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

Valguekspressiooni optimeerimine pET-plasmiididelt

Bakalaureusetöö

12 EAP

Katariina Kordemets

Juhendaja
PhD, Tõnis Org

TARTU 2022

INFOLEHT

Valgueekspressiooni optimeerimine pET-plasmiididelt

Nõudlus rekombinantsete valkude järele on järjest tõusmas, kuna neil on palju rakendusi alates teadusuuringutest kuni ravimite tootmiseni. Suur osa rekombinantsetest valkudest toodetakse bakterites protsessi lihtsuse ja odavuse tõttu. Bakteritest kasutatakse kõige rohkem valkude tootmiseks *E.Coli*-t. Valkude tootmisel *E.Coli*-s võib sõltuvalt valgust esineda olulisi puudusi nagu madal ekspressioonitase ja indutseeritavate süsteemide lekkimine. Sellest tulenevalt püstitati käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks optimiseerida pET plasmiididelt FGF2-G3, NRG1B1 ja TGFB3 valkude ekspressiooni.

Märksõnad: pET-plasmiidid, rekombinantsed valgud, suunatud mutagenees, valgueekspressioon

CERCS: T490 Biotehnoloogia

Optimization of protein expression by pET plasmids

The demand for recombinant proteins is growing as they have many applications from basic research to drug production. Many of the recombinant proteins are produced in bacteria due to the simplicity and low cost of the process. *E. coli* is the most widely used bacteria for protein production. The production of proteins in *E. coli* can have significant drawbacks depending on the protein, such as low expression levels and leaking of the inducible systems. Consequently, the aim of this bachelor's thesis was to reduce basal expression levels by adding glucose to the medium and increase protein expression from pET plasmids by site-directed mutagenesis.

Märksõnad: pET plasmids, recombinant proteins, site-directed mutagenesis, protein expression

CERCS: T490 Biotechnology

SISUKORD

INFOLEHT 2

SISUKORD 3

KASUTATUD LÜHENDID 5

SISSEJUHATUS 6

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE 7
1.1 Pluripotentsed tüvirakud ja nende kasvatamiseks vajalikud kasvufaktorid 7
1.2 Rekombinantsete valkude tootmine 7
1.3 Valkude tootmine bakterites 8
1.4 pET-plasmiidid 9
1.5 pET-plasmiidide kasutamise kitsaskohad ja võimalikud lahendused 10
1.5.1 Plasmiidse DNA muutmine suunatud mutageneesiga 12
1.5.2 Spetsiifilised söötmelisandid 13

2.0 EKSPERIMENTAALOSA 14
2.1 Töö eesmärgid 14
2.2 Materjal ja metoodika 15
2.2.1 Söötmed, bakteritüved ja plasmiidid 15
2.2.2 XL-1 BLUE kompetentsete rakkude tegemine 15
2.2.3 Suunatud mutagenees 16
2.2.3.1 PCR mutatsioonide sisseviimiseks 16
2.2.3.2 Restriktsioon 17
2.2.3.3 Transformatsioon 17
2.2.4 Miniprepid 17
2.2.5 Sangeri sekveneerimine 18
2.2.6 Valgueksprессiooniks kompetentsete rakkude tegemine 18
2.2.7 Valkude ekspresseerimine 18
2.2.8 SDS-polüakrüülamiid geelelektroforees 18
2.3 Tulemused 19
2.3.1 Suunatud mutageeneesi tulemused. 19
2.3.2 Glükoosirohke söötme mõju valgueksprессioonile 22
2.3.3 Mutatsiooniga plasmiidide geelelektroforeesi tulemused 23
2.4 Arutelu 24

KOKKUVÕTE 26

TÄNUSÕNAD 28

KASUTATUD KIRJANDUS 29

TÖÖS KASUTATUD VEEBIAADRESSID 33

LISAD 34

Lisa 1. Töös kasutatud plasmiidid 34
Lisa 2. RF1 ja RF2 koostis 37
Lisa 3. Suunatud mutageneesi katsed. 37
LIHTLITSENTS 39

KASUTATUD LÜHENDID

cAMP – tsükliline adenosiinmonofosfaat (*cyclic adenosine monophosphate*)

CAP – kataboliidi aktivaatorvalk (*catabolite activator protein*)

CHO – Hiina hamstri munasarjarakud (*Chinese hamster ovary cells*)

ESC – embrüonaalsed tüvirakud (*embryonic stem cells*)

FGF2-G3 – fibroblastide kasvufaktor 2 G3 (*fibroblast growth factor 2 G3*)

IPTG – isopropüül-β-d-1-tiogalaktopüranosiid (*isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside*)

iPSC – indutseeritud pluripotentsed tüvirakud (*induced pluripotent stem cells*)

NRG1B1 – neureguliini derivaat 1 B1 (*derivative of neuregulin 1 B1*)

Oct4 – oktameeri siduv transkriptsioonifaktor 4 (*octamer-binding transcription factor 4*)

SOX2 – sugu määrava regioon-Y box-2 transkriptsioonifaktor (*sex determining region Y-box 2*)

TGFB3 – transformeeriv kasvufaktor B3 (*transforming growth factor B3*)

TIR – translatsiooni alustamisregioon (*translation initiation region*)

Myc – proto-onkogeenide perekonna nimi (*family of proto-onkogenes*)

Klf4 – Kruppeli-sarnane faktor 4 (*Kruppel-like faktor 4*)

ori – replikatsiooni alguspunkt (*origin of replication*)

SISSEJUHATUS

Nõudlus rekombinantsete valkude järele on järjest tõusmas, kuna neil on palju rakendusi alates teadusuuringutest kuni ravimite tootmiseni. Rekombinantsete valkudena toodetakse kasvuhormoone, vaktsiine, monoklonaalseid antikehasid ja palju muid. Valke saab toota erinevates süsteemides, näiteks bakteri-, pärmi, putuka ja imetajate rakkudes. Sobivaim ekspressioonisüsteem sõltub konkreetse valgu omadustest nagu suurus ja translatsioonijärgsed modifikatsioonid. Bakterites valkude tootmist eelistatakse protsessi lihtsuse ja odavuse tõttu. Bakteritest kõige enam kasutatakse valkude tootmiseks *Escherichia coli*t. *E. coli*s on ekspressioonivektoritest sagedasti kasutusel pET-plasmiidid, mida kasutati ka selle töö eksperimentaalosas kolme tüvirakkude kasvatamiseks vajalikku kasvufaktori ekspresseerimiseks. Tüvirakkudel on palju rakendusi nii teaduses kui meditsiinis, kuid hetkel piirab nende kasutamist kommertsiaalsete söötmete kõrge hind, mistõttu teeks ise kasvufaktorite tootmine protsessi oluliselt odavamaks. Valkude tootmisel *E.Coli*s võib aga esineda puudusi, mis viivad madala saagiseni, sealhulgas madal ekspressioonitase ja lekkiv ekspressioon ehk geen avaldub ka valguekspressiooni indutseerimata. Selle süsteemi optimeerimiseks on kirjanduses välja pakutud palju erinevaid võimalusi. Üheks viisiks, kuidas ekspressioonitaset suurendada on suunatud mutageneesi käigus promootori ja translatsiooni alustamisregiooni järjestusi optimaalsemaks muuta. Lekkiva ekspressioni vastu on välja pakutud glükoosi lisamine standard söötmesse.

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse osas antakse ülevaade rekombinantsete valkude tootmisest erinevates süsteemides ja võimalustest valguekspressiooniga seotud probleemide lahendamisest *E.Coli*s. Eksperimentaalosa eesmärgiks oli vähendada basaalset ekspressioonitaset lisades söötmele glükoosi ja suurendada valguekspressiooni suunatud mutageneesi käigus pET-plasmiididelt.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Pluripotentsed tüvirakud ja nende kasvatamiseks vajalikud kasvufaktorid

Pluripotentsete tüvirakkude olulisteks tunnusteks on võime piiramatult jaguneda andes järglaseks samasuguste omadustega rakke ja võime diferentseeruda kõikideks kehas leiduvateks rakutüüpideks (Romito ja Cobellis, 2016). Pluripotentseid rakkke võib jagada embrüonaalseteks tüvirakkudeks (ESC) ja indutseeritud pluripotentseteks tüvirakkudeks (iPSC), millel on väga sarnased omadused, kuid erinevad saamisviisid (Bellin *et al*., 2012). Embrüonaalseid tüvirakke saadakse embrüote sisemisest rakumassist enne implantatsiooni, indutseeritud pluripotentseid tüvirakke aga täiskasvanud somaatiliste rakkude ümberprogrammeerimisel (Romito ja Cobellis, 2016). iPSC-de loomiseks kasutatakse kõige rohkem teatud transkriptsioonifaktorite üleekspressiooni, enim kasutatud trankriptsioonifaktorid on Oct4, Sox2, c-Myc ja Klf4 (Takahashi ja Yamanaka, 2006).
iPS rakkude uurimise teeb oluliseks asjaolu, et neil on väga laiad kasutusvõimalused, nende abil saab näiteks uurida arengu käigus toimuvaid füsioloogilisi protsesse, identsifitseerida uusi biomarkereid (Romito, Cobellis, 2016), modelleerida haiguseid (Bellin *et al*., 2012), testida uusi ravimikandidaate (Takahashi *et al.*, 2007) ning kasutada neid kahjustatud kudede ravis (Romito, Cobellis, 2016). Tüvirakkude kasvatamise muudab hetkel kulukaks selleks vajalik sööde, mis sisaldab kindlaid kasvufaktoreid. Kuo ja tema kolleegid optimeerisid ühte enim kasutatud E8 söödet, määrates kindlaks millised komponendid on vajalikud ja miks (2019). Välja töötatud B8 sööde on võrreldes kommertsiaalse söötmega 97% odavam. Kuo välja töötatud tüvirakkude söötmes kasutatakse kolme omatoodetud valku: fibroblastide kasvufaktor 2 ehk FGF2-G3, transformeeriv kasvufaktor B3 (TGFB3) ja neureguliini 1 derivaat (NRG1B1). Kõiki kolme valku saab tavalistes laboritingimustes *E.Colis* ekspresseerida, mis võimaldab söötme hinda oluliselt vähendada, kuna kasvufaktorid on söötme juures kõige kallim osa. (Kuo *et al*., 2019)

1.2 Rekombinantsete valkude tootmine

Valkude komplekse struktuuri tõttu on neid keemiliselt keeruline sünteesida, seetõttu toodetakse neid enamasti bioloogilistes süsteemides. Tavaliselt tehakse seda peremeesrakkude sees, kuid saadaval on üha rohkem ka rakuvabu ekspressioonisüsteeme. Valke, mida sünteesitakse peremeesrakus, aga mis on pärit mõnest teisest liigist, nimetatakse rekombinantseteks valkudeks, kuna neid kodeeriv DNA on rekombineeritud või

konstrueeritud. Esimene rekombinantne valk, mis kommertsiaalselt tootma hakati oli insuliin. Genentech sai USA Toidu- ja Ravimiametilt (FDA) heakskiidu rekombinantsele *E. coli*s toodetud iniminsuliinile 1982. aastal (Overton, 2014). Tänapäeval toodetakse rekombinantsete valkudena muuhulgas ka inimese kasvuhormoone, tsütokiine, vaktsiini komponente, monoklonaalseid antikehasid (Zhu, 2012). Tootmiseks on palju erinevaid ekspressioonisüsteeme, näiteks bakteri-, pärmi, putuka ja imetajate rakud ning ka rakuvabad ekspressioonisüsteemid. Valgud erinevad üksteisest suurel määral ja seetõttu tuleb valida süsteem lähtudes konkreetsest proteiinist. Structural Genomics Consortium jt sellealaste ekspertide koostöös koostatud dokumendis soovitatakse esimese süsteemina kaaluda *E.Coli*-t protsessi kiiruse ja lihtsuse tõttu. Süsteem sobib pigem valkude tootmiseks, mis on väiksemad, kui 60 kDa ja ei sisalda palju translatsioonijärgseid modifikatsioone (Structural Genomics Consortium *et al*, 2008). Kui soovitud valk on aga ulatuslikult translatsioonijärgselt modifitseeritud, siis valitakse korrektsete translatsioonijärgsete muudatuste saamiseks tavaliselt eukarüootne ekspressioonisüsteem (Walsh, 2010).

