens.

Reakcijos tūris 20 µl. Kontrolinei reakcijai paruošiamas mišinys be DNR. Reakcija vykdoma 15 min +22 °C temperatūroje.
6. Gautu konstruktu **transformuojamos** *E. coli* XLI–blue ląstelės (aprašyta toliau).
7. Iš bakterijų **išskiriama DNR** (aprašyta toliau).
8. DNR, turinčios įstatytą fragmentą, **atrankai** iš pavienių *E. coli* kolonijų išskirtos plazmidės karpomos EcoRI ir HindIII, BamHI, BglII ir KpnI restrikcijos endonukleazėmis. Restrikcijos produktai analizuojami 1,5% agarozės gelyje. Gautas **pCEP4dS–ei–CAIV(19–284 ar.)** konstruktas sekvenuojamas.

Transformacija

Kompetentinių ląstelių paruošimas

1. *E. coli* ląstelės užsėjamos ant Petri lėkštelės su kieta agarizuota LB terpe ir auginamos pernakt +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 -80 °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 gaivamos +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 su 100 µg/ml ampicilino ir per naktį auginamos +37 °C temperatūros termostate.

DNR išskyrimas iš bakterijų

Norint išskirti gryną konstruktą ar/ir gauti jo didesnę kiekį, reikalingą atlikti tolimesnes procedūras (pavyzdžiui, DNR sekvenavimą), konstruktą 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 nusiurbiamą. 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“ ($\lambda=260$ nm). DNR laikoma -20°C temperatūroje.

Baltymų gavimui eukariotų raiškos sistemose išskiriami dideli DNR kiekiai. Skyrimo išvakarėse pavienė transformantų kolonija perkeliama į kolbą su 200 ml LB terpės ir 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilino. Ląstelės auginamos per naktį $+37^{\circ}\text{C}$ jas purtant 220 aps./min greičiu. Pasibaigus auginimo laikui terpė su ląstelėmis centrifuguojama $5000\times g$ greičiu 10 min kambario temperatūroje. Terpė nupilama, DNR išskiriama naudojant „GeneJET™ Plasmid Maxiprep Kit“ pagal gamintojų pateiktas rekomendacijas. DNR koncentracija matuojama spektrofotometru „Agilent 8453“ ($\lambda=260$ nm; 280 nm; 320 nm). Santykis tarp optinio tankio, gauto esant 260 nm ir 280 nm bangos ilgiui, turi būti daugiau kaip 1,8. DNR filtruojama ir laikoma -20°C temperatūroje.

2.2.2. Rekombinantinių baltymų raiška

Transformantų biomasės auginimas

Toliau aprašyta metodika buvo naudojama *PfHsp90N* (1–215 ar.) geno raiškos gavimui.

1. Rekombinantinio baltymo raiškai gauti *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)CodonPlus–RIL, BL21(DE3)pLysS, BL21 Star (DE3) One Shot, Rosetta2(DE3) kamienai transformuojami *PfHsp90N* (1–215 ar.) baltymą koduojančiu konstruktui ir užsėjami ant Petri lėkštelės su selektyvia, antibiotikų turinčia agarizuota LB terpe. Auginant transformuotas BL21(DE3) ir BL21 Star (DE3) One Shot kamieno ląsteles į LB terpę dedama 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilino. Auginant kitų kamienų transformuotas ląsteles dedama 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilino ir 34 $\mu\text{g/ml}$ chloramfenikolio.
2. Iš užaugusių pavienių transformantų kolonijų atrenkama viena kolonija ir perkeliama į kolbą su 100 ml terpės ir atitinkamu antibiotiku. Auginant konstruktui transformuotas BL21(DE3) ir BL21 Star (DE3) One Shot ląsteles į terpę dedama 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilino. Auginant kitų kamienų ląsteles dedama dar ir 34 $\mu\text{g/ml}$ chloramfenikolio.
3. Ląstelės auginamos per naktį $+37^{\circ}\text{C}$ temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu. Ryte į kolbas su 400 ml terpės pridedama atitinkamų antibiotikų bei įpilama po 8 ml per naktį augintos bakterijų kultūros. Bakterijos auginamos $+37^{\circ}\text{C}$ temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu, kol jų optinis tankis ($\lambda=600$ nm) pasiekia 0,8. Geno raiška

indukuojama pridedant 1 mM IPTG. Bakterijos auginamos 20 val +20 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu.

4. Rekombinantinio baltymo raiškai patikrinti ruošiami ląstelių lizatų mėginiai, kurie analizuojami atliekant elektroforezę 12% SDS–poliakrilamido gelyje. Ląstelių auginimo metu joms pasiekus optinį tankį ($\lambda=600$ nm) 0,8 paimamas 300 μ l ląstelių mėginys prieš tikslinio baltymo indukciją. Norint įsitikinti, kad į terpę pridėjus tikslinio baltymo raiškos induktoriaus IPTG vyko rekombinantinio baltymo raiška ląstelėse, pasibaigus ląstelių auginimo laikui vėl imama ląstelių suspensija (apie 1 ml) ir matuojamas jos optinis tankis ($\lambda=600$ nm). Po tikslinio baltymo raiškos indukcijos paimamas tokio tūrio ląstelių mėginys, kad prieš ir po baltymo raiškos indukciją paimtuose mėginiuose ląstelių kiekis būtų toks pats. Mėginiai centrifuguojami 2 min 3300×g greičiu. Skystis nusiurbiamas. Mėginiai suspenduojami 50 μ l 1x SDS–poliakrilamido gelio pavyzdžio dažo ir 5 min palaikomi +95 °C temperatūroje. Ląstelių biomasė 20 min centrifuguojama 4000×g greičiu +4 °C temperatūroje. Skystis nupilamas. Biomasė laikoma -20 °C temperatūroje iki gryninimo.

Transfekcija ir geno raiška žinduolių ląstelėse

CAIV (19–284 ar.) baltymas buvo gautas žmogaus ląstelių linijoje HEK 293–F naudojant „FreeStyle™ MAX 293 Expression System“. Ląstelės auginamos ir transfekcija atliekama pagal „Invitrogen“ pateiktas rekomendacijas. Ląstelės auginamos 125 – 500 ml tūrio Erlenmejerio kolbose su 30 – 120 ml „FreeStyle™ 293“ terpės CO₂ inkubatoriuje–purtyklėje, kuriame palaikoma +37 °C temperatūra ir 8% CO₂ koncentracija. Ląstelės purtomos 135 aps./min greičiu. Ląstelės persėjamos kas 48 – 72 val, kiekvieną kartą praskiedžiant kultūrą tiek, kad ląstelių tankis būtų 0,3 – 0,5 · 10⁶ ląst./ml. Ląstelių gyvybingumas ir tankis įvertinamas mikroskopiškai naudojant hemacitometrą (Invitrogen) ir tripano mėlį. Nedidelis ląstelių suspensijos kiekis 5 – 8 kartus praskiedžiamas fosfatinio buferiu. Skiedimų skaičius nustatomas eksperimentiškai, praskiestos ląstelės turi padengti hemacitometrą vienu sluoksniu. Ląstelių gyvybingumui nustatyti į praskiestą ląstelių suspensiją pridedama tripano mėlio (galutinė koncentracija 0,04%). Tripano mėlis praeina per negyvų ląstelių membranas ir nudažo jas mėlynai. Kad transfekcija būtų efektyvi, ląstelių gyvybingumas turi būti virš 90%.

Ląstelės transfekuojamos, kai jų tankis 1 · 10⁶ ląst./ml. Prieš transfekciją mikroskopu įvertinama ląstelių būklė: turi nebūti daug agregatų. 30 ml ląstelių suspensijai naudojama 37,5 μ g DNR, 37,5 μ l „FreeStyle™ MAX“ transfekcijos reagento ir 1,2 ml

„OptiPRO™ SFM“ terpės. Į 1,5 ml talpos mėgintuvėlius įpilama po 600 µl „OptiPRO™ SFM“ terpės. Į vieną iš jų pridedama 37,5 µg DNR, į kitą – šiek tiek sumaišyto 37,5 µl „FreeStyle™ MAX“ transfekcijos reagento. Terpė ir transfekcijos reagentas sumaišomi ir supilami ant terpės su DNR. Mišiniai sumaišomi ir 10 min inkubuojami kambario temperatūroje. Po inkubacijos mišinys sulašinamas ant lėtai maišomų ląstelių. Po transfekcijos ląstelės gamina baltymą 5 dienas, išskirdamos jį į terpę. Rekombinantinio baltymo raiškai patikrinti ruošiami ląstelių augimo terpės mėginiai, kurie analizuojami atliekant elektroforezę 12% SDS–poliakrilamido gelyje. Paimama apie 100 µl ląstelių suspensijos ir ji nucentrifuguojama 5 min 10000×g greičiu kambario temperatūroje. Surenkama ląstelių terpė, į ją įpilama 6x SDS–poliakrilamido gelio pavyzdžio dažo ir 5 min palaikomi +95 °C temperatūroje.

Baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje

Baltymų elektroforezė vykdoma siekiant pamatyti tikslinio baltymo geno raišką. Tarp 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 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 °C temperatūroje pakaitintas baltymų dydžio žymuo ir anksčiau aprašytu būdu paruošti mėginiai. 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 °C temperatūroje jį purtant 70 purt./min greičiu. Tada 10 min blukinamas verdančiame distiliuotame vandenyje.

Baltymo tirpumo tikrinimas ir gryninimas

PfHsp90N (1–215 ar.) baltymas gryninamas pagal metodiką, aprašytą Kevin Corbett ir James Berger straipsnyje (2010 m.). Gryninama metalochelatinės chromatografijos būdu naudojant „ÄKTA purifier“ sistemą. Gryninimui naudoti buferiai pateikiami 2.1.3 skyrelyje.

Toliau aprašyta baltymo tirpumo tikrinimui ir gryninimui naudota metodika.

