

(19)



(10) **LT 2013 069 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2013 069**

(51) Int. Cl. (2014.01): **C12N 15/00**
C12P 21/00

(22) Paraiškos padavimo data: **2013 07 09**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2015 01 26**

(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: —

(71) Pareiškėjas:

VILNIAUS UNIVERSITETAS, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, LT

(72) Išradėjas:

Saulius KLIMAŠAUSKAS, LT
Rasa RAKAUSKAITĖ, LT
Viktoras MASEVIČIUS, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Jurga PETNIŪNAITĖ, AAA Law, J.Jasinskio g. 16A, LT-03163 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Seleno baltymų (SelProt) gavimas

(57) Referatas:

Pritaikius UAG kodono supresiją, vykdomą genetiškai modifikuoto mielių kamieno, pasiūlytas bendras metodas, leidžiantis į bet kurią baltymo poziciją įjungti šviesai jautrią grupę apsaugotą selenocisteiną (Sec). Baltymas, kurio sudėtyje yra selenocisteino liekana(-os), apsaugota fotoreaktyvia nitrobenzilo grupe, yra sintetinamas ir išgryninamas iš mielių ląstelių. Apsauginė grupė pašalinama apšvitinus baltymą (esantį ląstelėse arba išgrynintą) UV šviesa, ir tokiu būdu atkuriant Sec. Pasiūlytas metodas galėtų palengvinti seleno baltymų sintezę ir tuo pačiu išplėsti jų biotechnologinį bei biofarmacinį potencialą.

Selenobaltymų (SelProt) gavimas

Išradimo sritis

Išradimas susijęs su kryptingu retų ir nenatūralių aminorūgščių įjungimu į baltymus, ypač su *in vivo* rekombinantinių baltymų sintezės technologija, paremta UAG kodono supresija genetiškai koduojamomis nenatūraliomis aminorūgštimis.

Išradimo apžvalga

Rekombinantinių baltymų inžinerija ir sintezė ląstelėje yra plačiai išplėtota sritis, skirta biomolekulių struktūros ir funkcijos tyrimams bei praktiniam taikymui medicinoje ir pramonėje. Deja, dažnai yra labai sunku sukurti ir pagaminti baltymą, kuris turėtų pageidaujamą fermentinį aktyvumą ar biologinę funkciją (Brustad, E.M. and Arnold, F.H. (2011) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15(2), 201-210). Selenocisteino (Sec), 21-os aminorūgšties įjungimas į dirbtinius baltymus yra vienas iš būdų, leidžiantis suteikti jiems naujų savybių. Sec yra cisteino (Cys) analogas, turintis seleno atomą vietoje sieros, kas Sec suteikia unikalių fizikocheminių charakteristikų. Palyginus su Cys tiolio grupe, Sec selenolio grupė pasižymi aukštesniu nukleofiliškumu, žemesniu pKa ir žemesniu oksidacijos-redukcijos potencialu. Dėl išskirtinio cheminio reaktyvumo Sec sugeba pakeisti struktūrines ir fermentines baltymo savybes. Pavyzdžiui, baltymų inžinerijoje Sec įjungiamas į katalizinį fermento centrą, kuomet siekiama išplėsti natūraliai susiformavusį fermento katalizinį pajėgumą. (Huang, X. *et al.* (2011) *Chem. Soc. Rev.* 40, 1171-1184). Kita vertus, unikalus Sec cheminis reaktyvumas su elektrofilais ir oksidacijos reagentais yra naudingas selektyviai konjugacijai, žymėjimui ar baltymo dimerizacijos vietų kūrimui (Heras, I.L. *et al.* (2011) *Anal. Bioanal. Chem.* 400(6), 1717-27; Arnér, E. (2010) *Exp. Cell. Res.* 316(8), 1296-303; Johansson, L. *et al.* (2005) *Biochim. Biophys. Acta.* 1726(1), 1-13). Dar daugiau, selenocisteino, savo sudėtyje turinčio vertingų Se izotopų, įjungimas į baltymus yra naudojamas fazės nustatymui daugybinių bangos ilgių anomalios difrakcijos kristalografijoje, pozitronų emisijos tomografijoje PET (^{73}Se), specifiniame žymėjime radionuklidais (^{75}Se) ir didelės raiškos BMR (^{77}Se) tyrimuose (Johansson, L. *et al.* (2005) *Biochim. Biophys. Acta.* 1726(1), 1-13). Ne mažiau reikšminga

selenologijos sritis yra efektyvi gamtinių rekombinantinių selenobaltymų sintezė bakterijų (Arnér, E.S.J. (2002) *Met. Enzymol.* 347, 226-235) arba eukariotų ląstelėse (Liu, H. *et al.* (2012) *Protein Expr Purif.* 84(1), 59-63).

Nepaisant aukšto technologinio potencialo, Sec įjungti į rekombinantinius baltymus nėra paprasta. Dirbtinių selenobaltymų sintezei buvo pasiūlyta visa eilė metodų, tačiau iki šiol nė vienas iš jų neleidžia preciziškai į baltymus įterpti selenocisteiną ir gauti geras produkto išeigas (Johansson, L. *et al.* (2005) *Biochim. Biophys. Acta.* 1726(1), 1-13). Pavyzdžiui, baltymų susiuvimo metodus riboja kietos fazės sintezė, kuri paprastai leidžia susintetinti ne ilgesnius nei 50-ies aminorūgščių peptidus. Jei Sec turi būti įjungtas toliau 50-osios pozicijos, būtina siūti tris peptidinius fragmentus. Kadangi peptidų susiuvimui reikalinga N-galinio Cys liekana, šis metodas baltymo sekoje neišvengiamai sukuria papildomas Cys mutacijas (Muir, T. W. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* 72, 249-289). Kitu atveju, kuomet serino (Ser) liekanos chemiškai paverčiamos į Sec, reakcija vyksta su visais baltymo Ser, todėl ji netinka, kai baltymuose reikia atlikti vienintelį pakeitimą selenocisteinu (Wu, Z.-P., Hilvert, D. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111, 4513-4514). Panaši specifiškumo problema iškyla kada baltymas, savo sudėtyje turintis keletą Cys, yra sintetinamas Cys-auksotrofinio mikroorganizmo, auginamo terpėje su Sec – gaunamas produktas su daugybiniais Sec (Muller, S. *et al.* (1994) *Biochem.* 33, 3404-3412). Rekombinantinių baltymų sintezę bakterijose, vykstant gamtinio UGA kodono supresijai, riboja techniniai sunkumai. Jie atsiranda todėl, kad bakterinių selenobaltymų iRNR šalia UGA kodono yra plaukų segtuko pavidalo Sec įterpimo seka (SECIS). Ši SECIS struktūra, o taip pat joje esantys 4 konservatyvūs nukleotidai yra absoliučiai reikalingi, kad translacijos metu Sec būtų nukreiptas į peptidinę grandinę (Yoshizawa, S., Böck, A. (2009) *Biochim. et Biophys. Acta.* 1790, 1404-1414). Taigi, praktiškai yra beveik neįmanoma rekombinantinėje iRNR sukurti dirbtinę SECIS struktūrą, tuo pačiu metu neįvedant į baltymo seką papildomų mutacijų. Kitaip nei bakterinės translacijos atveju, baltymų raiškos sistemos žinduolių ląstelėse iš esmės tinka kryptingam Sec įjungimui į baltymą be papildomų sekos pakeitimų, nes žinduolių SECIS yra netransliuojamoje 3'UTR srityje. Deja, šios sistemos reikalauja nemažų išlaidų ir neleidžia gauti gerų produkto išeigų (Berry, M.J. *et al.* (1993) *EMBO J.*, 12 (8), 3315-3322). Tas pats pasakytina ir apie *in vitro* baltymų raiškos sistemas, kurias sudaro brangūs komponentai ir kurioms reikia sudėtingais cheminiais metodais paruošiamos tRNR su prijungtu Sec (Kang, T.J., Suga, H. (2008) *Biochem. Cell Biol.* 86, 92-99).