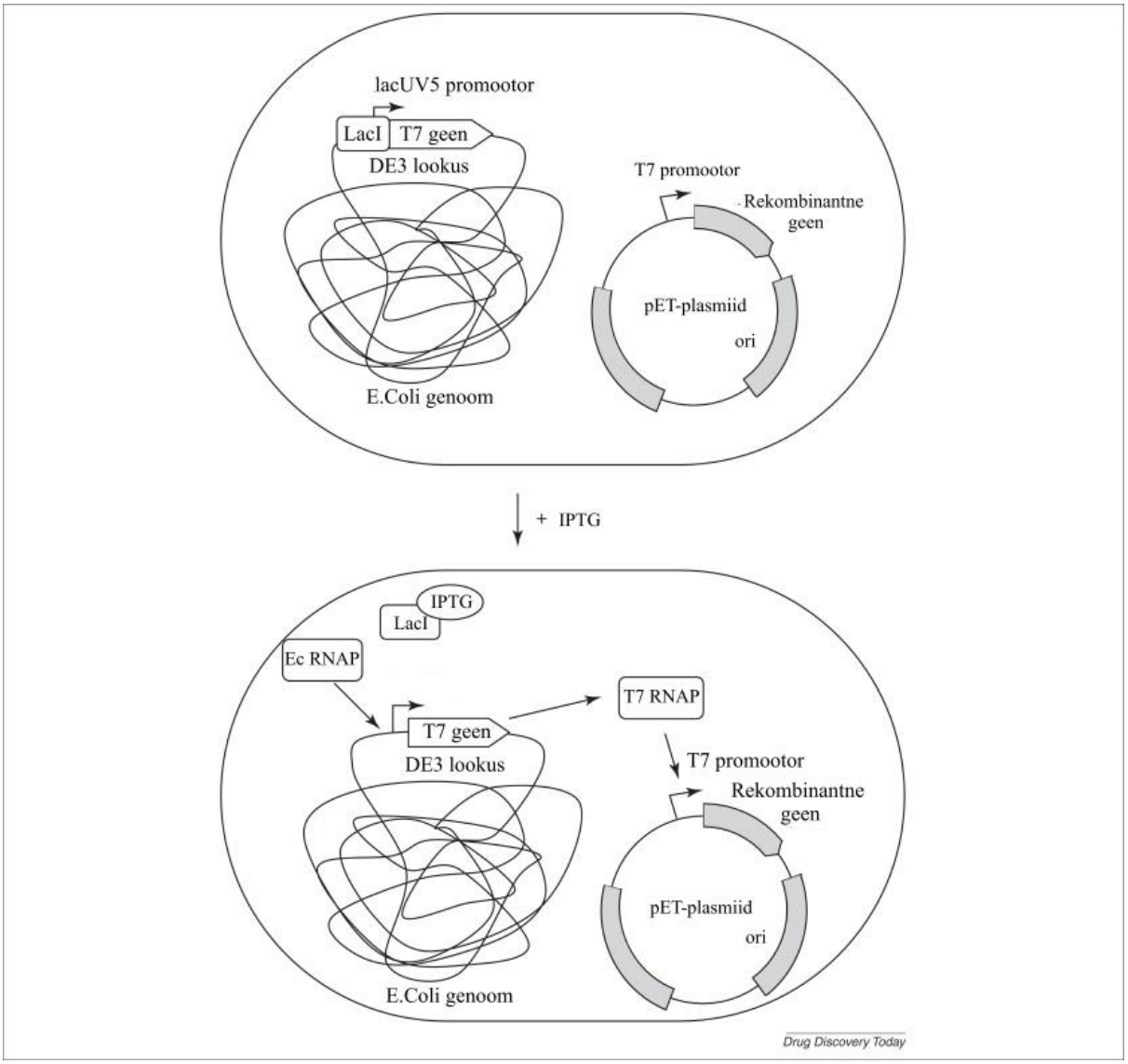
1.3 Valkude tootmine bakterites

Bakteritest kasutatakse valkude tootmiseks kõige enam *E.Coli*t, kuna see on füsioloogiliselt ja metaboolselt põhjalikult iseloomustatud ning selle kogu genoom on järjestatud (Blattner, 1997). Bakterite kasutamise esimene eelis on lihtsus ja odavus - madalad kulud tootmiseks kasutatava tüve loomisel, lihtsad kasvutingimused ning kiire tootmistsükkel (Zhu, 2012). Lisaks iseloomustab baktereid ka kõrge tootlikkus võrreldes imetajate ekspressioonisüsteemidega, mis võimaldab toota valku korraga suurtes kogustes (Zhu, 2012). Siiski on prokarüootsetel süsteemidel mitmeid piiranguid. Imetajavalke, mis sisaldavad translatsioonijärgseid modifikatsioone, on väga keeruline ekspresseerida (Mahmoud, 2007), kuna prokarüoodid ei modifitseeri valke translatsioonijärgselt samamoodi nagu näiteks inimrakud (Walsh, 2010). Ka bakteritel esinevad teatud translatsioonijärgsed modifikatsioonid, näiteks fosforüülimine, atsetüülimine ja glükosüülimine. Need modifikatsioonid erinevad aga eukarüootsetes rakkudes läbi viidavatest modifikatsioonidest ning nende sagedus prokarüootides on oluliselt madalam (Macek *et al.*, 2019). Ekpresseerimisel bakterisüsteemis on oluline valgu lahustuvus – valgud, mis ei ekspresseeru lahustuvas vormis, ei pruugi olla korralikult modifitseeritud või volditud ning võivad bakteri sees sadestuda inklusioonkehade moodustumise kaudu. Lahustuva valgu eduka ekspressiooni tõenäosus väheneb märkimisväärselt suurte valkude puhul molekulmassiga üle ~60 kDa (Structural Genomics Consortium *et al.*, 2008). Veel üks potentsiaalne probleem

eukarüootsete valkude tootmisel bakterites on erinev koodonkasutus. Probleem tuleneb sellest, et geneetiline kood on degenereerunud ja paljusid aminohappeid kodeerivad mitu koodonit. Iga organism kasutab eelistatult teatud koodoneid, seetõttu võivad, selles organismis vähem tavaliste koodonite kasutamisel, muutuda vastavad tRNA-d limiteerivaks, vähendades rekombinantse valgu tootmist (Overton, 2014). Sellele probleemile on saadaval kaks lahendust. Bakteris vähem levinuid tRNA-sid kodeerivaid järjestusi võib peremeesorganismi juurde viia kas plasmiidi kaudu või sisestades need kromosomaalsesse DNA-sse. Teise võimalusena võib enne geeni vektorisse kloonimist asendada rekombinantse geeni vähem levinud koodonid *E. coli* jaoks tavalisemate koodonitega (Burgess-Brown, *et al.,* 2008). Seega ühed olulisemad valgu saagikust määravad tegurid bakterites on ekspressioonitase, valkude lahustuvus ja koodonikasutus. Bakteriaalsed süsteemid on efektiivsed rekombinantsete valkude tootmiseks ja praegu tehakse palju tööd, et laiendada nende rakendust, võimaldamaks tõhusamat valgusünteesi, voltimist ja rakust väljutamist.

1.4 pET-plasmiidid

Vektoritena kasutati selle bakalaureusetöö eksperimentaalses osas pET-plasmiide. Need on ühed enim kasutatavad plasmiidid alates 1980. aastatest ja neid kasutatakse sageli just rekombinantsete valkude tootmisel (Shilling *et al.*, 2020; Overton, 2014). pET plasmiide kasutatakse *E.Coli* tüvedega, mis sisaldavad lüsogeniseeritud DE3 faagi fragmenti, mis kodeerib T7 RNA polümeraasi (Shilling, 2020). T7 RNA polümeraasi kodeeriv geen on lacUV5 promootori kontrolli all (Du *et al*., 2021). See konstrukt on sisestatud bakterikromosoomi DE3 lookusesse. lacUV5 promootor on IPTG (isopropüül-β-d-1-tiogalaktopüranosiidi) poolt idutseeritav, mis võimaldab ajalist kontrolli valgu tootmise üle (Overton, 2014). Üks sellel mehhanismil töötav sagedasti kasutatav *E. coli* tüvi on BL21 (DE3) (Du *et al*., 2021). Valguekspressiooni indutseerimine on võimalik, sest pET plasmiidil olev T7 promootor ei ole *E. coli* RNA polümeraasi poolt tugevalt aktiveeritud ja seetõttu sõltub huvipakkuva geeni ekspressioon IPTG-st. IPTG puudumisel on T7 geeni ees asuv lac promootor seotud lac repressoriga LacI, mis represseerib transkriptsiooni ja T7 RNA polümeraasi ei sünteesita. IPTG lisamisel vabaneb LacI lac promootori piirkonnast ning T7 RNA polümeraasi geenilt saab toimuda transkriptsioon. Seejärel aktiveerib T7 RNA polümeraas transkriptsiooni T7 promootorilt, millest allavoolu on kloonitud huvipakkuv rekombinantne geen (joonis 1) (Overton, 2014).



