

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Jenni Katri Pedor

**Bifunktsionaalsed streptavidiini teisendid:
disain ja ekspressioon *E. coli*'s**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad

prof. Ants Kurg, *Ph.D*

Meelis Kolmer, *Ph.D*

TARTU 2016

Sisukord

SISUKORD	2
INFOLEHT	4
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Streptavidiin.....	6
1.2 Biotiin.....	8
1.3 Streptavidiin-biotiin tehnoloogia rakendused	9
1.4 Bakteriorodopsiin	10
1.5 Penetratiin	11
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	13
2.1 Töö eesmärgid	13
2.2 Materjal ja meetodika.....	13
2.2.1 Plasmiidid	13
2.2.2 Bakteritüved	13
2.2.3 Antibiootikumid	13
2.2.5 Konstruktide disainimine.....	13
2.2.6 Oligonuleotiidsed praimerid	14
2.2.7 PCR (polümeraasi ahelreaktsioon)	15
2.2.8 DNA kloonimine.....	16
2.2.9 Valkude ekspressiooni optimeerimine	17
2.2.10 Rekombinantse valgu ekspressioon bakterirakus.....	18
2.2.11 Rekombinantsete valkude analüüs.....	18
2.3 Tulemused ja arutelu	20
2.3.1 Konstruktide disain	20
2.3.2 Valkude ekspressiooni optimeerimine ja valkude ekspressioon	22
2.3.3 Valkude puhastamine	23

2.3.4 Elektroforeetilise liikuvuse nihke analüüs.....	25
KOKKUVÕTE	28
SUMMARY	29
TÄNUAVALDUSED	30
KASUTATUD KIRJANDUS.....	31
LISAD.....	35

Infoleht

Bifunktsionaalsed streptavidiini teisendid: disain ja ekspressioon *E. coli*'s

Käesolevas bakalaureusetöös disainiti ja toodeti rekombinatseid valke, mis võimaldavad kinnitada märgistatud bioloogilisi märklaudmolekule nii raku membraani kui tuuma ja tsütoplasmasse. Märklaudmolekulide sidumiseks kasutati streptavidiini teiseid: tetrameere moodustavat streptavidiini ja kimäärset monomeerset streptavidiini. Raku membraani külge kinnituvaks domeeniks valiti bakteriorodopsiini modifitseeritud C-heeliks ning rekombinantse valgu lokaliseerimiseks raku tuuma ja tsütoplasmasse valiti penetratiin. *E. coli*'s ekspresseerisid C-heeliksist ja kimäärsest monomeersest streptavidiinist koosnev rekombinantne valk ning penetratiinist ja streptavidiinist koosnev rekombinantne valk. Penetratiinist ja streptavidiinist koosnev rekombinantne valk moodustas tetrameere ja sidus biotiini.

T490 Biotehnoloogia

Märksõnad: streptavidiin; biotiin; penetratiin; bakteriorodopsiin

Bifunctional streptavidin's derivatives: design and expression in *E. coli*

The aim of this study was to design and produce recombinant proteins with two functional domains. One domain would bind labelled macromolecules and the other would target the protein to specific cellular compartments. A derivative of wild type streptavidin and an artificial chimeric streptavidin monomer, were used as a binding domains.

Bacteriorhodopsin's modified C-helix was used to anchor the protein into cell membrane. A cell penetrating peptide penetratin was used for protein localization to cytoplasm and nucleus. Recombinant proteins penetratin-streptavidin and C-helix-monomeric streptavidin were successfully expressed in *E. coli*. Recombinant protein penetratin-streptavidin formed tetramers and was able to bind biotin.

T490 Biotechnology

Key words: streptavidin; biotin; penetratin; bacteriorhodopsin

Sissejuhatus

Tänapäeval kasutatakse immunohistokeemilisi analüüse laialdaselt nii teaduses kui ka kliinilises diagnostikas. Immunohistokeemiliste analüüside üheks väljundiks on erinevate makromolekulide asukoha kindlakstegemine rakkudes ja kudedes.

Vaatamata antud analüüside ulatuslikule kasutusele puuduvad universaalsed standardid nende tõlgendamiseks ja kvantifitseerimiseks. Seetõttu on eri aegadel ja eri laborites saadud tulemuste võrreldavus raskendatud. Eriti suuri probleeme võib see tekitada kliinilises diagnostikas, kus ravi sõltub tihti immunohistokeemilise analüüsi tulemusest.

Immunohistokeemiliste analüüside usaldusväärsuse tõstmise ja tulemuste võrreldavaks muutmise üheks võimaluseks on välja töötada kvantifitseeritavad standardid.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli disainida ja toota rekombinantseid valke, mis *in vitro* seonduksid rakkudega ja suudaksid universaalselt ning tugeva spetsiifikaga siduda märgistatud bioloogilisi märklaudmolekule. Sooviti, et disainitud rekombinantsete valkude kinnitumine raku pinnale või sisenemine ja paiknemine raku sees oleksid võimaluse korral kontrollitavad.

Käesolev bakalaureusetöö on kirjutatud Tartu Ülikooli bioloogia õppekava raames, spetsialiseerudes molekulaar- ja rakubioloogia valdkonnale. Kõik töös teostatud eksperimentaalsed katsed viidi läbi ettevõttes Estigen OÜ või Estigen America LLC.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Streptavidiin

Streptavidiin on ~ 56 kDa suurune valk, mida sekreteerib *Streptomyces avidinii* (Dundas *et al.*, 2013). Streptavidiin kuulub avidiinide/streptavidiinide perekonda. Streptavidiin on kana munavalgest leitud avidiini struktuurne ja funktsionaalne analoog. Looduslikus peremehes lõigatakse streptavidiinil sekreteerimise käigus ära N-terminusest signaalpeptiid (UniProt: P22629). Antud valk paistab teiste valkude seast välja oma erakordse omadusega siduda väga kõrge afiinsusega väikest vitamiini biotiin ($K_d \approx 10^{-14} - 10^{-16}$ M) (Määttä, 2010). Lisaks sellele on streptavidiin ka suhteliselt termostabiilne, peab hästi vastu denaturantidele, kõrgetele ja madalatele pH väärtustele ning mõningatele proteolüütilistele ensüümidele. Tänu nendele omadustele saab streptavidiini kasutada väga paljudes erinevates rakendustes (Dundas *et al.*, 2013). Streptavidiini biofunktsioon ei ole teada, kuid arvatakse, et see takistab soovimatute mikroorganismide kasvu, sidudes keskkonnast kasvuks vajaliku biotiini (Määttä, 2010).

Streptavidiini 3D struktuur tehti kindlaks 1980ndate lõpul (Hendrickson *et al.*, 1989; Weber *et al.*, 1989). Streptavidiin on tetrameerne valk, mis moodustub neljast identsest β -tunnist, mis omakorda koosnevad kaheksast anti-paralleelsest β -lehest ja neid ühendavatest aasadest (Hendrickson *et al.*, 1989). Biotiini seondumiskohad asuvad iga β -tünni ühes otsas, seega saab iga streptavidiini molekuliga seonduda 4 biotiini molekuli (Green, 1975). Streptavidiini ja biotiini vaheline side on üks tugevaim teadaolev mittekovalentne looduses esinev side valguga ja ligandi vahel (Green, 1975). Tugeva seondumise biotiiniga tagab mitu erinevat faktorit. Esiteks biotiini seondumiskohas paiknevad hüdrofiilsed aminohapped, mille abil moodustatakse vesiniksidemed ligandi ja valguga vahel (Weber *et al.*, 1989). Teiseks toimuvad pärast biotiini seondumist streptavidiini tertsiaalses ja kvaternaarses struktuuris muutused, näiteks toimub ligandi seondumisel streptavidiini tihedam kokku pakkimine (Williams *et al.*, 2003).

Biotiini seondumiskoha moodustumisel osalevad ka naaber alaühikud, kus koostööd teevad esimene ja teine ning kolmas ja neljas alaühik (alaühikute numbrid vastavalt artiklist Livnah *et al.*, 1993). Seetõttu võib streptavidiini struktuurilt käsitleda kui kahest erinevast funktsionaalsest dimeerist koosnevat dimeeri (Laitinen *et al.*, 2006).

Streptavidiini teisendid. Teaduslikust huvist ja uute rakenduste väljatöötamiseks on valmistatud palju erinevaid streptavidiini teisendeid (Laitinen *et al.*, 2006). Seda on võimaldanud streptavidiini omadus taluda ulatuslikke mutatsioone kaotamata oma funktsionaalsust (Dundas *et al.*, 2013). Streptavidiini teisendeid võib jagada järgnevalt:

biotiini seondumiskohta mutandid, alaühikute vaheliste liideste mutatsioonid, topoloogilised modifikatsioonid ja streptavidiiniga rekombinantsete valkude moodustamine (Sano *et al.*, 1998).

Biotiini seondumiskohta mutandid. Tekitades mutatsioone biotiini seondumiskohta on tulemuseks mutandid, mis omavad biotiini suhtes väiksemat afiinsust või seondumisreaktsioon on pöörduv (Wilchek ja Bayer, 1999). Nõrgem seondumine on saavutatav ka kasutades biotiini derivaate, nt pH sõltuv interaktsioon 2-iminobiotiiniga (Orr, 1981). Sellist omadust saab ära kasutada märgistatud ühendite puhastamisel (Laitinen *et al.*, 2006).

