

(19)



(10) **LT 5053 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5053**

(51) Int. Cl.⁷: **C12N 15/00**
C12P 21/00

(21) Paraiškos numeris: **2002 133**

(22) Paraiškos padavimo data: **2002 12 24**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2003 07 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2003 09 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Milda PLEČKAITYTĖ, LT
Edita MIŠTINIENĖ, LT
Vilma MICHAILOVIENĖ, LT
Henrikas PESLIAKAS, LT
Gintautas ŽVIRBLIS, LT

(73) Patent savininkas:

BIOTECHNOLOGIJOS INSTITUTAS, V.Graičiūno g. 8, 2028 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis:

Liudmila GERASIMOVICH, Vingrių g. 13-42, LT-2001 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Šaperonai DnaK, DnaJ ir GrpE iš *Meiothermus ruber*, pasižymintys padidintu terminiu stabilumu ir baltymų aktyvios struktūros atstatymo (refoldavimo) *in vitro* sistema ir būdas

(57) Referatas:

Išradimas apibūdina baltymų aktyvios struktūros atstatymo (refoldavimo) sistemą panaudojant termofilinius šaperonus, klonuotus iš mezofilinio mikroorganizmo *Meiothermus ruber*. Minėti šaperonai pasižymi padidintu terminiu stabilumu ir didesniu refoldavimo aktyvumu nei anksčiau žinomi šaperonai. Pasiūlyta refoldavimo sistema (refoldavimo buferis) be denatūruoto baltymo savo sudėtyje turi neorganinių druskų, trijų išgrynintų termofilinių šaperonų mišinį (DnaK, DnaJ ir GrpE) bei adenozintrifosfatą. Išradimas priklauso biotechnologijos sričiai ir gali būti panaudotas natūralių arba rekombinantinių baltymų aktyvios struktūros atstatymui *in vitro* jų gamybos procese.

5

Šis išradimas priskirtinas baltymų biotechnologijos sričiai. Jo esmė – naujų šaperonų panaudojimas atstatant aktyvią baltymų struktūrą (refolduojant denatūruotus baltymus) *in vitro*.

10 Molekuliniai šaperonai vadinami baltymai, kurie atstato denatūruotų arba dar nesusiformavusių baltymų tretinę struktūrą (konformaciją), o tai pastariesiems sudaro galimybę įgauti jiems būdingą biocheminį ar fiziologinį aktyvumą. Jei atstatomas denatūruotų fermentų aktyvumas, tai šis refoldavimo atvejis vadinamas reaktyvacija.

Termofiliniai šaperonai DnaK, DnaJ ir GrpE – tai rekombinantiniai baltymai, klonuoti iš *Meiothermus ruber* (*M. ruber*) ir ekspresuoti *E. coli* (toliau termofiliniai šaperonų baltymai 15 žymimi *Mru.DnaK*, *Mru.DnaJ*, *Mru.GrpE*, o jų genai, atitinkamai, *Mru.dnaK*, *Mru.dnaJ*, *Mru.grpE*). Visi šie baltymai yra išgryninti iš *E. coli* ir panaudoti denatūruotų baltymų struktūros atstatymo (refoldavimo) *in vitro* sistemoje.

Yra žinomi keli patentai, nagrinėjantys šaperonų baltymų arba genų panaudojimą aktyvios konformacijos baltymų gavimui, paminėtini: EP0885967 (su ekvivalentais JP11009274, 20 US6159708), EP1016724 (su ekvivalentais JP 2000189163, US6197547), EP0998485, WO9905163, EP1149909, WO0071723.

Patentų EP0998485, WO9905163 autoriai baltymų refoldavimui siūlo naudoti šaperoninus Hsp60 (GroEL) arba jų fragmentus kartu su foldazėmis, tai gali būti peptidilprolil-izomerazės arba tiol/disulfid-oksidoreduktazės (dažnai vadinamos protein-disulfid-izomerazėmis). Patentų EP1149909, WO0071723 autoriai tiems pat tikslams naudoja 25 *in vitro* netermofilinius šaperonus DnaK, DnaJ ir GrpE iš įvairių šaltinių (*E. coli*, mielių, augalų ir žinduolių) kartu su kitos grupės šaperonais ClpB ir ClpS. Pastarieji autoriai ir patentų EP0885967, EP1016724 autoriai siūlo šaperonų DnaK, DnaJ, GrpE, GroES ir GroEL koekspresijos su pasirinktu tiksliniu baltymu variantus, norėdami gauti juos 30 aktyvioje konformacijoje *in vivo*. Tačiau nei vienas nagrinėjamas analogas baltymų refoldavimui nepanaudojo termofilinių šaperonų. Be to, kaip bus parodyta toliau, šiame išradime siūlomi unikalūs termofiliniai šaperonai savo aktyvumu pranoksta analogus iš kitų šaltinių.

- Šio išradimo tikslas buvo sukurti baltymų refoldavimo *in vitro* sistemą, panaudojant rekombinantinius termofilinius šaperonus. Tam tikslui pasiekti termofiliniai šaperonų *Mru.dnaK*, *Mru.dnaJ* ir *Mru.grpE* genai buvo klonuoti iš mezofilinio mikroorganizmo *M. ruber*, perkelti į *E. coli* ir ekspresuoti. Tokiu būdu gauti nauji rekombinantiniai šaperonai buvo išgryninti ir panaudoti, komponuojant baltymų refoldavimo sistemas *in vitro*. Buvo surastos tokios šaperonų sistemos, kurios efektyviai atstato denatūruotų baltymų struktūrą ir gali būti panaudotos įvairios paskirties baltymų aktyvumo atstatymui biotechnologiniuose procesuose.
- Šio išradimo DnaK, DnaJ ir GrpE šaperonų baltymai buvo identifikuoti, klonuoti ir ekspresuoti pirmą kartą, be to, pademonstruotas jų didelis aktyvumas baltymų refoldavimo procese. Pilna *M.ruber* dnaK (hsp70) operono seka atskleista ir deponuota autorių vardu GenBank duomenų bazėje, numeris AF507046 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- Šaperonai *Mru.DnaK*, *Mru.DnaJ* ir *Mru.GrpE* yra termofiliniai ir skiriasi nuo anksčiau žinomų pagal savo kilmę, atsparumą aukštai temperatūrai ir didesnę refoldavimo aktyvumą. Nauji termofiliniai šaperonai iš *M. ruber* turi charakteristikas, pateiktas 1 lentelėje:

Lentelė 1.

Šaperonai	Šaperonų klasė	Aminorūgščių skaičius	Molekulinė masė, kDa	Izoelektrinis taškas, PI
<i>Mru.DnaK</i>	Hsp70	630	66,7	5,17
<i>Mru.DnaJ</i>	Hsp40	293	32,1	9,22
<i>Mru.GrpE</i>	Hsp22	176	19,5	4,86

- Jų aminorūgščių sekos pateiktos toliau (Fig. 1 – 3).

- Naujiems šaperonų baltymams gauti buvo naudotos rekombinantinės plazmidės pUC19-TR1, pUC19-TR2 ir pUC19-TR3; šios plazmidės saugomos Biotechnologijos instituto (Vilnius) Rekombinantinių baltymų tyrimo laboratorijoje ir joms suteikti numeriai BI-TR1, BI-TR2, BI-TR3, atitinkamai.

Rekombinantinė plazmidė pUC19-TR1 (deponavimo numeris BI-TR1) pasižymi tokiomis savybėmis:

- ji koduoja dalį *M.ruber dnaK* operono;
- jos bendras ilgis 5500 bazių porų;

- ji susideda iš sekančių elementų:

EcoRI-HindIII 2,7 tūkst. bazių porų dydžio pUC19 plazmidės fragmento, turinčio geną, apsprendžiantį atsparumą ampicilinui ir pMB1 replikono (ori srities);

EcoRI-HindIII fragmento 2,8 tūkst. bazių porų dydžio, koduojančio dalį geno

5 *Mru.dnaK*, visą *Mru.grpE* ir dalį *Mru.dnaJ* geno.