Alternatyvus kryptingo tam tikrų nenatūralių aminorūgščių įterpimo į baltymus metodas yra paremtas genetiškai koduojamų nenatūralių aminorūgščių įjungimu UAG stop kodono vietoje. Ši technologija jau leido labai specifiskai į baltymus įvesti daugiau nei 70 skirtingų aminorūgščių (Liu, C.C. and Schultz, P.G. (2010) *Annu. Rev. Biochem.* 79, 413-444), tačiau kol kas nebuvo pritaikyta Sec įterpimams/pakeitimams atlikti. Nors yra pavykę į histono H3 baltymą įterpti fenilselenocisteiną (Guo, J. *et al.* (2008) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47(34), 6399-6401), nebuvo pasiūlytas metodas, kuris leistų nuo Sec pašalinti apsauginę grupę (Clark, K.M. *et al.* (2009) *Methods Enzymol.* 462, 97-115). Šiuo metodu į įvairius baltymus buvo sėkmingai įterptos aminorūgštys su šviesai jautriomis apsauginėmis grupėmis, kaip antai DMNB-Ser. Nenatūrali aminorūgštis DMNB-Ser *in situ* fotolizės reakcijoje vėliau buvo nesunkiai paversta Ser (Lemke, E.A. *et al.* (2007) *Nat. Chem. Biol.* 3(12), 769-772). Proceso metu mielių ląstelės kotransformuotos plazmide, koduojančia tikslinį baltymą su TAG stop kodonu pasirinktoje geno vietoje bei plazmide *pescTrpLeuRSBH5T252A*, koduojančia ortogonalią UAG stop kodoną supresuojančią tRNR_{CUA} (O-tRNR) ir ortogonalią aminoacil tRNR sintetazę (O-RS), kuri prie O-tRNA prijungia nenatūralią aminorūgštį DMNB-Ser (ir taip pat DMNB-Cys, Young, T.S. *et al.* (2009) *Biochemistry.* 48(12), 2643-2653). Deja, rekombinantinių baltymų kiekiai gauti iš tokių mielių kultūrų buvo gana vidutiniški (Lemke, E.A. *et al.* (2007) *Nat. Chem. Biol.* 3(12), 769-772; Chin, J.W. *et al.* (2003) *Science.* 301(5635), 964-967). Rekombinantinių baltymų išeigos buvo pagerintos optimizavus O-tRNR transkripciją, t.y. suliejus O-tRNR geną su *SNR52* promotoriumi (*pSNR-LeuRS* plazmidė) ir baltymų raišką atlikus mielėse *LWUPF1Δ*, iš kurių pašalintas *UPF1* genas, stabilizuojantis stop kodoną turinčias iRNR (Wang, Q. and Wang, L. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* 130(19), 6066-6067). Nors veiksminga, ši sistema nebuvo panaudota sintetinti baltymams su DMNB-Ser arba DMNB-Cys.

Iki šiol nė viena iš egzistuojančių technologijų nepasiteisino kaip bendras metodas skirtas efektyviai sintetinti rekombinantinius baltymus, pageidaujamoje pozicijoje įvedant Sec liekaną.

Išradimo santrauka

Pirma: išradimas išsprendžia aukščiau išdėstytą problemą, panaudojant bet kurioje norimoje iRNR pozicijoje įvestą UAG kodoną, kuris mielių ląstelėse yra iškoduojamas O-tRNR su prijungta

nenatūralia aminorūgštimi – fotochemine grupe apsaugotu selenocisteinu. Apsauginė grupė, tokia kaip 4,5-dimetoksi-2-nitrobenzilas (DMNB), yra vėliau pašalinama nuo baltymo švitinant jį UV šviesa ir mutacijos vietoje atstatant Sec. Iš principo ši strategija gali būti taikoma Sec įjungti į bet kokio baltymo bet kurią norimą poziciją. Dar daugiau: gyvose ląstelėse fotochemiškai apsaugotas selenobaltymas leistų optiškai kontroliuoti jo vykdomus biologinius procesus. Taigi, šis metodas pateikia naują įrankį baltymų inžinerijai ir konkrečiai – selenologijai.

Antra: Išradimas pateikia naują fotochemiškai apsaugoto selenocisteino junginį (I formulė) bei sintezės schemą skirtą jam gauti.

Trumpas figūrų aprašymas

Fig.1 rodo DMNB-Cys sintezės kelią.

Fig. 2 rodo DMNB-Sec sintezės kelią.

Fig. 3 iliustruoja nuo DMNB-Sec priklausomą funkciškai aktyvaus EGFP baltymo sintezę mielių *S. cerevisiae* ląstelėse.

Fig. 4 iliustruoja fotocheminės DMNB grupės pašalinimą nuo selenocisteino lieknos, EGFP baltymą paveikus UV šviesa (340-390 nm).

Fig. 5 iliustruoja EGFP baltymo dimerų formavimąsi paveikus baltymą UV šviesa ir susidariusių dimerų redukciją pridėjus DTT.

Fig. 6 demonstruoja, kad tiek fotoapsauginės grupės pašalinimas, tiek dimerizacija ir redukuojanti monomerizacija vyksta švelniomis sąlygomis, išsaugant EGFP baltymo funkcinę savybę (fluorescenciją).

Detalus išradimo aprašymas

Visi tekste vartojami techniniai ir moksliniai terminai taikomi ir turi tokią reikšmę, kaip tai įprastai taiko ir supranta asmuo susijęs su išradimo sritimi, nebent apibrėžta kitaip. Terminu „ortogonalus“ vadinama molekulė, kuri funkcionuoja kartu su endogeniniais ląstelės komponentais, tačiau pasižymi mažesniu efektyvumu palyginus su atitinkama molekule, priklausančia ląstelei ar transliacijos sistemai, arba kuri visiškai nefunkcionuoja kartu su vidiniais ląstelės komponentais. tRNR ir aminoacil-tRNR sintetazių kontekste ortogonalumu vadinamas nesugebėjimas

funkcionuoti arba sumažėjęs ortogonalios tRNR efektyvumas funkcionuoti su endogenine tRNR sintetaze, palyginus su tuo, kaip endogeninė tRNR sintetazė funkcionuoja su endogenine tRNR. Ortogonaliai molekulei trūksta funkcijos, kuri yra įprasta ląstelės komplementariai endogeninei molekulei. Terminas „tikslinis kodonas“ taikomas kodonams, kuriuos translacijos proceso metu atpažįsta O-tRNA ir kurių neatpažįsta endogeninės tRNR. Tiksliniais kodonais gali būti stop kodonai, tokie kaip, pvz., UAG, UAA, UGA.

Terminas „translacijos sistema“ taikomas komponentams, kurie į augančią polipeptidinę grandinę įjungia aminorūgštį; šiuos komponentus gali sudaryti, pvz., ribosomos, tRNR, tRNR sintetazės, iRNR ir panašūs. O-tRNA ir O-RS gali būti pridėtos į *in vitro* ar *in vivo* translacijos sistemas arba būti jų dalimi. Išradimo metodais parinktos komponentų grupės veikia ląstelėje. Sistemai priklausanti nenatūrali aminorūgštis gali būti sintetinė aminorūgštis, tokia kaip šviesai jautria grupe apsaugotas selenocisteinas, egzogeniškai pridedamas į augimo terpę.

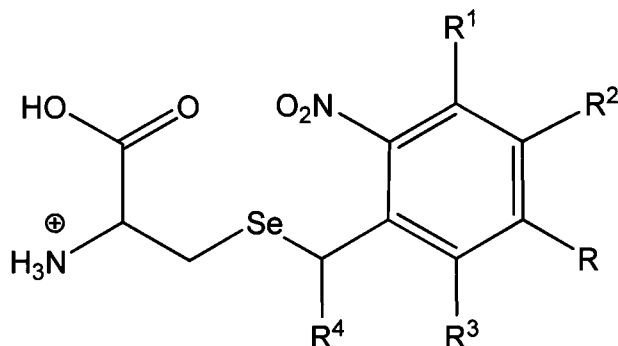
Aptariamas išradimas susijęs su baltymų turinčių nenatūralią aminorūgštį vienoje ar keliuose pasirinktose pozicijose sinteze, taikant translacijos sistemą. Metodas susideda iš:

- a) Translacijos sistemos, laikant, kad ji susideda iš:
 - i) nenatūralios amino rūgšties, kuri yra fotolabiliu bloku apsaugotas selenocisteinas;
 - ii) ortogonalios aminoacil-tRNR sintetazės (O-RS);
 - iii) ortogonalios tRNR (O-tRNR), kurią minėta O-RS aminoacilina fotolabiliu bloku apsaugotu selenocisteinu, pastarajam teikdama pirmenybę prieš natūralias aminorūgštis;
 - iv) nukleorūgšties, kuri koduoja tikslinį baltymą ir turi bent vieną tikslinį kodoną, kuris yra atpažįstamas minėtos O-tRNR;
- b) Minėtos nenatūralios amino rūgšties įtraukimo pasirinktoje pozicijoje tiksliniame baltyme atliekant šio baltymo translaciją (sintezę), kuri vykdoma pasitelkiant minėtą tikslinį kodoną, tuo būdu gaunant tikslinį baltymą turintį nenatūralią aminorūgštį pasirinktoje pozicijoje.

Aprašomas metodas gali būti išplėstas įtraukiant žingsnį c). Šis žingsnis – fotolabilios apsauginės grupės pašalinimas veikiant translacijos sistemą ar išgrynintą baltymą UV spindulių šaltiniu.

Ląstelės šeimininkės, kuriose atliekamos procedūros, pasirenkamos teikiant prerogatyvą bakterijų, mielių arba žinduolių ląstelėms; pirmenybė ypač teikiama mielių ląstelėms. Pirmuoju pasirinkimu iš mielių ląstelių yra *Saccharomyces cerevisiae*.

Toliau išradimas susijęs su fotolabiliu bloku apsaugotu selenocisteinu aprašomu formule I:



kur

R yra H, alkilas arba alkoksi-, karboksimetoksi grupė,

R¹ yra H, alkilas, arilas, alkoksi, hidroksi arba halogenatomai,

R² ir R³ kiekvienas nepriklausomai reiškia H, alkilą, arilą, alkoksi, hidroksi grupę, -CO₂R⁵ arba halogenatomą; kur jeigu R ir R² arba R ir R³ yra alkoksi, R² arba R³ gali sudaryti penkianares, šešianares arba septynianares ciklines struktūras derinyje su R,

R⁴ yra H, metilas, alkilas, -CH₂OR⁵ arba -CO₂R⁵,

R⁵ yra H- arba alkilas.

