



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Jonas Blistrubis

**AUDINĖS AUGIMO HORMONO INTARPINIŲ KŪNELIŲ,
SUSIDARIUSIŲ *E. COLI*, KIEKYBINĖ IR KOKYBINĖ ANALIZĖ
QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ANALYSIS OF MINK GROWTH
HORMONE INCLUSION BODIES FORMED IN *E. COLI***

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2016

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

(Data)

Jonas Blistrubis

**AUDINĖS AUGIMO HORMONO INTARPINIŲ KŪNELIŲ,
SUSIDARIUSIŲ *E. COLI*, KIEKYBINĖ IR KOKYBINĖ ANALIZĖ
QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ANALYSIS OF MINK GROWTH
HORMONE INCLUSION BODIES FORMED IN *E. COLI***

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas

doc. dr. Jolanta Sereikaitė

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantas

dr. Danutė Labeikytė

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Lietuvių kalbos konsultantas dr. Vaida Buivydienė

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2016

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Katedros vedėjas

Biotechnologijos studijų kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO UŽDUOTIS

.....Nr.

Vilnius

Studentui Jonui Blistrubiui

(Vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo tema:

Audinės augimo hormono tarpinių kūnelių, susidariusių *E. coli*, kiekybinė ir kokybinė analizė

patvirtinta 2015 m. lapkričio 06 d. dekanų potvarkiu Nr. 390fm

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2016 m. gegužės 30 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

Įvertinti baltymų kiekio skirtumus netirpioje frakcijoje tarp kultūrų indukuotų skirtingomis induktoriaus IPTG koncentracijomis ir identifikuoti šiuos baltymus.

Baigiamojo darbo rengimo konsultantas

.....
(Parašas)

dr. Danutė Labeikytė

(Moksl. laipsnis, vardas, vardas, pavardė)

Vadovas

.....
(Parašas)

doc. dr. Jolanta Sereikaitė

(Moksl. laipsnis, vardas, vardas, pavardė)

Užduotį gavau

.....
(Parašas)

Jonas Blistrubis

(Vardas, pavardė)

.....
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

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

Antrosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos magistro baigiamasis darbas 4

Pavadinimas **Audinės augimo hormono tarpinių kūnelių, susidariusių *E. coli*,
kiekybinė ir kokybinė analizė**

Autorius **Jonas Blistrubis**

Vadovas **Jolanta Sereikaitė**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Šis darbas skirtas įvertinti rekombinantinio audinės augimo hormono (aAH) tarpinių kūnelių, susiformavusių *E. coli*, sudėtį esant skirtingoms induktoriaus koncentracijoms. Buvo lyginamas nežinomų baltymų kiekis netirpioje frakcijoje tarp skirtinga induktoriaus koncentracija indukuotų kultūrų. Naudotos induktoriaus IPTG koncentracijos: 500 μ M (kontrolė), 50 μ M ir 10 μ M. Kultivacija atlikta esant 25 °C temperatūrai, mėginiai surinkti praėjus 27 val. po indukcijos. Baltymų kiekio skirtumai įvertinti 2-D NaDS-PAAG elektroforezės metodu, geliai išanalizuoti *Progenesis SameSpots* programa, rezultatai įvertinti statistiškai. Dominantys baltymai išanalizuoti tandeminiu MS/MS masių spektrometru *Orbitrap Velos*, sujungtu su UPLC *Waters nanoAcquity* chromatografu. Baltymai identifikuoti *Sprot* duomenų bazėje naudojant *MASCOT* programą. Identifikuoti 6 baltymai. Nustatytas didesnis šaperono DnaK ir fermento beta-laktamazės TEM kiekis, kai indukcija yra žema. Periplazminio oligopeptidus surišančio baltymo kiekis, esant žemai indukcijai, yra mažesnis lyginant su kontrole.

Darba sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, metodinė dalis, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas.

Darbo apimtis – 56 p., 7 iliustr., 5 lent., 66 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: audinės augimo hormonas (aAH), tarpiniai kūneliai, 2-D elektroforezė, *E. coli*, masių spektrometrija

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

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

Master Degree Studies **Bioengineering** study programme Master Graduation Thesis 4

Title **Quantitative and Qualitative Analysis of Mink Growth Hormone Inclusion Bodies Formed in *E. coli***

Author **Jonas Blistrubis**

Academic supervisor **Jolanta Sereikaitė**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

The aim of this work was to investigate the recombinant mink growth hormone (mGH) inclusion bodies composition, formed in *E. coli* induced with different concentrations of inductor. Unknown proteins quantity in insoluble fraction was compared between cultures induced with different inductor concentrations. Different concentrations of inductor was used: 500 μ M (control), 50 μ M and 10 μ M. Cell cultivation was performed at 25 °C degree and samples were collected 27 hours after induction. To assess quantitative differences between samples 2-D SDS-PAGE electrophoresis method was used, gels were processed with *Progenesis SameSpots* program and results were statistically analyzed. Proteins of interest were analyzed with MS/MS mass spectrometer *Orbitrap Velos* coupled with UPLC *Waters nanoAcquity* chromatograph. Proteins were identified with *MASCOT* program in *Sprot* database. Six proteins were identified. Higher amount of chaperone DnaK and enzyme beta-lactamase TEM was detected in samples with low induction. Lower amount of periplasmic oligopeptide-binding protein was detected in samples with low level of induction compared with control samples.

Structure: introduction, part of theory, experimental part, results and discussion, conclusions, references.

Thesis consist of: 56 p., 7 pictures, 5 tables, 66 bibliographical entries.

Key words: mink growth hormone (mGH), inclusion bodies, 2-D electrophoresis, *E. coli*, mass spectrometry

Vilniaus Gedimino technikos universiteto
egzaminų sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo
bei gynimo organizavimo tvarkos aprašo
2 priedas

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Jonas Blistrubis, 20101960

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, BIfm-14

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO

SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2016 m. gegužės 30 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Auginės augimo hormono tarpinių kūnelių, susidariusių *E. coli*, kiekybinė ir kokybinė analizė“ patvirtintas 2015 m. lapkričio 06 d. dekanų potvarkiu Nr. 390fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkai ir specialistai: dr. Danutė Labeikytė. Mano darbo vadovė doc. dr. Jolanta Sereikaitė.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Jonas Blistrubis

(Parašas)

(Vardas ir pavardė)

TURINYS

PAVEIKSLŲ IR LENTELIŲ SĄRAŠAS.....	9
ĮVADAS.....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. Intarpiniai kūneliai <i>E. coli</i> ląstelėse.....	13
1.1.1. Intarpinių kūnelių sudėtis.....	13
1.1.2. Intarpinių kūnelių sandara ir morfologija.....	14
1.2. Intarpinių kūnelių susiformavimas.....	15
1.2.1. <i>E. coli</i> panaudojimas rekombinantinių baltymų ekspresijai.....	15
1.2.2. Baltymų sulankstymą citoplazmoje atliekantys šaperonai.....	16
1.2.3. Natyvos tikslinio baltymo frakcijos didinimas.....	20
1.3. <i>E. coli</i> prisitaikymas prie žemos kultivacijos temperatūros.....	21
1.3.1. <i>E. coli</i> ląstelių adaptacija.....	21
1.3.2. Pokyčiai ląstelės membranoje.....	22
1.3.3. RNR metabolizmo adaptacija.....	23
1.3.4. Transkripcijos pokyčiai.....	23
1.3.5. RNR degradacija ir stabilizacija nukritus temperatūrai.....	24
1.3.6. Transliacija žemoje temperatūroje.....	24
1.3.7. Šalčio šoko baltymų indukcijos mechanizmas.....	25
2. METODINĖ DALIS.....	27
2.1. Prietaisai, darbo priemonės, kompiuterinės programos.....	27
2.1.1. Prietaisai, darbo priemonės.....	27
2.1.2. Kompiuterinės programos.....	28
2.2. Medžiagos ir tirpalai.....	28
2.2.1. Medžiagos.....	28
2.2.2. Tirpalai ir buferiniai tirpalai.....	29
2.2.3. Terpė.....	31
2.3. Metodai.....	31
2.3.1. aAH kamieno konservavimas.....	31
2.3.2. Rekombinantinio aAH biosintezė <i>E. coli</i> ląstelėse.....	32
2.3.2.1. Pasėjamosios kultūros paruošimas.....	32
2.3.2.2. Biomasės gavimas.....	33
2.3.3. Biomasės ardymas.....	34
2.3.4. Netirpios baltymų frakcijos plovimas.....	34

2.3.5. Mėginių tirpinimas rehidracijos buferiniame tirpale	34
2.3.6. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu	35
2.3.7. Petersono TCA-DOC baltymų precipitacija ir plovimas acetonu	35
2.3.8. Dvikryptė elektroforezė	36
2.3.8.1. IPG strypelių brinkinimas, mėginio užnešimas.....	36
2.3.8.2. Izoelektrinis fokusavimas.....	36
2.3.8.3. IPG strypelių pusiausvyrinimas.....	37
2.3.8.4. Gradientinių gelių gaminimo aparatūros surinkimas.....	37
2.3.8.5. Gradientinių gelių gaminimas.....	38
2.3.8.6. Antroji kryptis (skirstymas pagal molekulinę masę).....	39
2.3.8.7. Gelių fiksavimas, dažymas ir blukinimas.....	39
2.3.8.8. Gelių analizė.....	40
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	41
IŠVADOS.....	51
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	52

PAVEIKSLŲ IR LENTELIŲ SĄRAŠAS

Paveikslai:

- 1 pav.** Šaperonų valdomas baltymų sulankstymas *E. coli*.
- 2 pav.** NaDS-PAAG elektroforezės metodu išanalizuoti netirpios baltymų frakcijos mėginiai (aAH intarpiniai kūneliai).
- 3 pav.** *E. coli* augimo kreivės, optinio tankio priklausomybė nuo laiko.
- 4 pav.** Auginimo nr. I netirpios baltymų frakcijos mėginių analizė 2-D elektroforezės metodu.
- 5 pav.** Auginimo nr. I pakartotinė netirpios baltymų frakcijos mėginių analizė 2-D elektroforezės metodu.
- 6 pav.** Auginimo nr. II netirpios baltymų frakcijos mėginių analizė 2-D elektroforezės metodu.
- 7 pav.** Auginimo nr. III netirpios baltymų frakcijos mėginių analizė 2-D elektroforezės metodu.

Lentelės:

- 1 lentelė.** Auginimo nr. I baltymų kiekio skirtumai.
- 2 lentelė.** Auginimo nr. I baltymų kiekio skirtumai, pakartotina analizė.
- 3 lentelė.** Auginimo nr. II baltymų kiekio skirtumai.
- 4 lentelė.** Auginimo nr. III baltymų kiekio skirtumai.
- 5 lentelė.** Netirpioje baltymų frakcijoje identifikuoti baltymai.

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

aAH – audinės augimo hormonas

APS – amonio persulfatas

BIS akrilamidas – N, N`-metilen-bis-akrilamidas

BL21(DE3) – *Escherichia coli* modifikuotas kamienas

DTT – ditioneitolis

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis

IK – intarpinis kūnelis

IPG – imobilizuotas pH gradientas

IPTG – izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozidas

JAA – jodacetamidas

LB – Luria-Bertani

NaCl – natrio chloridas

NaDS – natrio dodecilsulfatas

NaOH – natrio hidroksidas

o. v. – optiniai vienetai

PAAG – poliakrilamidinis gelis

pET21a+ – rekombinantinį baltymą nešanti plazmidė

PMSF – fenilmetilsulfonil fluoridas

TEMED – N,N,N`,N`-tetrametiletildiaminas

TFA – trifluoracto rūgštis

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometanas

IVADAS

Rekombinantinių genų ekspresija bakterijose šiuo metu yra paprasčiausias ir pigiausias metodas norint išgauti didelį kiekį heterologinių baltymų, kurie panaudojami tyrimuose ar komerciniais tikslais. Iš visų bakterijų yra išskiriama *Escherichia coli*, kuri išlieka patraukliausiu organizmu dėl puikiai ištirto genomo, didelio skaičiaus klonavimo vektorių, gebėjimo augti greitai didelio tankio kultūroje ir minimalių reikalavimų mitybinei terpei.

Dėl daugybės įvairių stiprių promotorių ir metodų, optimizuojančių transliacijos iniciaciją ir elongaciją, rekombinantiniai baltymai *E. coli* ląstelėse yra sintetinami itin aktyviai. Vis dėlto, aktyvi baltymų sintezė nereiškia, jog efektyviai gaminamas aktyvus, teisingai sulankstytas rekombinantinis baltymas. Nuo pat DNR technologijų eros pradžios buvo susiduriama su baltymo teisingos tretinės struktūros įgavimo problemomis. Buvo nustatyta, jog ne visi heterologiniai baltymai gali natūraliai įgauti teisingą konformaciją.

Daugeliu atveju, ypač, kai produktas yra sudėtingos struktūros, neteisingai sulankstyti baltymai yra nukreipiami į stambius baltymų agregatus, vadinamus tarpiniais kūneliais. Siekiant padidinti išgaunamų natyvių baltymų kiekį yra taikomos dvi strategijos: natyvūs baltymai išgaunami iš tarpinių kūnelių arba vengiama tarpinių kūnelių susidarymo. Baltymų kiekį natyvioje frakcijoje gali padidinti žema kultivacijos temperatūra ir indukcijos mažinimas. Norint išaiškinti tam tikrų ląstelinių baltymų vaidmenį rekombinantinio baltymo sulankstymo procese, nukreipime į agregatus ir pritaikyti tai praktikoje, didinant natyvią baltymų frakciją, turi būti atliekami išsamūs fundamentiniai tyrimai.

Bakalaurinio darbo, atlikto VGTU Chemijos ir bioinžinerijos katedroje Molekulinės biotechnologijos laboratorijoje (2014), rezultatai parodė, jog kultivuojant *E. coli* BL21 (DE3) kamieną, turintį pET21a⁺/aAH plazmidę 25 °C temperatūroje bei indukuojant rekombinantinių baltymų ekspresiją itin maža 10 μM IPTG koncentracija, aptinkamas didesnis nenustatytų netirpių baltymų kiekis 35-45 kDa zonoje. Šis darbas yra skirtas pastebėtam netirpių baltymų kiekio padidėjimui ištirti. Kiekvieno eksperimento metu lygiagrečiai atliekami du auginimai 25 °C temperatūroje: kontrolinis auginimas, kai indukcija atliekama 500 μM IPTG ir eksperimentinis auginimas, kai indukcija atliekama 10 arba 50 μM IPTG. Baltymų kiekio skirtumai įvertinti 2-D elektroforezės metodu ir dominantys baltymai identifikuoti masių spektrometrijos metodu.

Darbo tikslas:

Įvertinti intarpinių kūnelių sudėties pokyčius ir identifikuoti baltymus, kurių kiekis keičiasi, kai indukcija atliekama skirtingomis induktoriaus IPTG koncentracijomis.

Darbo uždaviniai:

- Užauginti ląstelių biomasės, esant 25 °C temperatūrai, indukuojant 10, 50 ir 500 μM IPTG koncentracijomis bei surinkus biomasės mėginius išskirti netirpią baltymų frakciją.
- 2-D elektroforezės metodu palyginti intarpinių kūnelių sudėtį, kai indukcija atliekama skirtingomis IPTG koncentracijomis.
- Masių spektrometrijos metodu identifikuoti dominančius baltymus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Intarpiniai kūneliai *E. coli* ląstelėse

1.1.1. Intarpinių kūnelių sudėtis

Rekombinantinėse *E. coli* ląstelėse tikslinis baltymas yra pagrindinė intarpinių kūnelių (IK) sudedamoji dalis. Vertinant funkciškai, IK yra neteisingai sulankstytų baltymų rezervas, kuriame tikslinis baltymas gali sudaryti iki 95 % baltymų kiekio [1, 2]. Nors proteominė analizė parodė, jog rekombinantinis baltymas IK yra santykinai homogeniškas, be tikslinio baltymo yra aptinkamas didelis kiekis ląstelinių baltymų [3, 4]. Ląsteliniai baltymai gali sudaryti iki 50 % IK masės, ypač ankstyvosiose agregatų formavimosi stadijose [5]. Manoma, jog šie baltymai patenka į netirpią baltymų frakciją dėl tarpmolekulinės sąveikos su tiksliniu baltymu, šaperonų stokos, neefektyvaus agregatų gryninimo. Gryninant IK dažnai nepavyksta atskirti membraninių baltymų (OmpT, OmpC ir OmpA) [6]. Be baltymų, IK aptinkami fosfolipidų ir nukleino rūgščių pėdsakai [7].

IK sudėtyje aptinkama pre- β -laktamazė, kuri yra fermento β -laktamazės prekursorius, po subrendimo suteikiantis rekombinantinėms *E. coli* ląstelėms atsparumą atrankoje naudojamam ampicilinui [3]. Netirpioje baltymų frakcijoje aptinkami mažieji karščio šoko baltymai IbpA ir IbpB [8]. Rekombinantinių *E. coli* ląstelių netirpių baltymų frakcijoje taip pat aptinkamas elongacijos faktorius Tu (EF-Tu) [9], ląstelės metabolizme dalyvaujanti dihidrolipoamido dehidrogenazė (LpdA), triptofanazė (TnaA) ir D-tagatozė-1,6-bisfosfat aldolazė (GatY) [10].

Rekombinantinėse *E. coli* ląstelėse, kurių tikslinis baltymas yra nukreipiamas į IK, pastebimas padidėjęs DnaK kiekis netirpioje baltymų frakcijoje. Agregatus šalinanti DnaK sistema ir ClpB yra limituojantys veiksniai lemiantys tikslinio baltymo kiekį tirpioje formoje. IK formuojančiose ląstelėse aptinkamas padidėjęs DnaK kiekis parodo šio šaperono svarbą šalinant agregatus. Daugelio IK formuojančių baltymų masė yra 30–75 kDa, atitinkančių DnaK substratų dydį [5, 8].

Be DnaK, netirpioje baltymų frakcijoje, aptinkama GroEL šaperoninė sistema. DnaK aptinkamas agregatų išorėje, o GroEL yra tolygiai pasiskirstęs visoje ląstelės citoplazmoje ir IK viduje. Nors tiksliai DnaK ir GroEL funkcija IK metabolizme nėra iki galo išaiškinta, GroEL gali dalyvauti neteisingai sulankstytų baltymų nukreipime į IK [1, 5, 8, 11].