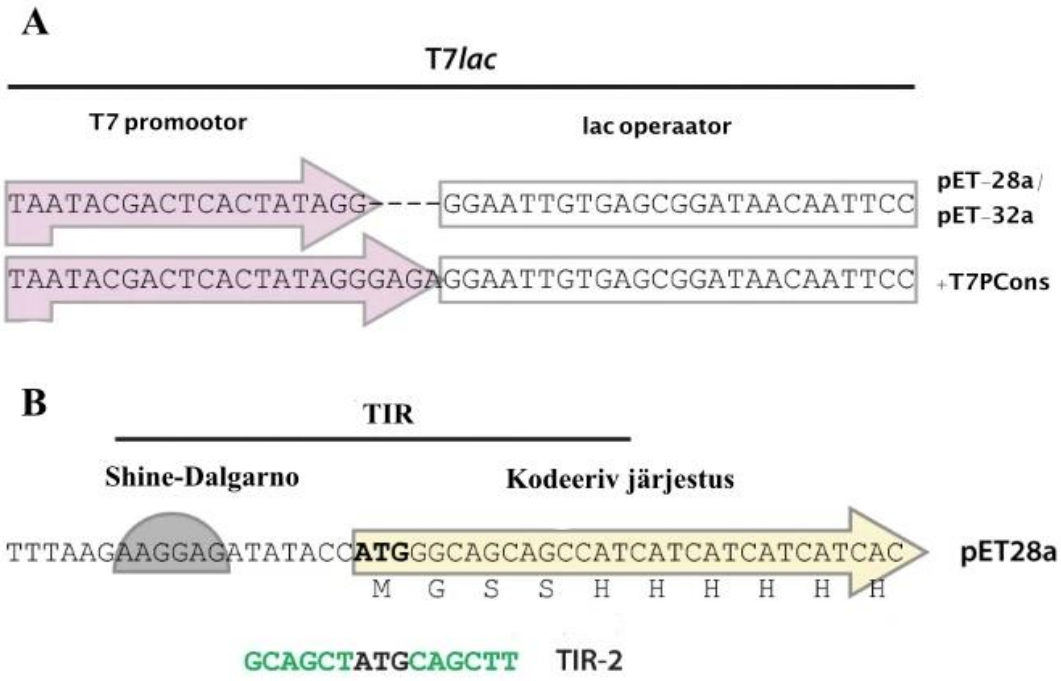
Joonis 1. IPTG-ga indutseeritav süsteem. Kohandatud Overton (2014) järgi. Lühendid: RNAP - RNA polümeraas, ori - replikatsiooni alguspunkt (*origin of replication*). Huvipakkuv rekombinantne geen on T7 promootori kontrolli all ja seda *E. coli* RNA polümeraas ei aktiveeri. Transkriptsiooniks on vaja T7 RNA polümeraasi (asub *E. coli* genoomis DE3 lookuses). T7 RNA polümeraasi ekspressiooni reguleerib lacUV5 promootor. Selle repressor on LacI. Rekombinantse geeni ekspresseerimiseks lisatakse süsteemi IPTG, mis on LacI ligand. IPTG-ga seondumisel vabastab LacI lacUV5 promootori, võimaldades *E. coli* RNAP-l transkribeerida T7 geeni, mis kodeerib T7 RNAP-d. Seejärel transkribeerib T7 RNAP rekombinantse geeni.

1.5 pET-plasmiidide kasutamise kitsaskohad ja võimalikud lahendused

Üks probleem pET-plasmiidide kasutamisel on lekkiv valgu ekspressioon ehk geen avaldub ka IPTG puudumisel. Seda võib põhjustada lekkiv T7 RNA polümeraasi tootmine IPTG puudumisel. Teine võimalik põhjus võib olla *E.Coli* RNA polümeraasi põhjustatud ekspressioon T7-promootorilt. (Overton, 2014). Kui rekombinantseid valke toodetakse mitteindutseeriva perioodi jooksul, saab *E. coli* kasutada kasvamiseks vähem ressursse, mis

pärsib kasvu. Tegemist on lisakoormusega bakterile, mis võib viia ka ekspressiooniplasmiidi kadumiseni või mutatsioonide ilmnemiseni ekspresseeritud geenis. (Du *et al*., 2021). Selle probleemi lahendamiseks on võimalik vektorisse lisada lac-operaatori järjestus, mis kattub T7-promootori järjestusega. Selle tulemusena seondub Lac-repressor promootoritega, mis reguleerib nii T7 RNA polümeraasi kui ka rekombinantse geeni ekspressiooni (Peränen, 1996). Alternatiivina võib kasutada plasmiide (pLysE/ pLysS), millelt ekspresseeritakse T7-lüsosüümi (Studier, 1991). T7 lüsosüüm moodustab spetsiifilise kompleksi T7 RNA polümeraasiga ja inhibeerib seda (Moffatt & Studier, 1987) ehk see lahendus sobib T7 RNA polümeraasi poolt põhjustatud lekkimise vaigistamiseks.

pET-plasmiidid sisaldavad Shillingu ja teiste (2020) kohaselt ka teisi vigasid. Nende uurimistöö keskendub pET-plasmiidides esinevate vigade parandamisele. T7-promootori järjestusest on plasmiidi disainimise käigus läinud kaduma neli nukleotiidi. Katsetulemuste kohaselt muudab nende nukleotiidide lisamine valguekspressiooni efektiivsemaks (joonis 2). Teine viga pET-28a plasmiidis on translatsiooni alustamise regioonis (TIR), mille tunneb ära ribosoom translatsiooni alustamiseks. Plasmiidi disainimisel on soovitud osad optimaalsust arvesse võtmata kokku liidetud. Antud katses leiti sünteetilise suunatud evolutsiooni meetodil optimaalsem TIR-järjestus, mis suurendab valguekspressiooni. Selleks tekitati järjestusse suvalisi mutatsioone ning tekitati suur hulk erinevaid TIR-järjestuse mutante. Seejärel katsetati neid variante läbi ning vaadati, millise variandiga on valguekspressioon kõige suurema saagisega. Leiti kaks sobivaimat TIR-järjestust: TIR-1 ja TIR-2. (Shilling *et al*., 2020), neist efektiivsem oli TIR-2 (joonis 2). Selles töös kasutatakse järgmisi plasmiide: pET-28a(+)-FGF2-G3, pET-32a(+)-NRG1B1, pET-32a(+)-TGFB3ga. PET-28a sisaldab nii ülalkirjeldatud T7-promootori järjestust kui ka TIR-järjestust. PET-32a plasmiidid sisaldavad küll samasugust T7-promootorit, kuid TIR-regioon on nendes teistsugune ja seetõttu oleks selle optimaalseima järjestuse väljaselgitamiseks vaja rohkem uuringuid ning siin töös seda osa ei muudetud.

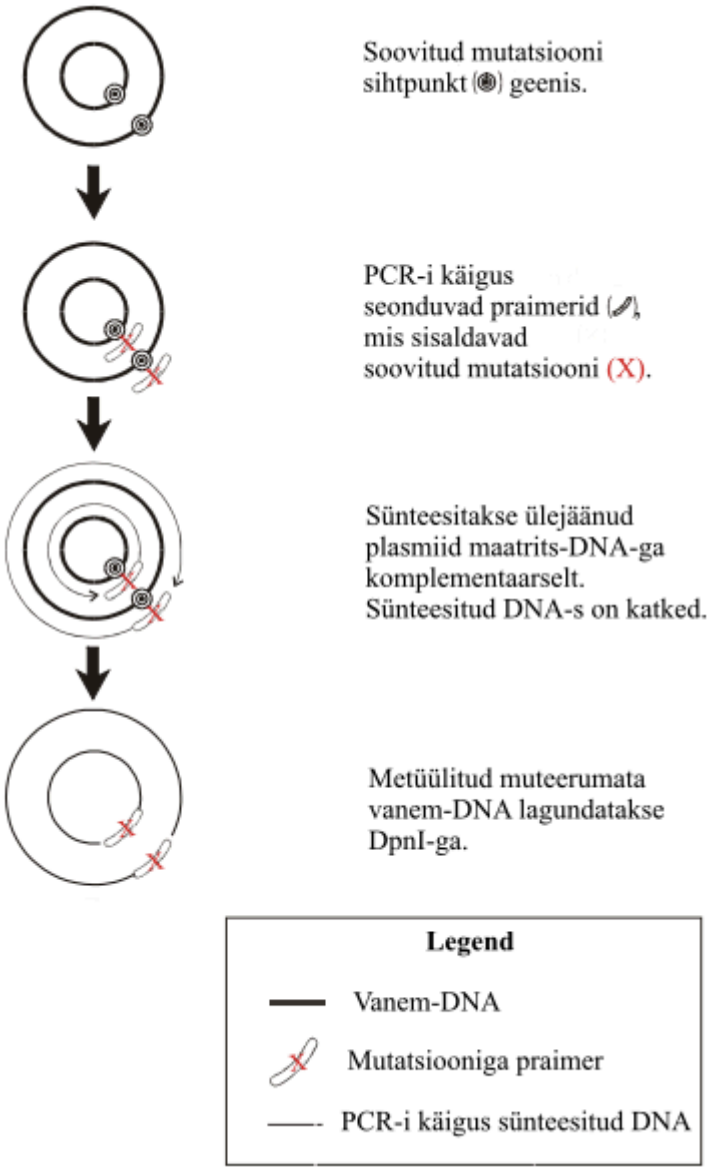


Joonis 2. Kohandatud Shilling *et al*. (2020) järgi. A) T7 promootori järjestuse soovitud mutatsioon (tähistatud T7PCons), B) TIR järjestuse soovitud mutatsioon (tähistatud TIR-2).

1.5.1 Plasmiidse DNA muutmine suunatud mutageneesiga

Suunatud mutageneesi käigus saab kasutada polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR), et sünteesida soovitud mutatsiooniga plasmiid. Suunatud mutageneesi läbiviimiseks PCR-i abil on palju erinevaid lähenemisviise, üks laialdaselt kasutatavaid meetodeid on QuikChange. Kasutatakse kahte omavahel komplementaarset praimerit, mis sisaldavad 5’ osas soovitud mutatsiooni (joonis 3). Praimerid seonduvad soovitud mutatsiooni kõrval olevale DNA järjestusele (selle järjestusega peavad need komplementaarsed olema). PCR-i käigus hakatakse ahelat pikendama ja plasmiidne DNA replitseeritakse koos mutatsiooniga. Mujal peale mutatsiooni koha on sünteesitud DNA-ahel vanemahelaga komplementaarne. (Edelheit ja Hanukoglu, 2009). Pärast PCR-i lisatakse restriktsiooniensüümi DpnI, mis lõikab ainult metüleeritud DNA-d. Kuna bakteris on DNA metüleeritud, PCR käigus sünteesitud DNA on aga metüleerimata, võimaldab see lagundada vanem-DNA, kus soovitud mutatsiooni ei ole. Seejärel viiakse plasmiid bakterisse transformatsiooni käigus. Selleks saab kasutada näiteks

kuumašokki. Suunatud mutageneesi PCR-i käigus on DNA-sse sisse jäänud katked, mis ligeeritakse *E. coli* ensüümide poolt transformatsioonijärgselt. (Liu ja Naismith, 2008).



Joonis 3. Kohandatud QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual (Agilent) järgi. Suunatud mutageneesi protsesside skemaatiline esitlus.