Plazmidės pUC19-TR2 (deponavimo numeris BI-TR2) bendras ilgis 3500 bp, ji koduoja dalį *M.ruber dnaK* operono ir susideda iš sekančių elementų:

EcoRI-HindIII 2,7 tūkst. bazių porų dydžio pUC19 plazmidės fragmento, turinčio geną, apsprendžiantį atsparumą ampicilinui ir pMB1 replikono (ori srities);

10 *EcoRI-HindIII* 0,8 tūkst. bazių porų dydžio fragmento, koduojančio 5'-galinę *Mru.dnaK* geno dalį ir jo promotorių.

Plazmidė pUC19-TR3 (deponavimo numeris BI-TR3) bendras ilgis 5500 bp, ji koduoja dalį *M.ruber dnaK* operono ir susideda iš sekančių elementų:

15 *Ecl136II* 2,7 tūkst. bazių porų dydžio pUC19 plazmidės fragmento, turinčio geną, apsprendžiantį atsparumą ampicilinui ir pMB1 replikono (ori srities);

Ecl136II 2,8 tūkst. bazių porų dydžio fragmento, koduojančio dalį geno *Mru.grpE* ir visą *Mru.dnaJ* geną.

20 Baltymų aktyvios struktūros atstatymo (refoldavimo) *in vitro* sistema apima praradusį aktyvią struktūrą baltymą, buferį, turintį palaikančių joninę jėgą druskų, disulfidinius baltymo tiltelius redukuojantį agentą, adenozintrifosfatą ir klonuotus termofilinius *Mru.DnaK*, *Mru.DnaJ* ir *Mru.GrpE* šaperonus pagal šį išradimą. Sistema yra vandeninio tirpalo formoje, ir komponentų kiekis nustatomas iš sąlygų:

	Baltymas, kurio struktūrą reikia atstatyti	3 – 5 μ M
25	Buferis (optimaliai TRIS-HCl)	pH 7,5 – 8,5
	Druskos, reikalingos joninei jėgai palaikyti	0,38 – 0,42 M
	Agentas, redukuojantis disulfidinius baltymo tiltelius, (optimaliai ditiotreitolis)	2 – 5 μ M
	Termofiliniai šaperonų baltymai:	
30	<i>Mru.DnaK</i> ,	3 – 5 μ M
	<i>Mru.DnaJ</i>	3 – 5 μ M
	<i>Mru.GrpE</i>	0,3 - 0,5 μ M
	Adenozintrifosfatas	9-11 mM.

Baltymų aktyvios struktūros atstatymo *in vitro* būdas, panaudojant šaperonus pagal išradimą, pasižymi tuo, kad denatūruotą baltymą praskiedžia buferiu, pavyzdžiui, TRIS-HCl, pH $7,5 \pm 0,1$, turinčiu joninę jėgą palaikančių druskų, pavyzdžiui, Na_2SO_4 , KCl, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, prideda disulfidinių baltymo tiltelių redukavimui ditioneitolio iki 2-5 μM , po to prideda termofilinių *Mrn*.DnaK, *Mrn*.DnaJ ir *Mrn*.GrpE šaperonų mišinį, optimaliai, santykiu 10:10:1, po inkubavimo 37°C dar prideda adenozintrifosfato iki koncentracijos 10 ± 1 mM ir išlaiko mažiausiai 5 min.

Išradimo baltymų refoldavimo *in vitro* sistema, panaudojant rekombinantinius termofilinius šaperonus, yra iliustruojama informacija, pateikta Fig 1 – Fig. 11, kartu nurodant naudotas metodikas.

- Fig.1 pateikta *Mrn*.DnaK termofilinių šaperonų pagal išradimą aminorūgščių seka;
 Fig.2 pateikta *Mrn*.GrpE termofilinių šaperonų pagal išradimą aminorūgščių seka;
 Fig.3 pateikta *Mrn*.DnaJ termofilinių šaperonų pagal išradimą aminorūgščių seka;
 Fig. 4 pateikta *M. ruber* operono, koduojančio *Mrn.dnaK*, *Mrn.dnaJ*, *Mrn.grpE* genus, nukleotidų seka. Genas *Mrn.dnaK* nuo 634 iki 2499 nukleotido, genas *Mrn.grpE* nuo 2578 iki 3108 nukleotido, genas *Mrn.dnaJ* nuo 3182 iki 4063 nukleotido.
 Fig. 5 atkartoja *Meiothermus ruber* chromosominės DNR Southern'o bloto vaizdą, naudojant [^{32}P]-žymėtą *dnaK* geno fragmentą. Pažymėti naudoti klonavimui fragmentai.

Chromosominė DNR veikta:

1 – <i>EcoRV</i>	6 – <i>Bsp120I</i> + <i>PaeI</i>
2 – <i>EcoRV</i> + <i>Eco47III</i>	7 – <i>PaeI</i>
3 – <i>Eco47III</i>	8 – <i>Alw44I</i>
4 – <i>NsbI</i>	9 – <i>Alw44I</i> + <i>EheI</i>
5 – <i>Bsp120I</i>	10 – <i>EheI</i>

M – DNR markeris (3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0 kb)

- Fig. 6. Plazmidžių pUC19-TR1, pUC19-TR2 ir pUC19-TR3 su *M. ruber* DNR fragmentais schema.
 Fig. 7 iliustruoja *Mrn*.DnaK baltymo gryninimo stadijas, frakcijų analizę atliekant elektroforezės būdu SDS-PAA geliuose (12%, redukuojančios sąlygos), kur
 A Chromatografija naudojant DEAE-Sefarozės kolonėlę:

- 1 - baltymo molekulinės masės standartai, (iš viršaus: 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4 kDa),
- 2 - biomasės ekstrakto supernatantas prieš užnešimą ant DEAE-Sefarozės,
- 3 - nesorbuota frakcija,
- 4-10 yra frakcijos iš DEAE-Sefarozės kolonėlės.

5 **B** Chromatografija naudojant Fenil-Sefarozės kolonėles:

- 1 - baltymo molekulinės masės standartai, (iš viršaus: 116, 66.2, 45, 35, 25 kDa),
- 2 - jungtinės atrinktos frakcijos po DEAE-Sefarozės kolonėlės,
- 3-10 yra frakcijos iš Fenil-Sefarozės kolonėlės.

C Gelfiltracija ant Sefakrilo S-300 kolonėlės:

- 10 1 - baltymo molekulinės masės standartai, (iš viršaus: 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4, 14.4 kDa),
- 2 - jungtinės atrinktos frakcijos po Fenil-Sefarozės kolonėlės,
- 3-10 yra frakcijos iš Sefakrilo kolonėlės.

Fig. 8 pavaizduotos *Mru.DnaJ* baltymo gryninimo stadijos, frakcijų analizę atliekant elektroforezės būdu SDS-PAA geliuose (12%, redukuojančios sąlygos), kur

A Chromatografija naudojant LRY2KT -Sefarozės kolonėlę:

- 1 - baltymo molekulinės masės standartai, (iš viršaus: 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4, 14.4 kDa).
- 2 - biomasės ekstrakto supernatantas prieš užnešimą ant LRY2KT- Sefarozės,
- 3 - nesorbuota frakcija,
- 20 4-10 yra frakcijos iš LRY2KT -Sefarozės kolonėlės;

B Chromatografija naudojant CM-Sefarozės kolonėlę:

- 1 - baltymo molekulinės masės standartai, (iš viršaus: 116, 66.2, 45, 35, 25 kDa).
- 2 - jungtinės atrinktos frakcijos po LRY2KT- Sefarozės kolonėlės;
- 3 - nesorbuota frakcija,
- 25 4-9 yra frakcijos iš CM -Sefarozės kolonėlės.

Fig. 9 pavaizduotos *Mru.GrpE* baltymo gryninimo stadijos, frakcijų analizę -elektroforezės būdu SDS-PAA geliuose (15%, redukuojančios sąlygos), kur

A Chromatografija naudojant DEAE-Sefarozės kolonėlę:

- 30 1 - baltymo molekulinės masės standartai (iš viršaus: 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4 kDa),
- 2 - biomasės ekstrakto supernatantas prieš užnešimą ant DEAE-Sefarozės,
- 3 - nesorbuota frakcija;
- 4-10 yra frakcijos iš DEAE-Sefarozės kolonėlės.