Alaühikute vaheliste liideste mutatsioonid. Alaühikute vaheliste liideste mutatsioonide abil on disainitud streptavidiinist nii monomeerseid kui dimeerseid vorme ning loodud ka stabiilsema kvaternaarse struktuuriga streptavidiine. Mono- ja dimeerseid vorme saab näiteks kasutada valkude puhastamisel. Stabiilsem streptavidiin leiab kasutust ekstreemset stabiilsust vajavates rakendustes (Laitinen *et al.*, 2006).

Topoloogilised modifikatsioonid. Topoloogiliste modifikatsioonide korral säilib valgu 3D struktuur sarnase kujuga. Sel viisil on võimalik disainida streptavidiin, mis omab väiksemat afiinsust biotiini suhtes, ning siduda streptavidiiniga erinevaid peptiide ja omavahel erinevate omadustega alaüksusi (Laitinen *et al.*, 2006).

Streptavidiiniga rekombinantsete valkude moodustamine. Rekombinantne liitvalk, kus üheks komponendiks on streptavidiin ja teiseks partnervalg, omab kahte iseseisvat funktsiooni. Üks funktsioon tuleneb streptavidiini domeenist ja teine partnervalgu domeenist. Rekombinantsete streptavidiini valkude puhul on toodetud valgupartii (*batch*) oma koostiselt homogeenne võrreldes valgupartiiiga, mis on toodetud keemilisel konjugeerimisel (Sano *et al.*, 1998).

Näiteid streptavidiini teisenditest. Metsiktüüpi streptavidiinil on neli võimalikku seondumiskohta biotinüleeritud ligandidele. Ligandid võivad omavahel agregeeruda, kuna paiknevad lähestikku. Agregeerumine viib tihti ühendi bioloogilise funktsiooni muutuseni ja seega võib tekkida artefakt, mis annab väära katse tulemuse. Töötades elusrakkudega eelistatakse kasutada väiksema funktsionaalsete seondumiskohtade arvuga streptavidiini vorme. Nii välditakse streptavidiiniga seonduvate ligandide agregeerumist (Dundas *et al.*, 2013).

Monovalentne tetrameerne streptavidiin. Üheks väiksema funktsionaalsete seondumiskohtade arvuga streptavidiini vormiks on monovalentne streptavidiini tetrameer.

Antud tetrameer sisaldab kolme inaktiveeritud seondumiskohta ja ühte aktiivset metsiktüüpi seondumiskohta (Howarth *et al.*, 2006).

Monovalentne monomeerne streptavidiin. Alternatiiviks monovalentsele tetrameersele streptavidiinile on välja töötatud ka monovalentne monomeerne streptavidiin, mis vastab tetrameerse streptavidiini ühele alaühikule ja seega seob endaga ühe biotiini või biotinüleeritud ligandi. Monomeeri suurus on ~ 25% tetrameerist ning tänu oma väikestele mõõtmetele võimaldab antud molekul paremat *in vivo* ligipääsu kudedesse. Monomeeri negatiivseks küljeks on tema ebastabiilsus (Dundas *et al.*, 2013). Selle probleemi üheks lahenduseks töötati välja stabiilsem kimäärne monomeer ($K_d = 3 \times 10^{-9} \text{ M}$) kasutades rizavidiini (*rhizavidin*) ja streptavidiini konserveerunud aminohapete järjestusi. Rizavidiin, mida toodab bakter *Rhizobium etli*, on biotiini siduv looduslik dimeer, kus naaber alaühikud ei oma kriitilist rolli seondumiskoha moodustumisel (Lim *et al.*, 2013). Tänu oma stabiilsusele ja lahustuvusele sobib rizavidiini ja streptavidiini monomeerne kimäär paremini biokeemiliste katsete läbiviimiseks ja rakkude märgistamiseks kui monomeerne streptavidiin (Dundas *et al.*, 2013).

1.2 Biotiin

Biotiin (vitamiin B7, vitamiin H) on väike vesilahustuv molekul, mida sünteesivad enamik mikroobe, taimi ja seeni, kuid biotiini vajavad kõik eluvormid (Määttä, 2010; D. Mock, 1996). Biotiini olulisus meie dieedis tehti kindlaks 20. sajandi esimeses pooles (Finkenwirth *et al.*, 2014). Biotiin isoleeriti esmakordselt munavalgest 1936. aastal (Kögl ja Tönnis, 1936).

Biotiin koosneb ureido- (*tetrahydroimidazolidone*) ja tetrahüdrotiofaan (*tetrahydrothiophene*) ringist, mis on omavahel külgepidi seotud, ning viimase küljes olevast paldrerjan- ehk pentaanhappejäagist (*valeric acid*). Tugeva sideme moodustamiseks streptavidiiniga on oluline just ureido ring (Määttä, 2010).

Biotiini tuntuimaks bioloogiliseks funktsiooniks on toimida karboksülaaside koensüümina. Selle kaudu osaleb biotiin glükoneogeneesis, rasvhapete sünteesis, aminohapete katabolismis ning energia transduktsioonis (Knowles, 1989). Biotiin on oluline ka rakusignalisatsioonis ja geenide epigeneetilises regulatsioonis. Kromatiini struktuuris esineb biotiini histoonide koosseisus (Zempleni, 2005).

Biotiini analoogid. Biotiini ja biotiini analooge kasutatakse laialdaselt streptavidiin-biotiin tehnoloogias. Enim rakendust leiavad biotiini analoogid, millel on modifitseeritud karboksüülrühm palderjanhappejäagis. Need analoogid võimaldavad biotiinile lisada soovitud ühendeid nii, et afiinsus streptavidiini suhtes säilib (Määttä, 2010).

Biotinüleerimine. Biotinülatsioon on erinevate ühendite sidumine biotiiniga (Kay *et al.*, 2009). Biotinülatsioon jaguneb ensümaatiliseks ja keemiliseks (Dundas *et al.*, 2013). Ensümaatiline biotinülatsioon võimaldab nii *in vivo* kui *in vitro* valke biotiiniga märgistada. Selleks viiakse vastava valgukonstruktsiooni järjekorras spetsiifilise peptiidi AviTag nukleotiidses järjekorras. Vastava aminohappelise järjekorras tunneb ära biotiini ligaas BirA. BirA seob biotiini kovalentselt AviTag järjekorras oleva lüsiinijäägiga (Kay *et al.*, 2009). Kasutades ensümaatilist biotinülatsiooni saab detekteerida näiteks nõrkasid valk-valk seoseid ensüümi ja märklaudvalgu vahel, uurida post-translatsioonilisi modifikatsioone, valk-RNA ja valk-DNA vahelisi seoseid (Dundas *et al.*, 2013).

Keemiline biotinülatsioon võimaldab *in vitro* keemiliste reagentide abil modifitseerida valke biotiiniga. Keemiline biotiini liitmine valguga toimub tingimustes, mis ei mõjuta valgukonstruktsiooni, 3D struktuuri ega funktsiooni. Antud protsess ei võimalda kontrollida valgukonstruktsiooni seondumise biotiini hulka. Kuna biotiini seondumine valguga on tihti vahendatud lüsiinijäägi kaudu võib biotiini seondumine teatud lüsiinijääkide külge viia ligandi seondumiskoha inaktivatsioonini (Kay *et al.*, 2009).

1.3 Streptavidiin-biotiin tehnoloogia rakendused

Streptavidiin-biotiin kompleks on teadlaste tähelepanu köitnud kahel järgneval põhjusel. Esiteks kujutavad need kaks molekuli huvitavat mudelsüsteemi, kus väga stabiilne oligomeerne valk omab kõrget afiinsust väikese ligandi suhtes. Teiseks streptavidiini ja biotiini vahelist interaktsiooni on võimalik ära kasutada paljudes erinevates bioteaduste rakendustes (Wilchek ja Bayer, 1990; Wilchek ja Bayer, 1988; Kuntz *et al.*, 1999).

Rakendusi, mis põhinevad streptavidiini kõrgel afiinsusel biotiini suhtes, nimetatakse üldiselt streptavidiin-biotiin tehnoloogiaks (Määttä, 2010).

Streptavidiin-biotiin tehnoloogia rakendusi võib kategoriseerida järgnevalt: puhastamine, lokaliseerimine, diagnostika, ravimite suunatud edastamine ja nanotehnoloogia.

Puhastamine. Puhastamine ehk antud juhul molekulide eraldamine afiinsuskromatograafia abil põhineb streptavidiini või biotiiniga seotud kandjatel (immobiliseeritud faas). Biotiini kolonne kasutatakse avidiini, streptavidiini ja biotiini vastaste antikehade eraldamiseks. Biotinüleeritud valkude ja/või nende retseptorite eraldamiseks saab kasutada streptavidiini kolonne (Wilchek ja Bayer, 1988).

Lokaliseerimine. Lokaliseerimine hõlmab endas näiteks makromolekulide asukoha määramist rakkudes ja kudedes. Antud molekulide detekteerimine põhineb bioloogiliselt aktiivsete

ühendite biotinüleerimisel. Biotinüleeritud ühendi asukoht tehakse kindlaks streptavidiiniga konjugeeritud markeri abil (Wilchek ja Bayer, 1988).

Diagnostika. Diagnostika alla kuuluvad näiteks streptavidiin-biotiin tehnoloogial põhinevad immunoloogilised analüüsid ja geeni sondid. Immunoloogiliste analüüside korral kasutatakse signaali võimendamiseks antigeeniga seonduvat biotinüleeritud antikeha, mille külge seondub, kas streptavidiiniga konjugeeritud sond või streptavidiin ja biotinüleeritud sond. Geeni sondide puhul märgistatakse proov biotiiniga ning detekteeritakse sobiva streptavidiini konjugaadiga (Wilchek ja Bayer, 1988).