1.5.2 Spetsiifilised söötmelisandid

Söötmelisandiga on võimalik langetada lac promootori basaalset ekspressioonitaset. Efektiivne transkriptsiooni initsiatsioon nõuab cAMP-i (*cyclic adenosine monophosphate*) ja cAMP retseptorvalgu CAP-i (*catabolite activator protein*) olemasolu. CAP/cAMP kompleks seondub vahetult lac promootorist ülesvoolu CAP box järjestusele ja stimuleerib RNA polümeraasi transkriptsiooni. Kuna CAP-i seondumine DNA-ga nõuab cAMP-i, sõltub transkriptsiooni indutseerimine cAMP tasemest rakus. cAMP taset omakorda mõjutab oluliselt söötmes olev süsinikuallikas. Glükoosi juuresolekul on cAMP tase madal, seega on

transkriptsioon lac promootorilt madal. (Novy ja Morris, 2001). Seda saab ära kasutada, et lahendada basaalse valguekpressiooni probleemi, lisades standardsele LB söötmele glükoosi, et hoida cAMP taset madalal. LB-söötmele 0,5-1,0% glükoosi lisamine vähendab oluliselt basaalset transkriptsiooni. (Grossman *et al*., 1998). See võib olla eriti oluline pET-vektori ekspressiooni jaoks, kui peremeesorganismidel lastakse kasvada statsionaarsesse faasi, kus indutseerimata ekspressioon on maksimaalne (Grossman *et al.*, 1998; Kelley *et al.*, 1995). Glükoosi lisamine ei mõjuta valguekspressiooni indutseerimist IPTG-ga, kuid pärast esialgset kiiret kasvufaasi põhjustavad glükoosi metaboolsed produktid happelisuse tõusu ja see omakorda madalama rakutiheduse statsionaarses faasis. Selle lahendamiseks võib rakke kasvatada algselt glükoosi juuresolekul, kuid indutseerimiseks minna üle glükoosivabale standardsöötmele. (Novy ja Morris, 2001). Selle meetodi eelis on glükoosi odavus ja kättesaadavus, mistõttu peaks olema võimalik seda meetodit kasutada igas laboris.

Chhetri, Kalita ja Tripathi avastasid, et 3% etanooli lisamine söötmesse suurendab valguekspressiooni (2015). Antud meetod töötab T5- ja T7- promootoritega. Täpne molekulaarne protsess on veel teadmata, kuid Zheng ja teised (2019) leidsid, et etanool *E. coli* rakkudes aktiveerib maltoosi ABC transporteri, kuumašoki vastused ja propanoaadi metabolismi. Nende tulemuste kinnitamiseks on aga vaja veel edasisi uuringuid. Optimaalne etanoolilisandi kogus *E. coli* BL21 tüve jaoks 0,1 mM IPTG juures on 2% (Yu *et al.* 2016). Tegu on unikaalse lahendusega, mille saaks pärast tulemuste kinnitamist ka teistes laborites võtta kasutusele paljudes eri olukordades, kuna see meetod on odav (igas laboris leidub etanooli) ja universaalne (seda on võimalik kasutada kõikide pET-plasmiididega ja sünteesida mitmeid erinevaid valke).

2.0 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Antud töö eksperimantaalosa üldiseks eesmärgiks oli suurendada valguekspressiooni pET-28a(+)-FGF2-G3, pET-32a(+)-NRG1B1 ja pET-32a(+)-TGFB3 plasmiididelt. Selleks prooviti vähendada basaalset ekspressioonitaset lisades söötmele glükoosi ja suurendada valguekspressiooni pET-plasmiididelt kasutades suunatud mutageneesi, mis põhineb Shillingu jt (2020) avaldatud tulemustel.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Söötmed, bakteritüved ja plasmiidid

Selle bakalaureusetöö jaoks kavandatud katses kasutatud plasmiidid on tellitud Addgenest. Kasutati järgmiseid plasmiide:

●pET-28a(+)-FGF2-G3 - His_6-märgisega, kodeerib FGF2-G3 valku, Km-resistentsus

●pET-32a(+)-NRG1B1 - His_6-märgisega, kodeerib TrxA-NRG1B1 liitvalku, Amp-resistentsus

●pET-32a(+)-TGFB3 - His_6-mägisega, kodeerib TrxA-TGFB3 liitvalku, Amp-resistentsus

Bakteritüvedes olevate plasmiidide paljundamiseks kasvatati baktereid LB (Lysogeny Broth) vedelsöötmes (1% trüptoon, 0.5% pärmiekstrakt, 1% NaCl) või agarplaatidel (1% trüptoon, 0.5% pärmiekstrakt, 1% NaCl, 1,5% agar), mis sisaldasid vastavat antibiootikumi (50 µg/ml) Valgueksрessiooni indutseerimiseks kasutati kas LB või SOC-söödet (2% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$ ja 20 mM glükoos).

2.2.2 XL-1 BLUE kompetentsete rakkude tegemine

Suunatud mutageneesi järgseks transformatsiooniks kasutati kompetentseid XL-1 BLUE rakke, mis saadi QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit-ist (Agilent) ja mida tehti juurde järgneva protokolli järgi. LB-plaadilt võeti üks koloonia ja pandi kasvama 2 ml-sse LB-söötmesse. Kultuuri kasvatati loksutis temperatuuril 37 °C 180 rpm üleöö. 500 µl üleöö kasvatatud kultuuri inokuleeriti 50 ml LB-sse. Inkubeeriti 37 °C juures kuni OD600 oli 0,3 kuni 0,5. Kultuur kanti ümber 50 ml-sse tuubi ja jahutati jääl 10 minutit. Rakke tsentrifuugiti 10 minutit 4200 rpm temperatuuril 4 °C. Vedelik eemaldati. Resuspendeeriti 17 ml-s jahutatud RF1 puhvris (Lisa 2) õrnalt, kuni rakud olid ühtlaselt resuspendeeritud. Seejärel inkubeeriti rakke/ RF1 15 minutit jääl. Rakke tsentrifuugiti 15 minutit 1950 p/min temperatuuril 4 °C. Vedelik eemaldati ja rakud resuspendeeriti õrnalt 4 ml-s RF2 puhvris (Lisa 2). Rakke/RF2 inkubeeriti 15 minutit jääl. Rakud jagati 100 µl kaupa 1,5 ml eppendorfi tuubidesse ja külmutati kuival jääl.

2.2.3 Suunatud mutagenees

2.2.3.1 PCR mutatsioonide sisseviimiseks

Suunatud mutageneesi läbiviimiseks kasutati QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit-i (Agilent) vastavalt tootja protokollile või sellest tuletatud järgnevat protokolli. 200 µl eppendorfi tuubi pipeteeriti 5 µl 10× reaktsioonipuhvrit, 10 ng dsDNA matriitsi (vastavat plasmiidi), 1,25 µl (125 ng) vastavat FWD praimerit , 1,25 µl (125 ng) RWD praimerit , 1 µl 2,5 mM dNTP segu, ddH2O lõppmahuni 50 µl. Seejärel lisati 1 µl PfuUltra HF DNA polümeraasi (2,5 U/µl), segu suspendeeriti ja sellega viidi läbi PCR-i programm, mille parameetrid on leitavad tabelist 1. Promootori järjestuse mutatsiooni tekitamiseks pET-28a(+)-FGF2-G3, pET-32a(+)-NRG1B1 ja pET-32a(+)-TGFB3 plasmiidides kasutati praimereid T7P_FWD ja T7P_RVS. TIR-järjestuse mutatsiooni tekitamiseks pET-28a(+)-FGF2-G3 plasmiidis kasutati praimereid TIR_FWD ja TIR_RVS. Topeltmutatsiooniga plasmiidi saamiseks tehti kaks eraldi PCR-i, võttes viimase PCRi alustamiseks juba mutatsiooniga plasmiidi Praimerite järjestused on välja toodud tabelis 2.

Tabel 1. PCR-i programm suunatud mutageneesi jaoks.

Segment	Tsükleid	Temperatuur	Aeg
1	1	95°C	30 sekundit
2	18	95°C	30 sekundit
		55°C	1 minut
		68°C	6 minutit
3	1	4°C	lõpmatuseni

Tabel 2. Suunatud mutageneesi jaoks kasutatud praimerid 5’ 3’ suunas.

Nimi	Järjestus
T7P_FWD	CTATAGGGAGAGG
T7P_RVS	CCTCTCCCTATAG
TIR_FWD	AACTTTAAGAAGGAG
TIR_RVS	CTCCTTCTTAAAGTT

2.2.3.2 Restriktsioon

PCR-i tulemusena saadavas produktis on nii soovitud mutatsioone sisaldavaid plasmiide kui ka vanem-DNAd, mida kasutati maatritsana. Soovitud on plasmiidid, mis on PCR-i käigus sünteesitud, sest need sisaldavad soovitud mutatsiooni, vanem-DNA aga mutatsiooni ei sisalda. Kuna bakterites on DNA metüleeritud, on võimalik vanem-DNA-st lahti saada, lisades PCR-i produktile DpnI restriktsiooniensüümi, mis lõikab üksnes metüleeritud DNA-d.

2.2.3.3 Transformatsioon

Keemiliselt kompetentsed rakud (iga reaktsiooni kohta 100 µl) sulatati jääl. Rakkudele lisati 1 µl Dpn I-ga töödeldud DNA-d ja suspendeeriti ning hoiti 30 minutit jääl. Transformatsioonireaktsioone kuumutati 45 sekundit 42 °C juures ja seejärel asetati reaktsioonid 2 minutiks jääle. Lisati 0,5 ml LB-söödet ja transformatsioonireaktsioone inkubeeriti üks tund 37 °C juures, loksutades kiirusel 180 pööret minutis. 250 µl iga transformatsioonireaktsiooni kanti agariplaadile, mis sisaldab plasmiidvektori jaoks sobivat antibiootikumi (pET-28a jaoks kanamütsiin ja pET-32a jaoks ampillitsiin). Transformatsiooniplaate inkubeeriti üleöö temperatuuril 37 °C.

2.2.4 Miniprepid

Bakterite kultuuri kasvatati loksutis 2 ml-s LB söötmes koos sobiva antibiootikumiga (kanamütsiin/ ampillitsiin) temperatuuril 37 °C 180 rpm üleöö. Rakud fuugiti lauatsentrifuugis 1 minutiga (13 000 rpm) 1,5 ml-s tuubis põhja (kaks korda). Supernatant eemaldati. Igasse tuubi lisati 100 µl resuspendeerimislahust (P1 puhver) ja suspendeeriti. Edasi lisati 100 µl lüüsilahust (P2 puhver) ja segati 5-6 korda tuubi ettevaatlikult tagurpidi pöörates. Järgmisena lisati 150 µl neutraliseerivat lahust (P3 puhver) ja segati jälle tuube 5-

6 korda tagurpidi pöörates. Tuube tsentrifuugiti 10 minutit (13 000 rpm). Supernatatnt pipeteeriti ümber uude 1,5 ml eppendorfi tuubi. Igasse tuubi lisati võrdne kogus (300 µl) isopropanooli ja tuub pöörati paar korda teistpidi. DNA sadestati tsentrifuugides 10 minutit 13 000 rpm. Supernatant eemaldati. Pesemiseks lisati 500 µl 70% etanooli, tsentrifuugiti jälle 10 minutit 13 000 rpm. Supernatant eemaldati ja tuubid jäeti lahtise kaanega umbes 10 minutiks 37 °C termoblokki kuivama. DNA suspendeeriti 50 µl TE puhvris.

2.2.5 Sangeri sekveneerimine

Plasmiide järjestust kontrolliti Sangeri sekveneerimise meetodil Tartu Ülikooli Genoomika instituudi tuumiklaboris. Sekveneerimisel kasutati praimerit pET2832_F järjestusega CTCATGAGCCCGAAGTGG. Saadud sekventside järjestuse joondamine teostati veebipõhise programmiga Benchling.