Tai, kad DnaK aptinkamas ant IK paviršiaus, rodo, jog šis šaperonas išskiriamas kartu su netirpia baltymų frakcija ne dėl bendro išsodinimo sąveikaujant su agregatus formuojančiais neteisingai sulankstytais baltymais. DnaK sąveikauja su jau suformuotais agregatais ir katalizuoja baltymų virsmus tarp tirpios ir netirpios formų [11]. DnaK nuolatos šalina agregatuose esančius baltymus net agregacijos metu, todėl IK augimas priklauso nuo balanso tarp baltymų nukreipimo į ir šalinimo iš IK [1]. Kai šaperonai ir proteazės nepajėgia užtikrinti baltymų kokybės kontrolės, baltymai formuoja IK, o kai šaperonai ir proteazės geba atlikti savo funkcijas ir aktyvuojama baltymų *de novo* sintezė, IK ištirpinami *in vivo*. DnaK ir ClpB dalyvauja išgaunant baltymus iš terminio šoko metu susiformavusių baltymų agregatų [12].

Champion, K. M., *et al.*, (2003) [13] palygino baltymų kiekio skirtumus tarp rekombinantinių *E. coli* ląstelių turinčių „tuščią“ ir *NutropinTM* (somatotropiną) koduojančią plazmidę. Nustatyta, jog ląstelėse, gaminančiose rekombinantinį baltymą, 6 kartus padidėja IK surišancio baltymo A (IbpA) kiekis. IbpA yra 16 kDa karščio šoko baltymas, kuris rišasi su agreguojančiais rekombinantiniais baltymais. IK susidarymas aktyvuoja IbpA gamybą [8,13]. DnaK ir GroEL kiekio skirtumų tarp ląstelių, gaminančių ir negaminančių rekombinantinį baltymą, nenustatyta, bet literatūroje minima, jog šių šaperonų kiekis padidėja rekombinantinio baltymo ekspresijos atveju, kai suformuojami IK [13, 14]. Nustatytas stuburinių lizocimo inhibitoriaus (Ivy) kiekio padidėjimas tikslinį baltymą ekspresuojančioje kultūroje bei 6 kartus didesnis GlmU baltymo kiekis „tuščioje“ ląstelių kultūroje. Didžiausias kiekybinis skirtumas buvo nustatytas fago šoko baltymo (PspA) atveju, kurio kiekis buvo 10 kartų didesnis rekombinantinio baltymo nekoduojančiose ląstelėse. PspA priskiriamas *E. coli* streso baltymams, kuris indukuojamas karščio šoku, ląsteles paveikiant etanolio ar hiperosmotiniu šoku [13, 15].

1.1.2. Intarpinių kūnelių sandara ir morfologija

Intarpiniai kūneliai gali susidaryti tiek citoplazmoje, tiek periplazminėje ertmėje, priklausomai nuo to ar rekombinantinis baltymas yra sukurtas sekrecijai. Agregatą formuojantys rekombinantiniai baltymai yra atsparūs proteolizei, geba sukaupti didelius kiekius santykinai gryno baltymo, todėl IK dažnai naudojami toksiškiems, nestabiliems ir lengvai pervyniojamiems baltymams gaminti.

Stebint pro elektroninį mikroskopą IK ląstelėse atrodo kaip stambūs, tamsūs agregatai [16, 17]. Išgryninti IK neturi griežtos struktūros, aptinkami apvalios ar ritinio formos dariniai, kurių diametras siekia 0,2–1,2 μm [18, 19]. Agregatų išorė yra įvairi, paviršius gali būti tiek šiurkštus, tiek lygus. Ląstelėje dažniausiai aptinkamas vienas arba keletas stambių IK, kurių dydžiai gali skirtis [5]. Citoplazmoje esantys IK susiformuoja iš dalinai sulankstytų baltymo

formų, kurios sukuria pirminę šerdį tolesniam agregatui augti [1]. IK dydis priklauso nuo ląstelių dydžio, rekombinantinio baltymo sekos ir aplinkinių sąlygų.

Intarpiniai kūneliai nėra inertiški, jų sudėtyje yra tam tikra dalis tinkamai sulankstytų baltymų, kurie pasižymi biologiniu aktyvumu. Ląstelėje baltymai nėra pasiskirstę vien į aktyvius (tirpius) ir neaktyvius (netirpius) baltymus, yra daugybė pereinamųjų baltymo formų, kurios pasižymi daliniu aktyvumu [20].

Pagal morfologiją baltymų agregatai yra skirstomi į labai tvarkingos struktūros amiloidines skaidulas ir netvarkingos struktūros IK. Amiloidinių skaidulų formavimasis žmogaus organizme sukelia įvairias ligas: *Alzheimer*, *Parkinson*, antrojo tipo diabetas ir prioniniai sutrikimai. Stebint elektroniniu mikroskopu amiloidinės skaidulos atrodo kaip ilgos gijos, kurių diametras siekia 6–12 nm. Rentgeno spindulių difrakcinis tyrimas parodė, jog amiloidinės skaidulos sudaro *cross-β* struktūras [21].

Priešingai nei amiloidinės skaidulos, bakterijose susiformuojantys IK yra morfologiškai netvarkingos struktūros. Šie agregatai susidaro bakterijose, gaminančiose rekombinantinius baltymus, tai reiškiny s keliantis daug problemų biotechnologijoje [22, 23]. Manoma, jog IK susidarymą lemia didelė vienos rūšies baltymų koncentracija, atsirandanti dėl labai aktyvios rekombinantinio baltymo ekspresijos. Naujai gaminami baltymai, dar neatsiskyrę nuo ribosomos, yra apsupami šaperonų, jie apsaugomi nuo agregacijos ir palengva įgauna savo natyvią formą. Esant neįprastai aktyviai ekspresijai, baltymo pagaminama tiek daug, jog nepakanka ląstelėje esančių šaperonų, todėl baltymai pradeda agreguotis [22]. Yra nustatyta, jog IK pasižymi amiloidinėmis savybėmis: rišimasis su Kongo raudonuoju dažu, agregacijos iniciavimas tirpių baltymų apsuptyje, citotoksiškumas eukariotinėse ląstelėse, skirtingas baltymų apykaitos greitis aggregate. Šios savybės leidžia manyti, jog IK savo sudėtyje turi struktūrų panašių į amiloidines skaidulas [23].

1.2. Intarpinių kūnelių susiformavimas

1.2.1. *E. coli* panaudojimas rekombinantinių baltymų ekspresijai

Enterobakterija *E. coli* yra prokariotinis organizmas, kuris plačiausiai naudojamas genetinėms manipuliacijoms, industrinei farmacinių produktų gamybai ir komerciniais tikslais. *E. coli* lyginant su kitomis ekspresinėmis sistemomis galima išskirti keletą pranašumų: gebėjimas augti nebrangioje mitybinėje terpėje, greitas biomasės prieauglis, tolerancija dideliame ląstelių tankiui, lengvas proceso padauginimas. Tai viena pirmųjų ekspresinių sistemų, kurios genomai yra puikiai ištirtas, sukurta daug metodų chromosomų manipuliavimui, genų

klonavimui ir rekombinantinių baltymų ekspresijai. Jei rekombinantinis baltymas nereikalauja sudėtingų posttransliacinių modifikacijų ir nesusiformuoja IK, tai *E. coli* yra palankiausias mikroorganizmas, norint išgauti didelį kiekį vertingo ir kokybiško baltymo.

Kai naujai susintetintas rekombinantinis baltymas nepajėgia greitai įgauti natyvios konformacijos ir nesąveikauja su šaperonais, bėgant laikui lieka dvi išeitys: baltymas nukreipiamas į IK arba baltymas degraduojamas. Net 40 % atvejų kultivuojant rekombinantinę *E. coli* tiksliniai baltymai agreguojasi ir suformuoja IK [24]. Tikimybė neteisingai suvynioti baltymą padidėja naudojant stiprius promotorius arba indukciją atliekant didelėmis induktoriaus koncentracijomis. Ekspresija gali būti tokia efektyvi, jog net pusę ląstelėje sintetinamų baltymų sudaro rekombinantinis baltymas. Esant tokioms aplinkybėms, baltymo agregacijos greitis dažniausiai būna didesnis nei natyvios konformacijos įgavimo greitis, o baltymo sulankstymą atliekančių šaperonų rezervas išsenka. Agregacijos procesas konkuruoja su teisingu baltymų sulankstymu ir labiau priklauso nuo ląstelės šaperonų veiklos, aplinkos sąlygų nei nuo tikslinio baltymo charakteristikų (baltymo dydžio, sulieto baltymo, formuojamų subvienetų struktūros, hidrofobiškumo). Kitas faktorius lemiantis IK formavimąsi yra bakterijų posttransliacinių modifikacijų stoka, kurios yra būtinos baltymo natyviai formai įgauti. Pavyzdžiui, laukinio tipo *E. coli* sunkiai formuoja vidumolekulinės ir tarpmolekulinės S-S jungtis, nes citoplazma pasižymi redukuojančiomis savybėmis, todėl rekombinantiniai baltymai, reikalaujantys daug disulfidinių jungčių, yra agreguojami.

Transkripcija ir transliacija tankiame *E. coli* citozolyje yra stipriai vienas nuo kito priklausomi procesai. Vidutiniškai kas 35 sekundes nuo ribosomos atpalaiduojama nauja baltymo molekulė, kuri patalpinama ląstelės makromolekulių apsuptyje, kur koncentracija siekia 300–400 mg/ml, todėl teisingas baltymo sulankstymas yra tikras iššūkis [25]. Įprastai nedideli šeimininko baltymai (< 100 a. r.), sudaryti iš vieno domeno, geba greitai ir efektyviai įgauti tinkamą konformaciją, bet dideli, turintys keletą domenų rekombinantiniai baltymai, kurių ekspresija yra nenatūraliai aktyvi, sulankstymui reikalauja šaperonų pagalbos.

1.2.2. Baltymų sulankstymą citoplazmoje atliekantys šaperonai

Neteisingas rekombinantinių baltymų sulankstymas yra dažnas reiškinys tiek *E. coli* atveju, tiek naudojant kitas ekspresines sistemas. Rekombinantinių baltymų neteisingas sulankstymas gali atsirasti dėl priešlaikinės transliacijos terminacijos, naujai susintetintos polipeptidinės grandinės teisingos konformacijos įgavimo sutrikdymo arba baltymo teisingos konformacijos praradimo dėl aplinkos veiksnių sukeliama streso. Ląstelei yra nenaudinga prarasti natyviuosius baltymus, todėl šiai problemai spręsti yra naudojami itin konservatyvios

struktūros baltymai (šaperonai), gebantys atlikti *de novo* baltymų sulankstymą, teisingai sulankstyti iš dalies sulankstytus baltymus, ištirpinti agregatus ir sunaikinti pažeistus baltymus. Šaperonai apsaugo aktyvias baltymo zonas nuo tarpusavio sąveikos ir sąveikos su tirpikliu. Be to, prisijungę šaperonai apsaugo baltymą nuo nepageidaujamų sulankstymų skatinančių fermentų, kurie geba pagreitinti nuo molekulių kinetikos priklausomus pokyčius, tokius kaip peptidil-propil ryšio izomerizacija, naujų disulfidinių tiltelių sukūrimas ir esamų pergrupavimas. Tikimybė suformuoti IK priklauso nuo ląstelės šaperonų rinkinio pajėgumo ir sąveikos su lankstomu tiksliniu baltymu. Greitos rekombinantinio baltymo sintezės metu ląstelė patiria šoką, indukuojami karščio šoko tipo baltymai [26], tačiau pavėluota ir pasyvi biosintezė nesuformuoja efektyvaus atsako malšinant agregatų susidarymą.

Molekuliniai šaperonai yra didžiausia sulankstymo moduliatorių klasė, kuri efektyviausiai atlieka baltymų konformacinės kokybės kontrolę. Šaperonai sąveikauja su baltymais neturinčiais natyvios formos, juos stabilizuoja, tinkamai sulanksto. Nors šaperonai yra konstitutyviai ekspresuojami, esant subalansuotoms augimo sąlygoms, tačiau jų ekspresija padidėja esant karščio šokui ir faktoriams, kurių dėka baltymai sulankstomi neefektyviai (pvz., rekombinantinio baltymo ekspresija). Pagal atliekamas funkcijas šaperonai skirstomi į streso ir karščio šoko baltymus (Hsps).

Vertinant veikimo principą mechanistiškai, baltymo sulankstymo metu šaperonai geba iškelti struktūrizuotus hidrofobiškus domenų į globulės išorę. Įprastai hidrofobinės baltymo dalys nėra orientuotos į supantį tirpiklį ir yra linkusios spontaniškai suformuoti hidrofobiškus domenų. Be šaperonų pagalbos tam tikros baltymo dalys sulankstymo metu negali specifiškai sąveikauti, nes hidrofobiškų domenų išardymas yra energetiškai nenaudingas procesas. Neperžengiant energetinio barjero baltymas yra nepilnai arba neteisingai sulankstomas.

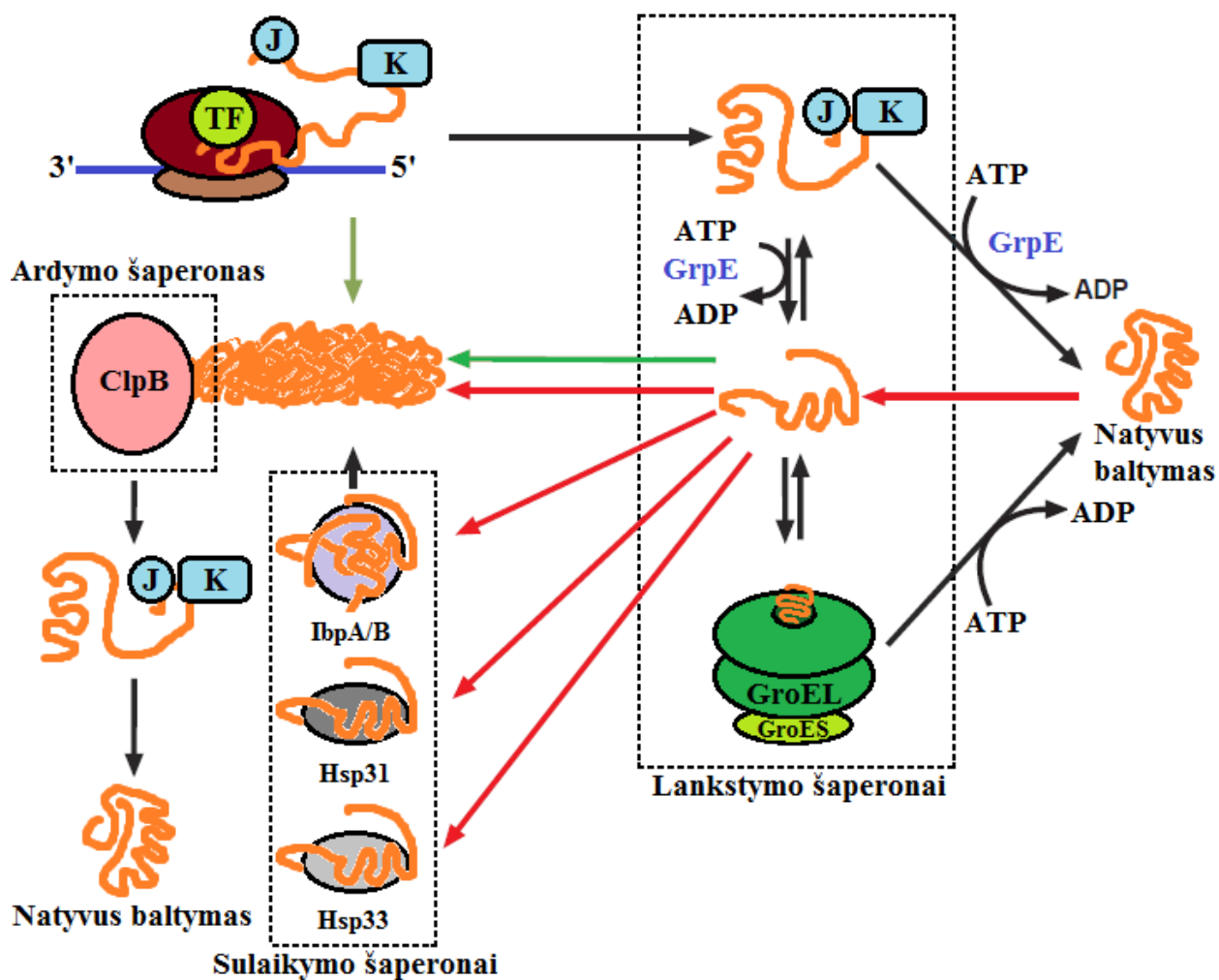
Šaperonai pasižymi selektyvumu baltymo sekai, nuo to priklauso ar šaperonas jungsis su baltymu. Dažniausi šaperonų taikiniai yra trumpos, nestruktūrizuotos, hidrofobinės baltymo atkarpos, turinčios daug bazinių ir mažai rūgštinių amino rūgščių liekanų. Kadangi šie motyvai baltymo grandinėje yra sutinkami dažnai, šaperonai turi daug susirišimo zonų.

Pagal veikimo mechanizmą molekuliniai šaperonai yra skirstomi į tris grupes. Pirmajai grupei priklauso šaperonai, kurie naudodami ATP (*angl.* adenosine triphosphate) atlieka konformacinius baltymų struktūros pakeitimus: teisingai sulanksto arba išlanksto neteisingos formos baltymus (pvz.: DnaK ir GroEL). Sekančiai grupei priklauso šaperonai sulaikantys baltymus dalinio sulankstymo stadijoje (pvz.: IbpB). Baltymas yra fiksuojamas dalinai sulankstytoje formoje, kol yra sumažinamas faktorius, sukėlęs baltymo konformacinius

pokyčius, ir teisingą baltymo formą gali atkurti sulankstymo šaperonai. Trečiajai grupei priklauso šaperonai, kurie geba tirpinti susidariusius agregatus (pvz.: ClpB).

Už *de novo* baltymų sulankstymą *E. coli* citoplazmoje yra atsakingos trys šaperonų sistemos: triggerinis faktorius (*angl.* Trigger Factor (TF)), DnaK-DnaJ-GrpE ir GroEL-GroES šaperoninės sistemos (1 pav.) [27]. TF baltymas yra sudarytas iš 3 domenų, kuris vidutinišku afiniškumu jungiasi su ribosomomis šalia baltymų išėjimo zonos. TF jungimosi su ribosoma padėtis leidžia lengvai sąveikauti su išlendančių naujai susintetintų baltymų trumpais fragmentais. Centrinis TF domenas turi peptidil-propil *cis/trans* izomerazinį aktyvumą [28]. Dažniausiai TF sąveikauja su didelės masės (> 60 kDa) multi-domeniniais baltymais, kurie sudaro 10–20 % *E. coli* proteomo [29].