1. Tikrinant baltymo tirpumą 1 g biomasės užpilamas 6 ml I buferio. Pridedama 1 mM PMSF ir 1 mM merkaptioetanolio. Maišoma 1 val +4 °C ant magnetinės maišyklės.
2. Biomasė ardoma ultragarsu 7 kartus po 30 s darant 30 s pertraukas.
3. Baltymų tirpalas išpilstomas į 1,5 ml talpos mėgintuvėlius ir 30 min centrifuguojamas 16000×g greičiu +4 °C temperatūroje. Tirpi frakcija surenkama į mėgintuvėlį.
4. Mėgintuvėliuose likusios nuosėdos ištirpinamos 500 µl 8 M karbamido.
5. Tirpios ir netirpios frakcijos baltymų koncentracija nustatoma Bradfordo metodu (Bradford, 1976).
6. Baltymų elektroforezei imama po 10 µg baltymo. Baltymų mėginiai paruošiami ir analizuojami 12% SDS–poliakrilamido gelyje, kaip aprašyta ankstesniame skyrelyje. Didesnio biomasės kiekio auginimui pasirenkamas tas bakterijų kamienas, kuriame gauta daugiausiai tirpaus baltymo.
7. *PfHsp90N* (1–215 ar.) gryninamas iš 12 g biomasės. Užpilama 72 ml I buferio, pridedamas 1 mM PMSF, 1 mM merkaptioetanolio ir 1 val maišoma +4 °C ant maišyklės.
8. Ardoma ultragarsu 5 kartus po 60 s darant 60 s pertraukas.
9. Centrifuguojama 30 min +4 °C temperatūroje 12600×g greičiu.
10. Baltymo tirpalas surenkamas ir leidžiamas per kolonėlę, užpildytą 10 ml chelatinės sefarožės su Ni²⁺ jonais (Ni Sepharose™ 6 Fast Flow). Prieš leidžiant baltymą kolonėlė pusiausvyrinama plaunant 10 tūrių I buferio su 1 mM merkaptioetanolio. Tekėjimo greitis – 1,5 ml/min.
11. Prie chelatinės sefarožės su Ni²⁺ jonais neprisijungę baltymai išplaunami naudojant I buferį. Plaunama tol, kol iš kolonėlės ištekančiame buferyje nebėra baltymų. Tai sužinoma analizuojant chromatogramą ir matuojant frakcijose esančių baltymų koncentraciją Bradfordo metodu (Bradford, 1976).
12. Baltymas desorbuojamas nuo kolonėlės naudojant II buferį su 1 mM merkaptioetanolio.
13. Baltymo koncentracija nustatoma Bradfordo metodu (Bradford, 1976).
14. Ruošiami baltymų mėginiai, kurie analizuojami 12% SDS–poliakrilamido gelyje.
15. Frakcijos, kuriose matomas tikslinis baltymas be priemaišų, apjungiamos ir dializuojamos per naktį dializės buferyje, vėliau – 2 val dializės buferyje be EDTA.
16. Nustatoma baltymo koncentracija Bradfordo metodu (Bradford, 1976). Baltymas išpilstomas į 1,5 ml talpos mėgintuvėlius ir saugomas -80 °C temperatūroje.

CAIV (19–284 ar.) buvo gaminama žinduolių ląstelėse ir išskiriama į terpę. Terpėje nesimatė jokių nuosėdų, taigi baltymas buvo tirpus ir jo tirpumo tikrinti nereikėjo.

Baltymas grynintas giminingumo chromatografijos būdu naudojant „LKB BROMMA“ gryninimo sistemą. Gryninimui naudoti buferiai pateikiami 2.1.3 skyrelyje.

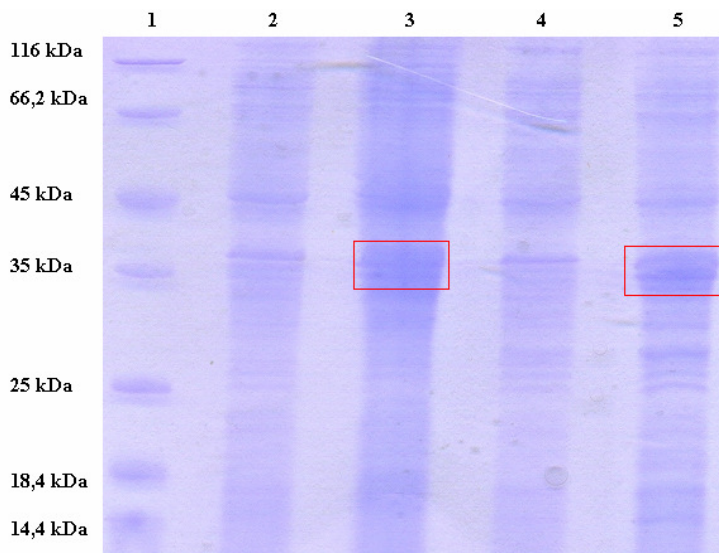
Baltymas grynintas pagal toliau aprašytą metodiką.

1. Ląstelių suspensija centrifuguojama 10 min 4000×g greičiu kambario temperatūroje.
2. Į terpę pridedama 10% III buferio ir 4 ml afininio sorbento *p*-aminometilbenzensulfonamido agarozės. Terpė su III buferiu ir sorbentu per naktį maišoma +4 °C temperatūroje.
3. Ryte terpė su sorbentu perkeliama į kolonėlę. Nesorbuoti baltymai išplaunami iš kolonėlės naudojant III buferį.
4. CAIV (19–284 ar.) desorbuojama nuo kolonėlės naudojant IV buferį.
5. Baltymo koncentracija išmatuojama spektrofotometru ($\lambda=280$ nm).
6. Ruošiami baltymų mėginiai, kurie analizuojami 12% SDS–poliakrilamido gelyje.
7. Frakcijos, kuriose matomas tikslinis baltymas be priemaišų, apjungiamos ir dializuojamos per naktį dializės buferyje II.
8. Nustatoma baltymo koncentracija spektrofotometru. Baltymas išpilstomas mažais tūriais ir saugomas -80 °C temperatūroje.

III. REZULTATAI

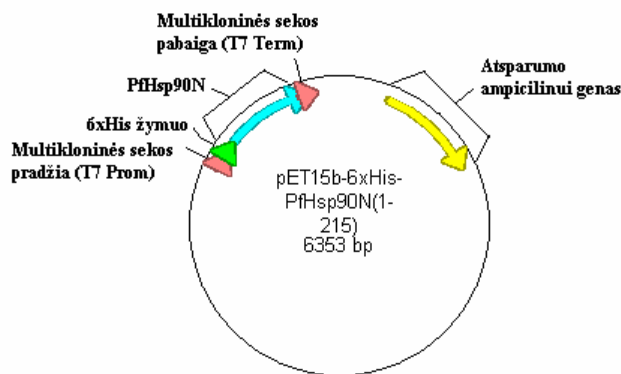
3.1. Rekombinantinio *PfHsp90N* (1–215 ar.) klonavimas ir raiška

Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje kuriami slopikliai, kurie turėtų konkuruoti su ATP jungdamiesi prie baltymo aktyvaus centro. Iš literatūros duomenų žinoma, kad *PfHsp90* aktyvusis centras yra šio baltymo N galo domene, todėl buvo nuspręsta gaminti ne pilną baltymą, o tik N galo domeną. Iš pradžių buvo bandyta gauti rekombinantinį baltymą panaudojant anksčiau laboratorijoje sukonstruotą pET15b–6xHis–*PfHsp90N*(1–246 ar.) konstrukta, koduojantis 6xHis žymenį N gale, N galo domeną ir dalį įkrautos jungties, iš viso 246 ar. ilgio baltymą. Buvo išbandytos įvairios sąlygos *PfHsp90N* (1–246 ar.) gauti. *PfHsp90N* (1–246 ar.) bandyta gauti *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)CodonPlus–RIL, Rosetta2(DE3) ir BL21 Star (DE3) One Shot kamienų ląstelėse. Geno raiška buvo indukuota naudojant 0,25–1 mM IPTG. Po indukcijos ląstelės buvo auginamos 3–20 val +20–37 °C temperatūroje. *PfHsp90N* (1–246 ar.) geno raišką pavyko gauti tik konstruktu transformuotas BL21(DE3)pLysS ir BL21 Star (DE3) One Shot ląsteles auginant +20 °C temperatūroje 18 val LB terpėje purtant 220 aps./min greičiu po tikslinio baltymo raiškos indukcijos 1 mM IPTG. Gauta labai maža geno raiška, o baltymo išgryninti nepavyko (9 pav.).



9 pav. *E. coli* baltymų elektroforezės vaizdas poliakrilamido gelyje (raudonai apibrėžtas apie 30 kDa dydžio *PfHsp90N* (1–246 ar.)). **1 takelis** – baltymų dydžio žymuo #SM0431; **2 takelis** – BL21 Star (DE3) One Shot ląstelių lizatas prieš *PfHsp90N* geno raiškos indukciją; **3 takelis** – BL21 Star (DE3) One Shot ląstelių lizatas po *PfHsp90N* geno raiškos indukcijos; **4 takelis** – BL21(DE3)pLysS ląstelių lizatas prieš *PfHsp90N* geno raiškos indukciją; **5 takelis** – BL21(DE3)pLysS ląstelių lizatas po *PfHsp90N* geno raiškos indukcijos.

Analizuojant pET15b–6xHis–*PfHsp90N*(1–246 ar.) konstrukto koduojamo baltymo seką buvo pastebėta, kad koduojamo baltymo C gale yra labai daug pasikartojančių krūvį turinčių glutamo rūgšties liekanų. Gali būti, kad daugybė pasikartojančių kodonų lemia transkripcijos arba translacijos klaidas, todėl baltymas nesintetinamas. Analizuojant literatūrą pastebėta, kad norint tirti *PfHsp90N* kuriami konstruktai, koduojantys baltymus nuo 1 iki 215 ar. (Corbett ir Berger, 2010; Pallavi ir kiti, 2010). Buvo nuspręsta sukurti konstruklą, koduojantį *PfHsp90N* (1–215 ar.) (10 pav.). Šis baltymas neturi ankstesnio konstrukto koduotos įkrautos jungties dalies (11 pav.).



10 pav. pET15b–6xHis–*PfHsp90N*(1–215 ar.) raiškos konstruktas.