Ravimite suunatud edastamine. Streptavidiin-biotiin tehnoloogia võimaldab *targeting*-antikehade ja terapeutiliste molekulide teineteisest sõltumatut annustamist, vähendades seeläbi ravimidoosi normaalses koes, võrreldes traditsioonilise immunoteraapiaga. Kohalik streptavidiini geenisiire spetsiifilistesse kudedesse võimaldab oluliselt suurendada biotiiniga märgistatud terapeutiliste molekulide lokaalset kontsentratsiooni, aga samuti ka viiruspõhiste geeniteraapiavektorite suunatud kasutamist (Lesch *et al.*, 2010).

Nanotehnoloogia. Streptavidiin-biotiin tehnoloogiat on kasutatud koos kvanttäppidega *in vivo* üksiku molekuli tuvastamiseks rakus. Kvanttäpid on nanomõõtmetes kristallid, mida kasutatakse fluorofooridena. Selle meetodi puhul on kvanttäpid seotud streptavidiiniga, mis seondub biotinüleeritud valguga (Howarth *et al.*, 2008).

Streptavidiin-biotiin tehnoloogia kaks suurt eelist on biotinülatsiooni minimaalne mõju bioloogiliselt aktiivsete ühendite aktiivsusele ning streptavidiini ja biotiini vahelisest kõrgest afiinsusest tulenev spetsiifiline seondumine (Wilchek ja Bayer, 1988).

1.4 Bakteriorodopsiin

Bakteriorodopsiin on 24 kD suurune transmembraanne valk *Halobacterium salinariumi* purpurses membraanis (Grigorieff *et al.*, 1996). Bakteriorodopsiin kuulub mikroobsete rodopsiinide ehk tüüp-I rodopsiinide ülempererkonda. Mikroobsed rodopsiinid avastati 1970ndatel aastatel. Neist esimene ja kõige paremini uuritud on bakteriorodopsiin (Oesterhelt ja Stoeckenius, 1973). Mikroobsed rodopsiinid on valgust opsiin ja kromofoorist retinaal koosnevad fotoretseptorid (Ernst *et al.*, 2014). Kokkupuutel valgusega põhjustab kromofoor molekulis konformatsioonilise muutuse (Bye *et al.*, 2013). Purpurne membraan on oma nimetuse saanud bakteriorodopsiinis peituva kromofoori retinaal järgi (Oesterhelt ja Stoeckenius, 1971).

Bakteriorodopsiin kujutab endast valgusenergia arvel töötavat prooton pumpa (Oesterhelt ja Stoeckenius, 1973). Antud prooton pump koosneb kolmest üksteise suhtes 120 kraadi võrra pööratud identsest valgust (homotrimeer). Iga alaühik koosneb seitsmest transmembraansest α -heeliksist ja nende vahel olevast retinaali molekulist (Luecke *et al.*, 1999). Membraani läbivad α -heeliksid on kokkuleppeliselt tähistatud alfabeetiliselt A-G alustades valgu N-terminusest (Ernst *et al.*, 2014). Tänu oma lihtsale tööpõhimõttele kasutatakse bakteriorodopsiini raku tasemel transpordi mehhanismide hüpoteeside ja uute eksperimentaalsete tehnoloogiate testimiseks (Lanyi, 2004).

Bakteriorodopsiini C-heeliks. Bakteriorodopsiini seitsmest α -heeliksist kuus suudavad iseseisvalt sünteesituna membraani siseneda. Neist kuuest α -heeliksist on enim edasi uuritud bakteriorodopsiini kolmandat ehk C-heeliksist. C-heeliks on 4 kDa suurune polüpeptiid, mis suudab spontaanselt siseneda fosfolipiidi kihti. Tema üheks oluliseks omaduseks on pH sõltuv insertioon membraani, kusjuures sisenemine fosfolipiidi kihti toimub happelise pH juures (Hunt *et al.*, 1997).

1.5 Penetratiin

Penetratiin on *Drosophila melanogaster*'i *Antennapedia* homeovalgu homeodomeenist pärit 16-st aminohappejärgist koosnev peptiid, mis kuulub rakku sisenevate peptiidide (*cell penetrating peptides*) hulka (Dupont *et al.*, 2011). Homeovalgud sisaldavad DNA-ga seonduvat homeodomeeni. Homeodomeen on konserveerunud homeovalkude rühmas nii liigi siseselt kui taksonite lõikes. Homeodomeen koosneb kolmest α -heeliksist, kus põhiliselt viimane heeliks osaleb märklaud-DNA äratundmises (Gehring *et al.*, 1994).

Penetratiini võime siseneda iseseisvalt rakku avastati juhuslikult 1990ndate esimeses pooles, tehes katseid elus neuronitega (Joliot *et al.*, 1991). Rakusiseselt paikneb penetratiin nii tsütoplasmas kui ka tuumas (Derossi *et al.*, 1994). Penetratiini translokalisatsiooni mehhanismi on küll uuritud, kuid ei mõisteta veel täielikult (Dupont *et al.*, 2011). Katsed on näidanud, et penetratiin võib siseneda elusrakku nii endotsütoosi kui ka otsese translokalisatsiooni kaudu (Dupont *et al.*, 2011). Raku pinnal paiknevad kompleksed suhkrud võivad põhjustada penetratiini agregeerumist ja seeläbi indutseerida endotsütoosi (Ghibaudi *et al.*, 2005). Samas võivad need suhkrud põhjustada penetratiini kontsentratsiooni tõusu membraani läheduses ja soodustada peptiidi interaktsiooni fosfolipiididega ning kutsuda esile translokalisatsiooni (Dupont *et al.*, 2011).

Penetratiini rakendus. Rakku sisenevate peptiidide, sh penetratiini, abil saab elusrakkudesse transportida peptiide, valke, *antisens*-oligonukleotiide, siRNAd, dsDNAd, nanopartikkeid ja liposoomi (Bechara ja Sagan, 2013).

2 Eksperimentaalne osa

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli disainida ja toota rekombinantseid valke, mis omaksid kahte domeeni, millest üks võimaldaks rekombinantse valgu paiknemise raku erinevatesse osistesse ja teine bioloogiliste märklaudmolekulide seondumise. Ühtlasi sooviti, et võimaluse korral oleks disainitud rekombinantse valgu hulk ja paiknemine nii raku pinnal kui raku sees kontrollitavad.

Antud bakalaureusetöö eesmärgid olid järgnevad:

1. Konstrueerida rekombinantsed valgud
2. Transformeerida konstrueeritud valkude nukleotiidne järjestus *E. coli* 'sse
3. Testida, milline rekombinantne valk ekspresseerub
4. Optimeerida rekombinantsete valkude ekspressiooni tingimusi
5. Puhastada saadud rekombinantsed valgud

2.2 Materjal ja meetoodika

2.2.1 Plasmiidid

Töös kasutati järgnevaid plasmiidseid vektoreid: pET SUMO (Thermo Fisher Scientific Inc.), mis sisaldas kanamütsiini-resistentsus geeni, pET-11a (EMD Millipore Corp.), mis sisaldas ampitsilliini-resistentsus geeni.

2.2.2 Bakteritüved

Töös kasutati *E. coli* kloneerimistüve JM109 (Promega Corp.). Konstrueeritud rekombinantsete valkude ekspressiooniks kasutati *E. coli* tüvesid BL21(DE3)pLysS (Promega Corp.) ja BL21(DE3)pLysE (Sigma-Aldrich Co. LLC.), millest mõlemad sisaldasid klooramfenikooli-resistentsus geeni.

2.2.3 Antibiootikumid

Töös kasutatud antibiootikumide lõpp-kontsentratsioonid: ampitsilliin, 100 µg/ml; klooramfenikool, 34 µg/ml; kanamütsiin, 50 µg/ml.

2.2.5 Konstruktide disainimine

Kõik konstruktide disainimise etapid (järjestuste homoloogia võrdlus, DNA translatsioon, pööratud komplemendi koostamine, restriksioon analüüsi planeerimine) viidi läbi kasutades internetipõhiseid programme (tabel 1, lisa 1). Töös kasutatud bakteriorodopsiini

modifitseeritud C-heeliksi järjestus vastab varem kirjanduses avaldatud järjestusele (Hunt *et al.*, 1997). Kasutatud streptavidiini järjestus vastab *Streptomyces avidinii* streptavidiini valgu aminohapetele 25-183 (UniProt: P22629) ning kimäärse monomeerse streptavidiini (mSA) järjestus vastab varem kirjanduses avaldatud järjestusele (Lim *et al.*, 2013). Töös kasutatud penetratiini järjestus vastab *Drosophila melanogaster* i *Antennapedia* homeodomeeni 339-354 aminohappejäägile (UniProt: P02833) (Derossi *et al.*, 1994).

Kõik disainitud konstruktid telliti plasmiidises vektoris pUC 57 firmast GENEWIZ Inc.

2.2.6 Oligonuleotiidsed praimerid

Töös kasutatud oligonukleotiidsed praimerid disainiti kasutades internetipõhiseid programme (tabel 1, lisa 1) ning telliti ettevõttest Metabion International AG (tabel 3).

Tabel 3.