Pirmenybė teikiama renkantis fotolabiliu bloku apsaugotą selenocisteino darinį - 4,5-dimetoksi-2-nitrobenzilselenocisteinui (DMNB-Sec).

Toliau išradimas susijęs su fotolabiliu bloku apsaugoto selenocisteino aprašomo formule I sinteze, kuri susideda iš šių stadijų: N',N'-apsaugoto selenocistino redukcija, susidariusio junginio reakcija su pasirinktu (1,3,4,5- ir arba alfa- pakeistu) 2-nitrobenzil- halogenidu, sulfonatu, fosfatu arba karboksilatu bei aminogrupės deblokavimo. Selenocistino aminogrupės gali būti apsaugotos *tert*-butoksikarbonil-, karboksibenzil-, aliloksikarbonil-, metoksikarbonil arba etoksikarbonil-apsauginėmis grupėmis.

Fotolabiliu bloku apsaugotas selenocisteinas aprašomas formule I toliau naudojamas šiame išradime aprašomame metode.

Aptariamasis išradimas, skirtas kryptingam Sec įjungimui į baltymus, yra paremtas UAG kodono supresijos technologija, naudojama kai kurioms kitoms nenatūralioms aminorūgštims įjungti į

baltymus. Šiam metodui naudojamos mielių ląstelės, kurios yra transformuotos plazmidėmis, norimoje tikslinio geno pozicijoje turinčiomis genų inžinerijos metodais įvestą TAG stop kodoną. Sistemą sudaro šie pagrindiniai komponentai:

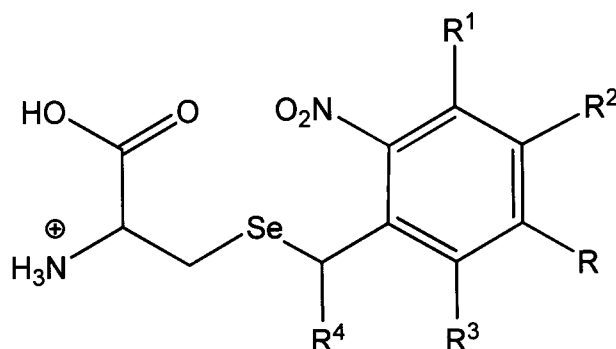
1. mielių padermė LWUPF1Δ, kurioje įvesta *UPF1*-geno delecija;
2. plazmidė pRR6;
3. sintetinė šviesai jautria grupe apsaugota aminorūgštis DMNB-Ser;
4. plazmidė, turinti pageidaujamoje tikslinio geno pozicijoje genų inžinerijos metodu įvestą TAG stop kodoną (pavyzdžiu naudojama pGFP-TAG).

pRR6 plazmidė buvo sukonstruota genų inžinerijos metodais laukinio tipo LeuRS geną iš plazmidės pSNR-LeuRS (Wang, Q. and Wang, L. (2008) J. Am. Chem. Soc. 130(19), 6066-6067) pakeitus mutuotu, specifišku DMNB-Ser, genu LeuRSBH5T252A iš plazmidės pescTrpLeuRSBH5T252A (Lemke, E.A. *et al.* (2007) Nat. Chem. Biol. 3(12), 769-772). DNR nukleotidų seka, reprezentuojanti LeuRSBH5T252A geną, yra pateikta kaip Seka Nr. 1:

```
atgcaagagcaataaccgcccgaagagatagaatccaaagtacagcttcattgggatgagaagcgcacattgaagtaaccgaagacgag
agcaaagagaagtattactgctgtctgggcagccctatccttctggtcgactacacatgggccacgtacgtaactacaccatcggtgacgt
gatcgcccgctaccagcgtatgctgggcaaaaacgtcctgcagccgatcggtgggacgcgtttggtctgcctgcggaaggcgcggcg
tgaaaaacaacaccgctccggcaccgtggacgtacgacaacatcgcttatgaaaaaccagctcaaatgctgggctttggttatgactg
gagccgcgagctggcaacctgtacgcccgaataactaccgttgggaacagaaattctcaccgagctgtataaaaaaggcctggtatataag
aagacttctgcggtcaactggtgtccgaacgaccagaccgtactggcgaacgaacaagttatcgacggctgctgctggcgtgcgatacc
aaagttgaacgtaaaagatcccgagtggtttatcaaaatcactgcttacgtgacgagctgctcaacgatctggataaactggatcactgg
ccagacaccgttaaaacatgcagcgttaactggatcggtcggttcgaaggcgtggagatcaccttcaacgttaacgactatgacaacacgc
tgaccgtttacactaccgcccggacgcgtttatgggtgtacctacgtggcggttagctgcgggtcatccgctggcgcagaaagcggcgga
aaataatcctgaactggcggcctttattgacgaatgccgtaacaccaaagttgccgaagctgaaatggcgacgatggagaaaaaaggcgtc
gatactggccttaagcggttcacccattaacgggcgaagaaattcccgtttgggcagcaaaattcgtattgatggagtacggcacggcg
agttatggcggtaccggggcacgaccagcgcgactacgagtttgctctaatacggcctgaacatcaaacgggtatcctggcagctgac
ggctctgagccagatctttctcagcaagccctgactgaaaaaggcgtgctgttcaactctggcgagttcaacgggtcttgaccatgaagcggc
cttcaacgccatcgccgataaactgactgcgatgggcgttggcgagcgtaaagtgaactaccgcctgcgcgactggggtgtttcccgtag
cgttactggggcgcgcccgatccgatggtgactctagaagacggtagcgaatgccgacccggacgaccagctgccggtgatcctgccg
gaagatgtggaatggacggcattaccagcccgattaaagcagatccggagtgggcgaaaactaccgttaacgggtatgccagcactgcgt
gaaaccgacactttcgacacctttatggagtctcctgggtgtatgcgcgtacacttgcccgcagtacaaagaaggtatgctggattccgaa
gcggtaactactggctgccgggtggatcgggtattggtgattgaacacgccattatgttctgctctacttccgttctccacaaactgatg
cgtgatgcaggcatggtgaactctgacgaaccagcgaacagttgctgtgtaggggtatggtgctggcagatgccttctactatgttgccga
aaacggcgaacgtaactgggtttccccggttgatgctatcggtgaacgtgacgagaaaggccgtatcgtgaaagcgaagatgcggcagg
ccatgaactggtttataccggcatgagcaaaatgtccaagtcgaagaacaacgggtatcgacccgcaggtgatggtgaacgttacggcgcg
gacaccgttcgtctgtttatgatgttcttccggctgatatgactctgaatggcaggaatccgggtggaaggggctaaccgcttctga
aacgtgtctgaaactggtttacgagcacacagcaaaaggtgatgttgcggcactgaacgttgatgcgctgactgaaaatcagaaagcgt
gcgtcgcgatgtgcataaacgatcgctaaagtaccgatgatatcgccgctgcagacctcaacaccgcaattgcggcgattatggag
```

ctgatgaacaaactggcgaaagcaccaaccgatggcgagcaggatcgcgctctgatgcaggaagcactgctggccgtgtccgtatgctt
 aaccggttcacccgcacatctgcttcacgctgtggcaggaactgaaaggcgaaggcgatatcgacaacgcgccgtggccggttgctgac
 gaaaaagcgatggtggaagactccacgctggtcgtggtgcaggttaacggtaaagtccgtgccaaaatcaccgttccggtggacgcaacg
 gaagaacaggttcgcgaacgtgctggccaggaacatctggtagcaaaatatcttgatggcggttactgtacgtaaagtgattacgtaccaggt
 aaactcctcaatctggtcgttgctaa

Šviesai jautria grupė apsaugotas selenocisteinas DMNB-Sec buvo chemiškai susintetintas iš selenocistino kaip trifluoracetato druska, panaudojus naujai sukurtą procedūrą. Tokia pati procedūra gali būti panaudota sintetinti kitiems, šviesai jautria grupė apsaugotiems, selenocisteinams, kurių formulė Nr. 1:



kur:

R yra H, alkilas arba alkoksi, karboksimetoksi grupė,

R¹ yra H, alkilas, arilas, alkoksi, hidroksi arba halogenatomai,

R² ir R³ kiekvienas nepriklausomai reiškia H, alkilą, arilą, alkoksi, hidroksi grupę, -CO₂R⁵ arba halogenatomą; kur jeigu R ir R² arba R ir R³ yra alkoksidarinius, R² arba R³ gali sudaryti penkianares, šešianares arba septynianares ciklines struktūras derinyjesu R,

R⁴ yra H, metilas, alkilas, -CH₂OR⁵ arba -CO₂R⁵,

R⁵ yra H- arba alkilas.

Kaip pavyzdį mes naudojome plazmidę pGFP-TAG (Wang, Q. and Wang, L. (2008) J. Am. Chem. Soc. 130(19), 6066-6067), kuri koduoja EGFP baltymą su TAG mutacija nereikšmingoje Tyr39 pozicijoje.