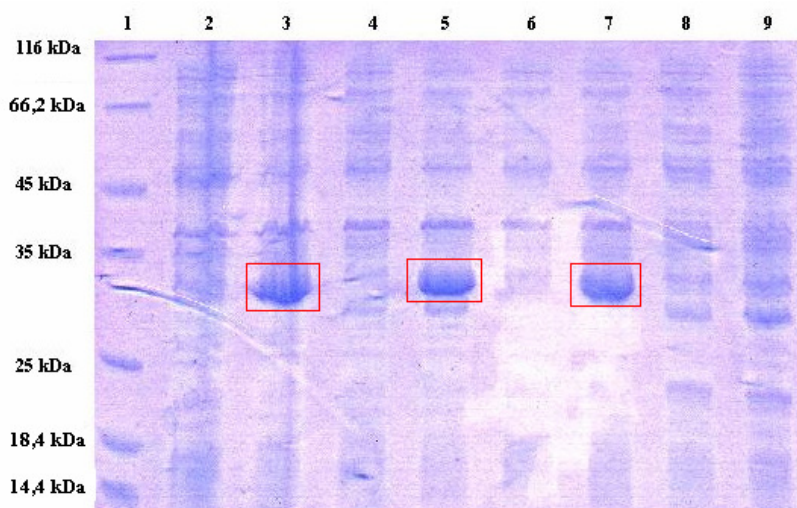
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Hsp90_Uniprot	HSTETFAFNADIRQLHSLIINTFYSNKEIFLRELISNASDALKIRYESITDTQKLSAEPEFFIRIIPKTNNTLTIEDSGIGHTKNDLINNLGTIARSGTKAFHEIQIA													
Hsp90(1–246)	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHHSTETFAFNADIRQLHSLIINTFYSNKEIFLRELISNASDALKIRYESITDTQKLSAEPEFFIRIIPKTNNTLTIEDSGIGHTKNDLINNLGTIARSGTKAFHEIQIA													
Hsp90(1–215)	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHHSTETFAFNADIRQLHSLIINTFYSNKEIFLRELISNASDALKIRYESITDTQKLSAEPEFFIRIIPKTNNTLTIEDSGIGHTKNDLINNLGTIARSGTKAFHEIQIA													
	N galo domenai													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Hsp90_Uniprot	SGDISHIGDFGVGFYSAYLYADHVVYVYSKNNDEQYVWESRAGGSFTVTKDETNEKLGRGKTIILHLKEDQLEYLEEKRIKDLVKKHSEFISFPIKLYCERQNEKEITASEEEEEGEGEGEGEGEEEEKK													
Hsp90(1–246)	SGDISHIGDFGVGFYSAYLYADHVVYVYSKNNDEQYVWESRAGGSFTVTKDETNEKLGRGKTIILHLKEDQLEYLEEKRIKDLVKKHSEFISFPIKLYCERQNEKEITASEEEEEGEGEGEGEGEEEEKK													
Hsp90(1–215)	SGDISHIGDFGVGFYSAYLYADHVVYVYSKNNDEQYVWESRAGGSFTVTKDETNEKLGRGKTIILHLKEDQLEYLEEKRIKDLVKKHSEFISFPIKLYCERQNEKEITASEEEEEGEGEGEGEGEEEEKK													
	Įkrauta jungtis													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Hsp90_Uniprot	KKTGEDKNADESKEENEDEEKKEDNEEDDNKTDHPKYEDVTELENRAEKKKEKKKIHITVEHEEELNKQKPLHMRKPEEVTNNEYASFYKSLTNDMEDHLAYKHFSYEGQLEFKALLFIPKRAPFDM													
Hsp90(1–246)	KKTGEDKNADESKEENEDEEKKEDNEEDDNKTDHPKYEDVTELENRAEKKKEKKKIHITVEHEEELNKQKPLHMRKPEEVTNNEYASFYKSLTNDMEDHLAYKHFSYEGQLEFKALLFIPKRAPFDM													
Hsp90(1–215)	KKTGEDKNADESKEENEDEEKKEDNEEDDNKTDHPKYEDVTELENRAEKKKEKKKIHITVEHEEELNKQKPLHMRKPEEVTNNEYASFYKSLTNDMEDHLAYKHFSYEGQLEFKALLFIPKRAPFDM													
	Vidurio domenai													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
Hsp90_Uniprot	DRMKNQKDIYYITGESINAVSNSPFLREALTKKGFEVIYHVPDIEYAYQQLKDFDGKLLKCTKEGLDIDDSEAAKKDFETLKAIEYGLCKYIKDYLHEKVEKVVYVGGQRTDSDPCVLVTFSEFGASANHE													
Hsp90(1–246)	DRMKNQKDIYYITGESINAVSNSPFLREALTKKGFEVIYHVPDIEYAYQQLKDFDGKLLKCTKEGLDIDDSEAAKKDFETLKAIEYGLCKYIKDYLHEKVEKVVYVGGQRTDSDPCVLVTFSEFGASANHE													
Hsp90(1–215)	DRMKNQKDIYYITGESINAVSNSPFLREALTKKGFEVIYHVPDIEYAYQQLKDFDGKLLKCTKEGLDIDDSEAAKKDFETLKAIEYGLCKYIKDYLHEKVEKVVYVGGQRTDSDPCVLVTFSEFGASANHE													
	C galo domenai													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	765	
Hsp90_Uniprot	RIMKAQALRDSNHTSYHLKKIMEINARHPIISALKQKADADKSDTKVDLIMLLFDTSLTSGFALPEPTTFSGRIHRIKILGLSIDEENNDDIDLPLEEVTVDATDSKHEEYD													
Hsp90(1–246)	RIMKAQALRDSNHTSYHLKKIMEINARHPIISALKQKADADKSDTKVDLIMLLFDTSLTSGFALPEPTTFSGRIHRIKILGLSIDEENNDDIDLPLEEVTVDATDSKHEEYD													
Hsp90(1–215)	RIMKAQALRDSNHTSYHLKKIMEINARHPIISALKQKADADKSDTKVDLIMLLFDTSLTSGFALPEPTTFSGRIHRIKILGLSIDEENNDDIDLPLEEVTVDATDSKHEEYD													

11 pav. Rekombinantinių *PfHsp90N* (1–215 ar.), *PfHsp90N* (1–246 ar.) ir laukinio tipo *PfHsp90* aminorūgščių sekų palyginimas.

Kuriant pET15b–6xHis–*PfHsp90N*(1–215 ar.) raiškos konstruklą, visi klonavimo darbai buvo atlikti pagal standartinius protokolus. DNR seka, koduojanti *PfHsp90*

nuo 1 iki 215 ar., buvo padauginta PGR metodu, kirpta NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis ir klonuota į tomis pačiomis restrikcijos endonukleazėmis kirptą pET15b vektorių. Pradmenų sekos pateiktos „Medžiagų ir metodų“ skyriuje.

Rekombinantinis *PfHsp90N* (1–215 ar.) buvo auginamas BL21(DE3), BL21(DE3)CodonPlus–RIL, BL21 Star (DE3) One Shot, Rosetta2(DE3) kamienų ląstelėse LB terpėje. BL21(DE3)pLysS kamieną taip pat norėta naudoti baltymo gavimui, tačiau po transformacijos ant Petri lėkštelės neužaugo nė viena BL21(DE3)pLysS ląstelių kolonija. Tikslinio baltymo raiška indukuota su 1 mM IPTG. Po indukcijos ląstelės buvo auginamos 18 val +20 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu. Tokios bakterijų auginimo sąlygos buvo pasirinktos remiantis Kevin Corbett ir James Berger straipsniu bei laboratorijos patirtimi. Pastebėta, kad auginant indukuotas ląsteles ilgesnį laiką žemesnėje temperatūroje dažniau gaunamas teisingos struktūros tikslinis baltymas. Auginant ląsteles tokiomis sąlygomis buvo gauta labai maža *PfHsp90N* (1–246 ar.) geno raiška. 26535,9 Da dydžio *PfHsp90N* (1–215 ar.) (ProtParam duomenų bazė) gautas BL21(DE3), BL21(DE3)CodonPlus–RIL ir BL21 Star (DE3) One Shot kamienuose (12 pav.).

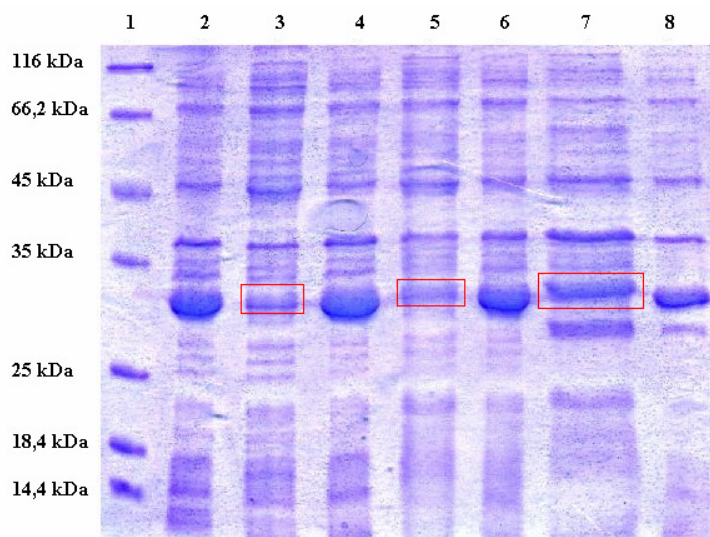


12 pav. *E. coli* baltymų elektroforezės vaizdas poliakrilamido gelyje (raudonai apibrėžtas apie 26 kDa dydžio *PfHsp90N* (1–215 ar.)). **1 takelis** – baltymų dydžio žymuo #SM0431; **2 ir 3 takeliai** – BL21(DE3) ląstelių lizatas prieš (2) ir po (3) *PfHsp90N* geno raiškos indukcijos; **4 ir 5 takeliai** – BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląstelių lizatas prieš (4) ir po (5) *PfHsp90N* geno raiškos indukcijos; **6 ir 7 takeliai** – BL21 Star (DE3) One Shot ląstelių lizatas prieš (6) ir po (7) *PfHsp90N* geno raiškos indukcijos; **8 ir 9 takeliai** – Rosetta2(DE3) ląstelių lizatas prieš (8) ir po (9) *PfHsp90N* geno raiškos indukcijos.

BL21(DE3), BL21(DE3)CodonPlus–RIL ir BL21 Star (DE3) One Shot kamienai buvo pasirinkti tolesniam darbui – *PfHsp90N* tirpumo tikrinimui ir gryninimui.

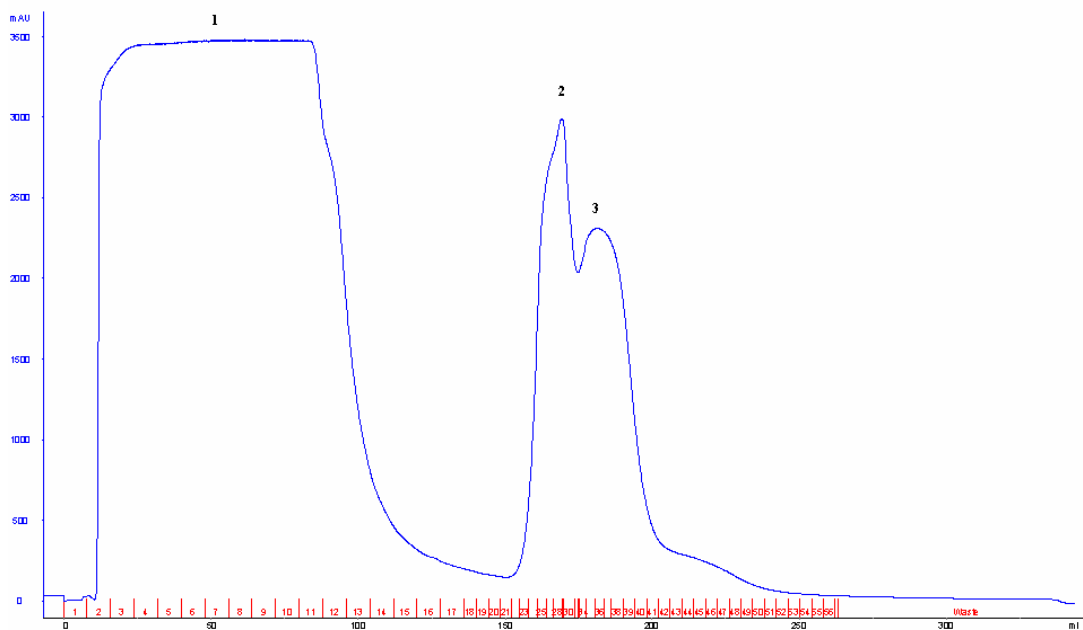
3.2. Rekombinantinio *PfHsp90N* (1–215 ar.) tirpumo tikrinimas ir gryninimas

Baltymo tirpumo tikrinimui buvo naudojama BL21(DE3)CodonPlus–RIL, BL21(DE3) ir BL21 Star (DE3) One Shot kamienų ląstelių biomasė. Tirpumo tikrinimas aprašytas medžiagų ir metodų skyrelyje. Gauti rezultatai pateikti 13 pav.