2.2.6 Valgueksпressiooniks kompetentsete rakkude tegemine

Valgueksпressiooniks kasutati BL21 (DE3) RIL tüve, mis saadi biokeemia õppetoolist prof. Juhan Sedmanilt. Kompetentsed rakud tehti vastavalt alapunktis 2.2.2 välja toodud protokollile.

2.2.7 Valkude ekspresseerimine

Kõigepealt tehti transformatsioon sama protokolli järgi, mis on välja toodud punktis 2.2.4. Seejärel võeti igalt LB-plaadilt üks koloonia ja pandi kasvama 2 ml-sse LB-vedelsöötmesse koos sobiva antibiootikumiga. Kultuuri kasvatati loksutis temperatuuril 37 °C 180 rpm üleöö. Järgmisel päeval inokuleeriti 500 µl kultuuri 2 ml LB-sse. Mõõdeti OD 600 ja baktereid kasvatati loksutis temperatuuril 37 °C 180 rpm, mõõtes iga tunni tagant tihedust, kuni see oli vahemikus 0,6-0,8. OD 600 väärtust mõõdeti NanoDrop One spektrofotomeetriga (Thermo Scientific, USA). Seejärel indutseeriti valgueksпressioon lisades IPTG-d lõppkontsentratsioonis 0,6 mM (Thermo Scientific, USA) ja kõiki kasvatati samadel tingimustel loksutis veel 4 tundi. Bakterisuspensiooni tsentrifuugiti 5000 g juures 10 minutit ja aspireeriti supernatant. Bakterisade hoiustati -20 °C juures.

2.2.8 SDS-polüakrüülamiid geelelektroforees

Valkude ekspressiooni kontrollimiseks tehti SDS-polüakrüülamiid geelelektroforees. Bakterisade suspendeeriti 50 µl-s 1x PBS lahuses. Sellele lisati 950 µl Laemmli lahust (50% glütserool, 10% SDS, 1M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% broomfenool sinine) ja suspendeeriti ning

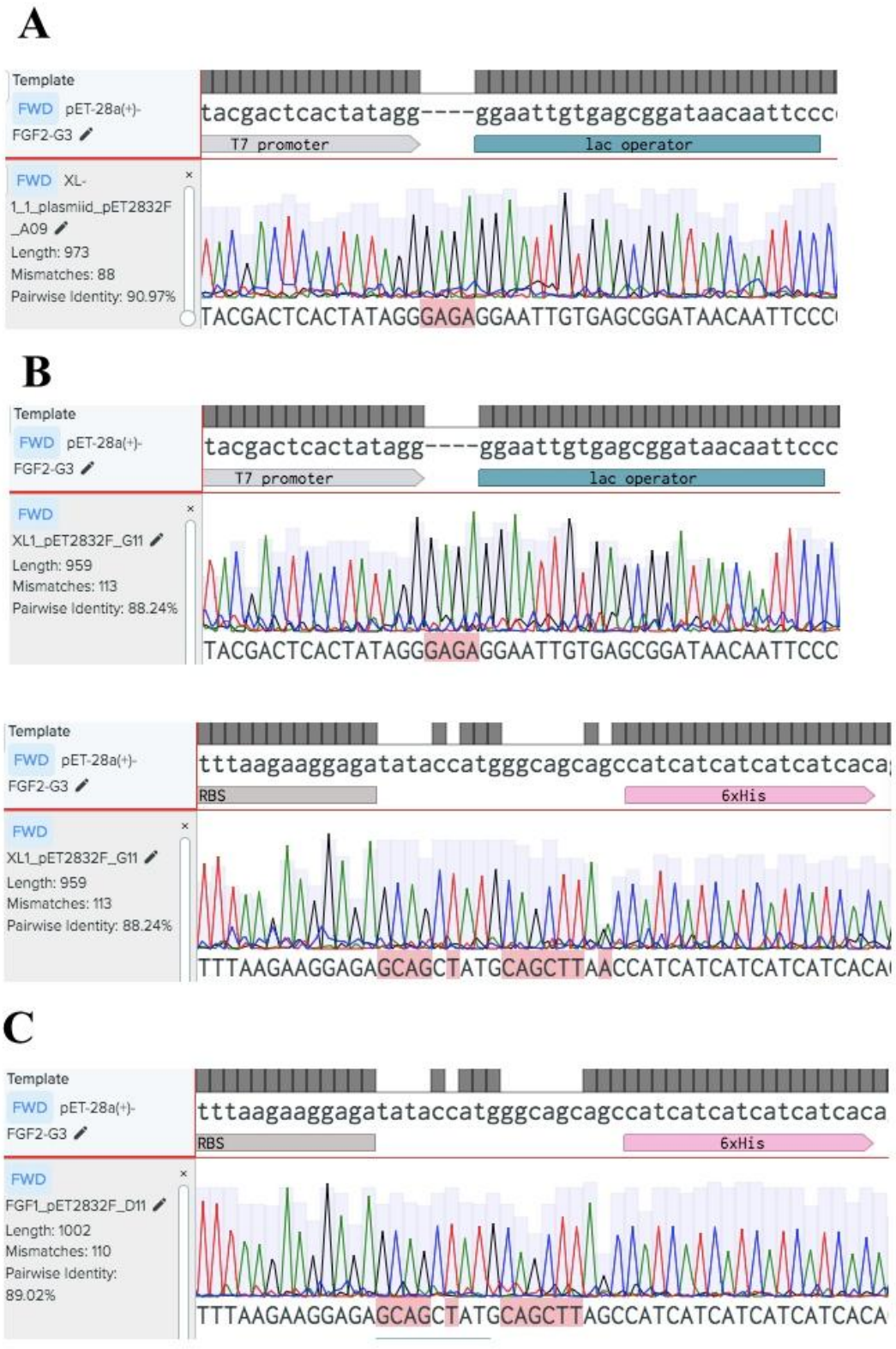
lisati 50 µl 99% merkaptoetanooli. Proove kuumutati 95°C juures 10 minutit. Valkude lahutamiseks kasutati 10 või 15% SDS-polüakrüülamiid geeli. Markerina kasutati 5 µl PageRuler Prestained Protein Ladder'it (Thermo Scientific, USA). Proove kanti geelile samuti 5 µl. Valguproove jooksutati 15 minutit 50 V ja 60 minutit 120 V juures. Seejärel loputati valgugeeli paar korda destilleeritud veega ja värviti loksutil Coomassie Blue värvilahusega (0,2% Coomassie Brilliant Blue, 50% metanool, 10% äädikhape) 1 tund. Üleliigse värvi eemaldamiseks pesti geeli loksutil 50% metanooli ja 10% äädikhapet sisaldava puhvriga, lahust mitu korda vahetades. Saadud valgumuster jäädvustati pildistades.

2.3 Tulemused

2.3.1 Suunatud mutageeneesi tulemused.

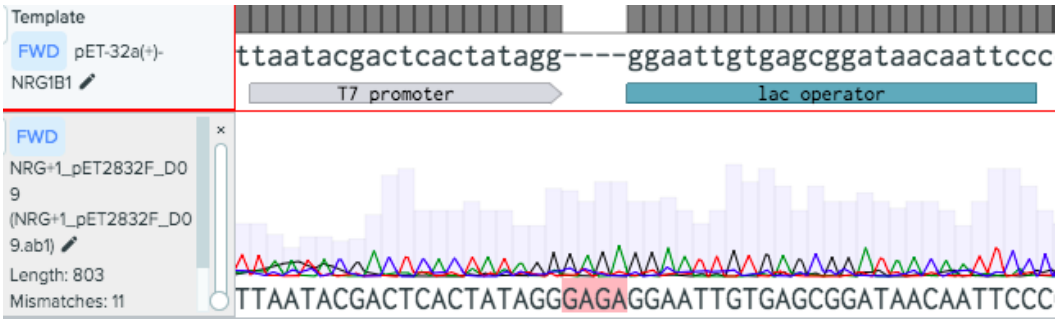
Pärast suunatud mutageneesi PCR-i käigus, vanem-DNAst vabanemist DpnI restriktsiooniga, transformatsiooni ja minipreppide valmistamist, kontrolliti plasmiide järjestust Sangeri sekveneerimise meetodil Tartu Ülikooli Genoomika instituudi tuumiklaboris. Kui sekveneerimistulemuste põhjal soovitud mutatsiooni/ mutatsioone plasmiidis ei esinenud, korrati mainitud etappe, kuni kõik soovitud mutatsioonid olid plasmiididesse sisestatud (Lisa 3). Tekitati T7 promootori järjestuse ja TIR järjestuse mutatsioone (joonis 2). pET-28a(+)-FGF2-G3 plasmiidist tekitati kolm erinevat plasmiidi: üks promootori järjestuse mutatsiooniga (joonis 4 paneel A), üks TIR järjestuse mutatsiooniga (joonis 4 paneel C) ja üks, millesse viidi mõlemad mutatsioonid (joonis 4 paneel B). Plasmiididesse pET-32a(+)-NRG1B1 ja pET-32a(+)-TGFB3 tekitati kummassegi ainult T7 promootori mutatsioon (joonis 5, joonis 6).

pET-28a(+)-FGF2-G3



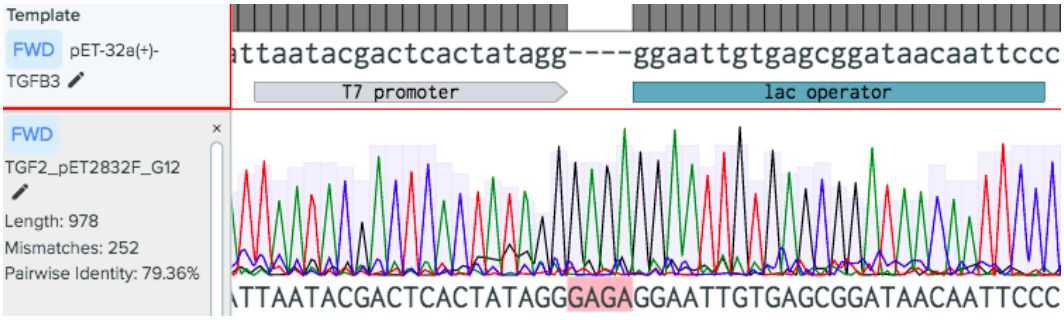
Joonis 4. Sangeri sekveneerimise tulemused pET-28a(+)-FGF2-G3 plasmiidile suunatud mutageneesi käigus tekitatud mutatsioonide kontrollimiseks. A) T7-promootori mutatsiooniga plasmiid B) T7-promootori ja TIR mutatsioonidega plasmiid C) TIR mutatsiooniga plasmiid.

pET-32a(+)-NRG1B1



Joonis 5. Sangeri sekveneerimise tulemused pET-32a(+)-NRG1B1 plasmiidile suunatud mutageneesi käigus tekitatud T7-promootori mutatsiooni kontrollimiseks.