Baltymo sintezei mielių LWUPF1Δ ląstelės buvo transformuotos pRR6 ir pGFP-TAG plazmidžių mišiniu, ir atrinkti transformantai auginami terpėje su 4 mM DMNB-Sec. Viso ilgio aktyvus

baltymas susiformuoja tik tuomet, kai nenatūrali aminorūgštis yra įjungiamą į baltymo grandinę iškodavus UAG kodoną. EGFP baltymas su prilietu 6-His oligopeptidu ir kurio Tyr39 pakeistas nenatūralia aminorūgštimi DMNB-Sec buvo išgrynintas iš mielių ląstelių imobilizuotų metalų afininės chromatografijos būdu. Izoliuoto EGFP baltymo su DMNB-Sec identiškumas patvirtintas masių spektrometrijos metodu. Seleno-EGFP baltymo išeiga sudarė 1 mg/l.

Pateikiamas metodas Sec apsaugoti naudoja šviesai jautrią DMNB grupę, tokiu būdu apsaugodamas chemiškai aktyvią selenolio grupę nuo cheminių reakcijų su biopolimerais, metabolitais ir kitomis molekulėmis (tame tarpe aktyviais deguonies dariniais), esančiais ląstelės aplinkoje. Pasibaigus baltymo sintezei fotoapsauginė grupė gali būti pašalinta *in vivo*, apšvitinus UV šviesa ląsteles producentes, arba *in vitro* - apšvitinus išgryninto baltymo tirpalą.

Anksčiau buvo parodyta, kad O-RS, optimizuota nenatūraliai aminorūgščiai DMNB-Ser, taip pat gali veikti su DNMB-Cys (Young, T.S. *et al.* (2009) Biochemistry. 48(12), 2643-2653). Mūsų nuostabai pasirodė, kad ši O-RS taip pat yra aktyvi su DMNB-Sec. Nors DMNB apsaugotas Sec nuo DMNB-Ser ir DNMB-Cys skiriasi tik vienu atomu, iš karto nebuvo akivaizdu, kad tokį nenatūralios aminorūgšties pakeitimą gerai toleruos mutantinė ortogonalė LeuRS. Viena abejonės priežasčių yra ta, kad palyginti su sieros ir deguonies, seleno van der Waals spindulys yra žymiai ilgesnis, dėl to mažiau tikėtina, kad didesnė aminorūgštis DMNB-Sec gerai atitiks fermento kišenę. Antra, dėl žymiai didesnio cheminio seleno reaktyvumo su elektrofilais ir oksidantais, DMNB-Sec gali greitai suirti augimo terpėje arba mielių ląstelės viduje. Trečia, anksčiau nebuvo nagrinėtas 4 mM DNMB-Sec toksiškumas mielių ląstelėms, nors žinoma, kad joms yra toksiškos žymiai mažesnės kai kurių Se junginių koncentracijos (pvz., 0,25 mM SeMet, Kitajima, T. *et al.* (2012) J. Biol. Chem. 287(13), 10032-8). Ketvirta, nors tiolių chemija ir turi panašumų su seleno chemija, mes nustatėme, kad efektyviai DNMB-Sec sintezei iš selenocistino visiškai netiko analogiškas DNMB-Cys sintezės iš cistino kelias, todėl jame reikėjo atlikti svarbių pakeitimų. Galiausiai, anksčiau nebuvo aprašytas fotocheminis DNMB grupės pašalinimas nuo Sec arba kitų Se junginių, ir nebuvo aišku, ar ši reakcija vyktų panašiai, kaip stebėta su Ser (Lemke, E.A. *et al.* (2007) Nat. Chem. Biol. 3(12), 769-772) ar Cys (Rathert, P. *et al.*, (2007) Chembiochem. 8(2), 202-207).

Aprašytas metodas gali būti naudojamas bet kokių rekombinantinių selenobaltymų sintezei mielėse. Žinomų selenobaltymų sąrašas yra pateiktas <http://www.selenodb.org/> interneto svetainėje.

Aprašytasis metodas gali būti naudojamas bet kurių kitų dirbtinai modifikuotų baltymų sintezei, kuriuose viena ar keletas Sec liekanų būtų įterptos pageidaujamose baltymo pozicijose. Įterpti Sec toliau gali būti naudojami kryptingam baltymo žymėjimui ar cheminei modifikacijai. Sec liekanos yra veikiamos tais pačiais reagentais, skirtais Cys modifikavimui, tačiau švelniai rūgštiniame pH ($\text{pH} < 7$) ši reakcija tampa selektyvi Sec. Įjungto Sec liekanos taip pat gali būti panaudotos šviesa kontroliuojamam funkcinų baltymų dimerų formavimui, kaip kad parodyta su EGFP.

Aprašytasis metodas gali būti taikomas bet kokių dirbtinai modifikuotų fermentų sintezei, kuriuose vienas ar keletas Sec įterpiami pasirinktose aktyvaus centro arba netoli jo esančiose pozicijose. Tokia pozicija dažnai yra fermento katalizinio Cys ar Ser liekanos, pakeičiamos Sec. Technologija praktiškai galėtų būti taikoma šioms fermentų klasėms: tiolių oksidoreduktazėms, (EC 1.8.3.2), baltymų tirozino fosfatazėms (EC 3.1.3.48), Cys peptidazėms (EC 3.4.22) (MEROPS interneto duomenų bazė: [//merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/family_index?type=P#C](http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/family_index?type=P#C)), vienos anglies pirimidino-5 transferazėms (tokioms kaip deoksicitidilato 5-hidroksimetiltransferazės (EC 2.1.2.8), timidilato sintetazės (EC 2.1.1.45) ir daugybė DNR citozino-5 metiltransferazių (EC 2.1.1.37)), RNR citozino-5 metiltransferazėms (sąrašas paskelbtas <http://modomics.genesilico.pl/reactions/C:m5C/>) ir RNR uracil-5 metiltransferazėms (sąrašas paskelbtas <http://modomics.genesilico.pl/reactions/U:m5U/>) (Bujnicki J. *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res.* 32(8), 2453-63). Taip pat buvo parodyta, kad DNR citozino-5 metiltransferazės (pvz., M.HhaI, M.SssI, M.HpaII, M.AluI, M2.Eco31I) ir jų dirbtiniai variantai katalizuoja nuo sekos priklausančias nekanonines reakcijas, kaip kad didesnių nei metilo grupių pernašą nuo sintetinių kofaktorių analogų (Lukinavičius G. *et al.* (2012) *Nucleic Acids Res.*, 40(22), 11594–11602; US2013130922A1), formaldehido pridėjimą arba pašalinimą 5- citozino pozicijoje (Liutkevičiūtė Z. *et al.*, (2009) *Nat. Chem. Biol.* 5, 400-402) ir alifatinių tiolių bei selenolių pridėjimą DNR 5-hidroksimetilcitozino liekanose (Liutkevičiūtė Z. *et al.*, (2011) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 2090-2093). Šios naujos reakcijos gali būti naudojamos genomines DNR epigenetinių modifikacijų,

tipiškai vykstančių CpG dinukleotido sekose, analizei. Pakeitus katalizinį Cys selenocisteinu būtų įmanoma sustiprinti šių fermentų katalizės jėgą ypač praktiškai svarbiose nekanoninėse reakcijose.

Pavyzdžiai

1 pavyzdys. Fotoapsaugotos aminorūgšties sintezė

DMNB-Cys sintezė (Fig. 1)

Cistino dimetilo esteris 1

Cistino suspensija (5 g, 20,8 mmol) metanolyje (100 ml) buvo atšaldyta iki $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, ir į reakcijos kolbą pridėta tionilchlorido (3,75 ml, 19,24 mmol). Palaukta, kol reakcijos mišinys pasieks kambario temperatūrą, tada 6 valandas virinta. Metanolis išgarintas sumažintame slėgyje, o nuosėdos ištirpintos metanolyje. Pridėjus dietilo eterio, produktas iškrito baltų kristalų nuosėdomis. Gauto produkto hidrochlorido druskos pavidale išeiga buvo 69 g (94%).

N,N'-bis(*tert*-butoksikarbonil)cistino dimetilo esteris 2

Reakcija atlikta pagal literatūroje aprašytą procedūrą (Busnel *et al.*, (2005) Bioorg. Med. Chem. 13(7), 2373–80).

N-(*tert*-butoksikarbonil)cisteino metilo esteris 3

Reakcija atlikta pagal literatūroje aprašytą procedūrą (Busnel *et al.*, (2005)).