Prie ilgų, naujai susintetintų baltymų grandinių, jungiasi DnaK šaperonas, kurio substratu gali būti ir TF atpažįstamos sekos. DnaK yra nukreipiamas į aukšto afiniškumo zonas padedant košaperonui DnaJ, kuris aktyvuoja DnaK surišto ATP hidrolizę, taip sukuriama tvirtas ryšys. DnaK ir baltymo sąveikai nutraukti yra naudojamas GrpE, kuris DnaK priklausančią ADP paverčia į ATP. DnaK-DnaJ-GrpE sistemos apdorotas baltymas gali įgauti natyvią formą savarankiškai, pakartotinai jungtis su DnaK ir TF, kol pasiekama natyvi forma arba sąveikauti su GroEL-GroES sistema. GroEL/ES sistema apdoroja iki 10 % *E. coli* naujai pagamintų baltymų [30]. GroEL yra 800 kDa oligomeras, sudarytas iš dviejų homoheptamerinių žiedų. Prie vieno iš dviejų GroEL žiedų visada prijungtas GroES. GroEL substratai yra dalinai struktūrizuoti baltymai (iki 60 kDa), kurie nėra įgavę natyvios formos. GroEL žiedai suformuoja uždara erdvę, kurioje įtrauktas baltymas yra veikiamas absoliutaus praskiedimo efekto ir gali įgauti teisingą formą. GroES suformuoja uždangą, palaiko baltymą GroEL žiedų ertmėje ir naudojant ATP suteikiamą energiją baltymas pasiekia natyvią formą [30, 31].



1 pav. Šaperonų valdomas baltymų sulankstymas *E. coli*. Pritaikyta pagal [31]

Naujai susidarantys baltymai, kuriems reikalinga šaperonų pagalba natyvios formos įgavimui, pirmiausia susiduria su TF ir DnaK-DnaJ sistemomis (1 pav.). Abu šie šaperonai apsaugo hidrofobines baltymo dalis nuo sąlyčio su tirpikliu ir kitomis baltymo dalimis. Dalinai sulankstytam baltymui atsiskyrus nuo TF ar DnaK: pasiekiami natyvi forma savarankiškai, vėl prisijungiama prie DnaK-DnaJ sistemos arba baltymas nukreipiamas į GroEL/ES sistemą, kur pasiekiami natyvi forma absoliutaus atskiedimo aplinkoje. Raudonos rodyklės žymi baltymo perėjimo kryptį nepalankiomis aplinkos sąlygomis. (1 pav.) Labilūs baltymai praranda natyvią formą, išsilanksto ir suformuoja agregatus. Sulaikymo šaperono IbpB paviršiuje prisijungia dalinai sulankstyti baltymai, kurie sulaikomi, kol sulankstymo šaperonai juos prijungia prie stambių agregatų. Sulaikymo šaperonai Hsp33 ir Hsp31 yra svarbūs oksidacinio ir stipraus terminio šoko atveju. ClpB atlieka agregatų išardymą ir, likvidavus šoką sukėlusį faktorių, aktyvuoja DnaK-DnaJ-GrpE sistemą. Rekombinantiniai baltymai tinkamu metu nesusijungę su TF ar DnaK/DnaJ sistemomis yra nukreipiami į IK (žalia rodyklė, 1 pav.) [31].

Be *de novo* baltymų sulankstymo, DnaK ir GroEL atlieka aplinkos veiksmų sukeltą šoko pažeistų baltymų sulankstymą iš naujo. Šiems šaperonams darbą palengvina sulaikymo šaperonai (holdazės), kurie stabilizuoja dalinai sulankstytus baltymus nepakeisdami jų struktūros (1 pav). Labiausiai žinomos holdazės priklauso mažųjų Hsp šeimai. *E. coli* holdazės IbpA ir IbpB yra 16 kDa homologiniai baltymai, kurie koduojami su tuo pačiu operonu [8]. IbpB suformuoja didelius oligomeras, kurie reaguoja į temperatūros pokyčius. Pakilus temperatūrai IbpB į išorę iškelia savo hidrofobinius domenų, kurie sugaudo pereinamosios formos išlankstytus ir denatūruotus linkusius baltymus [32]. Nukritus temperatūrai (pašalinus šoką sukeliančius faktorius), su IbpB surištus baltymus perima DnaK ir GroEL sistemos, kurios sugrąžina baltymui natyvią formą.

Lankstymo ir sulaikymo šaperonai yra nepajėgūs susidoroti su baltymų agregacija stipraus ir ilgo streso atveju, todėl susiformuoja agregatai. *E. coli* ląstelėse agregatų išardymą atlieka Hsp 100 šeimos narys, žiedą formuojanti ATP-azė ClpB. Be to, Hsp 100 šeimai priklauso ClpA, ClpX ir ClpY, kurių pagrindinė funkcija yra baltymų proteolitinis skaidymas [12]. ClpB kartu su kitais mažaisiais karščio šoko baltymais (sHsp) efektyviai išardo agregatus, bet dalinai sulankstyti baltymai įgauna natyvią formą tik po sąveikos su DnaK [33]. *In vitro* tyrimais nustatyta, jog DnaK-DnaJ gali ištirpinti nedidelius agregatus. *In vivo* DnaK-DnaJ inicijuoja didelių agregatų išardymą, kurį tęsia ClpB [34].

1.2.3. Natyvios tikslinio baltymo frakcijos didinimas

Daugelis eukariotinių baltymų, turinčių didelę terapeutinę ir komercinę vertę, turi sudaryti sudėtingas tretines ir ketvirtines struktūras, suformuoti keletą disulfidinių jungčių, priimti post-transliacines modifikacijas tam, kad būtų pasiekta natyvi, biologiškai aktyvi konformacija. Tokių baltymų gamyba *E. coli* ląstelėse yra sudėtinga užduotis, nes viduląstelinė aplinka, sulankstymą atliekantys baltymai ir sulankstymo kokybės kontrolė prokariotuose labai skiriasi nuo eukariotų. Šie neatitikimai daugeliu atveju sukelia IK formavimąsi, rekombinantinių baltymų proteolitinį skaidymą, kai heterologinis baltymas yra aktyviai ekspresuojamas *E. coli*.

Klasikiniai būdai IK formavimuisi slopinti yra paremti rekombinantinio baltymo sintezės greičio mažinimu. Rekombinantinio baltymo gaminimo greitį galima sumažinti naudojant silpnesnį promotorius, ir/arba mažinant indoktoriaus koncentraciją. Naudojant *lac* operonu paremtas sistemas indukcija atliekama izopropil D-tiogalaktopiranozidu (IPTG), kurio koncentracijai esant žemiau 100 μ M stebimas dalinės indukcijos efektas [35]. Kita strategija yra žemesnės kultivacijos temperatūros parinkimas, kuris suteikia dvigubą naudą, nes vienu metu yra lėtinami transkripcijos, transliacijos procesai ir mažinamas hidrofobinės sąveikos efektas. Šių

strategijų neigiama pusė yra sumažėjęs produktyvumas [36]. Naudojant žemą kultivacijos temperatūrą galima išgauti didesni kiekį tirpaus rekombinantinio baltymo, kurio aktyvumas yra didesnis, lyginant su tirpia rekombinantinio baltymo frakcija esant įprastai kultivacijos temperatūrai. Žema temperatūra keičia ne vien baltymo pasiskirstymą tarp tirpios ir netirpios frakcijų, bet kartu keičia baltymų konformacinį būvį tiek tirpioje, tiek netirpioje frakcijose. Vis dėlto, atliekant kultivaciją žemoje temperatūroje pakankamai ilgą laiką, agregatų kiekis didėja [20].

Siekiant išlaikyti didelį produktyvumą, kartu sumažinant neteisingą baltymų sulankstymą, *E. coli* kartu su tiksliniu baltymu yra ekspresuojami molekuliniai šaperonai, dalyvaujantys *de novo* baltymų sulankstyme. DnaK-DnaJ arba TF aktyvi ekspresija yra naudinga tuo atveju, jei reikalingas papildomas efektyvus rekombinantinio baltymo sulankstymas ankstyvoje sintezės stadijoje [37]. Jei baltymas geba lengvai pereiti ankstyvąją sulankstymo stadiją, bet kyla sunkumų pasiekiant galutinę konformaciją, papildomai yra ekspresuojama GroEL-GroES šaperoninė sistema, kuri efektyviai sulanksto < 60 kDa baltymus. Esant problemų viso rekombinantinio baltymo sulankstymo metu, papildomai ekspresuojamos abi DnaK-DnaJ ir GroEL-GroES šaperoninės sistemos [37].

1.3. *E. coli* prisitaikymas prie žemos kultivacijos temperatūros

1.3.1. *E. coli* ląstelių adaptacija

E. coli yra mezofilinė bakterija, kuri gerai auga kultivavimo temperatūrai esant nuo 21 iki 49 °C. Ši bakterija randama žmogaus žarnyne, todėl nestebina, jog nustatyta optimali augimo temperatūra yra 37 °C. Kultivavimo metu yra pastebimas staigus ląstelių augimo greičio kritimas, kai terpės temperatūra yra žemesnė nei 21 °C, o pasiekus 7.5 °C ląstelių augimas nebefiksuojamas [38].

Kiekvienas mikroorganizmas gali efektyviai daugintis ir augti tik jam vienam būdingame siaurame fizikocheminių veiksnių intervale. Ląstelių augimo greičio sumažėjimas analizuojant pasirinktą veiksniį dažniausiai priklauso nuo vienos ar kelių struktūrų (pvz.: šaperonai) atliekamų funkcijų sutrikdymo. Ląstelių struktūrų gebėjimas efektyviai atlikti savo funkciją tam tikrame išorinių veiksnių intervale nulemia mikroorganizmų biogeografinį pasiskirstymą [39]. Nustatyta, jog baltymų Dps, RpsB, ClpB ir DnaK veiklos sutrikimai esant žemai temperatūrai yra atsakingi už ląstelių augimo sustojimą, žūtį. Tai gali būti susiję su tuo, jog šaltis inaktyvuoja GroEL šaperonus, kurie toliau nepajėgia iš naujo sulankstyti dėl šalčio inaktyvuotus Dps, RpsB, ClpB ir DnaK baltymus [39]. Įdomu tai, jog šaperonų GroEL ir GroES

gebėjimas tinkamai sulankstyti baltymus stipriai sumažėja nukritus temperatūrai žemiau 15 °C. Šie šaperonai dalyvauja daugiau nei 30 % ląstelės baltymų sulankstyme ir surinkime taip pat prisideda prie baltymų sekrecijos. Augimui tinkamas temperatūros intervalas yra tiesiogiai susijęs su šaperonų aktyvumu [38].

Mikroorganizmai privalo sugebėti prisitaikyti prie kintančios aplinkos. Pokyčiai susideda iš aplinkoje esančio deguonies ir mitybinių medžiagų prieinamumo, osmosinio šoko, temperatūros kitimo. Nukritus aplinkos temperatūrai ląstelėje prasideda svarbūs fiziologiniai pokyčiai, pasikeičia membranų klampumas, padidėja RNR ir DNR antrinių struktūrų stabilumas, kuris apsunkina RNR transkripciją, transliaciją ir degradaciją [40]. Šalčio šoko atsakas padeda ląstelei kovoti su nepalankiais aplinkos pokyčiais, aktyvinant specifinių baltymų sintezę.

Kultivuojant *E. coli* optimalioje temperatūroje (37 °C) stebimas didžiausias ląstelių augimo greitis. Staigiai sumažinant kultivavimo temperatūrą yra stebimas augimo greičio kritimas, ląstelės pereina į aklimatizacijos fazę, kuri užtrunka apie 4 valandas. Aklimatizacijos metu daugelio baltymų (ir tikslinio baltymo) gamyba sustoja, tačiau šalčio šoko baltymų kiekis pradeda augti [41]. Po šių pokyčių ląstelės prisitaiko prie žemos kultivavimo temperatūros, šalčio šoko baltymų kiekis krenta, pratęsiama ląstelės baltymų sintezė, augimas, dauginimasis, bet visi procesais vyksta lėčiau [40].

1.3.2. Pokyčiai ląstelės membranoje

Staigus aplinkos temperatūros sumažėjimas pakeičia ląstelės membranos savybes, sumažėja fosfolipidų takumas, padidėja membranos laidumas [42]. Gram-neigiamų bakterijų membranoje yra lipopolisacharidų (LPS), kurie susideda iš tolimojo polisacharido (O-antigeno), šerdinio polisacharido ir lipido A. *E. coli* bakterijų lipidas A yra sudarytas iš dviejų gliukozaminų sujungtų su acilo grandinėmis (riebiosios rūgštys). Kultivuojant ląsteles 37 °C temperatūroje laurato riebioji rūgštis sudaro didžiausią dalį.

Ląsteles veikiant žema temperatūra yra pastebimas laurato riebiosios rūgšties kiekio sumažėjimas, kurią pakeičia palmitoleatas [43]. Palmitoleatas lyginant su lauratu yra nesočioji riebioji rūgštis. Nesočiosios riebiosios rūgštys membranai suteikia didesnę takumą, tai padeda kovoti su žemos temperatūros sukeliama problemomis. *E. coli* ląstelėse už laurato pakeitimą palmitoleatu yra atsakinga šalčiu indukuojama aciltransferazė LpxP, kuri palmitoleatą prijungia prie lipido A [44].

1.3.3. RNR metabolizmo adaptacija

Daugelis šalčiu indukuojamų baltymų dalyvauja RNR metabolizme (pvz.: RNR helikazė DeaD, egzonukleazės RN-azė R ir PNP-azė). Stipriausiai šalčiu indukuojami baltymai yra nukleino rūgščių šaperonai, priklausantys šalčio šoko baltymų šeimai Csp. Tai parodo, jog RNR metabolizmas yra kritiškas bakterijų adaptacijai.

Žema temperatūra stabilizuoja antrinę nukleino rūgščių struktūrą, tai keičia transkripciją, RNR degradaciją ir transliaciją. Pagrindinė šalčio šoko baltymų veikiančių RNR metabolizmą užduotis yra apsaugoti nuo antrinių struktūrų susidarymo bei degraduoti susidariusias struktūrizuotas RNR. Csp šeimos nukleino rūgščių šaperonai apsaugo nuo antrinių struktūrų formavimosi, helikazė DeaD geba išardyti antrines struktūras, o egzonukleazės PNP-azė ir RN-azė R atlieka jų degradaciją. RN-azė R yra vienintelis *E. coli* fermentas efektyviai karpantis dvigrandę RNR 3' → 5' kryptimi be helikazės pagalbos. Šalčio šoko metu RN-azės R kiekis padidėja iki 10 kartų [45].

1.3.4. Transkripcijos pokyčiai

Žemoje temperatūroje keičiasi DNR susukimo laipsnis, ji tampa labiau neigiamai superspiralizuota. Tai dalinai priklauso nuo to, kad vykstančioje sąveikoje dalyvauja histonų tipo HU (HupB) baltymai bei fermentas girazė (GyrA), kuris geba inicijuoti neigiamą superspiralizavimą. DNR struktūros pokytis yra trumpalaikis, trunkantis ~ 1 valandą, aklimatizacijos proceso metu [46]. Yra manoma, jog laikinoji DNR struktūra geba inicijuoti šalčio indukuojamų baltymų transkripciją. Tyrimų metu buvo parodyta, jog kultivuojant *Synechocystis sp.* ir ląsteles paveikiant DNR girazės inhibitoriumi, pastebimas šalčio indukuojamų genų slopinimas [47].

Daugelis baltymų priklausančių Csp šeimai geba jungtis su DNR. CspE ląstelėje dalyvauja chromosomų formavime (sulankstyme) ir apsaugoje [48]. CspA ir CspE dalyvauja transkripcijoje esant žemai temperatūrai atlikdami antiterminatorinę funkciją, neleisdami susiformuoti „plaukų segtuko“ motyvui, kuris sukelia priešlaikinį transkripcijos nutraukimą. Kitas baltymas pasižymintis antiterminatorine funkcija yra NusA [49].

Transkripcijos faktorius RpoS (σ^S) nėra priskiriamas šalčiu indukuojamiems baltymams, bet jis yra susijęs su ekspresija genų, veikiančių ląsteles susiduriančias su įvairiu stresu, tarp kurių ir šalčio šokas. Tiriant *E. coli* bioplėvelės formavimą 23°C temperatūroje, 40 % genų buvo kontroliuojami RpoS. Dalis šių genų buvo atsakingi už biofilmo formavimą, todėl atlikus eksperimentą su mutantu neturinčiu RpoS geno, buvo pastebėta, jog ląstelės sunkiau formuoja biofilimą 23 °C temperatūroje [50].

1.3.5. RNR degradacija ir stabilizacija nukritus temperatūrai

Dalis Csp šeimos baltymų dalyvauja RNR stabilizavime ir/arba degradacijoje. Csp šaperonų veikla yra būtina mRNR stabilumui, kai aplinkos temperatūra yra žema. CspA yra pagrindinis šalčio indukuojamas baltymas Csp šeimoje, kuris destabilizuoja antrines struktūras ir veikia kaip šaperonas, palaikantis RNR viengrandę formą, palankią RNR degradacijai. CspE veikia priešingai – stabdo RNR degradaciją. Šis fermentas geba prikabinti poli-A uodegą, kuri apsaugo RNR nuo PNP-azės egzonukleazinio aktyvumo ir nuo RN-azės E vidinio sukarpymo [51].

E. coli fermentas DeaD yra DEAD-box tipo helikazė, kuri šalčio šoko metu suformuoja degradosomą ir dalyvauja RNR degradavime. Turimas helikazinis aktyvumas padeda lengviau degraduoti RNR struktūras. *In vitro* tyrimuose buvo pastebėta, jog DeaD tiesiogiai jungiasi su RN-aze R, kuri atlieka pagrindinį RNR skaldymą degradosomos komplekse. RhlB helikazė aptinkama šalčio šoko atveju susijungusi su degradosoma, yra nežinoma ar dvi skirtingos helikazės jungiasi su RN-aze E, ar ląstelėje yra dviejų tipų degradosomos [52].

Esant žemai temperatūrai helikazė DeaD dalyvauja ribosomų biogenezeje. Inaktyvavus DeaD geną sumažėja subrendusių 50S ribosomos subvienetų, bet susidaro 40S dydį atitinkančių neaktyvių darinių [53]. Ribosomų susidaryme dalyvauja RbfA baltymas, kuris atsakingas už 30S subvieneto brendimą, jo kiekis ląstelėje padidėja šalčio šoko atveju [54].

PNP-azė yra viena pagrindinių egzonukleazų *E. coli*, kurios kiekis šalčio šoko metu padidėja dvigubai. Fermentas mažina Csp šeimos baltymų kiekį aklimatizacijos proceso pabaigoje. Ląstelės neturinčios PNP-azės, poli-A polimerazės (PAP) ar DeaD helikazės, geba ekspresuoti įprastą kiekį Csp baltymų, bet praėjus aklimatizacijai, Csp baltymų kiekis išlieka nepakitęs. Tai parodo, jog minėtieji fermentai prisideda prie specifinio Csp narių mRNR degradavimo [55].