NUMBER	JÄRJESTUS 5' ->3'	RAKENDUS
004	CGATCCCGCGAAATTAATACGAC	Geneetiline sõelumine ja sekveneerimine
006	GGTGGTGAACAGAACCCGATTTACTGG	Geneetiline sõelumine ja sekveneerimine
007	TTATTATTATTTCACTTTGGTAAAGGTATCCTGGCC	Geneetiline sõelumine ja sekveneerimine
009	GTCCGGCGTAGAGGATCG	Sekveneerimine
010	CGGATATAGTTCCTCCTTTCAGC	Geneetiline sõelumine ja sekveneerimine
011	ACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGG	Sekveneerimine
012	AGATTCTTGTACGACGGTATTAG	Geneetiline sõelumine ja sekveneerimine
013	ATTGGTGGTGGTGGTGAACAG	Geneetiline sõelumine

2.2.7 PCR (polümeraasi ahelreaktsioon)

Kõik selles töös teostatud PCR-i reaktsioonid viidi läbi Aeris™ Aeris Thermal Cycler termotsükleris (Esco Micro Pte. Ltd.).

Analüütiline PCR. Analüütiline koloonia PCR teostati positiivsete kolooniate selektsiooniks.

PCR reaktsioonid teostati 20 µl kasutades FIREPol® DNA polümeraasi (5x FIREPol® Master Mix Ready to Load with 7,5 mM MgCl₂, Solis BioDyne OÜ). Reaktsiooni segu sisaldas nii *forward* kui *reverse* praimerit kontsentratsioonil 150 nM. Valitud kolooniad siirdati reaktsiooni segusse.

PCR-i programm:

1. 95°C	3min	
2. 95°C	20sek	} x35
3. 51/56°C	20sek	
4. 72°C	60sek	
5. 72°C	7min	
6. 4°C	∞	

Preparatiivne PCR. Preparatiivne PCR teostati konstruktide sekveneerimisel kasutatud matriits-DNA valmistamiseks ning SUMO liitvalgu kloneerimisel. Kloneeritud DNA järjestuse õigsust kontrolliti DNA primaarjärjestuse määramisega Eesti Biokeskse tuumiklaboris või asutuses Functional Biosciences, Inc. Nendes asutustes kasutati ka T7 praimereid konstruktide sekveneerimisel.

PCR reaktsioonid teostati 20 µl kasutades FIREPol® DNA polümeraasi (5x FIREPol® Master Mix Ready to Load with 7,5 mM MgCl₂, Solis BioDyne OÜ). Reaktsiooni segu sisaldas nii *forward* kui *reverse* praimerit kontsentratsioonil 150 nM ja matriits DNA-d kontsentratsioonil 0,01-10 ng/µl.

PCR-i programm:

1. 95°C	3min	
2. 95°C	20sek	} x20
3. 51/56°C	20sek	
4. 72°C	30sek	
5. 72°C	7min	
6. 4°C	∞	

2.2.8 DNA kloonimine

Töö käigus teostatud DNA kontsentratsiooni mõõtmised viidi läbi spektrofotomeetriliselt (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Miniprep'id ja midiprep'id. Plasmiidne DNA puhastati ning säilitati edasiste katsete jaoks DNA *mini*-ja *midiprep* 'ide kujul. Selleks inokuleeriti 1 transformeeritud bakterirakkude koloonia LB plaadilt 2 ml LB/2xYT vedelsöötmesse *miniprep* 'ide puhul. *Midiprep* 'ide puhul inokuleeriti 50 ml LB/2xYT vedelsöödet eelkultuuriga kasutades 100x lahjendust. Vedelsöötmed sisaldasid sobivaid antibiootikume. Baktoreid kasvatati üleöö 37°C juures loksutil 225 RPM. *Miniprepp*'ide valmistamiseks kasutati FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction MiniKiti (Favorgen Biotech Corp.) või QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN N.V.) komplekti. *Midiprepp* 'ide valmistamiseks kasutati PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega Corp.) komplekti või viidi läbi aluseline lüüs SDS-iga koos fenooli töötlustega vastavalt varasemalt kirjanduses kirjeldatule (Green ja Sambrook, 2012).

DNA fragmentide puhastamine agaros geelist. DNA fragmentide puhastamiseks agaros geelist kasutati kommertsiaalset komplekti UltraClean® 15 DNA Purification Kit, järgides vastavat tootja protokollit (MO BIO Laboratories, Inc.).

Preparatiivsete PCR-i fragmentide puhastamine. Preparatiivse PCR-i käigus saadud fragmendid puhastati PCR-i segust kasutades kommertsiaalset komplekti MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN N.V.).

Bakterirakkude transformatsioon. Konstrukti sisaldav plasmiid pET-11a või pET SUMO transformeeriti *E. coli* BL21(DE3)pLysS või BL21(DE3)pLysE kompetentsetesse rakkudesse kasutades vastava tootja protokollit (Promega Corp., Sigma-Aldrich Co. LLC.).

Transformeeritud rakud külvati sobivaid antibiootikume sisaldavatele LB plaatidele. Rakke inkubeeriti 37°C juures üleöö.

Restriktsioon analüüs ja agaros geelelektroforees. Restriktsioon analüüsil kasutati FastDigest ensüüme NdeI ja BamHI (Thermo Fisher Scientific Inc.). Restrikteeritud DNA ja PCR fragmentide pikkust kontrolliti geelelektroforeesil. Geelelektroforees teostati TAE (Naxo OÜ) puhvril 1,5% agarosgeelil, kuhu oli lisatud etiidumbromiid, 0,5 µg/ml. Markerina kasutati ZipRuler™ Express DNA Ladder Set, Ready to Use (Thermo Fisher Scientific Inc.). Geelelektroforeesi tulemused jäädvustati kasutades Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Ligeerimine. Puhastatud DNA fragment sisestati NdeI-ga ja BamHI-ga lineariseeritud ja defosforüleeritud plasmidi (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Fisher Scientific Inc.), kasutades ensüümi T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific Inc.). Reaktsioon viidi läbi toetemperatuuril üleöö.

T/A klonereimine. SUMO liitvalku sisaldavad konstruktid valmistati kasutades T/A klonereimist. DNA fragmendid amplifitseeriti PCR-i käigus. PCR fragmendid ligeeriti pET SUMO vektorisse kasutades ensüümi T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific Inc.), järgides valmistaja protokoll. Ligeerimine viidi läbi 4°C juures üleöö.

2.2.9 Valkude ekspressiooni optimeerimine

Optimaalse valgu ekspressiooni saavutamiseks viidi läbi järgnevad katsed: teostati ekspressiooni ajaseeria, ekspressioon erinevatel temperatuuridel, ekspressioon erinevates *E. coli* tüvedes ning ekspressioon indutseeriti erinevatel IPTG kontsentratsioonidel.

Ajaseeria. Antud katses hinnati valgu kontsentratsiooni erinevatel ajahetkedel pärast induktsiooni 1 mM IPTG-ga. Selleks võeti bakterikultuurist esimese, teise ja iga järgneva kahe tunni järel kaheksa tunni jooksul 100 µl proovi või võeti 100 µl proovi esimese, teise ja iga järgneva kahe tunni järel kuue tunni jooksul. Saadud proove analüüsiti valgu geelelektroforeesil nagu kirjeldatud allpool.

Ekspressioon erinevatel temperatuuridel. Valgu ekspressioon viidi läbi 25°C, 30°C ja 37°C juures. Kõigil juhtudel kasvatati eelkultuur üles 37°C juures. Viimane arvestuslik bakterirakkude pooldumine enne indutseerimist teostati vastavalt 25°C, 30°C või 37°C juures. Seejärel indutseeriti valgu ekspressioon 1 mM IPTG-ga vastaval temperatuuril.

Ekspressioon erinevates *E. coli* tüvedes. Valke ekspresseeriti *E. coli* kahes erinevas ekspressioonitüves BL21(DE3)pLysS (Promega Corp.) ja BL21(DE3)pLysE (Sigma-Aldrich Co. LLC.).

Induktsioon erinevatel IPTG kontsentratsioonidel. Valkude ekspressiooni induktsiooniks kasutati 0,5 mM ja 1mM IPTG-d.

2.2.10 Rekombinantse valgu ekspressioon bakterirakus

Eelkultuuri valmistamiseks inokuleeriti transformeeritud bakterirakkude koloonia 2 ml LB/2xYT ja sobivat antibiootikumi sisaldavasse vedelsöötmesse ning kasvatati 37°C juures loksutil 225 RPM üleöö. Saadud eelkultuurist valmistati 100x lahjendus ning mõõdeti optiline tihedus 600 nm (OD₆₀₀) juures spektrofotomeetriliselt (BioPhotometer, Eppendorf AG.). Seejärel inokuleeriti 100 ml LB/ 2xYT, 6 ml 1M glükoosi ja sobivaid antibiootikume sisaldavat vedelsöödet eelkultuuriga nii, et kultuuri arvestuslik optiline tihedus (OD₆₀₀) oleks ≈0,1. Proov jagati kaheks (2 x 50ml) ning kasvatati 250 ml koonilises kolvis 37°C juures loksutil 225 RPM kuni OD₆₀₀≈0,6. Indutseerimata kontrolliks võeti 100 µl rakukultuuri, fuugiti põhja 3 min 14800 RPM (MicroCL 21 R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc.) ning bakterimass säilitati -20°C. Valgu sünteesi indutseeriti 1 mM IPTG-ga. Rakke inkubeeriti 2 tundi 37°C juures loksutil 225 RPM. Seejärel võeti indutseeritud kontrolliks 100 µl rakukultuuri, fuugiti (MicroCL 21 R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc.) rakud põhja 14800 RPM ja säilitati -20°C juures. Allesjäänud rakud fuugiti põhja 4000 RPM 10 min (Centrifuge 5810R, rootor: A-4-62, Eppendorf AG.). Bakterimassi säilitati -20°C juures.