N-(*tert*-butoksikarbonil)-*S*-(4,5-dimetoksi-2-nitrobenzil)cisteino metilo esteris 4

N-(*tert*-butoksikarbonil)cisteino metilo esterio suspensija (1,94 g, 8,25 mmol), 4,5-dimetoksi-2-nitrobenzilbromidas (2,40 g, 8,73 mmol) ir natrio karbonatas (1,51 g, 14,25 mmol) tetrahidrofurane (THF) (50 ml) virinta 60 valandų, tada reakcija nutraukta įpylus 50 ml vandens. THF išgarintas sumažintame slėgyje, ir produktas ekstrahuotas DCM. DCM išgarintas, o tai, kas liko, išgryninta chromatografijos kolonėle ($\text{C}_6\text{H}_6:\text{CHCl}_3$ 1:1, $R_f = 0,23$). Aprašyta procedūra leido gauti 2,16 g (61%) tikslinio produkto.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,47$ (9H, s, $3\times\text{CH}_3$), 2,91 (1H, dd $J = 14, 5,6\text{Hz}$, SCH_AH_B), 2,98 (1H, dd $J = 14, 5,6\text{Hz}$, SCH_AH_B), 3,78 (3H, s, OCH_3), 3,97 (3H, s, ArOCH_3), 4,03 (3H, s, ArOCH_3), 4,09 (1H, d $J = 13,6\text{Hz}$, $\text{BnCH}_A\text{H}_B\text{S}$), 4,17 (1H, d $J = 13,6\text{Hz}$, $\text{BnCH}_A\text{H}_B\text{S}$), 4,56 (1H, brm, CH), 5,35 (1H, d $J = 7,6\text{Hz}$, NH), 6,94 (1H, s, ArH), 7,69 (1H, s, ArH). ^{13}C NMR (100 Mz, CDCl_3): $\delta = 28,3, 34,4, 34,5, 52,7, 53,4, 56,4, 56,5, 80,3, 108,8, 113,4, 128,7, 140,5, 148,0, 153,0$,

155,2, 174,4. El. analizė $C_{18}H_{26}N_2O_8S$: apsk. - C, 50,22; H, 6,09; N, 6,51; S, 7,45. rasta - C, 50,39; H, 6,25; N, 6,53; S, 7,22. HRMS ($C_{18}H_{26}N_2O_8S$): m/z $[M+Na]^+$, apsk.: 453,1302; rasta: 453,1310.

S-(4,5-dimetoksi-2-nitrobenzil)cisteino hidrochloridas **5**

Į *N*-(*tert*-butoksikarbonil)-*S*-(4,5-dimetoksi-2-nitrobenzil)cisteino metilo esterio (0,95 g, 2,21 mmol) suspensiją acetono (25 ml) ir vandens (25 ml) mišinyje buvo pridėta koncentruotos druskos rūgšties (0,92 ml, 11,36 mmol). Reakcijos mišinys maišytas 3 dienas 60 °C (smėlio vonia) temperatūroje, tirpikliai išgarinti sumažintame slėgyje, liekana praplauta acetonu. Aprašyta procedūra leido gauti 0,74 g (95 %) tikslinio produkto.

1H NMR (400 MHz, DMSO- D_6): δ = 2,95 (1H, dd J = 14,6, 6,4 Hz, SCH_AH_B), 3,01 (1H, dd J = 14,6, 4,8, SCH_AH_B), 3,86 (3H, s, OCH_3), 3,93 (3H, s, OCH_3), 4,12 (1H, d J = 13,6 Hz, $BnCH_AH_BS$), 4,15-4,25 (2H, m, $BnCH_AH_BS$ + CH), 7,35 (1H, s, ArH), 7,70 (1H, s, ArH), 8,62 (3H, brs, NH_3), 14,04 (1H, brs, OH). ^{13}C NMR (100 Mz, $CDCl_3$): δ = 31,3, 33,7, 52,3, 56,5, 57,0, 109,4, 114,9, 129,3, 140,1, 148,0, 153,2, 170,0. HRMS ($C_{12}H_{16}N_2O_6S$): m/z $[M+H]^+$, apsk.: 317,0802; rasta: 317,0805.

DMNB-Sec sintezė (Fig. 2)

N,N'-bis(*tert*-butoksikarbonil)selenocistinas **1**

3,8 ml selenocistino tirpalas (0,625 g, 1,88 mmol) šarminiame vandenyje (1M NaOH) buvo sumaišytas su 1,8 ml di-*tert*-butildikarbonato (1,633 g, 7,49 mmol) dioksane tirpalu. Reakcijos mišinys maišytas 24 val. kambario temperatūroje, sukonzentruotas sumažintame slėgyje bei praplautas etilo acetatu. Vandens fazė buvo parūgštinta druskos rūgštimi, ir produktas ekstrahuotas etilo acetatu. Organinis sluoksnis praplautas sūrymu bei išdžiovintas bevandeniu natrio sulfatu. Etilo acetatas buvo pašalintas sumažintu slėgiu. Nuosėdos buvo perkristalintos iš benzeno ir sudarė 0,755 g (75,5 %) tikslinio produkto.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1,45 (9H, s, $3 \times CH_3$), 3,21 (1H, dd J = 12,6, 4,8 Hz, $SeCH_AH_B$), 3,46 (1H, dd J = 12,6, 4,8 Hz, $SeCH_AH_B$), 4,61 (1H, brm, CH), 5,37 (1H, brs, NH).

N-(*tert*-butoksikarbonil)-*Se*-(4,5-dimetoksi-2-nitrobenzil)selenocisteinas **2**

N,N'-bis(*tert*-butoksikarbonil)selenocistino (0,755 g, 1,41 mmol) ir 4,5-dimetoksi-2-nitrobenzilbromido (1,170 g, 4,24 mmol) mišinys etanolyje (30 ml) buvo atvėsintas iki 0 °C ir į reakcijos kolbą įpilta natrio borhidrido (0,161 g, 4,26 mmol). Reakcijos mišinys 75 min. maišytas

kambario temperatūroje, po to reakcija sustabdyta vandeniu (70 ml). Į reakcijos mišinį pridėta etilo acetato ir parūgštinta druskos rūgštimi. Organinis sluoksnis atskirtas ir išdžiovintas virš natrio sulfato. Tirpikliai išgarinti sumažintu slėgiu, nuosėdos išgrynintos chromatografijos kolonėle (CHCl_3 , $R_f = 0,26$). Aprašyta procedūra leido gauti 1,133 g (86,5 %) tikslinio produkto.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,46$ (9H, s, $3 \times \text{CH}_3$), 3,03 (1H, dd $J = 13,6, 4,8\text{Hz}$, SeCH_AH_B), 3,09 (1H, dd $J = 13,6, 4,8\text{Hz}$, SeCH_AH_B), 3,95 (3H, s, OCH_3), 4,01 (3H, s, OCH_3), 4,11 (1H, d $J = 11,6\text{Hz}$, $\text{BnCH}_A\text{H}_B\text{Se}$), 4,21 (1H, d $J = 11,6\text{Hz}$, $\text{BnCH}_A\text{H}_B\text{Se}$), 4,62 (1H, brm, CH), 5,46 (1H, brm, NH), 6,83 (1H, s, ArH), 7,69 (1H, s, ArH). ^{13}C NMR (100 Mz, CDCl_3): $\delta = 25,9$ (2 persidengiantys signalai aiškiai matomi iš HSQC duomenų), 28,3, 53,6, 56,4, 56,6, 80,7, 108,9, 113,2, 130,6, 139,7, 147,8, 153,2, 155,6, 174,9. El. analizė $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8\text{Se}$: apsk - C, 44,07; H, 5,22. rasta: C, 44,13; H, 5,53. HRMS ($\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8\text{Se}$): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$, apsk.: 487,0591; rasta: 487,0589.

Se-(4,5-dimetoksi-2-nitrobenzil)selenocisteino trifluoroacetatas **3**

N-(*tert*-butoksikarbonil)-*Se*-(4,5-dimetoksi-2-nitrobenzil)selenocisteinas (1,13 g, 2,44 mmol) buvo ištirpintas TFA (10 ml) ir 15 min. maišytas kambario temperatūroje. Išgaravus TFA, kietos nuosėdos praplautos DCM, nufiltruotos ir išdžiovintos. Produktas ištirpintas metanolyje, netirpūs nešvarumai nufiltruoti. Sumažintame slėgyje išgarinus metanolį, gauti 0,9 g (77 %) tikslinio produkto.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 2,95$ -3,11 (2H, m, SeCH_2), 3,87 (3H, s, OCH_3), 3,92 (3H, s, OCH_3), 4,14 (1H, d $J = 12\text{Hz}$, $\text{BnCH}_A\text{H}_B\text{Se}$), 4,17-4,25 (2H, m, $\text{BnCH}_A\text{H}_B\text{Se} + \text{CH}$), 7,15 (1H, s, ArH), 7,70 (1H, s, ArH), 8,44 (3H, brs, NH_3). ^{13}C NMR (75 Mz, CDCl_3): $\delta = 23,4, 26,0, 53,1, 56,7, 57,0, 109,5, 114,5, 131,2, 139,8, 148,2, 153,6, 170,4$. HRMS ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{Se}$): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$, apsk.: 365,0247; rasta: 365,0255.