1.3.6. Transliacija žemoje temperatūroje

Nukritus temperatūrai baltymų transliacija lėtėja, sustoja, tačiau tai neveikia šalčio indukuojamų baltymų gamybos, priešingai, jų ekspresija padidėja. PY yra baltymas dalyvaujantis transliacijos blokavime. Blokuojama mRNR, taip stabdoma transliacija, nes PY baltymas jungiasi su 30S ribosomos subvienetu, kuris atskiriamas nuo 50S. Trūkstant 30S subvienetų nesusiformuoja 70S kompleksai, todėl jų kiekis ilgainiui mažėja. PY baltymas aptinkamas kartu su ribosomomis jau pirmąją valandą po šalčio šoko ir išlieka per visą aklimatizacijos periodą, kol prisitaikysios ląstelės sugrįžta prie įprasto augimo [56].

Struktūrinė RNR stabdo ribosomų atliekamą transliaciją, be to, suformuotos struktūros gali slėpti *Shine-Dalgarno* sekas, kurios yra reikalingos transliacijos iniciacijai. RNR struktūriškumo mažinimą atlieka Csp baltymai, RNR helikazės, gebantys išlydyti RNR motyvus [57].

Pačios ribosomos sugeba prisitaikyti prie naujų sąlygų. *In vitro* tyrimais įrodyta, jog *E. coli* transliacinis mechanizmas žemoje temperatūroje aktyviau pasirenka šalčio indukuojamų genų mRNR [58]. Kryptingą mRNR pasirinkimą lemia dvi faktorių grupės vadinamos *cis* ir *trans*. *Cis* apima specifines mRNR struktūras būdingas tik šalčiu indukuojamiems genams, o *trans* apima Csp baltymus ir iniciacijos faktorius (IF1, IF2, IF3), aktyvinančius šalčio šoko indukuojamų genų mRNR transkripciją. IF3 faktorius stimuliuoja tik šalčio indukuojamų genų mRNR transliaciją, o IF1 sustiprina IF3 atliekamą funkciją, neveikdamas jo specifiškumo mRNR [59].

Baltymai pasižymi didžiausiu termodinaminiu stabilumu esant tam tikrai, optimaliai temperatūrai (*E. coli* – 20 °C). Tiek aukšta, tiek žema temperatūra apsunkina teisingą baltymų suvyniojimo procesą, todėl atsiranda neteisingai sulankstytų baltymų. Iniciacijos faktorius F2 ir Hsc66 baltymas dalyvauja teisingame baltymų sulankstyme šaltyje [60]. Ko-transliaciniame baltymų sulankstyme dalyvauja TF, kurio kiekis padidėja nukritus temperatūrai. Ląstelės turinčios sumažintą TF kiekį yra labai jautrios šalčiui, o papildomai ekspresuojant TF, padidėja ląstelių gebėjimas išgyventi šaltyje [28]. TF pagerina baltymų sintezę, sulankstymą, apsaugo pagamintus ir tvarko šalčio pažeistus baltymus [40].

1.3.7. Šalčio šoko baltymų indukcijos mechanizmas

Šalčio adaptacijos metu daugelio baltymų ekspresija stabdoma, bet šalčio indukuojamų baltymų ekspresija yra indukuojama. Indukcijos mechanizme nedalyvauja specifiniai indukcijos faktoriai, manoma, jog ekspresijos aktyvinimas vyksta dėl mRNR stabilumo pokyčių ir pakitusio prieinamumo transliacijai. Baltymo CspA šalčio indukcija yra plačiausiai ištirta. Šalčio šoko metu CspA sudaro iki 13 % visų ląstelės baltymų, bet esant optimaliai 37 °C temperatūrai baltymo kiekis yra labai mažas [61].

Geno *cspA* promotorius yra jautrus temperatūros sumažėjimui. 15 °C temperatūroje *cspA* geno promotorius yra 3 kartus aktyvesnis, be to, mRNR kiekis išauga dėl padidėjusio transkripto stabilumo (pusėjimo laikas 15 min.). Geno *cspA* mRNR yra labai nestabili 37 °C temperatūroje, pusėjimo laikas vos 12 sekundžių. Manoma, jog *cspA* mRNR 5' gale esančio netransliuojamo regiono (5' UTR) struktūriniai persitvarkymai sukeliantys nestabilumą 37 °C

temperatūroje, yra atsakingi už mRNR stabilizavimą žemoje temperatūroje. Be to, struktūriniai cspA 5' UTR pokyčiai žemoje temperatūroje atveria translacijos iniciacijos regioną (TIR) [62]. Padidėjęs CspA, translacijos iniciacijos faktorių IF3 ir IF1 kiekis, veikia kaip *trans* veiksniai, palengvinantys tolimesnę CspA biosintezę [58].

2. METODINĖ DALIS

2.1. Prietaisai, darbo priemonės, kompiuterinės programos.

2.1.1. Prietaisai, darbo priemonės

Prietaisai ir darbo priemonės:	Gamintojas:
10 µL, 100 µL, 200 µL, 1 mL, 5 mL automatinės pipetės	Eppendorf Research
100 mL, 500 mL, 1000 mL siaurakaklės plokščiadugnės kolbos	Rasotherm
20 mL, 200 mL, 500 mL stiklinės	Simax
25 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L, 2 L matavimo cilindrai	Simax, Rasotherm
Analitinės svarstyklės (Max 220 g, d = 0.0001 g)	Scaltec
Autoklavas	
Centrifuga	Labotek
Centrifuga 5810R	Eppendorf
Centrifuga Rotina 35R	Hettich
Elektrinė plytelė	Severin
Inkubatorius	Medline
Laminarinė spinta	
Magnetinė maišyklė RH basic 2	IKA
pH-metras	Mettler Toledo
Spektrofotometras Ultrospec 4000	Pharmacia Biotech
Srovės šaltinis izofokusavimui EPS 3501 XL	GE Healthcare
Svarstyklės SPO (Max 3100 g, d = 0.1 g)	SCALTEC SPO 61
Traukos spinta	
Ultragarsinis dezintegratorius Vibracell VCX 750	Sonics
Vienkartinės kiuvetės	Roth
Vorteksas MS1 Minishaker	IKA
Skeneris ImageScanner III	GE Healthcare Life Sciences
Elektroforezės aparatas SE900	Hoefer
Izofokusavimo prietaisas Multiphor II	GE Healthcare
Gradienteris	Pharmacia Biotech

Peristaltinė pompa Cyclo II	Roth
Vartytuvas WT 17	Biometra
Elektros šaltinis (izofokusavimui) Electrophoresis	GE Healthcare
Elektros šaltinis (elektroforezei) CS-3AMP	Cleaver scientific
Termostatas (izofokusavimui) MultiTemp III	GE Healthcare
Termostatas (elektroforezei) MultiTemp IV	GE Healthcare
Dejonizuoto vandens sistema Mili-Q	Millipore

2.1.2. Kompiuterinės programos

- *Microsoft Office 2010* programinis paketas
- *Adobe Photoshop CS6*
- *Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics)*
- *EPSON Scan*

2.2. Medžiagos ir tirpalai

2.2.1. Medžiagos

Medžiaga:

Acetonas
Acto rūgštis
Akrilamidas
Alyva Plus One (Dry Strip Cover Fluid)
Ampicilinas
APS (amonio persulfatas)
Baltymų molekulinų masių standartas SM0441
Baltymų molekulinų masių standartas SM0661
BIS akrilamidas (N, N`-metilen-bis-akrilamidas)
Bromfenolio mėlis
CHAPS
Coomassie Brilliant Blue G250
Coomassie Brilliant Blue R250
Deoksicholatas

Gamintojas, šaltinis:

P.P.H. Standard
Lachema
Roth
Amersham Biosciences
Roth
Fluka
Fermentas
Fermentas
Roth
Serva
Roth
Serva
Serva
Roth

DTT (ditiotreitolis)	Fermentas
<i>E. coli</i> kamienas BL21 (DE3), turintis plazmidę pET21a ⁺ /aAH	Molekulinės biotechnologijos laboratorija, VGTU
EDTA (etilendiamintetraacto rūgštis)	Roth
Etilo alkoholis	Vilniaus degtinė
Fosforo rūgštis	Реахим
Glicerolis	P.P.H. Standard
Glicinas	Roth
HCl (druskos rūgštis)	Rieder-de Haën
IAA (jodacetamidas)	Sigma
IPG buferinis tirpalas <i>Pharmalyte</i> pH 4-7	GE Healthcare Life Sciences
IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas)	Roth
Izopropanolis	Fluka
Jaučio serumo albuminas	Fermentas
Kazeino hidrolizatas	Oxoid
Mielių ekstraktas	Bacto
NaCl (natrio chloridas)	Fluka
NaDS (natrio dodecilsulfatas)	Roth
NaOH (natrio šarmas)	Chempur
pH 4-7 IPG (imobilizuoto pH gradiento) strypeliai	BioRad
PMSF (fenilmetilsulfonil fluoridas)	Fluka
Šlapalas	Roth
TCA (trichloracto rūgštis)	Roth
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletiletildiaminas)	Sigma
TRIS (tris(hidroksimetil)aminometanas)	Roth
Žemos lydimosi temperatūros agarozė	Roth

2.2.2 Tirpalai ir buferiniai tirpalai

- Ampicilino tirpalas (100 mg/mL): 0,1 g ampicilino tirpinama 1 mL sterilaus dejonizuoto vandens.
- IPTG tirpalas (0,1 M): 0,1191 g IPTG tirpinama 5 mL sterilaus dejonizuoto vandens.
- Biomasės ardymo buferinis tirpalas (100 mM TRIS, 5 mM EDTA, pH = 7,4): tirpinama 2,42 g TRIS ir 0,29 g EDTA 180 mL dejonizuoto vandens, pH privedamas iki 7,4 su praskiesta HCl (esant 20 °C temperatūrai). Buferinio tirpalo tūris papildomas su dejonizuotu vandeniu iki 200 mL ir laikomas 4 °C temperatūroje.

- PMSF tirpalas (200 mM) izopropanolyje: 69,68 mg PMSF tirpinama 2 mL izopropanolio. Tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje.
- APS tirpalas (10 %): 0,5 g amonio persulfato tirpinama 5 mL dejonizuoto vandens.
- Akrilamido/BIS akrilamido tirpalas (30,8 %): 300 g akrilamido sumaišoma su 8 g BIS akrilamido (N, N`-metilen-bis-akrilamido) ir 500 mL dejonizuoto vandens. Medžiagoms ištirpus, tūris pridedamas su dejonizuotu vandeniu iki 1 L.
- 1,5 M TRIS (pH 8,8): 181,7 g TRIS tirpinama 900 mL vandens, pH pridedamas iki 8,8 su 6 M HCl, tūris papildomas iki 1000 mL su dejonizuotu vandeniu.
- 1 % bromfenolio mėlis: 1 mg bromfenolio mėlio tirpinama 1 mL dejonizuoto vandens.
- NaDS (10 %): 10 g NaDS tirpinama 100 mL dejonizuoto vandens.
- Netirpios baltymų frakcijos plovimo buferinis tirpalas (100 mM TRIS, 5 mM EDTA, 1 M NaCl, 2 M šlapalas, pH = 8): tirpinama 2,42 g TRIS, 0,37 g EDTA, 11,69 g NaCl ir 24,02 g šlapalo 180 mL dejonizuoto vandens, pH pridedamas iki 8 su praskiesta HCl (esant 20 °C temperatūrai). Buferinio tirpalo tūris papildomas su dejonizuotu vandeniu iki 200 mL ir laikomas 4 °C temperatūroje.
- Rehidracijos buferinis tirpalas (8 M šlapalas, 50 mM DTT, 4 % CHAPS, 0,2 % *Pharmalyte* (pH = 4–7)): 2,4 g šlapalo, 38,55 mg DTT, 0,2 g CHAPS ir 10 µL *Pharmalyte* tirpinami 5 mL dejonizuoto vandens. Tirpalas išpilstomas po 0,5 mL ir užšaldomas - 20 °C temperatūroje.
- 0,5 mg/mL jaučio serumo albuminas: 0,5 mg jaučio serumo albumino tirpinama 1 mL RB tirpalo.
- 0,15 % deoksicholato tirpalas: 0,075 g deoksicholato tirpinama 50 mL dejonizuoto vandens.
- 72 % TCA tirpalas: 36 mL 100 % TCA tirpalo dejonizuotu vandeniu skiedžiama iki 50 mL.
- Bradford dažas: 50 mg *Coomassie Brilliant Blue* G250 tirpinama 50 mL metanolio, pridedama 100 mL 85 % fosforo rūgšties ir 500 mL dejonizuoto vandens. Dažas filtruojamas, pridedama dar 350 mL dejonizuoto vandens. Dažas laikomas 4 °C temperatūroje.
- R250 dažas: 3 g *Coomassie Brilliant Blue* R250 dažo tirpinama 450 mL metanolio, pridedama 100 mL acto rūgšties ir 450 mL dejonizuoto vandens.
- Pusiausvyrinimo buferinis tirpalas (50 mM TRIS, 2 % NaDS, 6 M šlapalo, 30 % glicerolio, pH = 8,8): sumaišomi 5 mL 1,5 M TRIS (pH = 8,8), 30 mL 10 % NaDS ir 45 g glicerolio, gautame tirpale tirpinami 54,1 g šlapalo. Pridedamas tūris su dejonizuotu

vandeniui (150 mL) ir pridedama apie 30 µL 1 % bromfenolio mėlio tirpalo. Gautas tirpalas išpilstomas po 30 mL ir laikomas - 20 °C temperatūroje.

- Redukuojantis pusiausvyrinimo buferinis tirpalas su DTT: 15 mL pusiausvyrinimo buferinio tirpalo tirpinama 139,5 mg DTT.
- Alkilinantis pusiausvyrinimo buferinis tirpalas su IAA: 15 mL pusiausvyrinimo buferinio tirpalo tirpinama 675 mg IAA.
- 10x elektrodinis buferinis tirpalas (0,25 M TRIS, 1,92 M glicino, 1 % NaSD, pH = 8,3): 393,25 g TRIS, 1873,3 g glicino ir 130 g NaDS tirpinama dejonizuotame vandenyje, tūris privedamas iki 1,3 L.
- 1x elektrodinis buferinis tirpalas: 1,3 L 10x elektrodo buferinio tirpalo skiedžiama iki 13 L su dejonizuotu vandeniu.
- 1 % agarozės tirpalas: 0,5 g žemos lydimosi temperatūros agarozės tirpinama 1x elektrodo buferiniame tirpale, pridedama 0,25 mg bromfenolio mėlio (tirpinimas vyksta karšto vandens vonelėje).
- Fiksavimo tirpalas (25 % metanolio, 10 % acto rūgšties): sumaišoma 250 mL metanolio ir 100 mL acto rūgšties, pridedama 650 mL dejonizuoto vandens.
- Blukinimo tirpalas (25 % metanolio, 10 % acto rūgšties): sumaišoma 750 mL metanolio ir 300 mL acto rūgšties, pridedama 1950 mL dejonizuoto vandens.

2.2.3 Terpė

Luria-Bertani (LB) terpės sudėtis 1 L:

- 10 g kazeino hidrolizato
- 10 g NaCl (natrio chlorido)
- 5 g mielių ekstrakto

2.3. Metodai

2.3.1. aAH kamieno konservavimas

Paruošiamas darbo inventoriųs, tirpalai darbui laminarinėje spintoje:

- Dejonizuotas vanduo;
- Pipečių antgaliai (5 mL, 1 mL, 0,1 mL);
- Mėgintuvėliai (*Eppendorf*: 1,5 mL, *Falcon*: 10 mL, 50 mL);

- Kultivavime naudojami tirpalai.

Darbo inventoriaus sterilumas užtikrinamas autoklavuojant 20 min. esant 1 atm. slėgiui ir 121 °C temperatūrai.

LB terpės paruošimas. Ruošiama 400 mL LB terpės į kurios sudėtyje yra 4 g kazeino hidrolizato, 4 g NaCl bei 2 g mielių ekstrakto, tirpinama 390 mL dejonizuoto vandens. Terpės pH koreguojama koncentruotu natrio šarmo tirpalu (pH 7–7,2). Terpė praskiedžiama iki 400 mL su dejonizuotu vandeniu. Terpė sterilinama autoklavu 1 atm slėgyje ir 121 °C temperatūroje.

Naktinės kultūros užsėjimas. Į 500 mL tūrio kolbą su 100 mL sterilios LB terpės įpilama 50 µL 100 mg/mL antibiotiko ampicilino ir tuomet įpilama 400 µL konervo (rekombinantinis *E. coli* BL21 (DE3) kamienas su pET21a⁺/aAH plazmide). NK kultivuojama termostatuojamame kratytuve per naktį, esant 37 °C temperatūrai bei 180 aps./min greičiui.

Biomasės kultivavimas. Į dvi 500 mL tūrio kolbas, kuriose yra po 100 mL šiltos (37 °C) LB terpės bei 50 µL 100 mg/mL ampicilino, pilama po 10 mL NK, kurios optinis tankis 600 nm bangoje yra virš 3 o. v. NK pridedamas tūris gali kisti, siekiama, kad galutinis o. t. būtų apie 0,2 o. v. Stebimas kultūros augimas, kas 40 min imami mėginiai tik iš vienos kolbos ir matuojamas optinis tankis. Biomasė kultivuojama kol optinis tankis pasiekia 1–1,5 o. v.

Biomasės išpilstymas ir laikymas. Nutraukus kultivaciją, neatidarinėtos kolbos kultūra supilama į du 50 mL *Falcon* tipo mėgintuvėlius ir centrifuguojama 10 min prie 2100 x g (+4 °C). Nupilamas gautas supernatantas, o nuosėdos suspenduojamos į mėgintuvėlius pilant po 9 mL LB terpės ir 9 mL 40 % glicerolio. Galutinė glicerolio koncentracija turi būti 20 %, o optinis tankis, prie 600 nm bangos, 4–6 o. v. Suspensija išpilstoma į 1,5 mL *Eppendorf* mėgintuvėlius po 0,5 mL, užšaldoma - 20 °C temperatūroje.

2.3.2 Rekombinantinio aAH biosintezė *E. coli* ląstelėse

2.3.2.1. Pasėjamosios kultūros paruošimas

Pirmiausia pagaminamas visas reikiamas LB terpės kiekis eksperimentui. Ruošiama 600 mL LB terpės, kurios sudėtyje yra 6 g kazeino hidrolizato, 6 g NaCl bei 3 g mielių ekstrakto, tirpinama 550 mL dejonizuoto vandens. Matuojamas terpės pH su tinkamai nukalibruotu pH-metru. Terpės pH koreguojama koncentruotu natrio šarmo tirpalu, galutinė

terpės pH turi būti lygi 7–7,2. Privedamas terpės tūris iki 600 mL su dejonizuotu vandeniu. Terpė sterilinama autoklavu 1 atm. slėgyje ir 121 °C temperatūroje (sterilinimo trukmė 20 min.).