B Chromatografija naudojant Oktil-Sefarozės kolonėlę:

- 1 - baltymo molekulinės masės standartai, (iš viršaus: 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4, 14.4 kDa),
- 2 - jungtinės atrinktos frakcijos po DEAE-Sefarozės kolonėlės,
- 3-10 yra frakcijos iš Oktil-Sefarozės kolonėlės.

C Gelfiltracija naudojant Sefakrilo S-100 kolonėlę:

- 5 1 - baltymo molekulinės masės standartai, (iš viršaus: 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4, 14.4 kDa),
- 2 - jungtinės atrinktos frakcijos po Oktil-Sefarozės kolonėlės,
- 3-8 yra frakcijos iš Sefakrilo S-100 kolonėlės.

Fig. 10 parodo rekombinantinių *Mru.DnaK* (Hsp70) ir *Mru.DnaJ* (Hsp40) terminį
10 stabilumą.

Fig. 11 parodo MDH reaktyvaciją (aktyvumo atstatymą), naudojant *E. coli*

DnaK/J/GrpE ir *M. ruber* *DnaK/J/GrpE* šaperonines sistemas pagal išradimą, kur

- a- MDH + *M.ruber* šaperonai; b – MDH + *E.coli* šaperonai; c – MDH spontaninė
15 reaktyvacija;

Naujų šaperonų genų klonavimo, genų ekspresijos *E.coli*, gautų šaperonų gryninimo bei jų
terminio stabilumo nustatymo detalės aprašytos toliau pateiktuose pavyzdžiuose. Šie
pavyzdžiai, kaip ir baltymų aktyvios struktūros atstatymo (refoldavimo) sistemos su
20 termofiliniais šaperonais *Mru.DnaK*, *Mru.DnaJ* ir *Mru.GrpE* paruošimo ir panaudojimo
pavyzdys malatdehidrogenazės aktyvumo atstatymui, neapriboja išradimo apibrėžtyje
nurodytos išradimo esmės.

1 pavyzdys.

25 Termofilinių šaperonų genų klonavimas

Termofilinių šaperonų klonavimui pasirinktas bakterinis kamienas *Meiothermus ruber*, kuris
buvo išskirtas iš Kamčiatkos (RU) geizerių. Kamieną maloniai suteikė MBI Fermentas
(Vilnius). *M. ruber* yra gramneigiamos bakterijos, neformuojančios sporų ir turinčios augimo
temperatūros optimumą 60-65°C. Chromosominė DNR, išskirta iš *M. ruber* kamieno buvo
30 restrikčiuota keliomis restriktazėmis, elektroforetiškai frakcionuota 1% agarozėje ir blotuota su
[³²P]-žymėtu *M. ruber* *dnaK* geno fragmentu, gautu polimerazinės grandininės reakcijos
(PGR) būdu amplifikavus konservatyvią *dnaK* geno 5'-dalį su degeneruotais pradmenimis,
kurie parinkti analizuojant *E. coli* ir *Thermus thermophilus* *dnaK* genų sekas:

5'-ATTGACCTGGGIACIACIAAC-3'

5'-C(G/T)GCGGTIGG(C/T)TCGTTGAT-3'

kur I yra inozino nukleotidas.

Southern'o bloto autoradiograma yra pateikta Fig. 5.

- 5 *M. ruber* chromosominės DNR fragmentai (2,8 ir 0,8kb), gauti naudojant *EheI* restriktazę, buvo pasirinkti klonavimui. Šie fragmentai buvo išskirti iš preparatyvinės elektroforezės gelio ir liguoti į plazmidės pUC19 *Ecl136II* taikinį bei transformuoti į *E. coli*. Gauti klonai pakartotinai hibridizuoti su aukščiau minėtu *M. ruber* dnaK geno fragmentu ir atrinktos dvi kolonijos, turinčios plazmides su 2,8 ir 0,8 kb fragmentais. Šios plazmidės (pUC19-TR1 ir
- 10 pUC19-TR2) buvo sekvenuotos. Išanalizavus gautus duomenis paaiškėjo, kad jų fragmentai apima didžiąją dalį *M. ruber* operono su dnaK, grpE ir dnaJ genais (Fig. 6).

- Nustačius, kad *Mru.dnaJ* genas plazmidėje pUC19-TR1 yra nepilnas, aukščiau aprašytu hibridizacijos būdu buvo identifikuotas dar vienas klonas, turintis plazmidę pUC19-TR3 su *Ecl136-Cfr42I* fragmentu (2,8 kb). Sekvenavimo duomenys patvirtino, kad plazmidė pUC19-
- 15 TR3 turi likusią dnaJ geno dalį. Pilna *M. ruber* dnaK-grpE-dnaJ operono seka pateikta Fig. 4.

2 pavyzdys.

Termofilinių šaperonų *Mru.dnaK*, *Mru.dnaJ* ir *Mru.grpE* genų ekspresija *E. coli*

- Termofilinių šaperonų genai *Mru.dnaK*, *Mru.dnaJ* ir *Mru.grpE* iš plazmidžių pUC19-TR1 ir
- 20 pUC19-TR3 buvo perkelti į ekspresinę plazmidę pET21b(+) (Novagen, publikuota patente US4952496). Tai buvo atlikta PGR metodu į kiekvieno geno 5'-galinę dalį įvedus *NdeI* taikinius, o į 3'-galinę dalį – *BamHI* taikinius. Taip modifikuoti atitinkamų genų fragmentai buvo liguoti su pET21b(+) plazmide, perskelta per *NdeI*-*BamHI* taikinius. Atrinktos plazmidės pET21-*Mru-dnaK*, pET21-*Mru-dnaJ* ir pET21-*Mru-grpE* toliau transformuotos į ekspresinį
- 25 kamieną *E.coli* BL(DE3). Atrinktos kolonijos, kurios ekspresuoja didelį kiekį (10-20% nuo visų ląstelinių baltymų) rekombinantinio termofilinio šaperono po indukcijos 1 mM izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidu (IPTG). Tokie kamieniai tinka tolimesniam termofilinių šaperonų gryninimui, gaunant pakankamus jų kiekius baltymų refoldavimui *in vitro* tirti.

30 3 pavyzdys

Termofilinių šaperonų *Mru.DnaK*, *Mru.DnaJ* ir *Mru.GrpE* gryninimas.

Rekombinantinių šaperonų *Mru.DnaK* ir *Mru.DnaJ* gryninimas analitiniais kiekiais buvo atliekamas tokiu būdu. Kamieniai *E. coli* BL(DE3) pET21-*Mru.dnaK* ir *E.coli* BL(DE3)

pET21-*Mru.dnaJ* buvo auginami iki optinio tankio $OD_{600nm}=0,6-1,0$ ir indukuojami 2-3 val. pridėjus 1mM IPTG. Gauta biomasė nucentrifuguojama, resuspenduojama 10mM TRIS-HCl, pH 7.8, 1mM EDTA buferyje ir ardoma ultragarsu. Po lizato centrifugavimo supernatantas su *Mru.DnaJ* skiedžiamas 10 kartų su 20mM CH_3COONa , pH 5.6 buferiu.

- 5 Tirpalas užnešamas ant 1ml SP-Sefarozės Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) kolonėlės (chromatografinė sistema AKTA explorer) ir leidžiamas 0–1M NaCl gradientas 20mM CH_3COONa , pH 5.6 buferyje. *Mru.DnaK* atveju supernatantas buvo skiedžiamas 10 kartu 50mM TRIS-HCl, pH 8.5 buferyje. Tirpalas užnešamas ant 1ml Q-Sefarozės Fast Flow kolonėlės ir leidžiamas 0–1M NaCl gradientas 50mM TRIS-HCl, pH 8.5 buferis.
- 10 Išanalizavus gautas frakcijas ant SDS-PAA gelio, atrenkamos tos, kurios turi švaresnius *Mru.DnaK* arba *Mru.DnaJ* baltymus.