2 pavyzdys. Kryptingas šviesai jautria grupe apsaugoto Sec įjungimas į mielių ląstelėse sintetinus baltymus

2 pavyzdys rodo, kad, naudojant aprašytą baltymų raiškos sistemą mielėse, funkciškai aktyviam baltymui susintetinti reikalingos kartu veikiančios molekulės: O-tRNR, O-RS ir DMNB-Cys arba DMNB-Sec. Mielių ląstelės buvo vienu metu transformuotos dviem plazmidėmis (pGFP-TAG ir pRR6) arba atskiromis plazmidėmis, o atrinkti transformantai 24 h 30 °C temperatūroje auginti

selektyvioje terpėje be (1 stulpelis) arba su (2 ir 3 stulpeliai) pridėta nenatūralia aminorūgštimi. Ląstelės surinktos centrifugavimu, praplautos ir resuspenduotos vandenyje. Nuo DMNB-Sec priklausančios funkcionalaus EGFP baltymo sintezės efektyvumas buvo stebėtas gyvose ląstelėse matuojant EGFP fluorescenciją (3 figūra). Fluorescencijos matavimai atlikti 0,1 ml ląstelių suspensijos pavyzdžiuose trimis pakartojimais, naudojant Synergy H4 (BioTek Instruments, Inc.) prietaisą. Kiekvieno mėginio fluorescencijos vertės buvo pakoreguotos pagal jo OD₅₉₅ absorbcijos vertes. Plazmidė pGFP-TAG koduoja EGFP baltymą, kurio funkciškai neutralioje Tyr39 pozicijoje įvestas TAG stop kodonas. pRR6 plazmidė kuoduoja TAG stop kodoną supresuojančią O-tRNR ir mutantinę ortogonalią LeuRS. Ląstelės, augdamos be nenatūralių aminorūgščių su DMNB apsaugine grupe, daugiausia sintetina ne viso ilgio nefluorescuojantį EGFP (1 stulpelis). Funkciškai aktyvus EGFP baltymas (fluorescuojantis) sintetinas tik tuomet, kai TAG kodonas iškoduojamas jį supresuojančios O-tRNA, užkrautos nenatūralia aminorūgštimi DMNB-Cys (2 stulpelis) arba DMNB-Sec (3 stulpelis).

1 stulpelis. Didesnė nei foninio lygio EGFP fluorescencija ląstelėse, augintose be nenatūralių aminorūgščių, atitinka nežymų viso ilgio EGFP baltymą, kuris, greičiausiai, sintetinas UAG kodono vietoje įjungiant leucinu užkrautas O-tRNR.

2 stulpelis. Ląstelės, augdamos 4 mM DMNB-Cys terpėje, fluorescuoja 6 kartus labiau, palyginti su 1 stulpelio verte. Tai reiškia, kad transliacijos metu DMNB-Cys yra prijungiama prie O-tRNA, kurios pagalba toliau įjunginama į baltymą UAG kodono vietoje.

3 stulpelis. Ląstelės, augdamos 4 mM DMNB-Sec terpėje, fluorescuoja panašiai kaip ląstelės, augdamos 4 mM DMNB-Cys terpėje (2 stulpelis). Tai reiškia, kad transliacijos metu DMNB-Sec yra prijungiama prie O-tRNA, kurios pagalba toliau įjunginama į baltymą UAG kodono vietoje.

4 stulpelis. Ląstelės, transformuotos tik pGFP-TAG plazmide, sintetina nedidelį funkciškai aktyvaus EGFP kiekį, kas atitinka ląstelės transliacijos aparato daromas UAG kodono supresijos klaidas.

5 stulpelis. Fluorescencijos fonas ląstelėse be reporterinės EGFP plazmidės.

6 stulpelis. Milių autofluorescencijos fonas netransformuotose ląstelėse.

7 stulpelis. Nefluorescuojantis 4 mM DMNB-Cys tirpalas.

8 stulpelis. Nefluorescuojantis 4 mM DMNB-Sec tirpalas.

Šie duomenys atitinka mielių ląstelėse vykstantį kryptingą šviesai jautria grupe apsaugoto Sec įjungimą į EGFP.

Šviesa indukuotas apsauginės DMNB grupės nuskėlimas nuo selenobaltymo (Fig. 4)

Fotocheminės reakcijos metu nuo selenobaltymo, turinčio fotoapsaugotą Sec liekaną, nuskeliama šviesai jautri DMNB grupė, ir tokiu būdu baltymo sekoje atkuriamas Sec. Fig. 4 demonstruoja fotolizinio apsauginės grupės pašalinimo eigą: reakcijoje dalyvauja baltymo sekoje esanti DMNB-Sec liekana. Su 6-His oligopeptidu sulietas EGFP baltymas, kurio sekoje Tyr39 pozicijoje įjungta DMNB-Sec nenatūrali aminorūgštis, buvo išgrynintas iš mielių ląstelių panaudojant standartinę IMAC procedūrą. Baltymo tirpalas (0,2 mg/ml PBS buferyje) apšvitintas UV šviesa, skleidžiama Olympus AX70 mikroskopo per 340-390 nm sužadavimo filtrą. Pažymėtais laiko momentais 20 µl pavyzdžiai buvo paimami ESI-MS analizei, ir EGFP produktai buvo kiekybiškai įvertinti remiantis masės spektrogramomis. Apsauginė DMNB grupė efektyviai pašalinta per 40-60 min, kas rodo, kad aprašytasis metodas gali būti praktiškai pritaikytas selenobaltymų sintezei.

3 pavyzdys. Šviesa kontroliuojama grįžtamoji baltymų dimerizacija

Chemiškai grįžtama rekombinantinių selenobaltymų dimerizacija (Fig. 5)

Fig. 5 rodo (SecEGFP)₂ dimerų formavimąsi po 20 min trukusios DMNB-SecEGFP baltymo apšvitos UV spinduliais. Jis taip pat iliustruoja susidariusių dimerų redukciją DTT, ko pasekoje susiformuoja SecEGFP baltymas. Nepriklausomai nuo pridėto 50 mM DTT, 0 min laiko taške baltymo tirpale buvo tik šviesai jautria grupe apsaugotas DMNB-SecEGFP (apskaičiuota masė: 28936 Da). Apšvitinus baltymą UV šviesa, po 20 min susidarė nauja monomerinė forma SecEGFP (apskaičiuota masė: 28741 Da) bei dimerinis produktas (SecEGFP)₂ (apskaičiuota masė: 57480 Da). Baltymo dimerai buvo visiškai redukuoti pridėjus 50 mM DTT ir suformavo monomerinius SecEGFP. Sutinkamai su ESI-MS matavimais, labiausiai tikėtina, kad esant švelniai oksiduojančioms sąlygoms (oro deguonies aplinkoje), dimerizacija vyksta susidarant Se-Se ryšiui tarp įterptų Sec liekanų, kuris yra lengvai išardomas DTT.

Funkciškai aktyvaus selenobaltymo dimerizacija (Fig. 6)

Selenobaltymo preparatai (0,167 mg/ml PBS buferyje) 20 min švitinti analogiškai kaip ESI-MS analizei, po to pridėta DTT iki 50 mM ir sumaišyta su SDS-PAGE preparatų buferiu (Thermo

Fisher). Nekaitinti pavyzdžiai išfrakcionuoti 12 % poliakrilamido gelyje. Gelio fluorescencija vizualizuota FLA-5100 (Fujifilm, Japonija) skaneriu. Fluorescuojantys (SecEGFP)₂ dimerai efektyviai susiformavo po 20 min DMNB-SecEGFP baltymo apšvitos UV šviesa, kurie, paveikti 50 mM DTT, pavirto fluorescuojančiais monomerais. Šis eksperimentas iliustruoja, kad tiek fotolizinis apsauginės grupės pašalinimas, tiek dimerizacija oksiduojančioje aplinkoje bei redukcinė monomerizacija gali vykti švelniomis sąlygomis, tokiu būdu išsaugant baltymo funkciją (fluorescenciją).

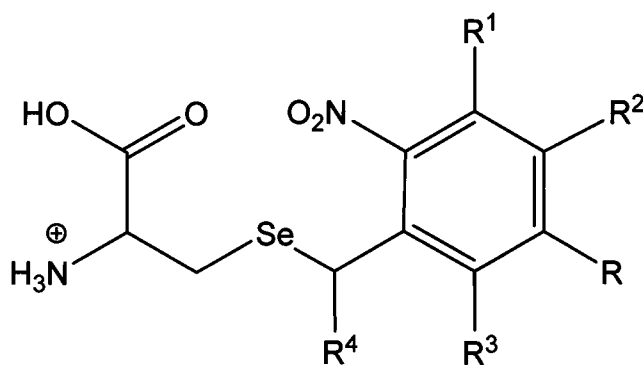
Šis pavyzdys rodo, kad tolesnis šviesa apsaugoto Sec utilizavimas gali būti naudingas tais atvejais, kada norima šviesa kontroliuoti baltymų dimerizaciją.