2.2.11 Rekombinantsete valkude analüüs

Valgu geelelektroforees. Ekspresseeritud valke analüüsiti SDS-polüakrüülamiidi geelelektroforeesil. Enne geelile kandmist töödeldi proove 95°C juures 5 min. Elektroforees viidi läbi kasutades kas nUView Tris-Glycine Precast Gel (NB, 4-8 %, NuSep Holdings Ltd.) või Horizontal Pre-Cast GeBAGel (8-16%, Gene Bio-Application Ltd.) polüakrüülamiid geeli vastavalt Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) või GeBARunner (Gene Bio-Application Ltd.) foreesi aparaadis. Molekulmassi markeriks oli nUView geelide korral PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.) ja GeBAGel geelide puhul kasutati molekulmassi markerina Protein Ladder Blue Prestained (Naxo OÜ). GeBAGel geele värviti pärast foreesi Coomassie R-250-ga vastavalt varem avaldatud protokollile (Green ja Sambrook, 2012). nUView geelid ei vajanud lisavärvimist. Geeli pildid jäädvustati UV valguslaual Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

SUMO rekombinantse liitvalgu puhastamine. SUMO, C-heeliksit ja mSA-d sisaldav liitvalk puhastati kasutades alljärgnevat protokollit. Valgu ekspressioonist saadud sade pesti 5 ml 0°C pesupuhvriga (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM TrisHCl, pH=8,0). Seejärel teostati fuugimine 4000 RPM 5 min (Centrifuge 5810R, rootor: A-4-62, Eppendorf AG.). Saadud rakkude sade lüüsi 4 ml lüüsipuhvris (2 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 30 mM TrisHCl, pH=8,0) ning igasse proovi lisati eraldi 20 µl PIC, vastavalt tootja protokollile (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich Co. LLC.) ja 50 µg/ml lüesosüümi (Thermo Fisher Scientific Inc.). Proovi inkubeeriti toatemperatuuril 15-20 min aeg-ajalt õrnalt loksutades. Seejärel lisati proovile 12 mM MgSO₄, 10 µg/ml DNase I (Sigma-Aldrich Co. LLC.), 10 µg/ml RNase A (DNase- and Protease-free, Thermo Fisher Scientific Inc.). Proovi inkubeeriti 15 min toatemperatuuril. Raku jäänused fuugiti põhja 4000 RPM 10 min 4°C (Centrifuge 5810R, rootor: A-4-62, Eppendorf AG.). Supernatandist võeti 100 µl proovi ning samuti hoiustati ka sade -20°C juures edasiseks analüüsiks. Rekombinantse valgu puhastamiseks jäeti sade üleöö lahustuma 4°C juures 0,5 ml uurea puhvris (6 M uurea, 2 mM EDTA, 100 mM TrisHCl, pH=8,0). Seejärel vähendati valgu proovi uurea kontsentratsioon kuni 2 M-ni astmelise dialüüsiga 4°C juures, kasutades 4 M ja 3 M uurea puhvrit (vastav uurea kogus, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM TrisHCl, pH=8,0). Liitvalgu puhastamiseks allesjäänud lahustunud *E. coli* valkudest kasutati kommertsiaalset komplekti MagneHis™ Protein Purification System (Promega Corp.). 30 µg valku puhastati 150 µl-s uurea puhvris (2 M uurea, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM TrisHCl, pH=8,0). Proovile lisati 30 µl nikli kuulikeste suspensiooni. Edasi toimiti vastavalt tootja protokollile. Valgu kandjale sidumise- ja eluatsioonilahused sisaldasid 2M uureat. Saadud valku töödeldi SUMO proteaasiga vastavalt tootja protokollile (Thermo Fisher Scientific Inc.). Lõigatud rekombinantne valk puhastati SUMO proteaasist ja His-tag'iga seotud SUMO valgust kommertsiaalse komplektiga MagneHis™ Protein Purification System (Promega Corp.). Kõik puhastamise eri etappides kogutud valgu preparaadid analüüsiti SDS-poliakrüülamiid geelelektrofooresil.

Penetratiinist ja streptavidiinist koosneva rekombinantse valgu puhastamine.

Penetratiini ja tetrameerse streptavidiini rekombinantse valgu puhastamiseks inklusioonkehadest kasutati T. Sano ja C. R. Cantori modifitseeritud protokollit (Sano ja Cantor, 1990). 50 ml indutseeritud valgu ekspressioonil saadud sade pesti 5 ml 0°C pesupuhvriga (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM TrisHCl, pH=8,0). Seejärel teostati fuugimine 4000 RPM 10 min (Centrifuge 5810R, rootor: A-4-62, Eppendorf AG.). Saadud rakkude sade lüüsi 4 ml lüüsipuhvris (2 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 12 mM MgSO₄, 10 µg/ml DNase I (Sigma-Aldrich Co. LLC.), 10 µg/ml RNase A (DNase and Proteas-free,

Thermo Fisher Scientific Inc.), 30 mM TrisHCl, pH=8,0). Proovi inkubeeriti 15 min toatemperatuuril. Inklusioonkehad sadestati lahusest tsentrifuugimisel (25 000 g, 15 min 4°C, Avanti® J-E, rootor: JA-17, Beckman Coulter Inc.). Supernatandist võeti 100 µl proovi ning sademest võeti kaapeproov geelelektroforees analüüsiks. Supernatant säilitati -20°C juures. Sadet pesti 0°C pesulahusega 10 ml (2 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100, 30 mM Tris-HCl pH= 8,0). Teostati fuugimine 13500 RPM 5 min 4°C (Avanti® J-E, rootor: JA-17, Beckman Coulter Inc.). Sade lahustati 0,5 ml 6 M guanidiinhüdrokloriid (pH=1,5) lahuses üleöö 4°C. Guanidiinhüdrokloriidi eemaldamiseks puhastati saadud valk kaks korda PD MiniTrap G-25 kolonnil (General Electric Healthcare) vastavalt tootja protokollile. Puhastatud valgu proov säilitati -20°C juures.

Elektroforeetilise nihke analüüs. Testimaks, kas toodetud valk moodustab tetrameere ja suudab siduda biotinüleeritud antikeha, teostati elektroforeetilise liikuvuse nihke analüüs. SDS-poliüakrüülamiidi geelelektroforeesil kasutati valgu ekspressioonil saadud indutseeritud proovi materjali, kuid erinevalt tavapärastest valgu foreesist proovi ei keedetud. Tetrameeride katse viidi läbi PBS puhvril, kasutades 20 µl inklusioonkehast puhastatud valgu proovi. Biotiini sidumiskatses kasutati 18 µl inklusioonkehast puhastatud valgu proovi. Antud katse viidi läbi 20 µl PBS puhvril, kasutades antikeha lahjendust 1:200 ning proove inkubeeriti üleöö temperatuuridel 20°C ja 4°C (Anti-Rabbit IgG (whole molecule)–Biotin antibody produced in goat, Sigma-Aldrich Co. LLC.). Proovidele lisati 2x Laemmli Sample Bufferit (Sigma-Aldrich Co. LLC.) ning kanti 30 µl poliüakrüülamiid geelile (NB, 4-8 %, nUView Tris-Glycine Precast Gel, NuSep Holdings Ltd.).

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Konstruktide disain

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli disainida ja toota rekombinantseid valke, mis omaksid ühte universaalset ja tugeva spetsiifikaga seondumisdomeeni märgistatud bioloogiliste molekulide sidumiseks ning teist domeeni raku külge kinnitumiseks. Võimaluse korral oleksid valgu hulk ja paiknemine nii raku pinnal kui raku sees reguleeritavad.

Antud domeeni ühendab *linker*. *Linker*'i ülesandeks on tagada konstruktid painduvus. Käesolevas bakalaureusetöös kasutatud *linker* koosneb glütsiini ja seriini jääkidest (Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (Huston *et al.*, 1988).

Seondumisdomeeniks valiti streptavidiin, kuna streptavidiin omab erakordselt tugevat afiinsust biotiini suhtes – nende vaheline side on üks tugevaim teadaolev mittekovalentne seondumismehhanism looduses (Green, 1975). Tänu oma väikestele mõõtmetele ei muuda

biotiin enamasti märgistatava valgu struktuurseid ega funktsionaalseid omadusi (Kay *et al.*, 2009). Streptavidiini ja biotiini seondumine on teaduslikult põhjalikult läbi uuritud ning laialdaselt kasutusel teadus-ja rakendusuringutes. Lisaks sellele on biotiin laialdaselt kasutusel bioloogiliste molekulide märgistamiseks kaubanduslikes toodetes.

Käesolevas bakalaureusetöös kasutatud streptavidiin koosneb 159 aminohappejäägist. Funktsionaalne streptavidiin koosneb neljast identsest alaühikust (UniProt: P22629).

Lisaks tetrameere moodustavale streptavidiinile kasutati seondumisdomeeni ka kimäärset monovalentset streptavidiini monomeeri (mSA) (Lim *et al.*, 2013). Monomeeri peamiseks eeliseks tetrameerse streptavidiini ees on antud molekuli väikesed mõõtmed, võimaldades mSA-d lihtsamini raku sisse transportida. Kimäärne monomeer on suhteliselt hea lahustuvusega ja stabiilne (Dundas *et al.*, 2013). Käesolevas bakalaureusetöös kasutatud kimäärse streptavidiini monomeeri järjestus vastab Kok Hong Limi ja kaastööliste poolt rhisavidiinist (*rhizavidin*) ja streptavidiinist struktuuripõhisel modelleerimisel väljatöötatud monovalentse monomeeri järjestusele. Antud monomeer suudab endaga siduda ühe biotiini molekuli (Lim *et al.*, 2013).