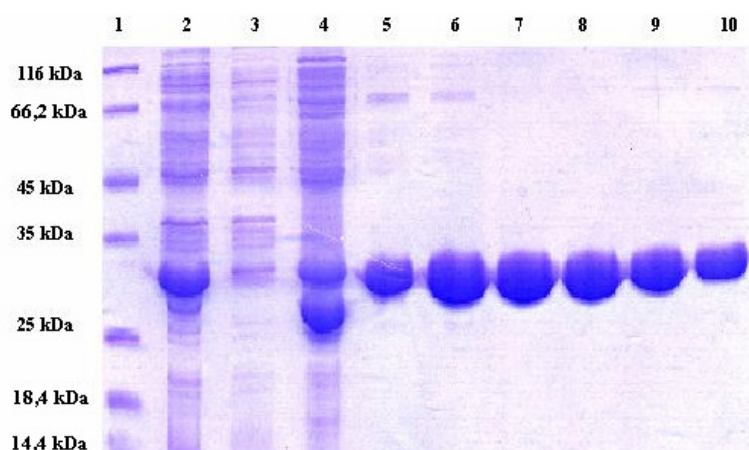


13 pav. *E. coli* baltymų elektroforezės vaizdas poliakrilamido gelyje (raudonai apibrėžta apie 26 kDa dydžio tirpi *PfHsp90N* (1–215 ar.) frakcija). **1 takelis** – baltymų dydžio žymuo #SM0431; **2 takelis** – ląstelių lizatas po *PfHsp90N* geno raiškos indukcijos; **3 ir 4 takeliai** – BL21(DE3) ląstelių lizato tirpi (3) ir netirpi (4) frakcijos; **5 ir 6 takeliai** – BL21 Star (DE3) One Shot ląstelių lizato tirpi (5) ir netirpi (6) frakcijos; **7 ir 8 takeliai** – BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląstelių lizato tirpi (7) ir netirpi (8) frakcijos.

Iš 13 pav. matosi, kad didžioji dalis baltymo yra netirpi nepriklausomai nuo bakterijų kamieno. Kadangi iš 1 g biomasės buvo gautas sąlyginai didelis tirpaus baltymo kiekis, buvo nuspręsta baltymą gryninti ir tik nesėkmės atveju ieškoti būdų tirpumui padidinti. Didesnis biomasės kiekis gryninimui buvo auginamas BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląstelėse, nes jose buvo matomas didžiausias tirpaus baltymo kiekis. *PfHsp90N* (1–215 ar.) buvo gryninamas pagal aprašymą medžiagų ir metodų skyrelyje. Rezultatai pateikiami 14 ir 15 pav.



14 pav. *Pfhsp90N* (1–215 ar.) gryninimo chromatograma. Mėlyna kreivė rodo baltymo sugerties intensyvumą 280 nm bangos ilgyje. **1 pikas** – nesorbuoti baltymai; **2 pikas** – sorbuotas netikslinis baltymas; **3 pikas** – sorbuotas tikslinis *Pfhsp90N* (1–215 ar.) baltymas.



15 pav. *Pfhsp90N* (1–215 ar.) gryninimo vaizdas poliakrilamido gelyje. **1 takelis** – baltymų dydžio žymuo #SM0431; **2 takelis** – nesorbuoti baltymai (1 pikas); **3 takelis** – nesorbuoti baltymai tarp 1 ir 2 piko; **4 takelis** – sorbuotas netikslinis baltymas (2 pikas); **5–10 takeliai** – sorbuotas tikslinis *Pfhsp90N* (1–215 ar.) baltymas (3 pikas).

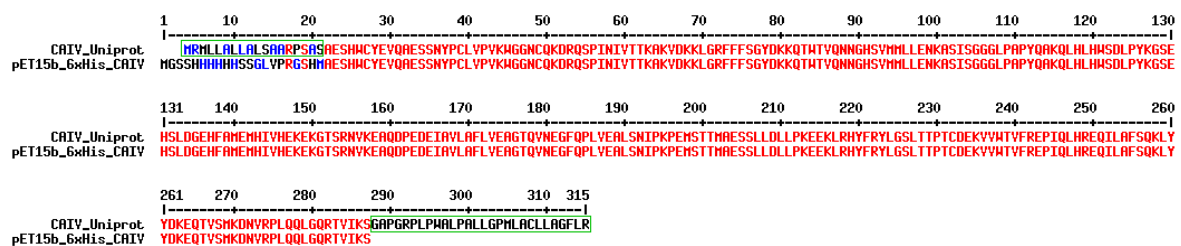
Iš 14 pav. matosi, kad sorbuotas baltymas išeina 2 pikais. Desorbcijos pradžioje desorbuojamas kažkoks bakterijų sintetinas baltymas (2 pikas), kuris savo paviršiuje tikriausiai turi kelis His ir sąveikauja su kolonėlėje esančiais Ni^{2+} jonais. Kelis His turintys baltymai desorbuojami esant mažai imidazolo koncentracijai, tuo tarpu baltymai su 6xHis uodegėle – kai imidazolo koncentracija 0,2–1 M. Atlikus baltymų elektroforezę 12% SDS–poliakrilamido gelyje, 4 takelyje, kuriame analizuojami 2 piko baltymai, matomas apie 25 kDa dydžio baltymas, kurio nėra kituose takeliuose (15 pav.). Greičiausiai šis baltymas ir yra kelis His turintis baltymas. 5 ir 6 takeliuose, kuriuose analizuojamas *Pfhsp90N* (1–215 ar.)

baltymas, matomas dar vienas apie 66,2 kDa dydžio baltymas. Kadangi tikslinio baltymo išgryninta daug (piko koncentracija 16 mg/ml), 5 takelyje matoma baltymo frakcija nebuvo paimta tolimesniems tyrimams. 6–10 takeliuose matomos frakcijos buvo apjungtos ir dializuojamos. Po dializės dalis baltymo iškrito į nuosėdas. Gali būti, kad baltymas agregavo dėl labai didelės jo koncentracijos. Gryninant kitą kartą reikėtų didinti kolonėlės tūrį arba mažinti biomasės kiekį, kad būtų gautas mažesnės koncentracijos baltymas. Net ir praradus baltymą dėl nuosėdų liko 93 mg baltymo.

Šiuo metu doktorantas Egidijus Kazlauskas vertina biotermodinامينius baltymo parametrus bei jo sąveiką su laboratorijoje sintetinamais junginiais. Tikimasi, kad jam pavyks rasti slopiklį, kuris atrankiai jungsis su *PfHsp90N*. Tokį slopiklį ateityje gal būtų galima naudoti kaip vaistų nuo maliarijos veikliąją medžiagą.

3.3. Rekombinantinės CAIV (19–284 ar.) klonavimas ir raiška

Bakalauro darbo metu remiantis turimais duomenimis apie vektoriaus pET15b (Novagen) ir 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 ar.) konstruktas, koduojantis CAIV nuo 19 iki 284 ar. (16 pav.).

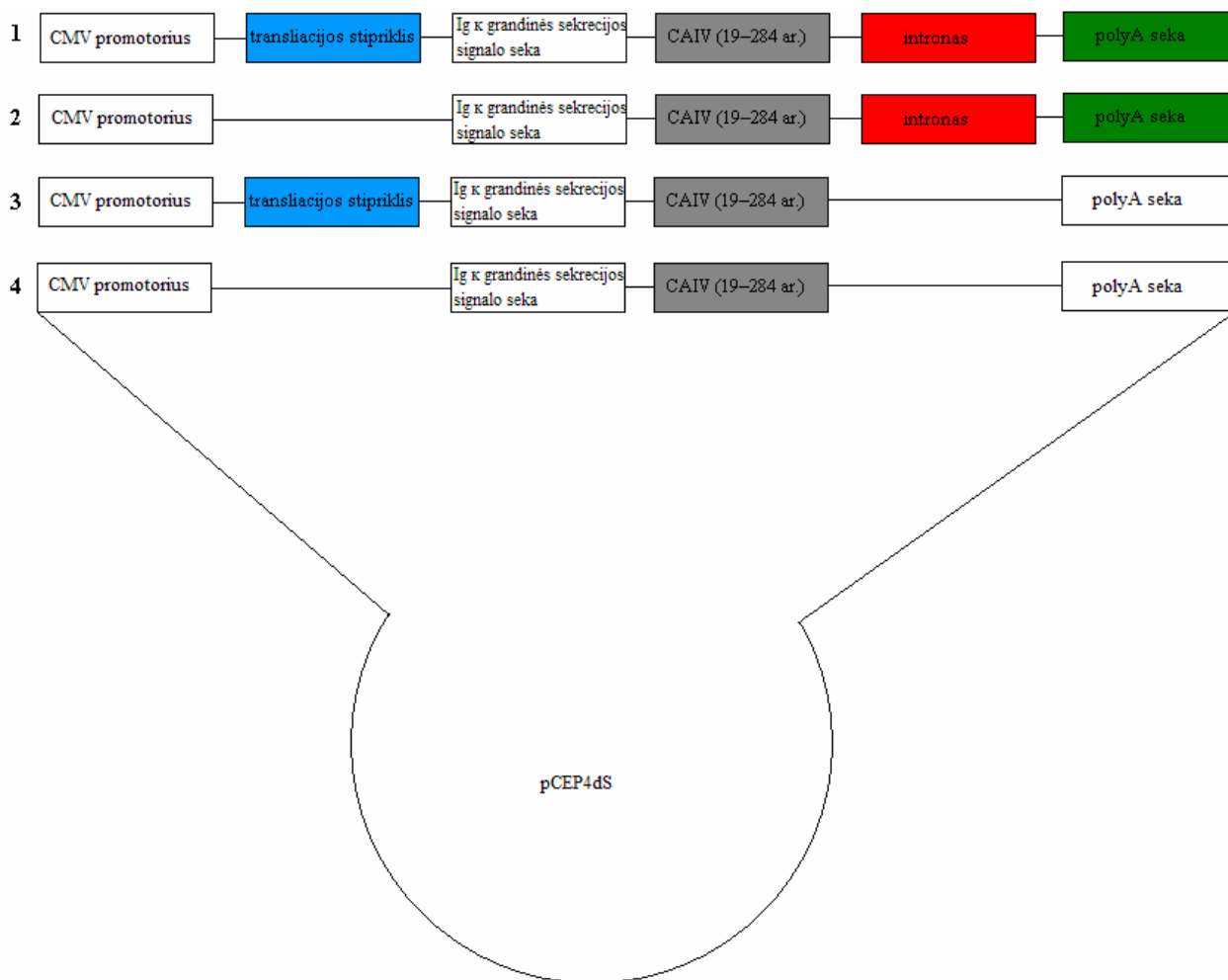


16 pav. Rekombinantinės žmogaus CAIV (19–284 ar.) (konstruktas – pET15b–6xHis–CAIV(19–284 ar.)) ir žmogaus laukinio tipo CAIV aminorūgščių sekų palyginimas. Paveiksle apibrėžta N galinė signalinė seka (1–18 ar.) ir C galo peptidas (285–312 ar.), kurių rekombinantiniame baltyme nėra.

Baltymas buvo ekspresuojamas *E. coli* bakterijose, kuriose nevyksta potransliacinės modifikacijos, todėl buvo sukurtas konstruktas be baltymo signalinės sekos ir C galo peptido, nukerpamo baltymui bręstant. Tačiau bandant gauti baltymą *E. coli* buvo susidurta su įvairiomis problemomis: negauta geno raiškos, baltymas buvo netirpus arba nesijungdavo su slopikliais ir netikdavo tolesniems tyrimams. Masių spektrometrija ir baltymo elektroforezė poliakrilamido gelyje redukuojančiomis ir neredukuojančiomis sąlygomis parodė, kad naudojant prokariotinę raiškos sistemą CAIV (19–284 ar.) raiškai, baltyme nesusidaro disulfidiniai tilteliai. Gauti CAIV (19–284 ar.) *E. coli* ląstelėse buvo

bandoma kelis metus. Buvo išbandyti įvairūs raiškos konstruktai, bakterijų kamienai, auginimo sąlygos, tačiau baltymo gauti nepavyko.