Į 250 mL talpos kolbą, kurioje yra po 50 mL LB terpės, turinčios 50 mg/L ampicilino, laminarinėje spintoje užsėjama 400 µL aAH produkuojančio kamieno konservo. Kultivuojama per naktį 13 valandų 25 °C temperatūroje, esant 200 aps./min.

2.3.2.2. Biomasės gavimas

Į dvi 500 mL talpos kolbas, kuriose yra po 250 mL sterilios LB terpės, pridedama antibiotiko ampicilino (125 µL) iki galutinės 50 µg/mL koncentracijos. Į paruoštą 25 °C temperatūros terpę pilama apie 8–13 mL pasėjamosios kultūros. Pridedamas pasėjamosios kultūros tūris priklauso nuo to, kokia pasėjamosios kultūros ląstelių koncentracija, kuri nustatoma aseptiškai paimant 1 mL mėginį optiniam tankiui (o. t.) įvertinti spektrofotometru (bangos ilgis 600 nm, 1 cm kiuvetė). Užsėjus kultūrą, paimami 1 mL mėginiai o. t. įvertinti, ir kolbos įstatomos į termostatuojamą kratytuvą. Nustatomi parametrai: 25 °C temperatūra ir 200 aps./min.

Kas 90 min matuojamas kultūros optinis tankis kultivavimo kolbose. Ląstelėms pasiekus 0,8 optinių vienetų o. t. 600 nm bangoje yra atliekama indukcija skirtingomis induktoriaus IPTG koncentracijomis.

Ruošiamas induktoriaus 0,1 M IPTG tirpalas. Atsižvelgiant į kintantį kultūros tūrį kultivacijos metu, apskaičiuojamas reikiamas induktoriaus tirpalo tūris, reikalingas indukuoti kultūras. Į kultivacijos kolbas pridedamas skirtingas induktoriaus tirpalo tūris iki 500, 50 arba 10 µM galutinių koncentracijų.

Kolbos su skirtingomis induktoriaus koncentracijomis pažymimos, tęsiama kultivacija, stebimas kultūrų optinis tankis. Po indukcijos biosintezė tęsiama dar 27 val. (iš viso 31 val.). Praėjus 27 val. po indukcijos iš kolbų paimami 200 mL mėginiai netirpių baltymų kiekybiniais ir kokybiniais skirtumams įvertinti. Mėginiai centrifuguojami 10 min 4 °C temperatūroje esant 2100 x g. Nupilamas supernatantas, o surinktos ląstelės užšaldomos ir saugojamos - 20 °C temperatūroje.

Kultūrų, augintų prie skirtingų induktoriaus koncentracijų (500 µM, 50 µM arba 10 µM) netirpių baltymų frakcijos yra lyginamos tarpusavyje tolimesnių tyrimų metu. Norint palyginti mėginius iš skirtingų kolbų, būtina paimti vienodą ląstelių kiekį. Renkant 200 mL mėginius, įvertinami kultūrų optiniai tankiai ir apskaičiuojami reikalingi mėginių tūriai. Mėginio

iš kultūros, kurios o. t. yra mažesnis (o. t.₁), paimamas tūris yra 200 mL, o mėginio, kurio o. t. yra didesnis (o. t.₂), tūris X apskaičiuojamas pagal formulę:

$$o. t._1 * 200 = o. t._2 * X \quad (1)$$

2.3.3. Biomasės ardymas

Surinkti biomasės pavyzdžiai, gauti nucentrifugavus 200 mL producento kultūros, suspenduojami 30 mL *biomasės ardymo buferiniame tirpale*, pridedama 150 µL 200 mM PMSF tirpalo (galutinė PMSF koncentracija biomasės tirpale 1 mM). Biomasė yra ardoma ultragarsu ledo ir NaCl vonelėje. Ardymo parametrai:

- Amplitudė – 50 %
- Energija – 1020 kJ
- Laikas – 5 min.
- Maksimali temperatūra – 10 °C

Biomasės lizatas centrifuguojamas 25 min 4 °C temperatūroje esant 13000 rcf jėgai. Atskiriamos tirpių ir netirpių baltymų frakcijos. Tolimesnei analizei naudojama netirpių baltymų frakcija, kuri užšaldoma ir saugoma - 20 °C.

2.3.4. Netirpių baltymų frakcijos plovimas

Netirpių baltymų frakcija suspenduojama 30 mL 4 °C temperatūros dejonizuoto vandens ir centrifuguojama 25 min 4 °C temperatūroje esant 13000 rcf.

Supernatantas nupilamas ir nuosėdos suspenduojamos 30 mL 4 °C temperatūros netirpių baltymų frakcijos plovimo buferiniame tirpale. Pridedama 150 µL PMSF tirpalo. Suspensija centrifuguojama 25 min 4 °C temperatūroje esant 13000 rcf greičiui.

Nupilamas supernatantas ir nuosėdos suspenduojamos 30 mL dejonizuoto vandens. Centrifuguojama 25 min 4 °C temperatūroje esant 13000 rcf. Nulipamas supernatantas, nuosėdos analizuojamos toliau arba užšaldomos - 20 °C temperatūroje iki kito etapo.

2.3.5. Mėginių tirpinimas rehidratacijos buferiniame tirpale

Netirpi baltymų frakcija gauta iš 200 mL kultūros yra suspenduojama 2 mL imobilizuoto pH gradiento (IPG) strypelių RB tirpale. Nuosėdos sunkiai tirpsta, švelniai maišant baltymai tirpinami 1 valanda. Likę neištirpę dariniai yra pašalinami mėginius centrifuguojant

5 min., esant 6000 rcf. Supernatantas atsargiai perkeliamas į naujus mėgintuvėlius neišjudinant nuosėdų.

2.3.6. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu

Panaudojant dvikryptę elektroforezę yra lyginami baltymų kiekio skirtumai tarp mėginių iš kultūrų indukuotų skirtinga induktoriaus koncentracija (10, 50 ir 500 μM). Norint patikimai palyginti tam tikrų baltymų kiekio skirtumus, į izoelektronio fokusavimo IPG strypelius reikia įnešti vienodą bendrą baltymų kiekį. Baltymų koncentracija nustatyta Bradfordo metodu.

Gaunama kalibracinė kreivė. 0,5 mg jaučio serumo albumino tirpinama 1 mL RB tirpalo. Į mėgintuvėlius pripilama jaučio serumo albumino tirpalo, nuo 0 μL iki 80 μL , kas 5 – 10 μL ir mėgintuvėlių tūris privedamas iki 100 μL su RB tirpalu. Į mėgintuvėlius pridedama po 1 mL *Bradford* dažo, sumaišoma, laikoma 5 min. kambario temperatūroje. Kiekvieno skiedimo taškas kartojamas du kartus. Spektrofotometru išmatuojama sugertis ties 595 nm bangos ilgiu. Pagal žinomą pridėtą baltymo kiekį mėginiuose ir gautą optinę sugertį, braižoma kalibracinė kreivė. Pagal kalibracinės kreivės tiesinės dalies nuolinkio koeficientą apskaičiuojama baltymų koncentracija mėginiuose. Nustatant baltymų koncentraciją laikomasi pasiklivimo intervalo (0,3–1 o. v., 595 nm).

Baltymų koncentracijai mėginiuose nustatyti yra paimama po 10 μL ištirpusio mėginio RB tirpale, skiedžiama 3 kartus (bendras tūris 30 μL) ir iš praskiesto mėginio matavimui paimama 30 μL . Matuojama du kartus. Baltymų mėginius galima skiesti papildomai. Nustačius baltymų koncentracijas mėginiuose, atliekama normalizacija (suvienodinamas baltymų kiekis mėginiuose).

2.3.7. Petersono TCA-DOC baltymų precipitacija ir plovimas acetonu

Naudojamas modifikuotas G. Peterson (1977) aprašytas metodas skirtas baltymų išsodinimui iš mažos koncentracijos mėginių. Vieno mėginio turinys (315 μL) maišomas su 3,15 mL 0,15 % deoksicholato tirpalu (išlaikomas santykis 1/10). Mėginys švelniai sumaišomas ir laikomas lede 15 minučių.

Pridedama 3,15 mL atšaldytos 72 % TCA. Mėginys švelniai sumaišomas ir laikomas lede 15 minučių. Mėginys centrifuguojamas 10 minučių, esant 12000 rcf ir 4 °C. Pašalinamas visas supernatantas neišjudinant nuosėdų.

Nuosėdos suspenduojamas 5 mL - 20 °C acetono. Mėgintuvėliai vorteksuojami tris kartus po 30 sekundžių valandos laikotarpyje. Procesas atliekamas šaltai, mėgintuvėliai visada laikomi lede. Atliekamas centrifugavimas surenkant baltymus iš acetono (10 min., 12000 rcf ir 4 °C), pašalinamas supernatantas. Plovimas acetonu kartojamas dar 2 kartus.

Po paskutinio plovimo acetonu, supernatantas pašalinamas sausai, išdžiovinamas atidarius mėgintuvėlius (apie 5–7 min.). Svarbu mėginių neperdžiovinti, nes pablogėja jų tirpumas. Paruoštas mėginys tirpinamas 340 µL RB tirpale, siekiama kiek įmanoma efektyviau ištirpinti baltymus. Mėginys pilnai paruošiamas pirmajai 2-D elektroforezės kryptčiai pridėjus 1 µL 1 % bromfenolio mėlio (dažas leidžia stebėti izofokusavimo eigą).

2.3.8. Dvikryptė elektroforezė

2.3.8.1. IPG strypelių brinkinimas, mėginio užnešimas

Pirmoji 2-D elektroforezės kryptis (baltymų frakcionavimas pagal pI) yra atliekama naudojant 18 cm IPG strypelius, kurių frakcionavimo ribos yra nuo 4 iki 7 pI. Sausi IPG strypeliai yra brinkinami horizontaliame brinkinimo padėkle naudojant mėginius ištirpintus RB tirpale. Gamintojo rekomendacijai rehidratacijai naudojant 18 cm strypelius: 315 µL mėginio RB tirpale, turinčio 200–400 µg baltymų. Tyrimo metu procesas buvo optimizuotas, parinkti parametrai rehidratacijai: 340 µL mėginio RB tirpale, turinčio 730 µg baltymų.

IPG strypeliai yra laikomi - 20 °C temperatūroje, prieš naudojimą reikiamas strypelių kiekis išimamas iš šaldiklio, strypeliai laikomi kambario temperatūroje 30 min. Brinkinimo padėklo griovelyje tolygiai paskirstoma 340 µL mėginio. Strypelis atsargiai išimamas iš apsauginės pakuotės, darbo metu inventorių laikomas kiek įmanoma švariau, strypelis manipuluojamas steriliais pincetais. Nuo strypelio nuplėšiama apsauginė plėvelė ir jis guldomas į mėginio tirpalą griovelyje gelio puse žemyn. Svarbu, kad nesusiformuotų oro burbulai, o pats strypelis nepriliptų prie griovelio dugno.

Brinkinami IPG strypeliai yra uždengiami DryStrip lengvąja alyva. Padėklas su strypeliais uždengiamas, patikrinamas padėklo horizontalumas. Brinkinimas atliekamas kambario temperatūroje per naktį.

2.3.8.2. Izoelektrinis fokusavimas

Įjungiamas izoelektrinio fokusavimo šaldymo platformos termostatas, palaikantis 20 °C temperatūrą.

Po brinkinimo strypeliai išimami iš brinkinimo padėklo ir kelioms minutėms padedami ant matinio stiklo padėklų. Nuo strypelių pašalinama alyva. Ant šaldymo platformos paskirstoma 3 mL lengvosios alyvos, uždedamas izoelektrinio fokusavimo padėklas su elektrodais taip, kad po padėklu nebūtų oro burbulų. Į padėklą pilama 10 mL lengvosios alyvos, ant kurios guldomas IPG strypelių laikiklis taip, kad nebūtų oro burbulų. Oro burbulai mažina šilumos mainus. Išbrinkinti IPG strypeliai guldomi greta vienas kito į strypelių laikiklį gelio puse aukšty. Strypeliai orientuojami rūgštiniu galu (+) į anodo pusę. Atkerpami du 11 cm ilgio popieriaus elektrodai, kurie sudrėkinami 500 µL dejonizuoto vandens, vandens perteklius pašalinamas filtriniu popieriumi. Sudrėkinti elektrodai dedami ant strypelių anodinių ir katodinių galų. Ant popierinių elektrodų dedami elektros šaltinio elektrodai. Uždengiamas izoelektrinio fokusavimo prietaiso dangtis.

Sujungiami elektros šaltinio ir izoelektrinio fokusavimo elektrodai. Įjungiamas elektros šaltinis, nustatoma izoelektrinio fokusavimo programa:

1. 300 V ir 300 V/h;
2. 1000 V ir 1000 V/h;
3. 2000 V ir 2000 V/h;
4. 3500 V ir 70 kV/h.

Po izoelektrinio fokusavimo nuo strypelių pašalinama alyva.

2.3.8.3. IPG strypelių pusiausvyrinimas

Į stiklinį mėgintuvėlį įpilama 15 mL pusiausvyrinimo tirpalo su DTT, įdedamas strypelis. Mėgintuvėlis uždengiamas parafilmu ir supamas 15 min. Buferinis tirpalas nupilamas.

Į mėgintuvėlį įpilama 15 mL pusiausvyrinimo tirpalo su IAA. Mėgintuvėlis uždengiamas parafilmu ir supamas 15 min. Buferinis tirpalas nupilamas.

2.3.8.4. Gradientinių gelių gaminimo aparatūros surinkimas

Su spiritu nuvalomi elektroforezės stiklai, gelių polimerizavimo kasetės paviršiai, tarpinės. Kruopščiai išplaunamas gradienteris ir peristaltinės pompos žarnos. Surenkama gelių polimerizavimo kasetė su pasirinktu stiklų skaičiumi. Sistema leidžia vienu metu pagaminti iki 6 gelių. Prijungiama peristaltinė pompa ir gradienteris. Gradienteris statomas ant magnetinės maišyklės ir į abu rezervuarus įdedami vienodo dydžio magnetai.

2.3.8.5. Gradientinių gelių gaminimas

Ruošiamas lengvasis tirpalas. Gaminama 190 mL lengvojo akrilamido/BIS-akrilamido 8 % tirpalo (gaminant 2 gelius), kuriam paruošti reikia:

- 49,8 mL 30,8 % akrilamido/BIS-akrilamido tirpalo
- 47,5 mL 1,5 M TRIS buferinio tirpalo, pH = 8,8
- 88,7 mL dejonizuoto vandens
- 1,9 mL 10 % natrio dodecilsulfato (NaDS) tirpalo
- 1,9 mL 10 % APS tirpalo
- 0,41 mL 10 % TEMED

Ruošiamas sunkusis tirpalas. Gaminama 190 mL sunkiojo akrilamido/BIS-akrilamido 20 % tirpalo (gaminant 2 gelius), kuriam paruošti reikia:

- 123 mL 30,8 % akrilamido/BIS-akrilamido tirpalo
- 48 mL 1,5 M TRIS buferinio tirpalo, pH = 8,8
- 1,9 mL 10 % natrio dodecilsulfato (NaDS) tirpalo
- 16,3 mL glicerolio
- 0,95 mL 10 % APS tirpalo
- 0,054 mL 10 % TEMED

Ruošiamas išstūmimo tirpalas. Gaminama 200 mL išstūmimo tirpalo, kuriam paruošti reikia:

- 50 mL 1,5 M TRIS buferinio tirpalo, pH = 8,8
- 60 mL glicerolio
- 90 mL dejonizuoto vandens
- 2 mg bromfenolio mėlio

Lengvasis ir sunkusis tirpalai supilami į atskiras gradienterio talpas. Tirpalai supilami taip, kad pirmiausia į polimerizacijos formą būtų paduodamas lengvasis tirpalas, o mažėjantis jo tūris gradienteryje pakeičiamas sunkiuoju tirpalu. Įjungiamo magnetinė maišyklė gradientio maišymui, atidaromas vožtuvas jungiantis gradienterio talpas, atidaromas vožtuvas jungiantis gradienterį ir peristaltinę pompą. Įjungiamo peristaltinė pompa, skystis paduodamas į polimerizacijos formą nestipria srovele, vengiama oro burbulų patekimo į sistemą. Gradienterryje likus apytiksliai 5–10 mL tirpalų yra įpilamas išstūmimo tirpalas, kuris pumpuojamas tol, kol polimerizacijos forma užpildoma 2 cm iki viršaus. Peristaltinė pompa

stabdoma, guminės žarnelės užgnybiamos su spaustukais. Būsimo gelio viršus padengiamas 50 % izopropanolio tirpalu, polimerizacijos forma uždengiama aliuminio folija ir geliai polimerizuojami per naktį.

2.3.8.6. Antroji kryptis (skirstymas pagal molekulinę masę)

Elektroforezės stiklai su geliais ištraukiami iš polimerizacijos formos, nuplaunami distiliuotu vandeniu. Gelio viršus užpilamas dejonizuotu vandeniu, palaikomas 15 min., vanduo pakeičiamas elektrodinio buferiniu tirpalu. Buferinis tirpalas laikomas ant gelio viršaus 15 min. ir nupilamas. Gelio viršus nusausinamas filtriniu popieriumi nepažeidžiant gelio paviršiaus.

Šiltu agarozės tirpalu padengiamas gelio viršus. Ant gelio viršaus atsargiai guldomas paruoštas IPG strypelis, su sterilia plastikine mentele strypelis švelniai priglaudžiamas prie gelio viršaus. Šalia strypelio įstatoma plastikinė plokštelė (0,5 x 2 cm) skirta masių standarto įvedimui. Palaukiama, kol agarozė sukietėja, ir ištraukiama plastikinė plokštelė, į kurios suformuotą griovelį pridedama 15 µL masių standarto. Agarozė užpildomas likęs tarpas iki formos viršaus, palaukiama, kol agarozė sukietėja.

Iš 10x elektrodinio buferinio tirpalo paruošiama 13 L vienkartinio elektrodinio buferinio tirpalo, kurio 12 L pilama į elektroforezės aparatą. Įjungiamas buferinio tirpalo maišymas ir termostatas, palaikantis 25 °C temperatūrą. Stiklai su geliais statomi į laikiklį, svarbi gelių orientacija, nes elektroforezė vykdoma ne vertikaliai, o horizontaliai. Gelių viršus su strypeliais turi būti orientuoti į katodinę (-) pusę.

Elektrodai sujungiami su elektros šaltiniu. Elektros šaltinis įjungiamas ir nustatomi parametrai: $U = 80 \text{ V}$ ir $I < 500 \text{ mA}$. Elektroforezė vykdoma apie 20 val., kol dažo šleifas išeina iš gelio. Elektroforezė nutraukiama ir stiklai su geliais ištraukiami. Elektrodinis buferinis tirpalas surenkamas (naudojamas iki 3 kartų).