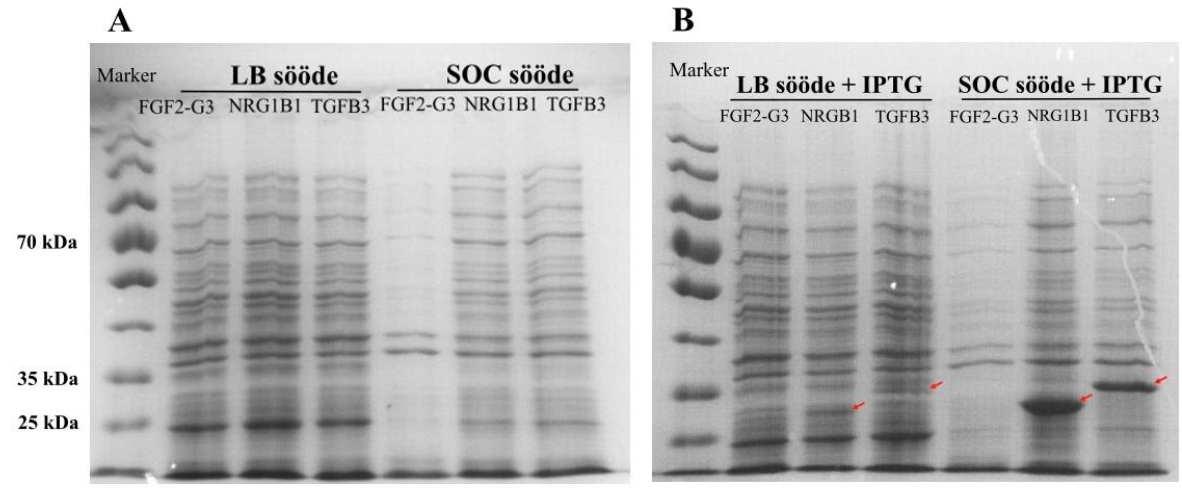
pET-32a(+)-TGFB3



Joonis 6. Sangeri sekveneerimise tulemused pET-32a(+)-TGFB3 plasmiidile suunatud mutageneesi käigus tekitatud T7-promootori mutatsiooni kontrollimiseks.

2.3.2 Glükoosirohke söötme mõju valgueksрessioonile

Baktereid kasvatati ja valgueksрessioon indutseeriti võrdlevalt LB-söötmes ja glükoorirohkes SOC-söötmes ning valgueksрessiooni kontrolliti SDS-polüakrüülamiid geelil.



Joonis 7. Valgueksрessioon 10% SDS-polüakrüülamiid geelil LB-söötmes kasvatatud bakterites ja SOC-söötmes kasvatatud bakterites. A) ilma IPTG-ga indutseerimata b) pärast IPTG-ga indutseerimist.

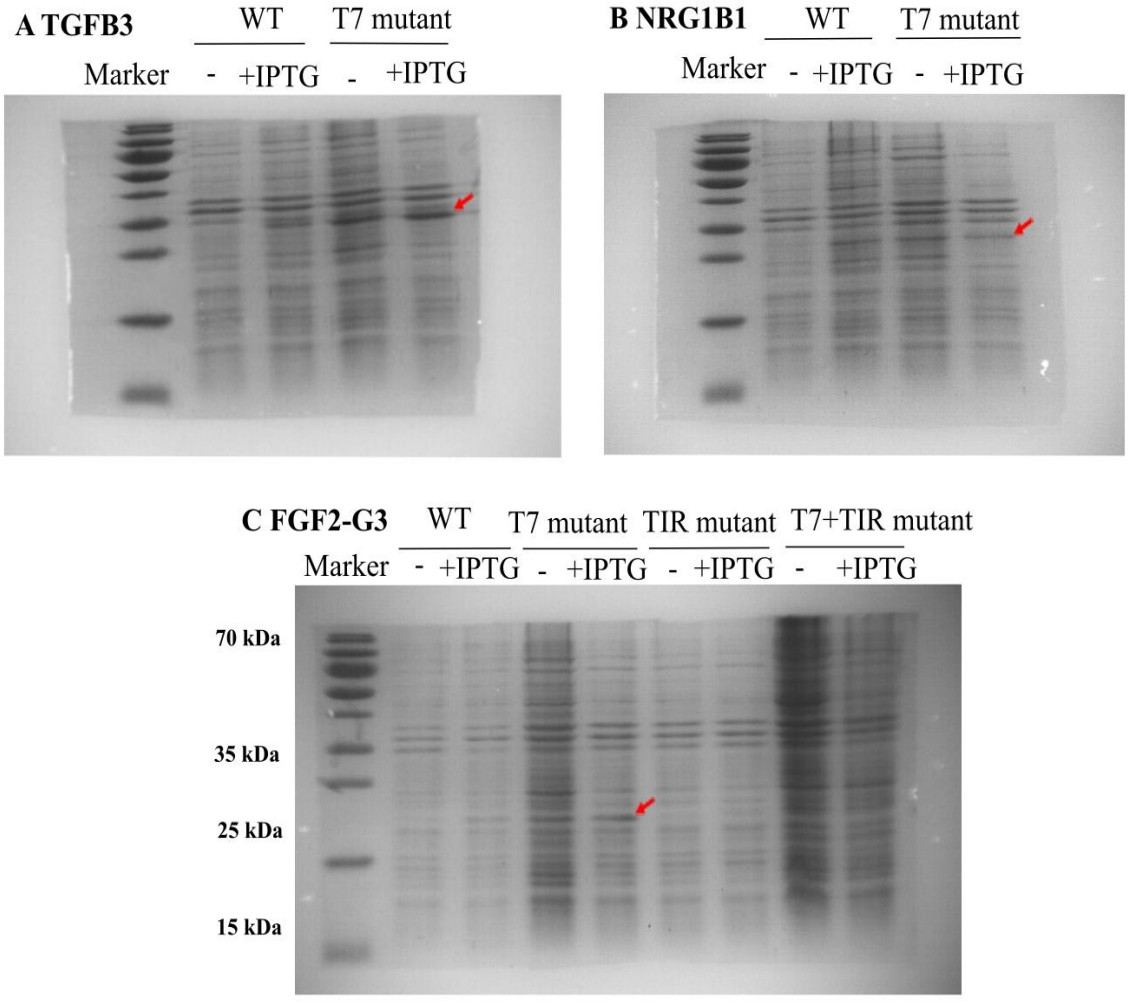
Jooniselt 7 on näha, et SOC-söötmes kasvatades ja IPTG-ga indutseerides oli geelil selgelt näha NRG1B1 valku ja TGFB3 valku (joonis 7 paneel B). Valkude geeli pildi järgi hinnatavad suurused ühtivad umbkaudu valgu aminohappelise järjestuse põhjal ennustatud suurustega (tabel 3). Ilma IPTG-d lisamata soovitud valke LB-söötmes ega SOC-söötmes kasvatades näha polnud ehk selles katses märgatavat valgueksрessiooni lekkimist ei toimunud. FGF2-G3 valk ei ole selgelt tuvastatav ka pärast SOC-söötmes kasvatamist ja IPTG-ga indutseerimist. Seda võis põhjustada liiga madala kontsentratsiooniga PAGE geeli kasutamine, kuna FGF2-G3 on väiksema molekulmassiga kui NRG1B1 ja TGFB3 ja antud geelil ei ole väikesed valgud hästi lahutunud. Samuti on geelilt näha, et eriti FGF2-G3 plasmiidi sisaldavad bakterid kasvasid glükoosi sisaldavas söötmes aeglasemalt, millele viitab väiksem valkude kogus geelil.

Tabel 3. Valkude teoreetiline suurus.

Valk	**Teoreetiline suurus (kDa)**
FGF2-G3	20,9
NRG1B1	25,3
TGFB3	30,4

2.3.3 Mutatsiooniga plasmiidide geelelektroforeesi tulemused

Eelmistest tulemustest lähtuvalt kasutati selles katses SOC söödet ja 15% SDS-polüakrüülamiid geeli. Võrreldi valgueksprессiooni *wild type* ja mutatsioonidega plasmiidides indutseerides valgueksprессiooni IPTG-ga.



Joonis 8. Valgueksprессioon mutatsiooni(de)ga ja mutatsiooni(de)ta plasmiididelt ilma IPTG-ga indutseerimata ja pärast IPTG-ga indutseerimist 15% SDS-polüakrüülamiid geelil SOC-söötmes kasvatatud bakterites. A) TGFB3 valk, B) NRG1B1 valk, C) FGF2-G3 valk. WT - wild type plasmiid.

Jooniselt 8 on näha, et kuigi rekombinantsete valkude induktsioon on selles katses madal, saab promootori mutatsiooniga plasmiididelt rohkem rekombinantset valku, näiteks võrreldes A paneelis TGFB3 valgu kogust *wild type* +IPTG rajas T7 +IPTG rajaga. Antud katse põhjal paistab aga, et mutatsioonidega plasmiididelt toimub rohkem ekspressiooni lekkimist (paneel A TGFB3 T7 mutandi ehk promootori mutatsiooniga plasmiidiga valguekspressioon, mida ei indutseeritud IPTG-ga ja TGFB3 T7 mutant + IPTG ehk promootori mutatsiooniga plasmiidiga valguekspressioon, mida indutseeriti IPTG-ga). TIR järjestuse muutmisel ei paista olevat märgatavat mõju valguekspressioonile (joonis 8 paneel C rajad FGF2-G3 TIR mutant ja FGF2-G3 TIR mutant +IPTG). Huvitaval kombel ei olnud valguekspressiooni suurenemist näha ka topeltmutatsioonidega plasmiidilt.

2.4 Arutelu

Transkriptsiooni initsiatsiooni jaoks lac promootorilt on vaja CAP/cAMP kompleksi, mis stimuleerib RNA polümeraasi transkriptsiooni. cAMP taset omakorda mõjutab oluliselt söötmes olev süsinikuallikas. Glükoosi juuresolekul on cAMP tase madal, seega on transkriptsiooni tase samuti madal. Seetõttu vähendab LB-söötmele 0,5-1,0% glükoosi lisamine oluliselt basaalset transkriptsiooni. (Novy ja Morris, 2001). Novy ja Morrise katsete tulemused näitasid, et ka IPTG poolt indutseeritud valguekspressioon paranes glükoosi juuresolekul. Sarnast efekti täheldati ka selles katses. Seda meetodit kasutades võib aga esineda ka teatud puudusi. Glükoosi metaboolsed produktid tõstavad happelisust, mis põhjustab madalamat rakutihedust statsionaarses faasis. Antud efekti oli näha ka selles töös, kus võrdlevas katses LB ja SOC söötmes kasvasid rakud glükoosi juuresolekul aeglasemalt, seda eriti FGF2-G3 plasmiidi puhul. Kirjanduse andmetel on mõnel juhul võimalik saavutada kõrgem rekombinantse valgu ekspressioon glükoosi puudumisel, näiteks. Griko *et al.* läbi viidud katses, kus üleekspreseeritava rekombinantse valgu ehk kadheriini ekspressioonitase oli oluliselt kõrgem, kui induktsioon IPTG-ga viidi läbi ilma glükoosita (2001). Millest täpsemalt sõltub glükoosi mõju (kas kasutatavatest plasmiididest, bakteritüvedest ja/ või ekspreseeritavast valgust) vajab edasist uurimist. Ühe variandina tasub proovida SOC söötme vahetamist LB söötme vastu IPTG lisamise ajal.