Rekombinantinių *Mru.DnaK*, *Mru.DnaJ* ir *Mru.GrpE* gryninimas preparatyviniais kiekiais atliekamas taikant individualų metodą kiekvienam iš baltymų, priklausomai nuo jo fiziko-cheminių savybių, tokių kaip izoelektrinis taškas (pI), hidrofobiškumas, histidino aminorūgščių skaičius ir pozicija.

- 15 *Mru.DnaK* (pI 5,17) gryninamas per tris chromatografines stadijas: ant DEAE-Sefarozės, ant Fenil-Sefarozės ir ant Sefakrilo S-300 kolonėlių (Fig. 7).

Mru.DnaJ (pI 9,22) buvo išgrynintas per dvi chromatografines stadijas: ant LRY2KT-Sefarozės (sorbentas su biomimetiniu dažu – šviesai atsparus geltonasis, turintis vario jonų) ir ant CM-Sefarozės (Fig. 8).

- 20 *Mru.GrpE* (pI 4,86) buvo gryninamas per tris chromatografines stadijas: ant DEAE-Sefarozės, ant Oktil-Sefarozės ir Sefakrilo S-100 (Fig. 9). Pritaikyta gryninimo metodologija davė patenkinamą rezultatą - daugiau negu 85% švarumą *M. ruber* šaperonų *Mru.DnaK*, *Mru.DnaJ*, *Mru.GrpE* preparatams.

25

4 pavyzdys

Šaperonų *Mru.DnaK* ir *Mru.DnaJ* terminio stabilumo nustatymas

Šaperonų *Mru.DnaK* ir *Mru.DnaJ* terminis atsparumas tikrintas indukuotų biomasių ultragarsiniuose nuskaidrintuose ekstraktuose. *E.coli* ląstelės, ekspresuojančios *Mru.DnaJ* (Fig.10, takeliai 2–7) ir *Mru.DnaK* (Fig. 10, takeliai 8, 9), buvo nucentrifuguotos ir resuspenduotos 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA buferiuose su pH reikšmėmis 7.4; 7.8; 8.2 (25°C). Ląstelės suardytos ultragarsu ir tirpi lizato frakcija inkubuota 37°C 10 min., perkelta į 65°C 10 min. ir nucentrifuguota. Tirpi frakcija (S) ir nuosėdos (P) analizuotos elektroforetiškai

30

12% SDS-PAA gelyje. Fig. 10 takelis 1 - baltymo molekulinės masės standartai (iš viršaus: 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4, 14.4 kDa).

Pastebėta, kad rekombinantinio *Mrn.DnaJ* terminis stabilumas didėja kylant buferio pH reikšmei (Fig. 10). Esant pH 7.4 *Mrn.DnaJ* išsėda pilnai, o jau esant pH 7.8 jis tampa pusiau tirpus. Baltymas *Mrn.DnaJ* lieka termoatsparus kai pH yra 8.2 (Fig. 10, takeliai 6 ir 7). Rekombinantinio *Mrn.DnaK* terminis atsparumas yra nepriklausomas nuo pH. Šis baltymas buvo tirpus pH intervale nuo 7.4 iki 8.2 (Fig. 10, takeliai 8 ir 9).

5 pavyzdys

10 **Baltymų aktyvios struktūros atstatymo (refoldavimo) sistemos su termofiliniais šaperonais *Mrn.DnaK*, *Mrn.DnaJ* ir *Mrn.GrpE* paruošimas ir panaudojimas malatdehidrogenazės aktyvumo atstatymui.**

Šaperonų aktyvumas buvo nustatinėjamas tokiu būdu. 3.8 μ M mitochondrinės malatdehidrogenazės (MDH) buvo denatūruota buferyje su 3 M guanidino hidroklorido 1 val. 37°C temperatūroje ir tada praskiesta 30 kartų (iki 0.127 μ M) foldavimo buferyje (25 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 0.25 M Na₂SO₄, 150 mM KCl, 20 mM Mg(CH₃COO)₂, 3 mM DTT) su šaperonais 3.5 μ M *Mrn.DnaK*, 3.5 μ M *Mrn.DnaJ* ir 0.35 μ M *Mrn.GrpE* arba su tokias pat kiekiais *E. coli* rekombinantinių šaperonų DnaK, DnaJ ir GrpE. Mišinys buvo inkubuojamas 5 min. 37°C temperatūroje, o tada pridedama 10 mM adenzintrifosfato (ATF). Mitochondrinės malatdehidrogenazės aktyvumo atstatymas (reaktyvacija) buvo matuojamas 10 min. intervalais 2 val. bėgyje. MDH aktyvumas buvo matuojamas pagal žinomą metodiką (Sanchez SA, Hazlett TL, Brunet JU, Jameson DM, 1998, Aggregation states of mitochondrial malate dehydrogenase. Protein Sci 7: 2184–2189). Kontrolinis mėginys su denatūruota MDH buvo inkubuojamas be šaperonų, tai MDH spontaninės reaktyvacijos mėginys.

Iš Fig. 11 grafiko akivaizdu, kad mėginyje su *M. ruber* šaperonais MDH refoldavimas vyksta apie 10 kartų intensyviau, negu spontaninė MDH reaktyvacija ir apie 3 kartus intensyviau nei naudojant analogišką sistemą su *E. coli* šaperonais. Taigi galima teigti, kad baltymų aktyvios struktūros atstatymo (refoldavimo) sistema, naudojant rekombinantinius šaperoninius *M. ruber* baltymus pagal išradimą, yra pranašesnė, lyginant su analogiškais baltymais iš *E. coli*.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Baltymų aktyvios struktūros atstatymo (refoldavimo) baltymas *Mrn.DnaK* - klonuotas termofilinis šaperonas, kurio aminorūgščių seka pateikta Fig. 1.
- 5 2. Baltymų aktyvios struktūros atstatymo (refoldavimo) baltymas *Mrn.GrpE* - klonuotas termofilinis šaperonas, kurio aminorūgščių seka pateikta Fig. 2.
3. Baltymų aktyvios struktūros atstatymo (refoldavimo) baltymas *Mrn.DnaJ* - klonuotas
10 termofilinis šaperonas, kurio aminorūgščių seka pateikta Fig. 3.
4. Baltymų aktyvios struktūros atstatymo (refoldavimo) šaperonai pagal 1-3 punktus, pasižymintys padidintu terminiu stabilumu 62-65°C temperatūroje pH 8,2–8,5 intervale.
- 15 5. *M.ruber* operonas, koduojantis *Mrn.dnaK*, *Mrn.dnaJ*, *Mrn.grpE* genus, kurio nukleotidų seka pateikta Fig. 4.
6. Rekombinantinė plazmidė pUC19-TR1, deponavimo numeris BI-TR1, bendras ilgis 5500 bazių porų, koduojanti dalį *Mrn dnaK* operono ir susidedanti iš sekančių elementų:
20 *EcoRI-HindIII* 2,7 tūkst. bazių porų dydžio pUC19 plazmidės fragmento, turinčio geną, apsprendžiantį atsparumą ampicilinui ir pMB1 replikono (ori srities);
EcoRI-HindIII fragmento 2,8 tūkst. bazių porų dydžio, koduojančio dalį geno *Mrn.dnaK*, visą *Mrn.grpE* ir dalį *Mrn.dnaJ* geno.
- 25 7. Rekombinantinė plazmidė pUC19-TR2, deponavimo numeris BI-TR2, bendras ilgis 3500 bazių porų, koduojanti dalį *Mrn dnaK* operono ir susidedanti iš sekančių elementų:
EcoRI-HindIII 2,7 tūkst. bazių porų dydžio pUC19 plazmidės fragmento, turinčio geną, apsprendžiantį atsparumą ampicilinui ir pMB1 replikono (ori srities);
EcoRI-HindIII 0,8 tūkst. bazių porų dydžio fragmento, koduojančio 5'-galinę
30 *Mrn.dnaK* geno dalį ir jo promotorių.
8. Rekombinantinė plazmidė pUC19-TR3, deponavimo numeris BI-TR3, bendras ilgis 5500 bazių porų, koduojanti dalį *Mrn dnaK* operono ir susidedanti iš sekančių elementų:

Ecl136II 2,7 tūkst. bazių porų dydžio pUC19 plazmidės fragmento, turinčio geną, apsprendžiantį atsparumą ampicilinui ir pMB1 replikono (ori srities);

Ecl136II 2,8 tūkst. bazių porų dydžio fragmento, koduojančio dalį geno *Mru.grpE* ir visą *Mru.dnaJ* geną.