Išradimo apibrėžtis

1. Baltymo, apimančio nenatūralią aminorūgštį vienoje arba daugiau parinktų padėčių, gavimo būdas transliacijos sistemoje, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad būdas apima:

- (a) paruošimą transliacijos sistemos, apimančios:
 - (i) nenatūralią aminorūgštį, kuri yra fotochemiškai apsaugotas selenocisteinas;
 - (ii) ortogonalią aminoacil-tRNR sintetazę (O-RS);
 - (iii) ortogonalią tRNR (O-tRNR), kur minėta O-RS pirmenybiškai aminoacilina minėtą O-tRNR su minėtu fotochemiškai apsaugotu selenocisteinu; ir
 - (iv) nukleorūgštį, koduojančią minėtą baltymą, kur minėta nukleorūgštis apima bent vieną tikslinį kodoną, kuris yra atpažįstamas O-tRNR; ir
- (b) įvedimą minėtos nenatūralios aminorūgšties į pasirinktą padėtį minėtame baltyme šio baltymo transliacijos metu, kaip atsaką į minėtą tikslinį kodoną, taip gaunant minėtą baltymą, apimantį minėtą nenatūralią aminorūgštį pasirinktoje padėtyje.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad fotochemiškai apsaugotas selenocisteinas apima formulę I:



kur

R yra H, alkilas arba alkoksi, karboksimetoksi grupė,

R¹ yra H, alkilas, arilas, alkoksi, hidroksi arba halogenatomas,

R² ir R³ kiekvienas nepriklausomai reiškia H, alkilą, arilą, alkoksi, hidroksi grupę, -CO₂R⁵ arba halogenatomą; kur jeigu R ir R² arba R ir R³ yra alkoksi grupė, R² arba R³ gali sudaryti penkianarę, šešianarę arba septynianarę ciklinę struktūrą derinyje su R,

R^4 yra H, metilas, alkilas, $-\text{CH}_2\text{OR}^5$ arba $-\text{CO}_2\text{R}^5$,

R^5 yra H arba alkilas.

3. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad fotochemiškai apsaugotas selenocisteinas yra 4,5-dimetoksi-2-nitrobenzilseleno cisteinas.

4. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta transliacijos sistema apima polinukleotidą, koduojantį minėtą O-tRNA, sulietą su SNR52 promotoriumi.

5. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tikslinis kodonas, atpažįstamas minėta O-tRNA yra UAG beprasmis kodonas.

6. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta nukleorūgštis apima bent vieną TAG beprasmį kodoną.

7. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta transliacijos sistema apima nukleorūgštį, kuri koduoja mutuotą ortogonalų LeuRS.

8. Būdas pagal bet kurį ankstesnį punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta transliacijos sistema apima ląstelę, apimančią minėtą nenatūralią aminorūgštį, minėtą O-RS ir minėtą O-tRNA.

9. Būdas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta ląstelė šeimininkė yra bakterinė, mielių arba žinduolio ląstelė šeimininkė.

10. Būdas pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta ląstelė šeimininkė yra mielių ląstelė šeimininkė.

11. Būdas pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta mielių ląstelė šeimininkė yra *Saccharomyces cerevisiae* ląstelė šeimininkė.

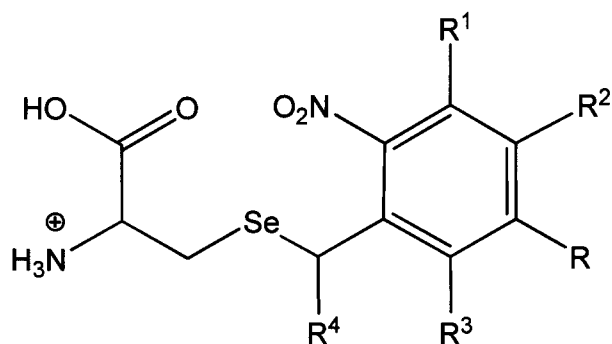
12. Būdas pagal 8–11 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta ląstelė šeimininkė dar apima UPF1 geno eliminavimą arba deleciją.

13. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas būdas dar apima fotochemiškai apsaugotas grupės pašalinimo, eksponuojant transliacijos sistemą arba išgrynintą baltymo tirpalą UV šviesoje, (c) pakopą.

14. Būdas pagal 1-13 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas baltymas yra dar naudojamas šviesa kontroliuojamai baltymo dimerizacijai.

15. Būdas pagal 1-14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas baltymas yra dar naudojamas selektyviai konjugacijai, kryptingam žymėjimui arba kitoms cheminėms modifikacijoms.

16. Fotochemiškai apsaugotas selenocisteinas, kurio formulė I:



kur

R yra H, alkilas arba alkoksi, karboksimetoksi grupė,

R¹ yra H, alkilas, arilas, alkoksi, hidroksi arba halogenatomas,

R² ir R³ kiekvienas nepriklausomai reiškia H, alkilą, arilą, alkoksi, hidroksi grupę, CO₂R⁵ arba halogenatomą; kur jeigu R ir R² arba R ir R³ yra alkoksi grupė, R² arba R³ gali sudaryti penkianarę, šešianarę arba septynianarę ciklinę struktūrą derinyje su R,

R⁴ yra H, metilas, alkilas, CH₂OR⁵ arba CO₂R⁵,

R⁵ yra H arba alkilas.

17. Selenocisteino pagal 16 punktą gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima pakopas: N,N'-blokuoto selenocisteino redukavimą ir reagavimą su junginiu, parinktu iš atitinkamai pakeisto (1,3,4,5 ir/arba alfa padėtyse) 2-nitrobenzilhalogenido, sulfonato, fosfato arba karboksilato, po to sekančiu amino grupių apsaugos pašalinimu.

18. Būdas pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad selenocistinas yra blokuotas grupė, parinkta iš butoksikarbonilo, karboksibenzilo, aliloksikarbonilo, metoksi arba etoksikarbonilo grupės.

19. Fotochemiškai apsaugotas selenocisteinas pagal 16 punktą, kur junginys yra panaudojamas būde pagal 1 punktą.

20. Baltymas, gautas būdu pagal 1-15 punktą.

21. Baltymas pagal 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas baltymas yra EGFP.

22. Baltymas pagal 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad kataliziniu arba funkciniu požiūriu svarbūs Cys arba Ser yra pakeisti Sec.

23. Būdo pagal 1 punktą panaudojimas natūralių rekombinantinių selenobaltymų gavimui.

24. Būdo pagal 1 punktą panaudojimas gavimui dirbtinai modifikuotų baltymų, kuriuose viena arba keletas Sec liekanų yra įterptos norimose padėtyse.

25. Būdo pagal 24 punktą panaudojimas, kur viena arba keletas Sec liekanų yra įterptos pasirinktose padėtyse aktyviame centre arba netoli jo.

26. Būdo pagal 25 punktą panaudojimas, kur Sec pakeičia katalizinį Cys arba Ser minėtose pasirinktose padėtyse.

27. Būdo pagal 26 punktą panaudojimas, kur minėtas pakeitimas yra atliekamas fermente, parinktame iš grupės tiolių oksidoreduktazių, baltymo tirozinfosfatazių, Cys peptidazių ir vienos anglies pirimidin-5-transferazių.