T7 promootori järjestus pET-plasmiididest tuleneb φ10 promootorist T7 faagis, mis on 23 nukleotiidi pikk ja vahemikus -17 kuni +6 mRNA alguskoha suhtes (Dunn *et al*., 1983). pET28a ja teised pET-plasmiidid sisaldavad ainult -17 kuni +2 piirkonda, kuna neli nukleotiidi kaotati, kui lac operaator järjestus algselt pET-plasmiididesse sisestati (Shilling

et al., 2020). Hilisemad uuringud näitasid, et nelja nukelotiidi kaotamine promootori järjestusest vähendab transkriptsiooni initsiatsiooni efektiivsust (Lopez *et al*., 1997). Shilling *et al*. said nelja nukleotiidi lisamisel pET-28a plasmiidilt kolm korda suurema saagise soovitud valku (sfGFP) tüves BL21(DE3) pLysS- ja sarnaseid tulemusi saadi ka teiste tüvede ja pET-plasmiididega. Ka selle töö eksperimentaalosas tehtud katses saadi suurem saagise valku plasmiididelt, mille promootori järjestusse olid need neli nukleotiidi lisatud.

Muudeti ka TIR järjestust, mis on ~30 nukleotiidist koosnev järjestus, mille tunneb ära 30S ribosomaalne subühik translatsiooni initsiatsiooni alguses. Natiivses *E. coli* mRNA-s sisaldab TIR Shine Dalgarno järjestust, mille pikkus on viis kuni üheksa nukleotiidi ja kodeeriva järjestuse viit esimest koodonit (Chen, 1994; Reeve, 2014). Scharff *et al*. avastasid, et natiivsed TIR-id on arenenud koos *E. coli* ribosoomidega ja on võrreldes ülejäänud kodeeriva järjestusega vähem tõenäoline, et need moodustavad kohalikke mRNA struktuure (2011), mis omakorda teeb järjestuse translatsiooni alguses 30S subühikule kättesaadavamaks (Kudla, 2009). TIR järjestused pET plasmiidides on kokku pandud võtmata arvesse koevolutsiooni *E. coli* ribosoomidega. Shilling *et al.* rakendasid sünteetilist evolutsiooni, et tuvastada TIR, mis sobiks paremini peremeesraku ribosoomidega ja leidsid järjestuse (TIR-2), mis suurendas valgu tootmist kuni 47 korda (Shilling *et al*., 2020). Sama järjestust saab kasutada lisaks pET-28a plasmiidile ka pET14b, pET15b ja pET28b–c, plasmiidides, sest nendel plasmiididel on sama TIR järjestus. Sünteetilist evolutsiooni saaks rakendada ka teistes pET-plasmiidides, et leida iga pET-plasmiidi jaoks bakteri ribosoomidega sobivaim järjestus. Selles töös tehtud katse tulemused seda ei kinnitanud, nende põhjal ei paista TIR järjestuse Shilling *et al*. järgi muutmisel olevat märgatavat mõju FGF2-G3 valgueksressioonile.

Tehtud katseid tuleks kindlasti korrata, kuna katse vahel esines ka samadel tingimustel oluline variatsioon valgueksressiooni efektiivsuses. Mutatsioonidega plasmiididelt valgueksressiooni võiks võrdluseks indutseerida ka LB-söötmes ja uurida, kas promootori mutatsioon põhjustab suuremat lekkimist. Edasistes katsetes peaks proovide valgusisalduse enne SDS-polüakrüülamiid geelile kandmist ühtlustama. Veel tuleks testida ka seda, kas valgud ekspresseerusid lahustunud kujul, sest valgud, mis ei ekspresseeru lahustuvas vormis, ei pruugi olla korralikult modifitseeritud või volditud.

KOKKUVÕTE

Tüvirakkudel on väga laiad kasutusvõimalused nii teadusuuringutes kui ka meditsiinis. Tüvirakkude kasvatamise muudab kulukaks selleks vajalik sööde, mis sisaldab kindlaid kasvufaktoreid. Kuo ja tema kolleegid töötasid välja söötme, milleks on vaja kolme ise toodetud kasvufaktorit ja mis on võrreldes kommertsiaalse söötmega 97% odavam (2019). Selles töös ekspresseeriti neid kolme tüvirakkude kasvatamise jaoks vajaliku kasvufaktorit *E. coli*s. Ühed olulisemad valgu saagikust määravad tegurid bakterites on ekspressioonitase (mida mõjutavad erinevad tegurid nagu promootoris esinevad DNA motiivid ja koodonkasutus) ning valkude lahustuvus. Selles töös tegeleti ekspressioonitaseme optimeerimisega. Shilling *et al*. artikli (2020) järgi muudeti pET-plasmiidide promootori järjestust, millest plasmiidide disainimise käigus on kaduma läinud neli nukleotiidi ja TIR-järjestust, et see sobiks paremini peremeesraku ribosoomidega. Lisaks viid läbi katse, kus söötmele lisati glükoosi, mis varasemate uuringute põhjal vähendab lac promootorilt valgueekspressiooni lekkimist.

Antud lõputöös tehtud katsete põhjal selgus, et glükoosi lisamisel söötmesse paranes IPTG poolt indutseeritud valgueekspressioon. Samuti suurendas valgu saagist promootori järjestusse nelja nukleotiidi lisamine. TIR järjestuse muutmine aga valgueekspressiooni märgatavalt ei suurendanud. Promootori järjestuse muutmist saaks kasutada ka teiste pET-plasmiididega. Antud katseid tuleks korrata ja veel tuleks testida seda, kas valgud ekspresseeruvad lahustunud kujul.

Optimization of protein expression by pET plasmids

Katariina Kordemets

Summary

Proteins that are synthesized in a host cell but originate from another species are called recombinant proteins. Today, human growth hormones, cytokines, vaccine components, monoclonal antibodies, among others, are produced as recombinant proteins. Proteins differ greatly from each other, and therefore the expression system must be chosen based on the particular protein of interest. One of the most widely used expression systems for protein production is *E. coli*. Depending on the protein, the production of it in *E. coli* can have significant drawbacks, such as low expression level and leaking of the inducible systems. pET-plasmids are commonly used as expression vectors in bacteria and were also used in the experimental part of this work to express three growth factors that are being used in media to grow embryonic stem cells. One way to increase expression levels is to optimize the sequences of the promoter and translation initiation region from pET-plasmids using mutagenesis. Against leaky basal expression, the addition of glucose to the standard medium has been proposed.

The aim of this study was to reduce basal expression levels by adding glucose to the medium and increase protein expression from pET plasmids by site-directed mutagenesis of promoter elements.

The experiments performed in this research concluded that glucose seemed to enhance IPTG mediated protein induction from the pET-plasmids. After adding four nucleotides to the promoter sequence in pET-plasmids higher yields of proteins were obtained. The protein expression seemed to be leakier in the plasmids with the mutated promoter sequence which is something that should be studied further. Changing the TIR sequence did not seem to have any effect on the protein expression. It should also be tested whether the proteins were expressed in soluble form as insoluble proteins are difficult to purify and may not be properly modified or folded.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada esiteks oma juhendajat Tõnis Orgu, kes igas olukorras rahulikuks ja sõbralikuks jäi ja kõike vajadusel väga hästi seletas. Samuti tahan tänada Merle Külaotsa, kes oli mind alati valmis aitama ja kes mulle lõputöö tegemisel suureks toeks oli. Tänan ka Annika Treid, kes mind õpetas kompetentseid rakke valmistama ja ka muudes asjades nõu andis. Lisaks soovin tänada Rita Kreevani, kes vajadusel laboris mu küsimustele vastas ja näitas, kus asjad asuvad.

KASUTATUD KIRJANDUS

Bellin, M., Marchetto, M. C., Gage, F. H., Mummery, C. L. (2012). Induced pluripotent stem cells: the new patient?. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 13, 713–726.

Blattner F. R., Plunkett G. III, Bloch A. B., …, Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science, 277, 1453-1462.

Burgess-Brown, N. A., Sharma, S., Sobott, F., Loenarz, C., Oppermann, U., Gileadi, O. (2008). Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: a multi-gene study. Protein Expr. Purif., 59, 94-102.

Chen, H., Bjerknes, M., Kumar, R. & Jay, E. (1994). Determination of the optimal aligned spacing between the Shine–Dalgarno sequence and the translation initiation codon of Escherichia coli mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 22, 4953–4957.

Chhetri, G., Kalita, P., Tripathi, T. (2015). An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. MethodsX, 2, 385–391.

Du, F., Liu, YQ., Xu, YS., …, Sun, X.-M.. (2021). Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microb Cell Fact,* 20, 189.

Dunn, J. J., Studier, F. W. & Gottesman, M. (1983). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. J. Mol. Biol. 166, 477–535.

Edelheit, O., Hanukoglu, A., Hanukoglu, I. (2009). Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. BMC Biotechnol, 9, 61.

Griko, N., Candas, M., Bulla, L. A. (2001). Expression and purification of insect cadherin ectodomain using the pTriEx-2 multisystem vector in Origami and Tuner cells. Sigma-Aldrich inNovations Newsletter, 13, 6-7.

Grossman, T. H., Kawasaki, E. S., Punreddy, S. R., Osbourne, M. S. (1998). Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. Gene, 209, 95-103.

Kelley, K. C., Huestis, K. J., Austen, D., …, Osbourne, M., S. (1995). Regulation of sCD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in Escherichia coli. Gene, 15, 33-36.

Kudla, G., Murray, A. W., Tollervey, D. & Plotkin, J. B. Coding-sequence determinants of gene expression in Escherichia coli. Science 324, 255–258 (2009).

Kuo, H.- H., Gao, X., DeKeyser, J.- M., …, Burridge, P. (2019). Negligible-Cost and Weekend-Free Chemically Defined Human iPSC Culture. BioRxiv, 685503.

Liu, H., Naismith, J. H. (2008). An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. BMC Biotechnol. 8, 91.

Lopez, P. J., Guillerez, J., Sousa, R. & Dreyfus, M. (1997). The low processivity of T7 RNA polymerase over the initially transcribed sequence can limit productive initiation in vivo. J. Mol. Biol. 269, 41–51.

Macek, B., Forchhammer, K., Hardouin, J., Weber-Ban, E., Grangeasse, C., Mijakovic, I. (2019). Protein post-translational modifications in bacteria. Nat Rev Microbiol 17, 651–664.

Mahmoud, K. (2007). Recombinant protein production: strategic technology and a vital research tool. Res J Cell Mol Biol 1, 9-22.

Moffatt, B. A., Studier, F. W. (1987). T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. Cell 49, 221–227.

Novy, R., Morris, B. (2001). Use of glucose to control basal expression in the pET System. Sigma-Aldrich inNovations Newsletter, 13, 8-10.

Overton, T. W. (2014). Recombinant protein production in bacterial hosts. Drug Discov., 19(5), 590-601.

Peränen, K., Rikkonen, M., Hyvönen, M., Kääriäinen, L. (1996). T7 vectors with modified T7lac promoter for expression of proteins in *Escherichia coli*. Anal. Biochem., 236, 371-373.