2.3.8.7. Gelių fiksavimas, dažymas ir blukinimas

Geliai atsargiai atskiriami nuo stiklinės polimerizavimo formos ir talpinami į dideles keturkampes talpas, kuriose gelis gali laisvai plaukioti nesulankstytas. Geliai yra dideli ir trapūs, lengvai plyšta. Visų pirma atliekamas gelių fiksavimas, šalinamas NaSD. Ant kiekvieno gelio užpilama po 0,5 L fiksavimo tirpalo. Geliai fiksuojami 3 valandas lėtai sūpuojant.

Fiksavimo tirpalas pakeičiamas į 0,5 L dažą R-250. Gelis dažomas 3 valandas lėtai sūpuojant, geliai perkeliami į 4 °C temperatūrą ir paliekami per naktį.

Nupilamas dažas, gelis praplaunamas su dejonizuotu vandeniu ir užpilamas 0,5 L blukinimo tirpalu. Gelis blukinamas lėtai sūpuojant ir tris kartus, kas valandą, pakeičiant blukinimo tirpalą.

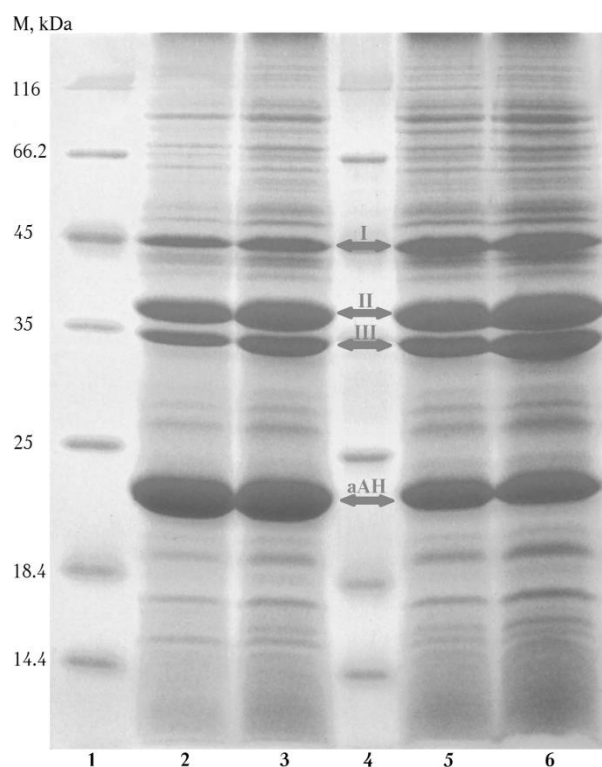
2.3.8.8. Gelių analizė

Geliai yra skenuojami ir apdorojami *Progenesis SameSpots* programa. Nustatomi baltymų kiekio skirtumai geliuose. Dominančios dėmelės iš gelių išpjaunamos, sudedamos į *Eppendorf* mėgintuvėlius ir dokumentuojamos. Taip paruošti mėginiai yra siunčiami masių spektrometrinei analizei, kur baltymai yra identifikuojami.

Masių spektrometrinė analizė yra užsakomasis tyrimas, atliekamas Biochemijos ir Biofizikos Institute (Varšuva). Baltymai analizuojami pažangia *Orbitrap Velos* sistema, sujungta su UPLC *Waters nanoAcquity* chromatografu. Tai tandeminis masių spektrometras (atlikta MS/MS analizė). Gauti duomenys apdorojami *MASCOT* programa ir baltymai identifikuojami naudojant *Sprot* duomenų bazę (paieškos filtras: *Escherichia coli*).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Baigiamojo bakalaurinio darbo, atlikto VGTU Chemijos ir bioinžinerijos katedros Molekulinės biotechnologijos laboratorijoje (2014 m.), metu nustatė, jog kultivuojant *E. coli* BL21 (DE3) kamieną, turintį pET21a⁺/aAH plazmidę, esant 25 °C temperatūrai ir indukciją atliekant žema (10 μM) induktoriaus IPTG koncentracija, padidėja tam tikrų baltymų (35-45 kDa) kiekis netirpioje frakcijoje (2 pav.). Be to, esant aktyviai rekombinantinio baltymo ekspresijai susiformuoja intarpiniai kūneliai (IK), o žeminant kultivacijos temperatūrą ir induktoriaus kiekį, susidaro daugiau tinkamai sulankstyto baltymo tirpioje formoje.

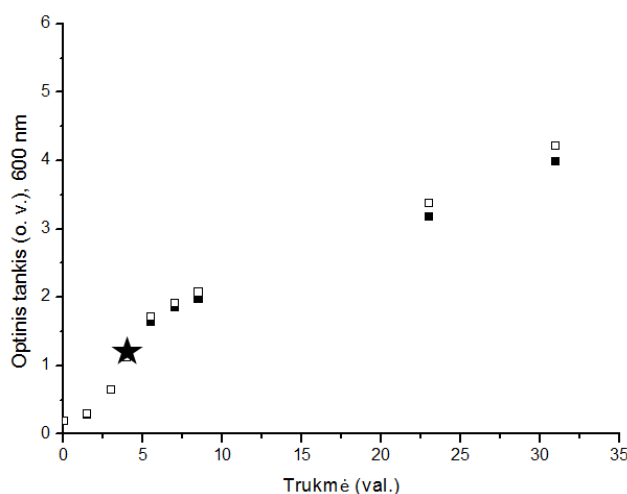


2 pav. NaDS-PAAG elektroforezės metodu išanalizuoti netirpios baltymų frakcijos mėginiai (aAH intarpiniai kūneliai). 2 ir 3 takeliai – mėginiai surinkti praėjus 19 val. po indukcijos, 5 ir 6 – 27 val. 2 ir 5 takeliai – kontrolė (indukcija 500 μM IPTG), 3 ir 6, mėginiai gauti iš auginimo indukavus 10 μM induktoriaus IPTG koncentracija. Pažymėtos baltymų grupės: I, II, III, kurių kiekis yra didesnis lyginant su kontrole (medžiaga pateikta iš bakalaurinio darbo)

Kai rekombinantinis baltymas formuoja IK, kultivacijos temperatūros žeminimas ir induktoriaus koncentracijos mažinimas yra strategijos leidžiančios padidinti rekombinantinio baltymo kiekį tirpioje (natyvioje) formoje. Kai IPTG koncentracija indukcijos metu yra žemesnė nei 100 μM, stebimas dalinės indukcijos efektas [35]. Malik, A., *et al.*, (2016) nustatė, jog pastebimai indukcijai pakanka vos 10 μM IPTG koncentracijos [63]. Margreiter, G., *et al.*, (2008) parodė, jog esant žemai induktoriaus koncentracijai susiformuoja tvarkingesni IK, kurių

struktūros tankis yra didesnis [64]. Įdomu, kas lemia tam tikrų baltymų kiekio padidėjimą netirpioje frakcijoje, kai naudojamas iki 50 kartų mažesnis induktoriaus kiekis nei įprasta ir kokių baltymų kiekis skiriasi, lyginant su kontroliniais auginimais (500 μ M indukcija).

Šiame darbe buvo nuspręsta detaliau ištirti anksčiau pastebėtą baltymų kiekio padidėjimą žemos induktoriaus koncentracijos atveju. Tyrimo metu aAH sintetinančios *E. coli* ląstelės buvo kultivuojamos 25 °C temperatūroje. Kultūrinio skysčio optiniam tankiui pasiekus 0,8 o. v. (600 nm) ribą, atlikta indukcija naudojant 10 arba 50 μ M IPTG koncentraciją. Kiekvieno eksperimento metu kartu vykdomas biomasės auginimas tiriamojoje ir kontrolinėje kolbose. Kontrolinių auginimų kultivacijos sąlygos yra identiškos lyginant su tiriamaisiais auginimais, išskyrus tai, jog indukcija atliekama naudojant 500 μ M IPTG koncentraciją. Praėjus 27 valandoms po indukcijos yra surenkami biomasės mėginiai, iš kurių išskiriama netirpi baltymų frakcija. Chalmers, J. J., *et al.*, (1990) tirdami *E. coli* vykstančius pokyčius esant žemai temperatūrai atliko kultivaciją 25 °C temperatūroje, kuri užtruko 24 valandas po indukcijos [65]. Šiame darbe buvo parinktas panašus kultivavimo laikas, nes po 27 valandų ląstelių augimas yra perėjęs į stacionarią fazę, kai baltymų kiekis pastovus ir dinaminiai pokyčiai ląstelėse yra minimalūs (3 pav.). Paruošti netirpios baltymų frakcijos mėginiai yra tirpinami ir išskirstomi 2-D elektroforezės metodo pagalba. Pirmiausia baltymai išskirstyti atliekant izoelektrinę fokusavimą 18 cm ilgio IPG strypeliuose pagal izoelektrinę tašką (pI: 4–7). Atliekant pirminius tyrimus mėginiai buvo skirstomi naudojant platų 3–10 pI intervalą. Pastebėta, jog beveik visi baltymai aptinkami siauresniame pI intervale, tad analizėje panaudotas 4–7 intervalas leidžia pasiekti geresnį baltymų išskirstymą pagal pI. Antrojoje 2-D elektroforezės kryptyje baltymai išskirstyti pagal masę gradientiniuose NaDS-PAAG (8–20 %).



3 pav. *E. coli* augimo kreivės, optinio tankio priklausomybė nuo laiko. Grafikas vaizduoja aAH ekspresuojančios kultūros augimą 25 °C temperatūroje. Vieno eksperimento metu biomasė auginama dvejuose kolbose, indukuotose skirtingomis induktoriaus koncentracijomis: ■ – indukuota 500 μ M, □ – indukuota 10 μ M, ★ – vaizduoja induktoriaus IPTG įvedimo laiką (medžiaga pateikta iš bakalaurnio darbo)

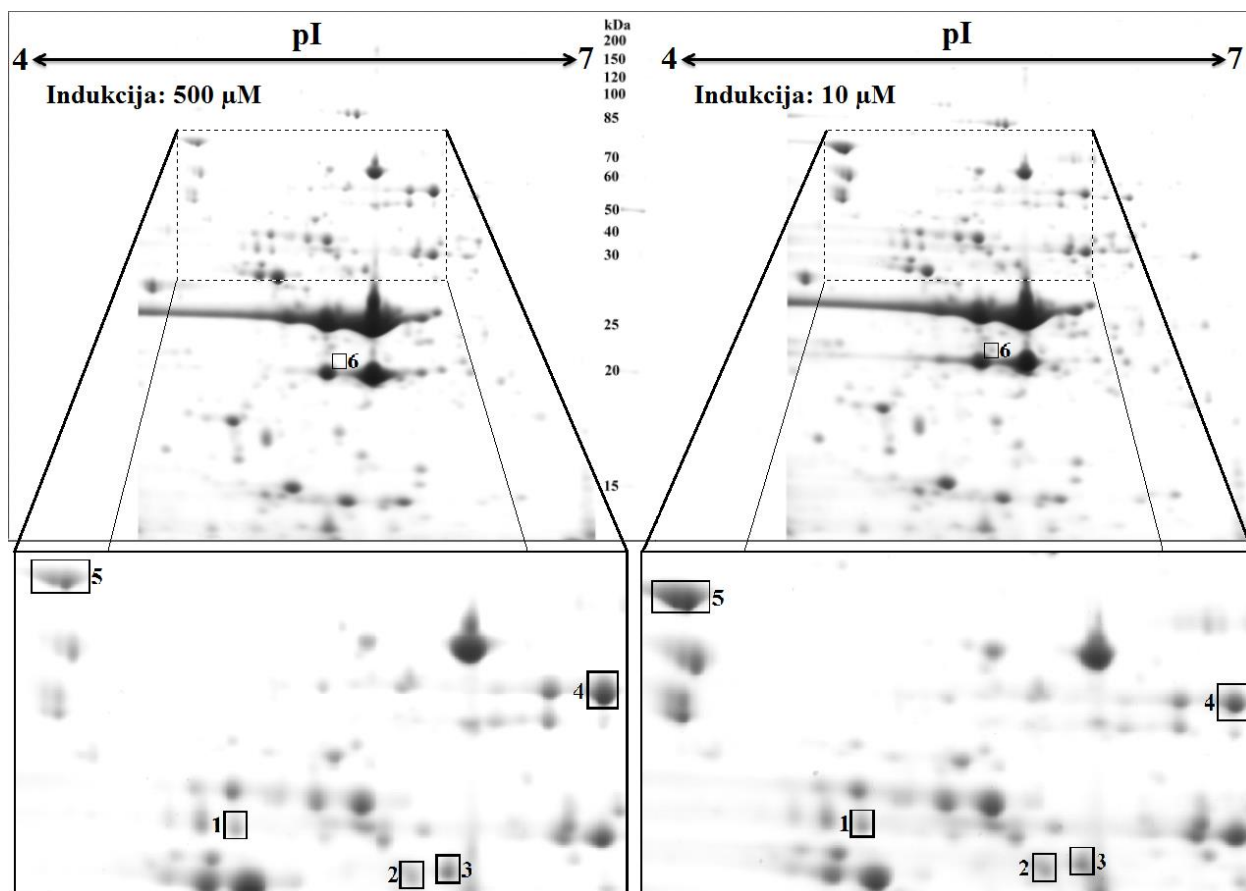
Dvikryptės elektroforezės baltymų skirstymo metodas yra žymiai pažangesnis, lyginant su įprasta vienkrypte elektroforeze. Baltymai išskirstomi ne vien pagal savo masę (1-D atveju), bet ir pagal savo izoelektrinį tašką (pI). Šis metodas suteikia galimybę tiksliau išskirstyti mėginį iki pavienių baltymų (atskirų dėmelių). Analizuojant 2-D elektroforezės metodu gautus gelius, galima kiekybiškai nustatyti konkrečių baltymų kiekio skirtumus.

Kiekvienos 2-D elektroforezės metu gaunami 2 geliai – išanalizuoti tiriamasis bei kontrolinis mėginiai. Tiriamasis ir kontrolinis mėginiai yra lyginami tarpusavyje ir nustatomi nukrypimai nuo kontrolinio mėginio. Dominantys baltymai, kurių kiekiai skiriasi nuo kontrolės, gali būti išskiriami iš gelių ir analizuojami masių spektrometru (MS). Šie analizės metodai, atliekami vienas paskui kitą, leidžia tiksliai įvertinti baltymų kiekio skirtumus bei šiuos baltymus identifikuoti.

Savo bakalauro darbo metu (2014 m.) pastebėjau, jog atliekant kultivaciją minėtomis sąlygomis, aptinkamas didesnis kiekis nežinomų baltymų mėginyje su 10 μ M IPTG indukcija. Šie rezultatai gauti mėginius analizuojant įprastos elektroforezės metodu. Didesnis baltymų kiekis aptiktas 35–45 kDa intervale. Šiame darbe tiriamas platesnis intervalas pagal masę: 20–80 kDa. Baltymai skirstomi ir pagal izoelektrinį tašką, o analizuojamas pI intervalas yra 5–6. Pasirinktas intervalas apima gelių centrinę dalį, kur baltymų atskyrimas yra kokybiškiausias ir rasta daugiausiai kiekybinių skirtumų tarp kontrolinio ir tiriamojo mėginių.

Šiame darbe pateikti rezultatai iš trijų atskirų biomasės auginimų (nr.: I, II ir III). Pirminių tyrimų metu buvo atlikta daug biomasės auginimų ir 2-D elektroforetinių analizių siekiant optimizuoti analizės atlikimo sąlygas (duomenys nepateikiami). Kiekvieno auginimo metu atliktas kontrolinis auginimas, su kuriuo lyginamas tiriamasis auginimas. Auginimo nr. I metu buvo atlikta indukcija su 10 μ M IPTG galutine koncentracija, surinkti mėginiai ir išanalizuoti 2-D elektroforezės metodu. Gauti geliai pavaizduoti 4 paveiksle, o išanalizuoti kiekybiniai skirtumai tarp kontrolinio ir tiriamojo mėginių pateikti lentelė 1.

Pateikti auginimo nr. I 2-D elektroforezės metodu išskirstytų mėginių gelių vaizdai (4 ir 5 pav.) ir nustatyti baltymų kiekio skirtumai (1 ir 2 lentelės).



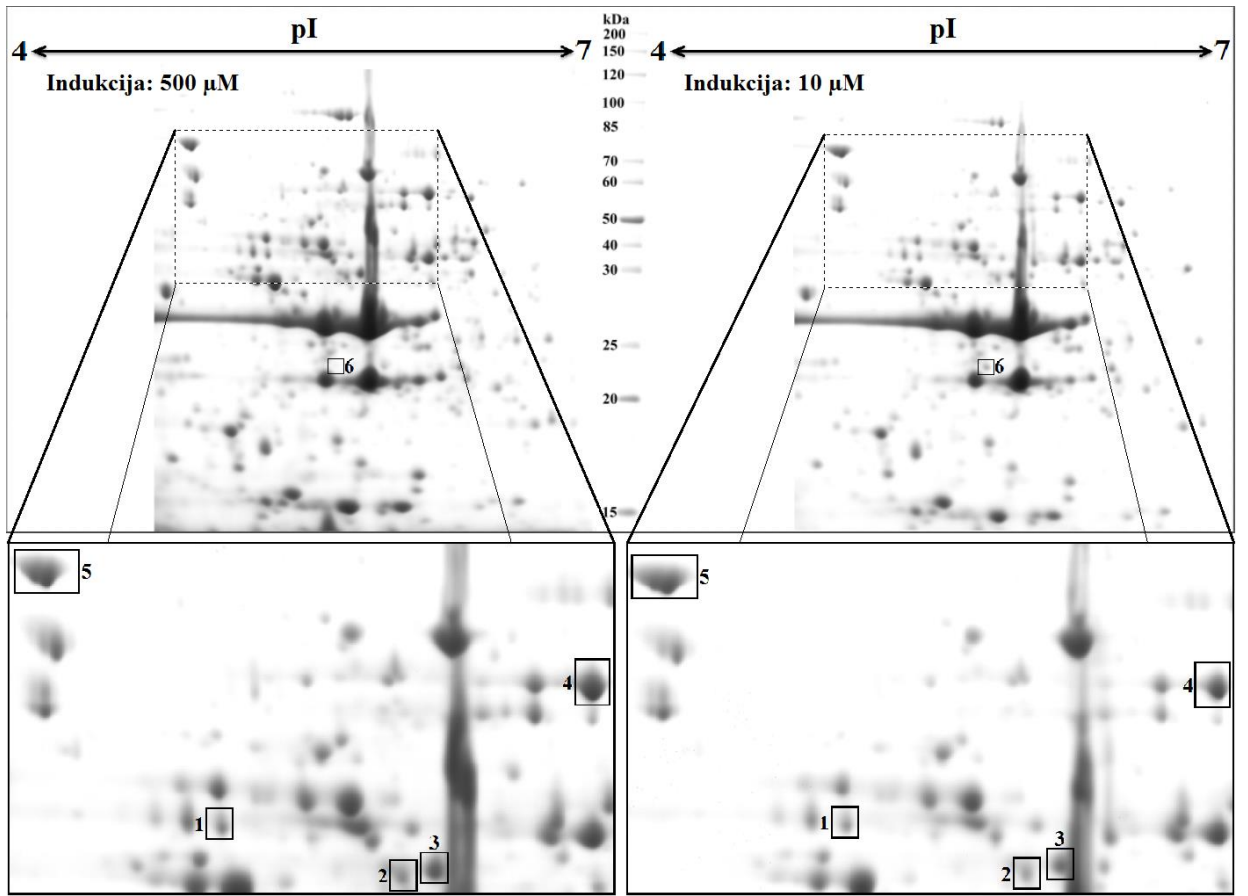
4 pav. Auginimo nr. I netirpios baltymų frakcijos mėginių analizė 2-D elektroforezės metodu. Kairėje paveikslo pusėje pateikta kontrolinė netirpių baltymų frakcija, kai indukcija 500 μ M IPTG. Dešinėje pusėje pateikta netirpių baltymų frakcija, kai indukcija 10 μ M IPTG

1 lentelė. Auginimo nr. I baltymų kiekio skirtumai. Lyginamas kontrolinis mėginys su mėginiu, kai indukcija 10 μ M IPTG

Baltymo nr.	Baltymų kiekio skirtumai kartais	
	IPTG indukcija, μ M:	
	500	10
1		1,2
2	1,1	
3	1,2	
4	1,8	
5		2
6		13,5

Siekiant įvertinti 2-D elektroforezės atlikimo kokybę, mėginiai iš auginimo nr. I buvo analizuojami pakartotinai. Gauti geliai pavaizduoti 5 paveiksle, o išanalizuoti kiekybiniai skirtumai tarp kontrolinio ir tiriamojo mėginių pateikti lentelė 2. Pakartotinos analizės rezultatai

yra labai panašūs, todėl galima teigti, jog 2-D elektroforezės atlikimo technika yra gera ir pridedamos paklaidos yra minimalios.