5

9. Baltymų aktyvios struktūros atstatymo (refoldavimo) *in vitro* sistema, turinti praradusį aktyvią struktūrą baltymą, buferį, palaikančias joninę jėgą druskas, disulfidinius baltymo tiltelius redukuojantį agentą, adenzintrifosfatą ir šaperonus, *b e s i s k i r i a n t i t u o*, kad tai yra vandeninis tirpalas, šaperonais naudojami klonuoti termofiliniai *Mru.DnaK*,
10 *Mru.DnaJ* ir *Mru.GrpE* šaperonai pagal 1-4 punktus, ir sistemos komponentų kiekis nustatomas iš sekančių sąlygų:

Baltymas, kurio struktūrą reikia atstatyti	3 – 5 μ M
Buferis, optimaliai TRIS-HCl	pH 7,5 – 8,5
Druskos, reikalingos joninę jėgą palaikyti	0,38 – 0,42 M
15 Agentas, redukuojantis disulfidinius baltymo tiltelius,	2 – 5 μ M
Termofiliniai šaperonų baltymai:	
<i>Mru.DnaK</i>	3 – 5 μ M
<i>Mru.DnaJ</i>	3 – 5 μ M
<i>Mru.GrpE</i>	0,3 - 0,5 μ M,
20 Adenzintrifosfatas	9-11 mM.

10. Baltymų aktyvios struktūros atstatymo *in vitro* būdas panaudojant šaperonus refoldavimo sistemoje, *b e s i s k i r i a n t i s t u o*, kad denatūruotą baltymą praskiedžia buferiu, pavyzdžiui, TRIS-HCl pH $7,5 \pm 0,1$, turinčiu joninę jėgą palaikančių druskų, pavyzdžiui, Na_2SO_4 , KCl, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, disulfidinių baltymo tiltelių redukavimui
25 prideda ditionitritolio iki koncentracijos 2-5 μ M, po to prideda termofilinių *Mru.DnaK*, *Mru.DnaJ* ir *Mru.GrpE* šaperonų pagal 1-4 punktus mišinį, optimaliai, moliniu santykiu 10:10:1, po inkubavimo 37°C temperatūroje prideda adenzintrifosfato iki koncentracijos 10 ± 1 mM ir išlaiko bent 5 min.

30

MAKAVGIDLGTNSVIAIMEGGSPVLENAEGERTTPSVVAYKGSQDLVGRVARRQAVLNPEGTVFE
IKRFIGRRWEEVQDEVKRVYPYKVVKGPDGGVRVDIAGKLYTPEEISAMILRKLVD DASKKLGEKITK
AVITVPAYFNNAQREATANAGRIAGLEVLRIVNEPTAAALAYGLDKKGHETVLVFDLGGGTDFDVTVL
EIGDGVFEVKATAGDTHLGGSDFDHAI VNWLAEEFKKESGGVDLKADRQALQRLIEAAEKAKIELSA
VTETTISLPFIGLDPISKTPHLERKLTRAKFEELIQPLLKKIRGPVEQALRDAGLSASQIDEVLLV
GGSTRVPAVQQIVKEMLGKEPNRSVNPDEVVALGAAVQAGVLTGQVEDVVLLDVTPLSLGVETKGGV
FTVLI PRNTTVPTRKSEIFTTAEHNQPSVEIHVLQGERPMAADNKS LGRFRLECI PPMPAGVPQIEV
TFDIDANGILHATAKEKSTGKEASITIQNTTTLSEQEI ERMKEAEANA EADRKRKEHADLKNLDA
ARIQAERVMGEKESTAEAKSRLEAAISR AKTLVDTDGSDADLRQATEELLAALQAYEQGAAAGSQAQ
SSTPKSDDVIDADYKPAD

Fig. 1.

MENNEPVVET PEAQNDLPEV ERLKGEVEFL KAELEASKNK FLRLYADFEN YKKRMVQELE
AAQRNGKFDA VRALLGTLDD LERALGFASV KPEDLIPGVR SVLENFTRSL KSLGVEAVPG
VGAEFDPYH EAIGAVEGEE GKVMHVYQQG FKYGDLLVRP ARVVVGSGAK PEEAEA

Fig. 2.

MNMAYKDYYK ILGV PKNASE DEIKKAFKKL ARKYHPDVNK EPGAEKFKE INEAYTVLSD
PEKRRYYDTY GAAAGSAGWQ GPPPGPGGFG GFTGNVGD FS DFFQQLFGGR GGFGGLGDLF
EQTPGRGARR VAGDLEAELP LSLEEAYRGG EKTISVGAER LTVRIPPGVR EGQKIRLAGK
GRAGGDLYLH VKLQSRPEMR LEGDDIYTVV EVPAPIAVVG GKVRVQTLDG PVEITIPRRT
QAGRKLRLAG KGWPRKDKSR GDQYAEVRVT IPTNPSPEEE RLYAQLAELI KVQ