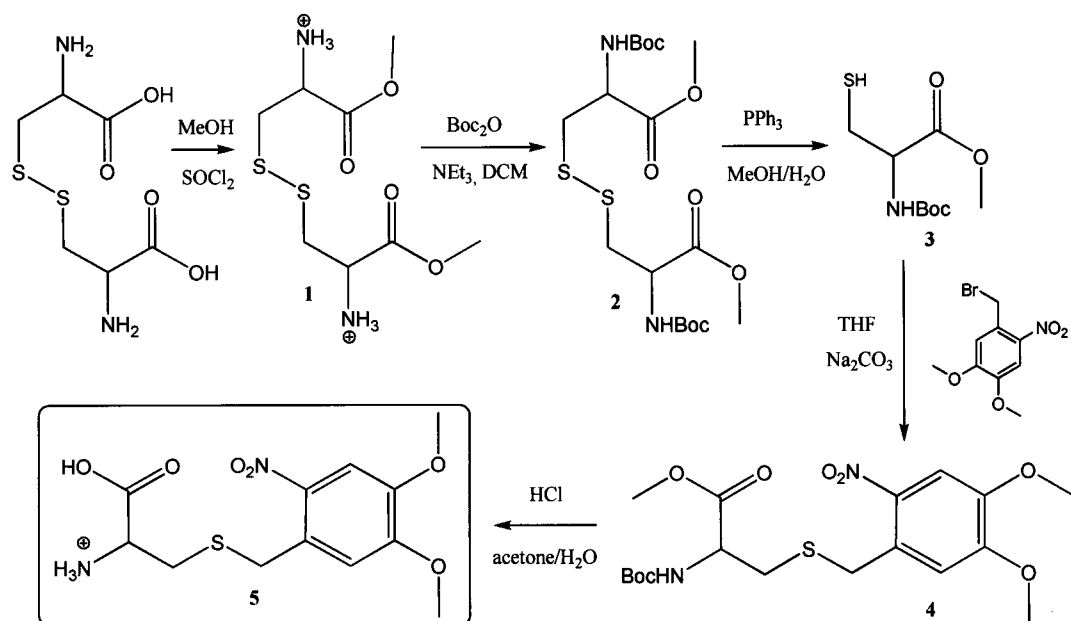


Fig. 1

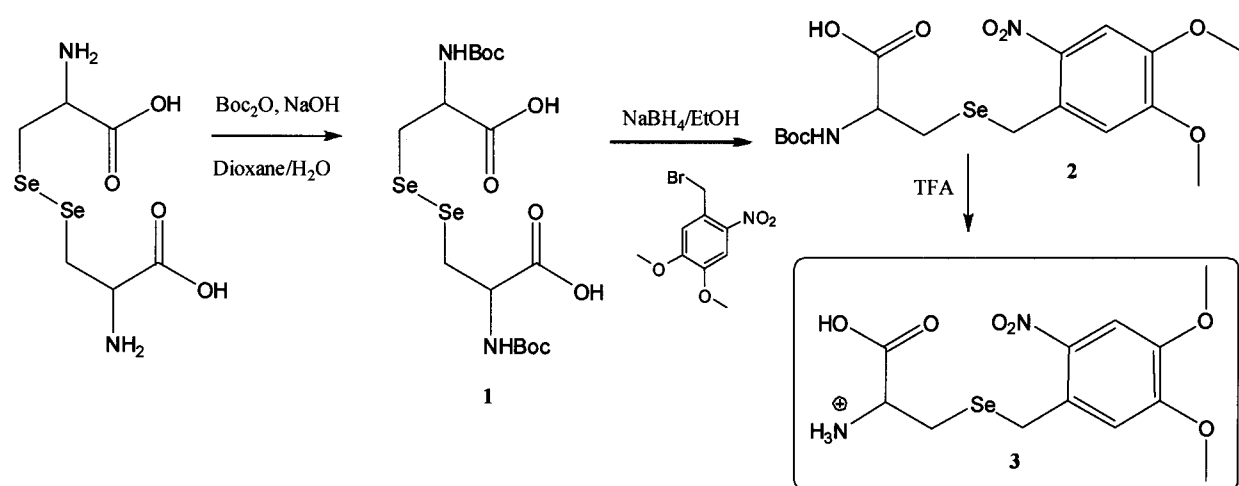


Fig. 2

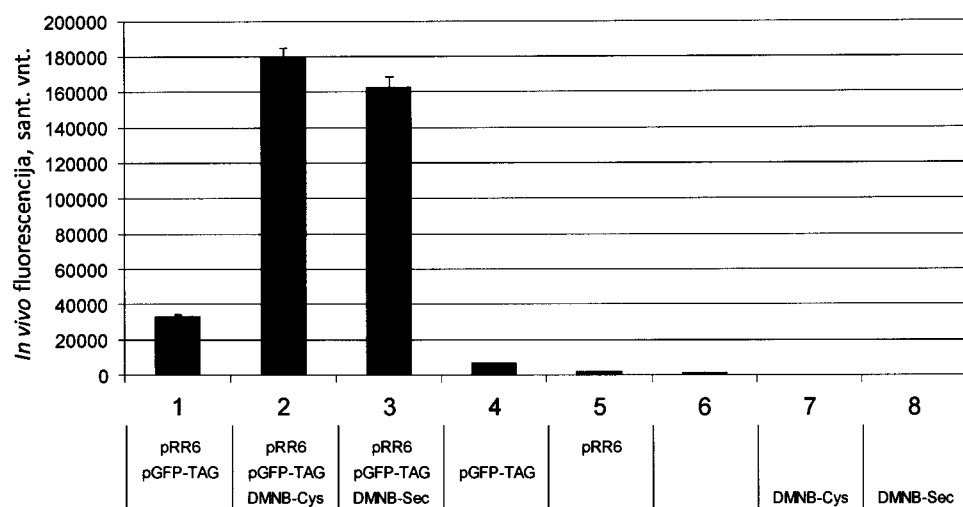


Fig. 3

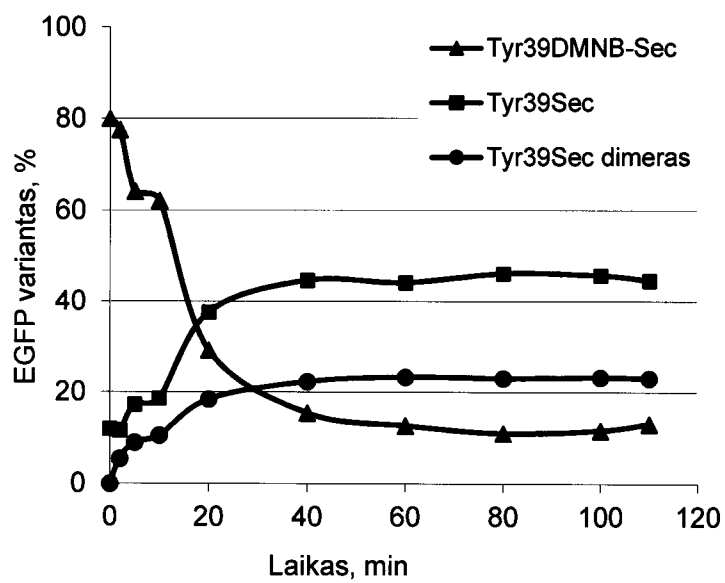


Fig. 4

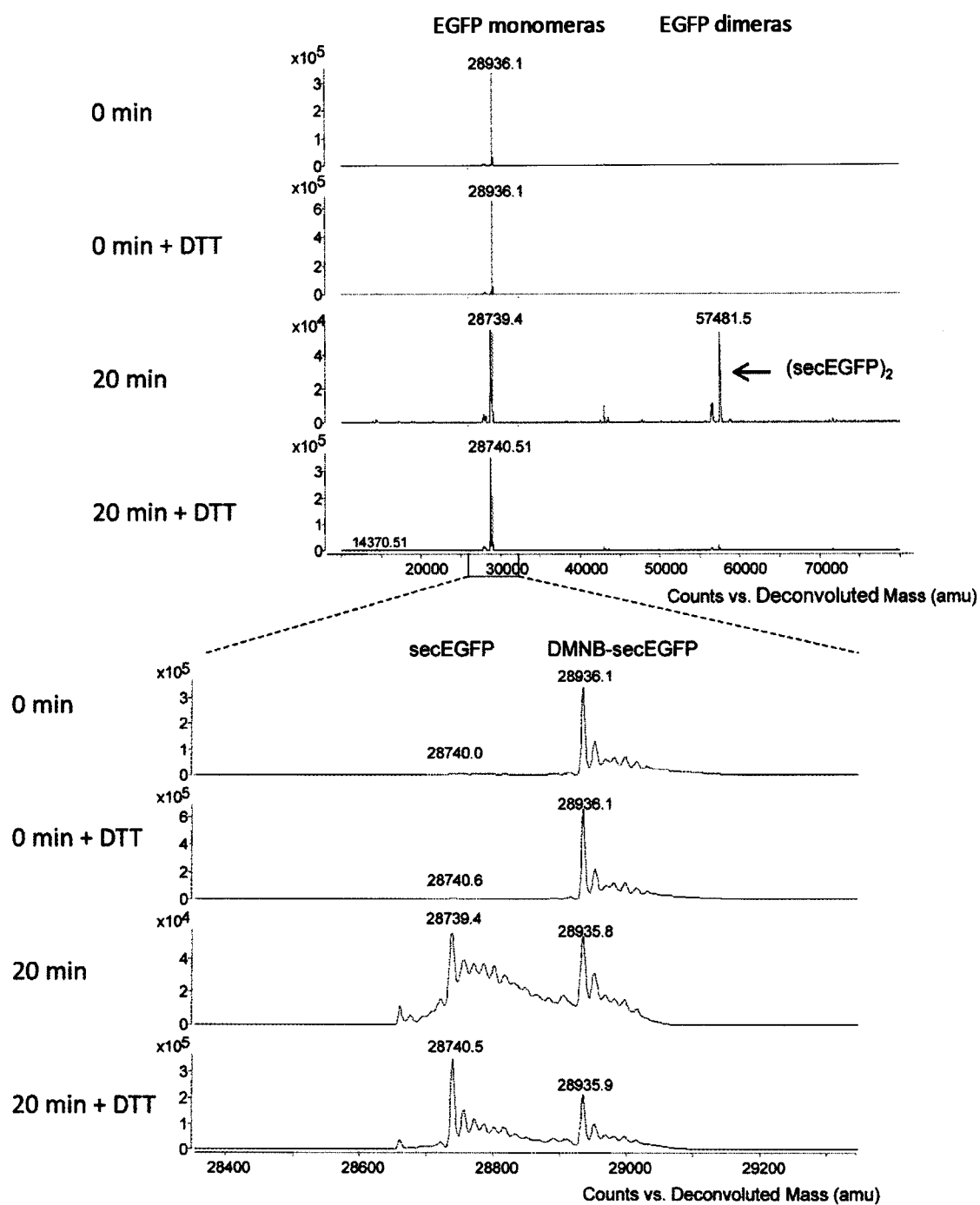
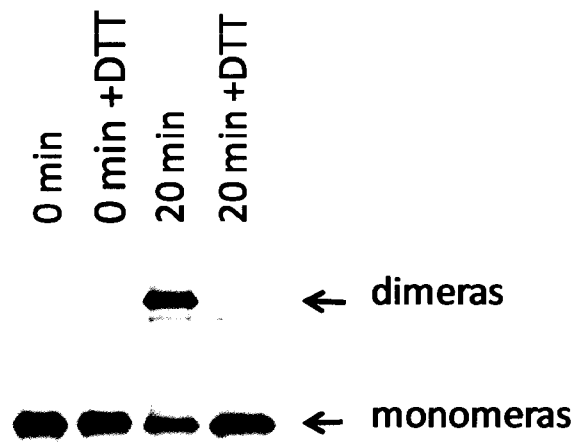


Fig. 5

**Fig. 6**