Liitvalgu ankurdamiseks raku membraani sooviti valku, mille kinnitumine oleks kontrollitav. Kontrollitavat kinnitumist fosfobilipiid kihti võimaldab bakteriorodopsiini C-heeliks, mille sisenemine membraani on pH-sõltuv (Hunt *et al.*, 1997).

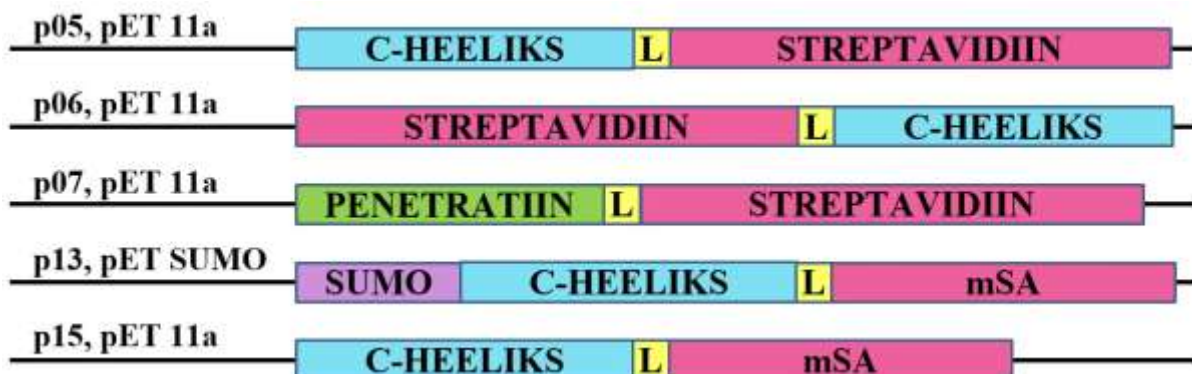
C-heeliks on 4 kDa suurune polüpeptiid, mis koosneb 36-st aminohappejäägist. Need 36 aminohappejääki vastavad bakteriorodopsiini 72-107 aminohappejäägile (UniProt: P02945). Erandiks on 105 positsioonis olev glutamiinhape, mis on asendatud glutamiiniga (Hunt *et al.*, 1997).

Lisaks membraani kinnituvale rekombinatsele streptavidiinile disainiti valk, mis suudaks siseneda rakku ja lokaliseeruda tuuma. Sobivat funktsionaalsust pakub penetratiin. Penetratiin kuulub rakku sisenevate peptiidide (*cell penetrating peptides*) hulka. Penetratiin on 16 aminohappejäägist koosnev peptiid. Antud 16 aminohappejääki vastavad *Drosophila melanogaster*'i *Antennapedia* homeodomeeni 339-354 aminohappejäägile (Uniprot: P02833) (Derossi *et al.*, 1994). Penetratiini lokaliseerub samaaegselt nii tsütoplasmasse kui tuuma (Joliot *et al.*, 1991).

Ümberkloneerimise lihtsustamiseks lisati disainimise käigus kõikide rekombinantsete valkude nukleotiidsete järjestuste 5' otsa NdeI ja 3' otsa BamHI lõikekohtade järjestused. Samuti lisati kõikide järjestuste 3' otsa lugemisraamis olevad stop-koodonid. Teostati ka rekombinantsete

valkude nukleotiidsete järjestuste koodonoptimisatsioon vastavalt *E. coli* koodonkasutuse tabelile.

Töös konstrueeritud rekombinantsed valgud on välja toodud joonisel 1.



Joonis 1. Rekombinantsed valgud. Joonisel on välja toodud konstrueeritud valgud koos vastavate nimetustega (p05, p06, p07, p13, p15). Tähistused: L – linker, mSA – kimäärne monomeerne streptavidiin. Näidatud on ka plasmiidid ekspressioonivektorid (pET-11a, pET SUMO).

Kõikide töös kasutatud ekspressiooni konstruktid nukleotiidsete järjestused kontrolliti sekveneerimise abil.

2.3.2 Valkude ekspressiooni optimeerimine ja valkude ekspressioon

Disainitud rekombinantsete valkude suuremahuliseks tootmiseks viidi läbi erinevad katsed, leidmaks optimaalsed ekspressiooni tingimused. Teostati ekspressiooni ajaseeria, ekspressioon temperatuuridel 25°C, 30°C ja 37°C, ekspressioon erinevates *E. coli* tüvedes ning ekspressioon indutseeriti erinevatel IPTG kontsentratsioonidel.

Penetratiinist ja streptavidiinist koosneva rekombinantse valgu p07 (joonis 1, 4) suurim ekspressioon saavutati 1 tunniga 37°C juures *E. coli* BL21(DE3)pLysS tüves indutseerituna 1 mM IPTG-ga kasutades pET-11a indutseeritavat ekspressioonivektorit. Teise, neljanda ja kuuenda tunni ajapunktis ekspressioon ei muutunud, kuid kaheksanda tunni ajapunktis oli valgu hulk mõnevõrra väiksem. Madalamatel temperatuuridel (25°C ja 30°C) teostatud ekspressioon ei suurendanud toodetud valgu hulka. Saadud valgu hulk jäi samaks ekspresseerituna *E. coli* tüves BL21(DE3)pLysE, kus liitvalgu ekspressioon on veelgi tugevama kontrolli all kui BL21(DE3)pLysS tüves. Induktsioon 0,5 mM IPTG-ga ei tekitanud muutust ekspresseerunud valgu koguses (andmed publitseerimata).

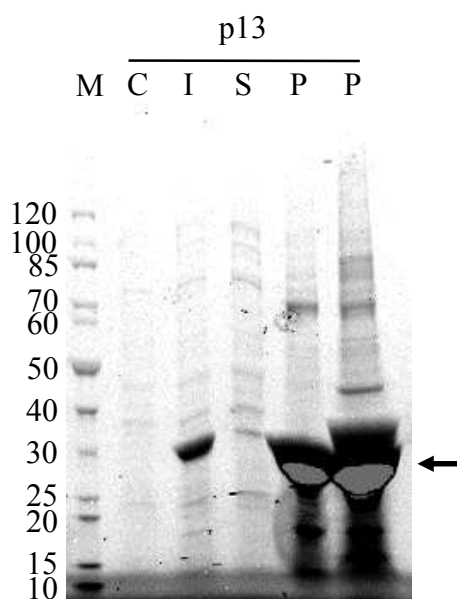
C-heeliks, mille C-terminusse on liidetud streptavidiin (p05) ei ekspresseerunud kasutades pET-11a ekspressioonivektorit (joonis 1). Küll aga ekspresseerus rekombinantne valk (p06), kus tetrameerne streptavidiin on liidetud C-heeliksi N-terminusse (joonis 1, 4). Järeldati, et C-terminuses streptavidiini sisaldav C-heeliks on antud orientatsioonis peremeesorganismile toksiline. Ekspressiooni saavutamiseks otsustati kasutada pET SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) ekspressioonivektorit. SUMO (*Saccharomyces cerevisiae* Smt3) ekspressioonisüsteemi kasutamine võimaldab toota *E. coli* valke, mis vastasel juhul pakitaks valessti, degradeeritaks või oleks väikese lahustuvusega. Antud ekspressioonisüsteemi abil saab ka võimendada valgu ekspressiooni (Peroutka Iii *et al.*, 2011).

Samal ajal köitis töögrupi tähelepanu Kok Hong Limi ja kaastööliste poolt välja antud artikkel kimäärsest monovalentsest monomeersest streptavidiinist (mSA) (Lim *et al.*, 2013). Viimase ajendil disainiti konstrukt, mis sisaldas C-heeliksit ja mSA-d. Disainimisel järgiti ülaltoodud etappe. Konstrukti nukleotiidne järjestus kloneriti pET SUMO plasmiidsesse ekspressioonivektorisse kasutades T/A klonerimist. Toodevat valk p13 koosnes SUMO-st, C-heeliksist ja mSA-st (joonis 1). Antud valgu suurim ekspressioon saavutati 4 tunniga 37°C juures *E. coli* BL21(DE3)pLysS tüves indutseerituna 1 mM IPTG-ga. Kuuenda tunni ajapunktis ekspressioon ei muutunud. Nii nagu p07 rekombinantse valgu puhul ei suurenenud ka toodetud p13 valgu hulk ekspresseerituna madalamatel temperatuuridel (25°C ja 30°C). Saadud valgu hulk jäi samaks ekspresseerituna *E. coli* tüves BL21(DE3)pLysE ning induktsioon 0,5 mM IPTG-ga ei tekitanud muutust ekspresseerunud valgu koguses (andmed publitseerimata).

Konstrukti, mis sisaldas C-heeliksit ja mSA-d, nukleotiidne järjestus kloneriti, kasutades NdeI ja BamHI restriksiooni kohti, ka pET-11a plasmiidsesse ekspressioonivektoritesse (p15, joonis 1), kuid antud juhul ekspressiooni ei täheldatud (andmed publitseerimata).