5 pav. Auginimo nr. I pakartotinė netirpios baltymų frakcijos mėginių analizė 2-D elektroforezės metodu. Kairėje paveikslo pusėje pateikta kontrolinė netirpių baltymų frakcija, kai indukcija 500 µM IPTG. Dešinėje pusėje pateikta netirpių baltymų frakcija, kai indukcija 10 µM IPTG

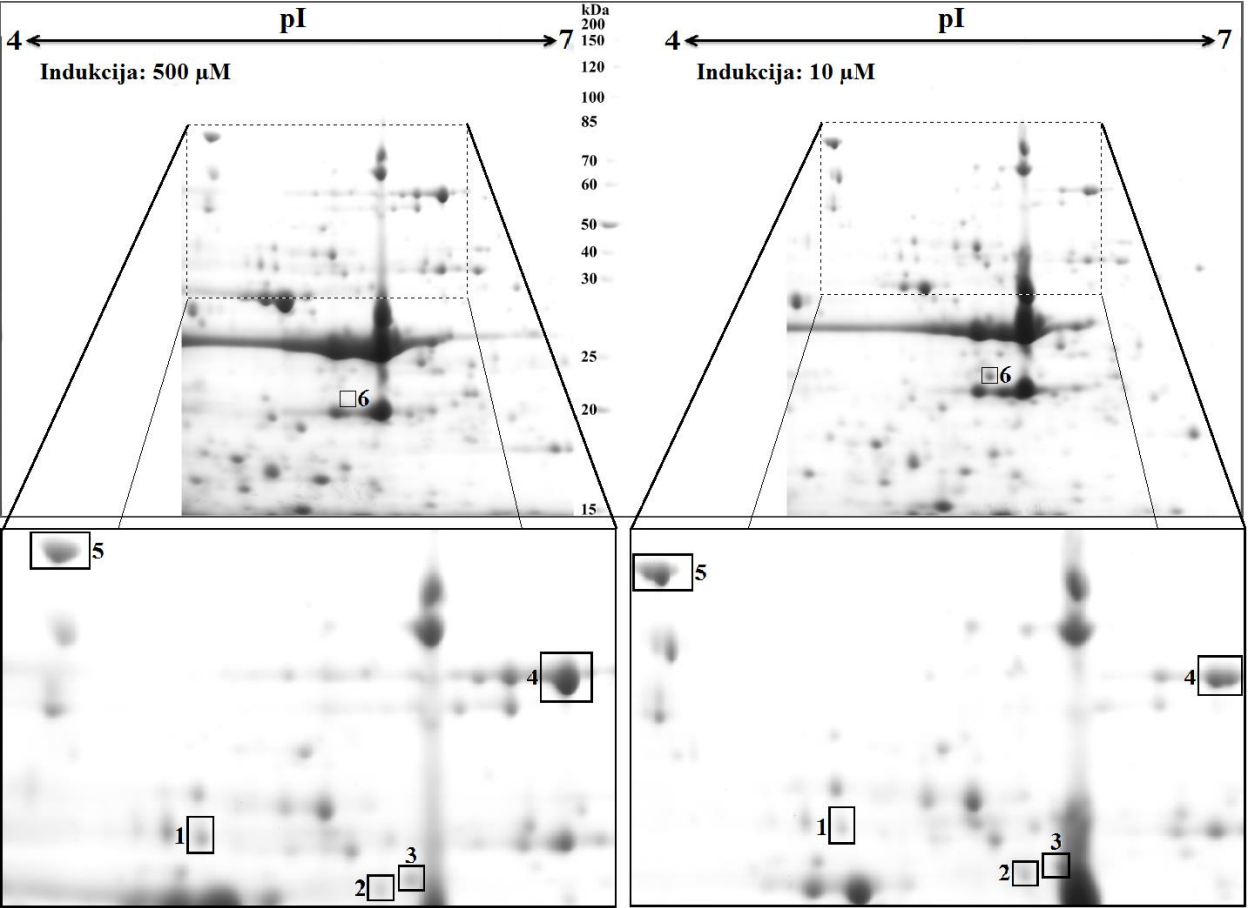
2 lentelė. Auginimo nr. I baltymų kiekio skirtumai, pakartotina analizė. Lyginamas kontrolinis mėginys su mėginiu, kai indukcija 10 µM IPTG

Baltymo kiekio skirtumai kartais		
Baltymo nr.:	IPTG indukcija, µM:	
	500	10
1		1,2
2	1,1	
3	1,1	
4	1,2	
5		1,6
6		27,4

Auginimo nr. II indukcija atlikta taip pat su 10 µM galutine induktoriaus IPTG koncentracija. Todėl, palyginus mėginių iš I ir II auginimų 2-D elektroforeze gautus gelius, galima įvertinti, ar baltymų kiekio skirtumai atsikartoja tarp skirtingų auginimų. Auginimo nr. II geliai pavaizduoti 6 paveiksle, o išanalizuoti kiekybiniai skirtumai tarp kontrolinio ir tiriamojo

mėginių pateikti lentelė 2. Palyginus auginimų nr. I ir II baltymų kiekio skirtumus (lentelė 1 ir 2), galima teigti, jog baltymų kiekio skirtumų nevienodumas tarp skirtingų 2-D elektroforezės analizių labiau priklauso nuo skirtingų auginimų, nei nuo 2-D elektroforezės atlikimo technikos.

Pateikti auginimo nr. II 2-D elektroforezės metodu išskirstytų mėginių gelių vaizdai (6 pav.) ir nustatyti baltymų kiekio skirtumai (3 lentelė).



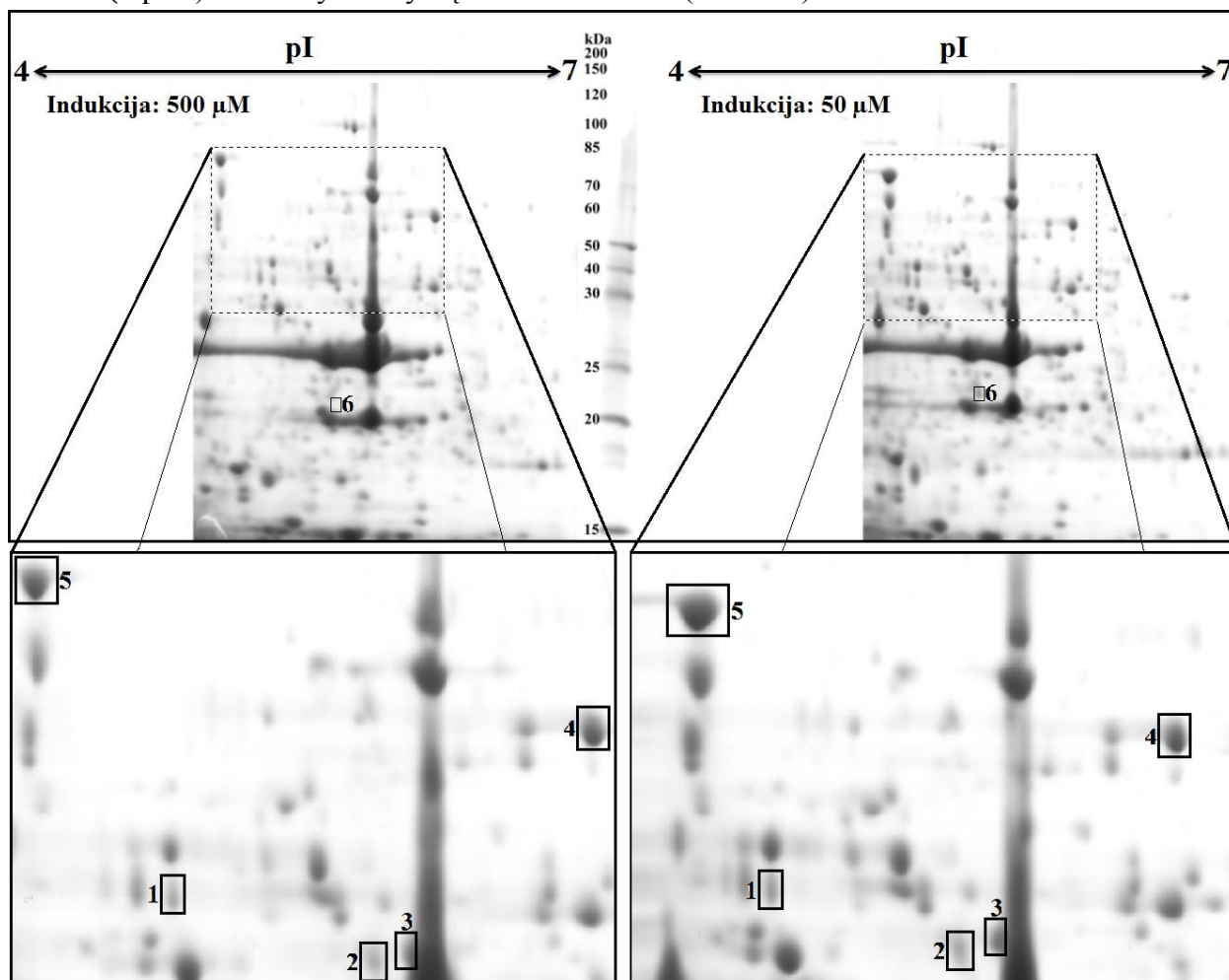
6 pav. Auginimo nr. 2 netirpios baltymų frakcijos mėginių analizė 2-D elektroforezės metodu. Kairėje paveikslo pusėje pateikta kontrolinė netirpių baltymų frakcija, kai indukcija 500 μ M IPTG. Dešinėje pusėje pateikta netirpių baltymų frakcija, kai indukcija 10 μ M IPTG

3 lentelė. Auginimo nr. 2 baltymų kiekio skirtumai. Lyginamas kontrolinis mėginys su mėginiu, kai indukcija 10 μ M IPTG.

Baltymo kiekio skirtumai kartais		
Baltymo nr.:	IPTG indukcija, μ M:	
	500	10
1	1,5	
2		1,4
3		1,7
4	1,3	
5		1,6
6		6,4

Atlikus eksperimentus naudojant 10 μM induktoriaus koncentraciją buvo įdomu, kaip pasikeičia pasirinktų baltymų kiekio skirtumai, kai indukcijai naudojama didesnė 50 μM IPTG koncentracija. Auginimo nr. III indukcija atlikta naudojant 50 μM IPTG koncentraciją. Atlikus 2-D elektroforezę gauti geliai, kurie pavaizduoti 6 paveiksle ir baltymų kiekio skirtumai pateikti 4 lentelėje. Esant 50 μM indukcijai nustatytas didesnis baltymo nr. 5 ir mažesnis baltymo nr. 6 kiekis, lyginant su eksperimentais, kai naudota 10 μM induktoriaus koncentracija. Nustatytas baltymo nr. 4 kiekis tarp kontrolinio ir tiriamojo gelių buvo beveik vienodas.

Pateikti auginimo nr. III 2-D elektroforezės metodu išskirstytų mėginių geliuose vaizdai (7 pav.) ir nustatyti baltymų kiekio skirtumai (4 lentelė).



7 pav. Auginimo nr. III netirpios baltymų frakcijos mėginių analizė 2-D elektroforezės metodu. Kairėje paveikslo pusėje pateikta kontrolinė netirpių baltymų frakcija, kai indukcija 500 μM IPTG. Dešinėje pusėje pateikta netirpių baltymų frakcija, kai indukcija 50 μM IPTG

4 lentelė. Auginimo nr. III baltymų kiekio skirtumai. Lyginamas kontrolinis mėginys su mėginiu, kai indukcija 50 μ M IPTG

Baltymo kiekio skirtumai kartais		
Baltymo nr.:	IPTG indukcija, μ M:	
	500	50
1		1,3
2	1	
3	1,1	
4	1,1	
5		2,1
6		4,9

Įvertinus baltymų kiekio skirtumus 2-D elektroforezės metodu, buvo pasirinktos baltymų dėmelės identifikacijai. Pirminių tyrimų metu buvo nuspręsta identifikuoti 6 baltymus. Baltymai pasirinkti pagal nustatytus didžiausius kiekio skirtumus lyginant su kontrole ir užimamą vietą masės ir pI intervale. Tolimesnių tyrimų metu 2-D elektroforezės atlikimo technika ir gautų gelių kokybė išaugo. Dalis identifikuotų baltymų žymaus ir statistiškai patikimo baltymų kiekio skirtumo, lyginant su kontrole, nepateikė. Identifikuoti baltymai ir jų charakteristikos pateiktos **lentelė 5**, kur baltymų numeriai (1–6) atitinka numeraciją, pateiktą 2-D elektroforezės geluose (4–7 pav.)

5 lentelė. Netirpioje baltymų frakcijoje identifikuoti baltymai

Balt. nr.:	Baltymo pavadinimas	Geno pavadinimas	Identifikavimo kodas*	Masė, (Mr)	Izoelektrinis taškas, (pI)	Baltymo sekos padengimas, (%)
1	Izocitrat liazė	aceA	P0A9G6	47777	5,16	55
2	Gliukoz-1-fosfatazė	agp	P19926	45996	5,48	55
3	Peptidazė B	pepB	A1AE61	46487	5,49	58
4	Periplazminis oligopeptidus surišantis baltymas	oppA	P23843	60975	6,05	60
5	Šaperonas DnaK	dnaK	P0A6Y8	69130	4,83	74
6	Beta-laktamazė TEM	bla	P62593	31666	5,69	80

* Baltymo identifikavimo kodas *SwissProt* duomenų bazėje

Baltymų kiekio skirtumų patikimumas įvertintas pagal tai, kaip vienodai baltymų kiekis skiriasi geluose tarp skirtingų auginimų. Jei išanalizavus skirtingų auginimų mėginius 2-D elektroforeze baltymo kiekio skirtumas yra žymus ir išlaikoma ta pati skirtumo tendencija tarp auginimų, tai nustatytas skirtumas yra patikimas. Baltymo kiekio skirtumo patikimumą nustatyti padeda standartinis nuokrypis (SD), kuris parodo nustatyto baltymo kiekio atsikartojimą tarp mėginių iš skirtingų auginimų. Patikimi ir reikšmingi baltymų kiekio skirtumai, lyginant su kontrole, nustatyti šiems baltymams: periplazminiam oligopeptidus surišančiam baltymui (nr. 4), šaperoniniam baltymui DnaK (nr. 5) ir fermentui beta-laktamazei TEM (nr. 6). Kai baltymų kiekio skirtumai yra žymūs ir skirtumų tendencija išlieka tarp skirtingų auginimų, galima

pagrįstai nagrinėti šių baltymų kiekio ryšį su parinktomis eksperimentinėmis kultivavimo sąlygomis, daryti prielaidas bei išvadas.

Baltymai nr. 1–3 taip pat identifikuoti masių spektrometrijos metodu, bet jų kiekio skirtumai yra nereikšmingi. Baltymų: izocitrat liazės (nr. 1), gliukoz-1-fosfatazės (nr. 2) ir peptidazės B (nr. 3) kiekio skirtumai yra nepastovūs, neatsikartoja tarp skirtingų auginimų. Šie baltymai negali būti patikimai analizuojami siekiant padaryti prielaidas apie IK heterogeniškumą.

Indukciją atliekant žema IPTG koncentracija, nustatytas mažesnis periplazminio oligopeptidus surišančio baltymo kiekis netirpių baltymų frakcijoje, lyginant su kontrole. Šio baltymo kiekis $1,4 \pm 0,3$ karto didesnis kontroliniame mėginyje, kai lyginama su $10 \mu\text{M}$ indukcija ir $1,1$ karto didesnis, kai lyginama su $50 \mu\text{M}$ indukcija. Baltymo kiekis tiesiogiai priklauso nuo indukcijos, nes didinant induktoriaus kiekį, baltymo kiekio skirtumas mažėja.

Esant žemam indukcijos lygiui, nustatytas didesnis šaperono DnaK ir beta-laktamazės TEM kiekis. Šaperono DnaK kiekis netirpių baltymų frakcijoje yra $1,7 \pm 0,2$ karto didesnis, kai indukcija yra $10 \mu\text{M}$ ir $2,1$ karto didesnis, kai indukcija yra $50 \mu\text{M}$, lyginant su kontrole. DnaK šaperono kiekio padidėjimas esant žemai indukcijai yra pastovus, standartinis nuokrypis (SD) tik $\pm 0,2$. Didžiausias kiekybinis skirtumas nustatytas beta-laktamazės TEM atveju. Nustatytas beta-laktamazės TEM kiekis yra $15,8 \pm 8,7$ karto didesnis, kai indukcija yra $10 \mu\text{M}$ ir $4,9$ karto didesnis, kai indukcija yra $50 \mu\text{M}$. Šio baltymo kiekio padidėjimas nėra pastovus (SD: $\pm 8,7$), bet kiekio skirtumas labai žymus. Esant žemai indukcijai ($10 \mu\text{M}$), gelyje gerai matoma dėmelė, bet kontroliniame gelyje ši dėmelė sunkiai aptinkama.