Fig. 3.

```

1 atcagaaacc cgattagcag caaagggatc aggaatccca gcaaggattt tctcgtctgg
61 gtgcggaaat atccacctgg atttttttgt cgcctcactc gcggtatggtg ctggtgtcta
121 tggggcccg cgcaaagggt acgtattgat cgcgggtcct cgcggcggtg cgcgttgagc
181 tgcgtccat caaccgtaat ttgtggccacc cgcgggtcgt caatttcgtt aagaaaagtg
241 gtataggcaa ccctggttgg cgggctgctg atgcgaggta aggctgaaag cccaggcaat
301 caggatagct gccagcagga taaaccataa gttgaacggc aggcggttca ttgtttttt
361 agcctacacc gatttacagg tataaaggta gtcaaaagaa ccgtgttggg ataagggtg
421 tttatcgctt ttcgggcccc cagccgagcg gtgctgcttg ccgctacgga gccatctgcc
481 ggcacacagt tgagggtgtg cgctatacat cgttacgctg ctggagcggg gttcaaactt
541 gataatacta gactcaactc tattgactat atcaataata actggtatca tatggctcag
601 tgagccgtgc ttagtgccgc cagcggaggga tgtatggcaa aagccgtagg aattgactta
661 ggaacgacca acagcgttat cgccatcatg gaagggtggc gcccggtggt gtcgagaaac
721 gccgagggcg agcgaccac cccagcggtg gtggcttata aggggagcga ccaactggtg
781 ggcggggtgg cccgcccgtc ggccgtgctt aaccccgagg gcaccgtctt cgagatcaag
841 cgcttcatcg ggcggcggtg ggaagagggt caggacgagg tcaagcggtt gccctataag
901 gtggtcaagg gccccgatgg cggggtgctg gtggatatcg ccggcaagct tcaaccccc
961 gaagagattt cggccatgat cctgcgcaag ctggtggagc acgctcccaa aaagctgggg
1021 gagaagatca ccaagcggtt gattaccgta ccagcctact tcaataacgc ccagcgcgag
1081 gccaccgcca acgcccgtag gattgccggc ctgaggtgct tgccatcgtt caacgagccc
1141 accgcgcgcg ccctggccta tggcctggac aaaaaaggcc acgagaccgt gctggtcttc
1201 gccctggcgg ggggtacctt cgacgtgagc gtgctggaga tcggcgacgg cgtctttgag
1261 gtcaaggcca ccgcggggga taccacctg ggcggctccg acttcgacca tgccatcgtg
1321 aactggctgg ccgaggagtt caagaaggag tcggcggggg tggaactgaa ggccgaccgg
1381 caggccctgc agcgctgat tgaagccgct gagaaggcca agatcgagct ttcggcggtt
1441 gccagacca ccatcagcct gcccttcacg ggcttcgacc cgatctccaa gacccccctg
1501 caccctcagc gcaagctcac ccgggccaag ttcgaggagc tgatccagcc cctgctgaag
1561 aagatccgcg gcccggtaga acagccctg cgcgatgccg gcctgagcgc cagccagatt
1621 gacgaggtgc tgctggtagg tggttctacc cgtgtgccgg cgggtgcagc gattgtgaag
1681 gagatgttgg gcaaaagagc caaccgcagc gtcaaccccc acgaggtggt ggccctgggg
1741 gcggcggtgc aggcgggtgt gctgaccggg caggtggagg acgtggtggt gctggacgtg
1801 accccgctct cgctgggggt ggagaccaag ggtggggtgt tcacggtgct gattccgcgc
1861 aacaccaccg taccgaccgg caagtcggag atcttcacca ccgcccagca caaccagccc
1921 tcgggtggaga tccacgtgct gcagggtgag cgccccatgg ccggcgacca caagagcctg
1981 ggccgcttcc gtctcagagt catcccgccc atgccggcg gcgtgcccc gacgaggtg
2041 accttcgaca tcgacgcca cggcatcctg catgcgaccg ccaaggagaa atccaccggc
2101 aaggaagcct ccattaccat ccagaacacc accacccctt ccgagcagga gatcgagcgc
2161 atgatcaagg aagccgaggg caacgcccag gcgaccgca agcgtaaaag gcacgccgat
2221 ctcaagaaca acctcgatgc cgcgcgcat caggcgaggc ggggtgatgg ggagaaggag
2281 agcaccgccc aggccaagag ccgcctcgag gccgccatca gccgggcccc gaccctggtg
2341 gacaccgacg gctccgacgc cgacctgcgc caggccaccg aggagctgct cgcggccctg
2401 caggcctacg agcagggggc ggctgcgggc agccagggccc agagcagcac ccccaagtc
2461 gacgagctga tcgacgcca ttacaacccc gccgactaag ccgcccagca tggggtgtgg
2521 ggaagcctgg cctagggccc gccccacgcc ccactttggc ccacagaggt gcgatgtatg
2581 gagaataacg aaccggtggt tgagacccca gaggcccaag acgatctgcc tgaagtggag
2641 cgccctcaag gtgaggtgga gtttttgaag cgggagctcg aggcctccaa aaacaaattc
2701 ctgcgctgtt acgcccactt tgaaaactac aaaaagcgca tgggtgcagga gctcgaggcc
2761 gccagcgcca acggcaaat cgatgcggtg cgggccctgc tgggaccctt ggacgacctc
2821 gagcgggcgt tgggctttgc cagcgtgaag cccgaagatc tgattccggg cgttagaagc
2881 gtgctggaaa acttcacccc cagcctcaag agcctggggg tagaggccgt gccgggggtg
2941 ggggcccagt tcgaccgcgc ctaccacgag gccatcgggg ccgtggaggg cgaggagggc
3001 aaggctcatg acgtctacca gcagggttcc aagtacggcg acctgctggt gcgcccggcg
3061 cgggtgtgtg ttggcagcgg cgctaaaccg gaagaggccg aagcctaaaa ccgagcgccg
3121 agagcaacta gcctccggcg ttcggccctc ggccctcagc cttacgtcta acttcggggg
3181 gatgaatatg gcctacaagg actactacaa aattcttggg gttcctaaga acgccagcga
3241 agatgaaatc aaaaaggcct tcaagaagct ggcccgtaa gttaccaccg acgtgaacaa
3301 agagccgggg gccgaggaga aattcaaaag gattaacgag gcctacacgg tgctgtccga
3361 cccggaaaag cgccgctact acgataccta cgggtgcggc cgggctggca cgggctggca
3421 gggccccccc ccggggcgcg gtggttttgg gggttttacc ggcaatgtgg gcgatttttc
3481 cgactttttc caacagcttt ttggcgccg ggggtgtttt ggccgctgg gtagctgtt
3541 cgagcagacc ccaggccggg gtgcgcgcgc ggtggcgggc gacctcgagg ccgagcttcc
3601 cctgagcctc gaggaggcct accgcggcgg agaaaaaacc atctccgttg gcgccgagc
3661 ccttacggtg cgcattcccac cagggtgctg cgagggccag aagatccgcc tggccggcaa
3721 ggggcgcgcc gggggcgacc tgtacctgca cgtcaagctg cagtcccggc cgagatgctg
3781 cctggaaggc gatgacattt acaccgtggt ggaagtaccg gccccattg cgggtgtggg
3841 gggcaagggt cgggtgcaaa ccttcgacgg cccggtggaa atcaccattc ccaggcgaac
3901 ccaggccgga cgcaagctgc gcctggccgg gaagggtctg ccccgcaag acaaaaggcg
3961 gggcgaccag tacgcccagg tgccgggtgac catccccacc aacccagcc ccgaggaaga
4021 gcgcctgtat gcccaactgg ccgagctgat caaggttcag taacgtctgc ttgtaaacta
4081 atagacatga ccccccaaca gcgcgacgac ttgctcaggc tgctcaaaaa ccgcttcgag
4141 caacaccgcg accgcccacc agggctgcgc tgggcccagg ccggcggtga gccggacgtg
4201 cagcccgcga agctggcctc gcttctggaa atggaaaaca ccggcggtga cgaagcccc
4261 gtgggcccgc acccacagac cggcaccttt atttttttcg actgcgcccc cgaaagcccc
4321 aaaggccgcc gcagcctctg ctacgaccag gctgcccgtc tggctagaaa gcagaacagg
4381 cctgcccagc cagccctgga gatggccgc gccatgggca tcgagctttt gaccgaggag
4441 cagtaccagg ccctgcagca actgggcccg tttgacacca agacctcgag ctggctcaaa
4501 acccccaggg ccattcgcaa gctgggtggg gccatctttg gcgaccggcg ctacgaccgc
4561 gtgttcattt accacaacgg ggccgattcc tactacgcgg gctcgagggt tctggtgctg

```

Fig. 4.

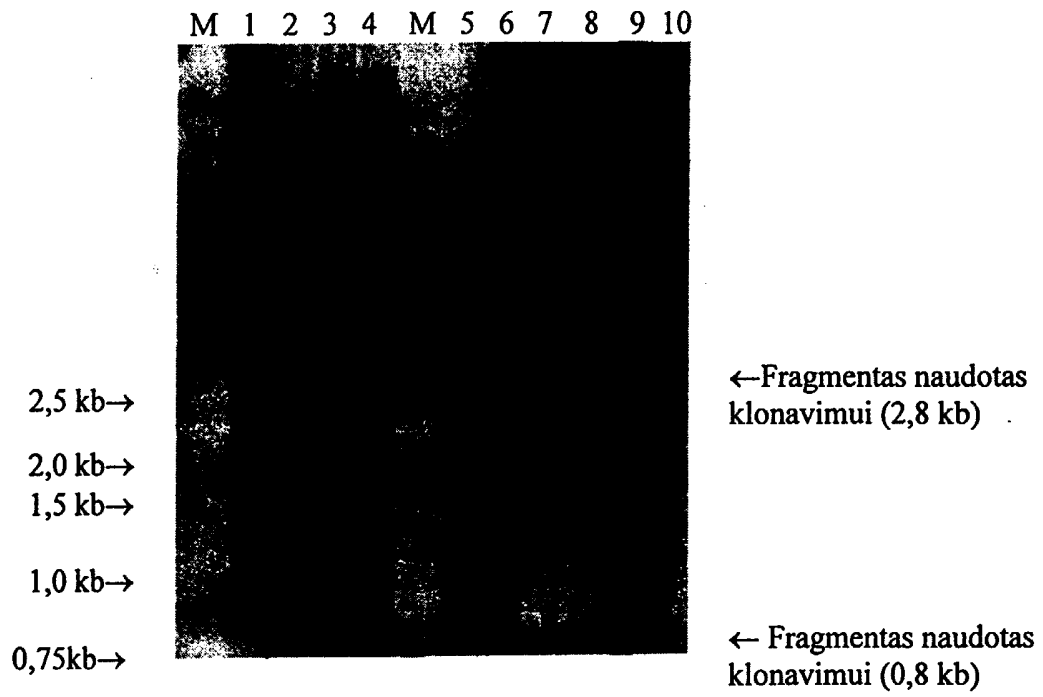


Fig. 5.