Magistro darbo metu buvo nuspręsta pabandyti gauti CAIV (19–284 ar.) žinduolių ląstelėse HEK 293–F. Tai – žmogaus ląstelės, todėl jose gauta žmogaus CAIV (19–284 ar.) turėtų būti tinkamos tretinės struktūros ir nepraradusi savo aktyvumo. Geno dalis, koduojanti CAIV nuo 19 iki 284 ar., buvo iškirpta iš pET15b–6xHis–CAIV(19–284 ar.) konstrukto ir klonuota į pCEP4dS vektorių. Siekiant gauti kiek įmanoma didesnę baltymo raišką ir palengvinti gryninimą buvo sukurti 4 konstruktai (17 pav.).



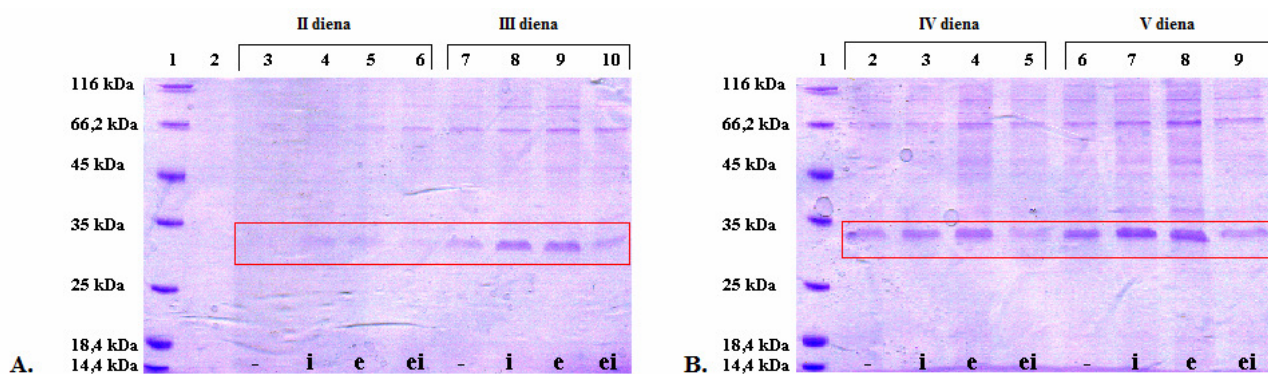
17 pav. pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.) raiškos konstruktai. **1** – pCEP4dS–ei–CAIV(19–284 ar.) raiškos konstruktas; **2** – pCEP4dS–i–CAIV(19–284 ar.) raiškos konstruktas; **3** – pCEP4dS–e–CAIV(19–284 ar.) raiškos konstruktas; **4** – pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.) raiškos konstruktas. Nenuspalvinti elementai jau buvo naudojamame raiškos vektoriuje, spalvoti buvo įklonuoti darbo metu.

Iš pradžių buvo sukurtas pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.) konstruktas. Juo buvo transfekuotos HEK 293–F ląstelės, kaip aprašyta „Medžiagų ir metodų“ skyriuje. Įsitikinęs, kad ląstelės gamina CAIV (19–284 ar.), buvo sukurti dar 2 konstruktai, turintys translacijos stipriklį arba introną. Tikėtasi, kad šie papildomi elementai padidins geno raišką. Abu

elementai padidino geno raišką, todėl buvo sukurtas konstruktas, turintis ir transliacijos stipriklį, ir introną.

Klonavimo darbai atlikti pagal standartinius protokolus. CAIV (19–284 ar.) iš pET15b–6xHis–CAIV(19–284 ar.) konstrukto iškirpta su NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis. pCEP4dS vektorius buvo kerpamas HindIII ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis. Siekiant patikrinti, ar CAIV genas įsistatė į pCEP4dS vektorių, gautas konstruktas buvo karpomas NcoI ir PflMI restrikcijos endonukleazėmis. Gauti produktai analizuojami 1,5% agarozės gelyje. Gautų fragmentų dydis buvo toks, kaip ir tikėtasi. Vadinas, gautas geras konstruktas. Intronas buvo iškirptas iš pCMV SPORT-βgal vektoriaus naudojant VspI ir NheI restrikcijos endonukleazes. pCEP4dS vektorius buvo kerpamas DraIII ir BamHI restrikcijos endonukleazėmis. DraI, EcoRI ir BamHI restrikcijos endonukleazės naudotos gauto konstrukto patikrinimui. Transliacijos stipriklis, sudarytas iš pelės kraujagyslių epitelio augimo veiksnio netransliuojamą regioną koduojančių geno dalių, buvo užsakytas iš „Linea libera“ ir turėjo BglII bei KpnI restrikcijos endonukleazių kirpimo vietas. Tais pačiais fermentais kerpamas vektorius, jie naudojami ir gauto konstrukto atrankai. Konstruktas, turintis ir introną, ir transliacijos stipriklį, kuriamas iš jau turimų konstrukto, turinčių po vieną iš minėtų elementų. Klonavimui naudojamos EcoRI ir HindIII restrikcijos endonukleazės. Jos bei BamHI, BglII ir KpnI restrikcijos endonukleazės naudojamos gero konstrukto atrankai. Visi gauti konstruktai buvo nusekvenuoti, mutacijų nėra.

Baltymas gautas HEK 293–F ląstelėse kaip aprašyta metodinėje dalyje. Geno raiškos priklausomybė nuo konstrukto pateikiama 18 pav.

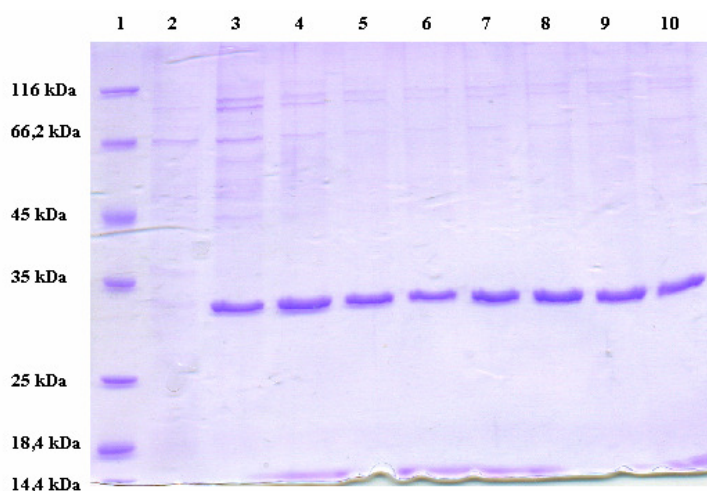


18 pav. HEK 293–F baltymų elektroforezės vaizdas poliakrilamido gelyje (raudonai apibrėžta apie 31 kDa dydžio CAIV (19–284 ar.)). **A. 1 takelis** – baltymų dydžio žymuo #SM0431; **2 takelis** – terpė, kurioje augo HEK 293–F ląstelės prieš transfekciją CAIV koduojančiu konstruktu; **3–6 takeliai** – terpė, kurioje augo HEK 293–F ląstelės 2 dieną po transfekcijos pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.) (3), pCEP4dS–i–CAIV(19–284 ar.) (4), pCEP4dS–e–CAIV(19–284 ar.) (5) ir pCEP4dS–ei–CAIV(19–284 ar.) (6) konstruktu; **7–10 takeliai** – terpė, kurioje augo HEK 293–F ląstelės 3 dieną po transfekcijos pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.) (7), pCEP4dS–i–CAIV(19–284 ar.) (8), pCEP4dS–e–CAIV(19–284 ar.) (9) ir pCEP4dS–ei–CAIV(19–284 ar.) (10) konstruktu. **B. 1 takelis** – baltymų dydžio žymuo #SM0431; **2–5 takeliai** – terpė, kurioje augo HEK 293–F ląstelės 4 dieną po transfekcijos pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.) (2), pCEP4dS–i–CAIV(19–284 ar.) (3), pCEP4dS–e–CAIV(19–284 ar.) (4) ir pCEP4dS–ei–CAIV(19–284 ar.) (5) konstruktu; **6–9 takeliai** – terpė, kurioje augo HEK 293–F ląstelės 5 dieną po transfekcijos pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.) (6), pCEP4dS–i–CAIV(19–284 ar.) (7), pCEP4dS–e–CAIV(19–284 ar.) (8) ir pCEP4dS–ei–CAIV(19–284 ar.) (9) konstruktu.

Iš 18 pav. matyti, kad introno arba transliacijos stipriklio pridėjimas padidino baltymo raišką. Tačiau konstruktas, koduojantis ir introną, ir transliacijos stipriklį, nepateisino lūkesčių. Buvo tikimasi, kad šio konstrukto geno raiška bus didesnė, nei konstruktų, turinčių tik introną arba tik transliacijos stipriklį, tačiau šio konstrukto geno raiška maža, mažesnė net už konstrukto, neturinčio introno ir transliacijos stipriklio, raišką.

3.4. Rekombinantinės CAIV (19–284 ar.) gryninimas

Visų keturių konstruktų koduojamas baltymas gryninamas naudojant tą pačią metodiką, aprašytą „Medžiagų ir metodų“ skyriuje. Kadangi gryninimui naudota nekompiuterizuota sistema, nėra kompiuterinės chromatogramos, tačiau baltymas iš kolonėlės išėjo vienu piku, ne taip, kaip gryninant *PfHsp90* (1–215 ar.). CAIV (19–284 ar.) gryninimo vaizdas poliakrilamido gelyje pateiktas 19 pav.



19 pav. CAIV (19–284 ar.) gryninimo vaizdas poliakrilamido gelyje. **1 takelis** – baltymų dydžio žymuo #SM0431; **2 takelis** – terpė, kurioje po transfekcijos augo ląstelės, po inkubacijos su afininiu sorbentu; **3–10 takeliai** – desorbuotas tikslinis baltymas CAIV (19–284 ar.).

Iš poliakrilamido gelio matyti, kad sorbento kiekis buvo parinktas tinkamai ir terpėje po inkubavimo su sorbentu baltymo neliko, jis nebuvo prarastas. Baltymas nėra ypatingai grynas ir jo gauta nedaug (4,2 mg iš 120 ml ląstelių kultūros), tačiau tai buvo viena iš paskutinių CA, kurių mūsų skyriuje nepavyko gauti *E. coli* po kelerių metų darbo, taigi šio baltymo išgryninimas yra didelis žingsnis į priekį. Magistrantė Joana Gilytė pamatavo baltymo aktyvumą „stopped flow“ metodu, baltymas aktyvus ir tinka tolesniam darbui. Šiuo metu baltymo savybes ir sąveiką su slopikliais tiria dr. Lina Baranauskienė.