Šaperonas DnaK ląstelėje atlieka naujai susintetintų baltymų sulankstymą ir neteisingai sulankstytų baltymų sulankstymą iš naujo [27]. Šaperonas aptinkamas ant IK paviršiaus ir sąveikauja su neteisingai sulankstytais baltymais [11], tad tikėtina, jog DnaK kiekio pokytį ląstelėje įtakoja rekombinantinio baltymo ekspresija ir IK formavimasis. Literatūroje minima, jog DnaK kiekis ląstelėje padidėja rekombinantinio baltymo ekspresijos atveju, kai suformuojami IK [14]. Šaperono kiekio padidėjimas yra atsakas į aktyvią heterologinio baltymo ekspresiją, kaip naujai susintetintiems baltymams nebepakanka turimo DnaK rezervo. Tačiau, Champion, K. M., *et al.*, (2003) palyginus mėginius, tarp kultūrų sintetinančių ir nesintetinančių rekombinantinį baltymą (alfa-gliukozidazę), neaptiko DnaK kiekio pokyčio [13]. Šiame darbe gauti rezultatai parodo, jog DnaK kiekis yra nevienodas, tarp kultūrų indukuotų skirtingomis induktoriaus koncentracijomis. Indukciją atlikus žema ($10\text{--}50 \mu\text{M}$) induktoriaus IPTG koncentracija, nustatytas padidėjęs DnaK kiekis, lyginant su kontroliniais mėginiais.

Intarpinius kūnelius sudarantys baltymai nuolatos šalinami iš agregatų arba nukreipiami į agregatų sudėtį, o esant pastovioms aplinkos sąlygoms, nusistovi šių veiksmų pusiausvyra. Carrió, M. M., *et al.*, (1998) tirdami IK susidarymą ląstelėse nustatė, jog ankstyvojoje IK formavimosi stadijoje, net iki 50 % agregatų masės gali sudaryti ląsteliniai baltymai [5]. Atlikto darbo metu buvo naudojamos 10, 50 ir 500 μM induktoriaus koncentracijos, kiekvienu atveju susiformavo IK. Tikėtina, jog esant žemai indukcijai, IK suformuojami skirtingai, lyginant su kontrole (500 μM). Žema indukcija gali sukurti sąlygas ankstyvosios IK formavimosi stadijos ištiesimui, tai leidžia aptikti padidėjusį ląstelių baltymų kiekį net po 27 valandų, kai indukcija yra žema.

Palyginus netirpių baltymų frakcijos mėginius iš kultūrų indukuotų skirtingomis induktoriaus koncentracijomis, didžiausias kiekybinis skirtumas nustatytas beta-laktamazės TEM atveju. Šio fermento kiekis didesnis mėginyje, kur indukcija žema. Rinas, U., *et al.*, (1993) nustatė, jog IK yra aprinkama pre-beta-laktamazė, tai beta-laktamazės prekursorius [3]. Didesnis baltymo kiekis žemos indukcijos atveju gali būti susijęs su ankstyvosios IK formavimosi stadijos ištiesimu (kaip ir DnaK atveju).

Esant žemai indukcijai nustatytas mažesnis periplazminio oligopeptidus surišančio baltymo (OppA) kiekis, lyginant su kontrole. Šis baltymas dalyvauja peptidų transporte per ląstelės membraną, taip pat, genų ekspresijos reguliavime, chemotaksysje, DNR perdavime konjugacijoje ir virulentiškumo raidoje [66]. Įprastos indukcijos metu (500 μM) ląstelės patiria šoką dėl aktyviai sintetinamo rekombinantinio baltymo. Šoko metu aktyvinami ląstelės kompensaciniai mechanizmai, švelninantys nukrypimą nuo normos. Tikėtina, jog didesnis OppA kiekis rodo, jog ląstelėse aktyvinamas peptidų pernešimas per membraną, siekiant kompensuoti padidėjusį medžiagų poreikį, aktyvios ekspresijos metu.

IŠVADOS

1. Kultivuojant producentą 25 °C temperatūroje ir indukciją atliekant 10 ir 50 µM IPTG koncentracija, aptinkamas didesnis šaperono DnaK ir fermento beta-laktamazės TEM kiekis netirpioje baltymų frakcijoje, lyginant su kontrole.
2. Kultivuojant producentą 25 °C temperatūroje ir indukciją atliekant 10 ir 50 µM IPTG koncentracija, aptinkamas mažesnis periplazminio oligopeptidus surišančio baltymo kiekis netirpioje baltymų frakcijoje, lyginant su kontrole.
3. aAH sintetinančių ląstelių netirpių baltymų frakcijoje identifikuoti 6 baltymai – izocitrat liazė, gliukoz-1-fosfatazė, peptidazė B, periplazminis oligopeptidus surišantis baltymas, šaperonas DnaK, beta-laktamazė TEM, iš kurių 3 – periplazminis oligopeptidus surišantis baltymas, šaperonas DnaK, beta-laktamazė TEM, išlaiko reikšmingus kiekio skirtumus, esant skirtingai indukcijai.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei dr. Jolantai Sereikaitei už suteiktą praktikos vietą ir pagalbą rašant baigiamąjį magistro darbą. Taip pat dėkoju dr. Danutei Labeikytei už konsultavimą praktinio darbo klausimais. Esu dėkingas Varšuvos Biochemijos ir Biofizikos instituto personalui už operatyviai ir profesionaliai atliktą masių spektrometrinę analizę.

LITERATŪROS ŠARAŠAS

1. Carrio, M. M., Villaverde, A., 2002. Construction and Deconstruction of Bacterial Inclusion Bodies. *Journal of Biotechnology*, 96, p. 3–12.
2. Villaverde, A., Carrió, M. M., 2003. Protein Aggregation in Recombinant Bacteria: Biological Role of Inclusion Bodies. *Biotechnology Letters*, 25, p. 1385–1395.
3. Rinas, U., Bailey, J.E., 1993. Overexpression of Bacterial Hemoglobin Causes Incorporation of Pre- β -Lactamase into Cytoplasmic Inclusion Bodies. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, p. 561–566.
4. Rinas, U., Boone, T. C., Bailey, J. E., 1993. Characterization of Inclusion Bodies in Recombinant *Escherichia coli* Producing High Levels of Porcine Somatotropin. *Journal of Biotechnology*, 28, p. 313–320.
5. Carrió, M. M., Corchero, J. L., Villaverde, A., 1998. Dynamics of *in vivo* Protein Aggregation: Building Inclusion Bodies in Recombinant Bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 169, p. 9–15.
6. Georgiou, G., Valax, P., 1999. Isolating Inclusion Bodies from Bacteria. *Methods in Enzymology*, 309, p. 48–58.
7. Doglia, S. M., *et al.*, 2008. Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analysis of the Conformational Quality of Recombinant Proteins Within Inclusion Bodies. *Biotechnology Journal*, 3, p. 193–201.
8. Allen, S. P., Polazzi, J. O., Gierse, J. K., Easton, A. M., 1992. Two Novel Heat Shock Genes Encoding Proteins Produced in Response to Heterologous Protein Expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174, p. 6938–6947.
9. Hart, R. A., Rinas, U., Bailey, J.E., 1990. Protein Composition of *Vitreoscilla hemoglobin* Inclusion Bodies Produced in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, p. 12728–12733.
10. Hoffmann, F., Weber, J., Rinas, U., 2002. Metabolic Adaptation of *Escherichia coli* During Temperature-Induced Recombinant Protein Production: 1. Readjustment of Metabolic Enzyme Synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 80, p. 313–319.
11. Carrió, M. M., Villaverde, A., 2005. Localization of Chaperones DnaK and GroEL in Bacterial Inclusion Bodies. *Journal of Bacteriology*, 187, p. 3599–3601.
12. Weibezahn, J., Bukau, B., Mogk, A., 2004. Unscrambling an Egg: Protein Disaggregation by AAA+ Proteins. *Microbial Cell Factories*, 3, p. 1–11.
13. Champion, K. M., *et al.*, 2003. Comparison of the *Escherichia coli* Proteomes for Recombinant Human Growth Hormone Producing and Nonproducing Fermentations. *Proteomics*, 3, p. 1365–1373.
14. Jürgen B., *et al.*, 2000. Monitoring of Genes that Respond to Overproduction of an Insoluble Recombinant Protein in *Escherichia coli* Glucose-Limited Fed-Batch Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 70, p. 217–224.
15. Kleerebezem, M., Crielgaard, W., Tommassen, J., 1996. Involvement of Stress Protein PspA (Phage Shock Protein A) of *Escherichia coli* in Maintenance of the Protonmotive Force Under Stress Conditions. *The EMBO Journal*, 15, p. 162–171.
16. Bowden, G. A., Paredes, A. M., Georgiou, G., 1991. Structure and Morphology of Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 9, p. 725–730.
17. Zhu, C., Yu, Z., 2008. The Surface Layer Protein of *Bacillus thuringiensis* CTC Forms Unique Intracellular Parasporal Inclusion Body. *Journal of Basic Microbiology*, 48, p. 302–307.
18. Singh, S. M., Panda, A. K., 2005. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, p. 303–310.
19. Wang, L., *et al.*, 2008. Bacterial Inclusion Bodies Contain Amyloid-Like Structure. *PLOS Biology*, 6, p. 1791–1801.

20. Vera, A., Gonzalez-Montalban, N., Aris, A., Villaverde, A., 2007. The Conformational Quality of Insoluble Recombinant Proteins Is Enhanced at Low Growth Temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 96, p. 1101–1106.
21. Maji, S. K., *et al.*, 2009. Functional Amyloids as Natural Storage of Peptide Hormones in Pituitary Secretory Granules. *Science*, 325, p. 328–332.
22. Ventura, S., 2005. Sequence Determinants of Protein Aggregation: Tools to Increase Protein Solubility. *Microbial Cell Factories*, 4, p. 1–8.
23. Ventura, S., Villaverde, A., 2006. Protein Quality in Bacterial Inclusion Bodies. *Trends in Biotechnology*, 24, p. 179–85.
24. Mayer M., Buchner J., 2004. Refolding of Inclusion Body Proteins. *Methods in Molecular Medicine*, 94, p. 239–254.
25. Lorimer, G. H., 1996. A Quantitative Assessment of the Role of the Chaperonin Proteins in Protein Folding *in vivo*. *The FASEB Journal*, 10, p. 5–9.
26. Rinas, U., 1996. Synthesis Rates of Cellular Proteins Involved in Translation and Protein Folding are Strongly Altered in Response to Overproduction of Basic Fibroblast Growth Factor by Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 12, p. 196–200.
27. Mujacic, M., Baneyx, F., 2004. Protein expression technologies: current status and future trends. p. 85–148.
28. Patzelt, H., *et al.*, 2001. Binding Specificity of *Escherichia coli* Trigger Factor *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, p. 14244–14249.
29. Deuerling, E., *et al.*, 2003. Trigger Factor and DnaK Possess Overlapping Substrate Pools and Binding Specificities. *Molecular Microbiology*, 47, p. 1317–1328.
30. Ewalt, K. L., Hendrick, J. P., Houry, W. A., Hartl, F. U., 1997. *In vivo* Observation of Polypeptide Flux Through the Bacterial Chaperonin System. *Cell*, 90, p. 491–500.
31. Baneyx, F., Mujacic, M., 2004. Recombinant Protein Folding and Misfolding in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*, 22, p. 1399–1408.
32. Shearstone, J. R., Baneyx, F., 1999. Biochemical Characterization of the Small Heat Shock Protein IbpB from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, p. 9937–9945.
33. Zolkiewski, M., 1999. ClpB Cooperates with DnaK, DnaJ and GrpE in Suppressing Protein Aggregation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, p. 28083–28086.
34. Zietkiewicz, S., Krzewska, J., Liberek, K., 2004. Successive and Synergistic Action of the Hsp70 and Hsp100 Chaperones in Protein Disaggregation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, p. 44376–44383.
35. Morgan-Kiss, R. M., Wadler, C., Cronan, J. E. J., 2002. Long-Term and Homogeneous Regulation of the *Escherichia coli* araBAD Promoter by use of a Lactose Transporter of Relaxed Specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, p. 7373–7377.
36. Vasina, J. A., Baneyx, F., 1997. Expression of Aggregation-Prone Proteins at Low Temperatures: a Comparative Study of the *E. coli* cspA and tac Promoter Systems. *Protein Expression and Purification*, 9, p. 211–218.
37. Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H., Yura, T., 2000. Overexpression of Trigger Factor Prevents Aggregation of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, p. 884–889.
38. Ferrer, M., *et al.*, 2003. Chaperonins Govern Growth of *Escherichia coli* at Low Temperatures. *Nature Biotechnology*, 21, p. 1266–1267.
39. Strocchi, M., Ferrer, M., Timmis, K. N., Golyshin, P. N., 2006. Low Temperature-Induced Systems Failure in *Escherichia coli*: Insights from Rescue by Cold-Adapted Chaperones. *Proteomics*, 6, p. 193–203.

40. Phadtare, S., 2004. Recent Developments in Bacterial Cold-Shock Response. *Current Issues in Molecular Biology*, 6, p. 125–136.
41. Polissi, A., *et al.*, 2003. Changes in *Escherichia coli* Transcriptome During Acclimatization at Low Temperature. *Research in Microbiology*, 154, p. 573–580.
42. Cao-Hoang, L., Dumont, F., Marechal, P. A., Gervais, P., 2010. Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* in Relation to Membrane Permeabilization due to Rapid Chilling Followed by Cold Storage. *Archives of Microbiology*, 192, p. 299–305.
43. Carty, S. M., Sreekumar, K. R., Raetz, C. R., 1999. Effect of Cold Shock on Lipid A Biosynthesis in *Escherichia coli* Induction at 12 °C of an Acyltransferase Specific for Palmitoleoyl-Acyl Carrier Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, p. 9677–9685.
44. Vorachek-Warren, M. K., *et al.*, 2002. An *Escherichia coli* Mutant Lacking the Cold Shockinduced Palmitoleoyltransferase of Lipid A Biosynthesis: Absence of Unsaturated Acyl Chains and Antibiotic Hypersensitivity at 12 °C. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, p. 14186–14193.
45. Phadtare, S., 2011. Unwinding Activity of Cold Shock Proteins and RNA Metabolism. *RNA Biology*, 8, p. 394–397.
46. Mizushima, T., *et al.*, 1997. Increase in Negative Supercoiling of Plasmid DNA in *Escherichia coli* Exposed to Cold Shock. *Molecular Microbiology*, 23, p. 381– 386.
47. Prakash, J. S., *et al.*, 2009. DNA Supercoiling Regulates the Stressinducible Expression of Genes in the *Cyanobacterium synechocystis*. *Molecular BioSystems*, 5, p. 1904–1912.
48. Chaikam, V., Karlson, D. T., 2010. Comparison of Structure, Function and Regulation of Plant Cold Shock Domain Proteins to Bacterial and Animal Cold Shock Domain Proteins. *BMB Reports*, 43, p. 1–8.
49. Bae, W., Xia, B., Inouye, M., Severinov, K., 2000. *Escherichia coli* CspA-Family RNA Chaperones are Transcription Antiterminators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, p. 7784–7789.
50. White-Ziegler, C. A., 2008. Low Temperature (23 °C) Increases Expression of Biofilm-, Cold-Shock- and RpoS-Dependent Genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, 154, p. 148-166.
51. Feng, Y., Huang, H., Liao, J., Cohen, S. N., 2001. *Escherichia coli* Poly(A)-Binding Proteins that Interact with Components of Degradosomes or Impede RNA Decay Mediated by Polynucleotide Phosphorylase and RNase E. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, p. 31651–31656.
52. Prud`homme-Généreux, A., *et al.*, 2004. Physical and Functional Interactions Among RNase E, Polynucleotide Phosphorylase and the Cold-Shock Protein, CsdA: Evidence for a ‘Cold Shock Degradosome’. *Molecular Microbiology*, 54, p. 1409–1421.
53. Charollais, J., Dreyfus, M., Iost, I., 2004. CsdA, a Cold-Shock RNA Helicase from *Escherichia coli*, is Involved in the Biogenesis of 50S Ribosomal Subunit. *Nucleic Acids Research*, 32, p. 2751–2759.
54. Dammel, C. S., Noller, H. F., 1995. Suppression of a Cold-Sensitive Mutation in 16S rRNA by Overexpression of a Novel Ribosome Binding Factor, RbfA. *Genes & Development*, 9, p. 626–637.
55. Yamanaka, K., Inouye, M., 2001. Selective mRNA Degradation by Polynucleotide Phosphorylase in Cold Shock Adaptation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183, p. 2808–2816.
56. Di Pietro, F., *et al.*, 2013. Role of the Ribosome-Associated Protein PY in the Cold-Shock Response of *Escherichia coli*. *Microbiology Open*, 2, p. 293–307.
57. Chowdhury, S., Ragaz, C., Kreuger, E., Narberhaus, F., 2003. Temperature-Controlled Structural Alterations of an RNA Thermometer. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, p. 47915-47921.

58. Giuliadori, A. M., Brandi, A., Gualerzi, C. O., Pon, C. L., 2004. Preferential Translation of Cold-Shock mRNAs During Cold Adaptation. *RNA*, 10, p. 265–276.
59. Gualerzi, C. O., Giuliadori, A. M., Pon, C. L., 2003. Transcriptional and Post-Transcriptional Control of Cold-Shock Genes. *Journal of Molecular Biology*, 331, p. 527–539.
60. Caldas, T., Laalami, S., Richarme, G., 2000. Chaperone Properties of Bacterial Elongation Factor EF-G and Initiation Factor IF2. *The Journal of Biological Chemistry*. 275, p. 855–860.
61. Goldstein, J., Pollitt, N. S., Inouye, M., 1990. Major Cold Shock Protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, p. 283–287.
62. Giuliadori, A. M., *et al.*, 2010. The cspA mRNA is a Thermosensor that Modulates Translation of the Cold-Shock Protein CspA. *Molecular Cell*, 37, p. 21–33.
63. Malik, A., *et al.*, 2016. Optimization of Expression and Purification of HSPA6 Protein from *Camelus dromedarius* in *E. coli*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23, p. 410-419.
64. Margreiter, G., Messner, P., Caldwell, K. D., Bayer, K., 2008. Size Characterization of Inclusion Bodies by Sedimentation Field-Flow Fractionation. *Journal of Biotechnology*, 138, p. 67-73.
65. Chalmers, J. J., *et al.*, 1990. Effects of Temperature on *Escherichia coli* Overproducing β -Lactamase or Human Epidermal Growth Factor. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, p. 104-111.
66. Doeven, M. K., Abeles, R., Tampé, R., Poolman, B., 2004. The Binding Specificity of OppA Determines the Selectivity of the Oligopeptide ATP-binding Cassette Transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, p. 32301-32307.