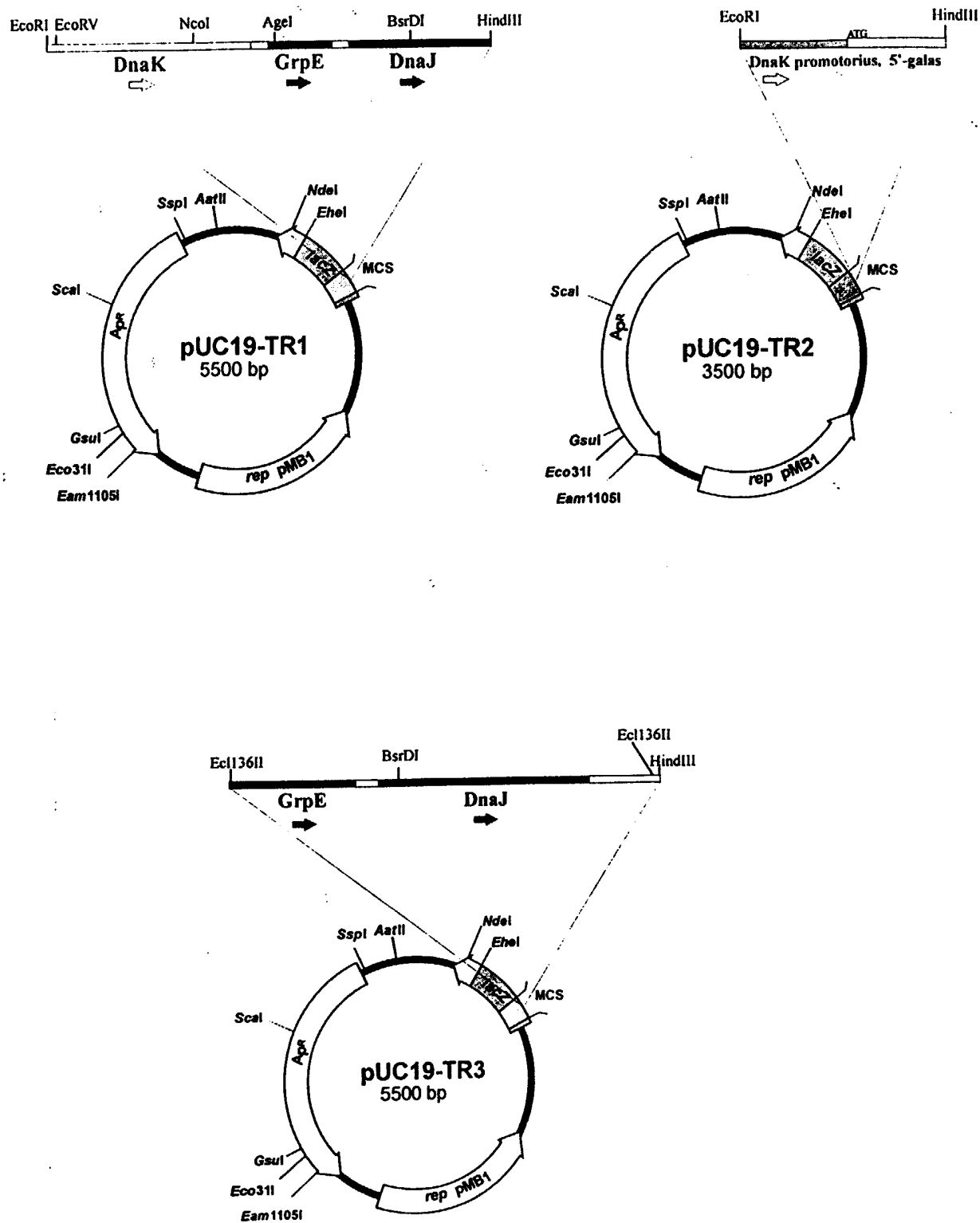


Fig. 6.

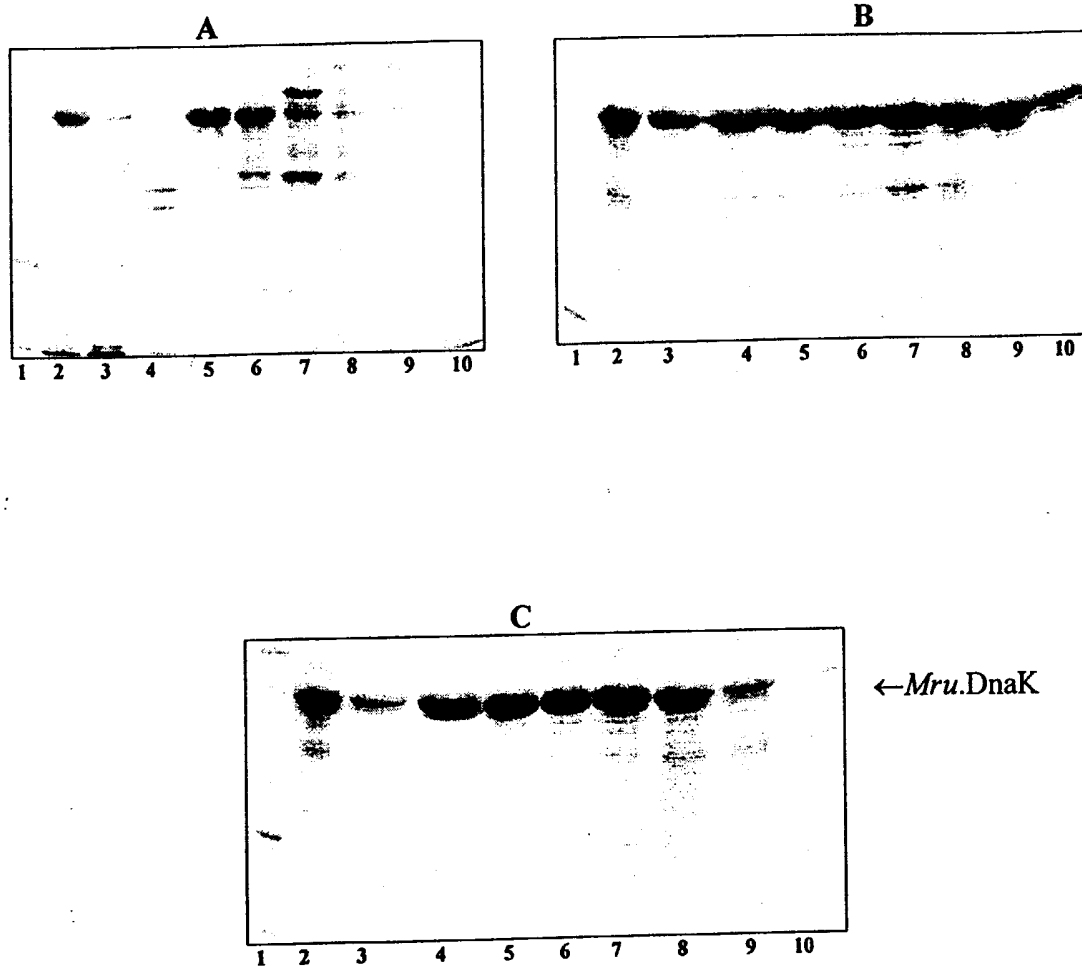


Fig. 7.