IV. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. *PfHsp90* (1–215 ar.) raiška ir gryninimas

Šiame darbe aprašytas *PfHsp90* (1–215 ar.) gavimas iš BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląstelių. Apžvelgtų straipsnių autoriai dažniausiai gauna *PfHsp90N* Rosetta kamiene, kuriame mes negavome geno raiškos. Šiame kamiene *PfHsp90N* gavo Rani Pallavi su kolegomis (2010 m.), tačiau straipsnyje plačiau neaprašo auginimo sąlygų. Kevin Corbett ir James Berger gavo *PfHsp90N* augindami konstruktą transformuotas Rosetta(DE3)pLysS ląsteles +20 °C temperatūroje 18 val savaime indukuojančioje terpėje (2010 m.). Deja, šio kamieno mes neturime, tačiau buvo išbandytas BL21(DE3)pLysS. Norimo rezultato negavome: transformuotos šio kamieno ląstelės neužaugo netgi ant Petri lėkštelių. Kolegos iš prof. Didier Picard (Ženevos universitetas) laboratorijos pasiūlė ekspresuoti *PfHsp90N* (1–215 ar.) BL21 Star (DE3) One Shot kamiene. Šis kamienas taip pat buvo išbandytas, jame gauta geno raiška.

Kaip matyti 13 pav., didžioji *PfHsp90* (1–215 ar.) baltymo dalis yra netirpi nepriklausomai nuo bakterijų kamieno. Viena iš galimų priežasčių – *E. coli* bakterijose nėra stabilizuojančių baltymų, kurie reikalingi tinkamai *PfHsp90N* tretinei struktūrai susiformuoti, todėl baltymas agreguoja (Dyson ir kiti, 2004). Michael Dyson su kolegomis siūlo lėtinti baltymų transliaciją mažinant temperatūrą ir/arba IPTG kiekį. Tuomet baltymas turėtų daugiau laiko įgyti tinkamą tretinę struktūrą. Taip pat galima bandyti gauti ne vieną baltymą, o baltymų kompleksą, sutinkamą organizme, kurio baltymą siekiama išgryninti, papildomai įterpti šaperonus, naudoti chemines medžiagas. Vienas iš sėkmingiausių metodų, pritaikytas ir kuriant *PfHsp90N* (1–215 a. r.) konstruktą, yra baltymo suliejimas su specialia tirpuma padidinančia seka ar baltymu. *PfHsp90N* (1–215 ar.) baltymas buvo sulietas su 6 His koduojančia seka N gale. Tai nėra labiausiai baltymo tirpumą padidinanti seka ir norint gauti daugiau tirpaus baltymo galbūt reikėtų rinktis sulietinį baltymą arba bent jau ilgesnę His uodegėlę (Dyson ir kiti, 2004). Park Dae–Wook su kolegomis siūlo sulieti baltymą su GST ir lizuoti *E. coli* naudojant buferius su sarkozilu (2011 m.), tačiau jų tyrimuose naudoti baltymai maždaug 2 kartus didesni nei *PfHsp90N* (1–215 ar.). Mūsų atveju iš tirpios frakcijos buvo išgrynintas labai didelis baltymo kiekis, todėl ypatingo tikslo didinti baltymo tirpumą nėra.

Pradėjęs biofizikinius tyrimus doktorantas E. Kazlauskas pastebėjo, kad gautas baltymas nėra labai stabilus aukštesnėje nei +37 °C temperatūroje, tačiau tai nekenkia biofizikiniams baltymo – ligando sąveikos tyrimams. Nestabilumas gana žemoje temperatūroje stebina, nes sergant maliarija ligonių temperatūra pakyla iki +41,5 °C

(Shahinas ir kiti, 2013). *P. falciparum* tokioje temperatūroje išgyvena ir dauginasi, o tam būtinas aktyvus PfHsp90. Remiantis UniProt duomenų baze, šis baltymas neturi sudėtingų tretinių struktūrų, pavyzdžiui, disulfidinių tiltelių, kurie galėjo būti pažeisti gaminant tik N galo domeną. Gali būti, kad mūsų baltymas prarado dalį stabilumo dėl to, kad buvo smarkiai sutrumpintas. Be to, pirmuonyje *P. falciparum* Hsp90 būna dimeras, galbūt todėl išlieka stabilus aukštoje temperatūroje. Hsp90 stabilumą natūralioje aplinkoje gali palaikyti ir potransliacinės modifikacijos. Kevin Corbett ir James Berger, kuriems pavyko baltymą iškristalinti, gavo PfHsp90N (1–215 ar.) *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS kamiene (2010). Bakterijos buvo auginamos autoindukcinėje terpėje. Geno raiška gauta po indukcijos auginant ląsteles 18 val +20 °C. Straipsnyje autoriai nemini, kad turėjo problemų dėl baltymo stabilumo. Mes negavome geno raiškos Rosetta2(DE3) kamiene, o Rosetta(DE3)pLysS kamieno neturime.

Norint gauti stabilesnį baltymą galima pabandyti gauti pilno ilgio baltymą. Be to, viso baltymo reikia norint įsitikinti, kad su N galu besijungiantys slopikliai jungsis ir prie pilno ilgio baltymo. Tokį baltymą Rani Pallavi su kolegomis gavo *E. coli* Rosetta ląstelėse, augintose 24 val +16 °C po geno raiškos indukcijos 1 mM IPTG (2010 m.). Autoriai naudojo žemesnę inkubacijos temperatūrą ir ilgesnį laiką nei mes. Tokiomis sąlygomis reikėtų pabandyti gauti pilno ilgio baltymą ir galbūt PfHsp90N (1–215 ar.). Žinoma, gauti pilno ilgio baltymą gali būti sudėtingiau nei N galą. PfHsp90N (1–246 ar.), kurį sudaro N galo domenai ir dalis įkrautos jungties, buvo bandoma gauti beveik pusę metų, tačiau nesėkmingai. Tai, kad mums pavyko gauti trumpesnį baltymą naudojant analogiškas geno raiškos sąlygas rodo, kad *E. coli* bakterijoms sudėtinga susintetinti įkrautos jungties dalį, o sintetinant pilną baltymą jungtis būtų beveik dvigubai ilgesnė. Nors gali būti, kad *E. coli* negali susintetinti dalies įkrautos jungties todėl, kad PfHsp90N (1–246 ar.) turi daug vienodų aminorūgščių, o tuo pačiu ir daug pasikartojančių nukleotidų konstrukto gale. Tai, kaip minėta literatūrinėje dalyje, – viena iš galimų prastos geno raiškos priežasčių. Rani Pallavi su kolegomis straipsnyje nenurodo, kokį kiekį baltymo jiems pavyko išgryninti, tačiau iš pateikto poliakrilamido gelio paveikslo atrodo, kad baltymo nedaug. Mūsų laboratorijoje vykdomiems tyrimams reikia didelių baltymo kiekių, kuriuos pagaminti gali užtrukti ilgai (baltymo gamyba brangs). Be to, atliekant biofizikinius matavimus su dimeriniu pilno ilgio baltymu, sunkiau interpretuoti gautus rezultatus.

4.2. CAIV (19–284 ar.) raiška ir gryninimas

Rekombinantinė žmogaus CAIV (19–284 ar.) – viena iš dviejų CA, kurių nebuvo gavę savo skyriuje, todėl jos gavimas buvo didelis žingsnis į priekį. Biofizikinius tyrimus atliekantiems kolegoms labai svarbu turėti visas CA, tai būtina slopiklių atrankai. Kelerius metus šį baltymą buvo bandoma gauti *E. coli* ląstelėse, kuriose gauta dauguma mūsų naudojamų CA, tačiau aktyvaus baltymo gauti nepavyko. Baltymo gavimas naudojant „FreeStyle™ MAX 293“ raiškos sistemą yra brangesnis, nei gavimas iš *E. coli* ląstelių, tačiau dr. L. Baranauskienės atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad gautas baltymas stabilus ir aktyvus, gerai jungiasi su ligandais. Be to, jo masių spektras atitinka teorinę 30323,4 Da baltymo masę (matavo dr. Vytautas Smirnovas) (ProtParam duomenų bazė). Dr. Sauliaus Gražulio darbo grupei pavyko šį baltymą iškristalinti. Ateityje planuojame parašyti straipsnį. Žinoma, CAIV (19–284 ar.) gavimas iš žinduolių ląstelių – dar naujas darbas mūsų laboratorijoje, todėl ateityje planuojame optimizuoti baltymo gavimą ir taip galbūt sumažinti CAIV (19–284 ar.) gavimo kaštus. Šiuo metu baltymo gavimo kaina šiek tiek stabdo baltymui imlius biofizikinius tyrimus. Baltymo gavimo išeiga yra pakankamai gera, apie 10 mg/l. Kai kurios mokslininkų grupės naudodamos HEK ląsteles gauna geresnius rezultatus. Gaurav Backliwal darbo grupė gavo 1,1g/l baltymo išeigą naudodami HEK 293E ląsteles žmogaus IgG gavimui (2008 m.). Norėdami padidinti geno raišką autoriai naudojo histonų deacetilazių ir DNR metiltransferazių slopiklius. Valproinė rūgštis, kuri buvo naudojama kaip histonų deacetilazių slopiklis, turi ir kitą poveikį – stabdo ląstelių ciklą. Straipsnio autoriai pastebėjo, kad dažna laikinos transfekcijos bėda – plazmidės „pametimas“ dėl ląstelių dalinimosi. Ši mokslininkų grupė naudojo polietileniminą kaip transfekcijos reagentą. Tačiau tokia didelė išeiga reta ir gali būti, kad tinkama tik konkrečiam baltymui gauti. Dr. Jurgita Matulienė išbandė polietileniminą kitos CA gavimui, bet rezultatai buvo žymiai prastesni, nei naudojant „FreeStyle™ MAX 293“ raiškos sistemą. Ateityje laboratorijoje bus bandoma vystyti polietileniminu paremtą transfekciją, bus bandoma gauti ir CAIV (19–284 ar.), tačiau neaišku, ar šis būdas pasiteisins. Gaurav Backliwal darbo grupė atkreipia dėmesį, kad tinkamas konstruktas yra labai svarbus geno raiškai. Jų tyrimų rezultatai rodo, kad žmogaus CMV promotorius, koks yra ir mūsų naudojamame pCEP4 vektoriuje, yra efektyviausias baltymo raiškai HEK 293E ląstelėse. Jie taip pat išbandė kelis reguliacinius elementus: introną, transkripcijos stipriklį bei juos abu viename vektoriuje. Autorių rezultatai rodo, kad intronas žymiai padidina geno raišką (nuo 15,5 iki 27,9 mg/l), transkripcijos stipriklis padidina ją dar daugiau (iki 33,8 mg/ml), o abu elementai – labiausiai (iki 39,5 mg/ml). Kadangi pCEP4 vektoriaus CMV promotoriui jau yra transkripcijos stipriklis, mes nusprendėme panaudoti

transliacijos stipriklį. Taip pat sukūrėme konstruklą su intronu. Atskirai negryninome kiekvieno konstrukto koduojamo baltymo, todėl negalime tiksliai pasakyti, kiek geno raišką padidino vieno ar kito reguliacinio elemento pridėjimas. Tačiau iš poliakrilamido gelių (18 pav.) matosi, kad introno ir transliacijos stipriklio pridėjimas geno raišką padidino gana stipriai ir vienodai. Tuo tarpu konstruktas, kuriame buvo intronas ir transliacijos stipriklis, buvo ekspresuojamas menkai, geno raiška netgi mažesnė nei naudojant konstruklą be papildomų reguliacinių elementų. Tai netikėtas ir nedžiuginantis rezultatas, kurio priežasčių šiuo metu nežinome. Gali būti, kad dėl ilgo ir sudėtingo klonavimo proceso buvo pažeistos vektoriuje esančios sekos, atsakingos už vektoriaus replikavimąsi ląstelėje, nes buvo nusekvenuotos tik reguliacinius elementus ir CAIV (19–284 ar.) koduojančios genų dalys. Ateityje planuojame perkelti nusekvenuotą dalį į pradinį pCEP4dS vektorių. Tikimės, kad tai išspės problemą.