2.3.3 Valkude puhastamine

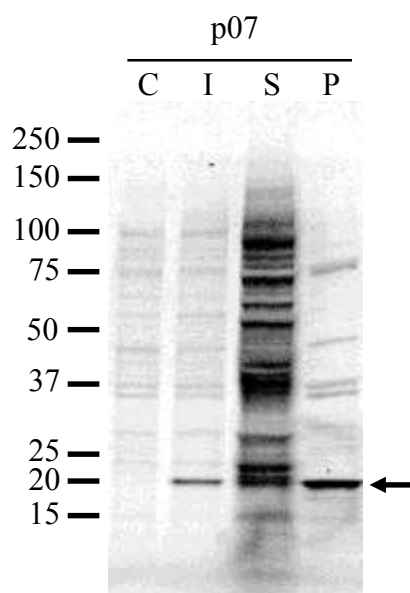
Katsete käigus selgus, et p13 liitvalk asus lüüsijärgses lahustumatus fraktsioonis (joonis 2). Saadud valk lahustati 6 M ureas. Urea kontsentratsiooni vähendati astmelisel dialüüsil 2 M-ni. Liitvalk puhastati *E. coli* valkudest afiinsuskromatograafia abil. SUMO valgu järjestus eemaldati liitvalgust SUMO proteaasi töötusega. SUMO proteaas ja rekombinantsest liitvalgust proteolüüsil ära lõigatud SUMO valgu järjestus eemaldati valgu preparaadist, kasutades afiinsuskromatograafiat.



Joonis 2. Rekombinantse valgu p13 asukoht fraktsioonis.

Radade tähistused: M – molekulmassi marker, C – indutseerimata, I – indutseeritud proov, 4 tundi, S – lüüsi järgne lahustunud fraktsioon, P – lüüsi järgne lahustumatu fraktsioon. Noolega tähistatud valgu suurus lüüsi järgses lahustumatus fraktsioonis vastab rekombinantse valgu p13 arvestuslikule suurusele (30,9 kDa).

Rekombinantse valgu p07 puhastamise käigus selgus, et antud valk paikneb inklusioonkehades (joonis 3), mis vastab kirjanduses varem kirjeldatule (Sano ja Cantor, 1990). Valgu p07 puhastamiseks kasutati modifitseeritud T. Sano ja C. R. Cantori varem avaldatud protokoll (Sano ja Cantor, 1990). Inklusioonkehad lahustati guanidiinhüdrokloriidiga. Lahustunud inklusioonkehade fraktsioonist eemaldati guanidiinhüdrokloriid eksklusioonkromatograafia abil.

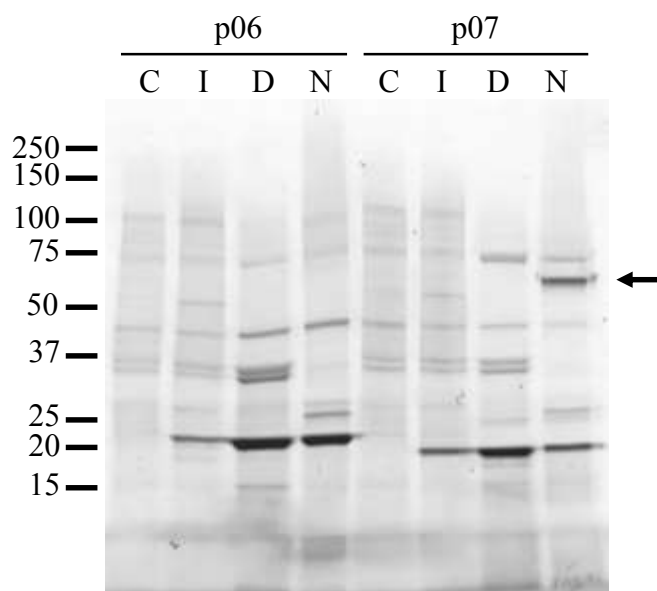


Joonis 3. Rekombinantse valgu p07 asukoht fraktsioonis.

Radade tähistused: C – indutseerimata, I – indutseeritud, 2 tundi, S – inkluusioonkehade sadestamisest saadud supernatant, P – inkluusioonkehade sade. Noolega tähistatud valgu suurus inkluusioonkehade sademes vastab p07 rekombinantse valgu monomeerse vormi arvutuslikule suurusele (21,469 kDa).

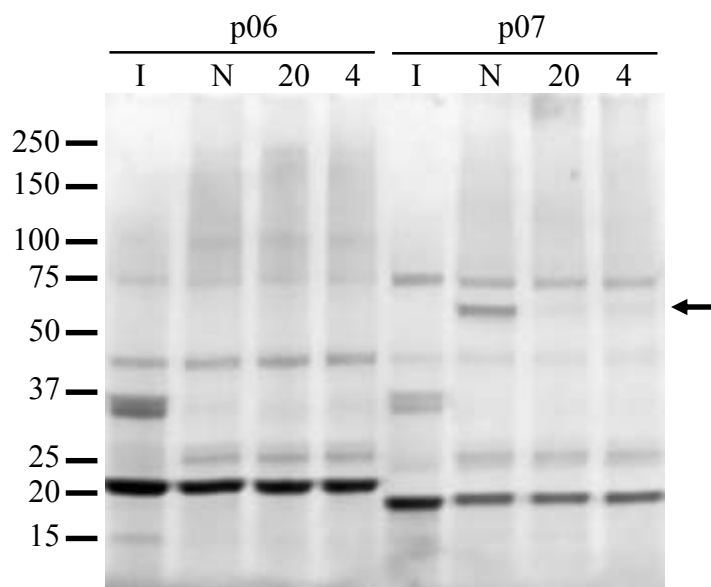
2.3.4 Elektroforeetilise liikuvuse nihke analüüs

Uurimaks, kas toodetud p06 ja p07 rekombinantsete valgud suudavad moodustada tetrameere ning siduda biotiini, teostati elektroforeetilise liikuvuse nihke analüüs. Termiliselt töötlemata proovis oli tuvastatav arvutuslikule tetrameersele p07 rekombinantsele valgule vastava molekulmassiga (85,877 kDa) *band*'i teke (joonis 4). Seega võib järeldada, et osa lahustunud termiliselt töötlemata valgust moodustab tetrameere. Rekombinantse valgu p07 inkubeerimine biotinüleeritud antikehaga põhjustas muutuse tetrameerse valgu liikuvuses (joonis 5). Katse tulemustest järeldub, et tetrameerne rekombinantne valk p07 on võimeline siduma biotiini. Rekombinantne valk p06 ei moodustanud tetrameere, ega sidunud biotinüleeritud antikeha.



Joonis 4. Rekombinantsete valkude p06 ja p07 tetrameeride elektroforeetilise liikuvuse nihke analüüs.

Radade tähistused: C – indutseerimata, I – indutseeritud, 2 tundi, D – inklusioonkehad töödeldud 95°C juures, N – inklusioonkehad, termiliselt töötlemata. Noolega tähistatud valgu suurus termiliselt töötlemata proovis vastab p07 tetrameeri arvestuslikule suurusele (85,877 kDa). Rekombinantne valk p06 ei moodusta tetrameere.



Joonis 5. Rekombinantsete valkude p06 ja p07 biotiini sidumise elektroforeetilise liikuvuse nihke analüüs.

Radade tähistused: I – indutseeritud, N – inklusioonkehad, termiliselt töötlemata, 20 – inklusioonkehast puhastatud termiliselt töötlemata üleöö 20°C juures biotinüleeritud

antikehaga inkubeeritud proov, 4 – inklusioonkehadest puhastatud termiliselt töötlemata üleöö 4°C juures biotinüleeritud antikehaga inkubeeritud proov. Rekombinantse valgu p07 rajal N asuva noolega tähistatud valgu kadumine antikehaga inkubeeritud proovides radadel 20 ja 4 näitab, et antud valk seob endaga biotinüleeritud antikeha. Rekombinantne valk p06 ei seo endaga biotinüleeritud antikeha.

Kokkuvõte

Käesolevas bakalaureusetöös disainiti ja toodeti kahte funktsionaalset domeeni sisaldavaid rekombinantseid valke. Ühe domeeni ülesandeks oli kinnituda raku membraani või siseneda raku ning teine domeen pidi võimaldama endaga siduda märgistatud bioloogilisi märklaudmolekule.

Bioloogiliste märklaudmolekulide sidumiseks kasutati tetrameere moodustavat streptavidiini või kimäärest monomeerset streptavidiini. Raku membraani kinnitumiseks kasutati bakteriorodopsiini modifitseeritud C-heeliksit. Rekombinantse valgu lokaliseerimiseks tuuma ja tsütoplasmasse kasutati *Antennapedia* homeodomeenist pärit penetratiini. Rekombinantsed valgud disainiti kombineerides omavahel erinevaid domeene.

Penetratiinist ja streptavidiinist koosnev rekombinantne valk paiknes inklusioonkehades. Puhastatuna moodustas antud valk tetrameere ja oli võimeline siduma biotiini *in vitro*.

Rekombinantne valk, mille C-terminuses oli C-heeliks ja N-terminuses streptavidiin, ei moodustanud pärast puhastamist tetrameere, ega sidunud biotiini. Rekombinantne valk, kus C-heeliks asus valgu N-terminuses, ei ekspresseerunud testitud tingimustel.

C-heeliksist ja streptavidiini monomeerist koosnev rekombinantne valk ekspresseeriti SUMO liitvalguna. Antud valk jäi lüüsijärgselt lahustumatusse fraktsiooni ning puhastati edasi uurea juuresolekul.

Bifunctional streptavidin's derivatives: design and expression in *E. coli*

Jenni Katri Pedor

Summary

The objective of this study was to construct artificial proteins with two different functional properties. These proteins should bind labelled biological molecules with high specificity. In addition, these proteins should be targeted to specific and different cellular components *in vitro*.