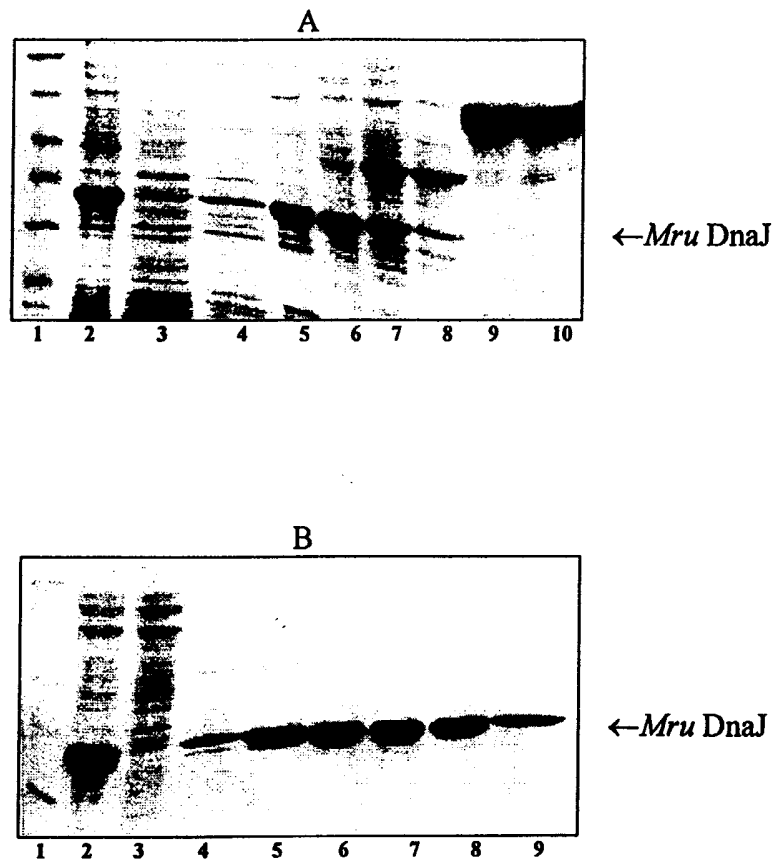


Fig. 8.

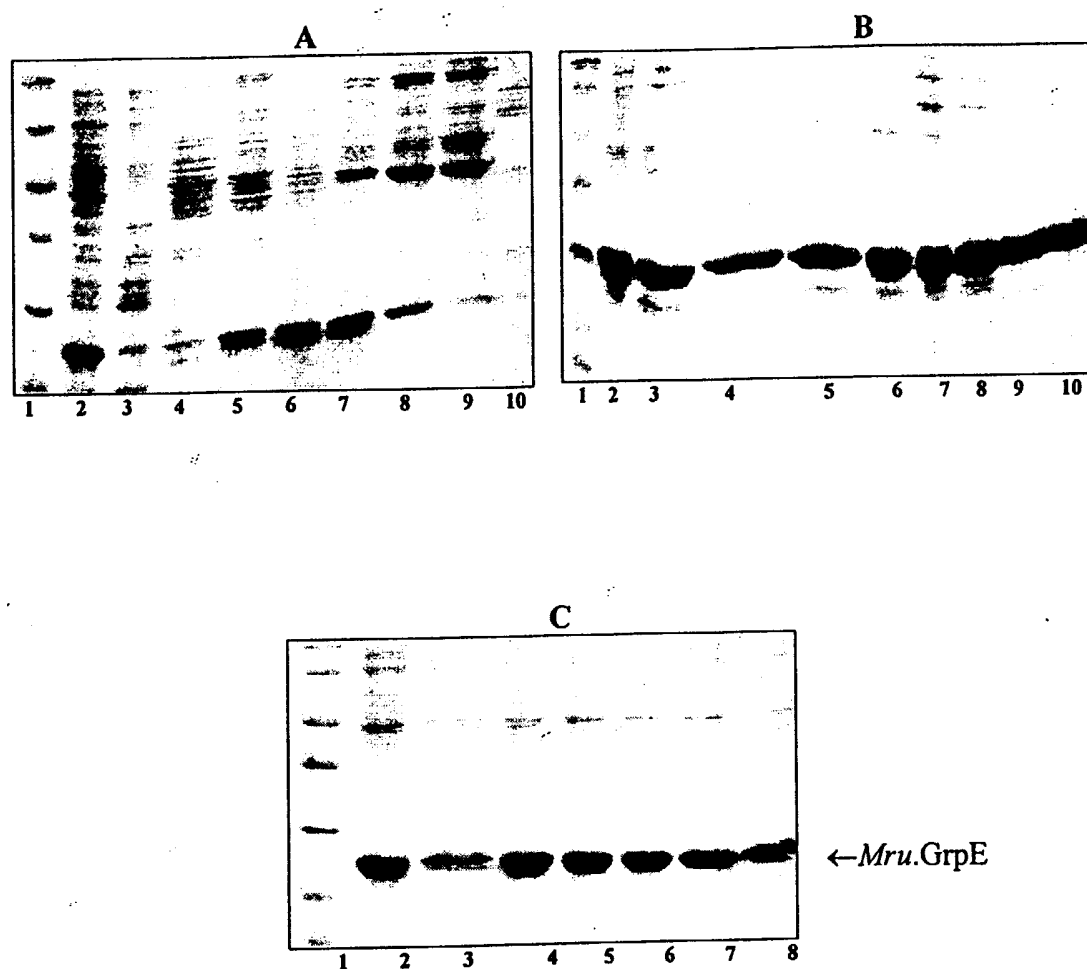


Fig. 9.

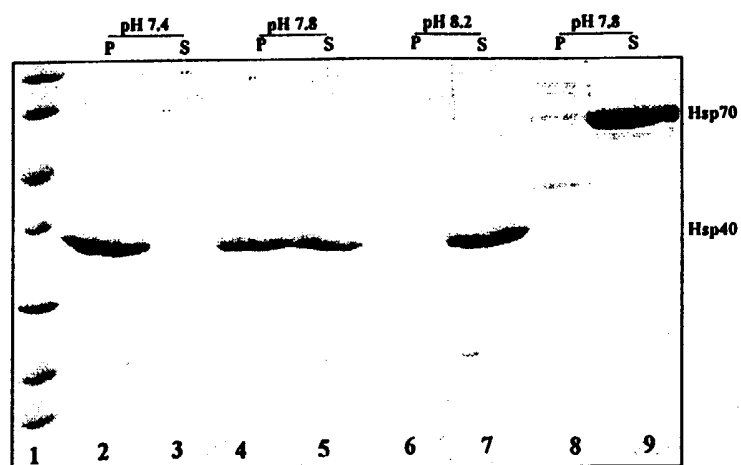


Fig. 10.

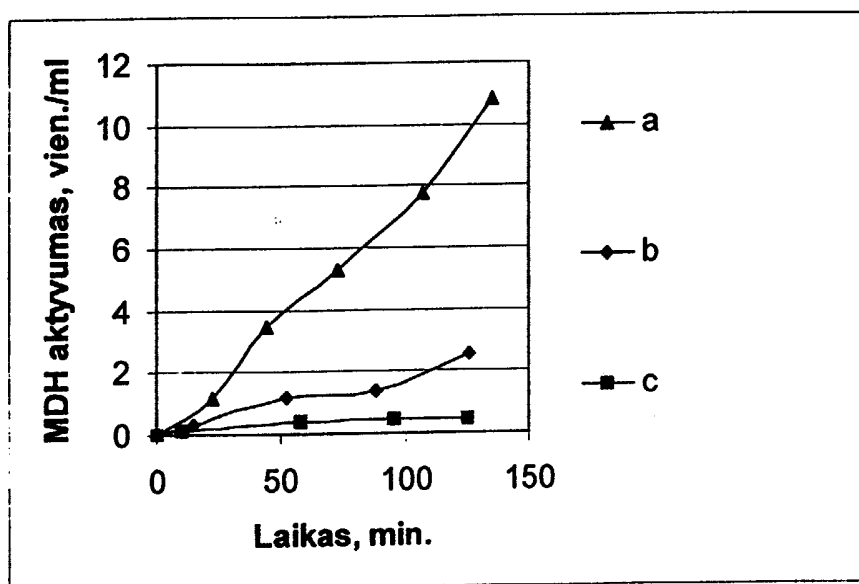


Fig. 11.