Dar vieno straipsnio autoriai nedidelės geno raiškos priežasties taip pat ieško konstrukto lygmenyje (Chaudhary ir kiti, 2011). Jie teigia, jos tinkamai baltymo sintezei svarbiausia, kokie žymenys bei kurioje baltymo dalyje naudojami ir kokie kodonai koduoja reikiamas aminorūgštis. Tačiau kodonų optimizavimas paprastai svarbus bandant gauti heterologinių genų raišką, pavyzdžiui, norint gauti eukariotų baltymus prokariotų raiškos sistemose. Mūsų atveju žmogaus baltymas gaunamas žmogaus ląstelėse, todėl papildomi kodonai vargu ar padėtų. Didelių žymenų ar sulietinių baltymų, kurių sintezei ląstelės eikvotų savo resursus, mūsų konstruktai taip pat nekoduoja, tačiau CAIV aktyviajame centre yra Zn^{2+} jonai, kurių trūkumas gali mažinti CAIV geno raišką. Ieškodama optimalių sąlygų kitos CA gavimui, dr. Jurgita Matulienė papildomai dėjo į terpę Zn^{2+} druskų, tačiau tai nepadidino geno raiškos. Gali būti, kad papildomų druskų pridėjimas pažeidžia terpės pusiausvyrą, juolab kad jos cheminės sudėties mes nežinome. Sarika Chaudhary su kolegomis taip pat siūlo trumpinti baltymą. Kad trumpesni baltymai ekspresuojami efektyviau, pastebėjo ir Virginia Picanço–Castro su kolegomis. Tačiau mes ir taip bandome gauti ne pilną CAIV, o tik katalitinį domeną, kurio trumpinimas gali neigiamai veikti baltymo aktyvumą.

Kamilla Swiech su savo darbo grupe pasiūlė dar vieną būdą padidinti baltymo išeigą stabdant ląstelių ciklą (2011 m.). Jie siūlo transfekuotas ląsteles auginti šiek tiek žemesnėje temperatūroje, +34 °C (įprastai šios ląstelės auginamos +37 °C). Ląstelės, auginamos šiek tiek hipotermiškėmis sąlygomis, sulėtina dalinimosi ciklą S arba G1 fazėje ir taip prisintetina daugiau baltymo. Be to, tokios ląstelės lėčiau naudoja deguonį ir maisto medžiagas, todėl po transfekcijos jas galima ilgiau auginti. Tokiomis sąlygomis geriau atliekamos kai kurios potransliacinės modifikacijos, pavyzdžiui, sialo grupės prijungimas. Šiuo metu skyriuje turime vieną CO₂ inkubatorių–purtyklę, skirtą suspensinėms žinduolių

ląstelėms auginti, todėl išbandyti šio būdo negalime. Lėtesnis ląstelių ciklas duotų daugiau laiko baltymo tretinės struktūros įgavimui, tačiau mūsų atveju sintetinamas baltymas ir dabar įgauna tinkamą tretinę struktūrą. Autoriai padidino savo baltymo koaguliacijos veiksnio VIII išeigą 26%. Šis baltymas skiriasi nuo CAIV (19–284 ar.) tiek savo struktūra, tiek atliekama funkcija, todėl neaišku, ar temperatūros sumažinimas padidintų mūsų baltymo raišką.

Philippe Girard ir kiti pastebėjo, kad transfekcijos efektyvumui svarbus inkubavimo laikas, per kurį susidaro transfekcijos kompleksai (2002 m.). Tačiau mūsų atveju per ilgai inkubuojant DNR su transfekcijos reagentu DNR pradeda degraduoti, todėl inkubacijos laiką reikia ilginti atsargiai. Be to, transfekcijos efektyvumui svarbiausi ne tai, kiek kompleksų susidaro, o kiek jų patenka į ląsteles. Mūsų atvejų transfekcijos efektyvumas siekia apie 70–80% (dr. Jurgita Matulienė tikrino naudodama β -galaktozidazės aktyvumo tyrimą (β -Gal Staining Kit, Invitrogen)). Tai tikrai geras rezultatas. Visgi neaišku, ar likusios ląstelės netransfekuojamos dėl to, kad joms tiesiog neužtenka DNR–lipidų kompleksų (tuomet būtų galima didinti transfekcijai naudojamos DNR ir transfekcijos reagento kiekį) ar dėl susidarančių agregatų, kurių, nors ir nedaug, nepavyksta išvengti. Kompleksų kiekį taip pat reikia didinti labai atsargiai. Jau minėta Kamilla Swiech su kolegomis pastebėjo, kad didelė kompleksų koncentracija stabdo ląstelių augimą, o esančių ląstelių nepakanka dideliems baltymo kiekiams pagaminti. Be to, didelis kompleksų kiekis ląsteles gali veikti toksiškai, gali susidaryti agregatai ir taip sumažėti transfekcijos efektyvumas.

Laikui bėgant tikimės sumažinti baltymo gavimo kaštus padidindami geno raišką arba optimizuodami transfekciją naudojant polietileniminą. Labai džiaugiamės magistro darbo metu gavę CAIV (19–284 ar.). Mūsų biofizikinių tyrimų darbo grupė tikisi rasti atrankiai besijungiančių slopiklių.

IŠVADOS

- Darbo metu buvo sukonstruotas pET15b–6xHis–*PfHsp90N*(1–215 ar.) konstruktas *PfHsp90N* (1–215 ar.) baltymui gauti ir 4 konstruktai CAIV (19–284 ar.) gauti: pCEP4dS–CAIV(19–284 ar.), pCEP4dS–i–CAIV(19–284 ar.), pCEP4dS–e–CAIV(19–284 ar.), pCEP4dS–ei–CAIV(19–284 ar.).
- Buvo rastos sąlygos *PfHsp90N* (1–215 ar.) geno raiškai. Panaši geno raiška gaunama auginant konstruktą transformuotas BL21(DE3), BL21(DE3)CodonPlus–RIL arba BL21 Star (DE3) One Shot kamienų ląsteles 18 val +20 °C temperatūroje po raiškos indukcijos 1 mM IPTG. Tinkamiausias baltymo gavimui BL21(DE3)CodonPlus–RIL kamienas, nes jame gaunama daugiausiai tirpaus baltymo.
- Buvo rasti geriausi konstruktai CAIV (19–284 ar.) raiškai HEK 293–F ląstelėse: pCEP4dSi–CAIV(19–284 ar.) ir pCEP4dSe–CAIV(19–284 ar.).
- *PfHsp90N* (1–215 a. r.) ir CAIV (19–284 ar.) buvo išgryninti ir tiko tolimesniems tyrimams.

PRODUCTION OF TARGET THERAPY ORIENTED RECOMBINANT PROTEINS IN PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC EXPRESSION SYSTEMS

Master's Thesis

Aurelija Mickevičiūtė

Vilnius University

Department of Biochemistry and Molecular Biology

SUMMARY

Chemical inhibitors or monoclonal antibodies for target therapy are being used with great perspectives in biomedical sciences. The aim of this master's research project was to produce two target therapy oriented recombinant proteins, namely, *Plasmodium falciparum* heat shock protein 90 N-terminal domain (*PfHsp90N*) and human carbonic anhydrase IV catalytic domain (CAIV (19–284 a. a.)). Chemical inhibitors are being designed at the Department of Biothermodynamics and Drug Design that may be developed as drugs against malaria and *retinitis pigmentosa*, respectively. The decision made to produce the *PfHsp90N* N-terminal domain and the CAIV from 19 to 284 amino acids for protein – ligand interactions was based on literature and experimental data. *PfHsp90N* was expressed in BL21(DE3)CodonPlus–RIL strain while growing induced cells for 20 hours at +20 °C temperature in LB medium with 1 mM isopropyl–β–D–thiogalactopyranoside (IPTG). This strain was chosen because it produces the biggest amount of soluble protein. *PfHsp90N* was purified by using metal chelate chromatography. CAIV (19–284 a. a.) was expressed in human suspension–adapted HEK 293–F cells using „FreeStyle™ MAX 293 Expression System“. The largest expression was noticed while using constructs with introne or translational enhancer. CAIV (19–284 a. a.) was purified by using affinity chromatography. Currently, the proteins are being used for biophysical experiments.

PADĖKA

Esu labai laiminga turėdama galimybę dirbti Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje. Dėkoju savo vadovei dr. Jurgitai Matulienei už begalę laiko, kurį ji skyrė mano baigiamajam darbui. Dėkoju dr. Daumantui Matuliui už suteiktą galimybę dirbti jo vadovaujamame skyriuje. Už pagalbą ir patarimus kasdieniniame darbe dėkoju dr. Vaidai Juozapaitienei, j. m .d. Vilmai Michailovienei, dr. Linai Baranauskienei, dokt. Egidijui Kazlauskui ir j. m. d. Jelenai Jachno. Dėkoju visiems kolegoms už labai draugišką aplinką.

Dėkoju už Lietuvos mokslo tarybos projekto „Studentų mokslinės veiklos skatinimas“ (VP1-3.1-ŠMM-01-V-02-003) paramą. Projektas yra finansuojamas pagal Žmogiškųjų išteklių plėtros veiksmų programos 3 prioritetą „Tyrėjų gebėjimų stiprinimas“ iš Europos socialinio fondo ir Lietuvos Respublikos valstybės biudžeto lėšų.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Akinleye A, Avvaru P, Furqan M, Song Y, Liu D. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) Inhibitors as Cancer Therapeutics. *J Hematol Oncol*. 2013; 6: 88–105.
2. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for Therapeutic Applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2002; 13: 117–23.
3. Baneyx F. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*. 1999; 10: 411–21.
4. Backliwal G, Hildinger M, Chenuet S, Wulhfard S, De Jesus M, Wurm FM. Rational Vector Design and Multi-pathway Modulation of HEK 293E Cells Yield Recombinant Antibody Titers Exceeding 1g/l by Transient Transfection Under Serum-free Conditions. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36(15): e96.
5. Bosley TM, Salih MA, Alorainy IA, Islam MZ, Oystreck DT, Suliman OSM, al Malki S, Suhaibani AH, Khiari H, Beckers S, van Wesenbeeck L, Perdu B, AlDrees A, Elmalik SA, Van Hul W, Abu-Amero KK. The Neurology of Carbonic Anhydrase Type II Deficiency Syndrome. *Brain*. 2011; 134: 3502–15.
6. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248–54.
7. Breton S. The Cellular Physiology of Carbonic Anhydrases. *JOP*. 2001; 2(4): 159–64.
8. Chaudhary S, Pak JE, Pedersen BP, Bang LJ, Zhang LB, Ngaw SMM, Green RG, Sharma V, Stroud RM. Efficient Expression Screening of Human Membrane Proteins in Transiently Transfected Human Embryonic Kidney 293S Cells. *Methods*. 2011; 55(4): 273–80.
9. Corbett KD, Berger JM. Structure of the ATP-binding Domain of *Plasmodium falciparum* Hsp90. *Proteins*. 2010; 78: 2738–44.
10. Dae-Wook P, Sang-Soo K, Min-Kyung N, Goo-Young K, Jungho K, Hyangshuk R. Improved Recovery of Active GST-fusion Proteins from Insoluble Aggregates: Solubilization and Purification Conditions Using PKM2 and HtrA2 as Model Proteins. *BMB Rep*. 2011; 44 (4): 279–84.
11. 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.