Reeve, B., Hargest, T., Gilbert, C. & Ellis, T. (2014). Predicting translation initiation rates for designing synthetic biology. *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2, 1.

Romito, A., Cobellis, G. (2016). Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions. Stem cells international, 9451492.

Scharff, L. B., Childs, L., Walther, D. & Bock, R. (2011). Local absence of secondary structure permits translation of mRNAs that lack ribosome-binding sites. PLoS Genet. 7.

Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. Commun. Biol., 3, 214.

Structural Genomics Consortium., Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques., Berkeley Structural Genomics Center. …, SPINE2-Complexes. (2008). Protein production and purification. Nat. Methods 5, 135–146.

Studier, F. W.. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. J. Mol. Biol., 219, 37-44.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell, 131(5), 861-872.

Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 126(4), 663–676.

Walsh, G. (2010). Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. Drug Discov, 15, 773-780.

Yu Z., Zheng H., Zhao X., Li S., Xu J., Song H. (2016). High level extracellular production of a recombinant alkaline catalase in *E. coli* BL21 under ethanol stress and its application in hydrogen peroxide removal after cotton fabrics bleaching. Bioresour Technol, 303.

Zheng, H., Yu, Z., Shu, W., …, Song, H. (2019). Ethanol effects on the overexpression of heterologous catalase in Escherichia coli BL21 (DE3). Applied Microbiology & Biotechnology, 103(3), 1441–1453.

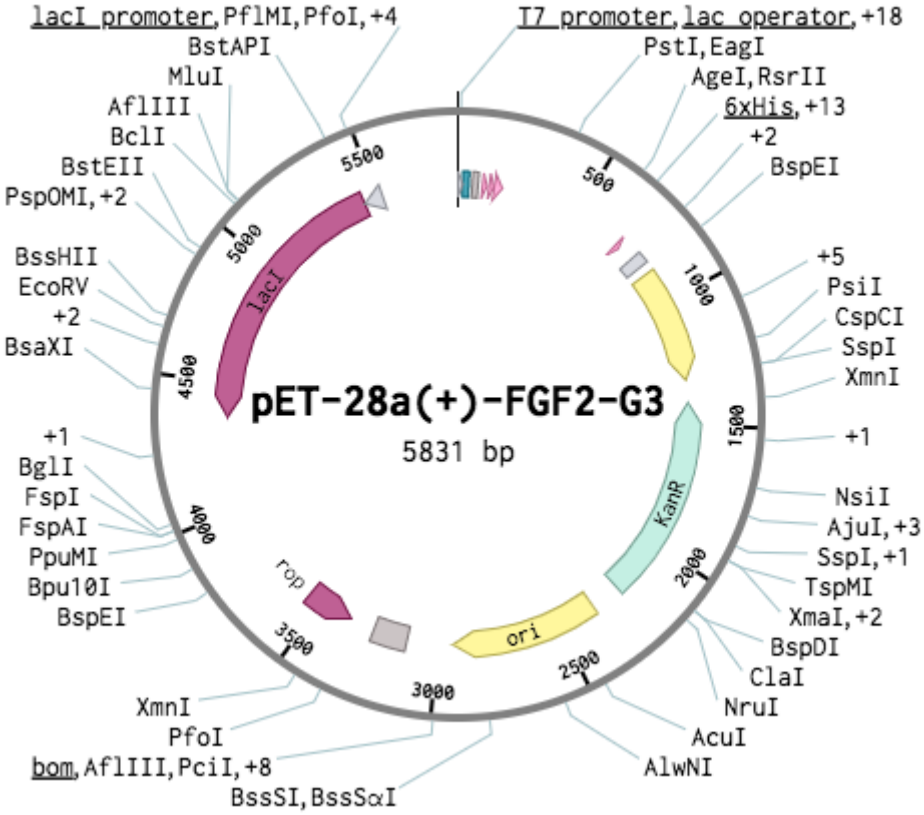
Zhu, J. (20212). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. Biotechnology Advances, 30(5), 1158-1170.

TÖÖS KASUTATUD VEEBIAADRESSID

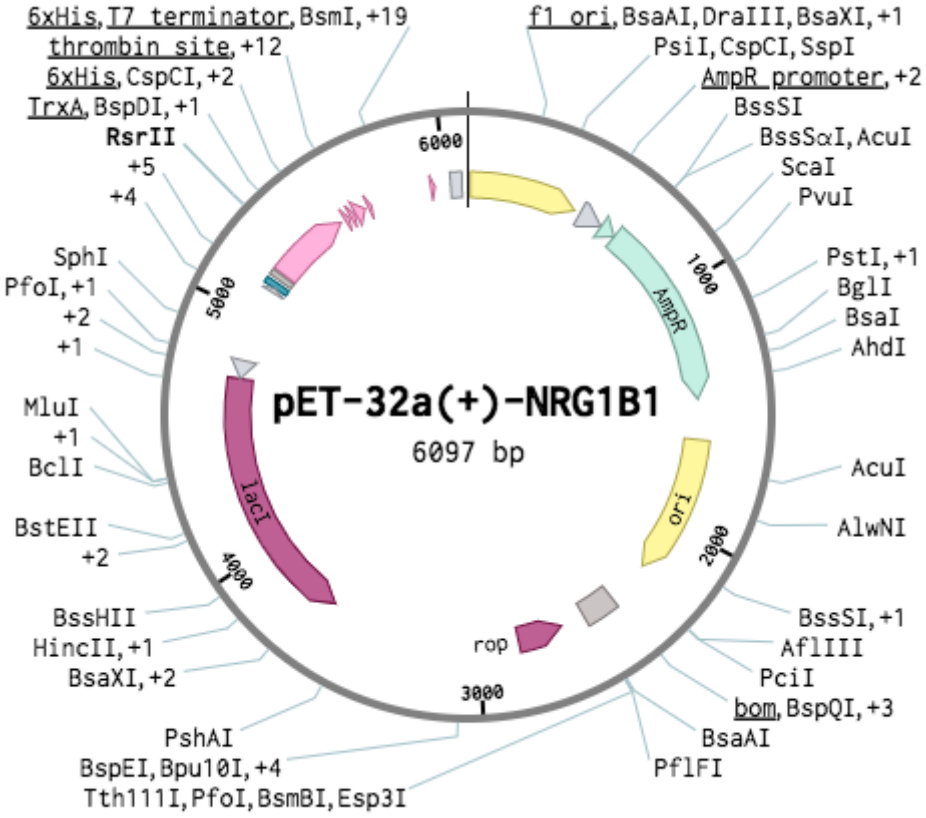
Benchling: https://benchling.com/

LISAD

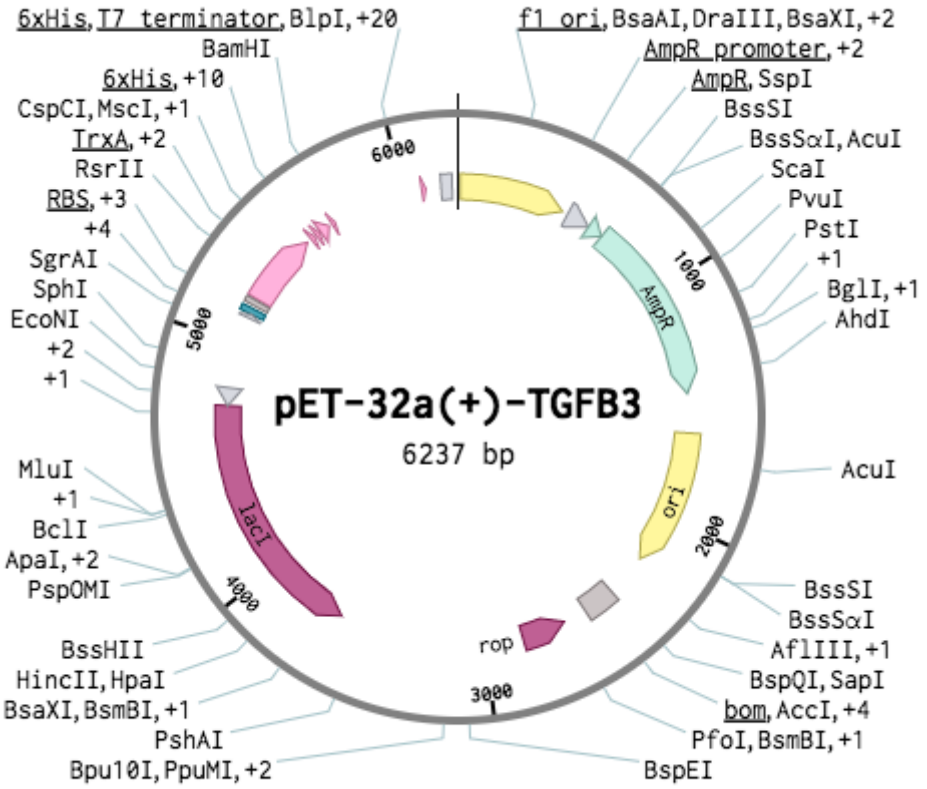
Lisa 1. Töös kasutatud plasmiidid



Joonis L1. pET-28a(+)-FGF2-G3.



Joonis L2. pET-32a(+)-NRG1B1.



Joonis L3. pET-32a(+)-TGFB3.

Lisa 2. RF1 ja RF2 koostis

Tabel L1. RF1 koostis.

Rubiidiumkloriid	1,21 g
Mangaan(II)kloriidtetrahüdraat ($MnCl_2*4H_2O$)	0,99 g
Kaaliumatsetaat	0,294 g
Kaltsiumkloriidi dihüdraat ($CaCl_2*2H_2O$)	0,148 g
Glütserool	15 g/ 12 ml

Lõplik pH reguleeriti äädikhappega väärtusele 5,8.

Lõppruumala viidi 100 ml-ni.

Tabel L2. RF2 koostis.

MOPS	0,105 g
Rubiidiumkloriid	0,06 g
Kaltsiumkloriidi dihüdraat ($CaCl_2*2H_2O$)	0,55 g
Glütserool	7,5 g/ 6 ml

Lõplik pH reguleeriti naatriumhüdroksiidiga väärtusele 6,8.

Lõppruumala viidi 50 ml-ni.

Lisa 3. Suunatud mutageneesi katsed.

Tabel L3. PCR-i käigus tehtava suunatud mutageneesi tulemused. Tabelis on märgitud, millist mutatsiooni üritati tekitada ja mis oli katse tulemus. X tähistab katseid, kus ei olnud transformatsiooni järgselt ühtegi kolooniat. Numbrid märgivad, mitu kolooniat sekveneerimisele saadetud kolooniatest olid õige mutatsiooniga.

	FGF2G3 T7	FGF2G3 TIR	FGF2G3 T7+ TIR	NRG1B1 T7	TGFB3 T7
1. katse		X		X	X
2. katse	X				
3. katse	X				
4. katse	4/4				
5. katse		0/2	0/2	0/2	0/2
6. katse		3/3	3/3	0/3	1/3
7. katse				0/4	
8. katse				4/6	

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.

Mina, Katariina Kordemets,
(sünnikuupäev 04.10.2000)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose "Valgueksрressiooni optimeerimine pET-plasmiididelt", mille juhendaja on PhD Tõnis Org, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Katariina Kordemets
26.05.22