Streptavidin-biotin interaction was chosen as the basis to provide binding functionality due to extremely high specificity of the interaction. A derivative of wild type streptavidin and an artificial chimeric streptavidin monomer, were used as a binding domains.

Modified bacteriorhodopsin C-helix was chosen to insert the designed recombinant proteins into the cell membrane. Penetratin, a cell penetrating peptide, was used for protein localization into nucleus and cytoplasm.

Several different recombinant proteins consisting of different combinations of a binding and cellular targeting domains were designed and expressed in *E. coli*.

Recombinant protein consisting of penetratin and streptavidin was shown to be localized in inclusion bodies. Purified penetratin-streptavidin protein was able to form tetramers and to bind biotin *in vitro*.

Recombinant protein with streptavidin at N-terminus and C-helix at C-terminus, purified from inclusion bodies, did not form tetramers and was not able to bind biotin. Recombinant protein that had C-helix at N-terminus was not expressed under any conditions tested.

Recombinant protein consisting of C-helix and streptavidin monomer was expressed as a SUMO fusion protein. After lysis it remained in the insoluble cell fraction and was further purified with urea.

Tänuavaldused

Ma soovin tänada oma juhendajat, professor Ants Kurge koostöö ja abi eest.

Ma tänan südamest oma juhendajat ja ülemust Meelis Kolmerit tema aja, kannatlikkuse ja toetuse eest ning väga põhjalike ja kasulike näpunäidete eest töö planeerimisel ja koostamisel. Veel sooviksin tänada teda mõtete jagamise eest teadlastest, teaduskirjandusest ja maailmast üldiselt. Ja muidugi kohvi ja kookide eest.

Olen ülimalt tänulik Estigen OÜ-le ja koostööpartneritele võimaluse eest osaleda väga huvitavas projektis. Tahaksin veel eraldi tänada Dan Rohwer-Nutter'it õpetuste eest, kuidas vahetada tõmbekapi filtrit ja kasutada kahveltõstukit ning Ameerika toidukultuuri imede tutvustamise eest, sh Pine Cone'i *cream puff*'i. Erilised tänud ka Juha Kononen'ile näpunäidete eest koekiipide valmistamisel ja histoloogiliste värvimiste läbiviimisel.

Täna oponent Tõnis Ördi tema aja ja asjakohaste tähelepanekute eest.

Täna Andres Salumetsa võimaluse eest kasutada Tervisetehnoloogiate Arenduskeskuse laborit ja kõiki laborikaaslasid nõu ja abi eest.

Olen siiralt tänulik Kadri Seppale kõigi koosõpitud tundide eest.

Kasutatud kirjandus

- Bechara, C. ja Sagan, S., (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* 587(12): 1693–1702.
- Bye, L., Modi, N. ja Stanford, M., (2013). *Basic Sciences for Ophthalmology*, OUP Oxford.
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G. ja Prochiantz, A., (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269(14): 10444–50.
- Dundas, C.M., Demonte, D. ja Park, S., (2013). Streptavidin-biotin technology: Improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(21): 9343–9353.
- Dupont, E., Prochiantz, A. ja Joliot, A., (2011). Penetratin Story: An Overview. *Ü. Langel, toim Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 391–397.
- Ernst, O.P., Lodowski, D.T., Elstner, M., Hegemann, P., Brown, L.S. ja Kandori, H., (2014). Microbial and animal rhodopsins: Structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem. Rev.* 114(1): 126–163.
- Finkenwirth, F., Kirsch, F. ja Eitinger, T., (2014). A versatile *Escherichia coli* strain for identification of biotin transporters and for biotin quantification. *Bioengineered* 5(2): 129–32.
- Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G. ja Wüthrich, K., (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78(2): 211–23.
- Ghibaudi, E., Boscolo, B., Insera, G., Laurenti, E., Traversa, S., Barbero, L. ja Ferrari, R.P., (2005). The interaction of the cell-penetrating peptide penetratin with heparin, heparansulfates and phospholipid vesicles investigated by ESR spectroscopy. *J. Pept. Sci.* 11(7): 401–9.
- Green, M.R. ja Sambrook, J., (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Fourth Edi.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Green, N.M., (1975). Avidin. *Adv. Protein Chem.* 29: 85–133.
- Grigorieff, N., Ceska, T.A., Downing, K.H., Baldwin, J.M. ja Henderson, R., (1996).

- Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* 259(3): 393–421.
- Hendrickson, W.A., Pähler, A., Smith, J.L., Satow, Y., Merritt, E.A. ja Phizackerley, R.P., (1989). Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86(7): 2190–4.
- Howarth, M., Chinnapen, D.J.-F., Gerrow, K., Dorrestein, P.C., Grandy, M.R., Kelleher, N.L., El-Husseini, A. ja Ting, A.Y., (2006). A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. *Nat. Methods* 3(4): 267–73.
- Howarth, M., Liu, W., Puthenveetil, S., Zheng, Y., Marshall, L.F., Schmidt, M.M., Witttrup, K.D., Bawendi, M.G. ja Ting, A.Y., (2008). Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells. *Nat. Methods* 5(5): 397–9.
- Hunt, J.F., Rath, P., Rothschild, K.J. ja Engelman, D.M., (1997). Spontaneous, pH-dependent membrane insertion of a transbilayer α -helix. *Biochemistry* 36(49): 15177–15192.
- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotný, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoleri, R.E., Haber, E. ja Crea, R., (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85(16): 5879–83.
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. ja Prochiantz, A., (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88(5): 1864–1868.
- Kay, B.K., Thai, S. ja Volgina, V. V, (2009). High-throughput biotinylation of proteins. *Methods Mol. Biol.* 498: 185–96.
- Knowles, J.R., (1989). The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 195–221.
- Kuntz, I.D., Chen, K., Sharp, K.A. ja Kollman, P.A., (1999). The maximal affinity of ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(18): 9997–10002.
- Kögl, F. ja Tönnis, B., (1936). Über das Bios-Problem. Darstellung von krystallisiertem Biotin aus Eigelb. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie* 242(1-2): 43–73.
- Laitinen, O.H., Hytönen, V.P., Nordlund, H.R. ja Kulomaa, M.S., (2006). Genetically

- engineered avidins and streptavidins. *Cell. Mol. Life Sci.* 63(24): 2992–3017.
- Lanyi, J.K., (2004). Bacteriorhodopsin. *Annu. Rev. Physiol.* 66(1): 665–688.
- Lesch, H.P., Kaikkonen, M.U., Pikkarainen, J.T. ja Ylä-Herttua, S., (2010). Avidin-biotin technology in targeted therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 7: 551–564.
- Lim, K.H., Huang, H., Pralle, A. ja Park, S., (2013). Stable, high-affinity streptavidin monomer for protein labeling and monovalent biotin detection. *Biotechnol. Bioeng.* 110(1): 57–67.
- Livnah, O., Bayer, E.A., Wilchek, M. ja Sussman, J.L., (1993). Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(11): 5076–80.
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailler, J.P. ja Lanyi, J.K., (1999). Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 291(4): 899–911.
- Mock, D., (1996). *Present Knowledge in Nutrition E.* Ziegler & L. Filer, ILSI Press: Washington DC.
- Määttä, J.A., (2010). *Structural and Functional Characterization of Engineered Avidin Proteins.* University of Tampere.
- Oesterhelt, D. ja Stoeckenius, W., (1973). Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70(10): 2853–7.
- Oesterhelt, D. ja Stoeckenius, W., (1971). Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat. New Biol.* 233(39): 149–52.
- Orr, G.A., (1981). The use of the 2-iminobiotin-avidin interaction for the selective retrieval of labeled plasma membrane components. *J. Biol. Chem.* 256(2): 761–6.
- Peroutka Iii, R.J., Orcutt, S.J., Strickler, J.E. ja Butt, T.R., (2011). SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes. *Methods Mol. Biol.* 705: 15–30.
- Sano, T. ja Cantor, C.R., (1990). Expression of a cloned streptavidin gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87(1): 142–146.
- Sano, T., Vajda, S. ja Cantor, C.R., (1998). Genetic engineering of streptavidin, a versatile affinity tag. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 715(1): 85–91.
- Zempleni, J., (2005). Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu. Rev.*

Nutr. 25: 175–96.

Weber, P.C., Ohlendorf, D.H., Wendoloski, J.J. ja Salemme, F.R., (1989). Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* 243(4887): 85–8.

Wilchek, M. ja Bayer, E.A., (1999). Foreword and introduction to the book (strept)avidin-biotin system. *Biomol. Eng.* 16(1-4): 1–4.

Wilchek, M. ja Bayer, E.A., (1990). Introduction to avidin-biotin technology. *Methods Enzymol.* 184: 5–13.

Wilchek, M. ja Bayer, E.A., (1988). The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal. Biochem.* 171(1): 1–32.

Williams, D.H., Stephens, E. ja Zhou, M., (2003). Ligand binding energy and catalytic efficiency from improved packing within receptors and enzymes. *J. Mol. Biol.* 329(2): 389–99.

LISAD

Lisa 1

Tabel 1. Konstruktide ja oligonukleotiidsete praimerite disainimiseks kasutatud internetipõhised programmid.

KASUTATUD VEEBI AADRESSID	RAKENDUS
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Teostada homoloogia võrdlus
http://web.expasy.org/translate/	DNA translatsioon
http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html	Pööratud komplement
http://www.restrictionmapper.org/	Restriktsioon analüüs
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/	Praimeri disain
http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html	