12. Danisc K, Blasiak J. Role of Anti-apoptotic Pathways Activated by BCR/ABL in the Resistance of Chronic Myeloid Leukemia Cells to Tyrosine Kinase Inhibitors. *ACTA Biochim Pol.* 2013; 60: 488–500.
13. 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.
14. 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.
15. Dekaminaviciute D, Lasickiene R, Parkkila S, Jogaite V, Matuliene J, Matulis D, Zvirbliene A. Development and Characterization of New Monoclonal Antibodies Against Human Recombinant CA XII. *Biomed Res Int. Priimtas spaudai* 2013.
16. Dietrich EM, Antoniades K. Molecularly targeted Drugs for the Treatment of Cancer: Oral Complications and Pathophysiology. *Hippokratia.* 2012; 16(3): 196–9.
17. 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.
18. 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.
19. Fisher Z, Kovalevsky AY, Mustyakimov M, Silverman DN, McKenna R, Langan P. Neutron Structure of Human Carbonic Anhydrase II: A Hydrogen Bonded Water Network “Switch” is Observed Between pH 7.8 and 10.0. *Biochem.* 2011; 50(44): 9421–3.
20. Gantke T, Boussouf S, Janzen J, Morrice NA, Howell S, Mühlberger E, Ley SC. Ebola Virus VP35 Induces High-level Production of Recombinant TPL-2-ABIN-2-NF- κ B1 p105 Complex in Co-transfected HEK-293 Cells. *Biochem J.* 2013; 452: 359–65.
21. Geisse S, Fux C. Recombinant Protein Production by Transient Gene Transfer into Mammalian Cells. *Meth Enzymol.* 2009; 463: 223–37.
22. Gerber DE. Targeted Therapies: a New generation of Cancer Treatments. *Am Fam Physician.* 2008; 3: 311–9.
23. Girard P, Derouazi M, Baumgartner G, Bourgeois M, Jordan M, Jacko B, Wurm FM. 100-liter Transient Transfection. *Cytotechnology.* 2002; 38: 15–21.

24. Hadden MK, Blagg BSJ. Synthesis and Evaluation of Radamide Analogues, a Chimera of Radicicol and Geldanamycin. *J Org Chem.* 2009; 74(13): 4697–704.
25. Hageman J, van Vaarde MAWH, Zylicz A, Walerych D, Kampinga HH. The Diverse Members of the Mammalian HSP70 Machine Show Distinct Chaperone-like Activities. *Biochem J.* 2011; 435: 127–42.
26. Helal I. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: New Insights into Treatment. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2013; 24(2): 230–4.
27. Ho SW, Tsui YTC, Wong TT, Cheung SKK, Goggins WB, Yi LM, Cheng KK, Baum L. Effects of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) in Transgenic Mouse Models of Frontotemporal Lobar Degeneration and Alzheimer's Disease. *Transl Neurodegener.* 2013; 2: 24.
28. Hrabeta J, Stiborova M, Adam V, Kizek R, Eckschlagen T. Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy. A Review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013; 157.
29. Kaufman RJ. Overview of Vector Design for Mammalian Gene Expression. *Mol Biotechnol.* 2000; 16: 151–60.
30. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE. Guidelines for the Nomenclature of the Human Heat Shock Proteins. *Cell Stress Chaperon.* 2009; 14: 105–11.
31. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian Cell Transfection: the Present and the Future. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 397: 3173–8.
32. 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.
33. Klink M, Nowak M, Kielbik M, Bednarska K, Blus E, Szpakowski M, Szylo K, Sulowska Z. The Interaction of HspA1A with TLR2 and TLR4 in the Response of Neutrophils Induced by Ovarian Cancer Cells in vitro. *Cell Stress Chaperon.* 2012; 17(6): 661–74.
34. 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.
35. 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.
36. Lee LCY, Maurine DH, Baillie GS. Targeting Protein–protein Interactions Within the Cyclic AMP Signaling System as a Therapeutic Strategy for Cardiovascular Disease. *Future Med Chem.* 2013; 5(4): 451–64.
37. Li J, Buchner J. Structure, Function and Regulation of the Hsp90 Machinery. *Biomed J.* 2013; 36: 106–17.
38. Li M, Ma CJ, Liu XM, Zhao D, Xu QC, Wang YJ. Molecular Cloning of HSP70 in *Mycoplasma ovipneumoniae* and Comparison with that of Other Mycoplasmas. *GMR.* 2011; 10(2): 834–48.
39. Li XI, Kang Y, Zhang XY, Zhu BI, Fang WH. Identification of a Heat Shock Cognate Protein 70 Gene in Chinese Soft–shell Turtle (*Pelodiscus sinensis*) and its Expression Profiles under Thermal Stress. *Biomed & Biotechnol.* 2012; 13(6): 465–77.
40. Liu X, Chen HH, Zhang LW. Potential Therapeutic Effects of Pigment Epithelium–derived Factor for Treatment of Diabetic Retinopathy. *Int J Ophthalmol.* 2013; 6(2): 221–7.
41. Maurisse R, De Semir D, Enamekhoo H, Bedayat B, Abdolmohammadi A, parsi H, Gruenert DC. Comparative Transfection of DNA into Primary and Transformed Mammalian Cells from Different Lineages. *BMC Biotechnol.* 2010; 10: 9.
42. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Sun L, Davis NM, Abrams SL, Franklin RA, Cocco L, Evangelisti C, Chiarini F, Martelei AM, Libra M, Kandido S, Ligresti G, Malaponte G, Mazzarino MC, Fagone P, Donia M, Nicoletti F, Polesel J, Talamini R, Bäsecke J, Mijatovic S, Maksimovic–Ivanic D, Milella M, Tafuri A, Dulińska–Litewka J, Laidler P, D’Assoro AB, Drobot L, Umezawa K, Montalto G, Cervello M, Demidenko ZN. Advances in Targeting Signal Transduction Pathways. *Oncotargen.* 2012; 3: 1505–21.
43. Meissner P, Pick H, Kulangara A, Chatellard P, Friedrich K, Wurm FM. Transient Gene Expression: Recombinant Protein Production with Suspension–adapted HEK293–EBNA Cells. *Biotechnol Bioeng.* 2001; 75(2): 197–203.
44. Ménard R. Medicine: Knockout Malaria Valcine? *Nature.* 2005; 433: 113–4.
45. Morton CL, Potter PM. Comparison of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *spodoptera frugiperda*, and COS7 Cells for Recombinant Gene Expression. *Mol Biotechnol.* 2000; 16: 193–202.

46. Pallavi R, Roy N, Nageshan RK, Tulukdar P, Pavithra SR, Reddy R, Venketesh S, Kumar R, Gupta AK, Singh RK, Yadav SC, Tatu U. Heat Shock Protein 90 as a Drug Target against Protozoan Infections. *J Biol Chem*. 2010; 285(49): 37964–75.
47. Parham JH, Iannone MA, Overton LK, Hutchins JT. Optimization of Transient Gene Expression in Mammalian Cells and Potential for Scale-up Using Flow Electroporation. *Cytotechnology*. 1998; 28: 147–55.
48. Pastorekova S, Parkkila S, Zavada J. Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance. *Adv Clin Chem*. 2006; 42: 167–216.
49. Picanço-Castro V, Russo-Carbolante EMS, Fontes AM, Fernandes AC, Covas DT. An Enhancer/Promoter Combination Strengthens the Expression of Blood-coagulation Factor VIII in Non-viral Expression Vectors. *Genet Mol Res*. 2008; 7(2): 314–25.
50. Purkerson JM, Schwartz GJ. The Role of Carbonic Anhydrases in Renal Physiology. *Kidney Int*. 2007; 71: 103–15.
51. 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.
52. Schlecht R, Scholz SR, Dahmen H, Wegener A, Sirrenberg C, Musil D, Bomke J, Eggenweiler HM, Mayer MP, Bukau B. Functional Analysis of Hsp70 Inhibitors. *PLOS ONE*. 2013; 8(11): e78443.
53. Senf SM. Skeletal Muscle Heat Shock Protein 70: Diverse Functions and Therapeutic Potential for Wasting Disorders. *Front Physiol*. 2013; 4: 330.
54. Sevastsyonovich 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.
55. Shahinas D, Folefoc A, Pillai DR. Targeting *Plasmodium falciparum* Hsp90: Towards Reversing Antimalarial Resistance. *Pathogens*. 2013; 2: 33–54.
56. Sterling D, Alvarez BV, Casey JR. The Extracellular Component of a Transport Metabolon. *J Biol Chem*. 2002; 277(28): 25239–46.
57. 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.
58. Supuran CT, Scazzafava A, Conway J, editors. Carbonic Anhydrase. 1st ed. Its Inhibitors and Activators. USA: CRC Press LLC; 2004.
59. Svichar N, Waheed A, Sly WS, Hennings JC, Hübner CA, Chesler M. Carbonic Anhydrases CA4 and CA14 Both Enhance AE3-mediated $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Exchange in Hippocampal Neurons. J Neurosci. 2009; 29(10): 3252–8.
60. Swiech K, Kamen A, Ansorge S, Durocher Y, Picanço-Castro V, Russo-Carbolante EMS, Neto MSA, Covas DT. Transient Transfection of Serum-free Suspension HEK 293 Cell Culture for Efficient Production of human rFVIII. BMC Biotechnol. 2011; 11: 114.
61. Tsao YS, Condon R, Schaefer E, Lio P, Liu Z. Development and Improvement of a Serum-free Suspension Process for the production of Recombinant Adenoviral Vectors Using HEK293 Cells. Cytotechnology. 2001; 37: 189–98.
62. Tsou YL, Lin YE, Chang HW, Lin HY, Shao HY, Yu SL, Liu CC, Chitra E, Sia C, Chow YH. Heat Shock Protein 90: Role in Enterovirus 71 Entry and Assembly and Potential Target for Therapy. PloS ONE. 2013; 8(10): e77133.
63. 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.
64. Wu MJ, Jiang Y, Yan YB. Impact of the 237th Residue on the Folding of Human Carbonic Anhydrase II. Int J Mol Sci. 2011; 12: 2797–807.
65. Wu MS, Lien GS, Shen SC, Yang LY, Chen YC. Hsp90 Inhibitors, Geldanamycin and Radicol, Enhance Fisetin-induced Cytotoxicity via Induction of Apoptosis in Human Colonic Cancer Cells. Evid Based Complement Alternat Med. 2013; 2013: 987612.
66. Wu X, Yano M, Washida H, Kido H. The Second Metal-binding Site of 70 kDa Heat-shock Protein is Essential for ADP Binding, ATP Hydrolysis and ATP Synthesis. Biochem J. 2004; 378: 793–9.
67. Yam AYW, Albanèse V, Lin HTJ, Frydman J. Hsp110 Cooperates with Different Cytosolic Hsp70 Systems in a Pathway for *de Novo* Folding. J Biol Chem. 2005; 280(50): 41252–61.